

Forschungsvorhaben

**„Mikrobiologische Untersuchung von
wassergemischten Kühlschmierstoffproben mittels
kultivierungabhängiger und –unabhängiger
Verfahren“**

Abschlussbericht

Prof. Dr. Dr.-Ing. Peter Kämpfer, Dr. Nicole Lidders

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

Gefördert durch die Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (DGUV)

Inhalt

	Seite
1. Titel, Laufzeit und Kooperationspartner des Vorhabens	2
2. Problemstellung	2
3. Forschungszweck und –ziel	3
4. Methodik	4
4.1 Probenahme	4
4.2 Kultivierung der Mikroorganismen	4
4.3 Identifizierung der kultivierten Mikroorganismen	9
4.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl mit DAPI-Färbung	10
4.5 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten	11
4.6 Kultivierungsunabhängige Untersuchungen: DNA-Extraktion, Anlegen einer Klonbibliothek und Sequenzierung des 16S rRNA Gens	12
4.7 Erstellung phylogenetischer Bäume	13
4.8 Nachweis und Quantifizierung von Mykobakterien in Kühlschmierstoffen mittels Real-time PCR	13
4.9 Darstellung der Arbeits- und Zeitabläufe	15
5. Ergebnisse	17
5.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Anzahl an koloniebildenden Einheiten	17
5.2 Kultivierung und Identifizierung der kultivierten Mikroorganismen (Isolate) mittels 16S rRNA Gensequenzierung	23
5.3 Physiologische Identifizierung der Isolate durch die BGIA	28
5.4 Analyse der mikrobiellen Diversität mittels kultivierungsunabhängiger Methoden (Klone)	31
5.5 Gesamtdiversität der Kühlschmierstoffproben in Abhängigkeit von den eingesetzten Kühlschmierstoffkonzentraten	42
5.6 Nachweis und Quantifizierung von Mykobakterien in Kühlschmier- stoffen mittels Real-time PCR	49
6. Für das Vorhaben relevante Veröffentlichungen von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen und die Konsequenzen für das Vorhaben	50
6.1 Diversität in Kühlschmierstoffen	50
6.2 Detektierung von Mykobakterien mittels Real-time PCR mit dem „Taqman“-Ansatz	51
7. Bewertung der Ergebnisse und Relevanz für die gesetzliche Unfallversicherung	51
7.1 Mikrobielle Diversität in Kühlschmierstoffen	51
7.2 Nachweis von Mykobakterien mittels Real-time PCR	53
8. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan	53
9. Literatur	54

1. Titel, Laufzeit und Kooperationspartner des Vorhabens

Titel des Forschungsvorhabens: „Mikrobiologische Untersuchung von wassergemischten Kühlschmierstoffproben mittels kultivierungsabhängiger und – unabhängiger Verfahren“

Laufzeit: 1.07.2007 bis 30.06.2009, kosten- und zuwendungsneutrale Verlängerung bis 31.03.2010

Das Forschungsvorhaben führt die Untersuchungsansätze eines ersten Projektteils zur „Untersuchung der bakteriellen Diversität in wassergemischten Kühlschmierstoffen“ gefördert von der Berufsgenossenschaft Metall Nord Süd (BGM) fort.

Kooperationspartner: Die kultivierungsabhängigen Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit dem Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA, ehemals BGIA) Fachbereich 2: Chemische und biologische Einwirkungen, Referat Biologische Arbeitsstoffe, in Sankt Augustin.

Die Kühlschmierstoffproben wurden freundlicherweise von verschiedenen Mitgliedsbetrieben der Berufsgenossenschaft Metall Nord Süd (BGM) zur Verfügung gestellt.

2. Problemstellung

Kühlschmierstoffe werden in der Industrie bei Tätigkeiten wie Bohren, Schleifen und Schneiden von Metallen verwendet. Weltweit werden dafür jährlich $22,4 \times 10^9$ Liter Kühlschmierstoff-Lösung in unterschiedlichen Produktionsprozessen eingesetzt (van der Gast *et al.*, 2003). Zum einen sollen Kühlschmierstoffe die Reibung zwischen Werkzeug und Werkstück verhindern und zum anderen die entstehende Wärme effektiv abzuführen (Kühlung). Zusätzlich werden anfallende Späne sowie Abriebmaterialien abtransportiert (Liedtke, 1999).

In der Regel werden wassergemischte Kühlschmierstoffe mit Bakteriziden versetzt, um das unerwünschte Wachstum von Mikroorganismen zu unterdrücken. Einige Mikroorganismen sind dennoch in der Lage sich in den Emulsionen/Lösungen anzusiedeln. Nichtwassermischbare Kühlschmierstoffe werden dagegen in der Regel als keimfrei angesehen, da ihnen die lebenswichtige Komponente Wasser fehlt.

Die in den Kühlschmierstoffen vorhandenen Mikroorganismen können nachteilige Einflüsse auf die Eigenschaften der Kühlschmierstoffe haben. Solche Einflüsse werden hauptsächlich durch mikrobielle Abbauprozesse von Kohlenwasserstoffverbindungen, organischen Estern und anderen Kühlschmierstoffkomponenten hervorgerufen. Darüber hinaus müssen gesundheitsgefährdende Aspekte von potentiell pathogenen Mikroorganismen auf den Menschen berücksichtigt werden. Aufgrund der mechanischen Dispersion sowie der Verflüchtigung einiger Kühlschmierstoffinhaltsstoffe entstehen bei der Arbeit mit Kühlschmierstoffen Aerosole mit einer Tröpfchengröße zwischen 0,01 und 10 µm. Diese feinen Tröpfchen gelangen einerseits auf die Haut der Arbeiter und werden andererseits über den respiratorischen Trakt aufgenommen. Folglich können sowohl Haut- als auch Atemwegserkrankungen durch Umgang mit Kühlschmierstoffen hervorgerufen werden (Liedtke, 1999).

Darüber hinaus werden seit einiger Zeit Vertreter der Gattung *Mycobacterium* (M.), insbesondere die Spezies *M. immunogenum*, als mögliche Verursacher von Atemwegserkrankungen wie Exogen-allergischer Alveolitis (EAA) oder Asthma, bei Tätigkeiten mit wassergemischten Kühlschmierstoffen wissenschaftlich diskutiert (z.B. Beckett, 2005; Falkinham, 2003; Wallace, 2002)..Da der kulturelle Nachweis von Mykobakterien aufwändig ist, liegt in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf dem schnellen und effizienten Nachweis von Vertretern dieser Gattung mittels kultivierungsunabhängiger Verfahren.

Über die gesundheitliche Relevanz der detektierten Bakterien können im Rahmen dieses Forschungsprojektes keine Aussagen getroffen werden.

3. Forschungszweck und -ziel

Aufgrund der oben genannten Problemstellung ist das Ziel dieser Arbeit, die mikrobielle Diversität in Kühlschmierstoffen zu untersuchen. Neben kultivierungsabhängigen Methoden sollen verstärkt kultivierungsunabhängige Methoden verwendet werden. Da nicht alle Bakterien kultiviert werden können, kann nur ein Teil der Diversität in den Proben über Kultivierung erfasst werden. Ergänzende kultivierungsunabhängige Analysen helfen, einen genaueren Eindruck bezüglich der Gesamtdiversität zu erhalten. Gleichzeitig sollen Standardmethoden entwickelt werden, um Bakterien und speziell Mykobakterien in Kühlschmierstoffen

nachzuweisen. Im Rahmen dieses Projektes soll insbesondere ein Verfahren entwickelt werden, um Mykobakterien über die Real-time PCR zu quantifizieren.

4. Methodik

4.1 Probenahme

Es wurden insgesamt 10 Kühlschmierstoffproben (mit den Bezeichnungen KSS 11 bis KSS 20) sowie 7 Ansetzwasserproben (mit der Zusatzbezeichnung AW) an vier Terminen (August und November 2007, Januar und Juni 2008) genommen (Tab. 1). Die Proben stammen aus fünf Betrieben. Zusätzlich wurden Proben des Kühlschmierstoffkonzentrats genommen, um Kühlschmierstoff-Agar herzustellen (s. 4. 2). Die Probenahme erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem IFA, das Paralleluntersuchungen mit diesen Proben durchführt.

4.2 Kultivierung der Mikroorganismen

Die Kühlschmierstoffproben wurden über eine Verdünnungsreihe auf unterschiedlichen Nährmedien ausgestrichen, um koloniebildende Einheiten (KBE) zu bestimmen sowie Isolate aus den Proben zu gewinnen. Verwendete Nährmedien waren R2A-Medium (Oxoid LTD, Basingstone, Hampshire, England), KSS-Agar (eigene Herstellung, s. unten) sowie die Mykobakterien-spezifischen Medien Middlebrook-, Stonebrink- (beide BD, Franklin Lakes, USA) und Löwenstein-Jensen-Nährmedium (Difco Laboratories, Detroit, USA). Das BGIA untersuchte zeitgleich die Kühlschmierstoffproben auf CASO-Nährmedium (Oxoid LTD, Basingstone, Hampshire, England) und R2A-Medium. Alle genannten Medien, bis auf den KSS-Agar, sind kommerziell erhältliche Standardmedien. Für den KSS-Agar wurden die Kühlschmierstoffkonzentrate der beprobten Betriebe, Bacto-Agar sowie Cycloheximid-Lösung (unterdrückt das Wachstum von Pilzen) verwendet (10 ml Kühlschmierstoffkonzentrat wurden mit 90 ml Reinstwasser verdünnt und sterilfiltriert; 17 g Bacto-Agar wurden in 860 ml Reinstwasser autoklaviert; 100 ml des verdünnten Kühlschmierstoffkonzentrats und 40 ml Cycloheximid-Lösung wurden nach Abkühlen des Agars auf ca. 50°C zu diesem dazugegeben). Die Proben auf R2A-Medium und KSS-Agar wurden bei 25°C inkubiert, auf CASO-Agar bei 22°C. Beim IFA wurden die Kühlschmierstoffproben zusätzlich routinemäßig auf CASO-Agar und auf KSS-Agar bei 36°C, die Ansetzwasserproben auf CASO-Agar bei 30°C inkubiert. Da die in den

Proben detektierten Bakterienarten auf den jeweiligen Medien unabhängig von der Inkubationstemperatur identisch waren und sich auch die KBE nicht wesentlich unterschieden, werden im Folgenden die Ergebnisse bei Inkubationstemperaturen von 25°C (R2A-Medium und KSS-Agar) und 22°C (Kühlsc hmierstoffproben auf CASO-Agar) bzw. 30°C (Ansetzwasserproben auf CASO-Agar) vorgestellt. Die Proben wurden auf Mykobakterien-spezifischen Medien (Middlebrook-, Löwenstein-Jensen- und Stonebrink-Nährmedium) inkubiert. Die Nährmedien wurden nach der DIN-Vorschrift 58943-3 „Tbc-Diagnostik, Teil 3: Kulturelle Methoden zum Nachweis von Mykobakterien“ ausgewählt. Zusätzlich zu der nach DIN-Vorschrift vorgegebenen Inkubationstemperatur von 36°C (Bebrüt ung erfolgte bei 37°C, da der Brutraum des Instituts eine konstante Temperatur von 37°C aufweist) wurden die Proben bei 25°C inkubiert.

Tab. 1: Beschreibung der untersuchten Kühlschmierstoffproben und ihre Einsatzorte

Proben-Nr.	KSS 11	Ansetzwasser KSS 11	KSS 12	KSS 13	Ansetzwasser KSS 12 + 13	KSS 14
Anlagentyp	Zentralanlage	Brunnenwasser	Zentralanlage	Einzelmaschine	Brunnenwasser	Einzelmaschine
Füllmenge (m ³)	10		10	0,25		0,3
Öl-Basis	Mineralöl Produkt A		Mineralöl Produkt A	Mineralöl Produkt A		Mineralöl Produkt B
Ansetzwasser	Brunnenwasser		Brunnenwasser	Brunnenwasser		Leitungswasser Kunststoffschlauch
Vorkonservierung Bakterizidtyp	(Acticide MV), CIT, MIT (2L/m ³)		(Acticide MV), CIT, MIT (2L/m ³)	(Acticide MV), CIT, MIT (2L/m ³)		Nein
Fungizidtyp	k.A.		k.A.	k.A.		Na-Pyrrhion
Nachkonservierung	Laborbericht und Empfehlung des Herstellers		Laborbericht und Empfehlung des Herstellers	Laborbericht und Empfehlung des Herstellers		Nein
Standzeit bei Probenahme	5 Tage		3 Monate	6 Monate		4 Monate
Bearbeitungs- verfahren	Schleifen		Schleifen	Schleifen		BAZ
Art des Werkstoffs	Eisen		Eisen	Eisen		Stahl
pH-Wert	9 – 9,5	<7,5	9,0	9,0	<7,5	8,5
Konz. Refraktometer	4,16 %		3 %	3,1 %		9,4 %
Konz. Ac. % KSS	3,2 %		3 – 3,5 %.	3 – 3,5 %.		k.A.
Nitrit (ppm)	k.A.		k.A.	k.A.		0
Besonderheiten						
Temperatur	23°C	21°C	24°C	23°C	16°C	Ca. 25°C
Probenahmedatum	14.08.2007	14.08.2007	6.11.2007	6.11.2007	6.11.2007	21.01.2008

Tab. 1: Fortsetzung

Proben-Nr.	KSS 15	Ansetzwasser KSS 15	KSS 16	Ansetzwasser KSS 16	KSS 17	Ansetzwasser KSS 17
Anlagentyp	Einzel- maschine	Leitungswasser aus Schlauch	Einzelmaschine	Leitungswasser aus Schlauch	Einzelmaschine	VE-Wasser
Füllmenge (m³)	2,5		0,5		1,0	
Öl-Basis	Mineralöl Produkt C		Mineralöl Produkt C		Mineralöl Produkt D	
Ansetzwasser	Leitungs- wasser aus Schlauch		Leitungswasser aus Schlauch		VE-Wasser (völlig entsalzt)	
Vorkonservierung Bakterizidtyp	Formaldehyd- Depot (N- Formal)		Formaldehyd-Depot (N-Formal)		nein	
Fungizidtyp	Jod-Carbamat		Jod-Carbamat		Na-Pyrithion	
Nachkonservierung	nein		Desinfektionsmittel		nein	
Standzeit bei Probenahme	23 Monate		12 Monate		Ca. 3 Monate	
Bearbeitungs- verfahren	Fräsmaschine		Fräsmaschine		Drehen, BAZ	
Art des Werkstoffs	Stahl		Stahl & Kunststoff		VA-Stahl	
pH-Wert	9,0	7,8	8,9	7,6	8,5	< 6,5
Konz. Refraktometer	7,9		9,4		8,8	
Konz. Ac. % KSS	k.A.		k.A.		k.A.	
Nitrit (ppm)	10		5		0	
Besonderheiten	borsäurehaltig					
Temperatur	19,6°C	19,9°C	19,3°C	19,5°C	21,5°C	20,4°C
Probenahmedatum	21.01.2008	21.01.2008	21.01.2008	21.01.2008	21.01.2008 und 7.03.2008	21.01.2008 und 7.03.2008

Tab. 1: Fortsetzung

Proben-Nr.	KSS 18	KSS 19	KSS 20	Ansetzwasser KSS 18 – 20
Anlagentyp	Einzelmaschine	Einzelmaschine	Sammelmaschine	Flusswasser
Füllmenge (m ³)	0,25	0,25	1,5 – 2	
Öl-Basis	Syntheseöl Produkt E	Mineralöl Produkt A	Mineralöl Produkt A	
Ansetzwasser	Gebrauchswasser aus Fluss	Gebrauchswasser aus Fluss	Gebrauchswasser aus Fluss	
Vorkonservierung Bakterizidtyp	k.A.	k.A.	k.A.	
Fungizidtyp	k.A.	k.A.	k.A.	
Nachkonservierung	nein	nein	nein	
Standzeit bei Probenahme	4 Wochen	4 Wochen	1 Woche	
Bearbeitungs- verfahren	Schleifen	Schleifen	Schleifen	
Art des Werkstoffs	CV-Stahl	HSS-Stahl	HSS-Stahl	
pH-Wert	9,0	9,0	7,5	6,0
Konz. Refraktometer	ca. 2 %	ca. 2 %	ca. 2 %	
Konz. Ac. % KSS	2	2	2	
Nitrit (ppm)	k.A.	k.A.	k.A.	
Besonderheiten	Standzeit maximal 4 – 5 Wochen	Standzeit maximal 4 – 5 Wochen	Standzeit maximal 4 – 5 Wochen	
Temperatur	28°C	31°C	24,5°C	22°C
Probenahmedatum	11.06.2008	11.06.2008	11.06.2008	11.06.2008

4.3 Identifizierung der kultivierten Mikroorganismen

Zur Identifizierung wurden einzelne Kolonien von den in Punkt 4.2 beschriebenen Nährmedien mittels fraktioniertem Ausstrich isoliert und in Reinkultur gebracht. Die Auswahl unterschiedlicher Kolonien erfolgte visuell anhand der Koloniemorphologie. Aus den Reinkulturen wurde anschließend die DNA extrahiert (GenElute™ Plant Genomic DNA Kit, Sigma-Aldrich, München), mittels PCR amplifiziert und das 16S rRNA-Gen zur Identifizierung des Isolates mit Bakterienprimern (Lane 1991) sequenziert. Für die PCR-Amplifikation des 16S rRNA Gens wurden die Primer 27f und 1492r (s. Tab. 2) gewählt, die an hoch konservierte und flankierende Bereiche dieses Gens binden.

Der PCR-Mastermix bestand pro Reaktionsansatz aus 2,5 µl dNTPs, 17,3 µl DNase-RNase-freiem Wasser, je 0,3 µl Primer 27f und 1492r, 2,5 µl Puffer, 2 µl Magnesiumchlorid und 0,1 µl Taq-Polymerase. Die verschiedenen Komponenten des Mastermixes wurden in ein DNase- RNase-freies 0,75 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert und kurz gevortext. Zu 24 µl des Mastermixes wurden in ein DNase- RNase-freies 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß je 1 µl des DNA-Extraktes pipettiert. Zusätzlich wurde für jeden Mastermix eine Negativ-Kontrolle angesetzt, indem anstelle von DNA 1 µl DNase- RNase-freies Wasser hinzugefügt wurde.

Die verschlossenen Reaktionsgefäße wurden in einen Thermocycler gestellt und das entsprechende Temperaturprogramm gewählt (95°C 3 Min., 30 Zyklen mit 94°C 45 Sek., 58,2°C 45 Sek., 72°C 1 Min., abschließende Extension mit 72°C 30 Min.).

Tab. 2: Darstellung der für Amplifizierung und Sequenzierung benutzten Primer 27f und 1492r und deren Bindestellen in *E. coli* (bezogen auf 16S rRNA von *E. coli*; Accession-Nr. M25588), sowie für die Sequenzierung der Klone verwendeten Plasmidprimer M13F und M13R.

Primer	Sequenz	Bindet an Position	Literatur
27f	5'- GAG TTT GAT CMT GGC TCA G - 3'	8-26	Lane, 1991
1492r	5'- ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT – 3'	1454-1474	Lane, 1991
M13F	5'- GTA AAA GGA CGG CCA G – 3'		Invitrogen
M13R	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'		Invitrogen

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit dem QIAquick PCR Aufreinigungs Kit (QIAGEN, Hilden) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt und für die Sequenzierung des 16S rRNA Gens einem Sequenzierservice übergeben

(hausintern und AGOWA, Berlin). Die Sequenzen wurden mit dem Programm MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) Version 4 (Tamura et al., 2007) bearbeitet. Mittels des BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) konnten die nächst verwandten Sequenzen, die in der NCBI-Datenbank hinterlegt sind, ermittelt werden und anschließend phylogenetische Bäume (Neighbour Joining Methode) sowie Sequenzähnlichkeiten berechnet werden.

Die physiologische Identifizierung der Isolate über ein API-System (bioMérieux, Schweiz) sowie über BBL™ Crystal™ (BD Diagnostic Systems, USA) wurde im Rahmen der Begleituntersuchungen des BGIA vorgenommen (s. Tab. 7 Ergebnisteil).

Zusätzlich zu der Gewinnung von Isolaten auf Standardnährmedien wurden gezielt Mykobakterien aus den Kühlschmierstoffproben gewonnen. Dazu wurden Kolonien, die auf den Mykobakterien-spezifischen Nährmedien gewachsen waren, isoliert und wie oben beschrieben identifiziert.

4.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid)-Färbung

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl der in der Probe vorhandenen Bakterien dient der Abschätzung, wie hoch der Anteil an kultivierbaren Bakterien (Ermittlung über KBE) zu der tatsächlich in einer Probe vorkommenden Anzahl an Zellen tatsächlich ist. Mittels DAPI-Färbung kann die Gesamtzellzahl über fluoreszenzmikroskopische Auszählung ermittelt werden. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) verwendet, welcher an AT-reiche Regionen der DNA bindet. Das Anregungsmaximum für DAPI liegt bei einer Wellenlänge von 365 nm; nach Anregung wird Licht einer Wellenlänge von 418 nm emittiert. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ist daher eine Visualisierung von Zellen durch die Färbung der darin enthaltenen DNA möglich. Hierbei erscheinen gefärbte Zellen blau, während DNA-freie Partikel (z.B. Polyanionen) gelb erscheinen.

Zu jeweils 50 µl Probe wurden 50 µl DAPI-Arbeitslösung (1µg/ml; Sigma-Aldrich, München) gegeben, gemischt und 30 min im Dunkeln inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein Polycarbonatfilter (Filterdurchmesser: 25 mm, Porengröße 0,2 µm;

Nucleopore[®], Whatman, Kent, GB) mit der glänzenden Seite nach oben in einer mit sterilfiltriertem Reinstwasser gefüllten, sterilen Petri-Schale eingeweicht. Der Polycarbonatfilter wurde jetzt mit der glänzenden Seite nach oben auf die Fritte eines Vakuum-Filtrationsgerätes gelegt und mit einer Klammer zwischen Glasaufsatz und Fritte fixiert.

Danach wurde 1 ml sterilfiltriertes Reinstwasser in die Filtrationseinheit vorgelegt und die Probe dazu pipettiert. Um die Zellen quantitativ zu überführen, wurde das Reaktionsgefäß, in welchem sich die Probe befand, mit 1 ml sterilfiltriertem Reinstwasser ausgespült und das Reinstwasser ebenfalls in die Filtrationseinheit pipettiert. Durch das Anlegen von Vakuum wurde nun die gesamte Flüssigkeit abgesaugt. Der Filter wurde der Apparatur entnommen, in eine leere, sterile Petrischale gelegt und im Dunkeln für mindestens 10 min luftgetrocknet.

Um das Ausbleichen des Fluoreszenz-Farbstoffes zu verhindern, wurden die Filter in selbsthergestelltem Einbettmedium (100 mg p-Phenylendiamin-Hydrochlorid, 10 ml 0,5 M Carbonat-Puffer (pH 9,0) und 90 ml 99%iges Glycerin) auf einem Objektträger eingebettet. Hierfür wurde ein Tropfen des Einbettmediums auf den Objektträger gegeben, der Filter darauf gelegt, ein zweiter Tropfen des Einbettmediums auf den Filter gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt.

Unter UV-Anregung wurde bei 1000-facher Vergrößerung an einem Epifluoreszenzmikroskop (Filter 01; Axioplan 2; Zeiss, Oberkochen) die Anzahl der Zellen pro Zählfeld ermittelt.

4.5 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Für die Bestimmung der Anzahl an koloniebildenden Einheiten (KBE) / ml Kühlschmierstoffprobe wurden Verdünnungsreihen angelegt. Jeweils 0,5 ml Kühlschmierstoffprobe wurde mit 4,5 ml 0,9%iger Natriumchlorid- (NaCl-) Lösung verdünnt und aus dieser Verdünnung erneut 0,5 ml mit 4,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt, bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-6} . Jeweils 100 μ l wurde auf die Nährmedienplatten (R2A, CASO, KSS-Agar, Mykobakterien-spezifischer Agar) übertragen und verteilt. Die Platten wurden inkubiert (s. 4.2), nach 3, 7 und 14 Tagen ausgezählt und die Anzahl an KBE / ml Kühlschmierstoffprobe berechnet. Die Kolonien auf dem Mykobakterien-spezifischen Agar wurden zusätzlich nach sechs Wochen ausgezählt. Nach DIN-Vorschrift 58943-3 zum Nachweis von Mykobakterien erfolgt die letzte Auszählung der KBE nach acht Wochen; dies war nicht möglich, da

die Platten sehr stark verpilzt waren und die KBE größtenteils schon nach sechs Wochen nicht mehr bestimmt werden konnten.

4.6 Kultivierungsunabhängige Untersuchungen: DNA-Extraktion, Anlegen einer Klonbibliothek und Sequenzierung des 16S rRNA-Gens

Mittels kultivierungsunabhängiger Untersuchungen können die Mikroorganismen in einer Probe ohne aufwändige Kultivierung analysiert werden. Die DNA wird direkt aus der Probe extrahiert und weiter untersucht. Der Vorteil dieser Methode liegt einerseits in der Schnelligkeit im Vergleich zu einer oftmals zeit- und arbeitsintensiven Kultivierung und Isolierung einzelner Organismen. Andererseits können aufgrund unterschiedlicher Nährstoffansprüche nicht alle Organismen aus einer Probe kultiviert werden – mit einem kultivierungsbasierten Vorgehen erhält man daher immer nur Informationen über einen Teil der vorkommenden Organismen.

Mikrobielle DNA wurde nach einer DNA-Extraktionsmethode, die einen Chloroform/Pentanol-Schritt beinhaltet (s. Anhang), direkt aus den Kühlschmierstoff-Proben extrahiert. Aus der so gewonnenen DNA wurde mittels PCR das 16S rRNA-Gen amplifiziert, welches für die Erfassung der mikrobiellen Diversität breite Verwendung findet. Die Amplifizierung erfolgte mit Hilfe der universellen Bakterien-Primer 27f und 1492r (s. Tab. 2), die an dem 16S rRNA-Gen sämtlicher Bakterienarten binden und so die bakterielle Vielfalt in den Kühlschmierstoff-Proben erfassen können. Die amplifizierten Produkte wurden anschließend kloniert, indem einzelne DNA-Fragmente in Plasmide von *E.coli* eingebaut wurden. Die so entstandenen Klone wurden mittels Restriktionsanalyse (ARDRA – Amplified rDNA Restriction Analysis) mit den zwei Restriktionsenzymen Hpa II und Hin 6 I (Fermentas, St. Leon Rot) vorselektiert und Klone, die unterschiedliche Bandenmuster aufweisen, anschließend sequenziert. Bei der Sequenzierung handelte es sich vorerst um die Sequenzierung eines kürzeren Abschnittes des 16S rRNA-Gens (circa 500 bis 800 bp). Die Sequenzen wurden dann mit Sequenzen aus Datenbanken verglichen (s. 4.3), um die nächstverwandten Arten bzw. Gattungen zu ermitteln. Für jeden Kühlschmierstoff wurde für alle durch Sequenzvergleich gefundenen, nächstverwandten Arten ein repräsentativer Klon ausgewählt und die komplette 16S rRNA-Genregion sequenziert. Ebenso wurde für alle Klone, die sich in ihren nächstverwandten Arten bzw. Gattungen wesentlich unterschieden (<97 %

Sequenzähnlichkeit), die 16S rRNA-Genregion vollständig sequenziert. Für die Sequenzierung der Klone wurden die Primer M13F und M13R verwendet, die im Plasmid binden (s. Tab. 2).

4.7 Erstellung phylogenetischer Bäume

Sowohl für die Vollsequenzen der Isolate, als auch für die Teil- und Vollsequenzen der Klone wurden nach dem Datenbankvergleich phylogenetische Bäume erstellt, indem die Sequenzen zusammen mit Sequenzen von Typstämme der Arten, die der nächstverwandten Gattung angehören in den Baum eingerechnet wurden. Als Baumberechnungs-Methode wurde der Neighbor-Joining Algorithmus gewählt, bei dem über die Zuordnung benachbarter Sequenzen die kleinstmögliche Astlänge des Baumes ermittelt wird, um so den am wahrscheinlichsten vorkommenden Baum zu berechnen. Die Erstellung der Neighbor-Joining Bäume erfolgte mit dem Computerprogramm MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) Version 4 (Tamura et al., 2007). Um die Verlässlichkeit der Abzweigungen in dem Baum einschätzen zu können, wurde das statistische Bootstrap-Verfahren angewendet. Dabei werden Zufallsdatensätze konstruiert und der Baum mit den jeweiligen Datensätzen neu berechnet. Für die Neighbor-Joining Bäume wurde ein Bootstrap-Wert von 1000 (1000 Wiederholungen) gewählt.

4.8 Nachweis und Quantifizierung von Mykobakterien in Kühlschmierstoffen mittels Real-time PCR

Die Real-time PCR dient der Quantifizierung von Mikroorganismen. Sie 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. Da die fluorometrische Messung in Echtzeit während der Reaktion erfolgt, wird dieses Verfahren als Real-Time PCR bezeichnet.

Die Amplifikationsrate (Rate der Zunahme des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts pro Zyklus, liegt zwischen 0 und 2) der PCR ist in der exponentiellen Phase konstant näherungsweise zwei. In der Real-Time PCR macht man sich diesen exponentiellen

Anstieg zunutze, um die Quantifizierung in Bezug auf die Anfangskonzentration rein mathematisch vorzunehmen. Die Echtzeitmessung erlaubt hierbei für jede Reaktion die Bestimmung, bis zu welchem Amplifikationszyklus die Produktzunahme noch exponentiell ist. Dies ist notwendig, da eine mathematische Berechnung außerhalb der exponentiellen Phase zu Fehlberechnungen führen würde.

Da nun für alle Reaktionsansätze die exponentielle Produktzunahme durch Messung der Fluoreszenz ermittelt werden kann, lässt sich ein Signal-Schwellenwert angeben, bei welchem sich alle Reaktionsansätze eines Analysenlaufs in der exponentiellen Phase befinden. Der Zeitpunkt (in PCR-Zyklen), an dem jedes Signal diesen Schwellenwert erreicht, wird als Schwellenwertzyklus (C_T -Wert) bezeichnet.

Nach Festlegung des Signal-Schwellenwertes wird für die Standards und die Umweltproben der C_T -Wert berechnet. Aus den C_T -Werten der Standards wird eine Kalibriergerade erstellt und anhand dieser die unbekannt Konzentrationen in der Umweltprobe bestimmt.

Die Bestimmung des Schwellenwerts ist also von zentraler Bedeutung. Hieraus ergeben sich die C_T -Werte, da diese innerhalb der Berechnung einen erheblichen Einfluss haben. Dies kann manuell oder durch das mit dem Cycler mitgelieferte Programmpaket (Rotor-Gene, Corbett Research, Sydney, Australien) automatisch durchgeführt werden. Hier muss für die zukünftigen Messungen eine einheitliche Strategie gefunden und erprobt werden, um die Werte vergleichbar zu halten.

In bisherigen Versuchen wurden zuerst bereits vorhandene Mykobakterien-Stämme verwendet. Die DNA dieser Stämme wurde mit verschiedenen Methoden extrahiert: neben der Methode nach Pitcher et al. (1989) wurde ein kommerziell erhältliches Kit getestet (GenEluteTM Plant Genomic DNA Kit, Sigma-Aldrich, München). Die Isolate wurden außerdem vorher teilweise mechanisch aufbereitet, da die Zellwände der Mykobakterien sehr stabil sind.

Für die Real-time PCR wurde ein Mykobakterien-spezifisches Primerpaar, welches das *hsp*-Gen (heat shock protein 65) amplifiziert, verwendet (Tab. 3). Erste Versuche beinhalteten die Entwicklung eines Standards und die Optimierung der PCR-Bedingungen. Zunächst wurden die optimalen PCR-Bedingungen mit der DNA aus mykobakteriellen Reinkulturen ausgetestet. Um eine unspezifische Amplifizierung von DNA zu vermeiden, wurde die optimale Annealing-Temperatur der Primer ermittelt. Hierfür wurde eine Temperatur-Gradienten-PCR eingesetzt, bei welcher die

PCR-Ansätze in einem Thermocycler mehrere Temperaturprogramme parallel und unabhängig voneinander durchlaufen können.

Der PCR-Mastermix wurde wie folgt angesetzt: je Reaktionsansatz 2,5 µl dNTP, 17,3 µl DNase- RNase-freiem Wasser, je 0,3 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (hsp 1 und hsp 2), 2,5 µl Puffer, 2 µl Magnesiumchlorid und 0,1 µl Taq-Polymerase. In den ersten Versuchen wurde DNA von Reinkulturen eingesetzt (s. 2.4). Zusätzlich wurde ein Blindwert (24µl Mastermix + 1µl DNase- RNase-freies Wasser) eingesetzt. Bei der PCR wurde das folgende Cyclo-Programm verwendet: 95°C 3 Min., 30 Zyklen mit 94°C 45 Sek., 66-54°C 45 Sek., 72°C 1 Min., abschließende Extension 72°C 30 Min.

Tab. 3: Darstellung der mykobakterienspezifischen Primer, deren Sequenzen und deren Schmelzpunkt

Primer	Sequenz	T _M	Literatur
hsp 1	5'-CTG GTC AAG GAA GGT CTG CG- 3'	61,4 °C	Khan <i>et al.</i> (2004)
hsp 2	5'- GAT GAC ACC CTC GTT GCC AAC- 3'	61,8 °C	

4.9 Darstellung der Arbeits- und Zeitabläufe

1. Probenahme von August 2007 bis Juni 2008 (Parallel durch Institut für Angewandte Mikrobiologie und BGIA durchgeführt)
2. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten und Isolierung von Kolonien erfolgte zeitnah nach der jeweiligen Probenahme (Parallel durch Institut für Angewandte Mikrobiologie und BGIA durchgeführt)
3. Bestimmung der Gesamtzellzahl durch Mikroskopie erfolgte zeitnah nach der jeweiligen Probenahme (Institut für Angewandte Mikrobiologie)
4. Sequenzierung der 16S rRNA Gene der Isolate (Institut für Angewandte Mikrobiologie) und physiologische Charakterisierung der Isolate (BGIA) erfolgte ein bis mehrere Monate nach der jeweiligen Probenahme, da die Isolate zuerst vereinzelt und kultiviert werden mussten
5. Parallel dazu wurde kultivierungsunabhängig DNA aus den Kühlschmierstoff- und Ansetzwasserproben extrahiert (Institut für Angewandte Mikrobiologie). Dies erfolgte zeitnah nach den jeweiligen Probenahmen. Teilweise verzögerte sich die DNA-Extraktion aufgrund von methodischen Problemen. In diesen

Fällen wurden die Kühlschmierstoffproben, die zur BGIA gegangen sind, nach Gießen gesendet und damit weitergearbeitet.

6. Die Amplifizierung der DNA, Klonierung, Einteilung der Klone in OTUs mittels ARDRA und Sequenzierung ausgewählter Klone (Institut für Angewandte Mikrobiologie) nahm den größten Teil der Zeit in Anspruch. Ursprünglich war geplant, die Ergebnisse Ende 2008 / Anfang 2009 schon vorliegen zu haben. Aufgrund des Aufwandes dieser Arbeit wurden die letzten Sequenzen allerdings erst in der zweiten Hälfte des Jahres 2009 fertiggestellt und die Erstellung der phylogenetischen Bäume erst Ende 2009 / Anfang 2010 beendet.
7. Die Entwicklung eines Standardverfahren zur quantitativen Detektion von Mykobakterien mittels Real-time PCR (Institut für Angewandte Mikrobiologie) wurde schon vor Beginn dieses Forschungsvorhabens in dem Forschungsprojekt „Untersuchung der bakteriellen Diversität in wassergemischten Kühlschmierstoffen“ im Rahmen einer Diplomarbeit begonnen. Die Arbeiten wurden 2007 und 2008 im Rahmen einer Masterarbeit vor allem an Isolaten weitergeführt und anschließend für die Kühlschmierstoffe angewendet. Aufgrund der Konsistenz und der Zusammensetzung der Kühlschmierstoffe kommt es bei einigen Proben allerdings immer noch zu Problemen. Die DNA-Extraktion aus Kühlschmierstoffen gestaltet sich oft schwierig, da organische und anorganische Stoffe in den Kühlschmierstoffen die Extraktion behindern können. Durch die Konsistenz der Kühlschmierstoffe können die Poren in den Filtern und Säulen verstopfen, die für die DNA-Extraktion verwendet werden. Besonders für die Anwendung der Real-time PCR ist es aber wichtig, saubere DNA als Ausgangsmaterial zu haben. Aufgrund der eben genannten Probleme können diese Versuche als noch nicht abgeschlossen gelten.

5. Ergebnisse

5.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Anzahl an koloniebildenden Einheiten

Die Anzahl an **Gesamtzellen (GZZ)** und an koloniebildenden Einheiten (KBE) wurde für zehn Kühlschmierstoffproben und sieben Ansetzwasserproben untersucht. Die Ergebnisse der GZZ-Bestimmung sind in Abbildung 1 und Tabelle 4 dargestellt. Die Werte schwanken je nach Probe zwischen $4,6 \times 10^2$ und $1,6 \times 10^8$ Zellen pro ml Kühlschmierstoff bzw. Ansetzwasser. Für die Kühlschmierstoffproben konnten GZZ-Werte zwischen $7,6 \times 10^4$ (KSS 19) und $1,6 \times 10^8$ (KSS 17) Zellen pro ml detektiert werden, für das Ansetzwasser schwankte die GZZ zwischen $4,6 \times 10^2$ (AW KSS 18 – 20) und $7,8 \times 10^7$ (AW KSS 11) GZZ pro ml. In den Kühlschmierstoffproben wurden immer höhere Gesamtzellzahlen als in den dazugehörigen Ansetzwasserproben gefunden mit Ausnahme von Kühlschmierstoffprobe 11; bei dieser Probe war das Ansetzwasser höher belastet als die Kühlschmierstoffprobe.

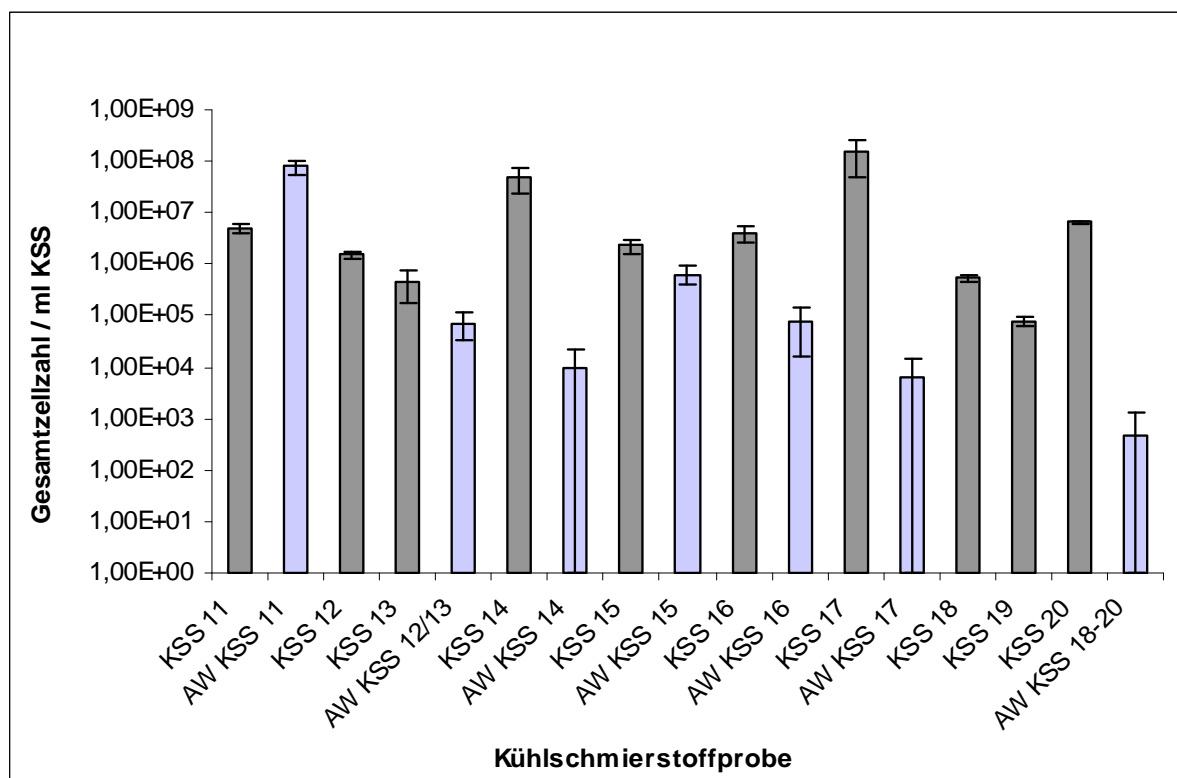


Abb. 1: Gesamtzellzahl-Bestimmung der einzelnen Kühlschmierstoffproben (KSS 11 – 20; graue Balken) und des jeweiligen Ansetzwassers (AW; hellblaue Balken) mittels DAPI-Färbung. Angegeben ist jeweils die Gesamtzellzahl / ml.

Tab. 4: Gesamtzellzahl (GZZ) / ml Kühlschmierstoffproben (KSS 11 - 20) und jeweiliges Ansetzwasser (AW) sowie Standardabweichungen (Stabw). Gezählt wurden zwischen 10 und 20 Gesichtsfelder. Werte geben GZZ pro ml KSS an.

	GZZ / ml	Stabw
KSS 11	$4,9 \times 10^6$	$\pm 1,0 \times 10^6$
AW KSS 11	$7,8 \times 10^7$	$\pm 2,1 \times 10^7$
KSS 12	$1,5 \times 10^6$	$\pm 2,5 \times 10^5$
KSS 13	$4,5 \times 10^5$	$\pm 2,8 \times 10^5$
AW KSS 12/13	$7,2 \times 10^4$	$\pm 4,0 \times 10^4$
KSS 14	$5,0 \times 10^7$	$\pm 2,8 \times 10^7$
AW KSS 14	$9,2 \times 10^3$	$\pm 1,2 \times 10^4$
KSS 15	$2,3 \times 10^6$	$\pm 7,5 \times 10^5$
AW KSS 15	$6,4 \times 10^5$	$\pm 2,5 \times 10^5$
KSS 16	$4,1 \times 10^6$	$\pm 1,5 \times 10^6$
AW KSS 16	$8,0 \times 10^4$	$\pm 6,4 \times 10^4$
KSS 17	$1,6 \times 10^8$	$\pm 1,1 \times 10^8$
AW KSS 17	$6,5 \times 10^3$	$\pm 8,1 \times 10^3$
KSS 18	$5,3 \times 10^5$	$\pm 6,4 \times 10^4$
KSS 19	$7,6 \times 10^4$	$\pm 1,6 \times 10^4$
KSS 20	$6,6 \times 10^6$	$\pm 5,0 \times 10^5$
AW KSS 18 – 20	$4,6 \times 10^2$	$\pm 8,3 \times 10^2$

Abbildung 2 und Tabelle 5 stellen die Ergebnisse der **Gesamtkoloniezahlbestimmung** (Anzahl KBE pro ml KSS bzw. AW) auf den Medien R2A-Agar, CASO-Nährmedium und KSS-Agar dar. Sowohl auf dem R2A-Medium als auch auf dem CASO-Medium konnte, mit Ausnahme von jeweils einer KSS-Probe, ein Wachstum von Bakterienkolonien festgestellt werden. Auf dem KSS-Agar konnte das Koloniewachstum nur bei etwa der Hälfte der Proben (9 von 17) ausgewertet werden, sechs Proben waren verpilzt bzw. überwachsen und konnten deshalb nicht ausgewertet werden und zwei Proben wurden nicht auf KSS-Agar ausplattiert. Die Gesamtkoloniezahl schwankte für die Kühlschmierstoffproben auf R2A-Medium zwischen $3,3 \times 10^0$ (KSS 15) und $1,3 \times 10^8$ (KSS 14) KBE / ml, auf CASO-Medium zwischen 0 (KSS 15) und $8,1 \times 10^8$ (KSS 14) KBE / ml und auf KSS-Agar zwischen $6,6 \times 10^3$ (KSS 18) und $5,7 \times 10^6$ (KSS 20) KBE / ml. Für das Ansetzwasser schwankte die Gesamtkoloniezahl auf R2A-Medium zwischen $3,9 \times 10^2$ (AW KSS 14) und $6,7 \times 10^5$ (AW KSS 15) KBE / ml, auf CASO-Medium zwischen $7,7 \times 10^1$ (AW KSS 11) und $2,2 \times 10^5$ (AW KSS 15) und auf KSS-Agar zwischen 0 (sechs Ansetzwasserproben, s. Tab. 5)) und $9,5 \times 10^6$ (AW KSS 14).

Eine hohe Gesamtzellzahl (alle Zellen, lebend und tot) bedingt nicht zwangsläufig auch eine hohe Gesamtkoloniezahl (nur lebende, wachstumsfähige Zellen). Ein anschauliches Beispiel hierfür liefern die KSS-Proben 15 und 16: Trotz hoher Gesamtzellzahlen von über 1 Million (Tab. 5) konnte auf den jeweils eingesetzten Nährmedien kein oder nur ein ganz geringfügiges Wachstum festgestellt werden. Gründe hierfür könnten beispielsweise in der Zusammensetzung des Kühlschmierstoffs liegen oder in betrieblicherseits zuvor erfolgten Konservierungsmaßnahmen. Es sollte nicht vergessen werden, dass sich nur ein kleiner Anteil der tatsächlich vorkommenden Bakterienarten auf Nährmedien kultivieren lässt. Somit wäre es möglich, dass auch hier nicht alle Bakterien auf den Standardmedien kultivierbar sind. Bei einer Auswertung der koloniebildenden Einheiten kommt es daher in der Regel immer zu einer Unterschätzung der Anzahl an tatsächlich vorkommenden Bakterien. Da sich die Gesamtkoloniezahl für die einzelnen Proben auf R2A- und CASO-Medium nur geringfügig unterscheiden, werden im Folgenden nur noch jeweils die Werte auf CASO-Medium angegeben.

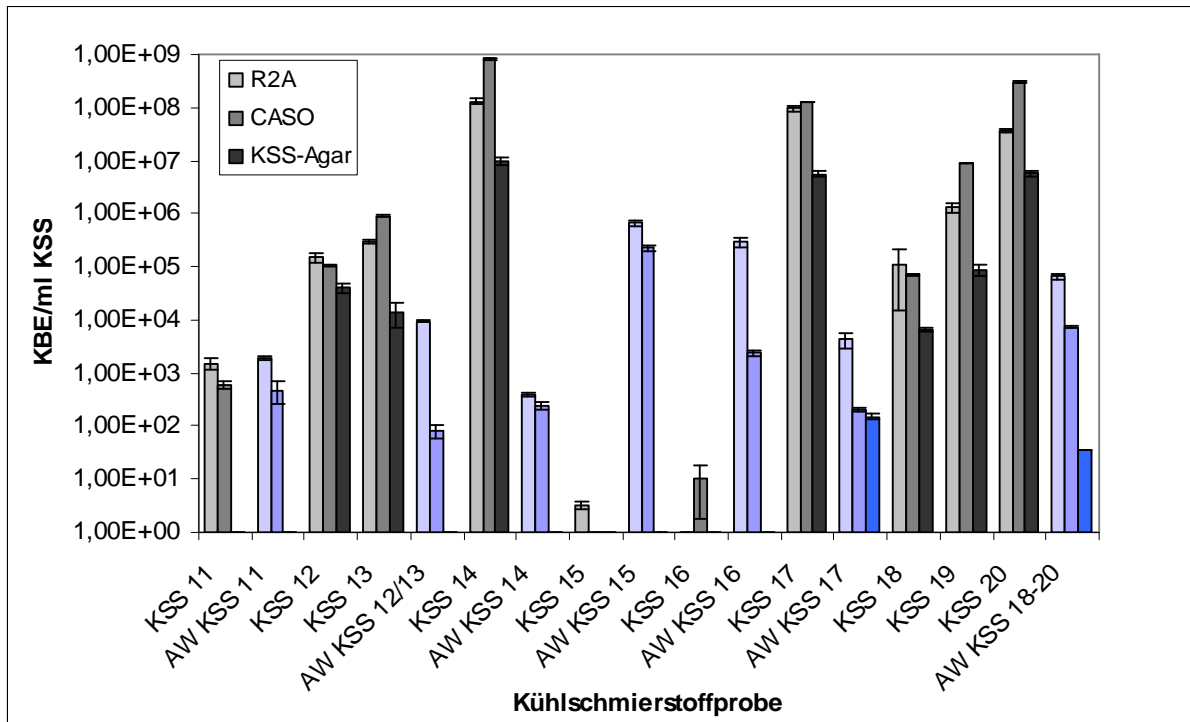


Abb. 2: Bestimmung der koloniebildenden Einheiten der Kühlschmierstoff-Proben (KSS 11 - 20) auf R2A-Agar (Inkubation bei 25°C), CASO-Nährmedium (Inkubation bei 22°C) und KSS-Agar (Inkubation bei 25°C) und des jeweiligen Ansetzwassers. Alle Angaben in KBE/ml.

Kühlschmierstoffprobe KSS 11 sowie das Ansetzwasser von KSS 11 wurden nicht auf KSS-Agar ausplattiert.

Tab. 5 (nächste Seite): Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) sowie der Standardabweichungen der Kühlschmierstoffproben auf R2A-Agar, CASO-Nährmedium und KSS-Agar. Inkubationstemperaturen s. 4.2 Material und Methoden. KSS 11 – KSS 20: Kühlschmierstoffproben 11 – 20. AW KSS 11 – AW KSS 18-20: Ansetzwasserproben für die Kühlschmierstoffe KSS 11 – KSS 20. n.d.: nicht detektiert. Alle Angaben in KBE / ml. Zum Vergleich sind in der letzten Spalte die Gesamtzellzahlen pro ml angegeben.

	R2A-Medium	CASO-Medium	KSS-Agar	GZZ / ml
KSS 11	$1,5 \times 10^3$ +/- $3,1 \times 10^2$	$6,1 \times 10^2$ +/- $8,5 \times 10^1$	n.d.	$4,9 \times 10^6$ +/- $1,0 \times 10^6$
AW KSS 11	$1,9 \times 10^3$ +/- $1,8 \times 10^2$	$7,7 \times 10^1$ +/- $2,0 \times 10^2$	n.d.	$7,8 \times 10^7$ +/- $2,1 \times 10^7$
KSS 12	$1,5 \times 10^5$ +/- $2,8 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$ +/- $5,3 \times 10^3$	$4,1 \times 10^4$ +/- $8,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^6$ +/- $2,5 \times 10^5$
KSS 13	$3,0 \times 10^5$ +/- $2,72 \times 10^4$	$9,0 \times 10^5$ +/- $2,5 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$ +/- $7,1 \times 10^3$	$4,5 \times 10^5$ +/- $2,8 \times 10^5$
AW KSS 12/13	$9,5 \times 10^3$ +/- $4,4 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$ +/- $2,2 \times 10^1$	0	$7,2 \times 10^4$ +/- $4,0 \times 10^4$
KSS 14	$1,3 \times 10^8$ +/- $1,4 \times 10^7$	$8,1 \times 10^8$ +/- $3,3 \times 10^7$	$9,5 \times 10^6$ +/- $1,6 \times 10^6$	$5,0 \times 10^7$ +/- $2,8 \times 10^7$
AW KSS 14	$3,9 \times 10^2$ +/- $3,1 \times 10^1$	$2,4 \times 10^2$ +/- $4,0 \times 10^1$	0	$9,2 \times 10^3$ +/- $1,2 \times 10^4$
KSS 15	$3,3 \times 10^0$ +/- $5,8 \times 10^{-1}$	0	0	$2,3 \times 10^6$ +/- $7,5 \times 10^5$
AW KSS 15	$6,7 \times 10^5$ +/- $8,1 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$ +/- $3,4 \times 10^4$	0.	$6,4 \times 10^5$ +/- $2,5 \times 10^5$
KSS 16	0	$1,0 \times 10^1$ +/- $8,2 \times 10^0$	0	$4,1 \times 10^6$ +/- $1,5 \times 10^6$
AW KSS 16	$2,9 \times 10^5$ +/- $5,5 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$ +/- $2,1 \times 10^2$	0	$8,0 \times 10^4$ +/- $6,4 \times 10^4$
KSS 17	$9,6 \times 10^7$ +/- $1,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$ +/- $2,9 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$ +/- $7,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^8$ +/- $1,1 \times 10^8$
AW KSS 17	$4,2 \times 10^3$ +/- $1,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$ +/- $2,2 \times 10^1$	$1,5 \times 10^2$ +/- $1,7 \times 10^1$	$6,5 \times 10^3$ +/- $8,1 \times 10^3$
KSS 18	$1,1 \times 10^5$ +/- $9,5 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$ +/- $4,7 \times 10^2$	$6,6 \times 10^3$ +/- $4,5 \times 10^2$	$5,3 \times 10^5$ +/- $6,4 \times 10^4$
KSS 19	$1,3 \times 10^6$ +/- $2,3 \times 10^5$	$8,7 \times 10^6$ +/- $2,1 \times 10^5$	$8,7 \times 10^4$ +/- $2,1 \times 10^4$	$7,6 \times 10^4$ +/- $1,6 \times 10^4$
KSS 20	$3,6 \times 10^7$ +/- $3,8 \times 10^6$	$3,0 \times 10^8$ +/- $4,7 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$ +/- $7,2 \times 10^5$	$6,6 \times 10^6$ +/- $5,0 \times 10^5$
AW KSS 18 – 20	$6,5 \times 10^4$ +/- $7,4 \times 10^3$	$7,4 \times 10^3$ +/- $4,5 \times 10^2$	$6,5 \times 10^4$ +/- 0,0	$4,6 \times 10^2$ +/- $8,3 \times 10^2$

Tab. 6: Bestimmung der Gesamtkoloniezahl (einschließlich Standardabweichungen) der Kühlschmierstoffproben (KSS 11 - 20) und des jeweiligen Ansetzwassers auf den Mykobakterien-spezifischen Medien Middlebrook (MB), Löwenstein-Jensen (LJ) und Stonebrink (SB) bei Inkubationstemperaturen von 25°C bzw. 37°C. Alle Angaben in KBE / ml.

n.a.: nicht auswertbar (Platten verpilzt oder überwachsen)..

	MB 25°C	MB 37°C	LJ 25°C	LJ 37°C	SB 25°C	SB 37°C
KSS 11	2,0 x 10 ⁰ +/- 0,0	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
AW KSS 11	2,0 x 10 ⁰ +/- 0,0	0.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
KSS 12	2,0 x 10 ⁴ +/- 1,1 x 10 ³	0	1,7 x 10 ⁰ +/- 1,5 x 10 ⁰	n.a.	n.a.	n.a.
KSS 13	0	6,3 x 10 ⁰ +/- 4,8 x 10 ⁰	1,4 x 10 ³ +/- 1,2 x 10 ²	n.a.	n.a.	n.a.
AW KSS 12/13	2 x 10 ⁰ +/- 0,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
KSS 14	0	0	0	0	0	0
AW KSS 14	0	0	0	0	0	0
KSS 15	0,3 x 10 ⁰ +/- 5,8 x 10 ⁻¹	1 x 10 ⁰ +/- 1,0 x 10 ⁰	0	1,7 x 10 ⁰ +/- 2,9 x 10 ⁰	0	0
AW KSS 15	0	0	2,6 x 10 ¹ +/- 5,8 x 10 ⁰	1,3 x 10 ⁰ +/- 2,3 x 10 ⁰	0	0
KSS 16	0,3 x 10 ⁰ +/- 5,8 x 10 ⁻¹	0	3,5 x 10 ⁰ +/- 2,1 x 10 ⁰	0	0	0
AW KSS 16	1,2 x 10 ¹ +/- 1,2 x 10 ¹	0	0	0	0	n.a.
KSS 17	1,7 x 10 ¹ +/- 4,9 x 10 ⁰	6 x 10 ⁰ +/- 2,0 x 10 ⁰	0	0	0	0
AW KSS 17	1,0 x 10 ¹ +/- 2,7 x 10 ⁰	0,7 x 10 ⁰ +/- 5,7 x 10 ⁻¹	7 x 10 ⁰ +/- 6,2 x 10 ⁰	0	0	0
KSS 18	0	0,3 x 10 ⁰ +/- 5,8 x 10 ⁻¹	0	0	0	0
KSS 19	1,1 x 10 ¹ +/- 2,7 x 10 ⁰	0,3 x 10 ⁰ +/- 5,8 x 10 ⁻¹	0	0	0	0
KSS 20	8,3 x 10 ² +/- 3,8 x 10 ²	6,6 x 10 ⁰ +/- 2,3 x 10 ⁰	6,0 x 10 ⁰ +/- 2,3 x 10 ⁰	0,3 x 10 ⁰ +/- 5,8 x 10 ⁻¹	0	0
AW KSS 18 - 20	1,5 x 10 ² +/- 4,0 x 10 ¹	3,3 x 10 ² +/- 3,2 x 10 ²	5,4 x 10 ¹ +/- 1,5 x 10 ¹	4,9 x 10 ¹ +/- 1,0 x 10 ¹	n.a.	n.a.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der KBE-Bestimmung auf den Mykobakterien-spezifischen Medien Middlebrook- und Löwenstein-Jensen-Nährmedium dargestellt. Auf dem Stonebrink-Nährmedium konnte kein Wachstum festgestellt werden, bzw. die Platten waren nicht auswertbar, da sie verpilzt oder mit einem Bakterienrasen überwachsen waren. Sowohl beim Middlebrook- als auch beim Löwenstein-Jensen-Medium konnten mehr KBE auf Platten, die bei 25°C inkubiert wurden, ausgezählt werden, als auf Platten, die bei 37°C inkubiert wurden. Insgesamt konnten nur sehr wenige Platten ausgewertet werden. Auf vielen Platten zeigte sich kein Wachstum oder die Ergebnisse waren nicht auswertbar. Bei den auswertbaren Platten schwankte die Gesamtkoloniezahl der Kühlschmierstoffe auf dem Middlebrook-Medium zwischen 0 (mehrere KSS, s. Tab. 6) und $2,0 \times 10^4$ (KSS 12) KBE / ml Kühlschmierstoffprobe, für das Ansetzwasser schwankte der Wert zwischen 0 (s. Tab. 6) und $3,3 \times 10^2$ (AW KSS 18 – 20) KBE / ml Ansetzwasser. Die Werte unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Inkubationstemperaturen von 25°C und 37°C (Ausnahme KSS 20). Bei einer Inkubationstemperatur von 25°C konnten allerdings in insgesamt 12 Proben Kolonien gezählt werden, bei einer Temperatur von 37°C dagegen nur bei 8 der Proben. Beim Löwenstein-Jensen-Medium konnten für die Kühlschmierstoffe Gesamtkoloniezahlen zwischen 0 (s. Tab. 6) und $1,4 \times 10^3$ (KSS 13) KBE / ml Kühlschmierstoffprobe detektiert werden, für das Ansetzwasser zwischen 0 (s. Tab. 6) und $4,9 \times 10^1$ (AW KSS 18 – 20). Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, können auf den Mykobakterien-spezifischen Medien auch andere Bakteriengattungen wachsen. Es wurden insgesamt 15 Isolate von diesen Medien kultiviert, die acht anderen Gattungen zugeordnet werden konnten (Tab. 7). Von der Gesamtkoloniezahl auf Mykobakterien-spezifischen Medien kann daher nicht auf die Anzahl an Mykobakterien in Kühlschmierstoffen geschlossen werden. Diese Beobachtung konnte für alle drei verwendeten Nährmedien (Stonebrink, Löwenstein-Jensen und Middlebrook) gemacht werden.

5.2 Kultivierung und Identifizierung der kultivierten Mikroorganismen (Isolate) mittels 16S rRNA-Gensequenzierung

Die auf den oben genannten Nährmedien gewachsenen Mikroorganismen wurden aufgrund ihrer Koloniemorphologie eingeteilt und unterschiedliche Kolonien anschließend isoliert, um Reinkulturen zu erhalten. Es wurden Isolate aus neun Kühlschmierstoffproben und aus sieben Ansetzwasserproben gewonnen und von

diesen Isolaten das 16S rRNA Gen sequenziert. Die Isolate stammen sowohl aus dem Institut für Angewandte Mikrobiologie als auch aus dem IFA und wurden von R2A-Agar, CASO-Nährmedium und von den Mykobakterien-spezifischen Medien gewonnen (Löwenstein-Jensen-, Middlebrook- und Stonebrink-Nährmedium). Obwohl vom Stonebrink-Nährmedium keine KBE ausgewertet werden konnten (s. 5.1 und Tab. 6), war es teilweise jedoch möglich, einzelne Kolonien von diesem Medium zu isolieren, wenn die entsprechende Platte nicht vollständig überwachsen war. Insgesamt wurden 44 Isolate am Institut für Angewandte Mikrobiologie gewonnen. Vom BGIA sind weitere 26 Isolate für die Identifizierung mittels 16S rRNA Gen-Sequenzierung an das Institut für Angewandte Mikrobiologie geschickt worden. Von den **insgesamt 70 Isolaten** wurden 16S rRNA Gen-Vollsequenzen erstellt und mit schon vorhandenen Sequenzen in der NCBI-Datenbank verglichen (Tabelle 7). Zusätzlich wurden phylogenetische Bäume mit den 16S rRNA Gensequenzen der nächstverwandten Typstämme der zugeordneten Gattung erstellt (**Abb. 1 - 26 im Anhang**). Die Sequenzierung der 16S rRNA Gene für die Zuordnung unbekannter Isolate zu bekannten Gattungen und Arten in Datenbanken gehört inzwischen zu den Standardmethoden der Identifizierung von Isolaten. Das 16S rRNA Gen ist circa 1500 Basenpaare lang und besitzt sowohl konservierte Bereiche, die bei fast allen Bakterien identisch sind, als auch variable Regionen, die sich zwischen den Gattungen und ggf. sogar Arten unterscheiden können. Eine Gattungszuordnung ist in der Regel durch die Sequenzierung des kompletten 16S rRNA Gens möglich. In einigen Fällen ist auch die Zuordnung zu Arten möglich, es gibt allerdings Gruppen von Bakterien, bei denen dies aufgrund der engen Verwandtschaft zwischen den Arten und eines sehr ähnlichen 16S rRNA Gens schwierig ist. In der nachfolgenden Tabelle 7 sowie in den Tabellen im Anhang ist daher neben der nächstverwandten 16S rRNA-Sequenz (Zuordnung auf Artebene) auch immer die Sequenzähnlichkeit angegeben. Eine Sequenzähnlichkeit von 100% lässt mit großer Wahrscheinlichkeit darauf schließen, dass das unbekannte Isolat (bzw. die Klonsequenz bei den kultivierungsunabhängigen Analysen) dieser Art angehört. Auch bei 99% Sequenzähnlichkeit ist die Wahrscheinlichkeit noch relativ groß. Sequenzen, die weniger als 97% Ähnlichkeit zu Sequenzen in der Datenbank aufweisen, gehören dagegen der genannten Art nicht an. Wenn es in den Datenbanken keine Art gibt, die mehr als 97% Ähnlichkeit zu der 16S rRNA Gen-Sequenz des untersuchten Isolats

aufweist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine neue Art, ggf. sogar um eine neue Gattung handelt.

Die Isolate konnten 27 unterschiedlichen Gattungen zugeordnet werden. 20 der Isolate hatten Mykobakterien als nächste Verwandte (Tabelle 7). Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass Isolate auch gezielt von den Mykobakterien-spezifischen Nährmedien ausgewählt wurden, d. h. der mögliche Rückschluss den man ziehen könnte, dass in einer Kühlschmierstoffprobe ausschließlich Mykobakterien vorhanden seien ist somit nicht richtig, sondern in diesem Fall durch die Auswahl des spezifischen Nährmediums bedingt.

Bei einer Sequenzähnlichkeit des Isolats mit der nächst verwandten Sequenz von unter 97 % kann nicht mehr davon ausgegangen werden, dass es sich um die gleiche Art handelt. Das ist für das Isolat AW 15.2 der Fall. Aufgrund der geringen Ähnlichkeit mit bekannten Arten wird dieses Isolat weitergehend untersucht. Insgesamt 13 (19 %) der aus den Kühlschmierstoff-Proben stammenden Isolate haben die höchste Sequenzähnlichkeit zu Arten, die gemäß TRBA 466 ("Einstufung von Bakterien (Bacteria) und Archaeobakterien (Archaea) in Risikogruppen") der Risikogruppe 2 zugeordnet werden.

Tab. 7: Zuordnung der Isolatsequenzen zu Spezies der nächstverwandten Gattungen aufgrund von 16S rRNA-Gen Vollsequenzen, sowie Angaben der Sequenzähnlichkeiten, der Kühlschmierstoff-Probe, aus der das Isolat gewonnen wurde, dem Nährmedium, von dem das Isolat stammt und der Risikogruppe der nächst verwandten Sequenz nach TRBA 466. Die Vergleichssequenzen wurden aus der primären Datenbank „Genbank“ entnommen. Risikogruppe k.E.: bislang keine Einstufung erfolgt. Gelb unterlegt: Arten die sowohl mit der physiologischen Nachweismethode als auch über Gensequenzierung nachgewiesen wurden. CASO = CASO-Medium, MB = Middlebrook-Medium, LJ = Löwenstein-Jensen-Medium, SB = Stonebrink-Medium, KSS = KSS-Agar.

Isolat	Nächst verwandte Sequenz nach BLAST (Acc.-Nr.)	Sequenz-ähnlichkeit	Risiko-gruppe	Isoliert aus KSS-Probe	Isoliert von
11.4	<i>Bacillus fusiformis</i> (AY907676)	99%	1	11	CASO
11.5	<i>Aeromonas veronii</i> biovar <i>sobria</i> (EF631963)	100%	2	11	CASO
11.6	<i>Micrococcus luteus</i> (EU086818)	99%	1	11	CASO
11.7	<i>Citrobacter freundii</i> (AJ233408)	99%	2	11	CASO
11.8	<i>Corynebacterium lubricantis</i> (FM173120)	99%	k.E.	11	MB
AW 11.1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (EU236753)	100%	1	11 AW	CASO
AW 11.2	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> (EU977808)	99%	k.E.	11 AW	CASO
AW 11.3	<i>Curtobacterium citreum</i> (AM411064)	99%	1	11 AW	CASO
AW 11.9	<i>Mycobacterium gordonae</i> (EF428556)	100%	1	11 AW	MB
12.1	<i>Wautersiella falsenii</i> (AM238680)	99%	k.E.	12	CASO
12.2	<i>Myroides odoratus</i> (M58777)	98%	2	12	CASO
12.3	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i> (FJ493054)	99%	k.E.	12	CASO
12.14	<i>Bacillus licheniformis</i> (AB301011)	100%	1	12	MB
12.19	<i>Corynebacterium lubricantis</i> (FM173120)	99%	k.E.	12	MB
12.23	<i>Variovorax ginsengisoli</i> (AB245358)	99%	k.E.	12	MB
13.1	<i>Bordetella trematum</i> (NR_025404)	99%	2	13	CASO
AW 12/13.1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (NR_025467)	99%	1	12/13 AW	CASO
AW 12/13.2	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> (EU714359)	97%	1	12/13 AW	CASO
AW 12/13.4	<i>Mycobacterium gordonae</i> (EF428556)	99%	1	12/13 AW	LJ
AW 12/13.6	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (X81665)	99%	2	12/13 AW	LJ
AW 12/13.7	<i>Mycobacterium gordonae</i> (EU486080)	99%	1	12/13 AW	LJ
AW 12/13.27	<i>Mycobacterium gordonae</i> (EF428556)	99%	1	12/13 AW	MB
AW 12/13.28	<i>Mycobacterium neglectum</i> (AJ580802)	99%	k.E.	12/13 AW	MB
14.1	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (Z76666)	100%	1	14	KSS
14.2	<i>Pseudomonas mendocina</i> (DQ178223)	99%	2	14	CASO
AW 14.1	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> (AY124375)	100%	k.E.	14 AW	CASO
AW 15.1	<i>Sphingomonas anadarae</i> (AB261013)	99%	k.E.	15 AW	CASO
AW 15.2	<i>Pedobacter composti</i> (AB267720)	93%	k.E.	15 AW	CASO
AW 15.4	<i>Mycobacterium cookii</i> (AF480598)	98%	1	15 AW	MB
16.1	<i>Micrococcus luteus</i> (EU438932)	100%	1	16	CASO
AW 16.2	<i>Mycobacterium gordonae</i> (AJ581472)	100%	1	16 AW	SB
AW 16.3	<i>Mycobacterium gordonae</i> (EF428556)	100%	1	16 AW	MB
AW 16.4	<i>Mycobacterium gordonae</i> (AJ581472)	99%	1	16 AW	MB
17.1	<i>Citrobacter farmeri</i> (DQ187383)	99%	2	17	CASO
17.2	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (AB109888)	99%	1	17	CASO
17.3	<i>Shewanella putrefaciens</i> (CP000681)	99%	1	17	CASO
17.4	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (EU815635)	99%	1	17	CASO
17.5	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (EU815635)	99%	1	17	CASO
17.6	<i>Citrobacter farmeri</i> (EU030438)	99%	2	17	CASO
17.7	<i>Citrobacter farmeri</i> (NR_024861)	100%	2	17	CASO

Tab. 7: Fortsetzung

Isolat	Nächst verwandte Sequenz nach BLAST (Acc.-Nr.)	Sequenz-ähnlichkeit	Risiko-gruppe	Isoliert aus KSS-Probe	Isoliert von
AW 17.1	<i>Ralstonia pickettii</i> (CP001069)	99%	1	17 AW	KSS
AW 17.2	<i>Atopostipes suicloacalis</i> (AF445248)	96%	k.E.	17 AW	LJ
AW 17.3	<i>Mycobacterium nebraskense</i> (AY368456)	99%	k.E.	17 AW	MB
AW 17.4	<i>Mycobacterium nebraskense</i> (AY368456)	99%	k.E.	17 AW	MB
AW 17.5	<i>Ralstonia pickettii</i> (FJ828883)	100%	1	17 AW	CASO
AW 17.6	<i>Cupriavidus metallidurans</i> (CP000353)	100%	k.E.	17 AW	CASO
18.1	<i>Bacillus circulans</i> (AY043084)	100%	1	18	MB
18.2	<i>Comamonas testosteroni</i> (GQ287631)	100%	1	18	CASO
19.1	<i>Gulosibacter molinativorax</i> (NR_025451)	100%	1	19	MB
19.2	<i>Moraxella osloensis</i> (GQ284472)	99%	2	19	CASO
19.3	<i>Brevundimonas diminuta</i> (EU977701)	100%	2	19	CASO
19.4	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (EU815635)	100%	1	19	KSS
20.1	<i>Cellulosimicrobium funkei</i> (AY501364)	99%	k.E.	20	SB
20.2	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> (AB116667)	99%	1	20	LJ
20.4	<i>Gulosibacter molinativorax</i> (AJ306835)	100%	1	20	LJ
20.5	<i>Gulosibacter molinativorax</i> (AJ306835)	99%	1	20	MB
20.7	<i>Cellulosimicrobium funkei</i> (AY501364)	99%	k.E.	20	MB
20.8	<i>Corynebacterium lubricantis</i> (FM173119)	99%	k.E.	20	MB
20.9	<i>Micrococcus luteus</i> (FJ357621)	99%	1	20	MB
20.10	<i>Comamonas denitrificans</i> (DQ836252)	99%	1	20	CASO
20.11	<i>Brevundimonas diminuta</i> (EU545397)	100%	2	20	CASO
AW 18-20.1	<i>Mycobacterium gordonae</i> (EU486080)	99%	1	18-20 AW	SB
AW 18-20.2	<i>Mycobacterium peregrinum</i> (AM884581)	99%	1	18-20 AW	SB
AW 18-20.3	<i>Mycobacterium peregrinum</i> (AM884279)	100%	1	18-20 AW	LJ
AW 18-20.4	<i>Mycobacterium gastris</i> (AF480602)	99%	2	18-20 AW	LJ
AW 18-20.5	<i>Mycobacterium gordonae</i> (EF428556)	99%	1	18-20 AW	LJ
AW 18-20.6	<i>Mycobacterium gordonae</i> (AY604571)	100%	1	18-20 AW	LJ
AW 18-20.7	<i>Mycobacterium gordonae</i> (AY604571)	100%	1	18-20 AW	MB
AW 18-20.8	<i>Mycobacterium gordonae</i> (EF428556)	100%	1	18-20 AW	MB
AW 18-20.9	<i>Mycobacterium nebraskense</i> (AY368456)	99%	k.E.	18-20 AW	MB

Auffallend ist, dass es keine Übereinstimmung zwischen den nachgewiesenen Arten im Ansetzwasser und in den dazugehörigen Kühlschmierstoffproben gibt (s. Tabelle 15). Von den insgesamt 98 mittels Sequenzierung der Isolate und der Klone detektierten Gattungen (Ergebnisse der Klonierung siehe 5.4) konnten nur 10 Gattungen sowohl in den Kühlschmierstoffproben als auch im Ansetzwasser gefunden werden. 46 der Gattungen wurden nur in Kühlschmierstoffproben gefunden, 42 der Gattungen dagegen nur im Ansetzwasser. Gründe dafür könnten die unterschiedlichen Nährstoffangebote und Lebensbedingungen im Kühlschmierstoff und im Ansetzwasser sein. Kühlschmierstoffemulsionen enthalten zum Beispiel Kohlenwasserstoffverbindungen und organische Ester, die von einigen Mikroorganismen als Nahrungsquelle genutzt werden können. Auch der pH-Wert der

Kühlschmierstoffemulsionen liegt im Durchschnitt zwischen 8,5 und 9,5 (Ausnahme KSS 20 mit einem pH-Wert von 7,5), während der pH-Wert des Ansetzwassers im Durchschnitt unter 7,5 lag. Auch das begünstigt andere Mikroorganismengemeinschaften. Ungeklärt ist, ob die in den Kühlschmierstoffproben vorherrschenden Gattungen in sehr geringen Mengen auch im Ansetzwasser vorkommen und dort nur nicht detektiert werden konnten. Durch die Änderung der Lebensbedingungen könnten sich diese Arten dann zu den dominierenden Arten entwickelt haben. In den Kühlschmierstoffkonzentraten konnten, soweit sie untersucht wurden, dagegen keine Bakterien nachgewiesen werden (s. Tab. 8), sie können daher nicht als Quelle für die mikrobielle Diversität in den Kühlschmierstoffemulsionen herangezogen werden.

5.3 Physiologische Charakterisierung der Isolate durch die BGIA

Neben dem Institut für Angewandte Mikrobiologie in Gießen hat auch die BGIA Isolate aus Kühlschmierstoffproben, deren Ansetzwasser und Kühlschmierstoffkonzentrat gewonnen und analysiert, allerdings nicht über die Sequenzierung, sondern über die physiologische Charakterisierung der Isolate. Bei gramnegativen Bakterien erfolgte die Charakterisierung mittels API-System (bioMérieux, Schweiz) und BBL™ Crystal™ (BD Diagnostic Systems, USA), bei grampositiven Bakterien wurde nur das System BBL™ Crystal™ verwendet. Die Isolate wurden von CASO-Nährmedium (22°C und 36°C bzw. 30°C), R2A-Agar (22°C und 36°C) und KSS-Agar (22°C und 36°C) gewonnen. In Tabelle 8 sind die nachgewiesenen Arten aufgelistet, jeweils mit der Angabe aus welchem Kühlschmierstoff die Isolate stammen sowie den Nährböden, auf denen sie isoliert wurden.

Tab. 8: Aus Kühlschmierstoffproben identifizierte Bakterienarten auf den Nährböden CASO-Nährmedium, R2A-Agar und KSS-Agar, bei 22°C, 30°C und/oder 36°C. Angegeben sind jeweils die Herkunft, die nachgewiesenen Arten, die Risikogruppe der Arten nach TRBA 466 sowie die Kultivierungsbedingungen, unter denen die Arten nachgewiesen werden konnten.

k.A.: bislang keine Einstufung erfolgt; gelb unterlegt: Arten die sowohl mit der physiologischen Nachweismethode als auch über Gensequenzierung nachgewiesen wurden.

Herkunft	Nachgewiesene Arten	Risiko- gruppe	Kultivierung
KSS 11	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	2	CASO-Nährmedium und R2A-Agar bei 22°C und bei 36°C
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	
	<i>Micrococcus luteus</i>	1	
	<i>Citrobacter freundii</i>	2	
AW KSS 11	<i>Leifsonia aquaticum</i>	1	CASO-Nährmedium bei 22°C und bei 36°C
	<i>Neisseria elongata</i>	1	
	<i>Pantoea agglomerans</i>	2	
KSS 12	<i>Empedobacter brevis</i>	2	CASO-Nährmedium und R2A-Agar bei 22°C und bei 36°C
	<i>Weeksella virosa</i>	1	
	Gemischte gram-negative Stäbchen		
KSS 13	<i>Empedobacter brevis</i>	2	CASO-Nährmedium und R2A-Agar bei 22°C und bei 36°C
	<i>Weeksella virosa</i>	1	
	<i>Bordetella avium</i>	2	
AW KSS 12/13	<i>Flavobacterium</i> <i>meningosepticum</i>	2	CASO-Nährmedium und bei 30°C
	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2	
KSS 14	<i>Weeksella virosa</i>	1	CASO-Nährmedium bei 22°C und bei 36°C KSS-Agar bei 22°C und 36°C
	<i>Pseudomonas</i> sp.		
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	
AW KSS 14 AW	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1	CASO-Nährmedium und bei 30°C
KSS 14 Konzentrat	keine Bakterien nachgewiesen		CASO-Nährmedium bei 22°C und bei 36°C
KSS 15	keine Bakterien nachgewiesen		CASO-Nährmedium bei 22°C und bei 36°C
AW KSS 15 AW	<i>Brevundimonas vesicularis</i> <i>Pasteurella</i> sp.	1	CASO-Nährmedium und bei 30°C

KSS 16	<i>Micrococcus luteus</i>	1	CASO-Nährmedium bei 22°C
AW KSS 16 AW	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1	CASO-Nährmedium und bei 30°C
KSS 17	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Moraxella</i> sp. <i>Escherichia coli</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> <i>Pseudomonas mesophilica</i> <i>Kluyvera ascorbata</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1 2 1 1 1 2 2 2	CASO-Nährmedium bei 22°C und bei 36°C KSS-Agar bei 22°C und 36°C
KSS 17 Konzentrat	keine Bakterien nachgewiesen		CASO-Nährmedium bei 22°C und bei 36°C
AW KSS 17 AW	<i>Brevundimonas vesicularis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1 1 2	CASO-Nährmedium und bei 30°C
KSS 18	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> <i>Moraxella</i> sp.	1	CASO-Nährmedium bei 22°C und bei 36°C
KSS 18 Konzentrat	keine Bakterien nachgewiesen		CASO-Nährmedium bei 22°C und bei 36°C
KSS 19	<i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Moraxella</i> sp. <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2 2	CASO-Nährmedium bei 22°C und bei 36°C KSS-Agar bei 22°C und 36°C
KSS 20	<i>Methylobacterium mesophilicum</i> <i>Moraxella</i> spp. <i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Moraxella</i> spp.	1 2	CASO-Nährmedium bei 22°C und bei 36°C KSS-Agar bei 22°C und 36°C
KSS 19/20 Konzentrat	keine Bakterien nachgewiesen		CASO-Nährmedium bei 22°C und bei 36°C
AW KSS 18-20	<i>Delftia acidoverans</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> / <i>achromogenes</i>	2 2	CASO-Nährmedium und bei 30°C

Auf dem KSS-Agar wurden wesentlich weniger Bakterien nachgewiesen als auf CASO-Nährmedium und R2A-Agar. Lediglich für vier Kühlschmierstoffproben (KSS 14, 17, 19 und 20) konnten Bakterien nachgewiesen werden, allerdings jeweils nur eine Art, *Pseudomonas fluorescens* (KSS 14), *Pseudomonas alcaligenes* (KSS 17 und 19) und die Gattung *Moraxella* (KSS 20).

Über die physiologische Charakterisierung konnten 15 (40%) Arten in den Kühlschmierstoffproben und deren Ansetzwasser gefunden werden, die der Risikogruppe 2 zugeordnet werden. Der höhere Anteil an Vertretern der Risikogruppe 2 im Vergleich zu den molekulargenetischen Verfahren mag daran liegen, dass die physiologischen Testsysteme für die klinische Diagnostik entwickelt wurden und somit ihren Schwerpunkt im Nachweis von (potentiellen) Krankheitserregern haben.

Interessant ist, dass nur sechs mit physiologischen Verfahren nachgewiesene Arten auch über Isolierung und 16S rRNA Gen-Sequenzierung in den jeweiligen Kühlschmierstoffproben detektiert werden konnten (in der Tab. 8 gelb unterlegt).

Bei zwei weiteren Kühlschmierstoffproben konnte darüber hinaus zumindest eine Übereinstimmung auf Gattungsebene für *Pseudomonas* (KSS 14) und *Moraxella* (KSS 19) festgestellt werden.

5.4 Analyse der mikrobiellen Diversität mittels kultivierungsunabhängiger Methoden (Klone)

Neben der Kultivierung von Mikroorganismen aus den Kühlschmierstoffproben wurden auch kultivierungsunabhängige Analysen durchgeführt. Die DNA wurde direkt aus den Kühlschmierstoff- bzw. Ansetzwasserproben extrahiert, kloniert und das 16S rRNA-Gen der Proben anschließend sequenziert. Trotz einiger methodischer Schwierigkeiten konnte die DNA-Extraktion und Sequenzierung des 16S rRNA-Gens erfolgreich aus allen zehn Kühlschmierstoffproben sowie aus vier Ansetzwasserproben durchgeführt werden. Bei den fehlenden Ansetzwasserproben der Kühlschmierstoffe (AW KSS 12/13, AW KSS 14 und AW KSS 17) konnte keine DNA extrahiert werden, hier liegen nur die Daten der kultivierungsabhängigen Versuche vor. Es wurden für alle Proben, aus denen DNA extrahiert werden konnte, Klonbibliotheken angelegt. Wenn möglich, wurden jeweils 100 Klone ausgewählt und mittels ARDRA (Amplified rDNA restriction analysis) vorselektiert. Alle Klone, die mit den Restriktionsenzymen Hpa II und Hin 6 I die gleichen Restriktionsmuster

aufwiesen, wurden einem OTU (= Operational Taxonomic Unit) zugeordnet. Es wurde davon ausgegangen, dass alle Klone eines OTUs zu der gleichen Art gehören. Wenn sehr viele Klone einem einzigen OTU zugeordnet wurden, wurden zwei oder mehr Klone für die Sequenzierung ausgewählt. Diese Klone zeigten alle die gleichen Sequenzergebnisse. Für alle ausgewählten Klone wurde die 16S rRNA teilsequenziert, für einige Klone wurde eine Vollsequenzierung durchgeführt (s. 4.6). Insgesamt wurden 753 Klone aus 14 Kühlschmierstoff- und Ansetzwasserproben ausgewählt, davon wurden 434 Klone teilsequenziert und davon 183 zusätzlich vollsequenziert (s. Tabelle 9 und 10). Die Teilsequenzen haben eine Länge von 500 bis 900 Basenpaaren, die Vollsequenzen sind zwischen 1300 und 1450 Basenpaare lang.

Tab. 9: Anzahl Klone für jede Kühlschmierstoffprobe (einschl. Klone, die nicht sequenziert wurden, da sie dem gleichen OTU angehörten) sowie Anzahl an sequenzierten Klonen insgesamt und an vollsequenzierten Klonen.

Seq. = sequenzierte Klone insgesamt, VS = vollsequenzierte Klone.

	KSS 11	KSS 12	KSS 13	KSS 14	KSS 15	KSS 16	KSS 17	KSS 18	KSS 19	KSS 20
Anzahl Klone	63	74	84	56	31	29	52	72	74	65
Seq.	30	53	50	45	26	16	46	29	37	48
VS	11	10	9	5	15	6	17	6	15	28

Tab. 10: Anzahl Klone im Ansetzwasser der Kühlschmierstoffproben sowie Anzahl an sequenzierten Klonen insgesamt und an vollsequenzierten Klonen.

Seq. = sequenzierte Klone insgesamt, VS = vollsequenzierte Klone, AW = Ansetzwasser

	AW KSS 11	AW KSS 15	AW KSS 16	AW KSS 20
Anzahl Klone	47	45	24	37
Seq.	18	34	21	31
VS	15	21	9	16

Die Zuordnungen der Klonsequenzen zu den nächstverwandten Arten, deren Sequenzähnlichkeit und die Riskogruppe nach TRBA 466 sind für jede Kühlschmierstoffprobe im **Anhang in den Tabellen 1 – 14** dargestellt. Wie schon in 5.2 beschrieben, variiert das Auflösungsvermögen des 16S rRNA Gens auf Gattungs- und Artebene je nach Bakteriengruppe. Auch wenn in den Tabellen im Anhang für die Teilsequenzen die Zuordnung zu den nächstverwandten Sequenzen auf Artebene erfolgt, sollte von den Ergebnissen der Teilsequenzierung nicht auf eine zweifelsfreie Artidentifizierung geschlossen werden. Für alle Klonsequenzen, die identische Ergebnisse beim Datenbankvergleich zeigten, wurde daher mindestens eine Sequenz vollsequenziert. Es wird dabei davon ausgegangen, dass auch die anderen, teilsequenzierten Klone bei einer Vollsequenzierung die gleichen Ergebnisse gezeigt hätten. Daher wurden dann auch die Klonsequenzen, die nur teilsequenziert wurden, den nächstverwandten Sequenzen auf Artebene zugeordnet (s. Anhang Tabelle 1 – 14).

Phylogenetische Bäume mit den Klonsequenzen und den Sequenzen von Typstämmen verwandter Arten sind im **Anhang in den Abbildungen 27 – 79** dargestellt. Die Klone konnten insgesamt **82 verschiedenen Gattungen** zugeordnet werden. Die Anzahl an Gattungen innerhalb einzelner Kühlschmierstoffe bzw. deren Ansetzwasser schwankt dagegen stark. Bei einigen der Kühlschmierstoff- und Ansetzwasserproben konnte durch die Sequenzierung der Klone eine hohe mikrobielle Diversität detektiert werden: Dazu gehörten die Ansetzwasserprobe AW KSS 20 (Flusswasser) mit 20 verschiedenen Gattungen, AW KSS 15 (Leitungswasser aus Schlauch) mit 19 verschiedenen Gattungen und die Kühlschmierstoffprobe KSS 12 (Mineralölhaltiger KSS, vorkonserviert) mit 13 verschiedenen Gattungen. Dabei war zu beobachten, dass vor allem die Ansetzwasserproben insgesamt eine hohe Diversität aufwiesen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass es sich bei den Ansetzwasserproben teils auch um Brunnenwasser bzw. Flusswasser handelt.

Bei einigen der Kühlschmierstoffproben konnte hingegen nur eine sehr geringe mikrobielle Diversität detektiert werden, teilweise wurden fast ausschließlich Vertreter einer Gattung gefunden. Dies könnte auf einen möglichen Selektionsdruck durch die Kühlschmierstoffe bzw. bestimmte Inhaltsstoffe zurückzuführen sein der dazu führt, dass sich an das Medium gut angepasste Arten besser durchsetzen. Beispiele sind Kühlschmierstoffprobe KSS 18 (Synthetischer KSS, keine Angaben

zur Konservierung), in der drei verschiedene Gattungen detektiert wurden: 66 der 72 Klone konnten in dieser Probe einer einzigen Gattung zugeordnet werden. Ebenso Probe KSS 14 (Mineralöhlhaltiger KSS, Bakterizidfrei), in der auch nur drei Gattungen detektiert werden konnten. Hierbei handelt es sich allerdings um ein KSS-Produkt, das gemäß Herstellerangaben so aufgebaut ist, dass sich eine dominante „Leitkeimflora“ aus einer Pseudomonadenart aufbauen soll.

In Probe KSS 16 (Mineralöhlhaltiger KSS, Bakterizid und Fungizid) konnten fünf Gattungen detektiert werden, aber auch hier dominierte eine Gattung, der 24 von 29 Klonen zugeordnet werden konnten. Im Unterpunkt 5.5 des Ergebnisteils wird auf die Unterschiede zwischen detektierter Diversität in den Kühlschmierstoffen und den jeweils eingesetzten Kühlschmierstoffkonzentraten genauer eingegangen.

In Abbildung 3 ist die Häufigkeit und Verteilung der 13 am häufigsten vorkommenden Gattungen über die Sequenzierung der Klone für alle Kühlschmierstoff- und Ansetzwasserproben dargestellt. Alle weiteren Gattungen, die über die Sequenzierung der Klone detektiert werden konnten, sind in der Abbildung unter „weitere Gattungen“ dargestellt.

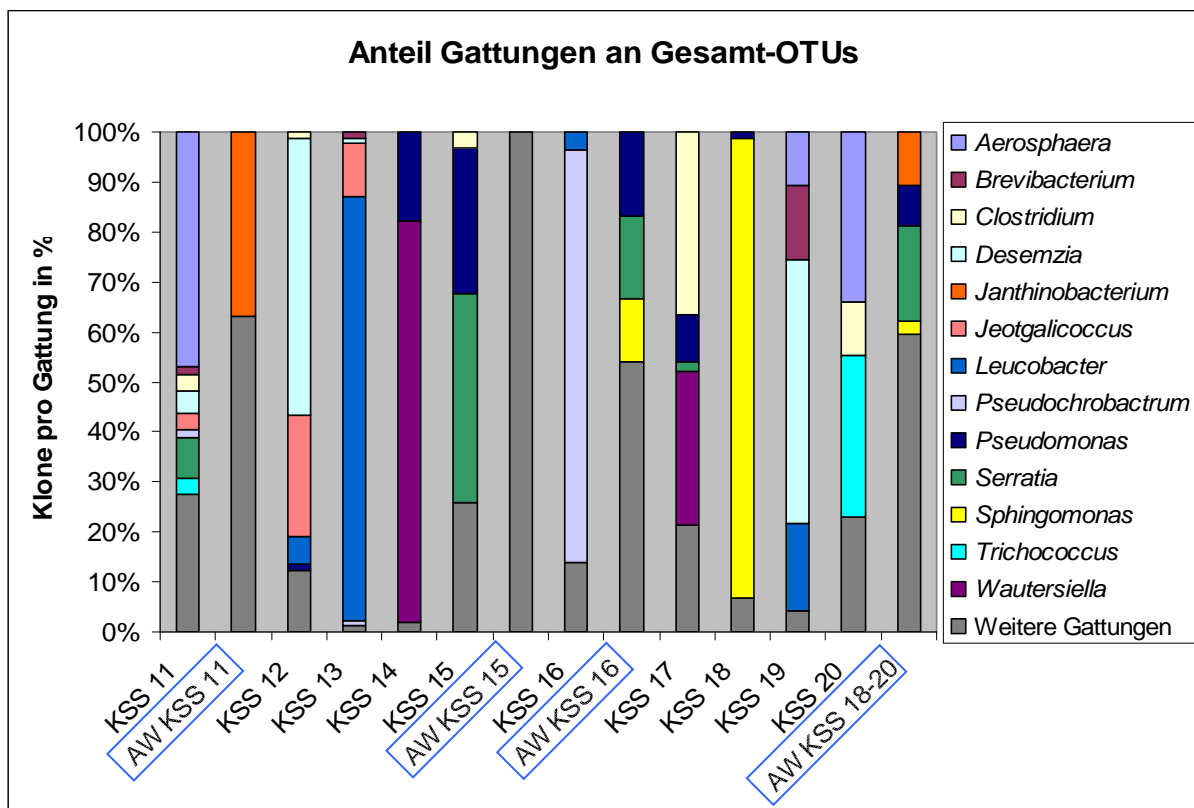


Abb. 3: Anteil der einzelnen Gattungen bezogen auf alle OTUs der Klone einer Probe, aufgegliedert nach den Herkunftsorten der Klone. KSS = Kühlschmierstoffprobe, AW = Ansetzwasserprobe des Kühlschmierstoffes.

In der nachfolgenden Tabelle 11 sind die Bakteriengattungen aufgelistet die mit dem jeweils eingesetzten Nachweisverfahren der 16S rRNA Gensequenzierung der Isolate und der Klone detektiert werden konnten. Zu beachten ist die verhältnismäßig geringe Übereinstimmung der Ergebnisse, die anhand unterschiedlicher Verfahren erhalten wurden: Nur 11 (13%) der 84 über die Klonierung detektierten Gattungen konnten auch über die Isolierung gefunden werden. 16 der über die Isolierung gefundenen Gattungen konnten nicht über die Klonierung detektiert werden, ebenso wie 73 (87%) der über die Klonierung gefundenen Gattungen nicht über die Isolierung detektiert werden konnten.

Tab. 11 (nächste Seite): Anzahl der Isolate und Klone, die jeweils der gleichen Gattung zugeordnet wurden. Da die Tabelle nur die Gattungen und nicht die Arten aufzählt, ist eine Zuordnung zu Risikogruppen nach TRBA 466 nicht möglich. Eine Aufgliederung auf Artebene einschließlich Zuordnung zu Risikogruppen ist in Tab. 6 sowie Tab. 1 – 14 im Anhang ersichtlich.

Nächst verwandte Gattung (nach BLAST)	Anzahl Isolate	Anzahl Klone	Herkunft der Isolate und Klone
<i>Atopostipes</i>	1	8	KSS 11 ^b , 12 ^b , 19 ^b , AW KSS 17 ^a
<i>Bacillus</i>	3	2	KSS 11, 12, 18 ^a
<i>Brevundimonas</i>	2	4	KSS 13 ^b , 16 ^b , 19, 20 ^a
<i>Citrobacter</i>	4	3	KSS 11 ^a , 17
<i>Comamonas</i>	2	12	KSS 16 ^b , 18, 20
<i>Corynebacterium</i>	3	1	KSS 11 ^a , 12 ^a , 20 ^a , AW KSS 11 ^b
<i>Microbacterium</i>	2	1	KSS 12 ^b , AW KSS 11 ^a , 12/13 ^a
<i>Pseudochrobactrum</i>	1	26	KSS 11 ^b , 12 ^a , 13 ^b , 16 ^b
<i>Pseudomonas</i>	6	33	KSS 12 ^b , 14, 15 ^b , 17, 18 ^b , 19 ^a , AW KSS 16 ^b , 20 ^b
<i>Sphingomonas</i>	1	70	KSS 18 ^b , AW KSS 15 ^a , 16 ^b , 20 ^b
<i>Wautersiella</i>	1	61	KSS 12 ^a , 14 ^b , 17 ^b
<i>Acinetobacter</i>	1		AW KSS 12/13
<i>Aeromonas</i>	1		KSS 11
<i>Bordetella</i>	1		KSS 13
<i>Cellulosimicrobium</i>	3		KSS 20
<i>Cubriavidus</i>	1		AW KSS 17
<i>Curtobacterium</i>	3		AW KSS 11, 12/13
<i>Gulosibacter</i>	3		KSS 19, 20
<i>Micrococcus</i>	3		KSS 11, 16, 20
<i>Moraxella</i>	1		KSS 19
<i>Mycobacterium</i>	17		AW KSS 11, 12/13, 15, 16, 17, 18-20
<i>Myroides</i>	1		KSS 12
<i>Pedobacter</i>	1		AW KSS 15
<i>Pseudoxanthomonas</i>	1		AW KSS 14
<i>Ralstonia</i>	2		AW KSS 17
<i>Shewanella</i>	1		KSS 17
<i>Variovorax</i>	1		KSS 12
<i>Achromobacter</i>		1	KSS 12
<i>Acidimicrobium</i>		1	KSS 12
<i>Acidovorax</i>		13	AW KSS 11, 15, 16
<i>Aerosphaera</i>		59	KSS 11, 19, 20
<i>Aquabacterium</i>		11	KSS 15, AW KSS 11, 15
<i>Aquamicrobium</i>		2	KSS 12
<i>Azoarcus</i>		2	AW KSS 20
<i>Bacteroides</i>		1	KSS 20
<i>Blastococcus</i>		1	KSS 15
<i>Bosea</i>		1	AW KSS 15
<i>Bradyrhizobium</i>		2	AW KSS 15
<i>Brevibacterium</i>		13	KSS 11, 13, 19
<i>Buttiauxella</i>		1	KSS 17
<i>Candidatus Koribacter</i>		1	AW KSS 15
<i>Chitinophaga</i>		1	AW KSS 15
<i>Clostridium</i>		30	KSS 11, 12, 15, 17, 20

^a: nur über Isolierung in der entsprechenden Kühlschmierstoff- bzw. Ansetzwasserprobe detektiert

^b: nur über Klonierung in der entsprechenden Kühlschmierstoff- bzw. Ansetzwasserprobe detektiert

Tab. 11: Fortsetzung

Nächst verwandte Gattung (nach BLAST)	Anzahl Isolate	Anzahl Klone	Herkunft der Isolate und Klone
<i>Curvibacter</i>		1	AW KSS 16
<i>Dechloromonas</i>		8	AW KSS 11, 16, 20
<i>Dehalospirillum</i>		1	KSS 20
<i>Desemzia</i>		84	KSS 11, 12, 13, 19
<i>Desulfitobacterium</i>		1	AW KSS 20
<i>Desulfohalobium</i>		1	AW KSS 20
<i>Devosia</i>		2	KSS 16
<i>Ectothiorhodospira</i>		1	KSS 15
<i>Ensifer</i>		1	AW KSS 15
<i>Enterobacter</i>		4	AW KSS 16
<i>Enterococcus</i>		3	KSS 11
<i>Ewingella</i>		3	AW KSS 20
<i>Facklamia</i>		4	KSS 11, 12
<i>Ferribacterium</i>		1	AW KSS 20
<i>Flavisolibacter</i>		2	AW KSS 15
<i>Hafnia</i>		2	KSS 17
<i>Haliangium</i>		1	AW KSS 20
<i>Herminiimonas</i>		1	AW KSS 15
<i>Janthinobacterium</i>		21	AW KSS 11, 20
<i>Jeotgalicoccus</i>		29	KSS 11, 12, 13
<i>Klebsiella</i>		1	KSS 15
<i>Leptospira</i>		6	AW KSS 15
<i>Leptothrix</i>		4	AW KSS 15, 20
<i>Leucobacter</i>		89	KSS 12, 13, 16, 19
<i>Limnobacter</i>		1	AW KSS 20
<i>Lysinibacillus</i>		1	KSS 11
<i>Marinilactibacillus</i>		1	KSS 14, 17
<i>Massilia</i>		8	AW KSS 11
<i>Methylibium</i>		1	AW KSS 11
<i>Methylococcus</i>		1	AW KSS 16
<i>Mucilaginisbacter</i>		1	AW KSS 15
<i>Nitrosococcus</i>		2	KSS 15, AW KSS 15
<i>Parabacteroides</i>		3	KSS 20
<i>Petrimonas</i>		1	KSS 20
<i>Propionivibrio</i>		2	AW KSS 15, 20
<i>Pseudoxanthobacter</i>		1	KSS 15
<i>Pusillimonas</i>		1	KSS 12
<i>Rahnella</i>		2	KSS 17
<i>Rhodobacter</i>		2	AW KSS 15
<i>Rhodothermus</i>		1	AW KSS 20
<i>Ruminobacillus</i>		2	KSS 20
<i>Saccharothrix</i>		1	AW KSS 15
<i>Salmonella</i>		3	KSS 17
<i>Serratia</i>		30	KSS 11, 15, 17, AW KSS 16, 20

Tab. 11: Fortsetzung

Nächst verwandte Gattung (nach BLAST)	Anzahl Isolate	Anzahl Klone	Herkunft der Isolate und Klone
<i>Solibacter</i>		2	AW KSS 20
<i>Sphingobacterium</i>		6	KSS 20, AW KSS 11, 20
<i>Sphingobium</i>		1	AW KSS 20
<i>Stella</i>		1	AW KSS 15
<i>Terrimonas</i>		1	AW KSS 15
<i>Thioalkalivibrio</i>		3	KSS 15, AW KSS 15
<i>Trichococcus</i>		15	KSS 11, 20
<i>Vagococcus</i>		1	KSS 11
<i>Virgibacillus</i>		1	KSS 11
<i>Yokonella</i>		1	AW KSS 20
<i>Zoogloea</i>		3	AW KSS 20

Tabelle 12 listet die gefundenen Gattungen nach Kühlschmierstoffprobe sortiert auf.

Die Tabelle 15 zeigt die Diversität für jede Kühlschmierstoffprobe und das dazugehörige Ansetzwasser einzeln auf. Die Tabelle macht deutlich, dass die unterschiedlichen Methoden zur Identifizierung der in den Kühlschmierstoffproben vorkommenden Gattungen unterschiedliche Ergebnisse liefern. Die geringe Übereinstimmung der Verfahren der Kultivierung und Sequenzierung der Isolate einerseits und der Klonierung andererseits wurde weiter oben schon diskutiert, ebenso die Unterschiede zwischen den Kühlschmierstoffproben und deren Ansetzwasser. Die Ergebnisse der Tabelle zeigt auch, dass sich die Zuordnung der Gattungen durch physiologische Tests von den Zuordnungen durch die Sequenzierung unterscheiden. Es ist daher nicht möglich, eine dieser Methoden als alleinige Standardmethode zur Detektierung von Mikroorganismen in wassergemischten Kühlschmierstoffen zu verwenden, da die Diversität dadurch unterschätzt wird. Es empfiehlt sich, immer mindestens zwei Methoden parallel einzusetzen, wenn die Gesamtdiversität ermittelt werden soll.

Tab. 12 (nächste Seite): Anzahl der Isolate und Klone, die den jeweiligen Gattungen zugeordnet wurden, aufgelistet nach Kühlschmierstoffprobe. Da die Tabelle nur die Gattungen und nicht die Arten aufzählt, ist eine Zuordnung zu Risikogruppen nach TRBA 466 nicht möglich. Eine Aufgliederung auf Artebene einschließlich Zuordnung zu Risikogruppen ist in Tab. 6 sowie Tab. 1 – 14 im Anhang ersichtlich.

Herkunft der Proben	Nächst verwandte Gattung (nach BLAST)	Anzahl Isolate	Anzahl Klone
KSS 11	<i>Aeromonas</i>	1	
	<i>Aerosphaera</i>		7
	<i>Atopostipes</i>		5
	<i>Bacillus</i>	1	1
	<i>Brevibacterium</i>		1
	<i>Citrobacter</i>	1	
	<i>Clostridium</i>		2
	<i>Corynebacterium</i>	1	
	<i>Desemzia</i>		3
	<i>Enterococcus</i>		1
	<i>Facklamia</i>		1
	<i>Jeotgalicoccus</i>		2
	<i>Lysinibacillus</i>		1
	<i>Micrococcus</i>	1	
	<i>Pseudochrobactrum</i>		1
	<i>Serratia</i>		3
	<i>Trichococcus</i>		2
	<i>Vagococcus</i>		1
	<i>Virgibacillus</i>		1
AW KSS 11	<i>Acidovorax</i>		3
	<i>Aquabacterium</i>		3
	<i>Corynebacterium</i>		1
	<i>Curtobacterium</i>	2	
	<i>Dechloromonas</i>		1
	<i>Janthinobacterium</i>		5
	<i>Massilia</i>		2
	<i>Methylibium</i>		1
	<i>Microbacterium</i>	1	
	<i>Mycobacterium</i>	1	
<i>Sphingobacterium</i>		2	
KSS 12	<i>Achromobacter</i>		1
	<i>Acidimicrobium</i>		1
	<i>Aquabacterium</i>		1
	<i>Aquamicrobium</i>		1
	<i>Atopostipes</i>		1
	<i>Bacillus</i>	1	1
	<i>Clostridium</i>		1
	<i>Corynebacterium</i>	1	
	<i>Desemzia</i>		27
	<i>Facklamia</i>		1
	<i>Jeotgalicoccus</i>		11
	<i>Leucobacter</i>		4
	<i>Microbacterium</i>		1
	<i>Myroides</i>	1	
	<i>Pseudochrobactrum</i>	1	
	<i>Pseudomonas</i>		1
	<i>Pusillimonas</i>		1
	<i>Variovorax</i>	1	
<i>Wautersiella</i>	1		
KSS 13	<i>Bordetella</i>	1	
	<i>Brevibacterium</i>		1
	<i>Brevundimonas</i>		1
	<i>Desemzia</i>		1

Tab. 12: Fortsetzung

Herkunft der Proben	Nächst verwandte Gattung (nach BLAST)	Anzahl Isolate	Anzahl Klone
KSS 13	<i>Jeotgalicoccus</i>		8
	<i>Leucobacter</i>		38
	<i>Pseudochrobactrum</i>		1
AW KSS 12/13	<i>Acinetobacter</i>	1	
	<i>Curtobacterium</i>	1	
	<i>Microbacterium</i>	1	
	<i>Mycobacterium</i>	4	
KSS 14	<i>Marinilactibacillus</i>		1
	<i>Pseudomonas</i>	2	10
	<i>Wautersiella</i>		34
AW KSS 14	<i>Pseudoxanthomonas</i>	1	
KSS 15	<i>Aquabacterium</i>		1
	<i>Blastococcus</i>		1
	<i>Clostridium</i>		1
	<i>Ectothiorhodospira</i>		1
	<i>Klebsiella</i>		1
	<i>Nitrosococcus</i>		2
	<i>Pseudomonas</i>		7
	<i>Pseudoxanthobacter</i>		1
	<i>Serratia</i>		10
	<i>Thioalkalivibrio</i>		1
AW KSS 15	<i>Acidovorax</i>		1
	<i>Aquabacterium</i>		5
	<i>Bosea</i>		1
	<i>Bradyrhizobium</i>		2
	<i>Candidatus Koribacter</i>		1
	<i>Chitinophaga</i>		2
	<i>Ensifer</i>		1
	<i>Flavisolibacter</i>		2
	<i>Hermiinimonas</i>		1
	<i>Leptospira</i>		6
	<i>Leptothrix</i>		3
	<i>Mucilaginibacter</i>		1
	<i>Mycobacterium</i>	1	
	<i>Nitrosococcus</i>		1
	<i>Pedobacter</i>	1	
	<i>Propionivibrio</i>		1
	<i>Rhodobacter</i>		2
	<i>Saccharothrix</i>		1
	<i>Stella</i>		1
	<i>Sphingomonas</i>	1	
<i>Terrimonas</i>		1	
<i>Thioalkalivibrio</i>		1	
KSS 16	<i>Brevundimonas</i>		1
	<i>Comamonas</i>		1
	<i>Devosia</i>		2
	<i>Leucobacter</i>		1
	<i>Micrococcus</i>	1	
	<i>Pseudochrobactrum</i>		11
AW KSS 16	<i>Acidovorax</i>		4
	<i>Curvibacter</i>		1
	<i>Dechloromonas</i>		3

Tab. 12: Fortsetzung

Herkunft der Proben	Nächst verwandte Gattung (nach BLAST)	Anzahl Isolate	Anzahl Klone
AW KSS 16	<i>Enterobacter</i>		1
	<i>Methylococcus</i>		1
	<i>Mycobacterium</i>	3	
	<i>Pseudomonas</i>		4
	<i>Serratia</i>		4
	<i>Sphingomonas</i>		3
KSS 17	<i>Buttiauxella</i>		1
	<i>Citrobacter</i>	3	3
	<i>Clostridium</i>		18
	<i>Hafnia</i>		1
	<i>Pseudomonas</i>	3	5
	<i>Rahnella</i>		1
	<i>Salmonella</i>		3
	<i>Serratia</i>		1
	<i>Shewanella</i>	1	
	<i>Wautersiella</i>		13
	AW KSS 17	<i>Atopostipes</i>	1
<i>Cupriavidus</i>		1	
<i>Mycobacterium</i>		2	
<i>Ralstonia</i>		2	
KSS 18	<i>Bacillus</i>	1	
	<i>Comamonas</i>	1	5
	<i>Pseudomonas</i>		1
	<i>Sphingomonas</i>		23
KSS 19	<i>Aerosphaera</i>		5
	<i>Atopostipes</i>		1
	<i>Brevibacterium</i>		10
	<i>Brevundimonas</i>	1	2
	<i>Desemzia</i>		13
	<i>Gulosibacter</i>	1	
	<i>Leucobacter</i>		6
	<i>Moraxella</i>	1	
	<i>Pseudomonas</i>	1	
KSS 20	<i>Aerosphaera</i>		16
	<i>Bacteroides</i>		1
	<i>Brevundimonas</i>	1	
	<i>Cellulosimicrobium</i>	3	
	<i>Clostridium</i>		7
	<i>Comamonas</i>	1	4
	<i>Corynebacterium</i>	1	
	<i>Dehalospirillum</i>		1
	<i>Gulosibacter</i>	2	
	<i>Micrococcus</i>	1	
	<i>Parabacteroides</i>		2
	<i>Petrimonas</i>		1
	<i>Ruminobacillus</i>		1
	<i>Sphingobacterium</i>		1
	<i>Trichococcus</i>		14
AW KSS 18-20	<i>Azoarcus</i>		1
	<i>Dechloromonas</i>		1
	<i>Desulfitobacterium</i>		1
	<i>Desulfohalobium</i>		1

Tab. 12: Fortsetzung

Herkunft der Proben	Nächst verwandte Gattung (nach BLAST)	Anzahl Isolate	Anzahl Klone
AW KSS 18-20	<i>Ewingella</i>		3
	<i>Ferribacterium</i>		1
	<i>Haliangium</i>		1
	<i>Janthinobacterium</i>		2
	<i>Leptothrix</i>		1
	<i>Limnobacter</i>		1
	<i>Mycobacterium</i>	9	
	<i>Propionivibrio</i>		1
	<i>Pseudomonas</i>		2
	<i>Rhodothermus</i>		1
	<i>Serratia</i>		6
	<i>Solibacter</i>		2
	<i>Sphingobacterium</i>		1
	<i>Sphingobium</i>		1
	<i>Sphingomonas</i>		1
	<i>Yokenella</i>		1
	<i>Zoogloea</i>		2

5.5 Gesamtdiversität der Kühlschmierstoffproben in Abhängigkeit von den eingesetzten Kühlschmierstoffkonzentraten

In Tabelle 13 ist die Anzahl an detektierten Gattungen für die fünf eingesetzten Kühlschmierstoffkonzentrate (Produkt A – E) zusammengefasst und aufgegliedert nach Kühlschmierstoffproben aufgelistet. Tabelle 14 listet die Daten nach der den Kühlschmierstoffproben zugrunde liegenden Öl-Basis (Mineralöl, Mineralöl mit Leitkeimflora und Syntheseöl) auf. Details über die vorkommenden Arten bzw. Gattungen können für jede Kühlschmierstoffprobe der Tabelle 15 entnommen werden. Die höchste Diversität konnte in den Kühlschmierstoffkonzentraten A und C nachgewiesen werden, mit 47 Gattungen für Produkt A und 16 Gattungen für Produkt C. Beide Konzentrate beruhen auf einer Mineralölbasis mit Vorkonservierung (bei KSS 19 und KSS 20, beide Produkt A, gibt es keine Angaben zu einer Vorkonservierung). Die Produkte B und D, beide auf Mineralölbasis mit Leitkeimflora, unterscheiden sich in ihrer Diversität diesbezüglich, dass Produkt D mit 14 detektierten Gattungen eine relativ hohe Diversität aufweist, während in Produkt B nur 4 Gattungen detektiert werden konnten, eine Gattung (*Wautersiella*) dominierte in der Probe. Als Leitkeimflora wurde diesem Produkt ein Vertreter einer *Pseudomonas*-Art zugegeben, um das Wachstum anderer Mikroorganismen zu

unterdrücken. In beiden Produkten konnte *Pseudomonas* als Vertreter der Leitkeimflora detektiert werden, in Produkt B (KSS 14) dominierte allerdings die Gattung *Wautersiella*, während in Produkt D (KSS 17) die Gattung *Clostridium* dominierte, auch hier gefolgt von *Wautersiella*. Das Vorhandensein der Leitkeimflora unterdrückt das Wachstum anderer Arten daher nicht. In Produkt E, Syntheseöl ohne Angaben zur Vorkonservierung, wurden nur 5 Gattungen detektiert, auch hier dominierte eine Gattung (*Sphingomonas*). Allerdings wurde dieses Produkt nur in einer Kühlschmierstoffprobe, KSS 18, eingesetzt. Falls dieses Ergebnis repräsentativ ist, würde sich ein Kühlschmierstoff auf Syntheseöl-Basis sehr gut eignen, um die Mikroorganismendiversität gering zu halten. Da nur eine einzige Kühlschmierstoffprobe mit Syntheseöl untersucht wurde, sollten die Ergebnisse allerdings vorher mit weiteren Proben bestätigt werden.

Tab. 13: Anzahl der detektierten Arten mit den drei verwendeten Methoden und Gesamtdiversität in den Kühlschmierstoffproben, nach Kühlschmierstoffkonzentrat (Produkt A – E) geordnet. Da einzelne Gattungen bei mehr als einer Methode entdeckt werden konnten, entspricht die Gesamtzahl an detektierten Arten pro Probe nicht der Summe der mit den einzelnen Methoden detektierten Arten.

Kühlschmierstoffkonzentrat	Anzahl gefundener Gattungen				Öl-Basis
	Gesamt	Isolierung	physiol. Test	Klonierung	
Produkt A	47	18	11	29	Mineralöl, vorkonserviert
KSS 11	20	5	4	15	
KSS 12	20	6	2	13	
KSS 13	10	1	3	6	
KSS 19	10	4	2	6	keine Angaben zur Konservierung
KSS 20	18	6	3	10	
Produkt B	4	1	2	3	Mineralöl + Leitkeimflora
KSS 14	4	1	2	3	
Produkt C	16	1	1	15	Mineralöl, vorkonserviert
KSS 15	10	-	-	10	
KSS 16	6	1	1	5	
Produkt D	14	3	6	9	Mineralöl + Leitkeimflora
KSS 17	14	3	6	9	
Produkt E	5	2	2	3	Syntheseöl, keine Angaben zur Konservierung
KSS 18	5	2	2	3	

Tab. 14: Anzahl der der detektierten Arten mit den drei verwendeten Methoden und Gesamtdiversität in den Kühlschmierstoffproben, nach Mineralöl-Basis (Mineralöl, Mineralöl mit Leitkeimflora, Syntheseöl) geordnet. Da einzelne Gattungen bei mehr als einer Methode entdeckt werden konnten, entspricht die Gesamtzahl an detektierten Arten pro Probe nicht der Summer der mit den einzelnen Methoden detektierten Arten.

* = für diese beiden Kühlschmierstoffproben gibt es keine Angabe zur Vorkonservierung.

Öl-Basis	Anzahl gefundener Gattungen				Kühlschmierstoff-konzentrat
	Gesamt	Isolierung	physiol. Test	Klonierung	
Mineralöl, vorkonserviert	52	16	11	37	Gesamt
	47	16	11	29	Produkt A
	20	5	4	15	KSS 11
	20	6	2	13	KSS 12
	10	1	3	6	KSS 13
	10	4	2	6	KSS 19*
	18	6	3	10	KSS 20*
	16	1	1	15	Produkt C
	10	-	-	10	KSS 15
	6	1	1	5	KSS 16
Mineralöl + Leitkeimflora	16	3	7	10	Gesamt
	4	1	2	3	Produkt B
	4	1	2	3	KSS 14
	14	3	6	9	Produkt D
	14	3	6	9	KSS 17
Syntheseöl, keine Angaben zur	5	2	2	3	Gesamt
	5	2	2	3	Produkt E
	5	2	2	3	KSS 18

Tabelle 15 (nächste Seite): Informationen über Gesamtzellzahl, Gesamtkoloniezahl sowie detektierte Diversität in den Kühlschmierstoffproben. Rot = Übereinstimmung der Arten bei der Verwendung unterschiedlicher Methoden, Fettdruck = Gattungen kommen häufig vor (mindestens 5 Klone konnten der gleichen Gattung zugeordnet werden). Organismen sind alphabetisch geordnet. Risikogruppe nach TRBA 466.

	GZZ	GKZ (KBE/ml, auf CASO- Medium)	Ergebnisse der physiologischen Tests der Isolate (isoliert von CASO, wenn nicht anders angegeben)	Risiko- gruppe	Ergebnisse der 16S rRNA Gensequenzierung der Isolate (isoliert von CASO, wenn nicht anders angegeben)	Risiko- gruppe	Klone (kultivierungsunabhängig)		Risiko- gruppe	KSS- Basis	Anlagen- typ	Konser- vierung	Stand- zeit
							Gattungen	Spezies (VS, Ähnlichkeit ≥ 97%)					
KSS 11	4,9E+06	6,10E+02	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Flavimonas oryzihabitans</i> <i>Micrococcus luteus</i>	2 2 2 1	<i>Aeromonas veronii biovar sobria</i> <i>Bacillus fusiformis</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Corynebacterium lubricantis</i> <i>Micrococcus luteus</i>	2 1 2 k.E. 1	Aerosphaera Atopostipes Bacillus Brevibacterium Clostridium Desemzia Enterococcus Facklamia Firmicutes Jeotgalicoccus Lysinibacillus Pseudochrobactrum Vagococcus Virgibacillus	<i>Aerosphaera taetra</i> <i>Bacillus fusiformis</i> <i>Clostridium mesophilum</i> <i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i> <i>Trichococcus collinsii</i>	k.E. 1 k.E. 1 1	Mineralöl (Produkt A)	ZA	CIT, MIT	5 Tage
AW KSS 11 Brunnen- wasser	7,8E+07	7,70E+02	<i>Leifsonia aquaticum</i> <i>Neisseria elongata</i> <i>Pantoea agglomerans</i>	1 1 2	<i>Curtobacterium citreum</i> <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> <i>Microbacterium</i> <i>hydrocarbonoxydans</i> <i>Mycobacterium gordonae</i>	1 1 k.E. 1	Acidovorax Aquabacterium Corynebacterium Dechloromonas Janthinobacterium Massilia Methylibium Sphingobacterium	<i>Acidovorax defluvii</i> <i>Acidovorax facilis</i> <i>Aquabacterium citratiphilum</i> <i>Aquabacterium commune</i> <i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i> <i>Janthinobacterium lividum</i> <i>Sphingobacterium kithiroshimense</i>	1 1 1 k.E. 1 1 k.E.				
KSS 12	1,50E+06	1,00E+05	<i>Empedobacter brevis</i> <i>Weeksella virosa</i> Gemischte, gramnegative Stäbchen	2 1	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Corynebacterium lubricantis</i> <i>Myroides odoratus</i> <i>Pseudochrobactrum</i> <i>saccharolyticum</i> <i>Variovorax ginsengisoli</i> <i>Wautersiella falsenii</i>	1 k.E. 2 k.E. k.E. k.E.	Achromobacter Acidimicrobium Aquabacterium Aquamicrobium Atopostipes Bacillus Clostridium Desemzia Facklamia Jeotgalicoccus Leucobacter Microbacterium Pseudomonas Pusillimonas	<i>Aquabacterium lusatiense</i> <i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i> <i>Microbacterium keratanolyticum</i> <i>Pseudomonas fluoreszens</i>	1 1 1 1	Mineralöl (Produkt A)	ZA	CIT, MIT	3 Monate
AW KSS 12/13 Brunnen- wasser	7,2E+04	8,00E+01	<i>Flavobacterium</i> <i>meningosepticum</i> <i>Sphingomonas</i> <i>paucimobills</i>	2 2	<i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> <i>Microbacterium phyllosphaerae</i> <i>Mycobacterium gordonae</i> <i>Mycobacterium neglectum</i>	2 1 1 1 k.E.							

Tab. 15: Fortsetzung

	GZZ	GKZ (KBE/ml, auf CASO- Medium)	Ergebnisse der physiologischen Tests der Isolate (isoliert von CASO, wenn nicht anders angegeben)	Risiko- gruppe	Ergebnisse der 16S rRNA Gensequenzierung der Isolate (isoliert von CASO, wenn nicht anders angegeben)	Risiko- gruppe	Klone (kultivierungsunabhängig)		Risiko- gruppe	KSS- Basis	Anlagen- typ	Konser- vierung	Stand- zeit
							Gattungen	Spezies (VS, Ähnlichkeit ≥ 97%)					
KSS 13	4,50E+05	9,00E+05	<i>Empedobacter brevis</i> <i>Weeksella virosa</i> <i>Bordetella avium</i>	2 1 2	<i>Bordetella trematum</i>	2	<i>Brevibacterium</i> <i>Brevundimonas</i> <i>Desemzia</i> <i>Jeotgalicoccus</i> <i>Leucobacter</i> <i>Pseudochrobactrum</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i> <i>Leucobacter aridicollis</i> <i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i>	2 1 k.E. k.E.	Mineralöl (Produkt A)	Einzel- maschine	CIT, MIT	6 Monate
KSS 14	5,00E+07	8,10E+08	<i>Weeksella virosa</i> <i>Pseudomonas</i> sp. KSS-Agar: <i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	1 1	<i>Pseudomonas mendocina</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	2 1	<i>Marinilactibacillus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Wautersiella</i>	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> <i>Wautersiella falsenii</i>	1 k.E.	Mineralöl (Produkt B)	Einzel- maschine	Na- Pyrrithion	4 Monate
AW KSS 14 Leitungs- wasser	9,2E+03	2,40E+02	<i>Brevundimonas</i> <i>vesicularis</i>	1	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	k.E.							
KSS 15	2,30E+06	0,00E+00	keine Isolate		keine Isolate		<i>Aquabacterium</i> <i>Blastococcus</i> <i>Clostridium</i> <i>Ectothiorodospira</i> <i>Klebsiella</i> <i>Nitrosococcus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Pseudoxanthobacter</i> <i>Serratia</i> <i>Thioalkalivibrio</i>	<i>Aquabacterium parvum</i> <i>Blastococcus aggregatus</i> <i>Clostridium sticklandii</i> <i>Pseudomonas extremorientalis</i> <i>Pseudomonas poae</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia plymuthica</i> <i>Serratia proteamaculans</i>	1 1 1 1 1 2 1 2	Mineralöl (Produkt C)	Einzel- maschine	Form- aldehyd- Depot (N- Formal), Jod- Carbamat	23 Monate
AW KSS 15 Leitungs- wasser	6,4E+05	2,20E+05	<i>Brevundimonas</i> <i>vesicularis</i> <i>Pasteurella</i> sp.	1	<i>Mycobacterium cookii</i> <i>Pedobacter composti</i> <i>Sphingomonas anadarae</i>	1 k.E. k.E.	<i>Acidovorax</i> <i>Aquabacterium</i> <i>Bosea</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Candidatus Koribacter</i> <i>Chitinophaga</i> <i>Ensifer</i> <i>Flavisolibacter</i> <i>Hermiiniimonas</i> <i>Leptospira</i> <i>Mucilaginibacter</i> <i>Nitrosococcus</i> <i>Propionivibrio</i> <i>Rhodobacter</i> <i>Saccharothrix</i> <i>Stella</i> <i>Terrimonas</i> <i>Thioalkalivibrio</i>	<i>Aquabacterium citratiphilum</i> <i>Bosea eneeae</i> <i>Bradyrhizobium elkanii</i> <i>Hermiiniimonas saxosidens</i> <i>Leptospira biflexa</i> serovar Andamana	1 1 1 k.E. 1				

Tab. 15: Fortsetzung

	GZZ	GKZ (KBE/ml, auf CASO- Medium)	Ergebnisse der physiologischen Tests der Isolate (isoliert von CASO, wenn nicht anders angegeben)	Risiko- gruppe	Ergebnisse der 16S rRNA Gensequenzierung der Isolate (isoliert von CASO, wenn nicht anders angegeben)	Risiko- gruppe	Klone (kultivierungsunabhängig)		Risiko- gruppe	KSS- Basis	Anlagen- typ	Konservierung	Stand- zeit
							Gattungen	Spezies (VS, Ähnlichkeit ≥ 97%)					
KSS 16	4,10E+06	1,00E+01	<i>Micrococcus luteus</i>	1	<i>Micrococcus luteus</i>	1	<i>Brevundimonas</i> <i>Comamonas</i> <i>Devosia</i> <i>Leucobacter</i> <i>Pseudochrobactrum</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Comamonas denitrificans</i> <i>Leucobacter aridicollis</i> <i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i>	2 1 k.E. k.E.	Mineralöl (Produkt C)	Einzel- maschine	Form- aldehyd- Depot (N- Formal), Jod- Carbamat	12 Monate
AW KSS 16 Leitungswasser	8,0E+04	2,30E+03	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1	<i>Mycobacterium gordonae</i>	1	<i>Acidovorax</i> <i>Curvibacter</i> <i>Dechloromonas</i> <i>Enterobacter</i> <i>Methylococcus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Serratia</i> <i>Sphingomonas</i>	<i>Dechloromonas aromatica</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	k.E. 1				
KSS 17	1,60E+08	1,30E+08	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Kluyvera ascorbata</i> <i>Moraxella</i> sp. <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas mesophila</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> KSS-Agar: <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2 1 2 1 1 1 1 1 1 2	<i>Citrobacter farmeri</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> <i>Shewanella putrefaciens</i>	2 1 1 1 1 1 1 1	<i>Buttiauxella</i> <i>Citrobacter</i> <i>Clostridium</i> <i>Hafnia</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rahnella</i> <i>Salmonella</i> <i>Serratia</i> <i>Wautersiella</i>	<i>Citrobacter amalonicus</i> <i>Citrobacter farmeri</i> <i>Clostridium sticklandii</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> <i>Wautersiella falsenii</i>	2 2 1 1 k.E.	Mineralöl (Produkt D)	Einzel- maschine	Na- Pyrrhion	3 Monate
AW KSS 17 Leitungswasser	6,5E+03	2,00E+02	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1	<i>Atopostipes suicloacalis</i> <i>Cupriavidus metallidurans</i> <i>Mycobacterium nebraskense</i> <i>Ralstonia pickettii</i>	k.E. k.E. k.E. 1							

Tab. 15: Fortsetzung

	GZZ	GKZ (KBE/ml, auf CASO- Medium)	Ergebnisse der physiologischen Tests der Isolate (isoliert von CASO, wenn nicht anders angegeben)	Risiko- gruppe	Ergebnisse der 16S rRNA Gensequenzierung der Isolate (isoliert von CASO, wenn nicht anders angegeben)	Risiko- gruppe	Klone (kultivierungsunabhängig)		Risiko- gruppe	KSS- Basis	Anlagen- typ	Konser- vierung	Stand- zeit
							Gattungen	Spezies (VS, Ähnlichkeit ≥ 97%)					
KSS 18	5,30E+05	7,00E+04	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Moraxella</i> sp.	1	<i>Bacillus circulans</i> <i>Comamonas testosteroni</i>	1 1	<i>Comamonas</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Sphingomonas</i>	<i>Comamonas testosteroni</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> <i>Sphingomonas andarae</i> <i>Sphingomonas dokdonensis</i>	1 1 k.E. k.E.	Synthese öl (Produkt E)	Einzel- maschine	k.A.	4 Wochen
KSS 19	7,60E+04	8,70E+06	<i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Moraxella</i> sp. KSS-Agar: <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	2 1 2	<i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Gulosibacter molinativorax</i> <i>Moraxella osloensis</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	2 1 2 1	<i>Aerosphaera</i> <i>Atopostipes</i> <i>Brevibacterium</i> <i>Desemzia</i> <i>Leucobacter</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Desemzia incerta</i> <i>Leucobacter aridicollis</i>	k.E. 1 k.E.	Mineralöl (Produkt A)	Einzel- maschine	k.A.	4 Wochen
KSS 20	6,06E+06	3,60E+07	<i>Methylobacterium</i> <i>mesophilicum</i> <i>Moraxella</i> spp. <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1 2	<i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> <i>Cellulosimicrobium funkei</i> <i>Comamonas denitrificans</i> <i>Corynebacterium lubricantis</i> <i>Gulosibacter molinativorax</i> <i>Micrococcus luteus</i>	2 1 k.E. 1 k.E. 1 1 1	<i>Aerosphaera</i> <i>Bacteroides</i> <i>Clostridium</i> <i>Comamonas</i> <i>Dehalospirillum</i> <i>Parabacteroides</i> <i>Petrimonas</i> <i>Ruminobacillus</i> <i>Sphingobacterium</i> <i>Trichococcus</i>	<i>Aerosphaera taetra</i> <i>Bacteroides graminisolvens</i> <i>Clostridium sticklandii</i> <i>Comamonas testosteroni</i> <i>Trichococcus collinsii</i> <i>Trichococcus pasteurii</i>	k.E. k.E. 1 1 1 1	Mineralöl (Produkt A)	Sammel- maschine		1 Woche
AW KSS 18 - 20 Fluss- wasser	4,6E+02	7,40E+03	<i>Delftia acidoverans</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> sp. <i>masoucida</i> / <i>achromogenes</i>	2 2	Mykobakterien-Agar: <i>Mycobacterium gastris</i> <i>Mycobacterium gordonae</i> <i>Mycobacterium nebraskense</i> <i>Mycobacterium peregrinum</i>	2 1 k.E. 1	<i>Azoarcus</i> <i>Dechloromonas</i> <i>Desulfotobacterium</i> <i>Desulfotolobium</i> <i>Ewingella</i> <i>Ferribacterium</i> <i>Haliangium</i> <i>Janthinobacterium</i> <i>Leptothrix</i> <i>Limnobacter</i> <i>Propionivibrio</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhodothermus</i> <i>Serratia</i> <i>Solibacter</i> <i>Sphingobacterium</i> <i>Sphingobium</i> <i>Sphingomonas</i> <i>Yokenella</i> <i>Zoogloea</i>	<i>Ewingella americana</i> <i>Ferribacterium limneticum</i> <i>Janthinobacterium lividum</i> <i>Limnobacter thiooxidans</i> <i>Serratia quinivorans</i> <i>Sphingobium xenophagum</i> <i>Yokenella regensburgi</i>	2 1 1 1 1 k.E. k.E.				

5.6 Nachweis und Quantifizierung von Mykobakterien in Kühlschmierstoffen mittels Real-time PCR

Um ein Standardverfahren zum quantitativen Nachweis von Mykobakterien mittels Real-time PCR zu entwickeln, wurden in einem ersten Schritt die DNA-Extraktion von Mykobakterien-Kulturen sowie die Amplifizierung von Mykobakterien-DNA optimiert. Zur Amplifizierung wurde ein spezifisches Primerpaar, welches im *hsp* (heat shock protein)-Gen bindet, verwendet. Für diese Vorversuche wurden Typstämme verschiedener Mykobakterien-Arten (*Mycobacterium immunogenum* DSM 43764, *M. abscessus* DSM 44196^T, *M. chelonae* DSM 43487, *M. intracellulare* DMS 43223^T, *M. diernhoferi* DSM 43524^T, *M. goodnae* DMS 44160^T und *M. aurum* DSM 43999^T) verwendet. Die DNA-Extraktion aus den genannten Reinkulturen wurde erfolgreich durchgeführt. Während für die DNA-Extraktion aus Reinkulturen das GenElute™ Plant Genomic Miniprep-Kit (Sigma-Aldrich, München) die besten Ergebnisse lieferte, erwies sich für die DNA-Extraktion aus Kühlschmierstoffen das Bactozol™-Kit (Molecular Research Center, USA), modifiziert nach Khan und Yadav (2004) am geeignetsten.

Die Amplifizierung des *hsp*-Gens aus Kühlschmierstoffen mittels Real-time PCR funktioniert für die Mehrzahl der Proben. Allerdings treten immer noch Probleme mit unspezifischen Doppelbanden auf, so dass die Ergebnisse nicht immer ausgewertet werden können. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf.

Als Standards für die Real-time PCR wurden klonierte Fragmente des *hsp*-Gens verwendet. Ein Standard aus genomischer DNA, wie er normalerweise verwendet wird, benötigt eine große Menge an DNA, um das Target in ausreichend großer Menge zur Verfügung zu stellen. Es hat sich herausgestellt, dass sich die Verwendung von klonierten Fragmenten wesentlich besser als Standard eignet (Rasche 2009).

6. Für das Vorhaben relevante Veröffentlichungen von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen und die Konsequenzen für das Vorhaben

6.1 Diversität in Kühlschmierstoffen

Aufgrund der gesundheitlichen Gefahren durch Aerosolbildung von Kühlschmierstoffen gibt es einige Veröffentlichungen, die sich mit dieser Problematik befassen. Insbesondere in jüngster Zeit werden in diesem Zusammenhang als Ursache von Atemwegserkrankungen oftmals auch Mykobakterien genannt (z.B. Rosenman, 2009; Passman, 2008; Selvaraju et al., 2008). Wenige Veröffentlichungen beschäftigen sich mit der mikrobiellen Diversität in Kühlschmierstoffen (z.B. van der Gast et al., 2001, 2003).

Gilbert et al. (2010) haben 44 Kühlschmierstoffe mittels Kultivierung, quantitativer PCR und DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) auf ihre mikrobielle Diversität untersucht. Interessanterweise stellten sie fest, dass die Diversität in Kühlschmierstoffen gering ist. Vor allem Vertreter von *Pseudomonas pseudoalcaligenes* und *Ochrobactrum anthropi* wurden nachgewiesen. Diese Beobachtungen widersprechen teilweise den Ergebnissen, die im Rahmen dieses Forschungsvorhabens ermittelt wurden. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* konnte auch hier als häufig vorkommende Art nachgewiesen werden, sowohl über Isolierung als auch über Klonierung. *Ochrobactrum anthropi* wurde dagegen nicht detektiert, weder über Isolierung noch über Klonierung.

Das untermauert die Bedeutung unabhängiger Beobachtungen mit möglichst vielen Methoden. Insbesondere im Zusammenhang mit einem Krankheitsfall ist es wichtig, möglichst genaue Angaben zu haben, um gezielt nach möglichen Erregern suchen zu können. Über den Klonierungsansatz konnten in diesem Projekt 73 Gattungen (87%) detektiert werden, die nicht über Kultivierung nachgewiesen werden konnten. Es ist daher wichtig, auch kultivierungsunabhängig auf Ebene der 16S rRNA Gen-Sequenzierung nach möglichen Arten bzw. Gattungen zu suchen. Dies ist insbesondere wichtig bei Fragestellungen zu allergischen Erkrankungen (z. B. Asthma, Exogen-allergische Alveolitis), deren Pathogenese nicht zwangsläufig an die Lebensfähigkeit, d. h. Kultivierbarkeit, des ursächlichen Mikroorganismus gebunden ist.

6.2 Detektierung von Mykobakterien mittels Real-time PCR mit dem „Taqman“-Ansatz

Rhodes et al. (2008) haben ein Verfahren entwickelt, wie *Mycobacterium immunogenum* mit einer quantitativen Real-time Taqman PCR detektiert werden kann. Als zu amplifizierendes Gen wird bei dieser Methode nicht das *hsp*-Gen, sondern das *rpoB*-Gen (kodiert für die RNA Polymerase B' Untereinheit) verwendet. Zusätzlich wird eine fluoreszierende Taqman-Sonde eingesetzt, die spezifisch für ein 60 Basenpaar langes Stück des *rpoB*-Gens ist. Die Methode wurde von Rhodes et al. (2008) neben Isolaten auch erfolgreich mit DNA getestet, die aus Kühlschmierstoffen extrahiert wurde.

Diese Methode wird auch im Institut für Angewandte Mikrobiologie angewendet. Auch hier gibt es allerdings zum Teil noch Probleme mit der nötigen Konzentration des Standards, bei dem genomische DNA eingesetzt wird (s. 5.5). Es ist daher geplant, wie bei der Real-time PCR mit dem *hsp*-Gen einen Standard zu verwenden, der aus den klonierten Fragmenten des *rpoB*-Gens besteht.

7. Bewertung der Ergebnisse und Relevanz für die gesetzliche Unfallversicherung

7.1 Mikrobielle Diversität in Kühlschmierstoffen

Die oben genannten Ergebnisse zeigen, dass in Kühlschmierstoffen eine große mikrobielle Diversität zu finden ist. Insgesamt konnten über Sequenzierungen der 16S rRNA Gene der Isolate und Klone 98 Gattungen detektiert werden. In den einzelnen Kühlschmierstoff- bzw. Ansetzwasserproben schwankte die Anzahl an detektierten Gattungen zwischen 3 und 20 pro Probe. Dabei war gerade auch in den Ansetzwasserproben häufig eine hohe mikrobielle Diversität zu finden. Teilweise wurde für das Ansetzen des Kühlschmierstoffkonzentrates Fluss- oder Brunnenwasser verwendet, das zum Teil bereits eine hohe Anzahl an Mikroorganismen aufweist. Aber auch beim Einsatz von Leitungswasser als Anmischflüssigkeit, konnte eine hohe mikrobielle Diversität detektiert werden. Ein Grund dafür kann die Verwendung von Schläuchen sein, die aufgerollt gelagert werden, ohne sie vorher vollständig zu entleeren. Das begünstigt die Entwicklung von Biofilmen zumal wenn solche Schläuche über Jahre hinweg benutzt werden. Mikroorganismen gelangen über das Ansetzwasser in die Kühlschmierstoff-

Konzentrate und letztendlich über den Bearbeitungsprozess als Aerosol in die Luft am Arbeitsplatz der Beschäftigten..

Wie die Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität in Kühlschmierstoffen zeigten, ist der große Teil der detektierten Mikroorganismen zumeist harmlos für den Menschen. Dennoch konnten auch potentiell krankheitsauslösende Bakterien nachgewiesen werden, die zu möglichen gesundheitlichen Beeinträchtigungen von Beschäftigten führen können. Zu den Mikroorganismen die in Risikogruppe 2 nach TRBA 466 eingestuft sind gehören nicht nur bestimmte Mykobakterienarten, sondern z.B. auch *Citrobacter freundii*, *Brevundimonas diminuta*, *Aeromonas veronii* biovar *sobria* und *Pseudomonas alcaligenes*. Eine regelmäßige Kontrolle der Kühlschmierstoffe und Vermeidung der Freisetzung von Aerosolen ist wichtig, um den Kontakt der Arbeitnehmer mit potentiell krankheitsauslösenden Bakterien so gering wie möglich zu halten. Die durchgeführten Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität sind daher auch für die gesetzliche Unfallversicherung relevant. Da schon im Ansetzwasser viele Mikroorganismen vorkommen, wäre es sinnvoll, schon hier die Kontamination („Verkeimung“) so gering wie möglich zu halten. Häufiges Wechseln der Wasserschläuche und vollständiges Entleeren dieser Schläuche nach Benutzung ist eine Möglichkeit, die Anzahl an Mikroorganismen zu reduzieren.

Die Mineralöl-basierten Kühlschmierstoffe wiesen in den Untersuchungen die größte Diversität an Mikroorganismen auf (Produkt A: insgesamt 47 Gattungen, zwischen 6 und 20 Gattungen pro Kühlschmierstoffprobe; Produkt C: insgesamt 16 Gattungen, zwischen 6 und 10 Gattungen pro Probe). In Mineralöl-basierten Kühlschmierstoffen mit Leitkeimflora und Syntheseöl-basierten Kühlschmierstoffen konnte dagegen eine geringere Anzahl an Gattungen festgestellt werden. Bei den Mineralöl-basierten Kühlschmierstoffen mit Leitkeimflora konnten in einer Probe (Produkt B) nur 4 Gattungen detektiert werden. Die zweite Probe (Produkt D) zeigte dagegen eine höhere Diversität mit 14 Gattungen in der Kühlschmierstoffprobe (KSS17). Eine Kühlschmierstoffprobe (KSS 18) wurde auf der Basis eines Syntheseöls angemischt (Produkt E), in dieser Probe konnten nur 5 Gattungen detektiert werden (s. Tabellen 13 und 14 im Ergebnisteil). Es wäre noch genauer zu untersuchen, ob Syntheseöl-basierte Kühlschmierstoffproben insgesamt eine geringere Diversität an Mikroorganismen aufweisen als Mineralöl-basierte Kühlschmierstoffe. Da aber nur eine Syntheseöl-basierte Probe untersucht wurde, kann dies zu diesem Zeitpunkt nicht verallgemeinert werden.

7.2 Nachweis von Mykobakterien mittels Real-time PCR

Es besteht der Verdacht, dass bestimmte Mykobakterien in Kühlschmierstoffen ein mögliches Gesundheitsrisiko für die Beschäftigten darstellen können. Daher ist es wichtig, eine schnelle Nachweismethode zu entwickeln, mit der diese Mykobakterienarten nicht nur detektiert, sondern auch quantifiziert werden können. Mykobakterien wachsen sehr langsam, daher ist eine Kultivierung sehr zeitaufwändig (bis zu 8 Wochen Kultivierungsdauer). Der Einsatz der Real-time PCR hat sich als schnelle und effiziente Methode erwiesen, Mykobakterien in Kühlschmierstoffen nachzuweisen. Der Nachweis über das *hsp*-Gen funktioniert gut, es gibt allerdings noch bei einigen Proben Probleme mit der Spezifität. Hier besteht noch Optimierungs- und Forschungsbedarf. Der Einsatz der Real-time Taqman PCR hat sich als erfolgsversprechend herausgestellt. Allerdings muss hier noch der eingesetzte Standard verbessert werden. Eine Quantifizierung ohne Standard ist nicht möglich, daher ist es wichtig, dass dieser bei jeder Amplifizierung problemlos funktioniert. An der Verbesserung des Standards wird im Institut für Angewandte Mikrobiologie gerade gearbeitet.

8. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Die Arbeiten zur Untersuchung der Isolate und der kultivierungsunabhängigen Analysen sind abgeschlossen. Die Arbeiten zum Nachweis und zur Quantifizierung von Mykobakterien sind annähernd abgeschlossen. Hier steht noch die weitere Optimierung und Anpassung der Methoden bezüglich der Spezifität (*hsp*-Gen) und der Standards (Real-time Taqman PCR) aus.

9. Literatur

Beckett, W., Kallay, M., Sood, A., Zuo, Z. & Milton, D. (2005) Hypersensitivity pneumonitis associated with environmental mycobacteria. *Environmental health perspectives* **113**, 767-770.

Falkinham, J. O. (2003) Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerging Infectious Diseases* **9**, 763-767.

Gilbert, Y, Veillette, M. & Duchaine, C. (2010) Metalworking fluids biodiversity characterization. *Journal of Applied Microbiology* **108**, 437-449.

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.

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**, 67-73.

Lane, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: **Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. (Hrsg.)** *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 115-175. Wiley, Chichester.

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

Passman, F. J. (2008) Metalworking fluid microbes – what we need to know to succesfully understand cause-and-effect. *Tribology Transactions* **51**, 107-117.

Pitcher, D. G., Saunders, N. A. & Owen, R. J. (1989) Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology* **8**, 151-156.

Rasche, D. (2009) Entwicklung einer quantitativen Schnellnachweismethode für Mykobakterien in Kühlschmierstoffen. Masterarbeit am Institut für Angewandte Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, fertiggestellt im Januar 2009.

Rhodes, G., Fluri, A., Gerber, M., Henderson, A., Ruefenacht, A. & Pickup, R. W. (2008) Detection of *Mycobacterium immunogenum* by real-time quantitative Taqman PCR. *Journal of Microbiological Methods* **73**, 266-268.

Rosenman, K. D. (2009) Asthma, hypersensitivity pneumonitis and other respiratory diseases caused by metalworking fluids. *Current Opinion in Allergy and Clinical Microbiology* **9**, 97-102.

Selvaraju, S. B., Kapoor, R. & Yadav, J. S. (2008) Peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH) assay for specific detection of *Mycobacterium immunogenum* and DNA-FISH assay for analysis of pseudomonads

in metalworking fluids and sputum. *Molecular and Cellular Probes* **22**, 273-280.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-1599.

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**, 453-461.

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

Wallace, R. J., Zhang, Y., Wilson, R. W., Mann, L. & Rossmore, H. (2002) Presence of a single genotype of the newly described species *Mycobacterium immunogenum* in industrial metalworking fluids associated with hypersensitivity pneumonitis in mice. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 5580-5584.

Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin:

TRBA 466 „Einstufung von Bakterien (Bacteria) und Archaeobakterien (Archaea) in Risikogruppen“, B ArbBl. 7-2006, S. 33 – 193 (Neufassung) Dezember 2005

DIN-Vorschriften:

DIN-Vorschrift 58943-3: Tuberkulosedagnostik Teil 3: Kulturelle Methoden zum Nachweis von Mykobakterien. DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin, Dezember 1996. Ref. Nr. DIN 58943-3 : 1996-12

Weitere Literatur zum Thema

Forschungsprojekt (Teil I)

„Untersuchung der bakteriellen Diversität in wassergemischten Kühlschmierstoffen“
Abschlussbericht unter:

http://www.bg-metall.de/fileadmin/downloads/Gesundheitsschutz/Kurzbericht_BGM-Projekt-Endfassung2.pdf