

Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Angewandte Mikrobiologie



**Kurzbericht des Forschungsprojektes
„Untersuchung der bakteriellen Diversität in
wassergemischten Kühlschmierstoffen“
Teil I**

**gefördert von der Berufsgenossenschaft Metall Nord Süd (BGM)
(ehemals Berufsgenossenschaft Metall Süd, BGMS)**

Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer¹, Dr. Udo Jäckel^{1,2}, Dr. Nicole Lodders¹

**1: Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Angewandte Mikrobiologie
Heinrich-Buff-Ring 26-32
35392 Gießen**

**2: Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin
Nöldnerstraße 40-42
10317 Berlin**

**Der vollständige Bericht zu diesem Forschungsprojekt ist als pdf-Datei
(1 MB) auf Anfrage erhältlich bei der**

**Berufsgenossenschaft Metall Nord Süd (BGM)
Hauptabteilung Prävention - Mainz
Abteilung Gesundheitsschutz
Sachgebiet Biologische Arbeitsstoffe
Frau Dr. Isabel Warfolomeow**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Zusammenfassung	3
1 Einleitung	4
1.1 Kühlschmierstoffe	4
1.2 Bakterien in Kühlschmierstoffen	5
1.3 Gesundheitsrisiken im Umgang mit Kühlschmierstoffen	6
1.4 Mykobakterien	7
1.5 Zielsetzung der Studie	8
2 Ergebnisse und Diskussion	9
2.1 Gesamtzellzahlbestimmung	9
2.2 Ermittlung der Anzahl an kultivierbaren Bakterien aus den Kühlschmierstoff-Proben	10
2.3 Isolierungen	11
2.4 Identifizierung der Isolate mittels 16S rRNA Gensequenz-Analyse	12
2.5 Molekularbiologische Untersuchungen der bakteriellen Diversität	12
2.6 Nachweis von Mykobakterien durch molekularbiologische Untersuchungen	16
Literatur	18

Anhang - Technische Daten zu den untersuchten Kühlschmierstoffproben

Ausgabedatum: **November 2007**

Zusammenfassung

1. Die Gesamtzellzahl der in den Kühlschmierstoffen gefundenen Mikroorganismen war um bis zu drei Zehnerpotenzen höher ($1,6 \times 10^5$ bis $7,5 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$) als vergleichbare Werte in Trinkwasser ($1,9 \times 10^4$ bis $5,6 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$).
Hinweis: Bei der Gesamtzellzahl handelt es sich um die Summe aller Zellen (tote und lebende) die zumeist um einige Zehnerpotenzen höher liegt als die Gesamtkoloniezahl, die nur die Anzahl der wachstumsfähigen Zellen (Koloniebildende Einheiten, KBE) darstellt.
2. Beim Vergleich der Konzentration kultivierbarer Bakterien in Abhängigkeit der verwendeten Nährmedien konnte die höchste Konzentration kultivierbarer Bakterien auf CASO-Nährmedium gefunden werden. Dieses Nährmedium eignet sich daher sehr gut für die Kultivierung von Bakterien aus Kühlschmierstoffen.
3. Der Großteil der in dieser Untersuchung gefundenen Arten wurde entweder nur mittels kultivierungsunabhängigen Ansatzes oder nur mittels Isolierung erfasst (kultivierungsunabhängig: 46 Arten, Isolierung: 20 Arten). Nur drei der Arten wurden mit beiden Ansätzen detektiert. Um eine möglichst große Anzahl an Arten zu erfassen, ist es daher – zumindest aus wissenschaftlicher Sicht – wichtig, sowohl kultivierungsabhängig als auch –unabhängig zu arbeiten.
4. Der Großteil der in dieser Studie sowohl durch Isolierung als auch durch den kultivierungsunabhängigen Ansatz nachgewiesenen Mikroorganismen wurden nach der Biostoffverordnung in die Risikogruppen 1 und 2 eingeordnet.
5. Auch in Kühlschmierstoffproben in denen sich gemäß Herstellerangaben eine so genannte Leitkeimflora etablieren soll um das Wachstum anderer Mikroorganismen zu unterdrücken, konnten insbesondere nach längerer Standzeit weitere Mikroorganismen nachgewiesen werden, die in dieser Probe (KSS 9) sogar dominierten. Ein hemmender Effekt auf das Wachstum von anderen Mikroorganismen durch eine dominante Besiedlung eines bestimmten „Leitkeims“ konnte somit nicht bestätigt werden.
6. Der molekularbiologische Nachweis von Mykobakterien in den untersuchten Kühlschmierstoffproben mittels Real-Time PCR konnte bis jetzt noch nicht erbracht werden. Da aber sowohl durch Färbung als auch durch Kultivierung auf spezifischen Nährmedien ebenfalls keine Mykobakterien detektiert werden konnten, ist anzunehmen, dass diese Bakterien in den Proben nicht vorhanden waren.

1 Einleitung

1.1 Kühlschmierstoffe

Kühlschmierstoffe werden u. a. in der Automobil-Industrie bei Tätigkeiten wie Bohren, Schleifen und Schneiden von Metallen verwendet. Weltweit werden dafür jährlich $22,4 \times 10^9$ Liter Kühlschmierstoff in unterschiedlichen Produktionsprozessen eingesetzt (van der Gast *et al.*, 2003). Diese Schmierstoffe erfüllen dabei folgende Hauptaufgaben: Einerseits verhindern sie durch die schmierende Eigenschaft die Reibung zwischen Werkzeug und Werkstück. Andererseits wird die entstehende Wärme effektiv abgeführt (Kühlung). Zusätzlich werden anfallende Späne sowie Abriebmaterialien abtransportiert (Liedtke, 1999).

Je nach Produktionsverfahren werden weitere Anforderungen an die Kühlschmierstoffe gestellt. Sie sollen beispielsweise die Metalle vor Korrosion schützen, stabil gegenüber mikrobiellem Befall sein, sich chemisch neutral gegenüber den Werkstoffen verhalten und eine gute Benetz- und Haftbarkeit aufweisen. Diese Anforderungen werden durch Zugabe von so genannten Additiven, überwiegend synthetische Stoffe, erfüllt. Sie werden den Grundölen zugemischt, um oben genannte Eigenschaften zu erzielen, bzw. um unerwünschte Eigenschaften der Grundöle zu unterdrücken.

Je nach Anforderung werden verschiedene Kühlschmierstoff-Arten eingesetzt, welche in wassermischbare und nichtwassermischbare Kühlschmierstoffe unterschieden werden. Wassermischbare Kühlschmierstoffe besitzen einen Grundölanteil von 20-70%. Sie haben ein weiteres Wirkungsspektrum als nichtwassermischbare Kühlschmierstoffe. Aufgrund ihrer vielfältigen Einsatzgebiete werden wassermischbaren Kühlschmierstoffe meist mehr als 10 Additive zugesetzt (Liedtke, 1999). Dazu gehören z.B. Emulgatoren, EP (extreme pressure)-Additive wie Disulfide oder Phosphorsäureester, Entschäumer sowie Bakterizide. Die wassermischbaren Kühlschmierstoffe werden vom Hersteller als Konzentrat geliefert. Durch Zugabe von Wasser entstehen dann dementsprechend Kühlschmier-Emulsionen und Kühlschmier-Lösungen mit einem Kühlschmierstoff-Konzentrat-Anteil von 3 bis 8%.

Im Gegensatz zu wassermischbaren Kühlschmierstoffen haben nichtwassermischbare Kühlschmierstoffe mit 80-98% einen deutlich höheren Grundölanteil. Sie zeichnen sich weiterhin durch eine hohe Homogenität, einen geringeren Pflegeaufwand, eine hervorragende Schmierfähigkeit und den geringeren Zusatz von Additiven aus. Nichtwassermischbare Kühlschmierstoffe werden hauptsächlich zur Optimierung der Schmierung verwendet.

1.2 Bakterien in Kühlschmierstoffen

Obwohl Kühlschmierstoffe wie oben erwähnt mit Bakteriziden versetzt werden, sind einige Mikroorganismen dennoch in der Lage, sich in wassermischbaren Kühlschmierstoffen anzusiedeln. Im Gegensatz dazu werden nichtwassermischbare Kühlschmierstoffe in der Regel als „keimfrei“ angesehen, da ihnen die lebenswichtige Komponente Wasser fehlt. In Grenzbereichen der Öloberfläche kann aber durch ungewollten Wassereintrag (z.B. Kondenswasserbildung) auch mikrobielles Wachstum stattfinden (BG Information 762, 2006).

Mikroorganismen können über eine Vielzahl von Quellen in die Kühlschmierstoffe gelangen, z.B. durch das Ansetzwasser, welches zum Verdünnen des wassermischbaren Kühlschmierstoff-Konzentrates benutzt wird, oder auch über Umgebungsluft und Bodenschmutz. Eine wichtige Inokulationsquelle stellen die Menschen selbst dar: So werden Kontaminationen beispielsweise von den Händen, durch Schweiß oder Speichel vermutet (van der Gast *et al.*, 2001). Kühlschmierstoffe bieten sowohl für aerobe als auch fakultativ und obligat anaerobe Bakterien geeignete Lebensräume. An Oberflächen der kühlenschmierstoffführenden Leitungssysteme kann außerdem die Bildung von Biofilmen beobachtet werden (van der Gast *et al.*, 2001). Die Bildung von Biofilmen schützt die dort siedelnden Bakterien gegenüber den Bakteriziden im Kühlschmierstoff. Andere Bakterienarten (z.B. *Pseudomonas* spp. sowie *Sphingopyxis* spp. wie *S. chilensis*) entwickeln gegenüber Bakteriziden oftmals Resistenzen bzw. besitzen Plasmide, welche ihnen die Fähigkeit zum Abbau dieser Bakterizide verleihen (Chakrabarty, 1976; Godoy *et al.*, 2003).

Die in den Kühlschmierstoffen vorhandenen Mikroorganismen können nachteilige Einflüsse auf die Eigenschaften der Kühlschmierstoffe haben. Solche Einflüsse werden hauptsächlich durch mikrobielle Abbauprozesse von Kohlenwasserstoffen, organischen Estern und anderen Kühlschmierstoff-Komponenten hervorgerufen. Beispielsweise kann es durch die Anreicherung von sauren Stoffwechselprodukten zu einer pH-Wert-Absenkung und damit zu Korrosionsproblemen an den Werkstücken kommen.

Vergleiche zwischen kultivierungsabhängigen und –unabhängigen Methoden in diesem Forschungsprojekt zeigten, dass die Methoden jeweils unterschiedliche Arten detektieren. Besonders häufig wurden in wassermischbaren Kühlschmierstoffen Arten der Gattung *Pseudomonas* nachgewiesen, vor allem *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Mattsby-Baltzer *et al.* 1989). So fanden z.B. Strauss und Gorfer (2004) mittels kultivierungsunabhängiger, molekularbiologischer Methoden *Pseudomonas pseudoalcaligenes* in Kühlschmierstoff-Proben. Durch Kultivierung aus denselben Kühlschmierstoff-Proben konnten sie hingegen *P.*

pseudoalcaligenes nicht nachweisen. Kultivierungsunabhängige Ansätze sind wichtig, um einen Gesamteindruck der vorhandenen Bakterienvielfalt zu erhalten, da kultivierungsabhängige Analysen oftmals selektiv sind. Auf der anderen Seite werden mittels Kultivierung teilweise auch Arten festgestellt, die kultivierungsunabhängig nicht entdeckt werden. Eine Kombination verschiedener Methoden zur Untersuchung der mikrobiellen Diversität in wassergemischten Kühlschmierstoffen erscheint daher zumindest aus wissenschaftlicher Sicht ratsam.

Eine Zustandsbeschreibung der Kühlschmierstoffe bezüglich des mikrobiellen Befalls orientiert sich derzeit nur an den bekannten Parametern wie wahrnehmbare Veränderungen (Geruch, Farbe, Konsistenz etc.), pH-Wert, Konzentration des Kühlschmierstoffs und Nitritgehalt (Leiseder, 1988; BG-Information 762, 2006). Wenn sich diese Parameter stark verändern, wird der Kühlschmierstoff destabilisiert, verliert seine Funktion und die weitere Benutzung kann möglicherweise die Gesundheit der Arbeiter gefährden. Der Kühlschmierstoff muss folglich ausgetauscht, und die Maschinen einer gründlichen Reinigung unterzogen werden.

1.3 Gesundheitsrisiken im Umgang mit Kühlschmierstoffen

Kühlschmierstoffe können auf zwei Wegen auf den Organismus einwirken: Äußerlich kann die Haut durch direkten Kontakt oder Kühlschmierstoff-Aerosole benetzt werden; innerlich können feinste Tröpfchen in die Lunge gelangen.

Hauterkrankungen durch Mikroorganismen in Kühlschmierstoffen sind kaum bekannt. Vereinzelt wurden Nagelwallentzündungen durch Pseudomonaden in Kühlschmierstoff-Emulsionen beschrieben, Kontaktallergien durch Mikroorganismen kommen nicht vor.

Zu den Atemwegserkrankungen zählen vor allem die Atemwegsallergien, die durch sensibilisierende Komponenten in Kühlschmierstoffen hervorgerufen werden. Insbesondere Biozide wie beispielsweise Formaldehyd-Abspalter (z.B. Hexahydrotriazine, Oxazolidine), NS-Heterocyclen (z.B. Isothiazolinone) aber auch andere Additive wie Korrosionsschutz für Buntmetalle (z.B. Benzotriazole, Benzothiazole) Hochdruck-(EP)-Zusätze, Antioxidantien oder andere eingeschleppte Stoffe können häufig zu Allergien führen. Atemwegsallergien durch Mikroorganismen in wassergemischten Kühlschmierstoffen werden ebenfalls in der Literatur beschrieben. Hierbei werden vor allem Schimmelpilze bzw. deren

Sporen (z.B. *Aspergillus*-, *Penicillium*arten) mit entsprechendem Sensibilisierungspotential genannt.

Zurzeit stark in der Diskussion sind die Endotoxine: Es handelt sich hierbei um Zellwandbruchstücke von ("zerstörten") Bakterien. Endotoxine können eingeatmet ab einer bestimmten Konzentration zu Fieber und grippeähnlichen Symptomen führen, die jedoch in der Regel reversibel sind. Entzündungsreaktionen und chronische Prozesse können bei andauernder hoher Belastung auftreten. Die bislang vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass für den Bereich der Tätigkeiten mit wassergemischten Kühlschmierstoffen keine dauerhaft erhöhten Endotoxinbelastungen vorliegen.

1.4 Mykobakterien

Die Gattung *Mycobacterium* stellt die einzige Gattung der Familie der *Mycobacteriaceae* dar und wird der Ordnung *Actinomycetales* zugeordnet (Stackebrandt *et al.*, 1997).

Bei den Mykobakterien handelt es sich um Gram-positive Stäbchen mit einem hohen GC-Gehalt in der DNA. Mykobakterien sind pleomorph, auch verzweigtes oder filamentöses Wachstum findet statt. Es wird aber kein Myzel ausgebildet, da die Filamente schon bei geringen Störungen zerfallen. Ihr Stoffwechsel ist aerob. Sie unterscheiden sich von anderen Gattungen durch ihre unverwechselbare Färbeeigenschaft, welche als Säurefestigkeit bezeichnet wird. Diese Säurefestigkeit geht auf das Vorhandensein von Mykolsäuren zurück (Madigan *et al.*, 2000).

Einige Mykobakterien-Arten wachsen sehr langsam. Sichtbare Kolonien der Art *M. tuberculosis* werden beispielsweise aus einem Inokulum erst nach wochenlanger Inkubation gebildet (Madigan *et al.*, 2000). Neben nichtpathogenen, ubiquitär vorkommenden, saprophytären Mykobakterien gibt es Mykobakterien, die fakultativ pathogen sind und ubiquitär vorkommen (z.B. *M. avium*), sowie obligat pathogene Mykobakterien (z.B. *M. tuberculosis*, *M. leprae*) (Köhler *et al.* 2001; Vaerewijck *et al.*, 2005).

Einen Großteil der fakultativ pathogenen Mykobakterien findet man ubiquitär z.B. in Wasser und Boden, sowie als Bestandteil der Schleimhautflora von Mensch und Tier. Darüber hinaus wurden sie zudem in vielen Aerosolen nachgewiesen. Solche Staub- oder Flüssigkeitspartikel (Tröpfchen), die mit Mikroorganismen bzw. Bestandteilen von Mikroorganismen behaftet sind, werden auch als „Bioaerosole“ bezeichnet.

Aerosole entstehen beispielsweise in Hallenbädern mit Wassersprühanlagen (Beckett *et al.*, 2005; Falkinham, 2003) aber auch bei Bearbeitungsverfahren mit wassergemischten Kühlschmierstoffen. Werden „Bioaerosole“ über einen längeren Zeitraum in höheren Konzentrationen eingeatmet, können allergisch-entzündliche Atemwegserkrankungen in Form einer Exogen Allergischen Alveolitis (EAA) entstehen. Hierbei handelt es sich um eine Immunreaktion auf die eingeatmeten organischen Stoffe. Die Erkrankung geht mit einer lymphozitären Entzündung der terminalen Bronchiolen, der Alveolen und des Lungeninstitiums einher (Heppt *et al.*, 1998). Als mikrobielle Antigene werden bislang verschiedene thermophile Actinomyceten (z.B. *Saccharopolyspora rectivirgula*), Schimmelpilze und Hefen genannt. Auch für Mykobakterien wurde schon seit längerem angenommen und kürzlich auch nachgewiesen, dass sie ebenfalls eine EAA hervorrufen können (Beckett *et al.*, 2005; Falkinham, 2003; Khan *et al.* 2005; Thorne *et al.*, 2006). Hierbei handelte es sich u. a. auch um Mykobakterien die in wassergemischten Kühlschmierstoffen nachgewiesen wurden.

Die Detektion von Mykobakterien verlangt Nachweis- und Identifizierungstechniken, welche bislang nicht in den Routineuntersuhcungen von Kühlschmierstoffproben durchgeführt werden (Beckett *et al.*, 2005). Die Detektion kann z.B. durch spezifische PCR- (Khan *et al.*, 2005; Yadav *et al*, 2003) und Real-Time-PCR-Methoden erfolgen (Khan *et al.*, 2004; Lachnik *et al*, 2002).

1.5 Zielsetzung der Studie

Kühlschmierstoffe werden trotz Einsatz von Bakteriziden häufig von Bakterien besiedelt. Bislang gibt es aber nur wenige Untersuchungen zur Diversität („Artenvielfalt“) der in wassergemischten Kühlschmierstoffen vorkommenden Mikroorganismen. Um Aussagen über ein potentiell gesundheitliches Risiko durch Bakterien in Kühlschmierstoffen zu machen, ist es jedoch notwendig, die darin enthaltenen Bakterien möglichst bis auf Speziesebene zu identifizieren.

In dem hier beschriebenen Projekt soll die Diversität der in Kühlschmierstoffen enthaltenen Bakterien vertiefend untersucht werden. Hierbei wurden sowohl kultivierungsabhängige als auch molekularbiologische Methoden verwendet.

Einen weiteren Schwerpunkt der Studie stellte die Detektion von Mykobakterien in den Kühlschmierstoffen dar. Neben kultivierungsabhängigen Methoden wurden hierbei ebenfalls molekularbiologische Methoden getestet.

2 Ergebnisse und Diskussion

Insgesamt wurden sieben im Gebrauch befindliche, wassergemischte Kühlschmierstoff-Proben (KSS-Proben) untersucht (Angaben zu den einzelnen Betriebsproben siehe Anhang 1). KSS-Probe 1 ist ölfrei, KSS-Proben 2, 3 und 7 – 10 basieren auf Mineralöl. Die Kühlschmierstoffprobe KSS-10 wurde mit Brunnenwasser angesetzt. Zusätzlich wurden aus den jeweiligen Konzentraten frisch angesetzte Kühlschmierstoffproben analysiert. Eine Besonderheit stellen die Kühlschmierstoff-Proben 8 und 9 dar: Hierbei handelt es sich – nach Herstellerangaben - um bakterizidfreie Produkte in denen sich eine so genannte Leitkeimflora, bestehend aus *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, etablieren soll um das Wachstum anderer Mikroorganismen zu verhindern.

2.1 Gesamtzellzahlen (DAPI-Methode)

Es wurden zwischen $1,6 \times 10^5$ Zellen pro ml (KSS-Probe 1) und $7,5 \times 10^8$ Zellen pro ml (KSS-Probe 9) festgestellt (s. Abb 1).

Hinweis: Bei der Gesamtzellzahl handelt es sich um die Summe aller Zellen (tote und lebende) die zumeist um einige Zehnerpotenzen höher liegt als die Gesamtkoloniezahl, die nur die Anzahl der wachstumsfähigen Zellen (Koloniebildende Einheiten, KBE) darstellt.

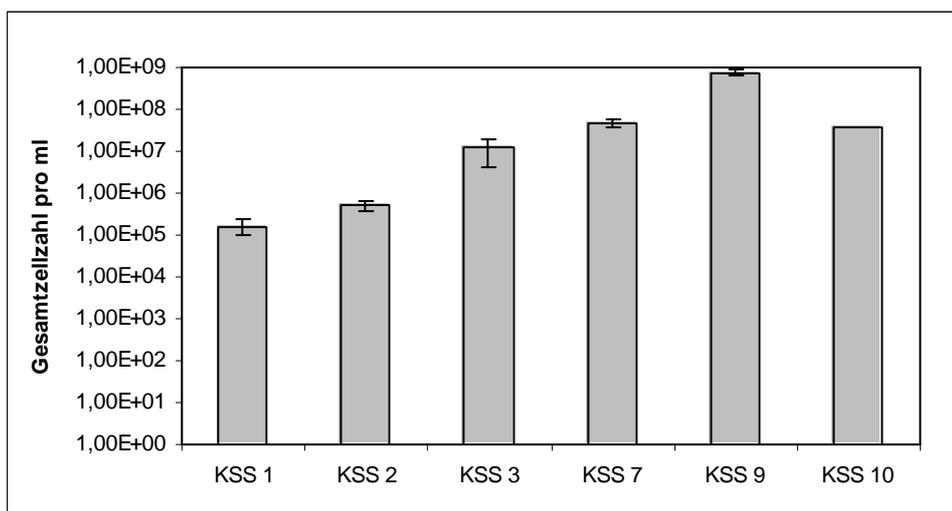


Abb. 1: Vergleich der fluoreszenzmikroskopisch ermittelten Gesamtzellzahl in sechs der untersuchten Kühlschmierstoff-Proben. Die Balken zeigen die ermittelte Gesamtzellzahl einer Probe (n=20 Gesichtsfelder) \pm Standardabweichung (SD). Die y-Achse wurde zur besseren Darstellung logarithmiert.

Im Gegensatz dazu sind im Trinkwasser häufig zwischen $1,9 \times 10^4$ und $5,6 \times 10^5$ Gesamtzellen pro ml nachweisbar (Wingender *et al.*, 2003), also um bis zu drei Zehnerpotenzen niedrigere Gesamtzellzahlen als im Kühlschmierstoff gefunden wurden.

KSS 8 konnte nicht weiter untersucht werden, da sowohl das Abzentrifugieren als auch die DNA-Extraktion, wahrscheinlich bedingt durch die Konsistenz des Kühlschmierstoffs, zu keinem Erfolg führten. Die KSS-Proben 4 – 6 wurden im Rahmen dieser Studie nur auf Mykobakterien und thermophile Actinomyceten untersucht. Im Folgenden wird auf diese Proben nicht mehr eingegangen, da weder Mykobakterien noch Actinomyceten isoliert werden konnten.

2.2 Ermittlung der Anzahl von kultivierbaren Bakterien aus den Kühlschmierstoff-Proben

Die Anzahl kultivierbarer Bakterien wurde durch Auszählung der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) auf drei verschiedenen Nährmedien (CASO-Nährmedium, R2A-Medium und G/A-Medium) ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Für KSS-Probe 1 konnte auf keinem der verwendeten Nährmedien Wachstum festgestellt werden. KSS-Probe 2 wurde daraufhin nur auf CASO-Nährmedium ausplattiert. Da auf diesem Medium nur ein Kolonietyp gewachsen ist, wurde auf den Einsatz weiterer Nährmedien verzichtet. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von KSS-Probe 2 konnte für KSS-Probe 3 eine deutlich höhere Anzahl an Kolonie bildenden Einheiten festgestellt werden. Hierbei war zusätzlich eine hohe morphologische Diversität der Kolonien zu beobachten. Daher wurde für KSS-Probe 3 entschieden, weitere Nährmedien (R2A-Medium, G/A-Medium) einzusetzen. Die KSS-Proben 7 bis 9 wurden ebenfalls auf oben genannten Nährmedien ausplattiert und zeigten auf allen drei Medien Wachstum. KSS-Probe 10 wurde nur auf CASO-Nährmedium und R2A-Medium ausplattiert.

Die höchste Konzentration an kultivierbaren Bakterien konnte insgesamt betrachtet auf dem CASO-Nährmedium ermittelt werden (Tabelle 1). Dieses Nährmedium eignet sich daher für die Kultivierung aus Kühlschmierstoffen gewonnenen Bakterien besonders gut.

Die KSS-Probe 3 wurde zusätzlich auf einem Kühlschmierstoff-Agarmedium ausplattiert. Bei diesem Medium handelt es sich um ein Selektivmedium, dem neben Agar und Cycloheximid-Lösung (zur Unterdrückung von Pilzwachstum) die jeweiligen Kühlschmierstoffe als einzige C-Quelle zugesetzt wurden. Es konnte auf diesem spezifischen Medium Wachstum

festgestellt werden, mit Bakterienkonzentrationen von $8,5 \times 10^4$ KBE ml^{-1} bis $3,2 \times 10^5$ KBE ml^{-1} .

Tab 1: Anzahl Kolonie bildender Einheiten (KBE) ml^{-1} der untersuchten Kühlschmierstoff-Proben auf verschiedenen Nährmedien. k.W. = kein Wachstum, n.a. = nicht ausplattiert

	CASO-Nährmedium	R2A-Medium	G/A-Medium
KSS-Probe 1	k.W.	k.W.	k.W.
KSS-Probe 2	$1,1 \times 10^3$	n.a.	n.a.
KSS-Probe 3	$9,3 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	k.W.
KSS-Probe 7	$4,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
KSS-Probe 8	$3,7 \times 10^5$	$5,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$
KSS-Probe 9	$1,9 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$	$8,1 \times 10^8$
KSS-Probe 10	$1,4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	n.a.

2.3 Isolierungen

Nach der Konzentrationsbestimmung der kultivierbaren Bakterien aus den KSS-Proben auf unterschiedlichen Medien wurden Bakterien aufgrund ihrer verschiedenen Koloniemorphologien isoliert. Insgesamt wurden 55 Isolate gewonnen (Tabelle 2).

Tab. 2: Anzahl der aus den jeweiligen KSS-Proben gewonnenen Isolate

	Anzahl Isolate
KSS-Probe 2	1
KSS-Probe 3	18
KSS-Probe 7	6
KSS-Probe 8	9
KSS-Probe 9	5
KSS-Probe 10	16

Neunzehn der Isolate wurden auf Kühlschmierstoff-Agarmedium ausgestrichen. Sämtliche Isolate wuchsen auf diesen mit Kühlschmierstoff versetzten Nährmedien, auch wenn das Wachstum deutlich langsamer erfolgte als auf den Kühlschmierstoff-freien Isolationsmedien.

2.4 Identifizierung der Isolate mittels 16S rRNA Gensequenz-Analyse

34 repräsentative Isolate wurden für die 16S rRNA Gensequenz-Analyse ausgewählt. Bei der Sequenzierung wird für einen Abschnitt des bakteriellen Genoms, in diesem Fall die 16S rRNA, die Abfolge der Nukleotide bestimmt. Das 16S rRNA-Gen kommt bei Prokaryoten universell vor. Einige Bereiche sind so konservativ, dass alle Bakterienspezies in diesen Abschnitten die gleiche Nukleotidabfolge besitzen. Diese Abschnitte werden genutzt, um das 16S rRNA-Gen mittels PCR („Polymerase Chain Reaction“) zu vervielfältigen. Andere Bereiche dagegen unterscheiden sich je nach Bakteriengattung oder sogar Spezies. Diese Bereiche sind für die Identifizierung von unbekanntem Isolate oder Klonen wichtig. Die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens der unbekanntem Isolate aus den KSS-Proben diente daher einer ersten Zuordnung der Isolate auf Gattungs- oder sogar Artebene. Die Zuordnung erfolgt über einen Vergleich der Sequenz des Isolates mit bekannten Sequenzen einer Datenbank. Diese Zuordnung ist in Tabelle 3 für die 34 Isolate dargestellt. Für jedes Isolat wurde aus der Datenbank die Sequenz ausgewählt und in der Tabelle aufgelistet, die dem Isolat am ähnlichsten ist. Zusätzlich wurden die Sequenzähnlichkeiten zwischen der Sequenz des unbekanntem Isolates und der Sequenz aus der Datenbank angegeben. Je geringer die Sequenzähnlichkeit ist, desto entfernter verwandt ist die Sequenz des Isolates zu der nächstverwandten Sequenz aus der Datenbank. Bei Sequenzähnlichkeiten von weniger als 97 % handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um unterschiedliche Arten. Isolate, die weniger als 97 % Sequenzähnlichkeit zur nächstverwandten Sequenz aus der Datenbank aufweisen, müssen daher eingehender untersucht werden, ob es sich tatsächlich um neue Arten handelt. Auffallend ist, dass vor allem die Isolate aus KSS-Probe 10 eine geringere Sequenzähnlichkeit zu schon bekannten Sequenzen aufweisen (z.B. Isolat I10.3, I10.4, I10.15 und I10.17).

2.5 Molekularbiologische Untersuchungen der bakteriellen Diversität

Um die bakterielle Vielfalt zu erfassen, wurde neben den kultivierungsabhängigen Methoden eine Klonbibliothek der 16S rRNA-Gene aus den DNA-Extrakten der KSS-Proben 2, 3, 7, 9 und 10 angelegt. Aus den KSS-Proben 1 und 8 konnte keine DNA extrahiert werden; die Proben wurden daher nicht kloniert. Durch das Anlegen einer Klonbibliothek können Proben kultivierungsunabhängig auf ihre Diversität untersucht werden. Mittels Kultivierung können nicht immer alle Mikroorganismen erfasst werden. Einige wachsen auf den angebotenen Nährmedien nicht, da sie andere Ansprüche an ihre Umwelt haben. Andere Mikroorganismen können sich aufgrund der Dominanz einiger Arten, die unter Laborbedingungen besonders gut wachsen, nicht auf den Nährmedien durchsetzen. Die KSS-Proben wurden daher zusätzlich

ohne den Umweg der Kultivierung sequenziert, indem Teile der genomischen DNA sämtlicher in den Proben vorkommender Bakterien in eine Klonbibliothek aufgenommen wurden und das 16S rRNA Gen der Klone anschließend sequenziert wurde (Tabelle 4).

Tab. 3: Zuordnung der Isolate zu Spezies der nächstverwandten Gattungen aufgrund von 16S rRNA Gen Vollsequenzen, sowie Angaben der Sequenzähnlichkeiten. Die Vergleichssequenzen wurden aus der primären Datenbank „Genbank“ entnommen.

Isolat	Nächst verwandte Sequenz nach BLAST (Acc.Nr.)	Sequenz-ähnlichkeit	Isoliert aus
I2.1	<i>Bacillus</i> sp. (AY87805)	99,80%	KSS 2
I3.3	<i>Paenibacillus</i> sp. (AB1983337)	99,20%	KSS 3
I3.5	<i>Bacillus pumilus</i> (AB020208)	100%	KSS 3
I3.9	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (Z76666)	100%	KSS 3
I3.17	<i>Micrococcus luteus</i> (AY801238)	99,80%	KSS 3
I3.18	<i>Caulobacter leidyia</i> (AF331660)	100%	KSS 3
I7.2	<i>Bacillus licheniformis</i> (EF433410)	100%	KSS 7
I7.3	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (AM114410)	99%	KSS 7
I7.6	<i>Shinella zoogloides</i> (AB238789)	99%	KSS 7
I7.7	<i>Bacillus pumilus</i> (AB020208)	99%	KSS 7
I7.8	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i> (AM180484)	99%	KSS 7
I8.1	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (Z76666)	100%	KSS 8
I8.8	<i>Bacillus pumilus</i> (AB020208)	99%	KSS 8
I8.9	<i>Bacillus pumilus</i> (DQ523500)	100%	KSS 8
I9.1	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (EF198140)	100%	KSS 9
I9.3	<i>Shewanella putrefaciens</i> (X81623)	99%	KSS 9
I9.7	<i>Alcaligenes faecalis</i> (AY548384)	99%	KSS 9
I9.2	<i>Sandaracinobacter sibiricus</i> (Y10678)	98%	KSS 9
I10.1	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> (AJ415377)	99 %	KSS 10
I10.2	<i>Brevibacterium albus</i> (EF158852)	97 %	KSS 10
I10.3	<i>Corynebacterium lipophilum</i> (Y09045)	95 %	KSS 10
I10.4	<i>Corynebacterium lipophilum</i> (Y09045)	95 %	KSS 10
I10.5	<i>Aerococcus viridans</i> (M58797)	98 %	KSS 10
I10.6	<i>Micromonospora chokoriensis</i> (AB241454)	99 %	KSS 10
I10.7	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> (AJ415377)	100 %	KSS 10
I10.9	<i>Aerococcus viridans</i> (M58797)	98 %	KSS 10
I10.10	<i>Corynebacterium mastitidis</i> (Y09806)	94 %	KSS 10
I10.11	<i>Bacillus fusiformis</i> (DQ333300)	99 %	KSS 10
I10.12	<i>Bacillus pumilus</i> (AB308441)	100 %	KSS 10
I10.14	<i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i> (AY028926)	99 %	KSS 10
I10.15	<i>Brevibacterium albus</i> (EF158852)	96 %	KSS 10
I10.16	<i>Aerococcus viridans</i> (AY707782)	98 %	KSS 10
I10.17	<i>Tessaracoccus bendigoensis</i> (DQ539501)	96 %	KSS 10
I10.18	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> (AB073189)	99 %	KSS 10

Tab. 4: Anzahl der Isolate und Klone, die jeweils der gleichen Gattung bzw. Art zugeordnet wurden

Nächst verwandte Art bzw. Gattung nach BLAST	Anzahl Isolate	Anzahl Klone	RG
<i>Aerococcus viridans</i>	3		2
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	15	1/2
<i>Bacillus fusiformis</i>	1		1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1		1
<i>Bacillus pumilus</i>	5		1
<i>Bacillus sp.</i>	1		?
<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	2		1
<i>Brevibacterium albus</i>	2		1
<i>Caulobacter leidyia</i>	1		1
<i>Corynebacterium lipophilum</i>	2		1
<i>Corynebacterium mastitidis</i>	1		2
<i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i>	1		1
<i>Micrococcus luteus</i>	1		1
<i>Micromonospora chokoriensis</i>	1		k.A.
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	2		2
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	1		1
<i>Paenibacillus sp.</i>	1		1 (?)
<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i>	1	1	k.A.
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	10	8	1
<i>Sandaracinobacter sibiricus</i>	1		1
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1		1
<i>Shinella zoogloides</i>	1		k.A.
<i>Tessaracoccus bendigoensis</i>	1		1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		1	2
<i>Acinetobacter seohaensis</i>		12	k.A.
<i>Acinetobacter sp.</i>		1	?
<i>Aerosphaera taetra</i>		31	k.A.
<i>Alcaligenes sp.</i>		1	?
<i>Bosea minatitlanensis</i>		1	1
<i>Brevundimonas aurantiaca</i>		1	1
<i>Brevundimonas diminuta</i>		6	2
<i>Caulobacter henricii</i>		1	1
<i>Citrobacter freundii</i>		1	2
<i>Clostridium sp.</i>		4	?
<i>Clostridium sticklandii</i>		4	1
<i>Comamonas sp.</i>		27	?
<i>Comamonas compostus</i>		2	k.A.
<i>Comamonas denitrificans</i>		1	1
<i>Comamonas terrigena</i>		3	2
<i>Comamonas testosteroni</i>		7	1
<i>Defluviobacter lusatae</i>		1	1
<i>Desemzia incerta</i>		7	1
<i>Facklamia tabacinasalis</i>		2	1
<i>Frigovirgula patagoniensis</i>		1	k.A.
<i>Kribbia dieselivorans</i>		1	k.A.
<i>Kurthia gibsonii</i>		5	1
<i>Lactobacillus carnis</i>		1	2
<i>Lactosphaera pasteurii</i>		2	1
<i>Leucobacter aridicollis</i>		15	k.A.

Tab. 4: Fortsetzung

Nächst verwandte Art bzw. Gattung nach BLAST	Anzahl Isolate	Anzahl Klone	RG
<i>Leucobacter chromiireducens</i>		1	k.A.
<i>Leucobacter</i> spp.		5	?
<i>Listeria innocua</i>		1	1
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>		1	1
<i>Methylobacterium extorquens</i>		1	1
<i>Methylobacterium isbiliense</i>		1	k.A.
<i>Methylobacterium organophilum</i>		5	1
<i>Ochrobactrum aqua-oryzae</i>		1	k.A.
<i>Phascolarctobacterium</i> sp.		1	1 (?)
<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i>		29	k.A.
<i>Rhizobium gallicum</i>		1	1
<i>Sphingopyxis</i> sp.		1	1 (?)
<i>Stenotrophomonas</i> sp.		1	?
<i>Tepidimonas</i> sp.		1	1 (?)
<i>Trichococcus collinsii</i>		2	1
<i>Trichococcus flocculiformis</i>		3	1
<i>Trichococcus pasteurii</i>		3	1
<i>Vagococcus carniphilus</i>		1	k.A.
<i>Vagococcus lutrae</i>		1	1
<i>Wautersiella falsenii</i> subsp. genomovar 1		1	k.A.

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, konnten durch die Sequenzierung der Klone, also durch den kultivierungsunabhängigen Ansatz, eine Vielzahl von Arten gefunden werden, die mit der Kultivierung nicht erfasst werden konnten. Auf der anderen Seite wurden auch durch die Kultivierung Arten bzw. Gattungen entdeckt, die durch die Klonierung nicht erfasst werden konnten. Durch die Kultivierung allein konnten 20 Arten entdeckt werden, durch den kultivierungsunabhängigen Ansatz wurden die Klone 46 Arten zugeordnet, die durch Isolierung nicht erfasst wurden. Nur drei der Arten (*Alcaligenes faecalis*, *Pseudochrobactrum saccharolyticum* und *Pseudomonas pseudoalcaligenes*) wurden durch beide Ansätze gefunden (Tabellen 4 und 5). Es ist daher aus wissenschaftlicher Sicht wichtig, die KSS-Proben sowohl kultivierungsabhängig als auch kultivierungsunabhängig zu analysieren, um der Gesamtdiversität der Mikroorganismen in den Proben so nahe zu kommen wie möglich.

Das Kühlschmierstoffprodukt (KSS-Proben 8 und 9), in dem sich gemäß Herstellerangaben *Pseudomonas pseudoalcaligenes* als Leitkeim dominant etablieren soll, um das Wachstum anderer Mikroorganismen zu verhindern, erfüllt diesen Zweck nur bedingt, wenn überhaupt. In der KSS-Probe 8 konnte kultivierungsabhängig neben *Pseudomonas pseudoalcaligenes* nur *Bacillus pumilus*, ebenfalls ein Bakterium der Risikogruppe 1, nachgewiesen werden. Dieser Kühlschmierstoff war zur Zeit der Beprobung frisch angesetzt.

Tab 5: Über Klonierung (kultivierungsunabhängig) und Kultivierung gefundene Arten in den Kühlschmierstoffproben. Die Tabelle gibt an, in welchen Kühlschmierstoff-Proben die jeweiligen Arten detektiert wurden.

	Klonierung	Kultivierung
<i>Alcaligenes faecalis</i>	KSS-Proben 2, 9	KSS-Probe 9
<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i>	KSS-Probe 7	KSS-Probe 7
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	KSS-Proben 3, 9	KSS-Proben 3, 8

In KSS-Probe 9 mit einer längeren Standzeit, konnte *P. pseudoalcaligenes* zwar noch kultivierungsunabhängig aber nicht mehr in Kultur nachgewiesen werden; allerdings dominierten in dieser Probe andere Mikroorganismen. Die Ausbildung einer dominanten Mikroflora bestehend aus *P. pseudoalcaligenes* zur Hemmung des Wachstums anderer Bakterienarten konnte bei den in diesem Projekt untersuchten Kühlschmierstoff-Proben somit nicht bestätigt werden.

2.6 Nachweis von Mykobakterien durch molekularbiologische Untersuchungen

Die Entwicklung und Optimierung molekularbiologischer Methoden, um Mykobakterien in den Kühlschmierstoffen zu detektieren, steht im Moment noch am Anfang. Daher können in diesem Bericht nur die ersten Ergebnisse vorgestellt werden.

Der Nachweis von Mykobakterien in den Kühlschmierstoffproben soll über die sogenannte Real-Time PCR erfolgen. Der Grund dafür ist, dass die reine Bestimmung der Anwesenheit eines Mikroorganismus in einer Umweltprobe (z.B. Kühlschmierstoff) meist nicht ausreicht. Stattdessen stellt oftmals auch die Konzentration bestimmter Mikroorganismen in der zu analysierenden Umweltprobe einen wichtigen Faktor dar. Diese Quantifizierung kann durch eine spezielle Art der PCR, der Real-Time PCR, durchgeführt werden. Die Real-Time PCR ist vom Prinzip her vergleichbar mit einer Standard-PCR. In der Real-Time PCR wird zum Reaktionsansatz jedoch neben den spezifischen Primern noch ein Fluoreszenzfarbstoff (Sybr[®]Green) gegeben, der an doppelsträngige DNA bindet. Während der Amplifikation bindet der Farbstoff an das entstandene Produkt, wodurch sich die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes um etwa das Tausendfache erhöht. Die Fluoreszenz steigt somit proportional zur Produktmenge. Die fluorometrische Messung erfolgt in Echtzeit während der Reaktion, daher wird dieses Verfahren als Real-Time PCR bezeichnet. Auf diese Weise kann über die

Fluoreszenzintensität die Konzentration an Mikroorganismen in der Ausgangsprobe bestimmt werden (weiterführende Literatur z.B. Wilhelm, 2003; Khan, 2004).

Um eine Real-Time PCR für Mykobakterien zu entwickeln, wurde zunächst das *hsp* Gen, welches ein Hitzeschock-Protein codiert, von Mykobakterien-Reinkulturen amplifiziert. Die Amplifizierung von DNA-Extrakten der KSS-Proben schlug bisher fehl. Wenn den DNA-Extrakten mind. 10^5 Zellen von *Mycobacterium abscessus* hinzugegeben wurden (getestet mit KSS-Probe 3), erfolgte dagegen eine Amplifizierung. Die Optimierung des Real-Time PCR Ansatzes in Bezug auf die kultivierungsunabhängige Detektion von Mykobakterien in Kühlschmierstoffen soll in einem weiteren Projekt erfolgen.

Erste Versuche zur quantitativen Bestimmung von Mykobakterien mittels Real-Time PCR von DNA-Extrakten von *Mycobacterium abscessus* verliefen positiv.

Mit Hilfe von Spezialfärbungen für Mykobakterien (Auramin-Rhodamin-Färbung und Ziehl-Neelsen-Färbung) konnten in den KSS-Proben keine verdächtigen Zellen nachgewiesen werden. Ein Problem bei dieser Methode ist jedoch die Nachweisgrenze. Für einen positiven Nachweis durch diese Färbemethoden müssen mindestens 10^3 bis 10^4 säurefeste Stäbchen pro Milliliter Proben vorhanden sein (Pfyffer *et al.*, 2003). Daher sind diese Färbungen meist nur für Reinkulturen geeignet, während Mykobakterien in Umweltproben aufgrund geringerer Zellzahl eventuell nicht erfasst werden und nur unter bestimmten Bedingungen nachgewiesen werden können.

Da in der vorliegenden Studie weder über Real-Time PCR noch über Färbung oder Kultivierung auf spezifischen Nährmedien Mykobakterien in den KSS-Proben nachgewiesen werden konnten, kann vermutet werden, dass in den Proben keine Mykobakterien vorhanden waren.

Förderung

Dieses Projekt wurde gefördert durch die Berufsgenossenschaft Metall Nord Süd (BGM) (ehemals Berufsgenossenschaft Metall Süd).

zuständig:

Hauptabteilung Prävention, Mainz

Abt. Gesundheitsschutz / Sachgebiet Biologische Noxen

Frau Dr. Isabel Warfolomeow

Literatur

BG-Information (BGI) 762 (2006) Keimbelastung wassergemischter Kühlschmierstoffe. Fachausschuss „Maschinenbau, Fertigungssysteme, Stahlbau (FAMFS)“.

Beckett W., Kallay M., Sood A., Zuo Z., Milton D. (2005). Hypersensitivity Pneumonitis associated with environmental Mycobacteria. *Environmental Health Perspectives* 113 (6), 767-770.

Chakrabarty A.M. (1976) Plasmids in *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Genet.* 10, 7-30.

Falkinham J.O. (2003) Mycobacterial Aerosols and Respiratory Disease. *Emerging Infectious Diseases* 9 (7), 763-767.

Godoy F., Vancanneyt M., Martinez M., Steinbüchel A., Swings J., Rehm B.H.A. (2003) *Sphingopyxis chilensis* sp. nov., a chlorophenol-degrading bacterium that accumulates polyhydroxyalkanoate, and transfer of *Sphingomonas alaskensis* to *Sphingopyxis alaskensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 473-477.

Heppt W., Renz H., Röcken M. (1998) Allergologie. Springer Verlag, Berlin.

Khan, I. U. H., Yadav, J. S. (2004) Real-time PCR assays for genus-specific detection and quantification of culturable and non-culturable mycobacteria and pseudomonads in metalworking fluids. *Molecular and Cellular Probes* 18 (1), 67-73

Khan I.U.H., Selvaraju S.B., Yadav J.S. (2005) Occurrence and characterization of multiple novel genotypes of *Mycobacterium immunogenum* and *Mycobacterium chelonae* in metalworking fluids. *FEMS Microbiology Ecology* 54, 329-338.

Köhler W., Eggers J., Fleischer B., Marre R., Pfister H., Pulverer G. (2001) Medizinische Mikrobiologie. Urban & Fischer Verlag, München.

Lachnik J., Ackermann B., Bohrssen A., Maass S., Diephaus C., Puncken A., Stermann M., Bange F.C. (2002) Rapid-Cycle PCR and Fluorimetry for Detection of Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (9), 3364-3373.

Leiseder L.M. (1988) Kühlschmierstoffe für die Metallzerspanung. Die Bibliothek der Technik, Band 12. Verlag moderne Industrie AG & Co., Landsberg/Lech.

Liedtke S. (1999) Schleifschlammentölung und Qualitätskontrolle der zurückgewonnenen Kühlschmierstoffe. Dissertation.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., Goebel W. (Hrsg.) (2000) Brock Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.

Mattsby-Baltzer I., Sandin M., Ahlström B., Allenmark S., Ebedo M., Falsen E., Pedersen K., Rodin N., Thompson R.A., Ebedo L. (1989) Microbial Growth and Accumulation in Industrial Metal-working Fluids. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (10), 2681-2689.

Pfyffer G.E., Brown-Elliott B.A., Wallace R.J. (2003) *Mycobacterium*: General Characteristics, Isolation and Staining Procedures. In: Murray P.R., Baron E.J. Manual of clinical Microbiology, 8. Auflage. AMS Press, Washington DC.

Stackebrandt E., Rainey F., Ward-Rainey N. (1997) Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classis nov. International Journal of Systematic Bacteriology 47 (2), 479-491.

Strauss J., Gorfer M. (2004) Molekulargenetische Identifizierung von Bakterien in Kühlschmierstoffen. Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft 64, 29-31

Thorne P.S., Adamcakova-Dodd A., Kelly K.M., O'Neill M. E., Duchaine C. (2006) Metalworking Fluid with Mycobacteria and Endotoxin induces Hypersensitivity Pneumonitis in Mice. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 173, 759-768.

Vaerewijck M.J.M., Huys G., Palomino J.C., Swings J., Portaels F. (2005) Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. FEMS Microbiology Reviews 29, 911-934.

Van der Gast C.J., Knowles C.J., Wright M.A., Thompson I.P. (2001) Identification and characterization of bacterial populations of an in-use metal-working fluid by phenotypic and genotypic methodology. International Biodeterioration & Biodegradation 47, 113-123.

Van der Gast C.J., Whiteley A.S., Lilley A.K., Knowles C.J., Thompson I.P. (2003) Bacterial community structure and function in a metal-working fluid. Environmental Microbiology 5 (6), 453-461.

Wilhelm, J., Pingoud, A. (2003) Real-Time Polymerase Chain Reaction. ChemBioChem 4 (11), 1120-1128.

Wingender J., Dannehl A., Bressler D., Flemming H-C. (2003) Charakterisierung von Biofilmen in Trinkwasserverteilungssystemen. In: Flemming H-C. (Hrsg.). Erfassung des Wachstums und des Kontaminationspotentials von Biofilmen in der Verteilung von Trinkwasser

Yadav J.S., Khan I.U.H., Fakhari F., Sollner M.B. (2003) DNA-Based Methodologies for Rapid Detection, Quantification, and Species- or Strain-Level Identification of Respiratory Pathogens (Mycobacteria and Pseudomonads) in Metalworking Fluids. Occupational and Environmental Hygiene 18, 966-975.

Anhang - Technische Daten zu den untersuchten Kühlschmierstoffproben

Proben-Nr.	1	2	3	7	8	9	10
Anlagentyp	Einzelmaschine	Einzelmaschine	Einzelmaschine	BAZ	Einzelmaschine	Zentralanlage	Zentralanlage
Füllmenge (m ³)	1,5	k. A.	1	1	0,8	32	10
Öl-Basis	Ölfrei	Mineralöl	Mineralöl	Mineralöl	Mineralöl	Mineralöl	Mineralöl
Vorkonservierung Bakterizidtyp	k. A.	Formaldehyd- Depot	Formaldehyd - Depot	k. A.	ohne	ohne	Nachkonserv. mit CMI/MI
Vorkonservierung Fungizidtyp	k. A.	Jodcarbamat	Jodcarbamat	k. A.	Na-Pyriothion	Na-Pyriothion	Ohne
Nachkonservierung	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	Ja
Standzeit bei Probenahme	k. A.	k. A.	k. A.	8 Monate	8 Monate	21 Monate	12 Monate
Bearbeitungsverfahren	Schweißen	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	Schleifen
Art des Werkstoffs	k. A.	k. A.	k. A.	Stahl, Alu	Guss, Gusseisen	Stahl, Guss, Gusseisen, Alu, Buntmetalle	Fe-Werkstoffe
pH-Wert	9,1	9,3	8,7	8,3	9,0	8,7	9,1
Konz. Refraktometer %	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	3,3
Nitrit (ppm)	16	2	1	k. A.	k. A.	k. A.	4
Besonderheiten	Borhaltig	Borhaltig	Borhaltig	-	-	-	Brunnenwasser

k. A. = keine Angaben

KSS-Proben 4-6 sind in der Tabelle nicht aufgeführt, da sie nur auf Mykobakterien und thermophile Aktinomyzeten untersucht wurden.