

Entwicklung eines kultivierungsfreien Ansatzes zur Bewertung von wassergemischten Kühlschmierstoffen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie und multivariater Datenanalyse – erste Ergebnisse

N. Karthäuser, A. Kolk, K. Druckenmüller

ZUSAMMENFASSUNG Wassergemischte Kühlschmierstoffe (wKSS) bieten aufgrund ihrer Zusammensetzung und ihrer Anwendungsbedingungen mit Blick auf pH-Wert, Temperatur, Wasser- und Sauerstoffgehalt vielen Mikroorganismen ein günstiges Wachstumsmilieu. Einige der Mikroorganismen aus wKSS können bei exponierten Beschäftigten Haut- und Atemwegserkrankungen hervorrufen. Wann ein mikrobiell besiedelter Kühlschmierstoff für Beschäftigte ein relevantes Risiko darstellt, ist jedoch nicht eindeutig geklärt. Es gibt bisher kein Verfahren, das eine solche Bewertung ermöglicht. In diesem Artikel werden erste Ergebnisse einer Untersuchung vorgestellt, welche die Entwicklung eines kultivierungsunabhängigen Ansatzes zum Nachweis mikrobieller Belastungen in wKSS mittels Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) zum Ziel hat. Die hierbei erzeugten Massenspektren bilden die Grundlage für ein Projekt, bei dem mithilfe multivariater Datenanalyse mikrobiologische Spektren systematisch dahingehend geprüft werden sollen, ob eine Unterscheidung zwischen gesundheitlich bedenklichen und unbedenklichen Kühlschmierstoffen möglich ist. Zur Erzeugung der Massenspektren wurde ein mehrstufiges Waschprotokoll mit verschiedenen Lösungsmitteln entwickelt, dass das Entfernen störender Matrixkomponenten aus dem wKSS und die Gewinnung von Molekül-Ionen erlaubt. Dieses Protokoll stellt den ersten Schritt für die Entwicklung eines datenbasierten Bewertungstools für Kühlschmierstoffe dar.

First results on the development of a cultivation-independent method for evaluating water-mixed metalworking fluids using MALDI-TOF mass spectrometry

ABSTRACT Metalworking fluids (MWFs) when mixed with water provide a favorable growth environment for microorganisms due to their composition and operating conditions. Some of these microorganisms can cause skin and respiratory diseases in exposed workers. However, it remains unclear under which conditions a microbially contaminated MWF poses a health-relevant risk to employees. So far, no method exists that allows such an assessment. This article presents initial results of a project aiming at development of approach for detecting microbial contamination in MWFs using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). The obtained mass spectra provide a basis for further investigation on the question if multivariate data analysis can be used to systematically identify specific microbiological patterns that enable discrimination between hazardous and non-hazardous MWFs. To generate high-quality mass spectra, a multi-step washing protocol based on various solvents has been developed to remove interfering matrix components and to obtain clear molecular ions. This protocol represents the first step toward developing a data-driven assessment tool for metalworking fluids.

1 Einleitung

Kühlschmierstoffe (KSS) lassen sich nach DIN 51385 unterscheiden in nichtwassermischbare und wassermischbare Kühlschmierstoffe (wKSS) [1]. Neben einer Vielzahl von Primärstoffen, die beiden Arten hinzugefügt werden, spielt nur bei letzterem das Wasser eine wichtige Rolle. Ein wasserlöslicher, meist ölfreier wKSS bildet bei der Anwendung eine Lösung mit Wasser, während ein emulgierbarer wKSS als Öl-in-Wasser-Emulsion vorliegt. Ihr hoher Wasseranteil von typischerweise 90 bis 99 % im Einsatz und die enthaltenen organischen Komponenten einiger Additivstoffe schaffen bei beiden ideale Bedingungen für mikrobielles Wachstum. Trotz des Einsatzes von Bioziden lässt sich eine mikrobielle Besiedlung in der Praxis nicht vollständig verhindern [2].

Eine solche Besiedlung kann gesundheitliche Risiken bergen, bis hin zur Entwicklung von Berufskrankheiten wie der sogenannten Metallarbeiterlunge (exogene allergische Alveolitis, EAA). Allgemein bietet das Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA) mit dem Internetportal Kühlschmierstoffe (www.dguv.de/ifa/praxishilfen/kuehlschmierstoffe/index.jsp) alle wichtigen Informationen zur Gefährdungsbeurteilung bei Tätigkeiten mit KSS an. Das Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IPA) stellt serologische Testsysteme zur Verfügung, die eine Bestimmung spezifischer Antikörper gegen typische kühl-schmierstoff-assoziierte Mikroorganismen ermöglichen [3 bis 6].

WKSS stellen nach wie vor den mengenmäßig größten Anteil der eingesetzten KSS in der metallverarbeitenden Industrie dar

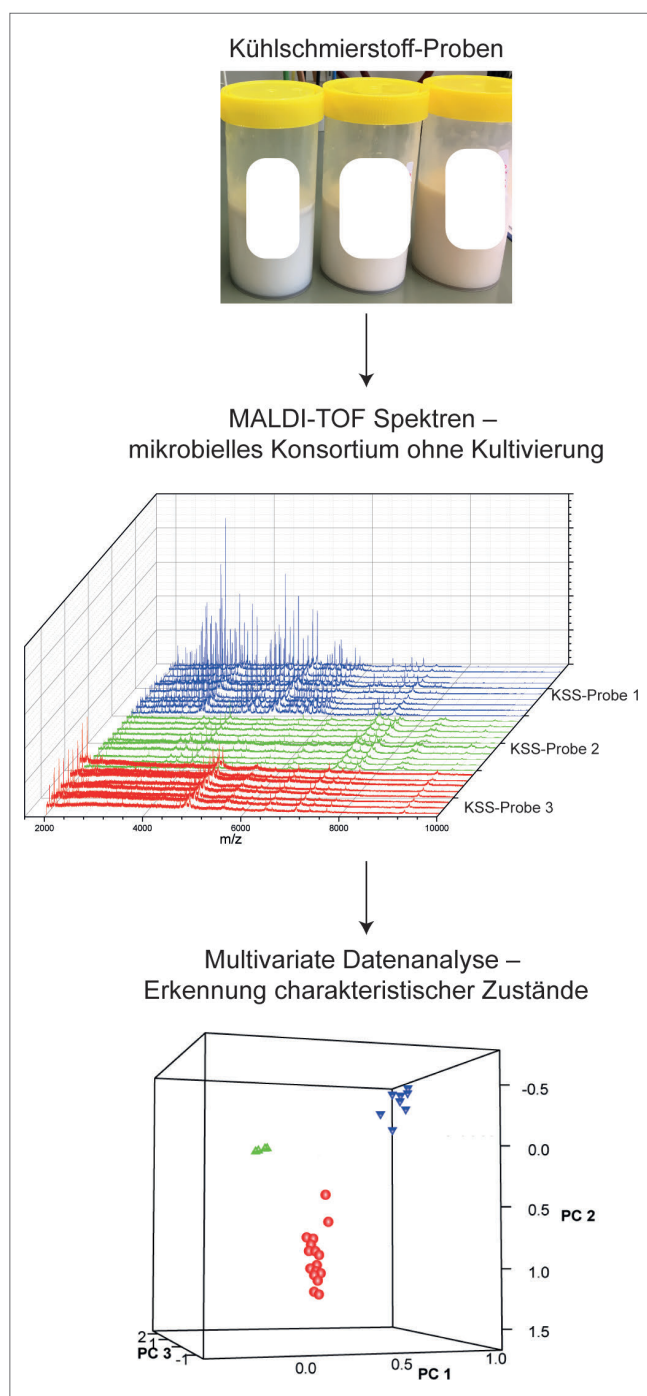


Bild 1 Prinzip der Direktanalyse mikrobieller Konsortien aus KSS mittels MALDI-TOF MS und multivariater Datenanalyse. Dargestellt sind Beispieldaten zur Illustration des Verfahrens (keine realen KSS-Messdaten).
Grafik: K. Druckenmüller

und sind insbesondere in der Zerspanung, Guss- und Serienfertigung unverzichtbar. Internationale Marktanalysen prognostizieren für den globalen Sektor der water-miscible metalworking fluids bis 2031 ein kontinuierliches Wachstum mit einer jährlichen Zuwachsrate von etwa 3,9 % [7, 8].

Parallel dazu gewinnen alternative emulgierbare wKSS auf Basis biogener Öle zunehmend an Bedeutung. Sie bieten das Potenzial, mineralölbasierte Komponenten zu reduzieren und sowohl ökologische als auch gesundheitliche Belastungen zu

verringern [9]. Eine aktuelle Studie des Vereins Deutscher Ingenieure e. V. Zentrum Ressourceneffizienz zeigt, dass die Standzeitverlängerung von wKSS durch gezielte Pflege- beziehungsweise Hygienemaßnahmen sowohl ökologisch als auch ökonomisch vorteilhaft ist [10]. Als Beispiele werden unter anderem die regelmäßige Entfernung von Fremddöl mittels Abscheider sowie eine bedarfsgerechte Biozid- beziehungsweise Hygienemaßnahme genannt [10].

Die oben genannten Quellen deuten darauf hin, dass wKSS auch zukünftig eine Rolle spielen und dabei stets länger und öfter wiederverwendet werden. Damit bleibt die mikrobiologische Überwachung dieser Systeme ein wichtiger Aspekt des Arbeitsschutzes. Vor diesem Hintergrund gewinnen neue Verfahren zur schnellen und zuverlässigen Beurteilung des mikrobiellen Zustands von KSS an Bedeutung, da sie unter anderem eine Entscheidungsgrundlage für Pflege- und Hygienemaßnahmen liefern können.

Bisher erfolgte die Bewertung mikrobieller Besiedelungen vorwiegend über kultivierungsbasierte Verfahren. Diese klassische Analytik ist ein anerkanntes Standardverfahren, um den Zustand eines Kühlschmierstoffs zu beurteilen. Die Ergebnisse aus solchen Untersuchungen hängen jedoch stark von Erfahrung und Fachwissen der Person ab, die die Untersuchungen durchführt und die Ergebnisse bewertet.

2 Ziel

Vor diesem Hintergrund verfolgt das IFA das Ziel, eine Probenaufbereitung zu entwickeln, die durch eine kultivierungsfreie Analyse von Kühlschmierstoffen mittels Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) eine Aussage zur mikrobiologischen Besiedelung des KSS ermöglicht. Dieses Vorgehen stellt den ersten Schritt auf dem Weg zu einer datenbasierten Bewertungsmethode dar, mit dem zwischen unbedenklichen und gesundheitlich relevanten KSS unterschieden werden kann (**Bild 1**).

Im ersten Arbeitsschritt wurde die Machbarkeit der Erzeugung von Massenspektren aus wKSS-Proben untersucht. Dabei stand die Frage im Vordergrund, ob sich Spektren mit einer ausreichenden Anzahl an Molekül-Ionen und einem Signal-Rausch-Verhältnis ($S/N \geq 3$) erzeugen lassen. Nur bei $S/N \geq 3$ kann man davon ausgehen, dass die detektierten Molekül-Ionen tatsächlich aus der Probe stammen und für multivariate Datenanalysen verlässlich nutzbar sind, zum Beispiel durch eine Hauptkomponentenanalyse (HKA, englisch: Principal Component Analysis, PCA).

3 Etablierung des Waschprotokolls

Zur Etablierung des Waschprotokolls wurde eine mikrobiell besiedelte wKSS-Probe verwendet ($4,63 \cdot 10^6$ KBE/ml). Nach einer ersten Zentrifugation zur Abtrennung fester Bestandteile wurden verschiedene Lösungsmittel eingesetzt: Acetonitril, Isooctan, 2-Propanol, Xylol und Aceton. Ziel war die Reduktion störender Komponenten (Öle, Additive, Salze) bei gleichzeitiger Erhaltung der mikrobiellen Proteine. Die mikroskopischen Präparate des somit erhaltenen Pellets zeigten, dass Mikroorganismen vorhanden waren. Zur Extraktion der Proteine wurden die Pellets gemäß der von der Fa. Bruker vorgegebenen Extraktionsmethode aufgearbeitet und mittels eines MALDI-TOF MS der Fa. Bruker gemessen (MALDI Biotyper smart). Die Analyseparameter ent-

sprachen der Standardeinstellung für die Analyse von Bakterien und Hefen mittels Standard MBT_AutoX-Methode. Als Matrix wurde die Alpha-Cyano-4-Hydroxymethylsäure (CHCA) mit dem Standardlösemittel 50 % Acetonitril, 2,5 % Trifluoressigsäure, 47,5 % Wasser verwendet. Die Massennachse des MALDI-TOF wurde mit dem Bakterienstandard der Fa. Bruker kalibriert.

4 Erste Ergebnisse

Die Untersuchungen zeigten, dass die Waschschritte mit Isooctan und anschließend 2-Propanol oder Acetonitril die qualitativ besten Massenspektren lieferten, reich an Peaks mit einem Signal zu Rauschverhältnis (S/N) ≥ 3 . Auf Grundlage dieser initialen Ergebnisse soll für die weitere Anwendung zur Untersuchung von wKSS-Proben das folgende Waschprotokoll zur Probenvorbereitung verwendet werden:

1. 5 ml wKSS in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführen,
2. mit 5 ml Isooctan circa 4 min im Horizontalschüttler schütteln,
3. 30 min bei 5 000 rpm und bei 4 °C zentrifugieren,
4. den organischen Überstand (Isooctan-Phase) vorsichtig abpipettieren,
5. Zellpellet in 1,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendieren, in 2 ml Reaktionsgefäß überführen,
6. 2 min bei 13 000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren,
7. Überstand abpipettieren,
8. Zellpellet in 1,5 ml 2-Propanol oder Acetonitril resuspendieren,
9. Zentrifugieren wie Schritt 5,
10. Schritte 6 bis 8 zweimal wiederholen (insgesamt dreimal waschen). Entfernung der Feststoffe: Das Zellpellet trennt sich von selbst von den anorganischen und organischen Festphasen, die dann entfernt werden können,
11. in 1 ml 75%igem Ethanol resuspendieren,
12. Zentrifugieren wie Schritt 5,
13. Überstand abpipettieren,
14. Schritte 11 bis 13 wiederholen,
15. Zellpellet 5 bis 10 min bei Raumtemperatur lufttrocknen, bis das Restethanol vollständig entfernt ist.

Der Isooctan-Waschschritt wird initial durchgeführt, da das unpolare Lösungsmittel nicht zur Resuspendierung eines Zellpellets in späteren wässrigen Schritten geeignet ist. Durch die Extraktion der hydrophoben Ölphase mit Isooctan wird auch bei emulgierbaren wKSS eine Abtrennung der Zellen von der öligen Matrix gewährleistet.

Die Probenvorbereitung nach diesem Waschprotokoll ermöglicht die Aufnahme von positiv geladenen Molekül-Ionen mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z -Verhältnis) zwischen 3 500 und 18 000 m/z (Bild 2). Im Mittel liegen 80 Peaks mit einem $S/N \geq 3$ vor. Diese Peaks sind als echte Signale zu werten und eignen sich zur Beurteilung, ob es sich um Signale aus dem mikrobiellen Konsortium des Kühlschmierstoffs handelt.

5 Diskussion

Die Probenaufbereitung erwies sich als entscheidend für die Qualität der MALDI-Spektren. Während unbehandelte Proben nur Hintergrundrauschen zeigten, konnten nach dem dreifachen Waschen mit 2-Propanol oder Acetonitril signifikante Molekül-Ionen

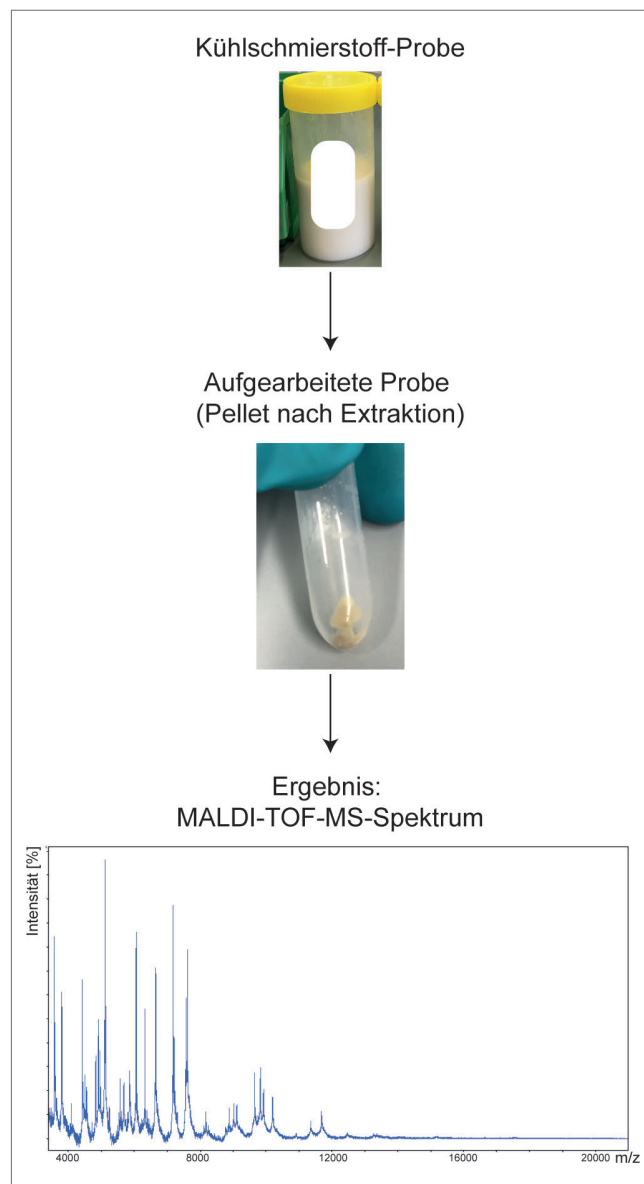


Bild 2 Probenaufbereitung und Analyseschritte zur Erzeugung eines MALDI-TOF MS aus wKSS. Dargestellt sind (von oben nach unten): eine unbehandelte Kühlschmierstoff-Probe, das nach dem Waschprotokoll gewonnene Pellet und das daraus erzeugte Massenspektrum mit Peaks im Bereich von ca. 3500 bis 20000 m/z (reale Messdaten).

Grafik: K. Druckenmüller

nen detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass durch die Anwendung des Waschprotokolls störende Matrixbestandteile effektiv entfernt wurden und damit der Nachweis mikrobieller Proteine möglich war.

In nächsten Versuchen soll geprüft werden, ob zum Beispiel eine Veränderung der Laserintensität das S/N -Verhältnis verbessert oder damit weitere Molekül-Ionen detektiert werden können. Die CHCA-Matrix mit dem Standardlösemittel wird verwendet, da sie besonders geeignet ist, komplexe unreine Proben zu analysieren [11].

Ein weiterer wichtiger Punkt für die erfolgreiche Probenanalyse ist das Abrastern des Probenspots und die Spot-zu-Spot-Reproduzierbarkeit [12, 13]. Da es sich bei wKSS um Mischproben mit vielen verschiedenen Mikroorganismen handelt, muss noch erarbeitet werden, wie der Spot abgerastert und wie viele Spots ge-

messen werden müssen, um ein aussagekräftiges Massenspektrum zu erhalten, beziehungsweise ein Spektrum, das die jeweilige mikrobielle Zusammensetzung des wKSS am wahrheitsgetreuesten abbildet.

6 Zusammenfassung

WKSS bieten aufgrund ihrer Zusammensetzung ein günstiges Wachstumsmilieu für Mikroorganismen. Bei ihrer Handhabung in der Metallbearbeitung können mikrobiell belastete Aerosole freigesetzt werden. Ihre mikrobiologische Besiedelung stellt sowohl ein technisches Risiko für die damit betriebene Maschine als auch ein gesundheitliches Risiko für das an dieser Maschine beschäftigte Personal dar. Ziel des vorgestellten Projektes ist die Entwicklung eines kultivierungsunabhängigen Bewertungsverfahrens zur Beurteilung mikrobiologischer Veränderungen im KSS. Die Grundlage dafür bildet eine Kombination aus MALDI-TOF MS und multivariater Datenanalyse.

Im ersten Projektabschnitt konnte die Machbarkeit der direkten MALDI-TOF-Analyse nachgewiesen werden. Durch die Entwicklung eines mehrstufigen Waschprotokolls wurden Massenspektren mit einer ausreichenden Anzahl charakteristischer Peaks und einem guten Signal-Rausch-Verhältnis $S/N \geq 3$ gemessen. Dies ist der entscheidende methodische Schritt, um eine Datengrundlage für die Anwendung multivariater Datenanalysen zu legen.

7 Ausblick

Im nächsten Projektabschnitt soll die Alterung eines in der Maschine eingesetzten wKSS über die Standzeit hinweg begleitet werden. Dabei soll geprüft werden, ob sich mikrobiologische oder allgemeine Veränderungen im wKSS anhand der Spektrenmuster erkennen lassen und diese Veränderungen erfasst werden können. Hierzu soll eine multivariate Datenanalyse angewendet werden, mit der Muster und Trends in den Massenspektren identifiziert werden können. Sofern diese Auswertung erfolgreich ist, wird der Ansatz im weiteren Verlauf an KSS-Proben aus Arbeitsplätzen mit Verdacht auf arbeitsbedingte Erkrankungen sowie an Vergleichsproben aus unauffälligen Arbeitsplätzen erprobt. Durch den di-

rekten Vergleich der Ergebnisse soll geprüft werden, ob sich über die Massenspektren charakteristische Muster ableiten lassen, die eine Unterscheidung zwischen unbedenklichen und potenziell gesundheitsschädigenden KSS ermöglichen.

LITERATUR

- [1] Bearbeitungsmedien für die Umformung und Zerspanung von Werkstoffen Begriffe. DIN 51385. Hrsg.: Deutsches Institut für Normung, 2013.
- [2] DGUV Information 209-051: Keimbelastung wassergemischter Kühlschmierstoffe. Hrsg.: Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung, Berlin 2019.
- [3] Kespohl, S. et al.: Hypersensitivity pneumonitis due to metal working fluids: Detection of specific IgG antibodies to microbial antigens. *Respir Physiol Neurobiol* (2023) 315, p. 104107.
- [4] Kespohl, S. et al.: Microbial contamination in water-based metalworking fluid as trigger for occupational hypersensitivity pneumonitis development of specific IgG tools for a suspected clinical case. *Allergol Select* (2020) 4, p. 110-117.
- [5] Kespohl, S. et al.: Mikrobiell kontaminierte Kühlschmierstoffe Update zu Auslösern und Diagnostik der Maschinenerkrankungen. *Gefahrstoffe Reinhalt. Luft* 85 (2025) Nr. 9-10, S. 239-244.
- [6] Kühlschmierstoffe. Hrsg.: Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. <https://www.dguv.de/ifa/praxishilfen/kuelschmierstoffe/index.jsp>
- [7] Future Market, I. Water-miscible Metalworking Oil Market. *Future Market Insights*. <https://www.futuremarketinsights.com/reports/water-miscible-metalworking-oil-market>
- [8] Transparency Market, R. Metalworking Fluids Market. *Transparency Market Research*. <https://www.transparencymarketresearch.com/metalworking-fluids-market.html>
- [9] Elsheikh, A. et al.: A review on sustainable machining: Technological advancements, health and safety considerations, and related environmental impacts. *Results in Engineering* (2024) 24, p. 103042.
- [10] Ressourceneffizienz, V. Z., Standzeitverlängerung von Kühlschmierstoffen Potenziale, Maßnahmen und Praxisbeispiele. In: VDI ZRE-Studie. Hrsg.: VDI Zentrum Ressourceneffizienz, Berlin 2025.
- [11] Wang, Z. P. et al.: Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectroscopy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12 (1998) 8, p. 456-464.
- [12] Toh-Boyo, G. M.; Wulff, S. S.; Basile, F.: Comparison of sample preparation methods and evaluation of intra- and intersample reproducibility in bacteria MALDI-MS profiling. *Anal Chem* 84 (2012) 22, p. 9971-80.
- [13] Knochenmuss, R. et al.: The Matrix Suppression Effect and Ionization Mechanisms in Matrix-assisted Laser Desorption Ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1996) 10, p. 871-877.

DANKSAGUNG

Für die Laborunterstützung danken wir Meltem Eryilmaz-Hessler, Carina Fink und Melanie Schumacher. Für sachliche Unterstützung danken wir Doerthe Range.

Nadja Karthäuser,

Dr. rer. nat. Annette Kolk,

Dr. rer. nat. Katharina Druckenmüller

Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA), Sankt Augustin.