

Nachweis von Endotoxinen in Kühlschmierstoffen und Kühlschmierstoffaerosolen

B. Zucker, M. Boxhammer, W. Müller, I. Warfolomeow

Zusammenfassung In der vorliegenden Untersuchung wird ein Verfahren vorgestellt, mit dem Endotoxine in wassergemischten Kühlschmierstoffen (KSS) nachgewiesen werden können. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass in mineralöhlhaltigen KSS im Mittel sowohl höhere Bakterien- als auch Endotoxinkonzentrationen nachgewiesen werden können als in vollsynthetischen KSS. Orientierende Messungen zur Charakterisierung der Konzentration von luftgetragenen Endotoxinen an Arbeitsplätzen, bei denen wassergemischte KSS angewendet werden, zeigten maximale Belastungen von 63 EU/m³ Luft. Für diese im Vergleich zu anderen Wirtschaftszweigen recht niedrigen Konzentrationen (z. B. Tierhaltung) dürften vor allem effiziente Schutzeinrichtungen, wie z. B. Einhausung oder Absaugung an den verarbeitenden Maschinen, verantwortlich sein.

Detection of endotoxins in metalworking fluids and metalworking fluid aerosols

Abstract A method is presented which allows the concentration of endotoxins in metalworking fluids to be determined. By using this method it was shown that mineral oil based metalworking fluids on average contained higher concentrations of endotoxin and bacteria than synthetic metalworking fluids. In a preliminary study dealing with the concentrations of airborne endotoxins at workplaces using metalworking fluids concentrations of up to 63 EU/m³ air were found. Those are relative low concentrations compared to other workplaces (e. g. animal husbandry). These low concentrations should be mainly the result of effective protective measures like enclosure of machines and the use of local exhaust ventilation systems.

1 Einleitung

Wassergemischte Kühlschmierstoffe (KSS) sind Öl-Wasser-Gemische, die bei diversen Arbeitsprozessen in der Metall verarbeitenden Industrie als Aerosol in den luftgetragenen Zustand gelangen. Da KSS häufig mit Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukten belastet sind, können sich diese bei Metallverarbeitungsprozessen ebenfalls als sog. Bioaerosol über die Luft verbreiten. Aus arbeitsmedizinischer Sicht sind dabei besonders Endotoxine (Lipopolysaccharide – LPS – der Zellwand gramnegativer Bakterien) von Bedeutung, da sowohl epidemiologische Untersuchungen als auch Belastungsversuche darauf hinweisen, dass diese an der Entstehung von verschiedenen Atemwegserkrankungen, wie z. B. der chronischen Bronchitis oder dem Organic Dust Toxic Syndrome (ODTS), beteiligt sind.

Priv.-Doz. Dr. Bert-Andree Zucker, Dr. Michaela Boxhammer,
Prof. Dr. Wolfgang Müller,

Institut für Tier- und Umwelthygiene, Freie Universität Berlin.

Dr. Isabel Warfolomeow,

Berufsgenossenschaft Metall Süd, Mainz.

Darüber hinaus ist bekannt, dass eine Belastung mit luftgetragenen Endotoxinen die klinische Ausprägung von anderen nicht endotoxinbedingten Atemwegserkrankungen, wie z. B. Asthma, verstärken kann [1; 2].

In der vorliegenden Untersuchung wird eine Methode vorgestellt, mit der Endotoxine in KSS nachgewiesen werden können, und es werden Ergebnisse orientierender Messungen hinsichtlich der aerogenen Belastung mit Endotoxinen an verschiedenen Arbeitsplätzen in der Metall verarbeitenden Industrie präsentiert.

2 Material und Methoden

2.1 Nachweis von Endotoxinen in KSS

Für die Bestimmung der Endotoxinkonzentration in den KSS-Proben wurde der Limulus-Amöbozyten-Lysat(LAL)-Test QLC-1000 (Bio Whittaker, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Aufgrund verschiedener Inhaltsstoffe der KSS und ihrer Eigenfarbe war es aber nicht möglich, die Endotoxinkonzentration in diesen direkt zu bestimmen, da es sowohl zu unspezifischen Hemmungen als auch zu unspezifischen Aktivierungen des Nachweissystems kam. Diese konnten weder durch Probenverdünnung noch durch den Zusatz von Pyrospore oder Mg-Ionen überwunden werden. Daher wurde ein Weg gewählt, die KSS-Proben in ihre wässrige und ölige Phase zu spalten. Hierbei wurde angenommen, dass sich die LPS aufgrund der Hydrophilie ihrer Polysaccharidkette in der wässrigen Phase konzentrieren [3] und sich außerdem störende Einflüsse auf das Nachweissystem eliminieren lassen könnten.

Zur Spaltung der KSS wurde der Zusatz von verschiedenen Adsorbentien sowie Spaltsalzen geprüft, wobei sich eine Säurespaltung mit HCl in Kombination mit dem Zusatz von MgCl₂ und Erhitzen von 90 °C über 20 min als am besten geeignet erwies. Zusätzlich wurde der Trennungsprozess durch Zentrifugieren unterstützt.

Um die Annahme zu bestätigen, dass sich Endotoxine nach Spaltung der KSS in der wässrigen Phase konzentrieren und durch den Aufbereitungsprozess nicht inaktiviert werden, wurde einer endotoxinfreien Standard-Öl-in-Wasser-Emulsion eine definierte Menge („spike“) von E.-coli-LPS zugesetzt. Nach Spaltung dieser kontaminierten Emulsion wurde die Reisolierungsrate des zugesetzten Endotoxins im LAL-Test bestimmt. Diese schwankte zwischen 96 und 98 %.

Neben der Endotoxinkonzentration wurden folgende mikrobiologische Parameter in den KSS-Proben bestimmt:

- aerobe Gesamtkoloniezahl (GKZ): aerob wachsende Bakterien auf 5 % Hammelblutagar bei 37 °C für 24 h und anschließend bei 20 °C für 48 h,
- aerobe gramnegative GKZ: aerob wachsende gramnegative Bakterien auf MacConkey-3-Agar bei 37 °C für 24 h und anschließend bei 20 °C für 48 h.

Tabelle 1. Konzentration an Bakterien und Endotoxinen in KSS-Proben.

KSS-Typ	Endotoxin in EU/ml			Aerobe GKZ in KBE/ml			Aerobe gramnegative GKZ in KBE/ml		
	Median	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum
mineralölhaltig	96,3	4,4	672,0	$3,9 \cdot 10^2$	u. N.	$4,4 \cdot 10^4$	u. N.	u. N.	$6,0 \cdot 10^2$
vollsynthetisch	0,6	0,1	6,9	u. N.	u. N.	$6,0 \cdot 10^2$	u. N.	u. N.	$6,0 \cdot 10^2$

u. N. = unter der Nachweisgrenze (5 KBE/ml), GKZ = Gesamtkoloniezahl, EU = Endotoxin Units, KBE = Kolonie bildende Einheiten

Tabelle 2. Einfluss von Bakterienwachstum und Bakterizideinsatz auf die Endotoxinkonzentration in KSS – Laborversuche.

KSS-Typ	Behandlung	Endotoxin in EU/ml	Aerobe GKZ in KBE/ml
mineralölhaltig	vor Bakterienzugabe	377	410
	nach Bakterienzugabe	2210	600
	nach Bakterizideinsatz	2990	u. N.
vollsynthetisch	vor Bakterienzugabe	0,6	u. N.
	nach Bakterienzugabe	375	100
	nach Bakterizideinsatz	440	u. N.

2.2 Einfluss von Konservierungsmaßnahmen auf die Konzentration von Endotoxinen und Bakterien in KSS

Zur Untersuchung des Einflusses von Konservierungsmaßnahmen (Zusatz von Bakteriziden) auf den Endotoxingehalt in KSS wurden sowohl Labor- als auch Feldversuche durchgeführt.

2.2.1 Laborversuche

Ein vollsynthetischer sowie ein mineralölhaltiger KSS wurden mit einer Kultur von *Pseudomonas stutzeri* kontaminiert und anschließend mit einem Bakterizid behandelt. Endotoxinkonzentration und Bakterienwachstum wurden vor Zugabe der Bakterien sowie vor und nach Zugabe des Bakterizids bestimmt. Die Einwirkzeit des Bakterizids betrug 24 h.

2.2.2 Feldversuch

In einem Metall verarbeitenden Betrieb wurde die Konzentration von Endotoxinen und Bakterien in einem mineralölhaltigen KSS aus einer Zentralanlage mit 120 000 l KSS vor und nach einem prophylaktischen Bakterizideinsatz bestimmt.

2.3 Bestimmung der Konzentration von luftgetragenen Endotoxinen und Bakterien an verschiedenen Arbeitsplätzen in der Metall verarbeitenden Industrie

An sechs Arbeitsplätzen in verschiedenen Metall verarbeitenden Betrieben wurde die Konzentration von luftgetragenen Endotoxinen mittels stationärer und personengetragener Messungen bestimmt. Die Messungen erfolgten in Anlehnung an das „Verfahren zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz“ [4] unter Verwendung des LAL-Testes QCL-1000 (Bio Whittaker, USA).

Die Bestimmung der Gesamtkoloniezahl an luftgetragenen aeroben Bakterien erfolgte mittels Impingement (AGI-50-Impinger, Luftdurchsatz 12,5 l/min, Sammelzeit 20 min, 50 ml pyrogenfreies Wasser als Sammelflüssigkeit).

Weiterhin wurde die Gesamtkoloniezahl an Bakterien und die Endotoxinkonzentration in den KSS-Proben der jeweiligen Arbeitsplätze bestimmt.

Die Verfahren zur Kultivierung der Bakterien und zum Endotoxinnachweis entsprechen den in Abschn. 2.1 beschriebenen.

Die einzelnen Arbeitsplätze (AP) wiesen folgende Charakteristika auf:

- AP1: Rundschleifmaschine und anschließende Teilereinigungsmaschine im Fahrzeugbau, beide Maschinen mit einer Absaugung ausgerüstet; potenzielle Aerosolquellen: vollsynthetischer KSS der Schleifmaschine und Reinigungslösung der Teilereinigungsmaschine
- AP2: Rundschleifmaschine im Maschinenbau, Maschine mit Absaugung ausgerüstet; potenzielle Aerosolquellen: mineralölhaltiger konservierter KSS
- AP3: CNC-Bearbeitungszentrum (Bohren, Fräsen, Drehen), Maschine vollständig eingehaust und mit Absaugung ausgerüstet; potenzielle Aerosolquelle: mineralölhaltiger konservierter KSS
- AP4: Bearbeitungszentrum in einer Leichtmetallgießerei; potenzielle Aerosolquelle: mineralölhaltiger KSS
- AP5: Rundschleifmaschine im Maschinenbau; potenzielle Aerosolquelle: mineralölhaltiger konservierter KSS
- AP6: Rundschleifmaschine in einem Metallverarbeitungszentrum; potenzielle Aerosolquelle: vollsynthetischer konservierter KSS.

3 Ergebnisse

3.1 Endotoxin- und Bakterienkonzentration in KSS-Proben

In 96 KSS-Proben wurden die Endotoxinkonzentration und die aerobe sowie aerobe gramnegative GKZ bestimmt. In allen Proben waren Endotoxine nachweisbar, aerob wachsende Bakterien wurden in 68 Proben nachgewiesen, aerobe gramnegative Bakterien in 51 der 96 Proben. Die mineralölhaltigen KSS-Proben zeigten gegenüber den vollsynthetischen höhere Kontaminationen an Endotoxinen und Bakterien (Tabelle 1).

3.2 Einfluss von Konservierungsmaßnahmen auf die Konzentration von Endotoxinen und Bakterien in KSS

Bei den im Rahmen der Laborversuche mit Bakterien angeimpften KSS-Proben konnte eine Zunahme der Endotoxinkonzentration bereits nach der Kontamination mit den Bakterien und darüber hinaus ein weiterer Endotoxinanstieg nach Zugabe des Bakterizids festgestellt werden. Nach Bakterizideinsatz konnten keine vermehrungsfähigen Bakterien (aerobe GKZ) mehr nachgewiesen werden (Tabelle 2). Bei der Konservierungsmaßnahme unter Feldbedingungen konnte mit einer Zeitverzögerung von sieben Tagen eine deutliche Zunahme der Endotoxinkonzentration

Tabelle 3. Einfluss von Bakterizidzusatz auf das Bakterienwachstum und die Endotoxinkonzentration in KSS unter Praxisbedingungen.

Behandlung	Endotoxin in EU/ml	Aerobe GKZ in KBE/ml	Aerobe gramnegative GKZ in KBE/ml
3 Tage vor Bakterizidzugabe	102	$1,4 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$
3 Tage nach Bakterizidzugabe	95	$1,4 \cdot 10^2$	$7,0 \cdot 10^1$
7 Tage nach Bakterizidzugabe	151	u. N.	u. N.

u. N. = unter der Nachweisgrenze (5 KBE/ml), GKZ = Gesamtkoloniezahl, EU = Endotoxin Units, KBE = Kolonie bildende Einheiten

Tabelle 4. Konzentrationen an Endotoxinen und Bakterien in KSS-Aerosolen und KSS-Proben von verschiedenen Arbeitsplätzen.

Untersuchte Parameter	Untersuchter Arbeitsplatz					
	1	2	3	4	5	6
KSS-Proben						
Gesamtkoloniezahl in KBE/ml	$5,3 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$	$9,9 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^7$	u. N.
Endotoxinkonzentration in EU/ml	1768,0	1008,0	2227,0	3,3	5470,0	9,8
Aerosolmessungen						
<i>Stationär</i>						
Gesamtkoloniezahl in KBE/m ³	$1,7 \cdot 10^3$	$3,2 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^2$	$2,1 \cdot 10^1$	$4,5 \cdot 10^0$	$7,0 \cdot 10^0$
Endotoxinkonzentration in EU/m ³	14,8	u. N.	7,2	6,1	63,0	u. N.
<i>Personengetragen</i>						
Endotoxinkonzentration in EU/m ³	21,5	11,0	33,9	u. N.	33,6	u. N.

u. N. = unter der Nachweisgrenze (5 KBE/ml, 4,0 EU/m³ in Luftprobe, 0,05 EU/ml in Materialprobe), GKZ = Gesamtkoloniezahl, EU = Endotoxin Units, KBE = Kolonie bildende Einheiten

beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt waren keine vermehrungsfähigen Bakterien mehr nachweisbar (Tabelle 5).

3.3. Bestimmung der Konzentration von luftgetragenen Endotoxinen an verschiedenen Arbeitsplätzen in der Metall verarbeitenden Industrie

Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen von luftgetragenen Endotoxinen und Bakterien sowie die Konzentrationen dieser Parameter in den jeweiligen KSS-Proben sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Am AP1 wurde als bedeutende Endotoxinquelle die Reinigungslösung mit 1768 EU/ml identifiziert, die Endotoxinkonzentration des KSS war hingegen mit 0,1 EU/ml vernachlässigbar gering. Insgesamt konnten in den KSS-Proben Endotoxinkonzentrationen von weniger als 0,05 EU/ml (untere Nachweisgrenze für Materialproben) bis 5470 EU/ml festgestellt werden. Die Konzentrationen von luftgetragenen Endotoxinen schwankten bei den stationären Messungen zwischen Werten unterhalb der Nachweisgrenze ($4,0 \text{ EU/m}^3$) und $63,0 \text{ EU/m}^3$ bzw. bei den personengetragenen Messungen zwischen unter der Nachweisgrenze und $33,9 \text{ EU/m}^3$.

4 Diskussion

In dieser Studie wird eine Methode vorgestellt, mit der es möglich ist, Endotoxine in KSS nachzuweisen. Hierzu werden die wassergemischten KSS in ihre Öl- und Wasserphase getrennt, wobei sich LPS mit langer Polysaccharidkette (S-LPS-Typ) in der wässrigen Phase konzentrieren. In dieser können sie mithilfe des Limulus-Tests quantifiziert werden. Bei der beschriebenen Spaltung der KSS-Proben ist aber zu berücksichtigen, dass es beim verstärkten Vorhandensein von Endotoxinen vom R-LPS Typ (sehr kurze Polysaccharidkette) zu einer Unterbewertung der Endotoxinkontamination im KSS kommen kann, da diese LPS-Typen nur eine geringe Wasserlöslichkeit aufweisen [3]. In diesem Fall sollte

die Spaltung der KSS auf der Basis von Extraktionsprotokollen für weniger stark hydrophile LPS-Typen modifiziert werden.

Durch die Bestimmung der Endotoxinkonzentration sind Rückschlüsse auf das Ausmaß der Kontamination von KSS mit gramnegativen Bakterien möglich, auch wenn es sich um schwer oder nicht kultivierbare Bakterien handelt oder wenn durch Konservierungsmaßnahmen der KSS keine lebensfähigen Bakterien mehr vorhanden sind. Letzteres ist in der über den bakteriellen Zelltod hinausgehenden endotoxischen Aktivität begründet [5]. Insofern stellt die Endotoxinkonzentration eine wichtige Ergänzung bei der Beurteilung des hygienischen Zustands von KSS dar, insbesondere bei einem negativen bakteriologischen Untersuchungsbefund.

Weiterhin zeigen diese Untersuchungen, dass KSS eine wichtige Quelle für luftgetragene Endotoxine in der Metall verarbeitenden Industrie sein können. Die Belastung von Arbeitnehmern wird dabei vor allem von folgenden Faktoren bestimmt:

1. Konzentration von Endotoxinen im KSS,
2. Grad der Aerosolbildung während des Metall verarbeitenden Prozesses,
3. Vorhandensein von Schutzeinrichtungen an den Metall verarbeitenden Maschinen, wie Maschinenkapselung und -absaugung,
4. Vorhandensein von Be- und Entlüftungsvorrichtungen in den Werkhallen.

Orientierende Messungen in verschiedenen Metall verarbeitenden Betrieben zeigten dabei im Vergleich zu anderen endotoxinbelasteten Arbeitsbereichen (z. B. Landwirtschaft) eher niedrige Endotoxinkonzentrationen. So schwankte die Konzentration von einatembaren Endotoxinen bei personengetragenen Messungen in den untersuchten Metall verarbeitenden Betrieben zwischen Werten unterhalb der Nachweisgrenze ($4,0 \text{ EU/m}^3$) und $33,9 \text{ EU/m}^3$. Die höchste Konzentration von einatembaren Endotoxinen

wurde am Arbeitsplatz AP5 bei einer stationären Messung mit 63,0 EU/m³ ermittelt. In Schweineställen wurden dagegen durchschnittliche Konzentrationen an einatembaren Endotoxinen von 670 EU/m³, in Geflügelställen von 2 000 EU/m³ gemessen [6], wobei Spitzenwerte von über 40 000 EU/m³ auftreten können [7]. Einen umfassenden Überblick zu Endotoxinbelastungen in unterschiedlichen Arbeitsbereichen und Branchen findet sich u. a. in [8].

Bei den Messungen wurde auch deutlich, dass zwischen den ermittelten luftgetragenen Endotoxinkonzentrationen bei stationärer und personengetragener Messung deutliche Unterschiede auftreten können. So wurden am Arbeitsplatz 3 mit 7,2 EU/m³ relativ geringe Endotoxinkonzentrationen bei der stationären Messung beobachtet, mit 33,9 EU/m³ deutlich höhere dagegen bei der personengetragenen. Bei diesem Arbeitsplatz handelte es sich um eine vollständig eingehauste Maschine, die aber zum Wechseln der zu bearbeitenden Teile betreten wurde. Hierbei wurden die Teile vom Bedienungspersonal mit Druckluft von anhaftenden Spänen

und KSS gereinigt. Die bei diesem Reinigen entstandenen KSS-Aerosole dürften für die oben beschriebene Differenz verantwortlich sein, da die stationäre Messung außerhalb der Maschinenabkapslung erfolgte. Dieses Beispiel macht deutlich, dass eine Beurteilung der Exposition des Bedienpersonals der Maschinen gegenüber KSS-Aerosolen stets über personengetragene Messungen erfolgen sollte.

Bei der begrenzten Anzahl der in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen ist zu berücksichtigen, dass sie keinen vollständigen Überblick über die Endotoxinbelastung der Luft am Arbeitsplatz bei Tätigkeiten mit wassergemischtem KSS geben können. Die Untersuchungsergebnisse machen aber deutlich, dass an Arbeitsplätzen in der Metallverarbeitung die Exposition gegenüber Endotoxinen in Konzentrationsbereichen gehalten werden kann, die unter den in der Literatur beschriebenen „No-effect-levels“ für endotoxin-assoziierte Atemwegserkrankungen (ODTS: 2 000 EU/m³; chronische Bronchitis: 100 EU/m³) liegen [9].

Literatur

- [1] Michel, O.; Kips, J.; Duchateau, J.; Vertongen, F.; Robert, L.; Collet, H.; Pauwels, R.; Sergysels, R.: Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154 (1996), S. 1641-1646.
- [2] Douwes, J.; Thorne, P.; Pearce, N.; Heederik, D.: Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg.* 47 (2003), S. 187-200.
- [3] Westphal, O.; Lüderitz, O.; Bister, F.: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z. Naturforsch.* 7b (1952), S. 148-155.
- [4] Verfahren zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz (Kennzahl 9450). In: BGIA-Arbeitsmappe Messung von Gefahrstoffen. 19. Lfg./97. Hrsg.: Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitsschutz – BGIA, Sankt Augustin. Berlin: Erich Schmidt 1989 – Losebl.-Ausg. www.bgia-arbeitsmappedigital.de/9450
- [5] Zucker, B.; Müller, W.: Untersuchungen zum Luftkeimhaushalt in Tierställen: Stabilität von Endotoxinen in der Umwelt. *Berliner und Münchener Tierärztl. Wochenschr.* 117 (2004), S. 6-11.
- [6] Takai, H.; Pedersen, S.: Livestock related fine dust – composition, structure and flows. *Landbauforschung Völkenrode* 235 (2002), S. 139-144.
- [7] Linsel, G.; Backe, E.; Brehme, G.; Jäckel, R.; Lotz, G.; Zucker, B.: Anwendung eines Vollbluttests zur Messung luftgetragener Endotoxine in der Landwirtschaft. Dokumentationsband 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arbeits- und Umweltmedizin, Dresden 2003.
- [8] Irritativ-toxische Wirkungen von luftgetragenen biologischen Arbeitsstoffen am Beispiel der Endotoxine. Informationspapier des Ausschusses für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS). *BArbBl.* (2005) Nr. 6, S. 49-59.
- [9] Rylander, R.: Evaluation of the risks of endotoxin exposure. *Int. J. Occup. Environm. Health Suppl.* 3 (1997), S. 32-36.