



Ausschliessungspatent

Erteilt gemaeß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

210 076

Int.Cl.³

3(51)

C 12 Q

1/02

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) AP C 12 Q/ 2529 957
(31) 822473

(22) 12.07.83
(32) 12.07.82

(44) 30.05.84
(33) FI

(71) siehe (73)
(72) FALCK, KAI;FI;
(73) LABSYSTEMS OY;HELSINKI, FI

(54) VERFAHREN ZUR DURCHFUEHRUNG EINER MUTAGENITAETSPRUEFUNG

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Durchführung einer Mutagenitätsprüfung für die Anwendung in der chemischen und pharmazeutischen Industrie, insbesondere auf dem Gebiet des Arbeits- und Umweltschutzes. Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens, mit dem die Mutagenitätsprüfung auf einfache Weise und in kurzer Zeit durchgeführt werden kann. Erfindungsgemäß wird eine Zellpopulation einem Mutagen ausgesetzt. Im Ergebnis dessen mutiert ein Teil der Population, während die ursprünglich uniforme Zellpopulation in Subpopulationen unterteilt wird. Die durch die Erhöhung der Dichte der unterteilten Zellpopulationen hervorgerufene Variation der Turbidität wird als Veränderung in der optischen Dichte mittels eines vertikal messenden Photometers bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen, und die Quantität der Zellen in den Subpopulationen wird als optische Dichte gemessen. Die Absorptionswerte werden in Übereinstimmung mit einem vorprogrammierten Zeiteilungssystem gemessen und die Wachstumskurve wird aus den Werten als Funktion der Zeit gebildet.

Verfahren zur Durchführung einer Mutagenitätsprüfung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Durchführung einer Mutagenitätsprüfung dergestalt, daß eine Zellpopulation einem Mutagen ausgesetzt wird, wobei im Ergebnis dessen ein Teil der Population mutiert, worauf die ursprünglich uniforme Zellpopulation in Subpopulation unterteilt wird.

Die Mutagenitätsprüfung dient der raschen vorläufigen Prüfung von der krebserregenden Wirkung verdächtigten Substanzen, zumal in bakteriellen Mutagenitätsprüfungen festgestellt worden ist, daß mindestens 90 % der bekannten Kanzerorgene ebenfalls Mutagene sind. Neben der Bearbeitung von biologischen Proben ist es möglich, beispielsweise anhand der mutagenen Aktivität von Urin festzustellen, ob eine betreffende Person möglicherweise mutagenen Substanzen ausgesetzt worden ist, welche somit potentiell eine Krebsgefahr verursachen können.

Neben Luft-, Wasser- und Nahrungsmittelproben ist es möglich, in der Umwelt vorhandene Mutagene wie auch beispielsweise mögliche Spuren von mutagenen Pestiziden usw. in Nahrungsmitteln festzustellen.

Die Mutagenitätsprüfung ist in einem ständig zunehmendem Ausmaß ein Teil der gesetzlich vorgeschriebenen toxikologischen Analyse eines Produktes oder Äquivalentes. Einige der wichtigsten Nutzer dieser Tests sind gegenwärtig die pharmazeutische und chemische Industrie. Ein spezifisches Anwendungsgebiet liefern die Behörden für Umwelt- und Arbeits-

schutz, die gewöhnlich komplexe Proben zu untersuchen haben, welche mehrere unterschiedliche Chemikalien enthalten. Entsprechend der sich ausweitenden Gesetzgebung zum Schutze der Verbraucher werden beispielsweise auch Lebensmittel und deren Additive in den Geltungsbereich von Mutagenitätsuntersuchungen einbezogen. In diesem Zusammenhang kann ein Problem durch die in den genannten Produkten enthaltenen Wachstumsfaktoren aufgeworfen werden; diese Faktoren können die mit Hilfe herkömmlicher Mutagenitätsprüfungen erzielbaren Resultate verzerren.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Im Rahmen des bisherigen Standes der Technik ist für die Prüfung der Mutagenität ein mikrobiologischer Fluktuationstest angewendet worden. Der Fluktuationstest ist ein Zweistufentest der bakteriellen Mutagenität, der sich zur Prüfung niedriger, nichttoxischer Mutagenkonzentrationen eignet. In der ersten Teststufe, welche 18 bis 20 h in Anspruch nimmt, findet die etwaige Mutation statt; dem folgt eine dreitägige Selektion in einem von Wachstumsfaktoren freien Wachstums-Nährmedium.

Da die Prüfung in einem flüssigen Medium stattfindet, in welchem Versuche unternommen werden, jede originale Mutante zu isolieren, so ergibt sich aus der obigen Anforderung, daß die Durchführung der Prüfung eine große Anzahl von Reagenzgläsern notwendig macht. Je mehr Reagenzgläser je Probe verfügbar sind, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, daß die erzeugten Original-Mutanten jeweils in ihrem eigenen Reagenzglas isoliert werden können.

Die Beobachtung der Mutation beruht auf einem pH-Indikator, da die mutierten Zellen während des Wachstums im Selektionsnährboden saure Fermentationsprodukte ausscheiden.

Der mikrobiologische Fluktuationstest ist einer der empfindlichsten Mutagenitätstests, die bis jetzt entwickelt worden sind. Der sog. Ames-Test, welcher der in breitem Maße angewandte bakterielle Mutagenitätstest ist, erfordert um etwa das 10- bis 100fache höhere Mutagen-Konzentrationen, um im Vergleich zum Fluktuationstest eine ähnlich positive Reaktion zu erbringen.

Ein Nachteil des Fluktuationstests ist seine Sensitivität gegenüber den toxischen Wirkungen sowie den Wachstumsfaktoreffekten der Substanz; ein Nachteil ist des weiteren der mit dem Test verbundene große Arbeitsaufwand. Pro einer Probe werden mindestens 50 Reagenzgläser verwendet; ist die Probe hinsichtlich ihrer toxischen Eigenschaften unbekannt, so sind bis zu acht unterschiedliche Verdünnungen der genannten Probe erforderlich, um nichttoxische, aber nach Möglichkeit noch mutagene Konzentrationsbereiche zu erzielen. In einem solchen Fall kann die Gesamtzahl an Reagenzröhrchen bis zu 400 Stück je Probe betragen. Unter Einbeziehung sämtlicher Arbeitsschritte erfordert die Durchführung des Tests etwa 30 min pro Verdünnung (50 Reagenzgläser), was die Anzahl der zu analysierenden Proben beträchtlich einschränkt. Die an den darauffolgenden Tagen durchzuführende Mutagenisierung und Selektion beschränkt die Start-Tage des Tests auf lediglich die Montage und Donnerstage, wenn ein Arbeiten während der Wochenenden vermieden werden soll. Ein Nachteil der manuell durchgeführten Mutagenitätsprüfung sind die hohen Kosten.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens, mit dem die Mutagenitätsprüfung schnell und auf einfache Weise durchgeführt werden kann.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, das Wachstum der Zellkultur durch Trübungsmessung zu verfolgen.

Das Verfahren entsprechend der vorliegenden Erfindung ist hauptsächlich dadurch gekennzeichnet, daß die durch die Steigerung der Dichte der differenzierten Zellpopulationen verursachte Variation der Trübung mittels eines Fotometers als eine Veränderung der optischen Dichte gemessen wird, wobei bei einer bestimmten Wellenlänge in vertikaler Richtung gemessen wird und wobei die Zellquantität in den Subpopulationen als optische Dichte bestimmt wird.

Vermittels eines vertikal messenden Fotometers ist es möglich, die Zellquantität in einer Bakterienpopulation präzise als optische Dichte zu messen, wobei das Meßergebnis durch Sedimentation der Zellen oder durch Variationen des Flüssigkeitsvolumens nicht beeinträchtigt wird. Außer vermittelt eines Fotometers kann die Messung auch unter Zuhilfenahme eines vertikal messenden Fluorometers, Nephelometers, Luminometers oder auch irgendeines anderen Apparates vorgenommen werden, der imstande ist, eine Variation im Wachstum der Zellpopulationen zu registrieren.

Eine ursprünglich uniform auxotrophe Zellpopulation kann

durch die Wirkung eines Mutagens genetisch in auxotrophe und prototrophe Subpopulationen differenziert werden. Durch Beobachten des Wachstums der genannten Populationen vermittels eines Fotometers, welches in einer üblichen Küvette stattfinden kann, ist es möglich, aus der in Abhängigkeit von der Zeit aufgestellten Wachstumskurve beispielsweise die Mutagenität der Probe, Toxizität, Art der Toxizität (Bakteriostatikum, Bakterizid), die Zersetzung einer toxischen Verbindung während des Tests wie auch etwaig in der Probe vorhandene Wachstumsfaktoren sowie Wachstumsgeschwindigkeiten der auxotrophen und prototrophen Zellen herauszufinden. Um diese Parameter herauszufinden, ist es nicht erforderlich, die Probe an sich oder auch die Prüforganismen zu beeinträchtigen.

Um die spontane Mutationshäufigkeit festzustellen (den sog. Hintergrund), benötigt man eine der Prüfprobe entsprechende Probe, welche allerdings keine Mutagene enthält. Die Handhabbarkeit des Verfahrens wird durch eine entsprechende Probe unterstützt, welche bekannte Mutagene enthält. Je nach der zu untersuchenden unbekannt Probe ist es möglich, mehrere Paralleluntersuchungen und/oder Verdünnungen der Probe vorzunehmen.

In einem mikrobiologischen Mutagenitätstest ist es möglich, genetisch genau gekennzeichnete aminosäure-auxotrophe Einzelmarker-Bakterienstämme zu verwenden. Eine durch Mutation hervorgerufene Veränderung im Genotyp wird als phänotypisch veränderte Wachstumsfaktor-Anforderungen nachgewiesen, so daß jene Zellen, die einen korrekten Mutationstyp erlangt haben, von der Wirkung der Wachstumsfaktor-Aminosäuren befreit wurden.

Im Test wird die ursprünglich genetisch uniforme Bakterienpopulation Mutagenen ausgesetzt. Im Ergebnis dessen mutiert

ein Teil der Population von auxotroph zu prototroph. Die Zunahme der Trübung der auf diese Weise differenzierten Subpopulationen kann spektrofotometrisch im subminimalen Wachstumsmedium vermittels eines FP-901-Fotometers durch vertikale Messung beobachtet werden, wobei Veränderungen des Flüssigkeitsvolumens wie auch Sedimentation der bakteriellen Zellen das Extinktions-Meßergebnis nicht beeinträchtigen. Ein Fotometer des Typs FP-901 ist beispielsweise in der veröffentlichten DE-OS 2 451 769 beschrieben.

Nachdem sämtliche Wachstumsfaktor-Aminosäuren verbraucht worden sind, sind lediglich jene Zellen in der Lage, ihr Wachstum fortzusetzen, welche die Mutation erwarben. Je größer die im Startmoment des Tests induzierte Population der mutanten Zellen ist, desto rascher erreichen sie eine spektrofotometrisch meßbare Dichte. Die vom Testbeginn bis Moment des Nachweisens verstreichende Zeit verhält sich umgekehrt proportional zu der in der Probe enthaltenen mutagenen Aktivität. Die auf der Basis der Extinktion aus dem Wachstum der Populationen gewonnene grafische Darstellung, die sog. Wachstumskurve, informiert nicht nur über die Mutagenität der Probe, sondern auch über etwaig in der Probe enthaltene Wachstumsfaktoren.

Die Vorteile des Verfahrens gegenüber früheren Tests sind folgende:

1. Geschwindigkeit: Das Prüfergebnis wird in weniger als 24 h erhalten. Beim Ames-Test vergehen bis zum Ergebnis-Ausstoß 24 h; beim Fluktuationstest sind es 96 h.

2. Niedrigerer Verbrauch an Probenmaterial und Reagenzien, da beim turbidimetrischen Verfahren das Gesamt-Testvolumen kleiner ist.
3. Materialökonomie: Beim turbidimetrischen Verfahren wird eine Probe in einer Küvette analysiert, wohingegen im Ames-Test mindestens 6 Petri-Schalen und im Fluktuationstest mindestens 150 Reagenzröhrchen pro Probe benötigt werden.
4. Ökonomie hinsichtlich der Arbeitsmenge: Das turbidimetrische Verfahren kann vermittels des FP-901-Systems vollständig automatisiert werden. Die je Probe benötigte Zeit beträgt etwa 20 s. Im Ames-Test werden je Probe mindestens 20 min benötigt, und im Fluktuationstest beträgt der Zeitaufwand je Probe etwa 1,5 h.
5. Die Startzeit kann während der Arbeitswoche frei gewählt werden. Ein turbidimetrischer Test dauert weniger als 24 h, wohingegen die durch den Ames-Test benötigten 48 h die Startzeit auf die Periode von Montag bis Mittwoch begrenzen; beim Fluktuationstest ist es lediglich am Montag und Donnerstag möglich, den Test zu starten, sofern nicht über das Wochenende gearbeitet wird.
6. Sensitivität: Das turbidimetrische Verfahren ist theoretisch der höchstmöglich sensitive Test der bakteriellen Mutagenität. Durch seine Anwendung ist es sogar möglich, das Entstehen von 1 induziertem Zurückkehrer nachzuweisen. Das Niveau der spontanen Rückkehr der Null-Kontrolle liegt gewöhnlich unter 1 pro Probe. Eine induzierte zurückkehrende Zelle wird in etwa 10 h als Trübungswachstum nachgewiesen, wenn die Erzeugungszeit etwa 40 min beträgt.

7. Der turbidimetrische Mutagenitätstest ist der einzige Mutagenitätstest, bei dem auch zwischen Testbeginn und Testende Informationen gewonnen werden, ohne daß dabei in die Probe eingegriffen werden muß. Beim Ames-Test ist es möglich, die akute Toxizität der Probe zu bestimmen, wobei dies aber den für die Testdurchführung erforderlichen quantitativen Arbeitsaufwand verdoppelt. Andererseits werden im Fluktuationstest Versuche unternommen, die Toxizität vermittels ausgedehnter Reihen von Verdünnungen zu eliminieren.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nunmehr in ihren Details ausführlicher unter Bezug auf die beigelegten Zeichnungen beschrieben, wobei die Abbildungen 1 bis 3 verschiedene Wachstumskurven, d. h. Extinktionswerte in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf darstellen, wobei die Extinktionswerte im logarithmischen Maßstab dargestellt sind.

Der turbidimetrische Test der bakteriellen Mutagenität beruht mithin auf einer durch ein Mutagen induzierten Differenzierung einer ursprünglich genetisch uniformen Zellpopulation in auxotrophe und prototrophe Subpopulationen sowie auf der Beobachtung einer Veränderung in der Trübung dieser Subpopulationen.

Bei den im Test verwendeten Organismen handelt es sich um *E. coli* WP2 (trp^-) und *Salmonella typhimurium* (his^-) oder irgendwelche andere geeignete aminosäure-auxotrophe Einzelmarker-Stämme. Das Wachstum und die Differenzierung der Zellpopulationen werden unter Einsatz eines FP-901-Spektrofotometers beobachtet, welches vertikal mißt, wobei Veränderungen

im Flüssigkeitsvolumen wie auch der Sedimentation der Zellen das Extinktions-Meßergebnis nicht beeinträchtigen. $A = E \frac{m}{a}$ (Suovaniemi, O., "Performance and Properties of the Finn-pipette Analyzer System", Tagungsberichte des Zweiten nationalen Meetings zur Biophysik und Biotechnologie in Finnland, 1976, S. 183 - 187, herausgegeben von A.-L. Kairento, E. Riihimäki und P. Tarkka; und Suovaniemi, O. und Järnefelt, J., "Discrete Multichannel Analyzing Systems with a Vertikal Optical Path and Batch Processing", 1982, International Laboratory, im Druck).

Der Test und das Wachsen der Zellen finden in einer +37 °C-Inkubator-kassette, in einem 9 x 1 ml-Küvetten-satz statt, eine Küvette pro Probe, in subminimalem flüssigem Nährmedium entweder nach Davis-Mingioli oder nach Vogel-Bonner. Die ursprüngliche Größe der Zellpopulation beträgt 5×10^6 , wobei diese als ihre eigene Nullvariante im FP 901 eingesetzt wird, worauf das Wachstum der Zellen eine Veränderung der Extinktion $dA_{405}/10^6$ Zellen - 0,001 hervorruft. Im Mutagenisierungsstadium werden die Zellen durch die Wirkung des Wachstumsfaktors fünfmal auxotroph unterteilt. Nachdem der gesamte Wachstumsfaktor verbraucht worden ist, ist das Wachstum der auxotrophen Zellen zu einem Ende gekommen, während jedoch jene Zellen, die zu prototrophen Zellen mutiert haben, ihr Wachstum fortsetzen. Je höher der Anteil prototropher Zellen an der Gesamtpopulation ist, desto rascher erreichen sie eine meßbare Dichte.

Im Falle von nichttoxischen Proben kann die Nachweisdauer direkt als ein Maß der mutagenen Aktivität genutzt werden. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit des Prüforganismus variiert

- 10 -

die Zeitdauer der Testdurchführung; im Falle von *E. coli* und *S. typhimurium* geht sie nicht über 24 h hinaus.

Die aus den Extinktionswerten als Ergebnis erhaltene Kurve ist eine typische Illustration von diauxischem Wachstum.

In Abbildung 1 entspricht die Kurve 1 dem ungehemmten Wachstum (nichttoxisch, Überlebensrate 100 %); Kurve 2 entspricht einer Überlebensrate von 80 %; Kurve 3 entspricht einer Überlebensrate von 50 %; und Kurve 4 entspricht einer Überlebensrate von 20 %. Der Anteil toter Zellen kann aus der Formel

$$b = n - \frac{1}{2^{\tau/gt}}$$

berechnet werden, in welcher

- n Anteil der ursprünglichen Population (1,000) ist,
- t die von jenem Moment an verstreichende Zeit ist, bei dem der 0-Pegel überschritten wird (t_{0+} , t_1 , t_{2+})
- gt die Erzeugungszeit ($t_1 - t_0$) ist.

In Abbildung 2 repräsentiert Kurve 5 das ungehemmte Wachstum, Kurve 6 repräsentiert ein Bakterizid (Todesrate 50 %), die Kurven 7 und 8 repräsentieren nichtzersetzte Bakterio-
statika, und Kurve 9 repräsentiert ein zersetzendes Bakterio-
statikum.

In Abbildung 3 repräsentiert $l_1 - l_0$ (= a) das Teilen des Wachstumsfaktors.

Außer einer grafischen Darstellung des diauxischen Wachstums können die folgenden Faktoren bestimmt werden:

1. Die Toxizität der Probe aus dem Startmoment des I log Stufe (Abbildung 1).
2. Die Natur der Toxizität der Probe (Bakterizid, Bakterio-
statikum, zersetzendes Bakterio-
statikum) aus der Form der
Wachstumskurve des Stufe I log (Abbildung 2).
3. Die Wachstumsrate der nicht zurückgekehrten Zellen, aus
der Größe des Winkelfaktors der Wachstumskurve des Stufe
I log (Abbildung 3).
4. Die Wachstumsrate der Zurückkehrer, aus der Größe des
Winkelfaktors des Stufe II log (Abbildung 3).
5. Die etwaig in der Probe vorhandenen Wachstumsfaktoren,
aus der Größe der Extinktion im I-Plateau-Stadium. Die
Anzahl der durch die Wachstumsfaktoren zusätzlich her-
vorgerufenen Rückkehrer ergibt sich aus der Formel
 $Fp. = 2^{g-1} \times g \times r$, in welcher $Fp.$ = zusätzliche Rück-
kehrer nach Verbrauch von zusätzlichem Wachstumsfaktor,
 g = Anzahl der Zellgenerationen, r = Quantität der pro
Generation produzierten Rückkehrer \times Populationsgröße;
 Z = Rückkehrer (r) pro Generation (g) \times Populations-
größe (s)

 $l_0 = \text{Überschuß-Startpegel} = D_1 - D_0 = s$
 $l_1 = \text{Überschuß-Finalpegel} = D_2 - D_0$
 $g = \text{Anzahl Zellgenerationen} =$
 $D_1 - D_0 / D_2 = k_1 / t_{5+} - t_0 - k_1 / t_5 - t$
6. Mutagenität der Probe, aus der Länge der Plateau-Stufe I
(Abbildung 3).

- 12 -

7. Anzahl der Rückkehrer im Moment t_0 durch Extrapolation unter Nutzung der Wachstumsraten der Stufen II log und I log.

D = nachgewiesene Größe der finalen Population

$a = k_1/t_5 - t_0$ = Anzahl der Teilungen in der Stufe log I

$b = k_2/t_{n+2} - t_5$ = Anzahl der Teilungen in den Stufen Plateau I und log II

X = Anzahl der Rückkehrer zum Zeitpunkt t_0 .

$$X = \frac{D}{2^a + 2^{a+b}}$$

Testdurchführung

Wachstumsmedium	965 μ l
Bakterienzellen	5 μ l
Probe	10 μ l

Metabolisches Aktivierungssystem (S-9) 20 μ l (sofern erforderlich)

Die obigen Komponenten werden in einer 1-ml-Küvette zusammengefaßt, 15 s lang vermittelt eines Schüttelapparates verrührt, in eine +37 °C-Inkubator Kassette eingebracht, bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem FP 901 auf Null eingestellt und anschließend 20 bis 24 h lang bebrütet, während die Extinktion der Probe bei 405 nm entsprechend einem vorprogrammierten Zeitteilsystem gemessen wird.

Aus den Extinktionswerten wird in Abhängigkeit von der Zeit eine Wachstumskurve aufgestellt, aus welcher die Mutagenität der Probe sowie mehrere andere Parameter interpretiert werden können.

Der turbidimetrische Test der bakteriellen Mutagenität eignet sich für sämtliche Typen der Mutagenitätsprüfung, bei denen es darauf ankommt herauszufinden, ob die betreffende Probe imstande ist, mit DNS in einer Mutationen hervorrufenden Weise zu reagieren.

Tabelle 1

Trübungs-Unterscheidungskraft von FP-901 $A_{405 \text{ nm}} n = 9$

Dichte 10^6	$A_{405} \pm$ S.D.	S.D./ A_{405} (%)	$A_{405}/10^6$ Zellen
5	0,000 0,000	-	-
20	0,021 0,004	19	0,001
40	0,046 0,007	15	0,001
60	0,062 0,006	10	0,001
80	0,076 0,002	2,6	0,001
160	0,159 0,010	6,0	0,001
240	0,239 0,010	4,2	0,001
320	0,326 0,015	4,6	0,001
400	0,405 0,018	4,4	0,001
480	0,486 0,020	4,1	0,001
560	0,562 0,022	3,9	0,001
640	0,638 0,015	2,4	0,001
720	0,706 0,015	2,1	0,001
800	0,772 0,014	1,8	0,001
880	0,833 0,012	1,4	0,001
960	0,890 0,009	1,0	0,001
1040	0,938 0,011	1,2	0,001
1120	0,990 0,010	1,0	0,001

Tabelle 2

Effekt von Wachstumsfaktoren auf Dichte und auxotrophe Wachstumszeit von *E. coli* WP 2 uvrA. Größe der ursprünglichen Population 5×10^6 Zellen.

<u>Trp-Konz. /μg/ml</u>	<u>Dichte/Messküvette</u>	<u>Wachstumszeit</u>
0,0	$2,5 \times 10^7$	2 h 20'
0,4	$1,6 \times 10^8$	5 h
0,8	$2,0 \times 10^8$	5 h 20'
1,6	$3,2 \times 10^8$	6 h
3,2	$6,4 \times 10^8$	7 h
6,4...48	n. 10^9	8 h 20'

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Durchführung einer Mutagenitätsprüfung dergestalt, daß eine Zellpopulation einem Mutagen ausgesetzt wird, wobei im Ergebnis dessen ein Teil der Population mutiert, worauf die ursprünglich uniforme Zellpopulation in Subpopulationen unterteilt wird, gekennzeichnet dadurch, daß die durch die Veränderung der Dichte der unterteilten Zellpopulationen hervorgerufene Variation der Turbidität als Veränderung der optischen Dichte mittels eines vertikal messenden Photometers bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen wird und die Quantität der Zellen in den Subpopulationen als optische Dichte gemessen wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das Wachstum der unterteilten Zellpopulationen mittels eines vertikal messenden Photometers, Fluorometers, Nephelometers oder Luminometers gemessen wird.
3. Verfahren nach den Punkten 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß die Absorptionswerte in Übereinstimmung mit einem vorprogrammierten Zeiteilungssystem gemessen werden und daß die Wachstumskurve aus den Werten als Funktion der Zeit gebildet wird.