CH 678065 A5

(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) CH 678065 A5

(51) Int. Cl.[5]: C 12 Q 1/0
C 12 Q 1/3
C 12 Q 1/6

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) PATENTSCHRIFT A5

(21) Gesuchsnummer: 1357/88

(22) Anmeldungsdatum: 13.04.1988

(24) Patent erteilt: 31.07.1991

(45) Patentschrift veröffentlicht: 31.07.1991

(73) Inhaber:
Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz

(72) Erfinder:
Schram, Eric, Linkebeek (BE)

(74) Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich

(54) Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Adenosin-triphosphat in biologischem Material und Enzym zur Durchführung dieses Verfahrens.

(57) Es wird ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Adenosin-Triphosphat, ATP, in biologischem Material beschrieben, welches lebende somatische Zellen und/oder lebendes Mikroorganismenzellen enthält. Das ATP wird aus den lebenden somatischen und den lebenden mikrobiellen Zellen in getrennten Arbeitsschritten extrahiert und durch eine biolumineszente Reaktion beschrieben.

Die Extraktion des ATP's aus den lebenden somatischen Zellen erfolgt in einem getrennten Arbeitsschritt vor der Extraktion des ATP's aus den lebenden mikrobiellen Zellen. Somit ist eine getrennte Bestimmung der somatischen und der mikrobiellen Zellen möglich. Bei dem Verfahren wird ein Lipid zur Verhinderung der Inaktivierung der biolumineszenten Reaktion und/oder der ATP-Hydrolyse-Reaktion durch Detergentien zugegeben, die zur Extraktion des ATP's aus den somatischen Zellen herangezogen werden.

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Adenosin-triphosphat, abgekürzt als ATP, in biologischem Material, welches lebende somatische Zellen und/oder lebende mikrobielle Zellen enthält. Bei diesem Verfahren erfolgt die Extraktion des Adenosin-triphosphates aus den lebenden somatischen Zellen, beziehungsweise aus den lebenden Mikroorganismenzellen, in voneinander getrennten Verfahrensschritten, und die Menge des extrahierten ATP's wird durch seine Biolumineszenzreaktion bestimmt. Die bevorzugt angewandte biolumineszente Reaktion ist diejenige, die in der Natur bei Leuchtkäfern (englische Bezeichnung fire-fly, lateinische Bezeichnung Photinus Pyralis) anzutreffen ist.

Mit Hilfe des erfindungsgemässen Verfahrens, können in dem biologischen Material zwei Arten von lebenden Zellen unterschieden werden, nämlich

1) Mikroorganismen: z.B. Bakterien (Durchmesser 1 Mikrometer, ATP-Gehalt 10^{-15} g)
2) Somatische Zellen: z.B. Blutzellen (Durchmesser 10 Mikrometer, ATP-Gehalt 5×10^{-13} g).

Um in biologischen Materialien das aus den Mikroorganismen stammende ATP bestimmen zu können, muss vorgängig das ATP der allenfalls vorhandenen somatischen Zellen, beziehungsweise die somatischen Zellen selbst, zerstört werden.

Um in lebendigen Zellen enthaltenes ATP bestimmen zu können, muss dieses zuerst aus den Zellen extrahiert werden. Dies soll in einer solchen Art und Weise geschehen, dass endogene Enzyme das extrahierte ATP nicht abbauen können.

ATP kann selektiv aus somatischen Zellen extrahiert werden, indem man ein nicht-ionisches Detergens, welches die Mikroorganismen nicht angreift, zur entsprechend vorbereiteten Probe hinzugibt. Zur Extraktion des ATP aus Mikroorganismen muss ein stärkeres Reagenz verwendet werden, welches die allenfalls vorhandene somatische Zelle ebenfalls angreift. Dazu eignen sich vorzugsweise kationische Detergenzien, insbesondere tertiäre und quaternäre Amine.

Wenn eine Probe eines biologischen Materials sowohl somatische Zellen, d.h. Gewebszellen, als auch lebende mikrobielle Zellen enthält, so wird im allgemeinen zunächst diese Probe mit einem nicht ionischen Detergens behandelt, welches die Membranen der somatischen Zellen angreift, so dass das ATP aus dieser Zelle strömt. Um dieses ATP zu zerstören, fügt man ein Enzym, z.B. ATP-ase, zu. Damit wird ATP in eine Substanz umgewandelt, welche mit Luciferin-Luciferase nicht reagiert. Nachdem diese Behandlung beendet ist, wird eine bekaterizide Substanz, z.B. ein kationisches Detergens, in der Regel ein quaternäres Ammonium-Salz, zugegeben. Dieses Detergens perforiert die Mikroorganismen und setzt aus diesen das ATP frei. Gleichzeitig wird Luciferin-Luciferase zugegeben, und die emitierte Lichtmenge wird mittels einem Luminometer gemessen.

Das für die Zerstörung des aus somatischen Zellen stammenden ATP's verwendete Enzym, muss inaktiviert werden ehe das ATP aus den Mikroorganismenzellen freigesetzt wird.

Bisher war jedoch keine geeignete und wirksame Methode bekannt, um dieses Enzym zu zerstören.

Eine Erwärmung auf den Siedepunkt ist keine praktikable Methode. Ebenso ist eine Hinzugabe von Säuren, z.B. Trichloressigsäure, nicht geeignet, da nachfolgend die Probe neutralisiert werden müsste. Eine mögliche Verdünnung der Probe würde die Empfindlichkeit der Methode herabsetzen.

Ein weiteres Problem, das bisher bei der Bestimmung von Mikroorganismen in biologischem Material auftrat, war dasjenige, dass die kationischen Detergenzien, welche zur Extraktion von ATP aus Mikroorganismen verwendet werden, eine schnelle Inaktivierung des Enzyms bewirken, welches für die Biolumineszenz-Reaktion verantwortlich ist. Der zeitliche Ablauf der Bestimmung (Messung) war daher äusserst kritisch und erschwert somit den Gebrauch eines internen Standards.

Die oben beschriebenen Arbeitsweisen stellen eine kurze Zusammenfassung des nächstliegenden Standes der Technik dar, welcher in den nachfolgend genannten Dokumenten enthalten ist.

I. Die Verwendung von nicht-ionischen Detergenzien für die Extraktion von ATP aus somatischen Zellen ist beschrieben in:
US-PS Nr. 3 745 090 (Chappelle et al.)
US-PS Nr. 4 303 752 (Kolehmainen et al.)
SE Nr. 8 203 564-A (Nilsson et al.).

II. In den beiden oben zitierten US-Patentschriften wird auch die Verwendung von Apyrase für die Zerstörung von ATP, welches aus somatischen Zellen stammt, beschrieben.

III. Die Verwendung von kationischen Detergenzien (quaternäre Ammoniumsalze) ist beschrieben in:
US-PS Nr. 4 303 753 (Kolehmainen et al.)
SE Nr. 7 809 370-A (LKB Produkter AG)
Harber WO 86/07 094.

IV. Die Verwendung von Detergenzien für die Extraktion von ATP ist beschrieben worden von:
– P.E. Stanley, Bioluminescene [2], Methods of Enzymology, Vol. 133, 1986, Seiten 14 bis 22.
– T.J. Franklin and G.A. Snow, Biochemistry of Antimicrobial Action, Second Edition, 1975, Chapman and Hall, London, Seiten 56 bis 63.

V. Die Rolle von Lipiden bezuglich der Aktivität von Luciferase ist vom theoretischen Standpunkt aus studiert worden; siehe
– N.N. Ugarova et al., Biochimica et Biophysica Acta 921 (1987), Seiten 465 bis 472.

VI. Allgemeine Literaturstellen:
– Eric Schram, XI International Congress of Clinical Chemistry, 1982, Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York, Seiten 1013 bis 1022.
– E. Schram, Luminescent Assays: Perspectives in Endocrinology and Clinical Chemistry, edited by M. Serio and M. Pazzagli, Raven Press, New York, 1982, Seiten 1 bis 9 in «Fundamental Aspects of Bioluminescent Reactions Used in Clinical Chemistry».
– Frans Gorus and Eric Schram, Applications of Bio- and Chemiluminescence in the Clinical Labora-

tory, Clinical Chemistry, 25, Seiten 512 bis 519 (1979).
– Prospekt von 3M über Biolumineszenz, Licht in der Mikrobiologie.

Mittels dieser Zitate ist der Inhalt der jeweiligen Publikation als hierin inkorporiert zu betrachten.

Ziel der vorliegenden Erfindung war es, die Nachteile bisher bekannter Verfahren zur Bestimmung von lebenden Mikroorganismenzellen in biologischen Materialien zu vermeiden, welche neben den Mikroorganismenzellen gegebenenfalls noch lebende somatische Zellen enthalten. Überraschenderweise zeigte es sich, dass man die angestrebten Ziele erreichen kann, indem man bei dem Bestimmungsverfahren die in der Folge definierten Arbeitsschritte anwendet.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Adenosin-triphosphat, ATP, in biologischem Material, welches lebende somatische Zellen und/oder lebende mikrobielle Zellen enthält, nach selektiver Extraktion aus den lebenden Zellen und mittels Biolumineszenz, wobei die erzeugte Lumineszenz zu jedem beliebigen Zeitpunkt des Verfahrens gemessen werden kann, und das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man entweder in einer Probe des biologischen Materials sowohl den Gehalt an somatischen als auch mikrobiellen Zellen bestimmt, indem man

a) die Probe des biologischen Materials vorlegt,
b) wenigstens ein Detergens zur Extraktion des ATP's, welches in den somatischen Zellen enthalten ist, hinzugibt,
c) ein Reagenz für die biolumineszente Reaktion vor, während oder nach der in Schritt b) genannten Extraktion des ATP's hinzugibt, die nicht mikrobiellen Zellen durch die erzeugte Lumineszenz quantifiziert,
d) wenigstens ein Lipid zur Verhinderung der Inaktivierung der biolumineszenten Reaktion und/oder der ATP-Hydrolyse-Reaktion des oder der eingesetzten Detergenzien hinzugibt,
e) dem so erhaltenen Gemisch zum Abbau des aus den nicht-mikrobiellen Zellen stammenden ATP's wenigstens ein hydrolytische Spaltungen katalysierendes Enzym hinzufügt, und anschliessend
f) zu dem so erhaltenen Gemisch ein Gemisch, enthaltend wenigstens eine bakterizide Substanz zur Freisetzung des ATP's, welches in den mikrobiellen Zellen enthalten ist, und wenigstens eine Substanz, welche die Aktivität des oben genannten Enzyms inhibiert, aber die biolumineszente Reaktion nicht beeinflusst, hinzugibt, und
g) die mikrobiellen Zellen mittels der erzeugten Biolumineszenz quantifiziert, oder dass man in dem biologischen Material nur die mikrobiellen Zellen quantifiziert, indem man nach dem Verfahrensschritt (c) keine Bestimmung der Biolumineszenz vornimmt, sondern gleich anschliessend die Schritte d), e), (f) und (g) des Verfahrens durchführt.

Als Beispiele für biologische Materialien, in denen mit Hilfe des erfindungsgemässen Verfahrens auch in Anwesenheit von lebenden somatischen Zellen die lebenden Mikroorganismenzellen bestimmt werden können, sind biologische Flüssigkeiten, die insbesondere in Form einer Suspension, vorzugsweise in Form einer wässrigen Suspension, vorliegen, wobei das biologische Material vorzugsweise aus der Gruppe ausgewählt ist, welche die folgenden Produkte umfasst:

Urin menschlichen oder tierischen Ursprungs, Blut menschlichen oder tierischen Ursprungs, Milch menschlichen oder tierischen Ursprungs, Fruchtsäfte, Bier, Wein, Fleischextrakte, Klärschlamm, Wasser und Zellkulturen. Das entsprechende biologische Material kann jedoch auch eine Bodenprobe, ein Nahrungsmittel oder ein Textilmaterial sein.

Bevorzugte Detergentien, die bei der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens im Verfahrensschritt (b) zur Extraktion des ATP's aus den somatischen Zellen zugegeben werden, sind nichtionische Detergentien, insbesondere solche auf Basis eines Äthers mit Polyoxyäthylenkette und eines längerkettigen Alkyl- oder Alkylphenylrestes, wie die Produkte, die im Handel unter den Markenbezeichnungen «Triton» und «Lubrol» erhältlich sind.

Bei der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens wird im Verfahrensschritt (d) ein Lipid zugesetzt. Vorzugsweise wird ein Phospholipid zugesetzt, insbesondere Lecithin.

Es ist nötig, das aus den nicht-mikrobiellen Zellen stammende Enzym durch die Zugabe eines hydrolytische Spaltungen katalysierenden Enzyms zu zerstören, ehe dann anschliessend das ATP aus den mikrobiellen Zellen freigesetzt wird.

Bei bisher bekannten Bestimmungsverfahren wurde zu dieser Hydrolyse des ATP das hydrolytische Spaltungen katalysierende Enzym Apyrase verwendet, welches eine aus Kartoffeln extrahierte ATP-ase ist.

Bei der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens wird im Verfahrensschritt (e) als hydrolytische Spaltungen katalysierendes Enzym ebenfalls vorzugsweise eine ATP-ase zugesetzt. Zu diesem Zweck wird jedoch vorzugsweise Säuger-Membranen-ATP-ase verwendet. Dieses Enzym kann neben der Hydrolyse des aus somatischen Zellen stammenden ATP's auch für die Zerstörung von Rest-ATP, welches allenfalls in den Reagenzien vorhanden ist und die Empfindlichkeit der Methode herabsetzen würde, verwendet werden.

Des weiteren ist die bevorzugt eingesetzte Säugermembrane ATP-ase selektiv durch die Zugabe von Vanadationen inhibierbar. Vanadationen inhibieren jedoch das Reagens für die biolumineszente Reaktion nicht.

Gemäss einer bevorzugten Ausführungsart des erfindungsgemässen Verfahrens wird daher im Verfahrensschritt (f) als Substanz, welche die Aktivität des hydrolytische Spaltungen katalysierenden Enzyms inhibiert, aber die biolumineszente Reaktion nicht beeinflusst, ein Vanadat hinzugegeben.

Das für die lumineszente Reaktion verantwortliche Enzym Luciferase ist ein Lipoprotein, welches durch das Vorhandensein von anionischen Detergentien inaktiviert wird. Aber die Aktivität des En-

zyms Luciferase wird zurückgewonnen durch die Zugabe von wenigstens einem Lipid, wie z.B. Phosphatidylcholin. Ein solches Lipid, z.B. Lecithin, schützt auch die Aktivität von Luciferase in Gegenwart von kationischen Detergentien. Zur Freisetzung des ATP's aus den mikrobiellen Zellen im Verfahrensschritt (f) wird als bakterizide Substanz vorzugsweise ein kationisches Detergens zugegeben, beispielsweise Hexachloridin.

Bei der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens nach den oben erwähnten bevorzugten Ausführungs arten können die folgenden Vorteile erzielt werden:

1. Bei Verwendung von Säugermembranen ATP-ase als hydrolytische Spaltungen katalysierendes Enzym kann dieses anschliessend leicht inhibiert werden, ohne dass das biolumineszente Reagens beeinflusst wird.
2. Unter Verwendung wenigstens eines Lipides wird die Luciferase gegen Inhibierung durch Detergenzien für die Extraktion des ATP's geschützt.
3. Mit dem erfindungsgemässen Verfahren kann zu jedem beliebigen Zeitpunkt ATP bestimmt werden, resp. die Reaktion verfolgt und kontrolliert werden.
4. Mit dem erfindungsgemässen Verfahren können kleine Mengen an ATP, resp. Mikroorganismen, reproduzierbar nachgewiesen werden (ca. 10 000 Bakterien/ml).

Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung hydrolytische Spaltungen katalysierende Enzyme als Mittel zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens.

Ein bevorzugtes derartiges hydrolytische Spaltungen katalysierendes Enzym ist eine ATP-ase, vorzugsweise eine Säugermembranen ATP-ase.

Die Erfindung sei nun anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

In den Fig. 1 bis 3 ist auf der Ordinate die Lumineszenz in relativen Lichteinheiten in counts per minute [cpm] aufgetragen. Auf der Abszisse ist die Zeit in Sekunden angegeben.

Fig. 1 zeigt die Extraktion von E. Coli mit kommerziellem kationischem Detergens «Nucleotide Releasing Reagent for Microbial ATP» (NRB, Lumac). Konzentration gemäss NRB-Vorschrift. Volumen: 100 Mikroliter in 100 Mikroliter Suspension.

Die Zugabe des Luciferin-Luciferase-Reagenzes zeigt eine schnelle Abnahme der Lumineszenz, bedingt durch die Inhibition des Enzyms.

Fig. 2 zeigt das gleiche Experiment, wie in Fig. 1 dargestellt, mit dem Unterschied, dass zusätzlich Lecithin, extrahiert aus Sojabohnen, in einer Endkonzentration von 2 mg/ml in der Probe zur Probe hinzugegeben wurde. Man sieht, dass jetzt die Lumineszenz konstant bleibt. Dies ist deswegen so, weil das Lecithin die Inhibition des Enzyms verhindert.

Nach ca. 300 Sekunden wurde ein interner Standard mit bekannter ATP-Konzentration (10^{-8} M/l, 10 Mikroliter) hinzugegeben. Es tritt eine rasche Zunahme der Lumineszenz wegen der Erhöhung der ATP-Konzentration in der Probe auf. Es ist ebenfalls ersichtlich, dass das Lecithin weiterhin die Inhibition des Enzyms verhindert.

Fig. 3 zeigt die Hydrolyse von ATP aus verdünntem Blut mit Membran-ATP-ase (0,02 µ/ml in Probe) nach der Extraktion des ATP's mit Lubrol. Nach ca. 300 Sekunden wurde ATP von bekannter Konzentration (10^{-7} M/l, 10 Mikroliter) zusammen mit Vandat hinzugegeben. Die End-Konzentration des Vanadats (Natrium-ortho-vanadat) betrug in der Probe 5.10^{-4} M.

Durch die Hinzugabe des Vanadats wird die Inhibierung der Membran-ATP-ase erreicht. Das zeigt sich deutlich, weil nach der Zugabe von zusätzlichem ATP nur eine unbedeutende Abnahme der Lumineszenz stattfindet.

Patentansprüche

1. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Adenosin-triphosphat, ATP, in biologischem Material, welches lebende somatische Zellen und/oder lebende mikrobielle Zellen enthält, nach selektiver Extraktion aus den lebenden Zellen und mittels Biolumineszenz, wobei die erzeugte Lumineszenz zu jedem beliebigen Zeitpunkt des Verfahrens gemessen werden kann, dadurch gekennzeichnet, dass man entweder in einer Probe des biologischen Materials sowohl den Gehalt an somatischen als auch mikrobiellen Zellen bestimmt, indem man
   a) die Probe des biologischen Materials vorlegt,
   b) wenigstens ein Detergens zur Extraktion des ATP's, welches in den somatischen Zellen enthalten ist, hinzugibt,
   c) ein Reagenz für die biolumineszente Reaktion vor, während oder nach der in Schritt b) genannten Extraktion des ATP's hinzugibt, die nicht mikrobiellen Zellen durch die erzeugte Lumineszenz quantifiziert,
   d) wenigstens ein Lipid zur Verhinderung der Inaktivierung der biolumineszenten Reaktion und/oder der ATP-Hydrolyse-Reaktion des oder der eingesetzten Detergenzien hinzugibt,
   e) dem so erhaltenen Gemisch zum Abbau des aus den nicht-mikrobiellen Zellen stammenden ATP's wenigstens ein hydrolytische Spaltungen katalysierendes Enzym hinzufügt, und anschliessend
   f) zu dem so erhaltenen Gemisch ein Gemisch, enthaltend wenigstens eine bakterizide Substanz zur Freisetzung des ATP's, welches in den mikrobiellen Zellen enthalten ist, und wenigstens eine Substanz, welche die Aktivität des oben genannten Enzyms inhibiert, aber die biolumineszente Reaktion nicht beeinflusst, hinzugibt, und
   g) die mikrobiellen Zellen mittels der erzeugten Biolumineszenz quantifiziert, oder dass man in dem biologischen Material nur die mikrobiellen Zellen quantifiziert, indem man nach dem Verfahrensschritt (c) keine Bestimmung der Biolumineszenz vornimmt, sondern gleich anschliessend die Schritte (d), (e), (f) und (g) des Verfahrens durchführt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man nach der Zugabe des minde-

stens einen, hydrolytische Spaltungen katalysierenden Enzyms im Verfahrensschritt (e) den Abbau des aus nicht-mikrobiellen Zellen stammenden ATP's messtechnisch kontrolliert und so lange mit der Hinzugabe der in Schritt (f) genannten Substanzen zuwartet, bis die ursprüngliche ATP-Konzentration genügend reduziert ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man durch Vorversuche diejenige Zeit feststellt, welche im Verfahrensschritt (d) zum Abbau des aus den nicht mikrobiellen Zellen stammenden ATP's mit den hydrolytische Spaltungen katalysierenden Enzymen notwendig ist, so dass dann bei der Bestimmung in den entsprechenden Proben der Zeitraum bekannt ist, der vor der Durchführung der Hinzugabe im Verfahrensschritt (f) abgewartet werden muss.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das biologische Material eine biologische Flüssigkeit ist, die insbesondere in Form einer Suspension, vorzugsweise in Form einer wässrigen Suspension, vorliegt, wobei das biologische Material vorzugsweise aus der Gruppe ausgewählt ist, welche die folgenden Produkte umfasst:
Urin menschlichen oder tierischen Ursprungs, Blut menschlichen oder tierischen Ursprungs, Milch menschlichen oder tierischen Ursprungs, Fruchtsäfte, Bier, Wein, Fleischextrakte, Klärschlamm, Wasser und Zellkulturen, oder dass das biologische Material eine Bodenprobe, ein Nahrungsmittel oder ein Textilmaterial ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das im Schritt (b) hinzugegebene Detergens ein nicht-ionisches Detergens, vorzugsweise auf Basis eines Äthers mit Polyoxyäthylenkette und eines längerkettigen Alkyl- oder Alkylphenylrestes ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die biolumineszente Reaktion die Luciferin-Luciferase-Reaktion, vorzugsweise von Photinus pyralis, ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das im Schritt d) zugesetzte Lipid ein Phospholipid, vorzugsweise Lecithin, ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das im Schritt (e) hinzugefügte hydrolytische Spaltungen katalysierende Enzym eine ATP-ase, vorzugsweise eine Säuger-Membranen-ATP-ase, ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die im Schritt (f) erwähnte bakterizide Substanz ein kationisches Detergens ist.

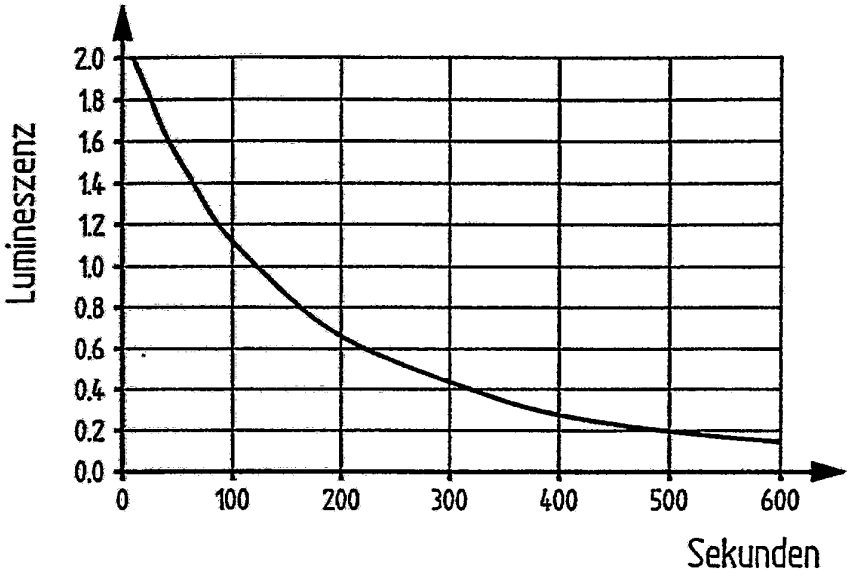
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die im Schritt (f) erwähnte Substanz, welche die Aktivität des hydrolytische Spaltungen katalysierenden Enzyms inhibiert, aber die biolumineszente Reaktion nicht beeinflusst, ein Vanadat ist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass man nach der Bestimmung der Lumineszenz, ausgelöst durch ATP somatischer Zellen, einen Standard mit bekannter ATP-Konzentration hinzugibt und so die ATP-Konzentration und/oder die Anzahl der somatischen Zellen quantifiziert.

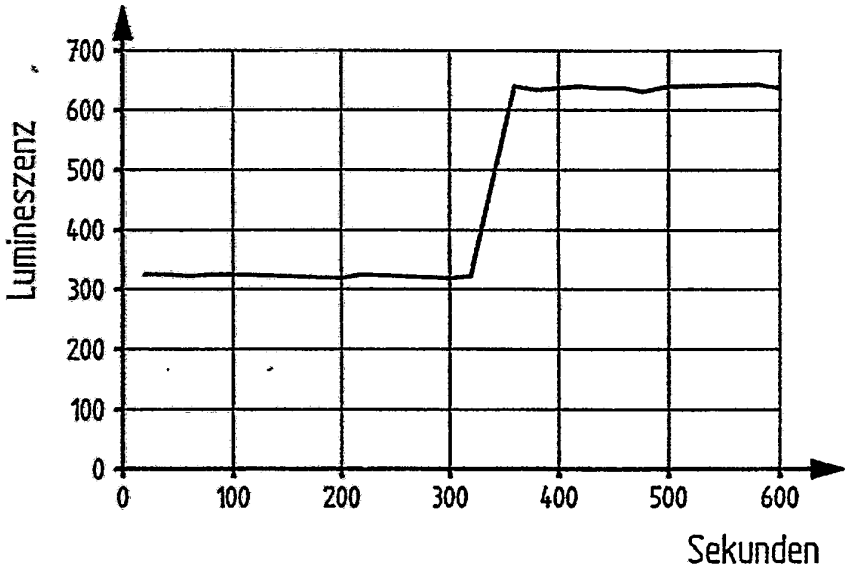
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man nach der Hinzugabe der im Schritt (f) erwähnten Substanz und nach Bestimmung der Lumineszenz, einen Standard mit bekannter ATP-Konzentration hinzugibt und so die ATP-Konzentration und/oder die Anzahl der mikrobiellen Zellen quantifiziert.

13. Hydrolytische Spaltungen katalysierendes Enzym als Mittel zur Durchführung der Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 12.

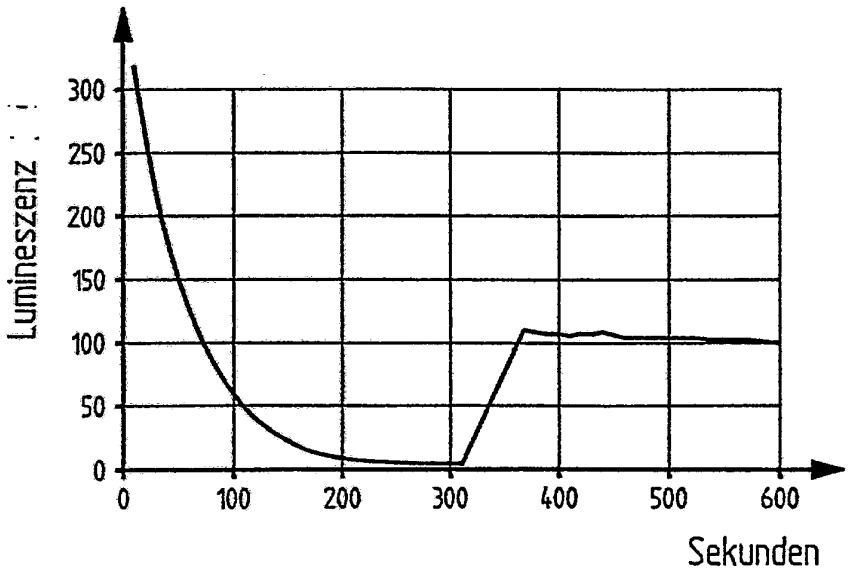
14. Enzym nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass es ATP-ase, vorzugsweise Säuger-Membranen-ATP-ase, ist.



Figur 1



Figur 2



Figur 3