

**Ergebnisbericht
zum Wirksamkeitsnachweis ausgewählter Biozide in
wassergemischten Kühlschmierstoffen gegenüber
Mykobakterien – insbesondere *M. immunogenum***

Auftraggeber:

Berufsgenossenschaft Metall Nord Süd (BGM)
Abteilung Gesundheitsschutz
Sachgebiet Biologische Noxen
Zuständig: Frau Dr. Isabel Warfolomeow

Forschungsnehmer:

Forschungszentrum Borstel
Nationales Referenzzentrum (NRZ) für Mykobakterien
Leitung: Frau Dr. S. Rüsck-Gerdes

Stand: Januar 2009

Ausgangssituation

Seit Beginn der 90er Jahre sind in den USA bei verschiedenen Automobilherstellern und – Zulieferern wiederholt Fälle von Atemwegserkrankungen im Sinne einer Exogen Allergischen Alveolitis (EAA, engl. Hypersensitivity Pneumonitis (HP)) aufgetreten. In den Betriebsproben der eingesetzten wassergemischten Kühlschmierstoffe (KSS) konnte ein bis dahin nicht als eigenständige Spezies bekanntes Mykobakterium (M.) – *M. immunogenum* – isoliert werden. Vermutet wird eine unzureichende Wirksamkeit von bestimmten N-Formalen, insbesondere substituierten Hexahydrotriazinen (sHHT), gegenüber dieser Bakterienart (1). Als Folge davon wurde seinerzeit bei einem großen Automobilkonzern in USA der Einsatz von N-Formalen in wassergemischten Kühlschmierstoffen streng limitiert.

Nachdem 2003 eine ähnliche Situation bei einem Automobilhersteller in England auftrat (2), ohne das dort jedoch *M. immunogenum* in Betriebsproben nachgewiesen werden konnte, wurden in einer von der Berufsgenossenschaft Metall Nord Süd (BGM, vormals Süddeutsche Metall-Berufsgenossenschaft, Mainz) initiierten Untersuchungsreihe vierzig KSS-Betriebsproben auf das Vorkommen von Mykobakterien untersucht. Lediglich in einer Probe, die aus den USA stammte, konnte *M. immunogenum* nachgewiesen werden (3). Aufgrund dieser Ergebnisse ging man bislang hierzulande nicht von einer Gefährdung durch Mykobakterien bei Tätigkeiten mit wassergemischten KSS aus.

Anfang 2007 wurde erstmalig im Rahmen eines Berufskrankheitenverfahrens der BGM in einer mit N-Formalen konservierten KSS-Probe einer Zentralanlage *M. immunogenum*, in auffallend hoher Konzentration, nachgewiesen. Obwohl mittlerweile mehrere Betriebe betroffen sind, kam es bislang jedoch nur im ersten Fall zu einer Häufung von Atemwegserkrankungen die als beruflich verursachte EAA anerkannt wurden. In allen anderen Betrieben mit Nachweis von *M. immunogenum* in wassergemischten KSS, sind in diesem Zusammenhang bisher keine Erkrankungen zu verzeichnen.

Vergleichende Untersuchungen eines Konservierungsmittelherstellers in Deutschland zur Wirksamkeit verschiedener Biozide in 2006, belegten die bereits in den USA postulierte unzureichende Wirksamkeit von Triazinen und Oxazolidinen (N-Formalen) insbesondere gegenüber der Spezies *M. immunogenum*. Die interne Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Mykobakterien, Borstel.

Der vorgenannte Untersuchungsansatz einer vergleichenden Biozidwirksamkeit gegenüber Mykobakterien, wurde von der BGM aufgegriffen und in zwei Testreihen erweitert. Zum Einsatz kamen die mittlerweile hierzulande aus KSS-Betriebsproben isolierten Stämme von *M. immunogenum* und einer noch nicht beschriebenen Mykobakterienart. Dies ist insofern von Bedeutung, da die üblicherweise in Versuchsreihen eingesetzten Stammkulturen (ATCC-Stämme) ein verändertes Verhalten gegenüber „Wildstämmen“ aus nativen Proben zeigen können.

Zwei aus Patientenmaterial isolierte Mykobakterienarten dienten als Referenzstämme; darüber hinaus wurde ein weiterer, borsäurehaltiger KSS eingesetzt.

Material und Methoden

Bakterien-Stämme:

Mycobacterium immunogenum (Stamm Nr. 925/07 und 1388/08).

Mykobakterium einer unbekanntenen Art Stamm Nr. 1385/08

Mycobacterium gordonae (Stamm Nr. 719/08)

→ Diese Stämme wurden aus unterschiedlichen

Betriebsproben wassergemischter Kühlschmierstoffe beim NRZ isoliert.

Mycobacterium avium (Stamm Nr. 3392/08)

Mycobacterium fortuitum (Stamm Nr. 3838/08)

→ Diese Stämme wurden aus Patientenmaterial beim NRZ isoliert.

Kühlschmierstoffe :

KSS A	Mineralöhlhaltig (30%) Wassermischbar, Borfrei, Aminhaltig Typische Einsatzkonzentration: 3-15% pH-Wert bei 3% = 9,2
KSS B	Mineralöhlhaltig (75%) Wassermischbar, Borfrei, Aminhaltig Typische Einsatzkonzentration: 5-10% pH-Wert bei 5% = 9,1
KSS C	Mineralöhlhaltig (40%) Wassermischbar, Borhaltig (ca. 8%), Aminhaltig Typische Einsatzkonzentration: 4-6% pH-Wert bei 4% = 9,0

Die Kühlschmierstoffprodukte wurden für die geplanten Untersuchungszwecke ohne Vorkonservierung zur Verfügung gestellt und in den Versuchsreihen jeweils in Konzentrationen zu 2,5% und 5% eingesetzt.

Biozide:

Abkürzung	Substanz	Einsatzkonz. im Test	Substanzgruppe
MBO	3,3'-Methylenbis[5-methyloxazolidin]	0,1%	N-Formal
HHT	2,2',2''-(Hexahydro-1,3,5-triazin-1,3,5-triyl)-triethanol	0,1% und 0,15%	N-Formal
EDDM	(Ethylendioxy)-dimethanol	0,1%	O-Formal
CMIT/MIT	5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on + 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (Verhältnis 3:1)	0,1%	Isothiazolinone
EDDM + CMIT/MIT		0,1%	Formulierung aus O-Formal + Isothiazolinon

Durchführung

Von den Kühlschmierstoffen wurde mit sterilem WSH (Wasser standardisierter Härte = 17,0 dH°) 40 ml einer 2,5 und 5%igen Emulsion hergestellt. Diese Emulsionen wurden nach vollständiger Homogenisierung mit den jeweiligen Bakterienstämmen beimpft, wobei die Ausgangskeimzahl ca. 10^6 KBE/ml betrug. Die beimpften Emulsionen wurden anschließend mit den fünf Bioziden in einer Konzentration von 0,1% bzw. 0,15% versetzt. Da die Menge der aktiven Wirksubstanz im HHT niedriger ist als in MBO und EDDM, wurde die Konzentration von HHT in der zweiten Testreihe auf 0,15% erhöht. Aufgrund des hohen Untersuchungsumfangs, konnte dieser Ansatz jedoch nur mit dem borsäurehaltigen Produkt durchgeführt werden.

Nach 3, 8 und 23 Tagen Einwirkzeit der Biozide bei 25°C wurde anschließend von den Ausgangssuspensionen Röhrcchen mit Löwenstein-Jensen-Medium und Platten mit Middlebrook-Nährmedium beimpft. Zum Abstoppen der Biozid-Wirkung vor der Bebrütung wurde das Gemisch aus Kühlschmierstoff, Biozid und Bakterien mit Aqua dest 1:100 nach der jeweiligen Einwirkzeit verdünnt.

Die Bebrütungsdauer betrug für die schnell wachsenden Mykobakterien 3 und für die langsam wachsenden acht Wochen.

Ergebnisse

Die nachfolgenden Ergebnistabellen (Tabellen 1-3) fassen zwei Versuchsreihen zusammen. Eine erste Testreihe beinhaltete teilweise Unterschiede im Hinblick auf Versuchsansatz, Auswertung und Untersuchungsumfang wie folgt:

- nur 1 *M. immunogenum* Stamm (Nr. 925/07) wurde eingesetzt,
- die Einsatzkonzentration von HHT lag bei 0,1%,
- die Einwirkzeit der Biozide betrug 4, 11 und 16 Tage.

Diese Unterschiede sind in der Tabelle vermerkt bzw. bei der Auswertung berücksichtigt worden.

Legende:

	++	= konfluierendes Wachstum (dichter Bakterienrasen)
	+	= geringes Wachstum
	+/-	= 1-5 Einzelkolonien
	-	= kein Wachstum

Da die Auswertung drei unterschiedliche Einwirkzeiten der eingesetzten Biozide mit gegebenenfalls auch bis zu drei unterschiedlichen Ergebnissen umfasst, wurde zur Vereinfachung zusätzlich eine farbliche Darstellung entsprechend dem „Ampelprinzip“ gewählt mit den folgenden Konventionen:

- 1.) Die Ergebnisse für „geringes Wachstum“ (+) und „1-5 Einzelkolonien“ (+/-) sind farblich zusammengefasst.
- 2.) Das jeweils am häufigsten genannte Ergebnis führt zur farblichen Zuordnung.
- 3.) Bei einem Verlauf (z.B. kein Wachstum – geringes Wachstum – Bakterienrasen) erfolgt die Zuordnung entsprechend dem mittleren Ergebnis.

Tabelle 1

KSS-Konz.	<i>M. immunogenum</i> (KSS-Stamm 1)		<i>M. immunogenum</i> (KSS-Stamm 2)		unbekanntes Mykobakterium (KSS-Stamm)		<i>M. gordonae</i> (KSS-Stamm)		<i>M. avium</i> (Patientenmat.)		<i>M. fortuitum</i> (Patientenmat.)	
	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%
KSS A (mineralölhaltig (30%), Borfrei, Aminhaltig)												
Kontrolle	++	++	++	++	+/-	+/-	+	+	++	++	++	-
	++	++	++	++	+/-	-	+	+	++	++	+	-
	++	++	++	++	+/-	-	+	+	++	++	+	-
HHT * (0,1%) 1. Testreihe	++	++										
	++	++										
	++	++										
MBO (0,1%) 1. Testreihe	++	++										
	-	++										
	-	++										
EDDM (0,1%)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CMIT/MIT (0,1%)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
EDDM + CMIT/MIT (0,1%) 1. Testreihe	-	-										
	-	-										
	-	-										

* HHT = 2,2',2''-(Hexahydro-1,3,5-triazin-1,3,5-triyl)-triethanol (CAS Nr. 4719-04-4)

Tabelle 2

KSS-Konz.	<i>M. immunogenum</i> (KSS-Stamm 1)		<i>M. immunogenum</i> (KSS-Stamm 2)		unbekanntes Mykobakterium (KSS-Stamm)		<i>M. gordonae</i> (KSS-Stamm)		<i>M. avium</i> (Patientenmat.)		<i>M. fortuitum</i> (Patientenmat.)	
	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%
KSS B (mineralölhaltig (75%), Borfrei, Aminhaltig)												
Kontrolle	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	+/- +/- -	+/- - -	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++	++ ++ ++
HHT * (0,1% !) 1. Testreihe	++ ++ ++	++ ++ ++										
MBO (0,1%) 1. Testreihe	++ ++ +	++ + -										
EDDM (0,1%)	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
CMIT/MIT (0,1%)	+/- - -	- - -	- - +/-	- - -	- - -	- - -	++ - -	++ - -	++ ++ -	++ + -	- - -	+ - -
EDDM + CMIT/MIT (0,1%) 1. Testreihe	- -	- -										

* HHT = 2,2',2''-(Hexahydro-1,3,5-triazin-1,3,5-triyl)-triethanol (CAS Nr. 4719-04-4)

Tabelle 3

KSS-Konz.	<i>M. immunogenum</i> (KSS-Stamm 1)		<i>M. immunogenum</i> (KSS-Stamm 2)		unbekanntes Mykobakterium (aus KSS)		<i>M. gordonae</i> (aus KSS)		<i>M. avium</i> (Patientenmat.)		<i>M. fortuitum</i> (Patientenmat.)	
	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%	2,5%	5,0%
KSS C (mineralölhaltig (40%), <u>Borsäurehaltig (8%)</u>, Aminhaltig)												
Kontrolle	- + +	+ - -	+ + +	- + +	- - -	- - -	- - -	+/- +/- +/-	++ ++ ++	++ ++ ++	- - -	+/- - -
HHT * (0,15% !)	+/- +/- +/-	+/- - -	+/- + +	- + +	- - +/-	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	+/- - -	- - -
MBO (0,1%)	+ + +	+/- +/- +/-	+/- + +	+/- + +	+/- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
EDDM (0,1%)	- +/- +	+/- - -	+/- + +	+/- + +	- +/- -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
CMIT/MIT (0,1%)	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	++ - -	++ - -	- - -	- - -
EDDM + CMIT/MIT (0,1%)	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -

* HHT = 2,2',2''-(Hexahydro-1,3,5-triazin-1,3,5-triyl)-triethanol (CAS Nr. 4719-04-4)

Diskussion

In den vorausgegangenen Untersuchungen zur Biozidwirksamkeit fiel bereits auf, das *M. immunogenum* ein anderes Verhalten gegenüber den im Versuch eingesetzten Bioziden zeigte im Vergleich zu den Referenzarten *M. terrae* und *M. avium*. Während sich HHT und MBO bei *M. immunogenum* als unzureichend wirksam erwies, konnte mit der Formulierung CMIT/MIT ein gutes Ergebnis erzielt werden; umgekehrt verhielt es sich bei den Referenzstämmen.

Auch in den Testreihen der BGM fiel erneut eine eingeschränkte bis unzureichende Wirksamkeit beider N-Formale auf. Im Unterschied zur vorgenannten Untersuchung, zeigte sich aber diesmal auch die Formulierung CMIT/MIT zumindest im ersten KSS-Produkt als nicht ausreichend wirksam. Bei EDDM als Einzelwirkstoff gab es unterschiedliche Ergebnisse je nach eingesetztem Kühlschmierstoff. Die Wirksamkeit der Biozide wird offensichtlich vom verwendeten KSS-Produkt beeinflusst.

Wie die Versuchsansätze mit den Kontrollen zeigen, bieten die zu Versuchszwecken nicht vorkonservierten Kühlschmierstoffe allesamt recht gute Wachstumsbedingungen für Mykobakterien. Lediglich das borsäurehaltige Produkt erwies sich bereits in der Biozid freien Variante stabiler gegenüber einer Besiedlung mit Mykobakterien. Die mit dem borsäurehaltigen Kühlschmierstoff-Produkt getesteten N-Formale und auch das O-Formal, führten zu keiner erkennbaren Verbesserung der bereits in der Kontrolle nachweisbaren besseren mikrobiologischen Stabilität. Daher lässt sich nicht beurteilen, ob die im zweiten Versuchsansatz eingesetzte höhere HHT-Konzentration von 0,15% eine stärkere biozide Wirkung zur Folge hat. Es bleibt somit die Frage, ob es sich um eine grundsätzliche unzureichende biozide Wirkung von HHT bzw. der N-Formale insbesondere gegenüber Mykobakterien handelt oder lediglich um eine zu geringe Konzentration in der Anwendung?

In den bislang vorliegenden *M. immunogenum* - positiven Proben aus Mitgliedsbetrieben der BGM, fiel zudem eine recht hohe Gesamtkoloniezahl ubiquitärer Bakterien auf, was möglicherweise auch auf eine unzureichende Biozid-Wirksamkeit / zu niedrige Dosierung hindeutet. Bemerkenswert ist, dass *M. immunogenum* noch in keiner Wasserprobe (Anmischwasser) nachgewiesen wurde; umgekehrt die typischerweise im Wasser vorkommenden Mykobakterien, wie *M. xenopi*, *M. gordonae*, bis auf wenige Ausnahmen nicht in Kühlschmierstoffproben gefunden werden. War *M. immunogenum* in Betriebsproben nachweisbar, dann in der Regel als einziges Mykobakterium und in hohen Konzentrationen (positives Primärpräparat = >10.000 KBE/ml).

Die aus KSS-Proben isolierte „unbekannte“ Mykobakterienart ist gegenüber den eingesetzten Bioziden äußerst empfindlich und zeigt ein vergleichbares Verhalten zu den anderen Referenzarten.

Mit der Zubereitung EDDM + CMIT/MIT konnte in den bislang durchgeführten Testreihen eine zuverlässige und reproduzierbare biozide Wirksamkeit gegenüber allen getesteten Mykobakterien, einschließlich *M. immunogenum* erzielt werden. Die biozide Wirkung tritt bereits nach 3 Tagen Einwirkdauer ein. Bemerkenswert sei jedoch, dass auch nach erfolgreicher Konservierung, *M. immunogenum* zwar nicht mehr in der „fließenden Welle“ aber noch im „Biofilm“ von Anlagen nachweisbar war. Wird dieser „Biofilm“ nicht beseitigt, muss mit nachfolgenden Rekontaminationen des Kühlschmierstoffs gerechnet werden.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann nicht beurteilt werden, ob es sich bei den aufgetretenen Erkrankungsfällen (EAA) im Zusammenhang mit dem Nachweis von *M. immunogenum* lediglich um ein betriebliches Einzelgeschehen handelt oder zukünftig mit der Möglichkeit eines gehäufteten Vorkommens gerechnet werden muss. Nach dem jetzigen Kenntnisstand ist *M. immunogenum* als ein verdächtiges Allergen zur Auslösung einer EAA zu bewerten; eine eindeutige ursächliche allergene Komponente konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt und bislang unbekanntes Cofaktoren eine maßgebliche Rolle spielen.

Zusammenfassung

- 1.) HHT und MBO (N-Formale) zeigen in den gebräuchlichen Einsatzkonzentrationen gegenüber den aus KSS-Proben isolierten *M. immunogenum* Stämmen keine ausreichende Wirksamkeit.
- 2.) Im Vergleich zu anderen Mykobakterienarten zeigt *M. immunogenum* eine höhere Stabilität gegenüber den meisten getesteten Bioziden.
- 3.) Die Wirksamkeit von EDDM (O-Formal) und CMIT/MIT (Heterocyclus) als Einzelformulierung ist indifferent und variiert je nach eingesetztem KSS-Produkt bzw. Mykobakterienspezies.
- 4.) Die Zusammensetzung des KSS-Produkts beeinflusst die Wirksamkeit der eingesetzten Biozide.
- 5.) Das borhaltige KSS-Produkt zeigt bereits im nicht konservierten Zustand (Formulierung ohne Biozide) eine gute Stabilität gegenüber einer Besiedlung mit Mykobakterien und somit auch den besten Wirkeffekt der getesteten Biozide.
- 6.) Die Formulierung EDDM + CMIT/MIT erwies sich gegenüber allen im Versuch eingesetzten Mykobakterienarten, einschließlich *M. immunogenum*, als schnell und ausreichend wirksam.

Literatur

- 1.) „White Paper – Hypersensitivity Pneumonitis: Is There an Association with Triazine Biocides and Mycobacteria in Metalworking Fluids?“, Safety, Health, Environmental Regulatory Affairs Committee of the Independent Lubricant Manufacturers Association (ILMA), USA
- 2.) Outbreak of respiratory disease at Powertrain Ltd, Longbridge, Birmingham Health and Safety Executive (HSE), 2006, England
- 3.) Ergebnisbericht zur Studie „Vorkommen von Mykobakterien in wassergemischten Kühlschmierstoffe“, April 2004,
(<http://www.bg-metall.de> → Prävention → Biologische Noxen → Kühlschmierstoffe)