

Freie Universität Berlin, Institut für Tier- u. Umwelthygiene,
Robert-von-Ostertag-Str. 7-13, 14163 Berlin

Bundesanstalt für Landwirtschaft
und Ernährung (BLE)
Referat 314
Deichmanns Aue 29
53179 Bonn

gf. Direktor
Univ.-Professor Dr. Uwe Rösler
Robert-von-Ostertag-Str. 7-13
14163 Berlin

Telefon +49 30 838 51845
Fax +49 30 838 4 51863
E-Mail tierhygiene@vetmed.fu-berlin.de
Internet www.vetmed.fu-berlin.de

Bearbeiter/in ur

31. August 2019

Abschlussbericht

zum Entscheidungshilfe-Verbundforschungsvorhaben
„Auswirkungen von Glyphosat auf aus Tierhaltungen stammende Bakterien“
(Akronym: Glypho-Bak)

Ausführende Stelle: Institut für Tier- und Umwelthygiene, Freie Universität Berlin
Förderkennzeichen: 2815HS015
Vorhabensbezeichnung: Teilvorhaben 1
Laufzeit des Vorhabens: 01.01.2016 bis 30.06.2019
Berichtszeitraum: 01.01.2016 bis 30.06.2019
Projektpartner im Forschungsverbund: <ul style="list-style-type: none"> – Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Tier- und Umwelthygiene (FU-ITU) – Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Physiologisches Institut (TiHo-PI) – Technische Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Lehrstuhl für Tierernährung (TUM-LT) – Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Institut für Biochemie (UL-IB)

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Das übergeordnete Ziel des gesamten Verbundforschungsvorhabens bestand darin, belastbare Erkenntnisse zu erlangen ob und wenn ja in welcher Weise der Einsatz von Glyphosat eine Beeinflussung des mikrobiellen Ökosystems in der Nutztierhaltung nach sich zieht.

Dabei sollte das Hauptaugenmerk liegen auf:

- einer möglichen Resistenzinduktion gegen Glyphosat
- dem Einfluss des Herbizids und seiner Begleitstoffe auf die Anreicherung tier- und humanmedizinisch relevanter Keime (Zoonose-Erreger) wie Enterobacteriaceen (Salmonellen, *E. coli*), sowie auch auf wichtige antibiotikaresistente Erreger bei Schweinen und Rindern
- einer möglichen Chelatbildung durch Glyphosat und die daraus folgende Beeinträchtigung der Resorptionsvorgänge
- dem Einfluss von Glyphosat auf die bakterielle Proteinsynthese bei Rindern

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Ziel des Forschungsvorhabens bestand darin, belastbare Erkenntnisse zur möglichen Beeinflussung bakterieller Biozöten bei Nutztieren durch Glyphosat zu erlangen.

Dabei wurde zunächst in **Task 1.1** durch das ITU gemeinsam mit UL-IB eine umfassende Literaturrecherche zu den Grundlagen und zum Auftreten von mikrobiellen Resistenzen gegen Glyphosat sowie zur möglichen Co-Selektion von Antibiotikaresistenzen und zu einer möglichen Anreicherung (Verschiebungen im enteralen Mikrobiom) von für Mensch und Tier pathogenen Erregern im Zusammenhang mit einem Glyphosateinsatz durchgeführt. Diese Literaturrecherche beschränkte sich nicht allein auf den Shikimate Pathway, sondern zog auch eine globalere Betrachtungsweise heran. Dabei wurde der Einfluss glyphosathaltiger Herbizide auf verschiedene (tier-) pathogener Erreger und deren Lebensgemeinschaften insgesamt betrachtet.

Im Rahmen von **Task 2** wurde durch das ITU ein umfangreiches Screening von Tier- und Umweltisolaten auf eine vorliegende Glyphosat-Resistenz mittels MHK-Bestimmung gegenüber Glyphosat und gegenüber der Kombination von Glyphosat mit Netzmitteln durchgeführt (**Task 2.1**). Im Vordergrund standen dabei aktuelle, bakterielle Isolate (*E. coli*, ESBL-bildende *E. coli* und Salmonellen) aus verschiedenen Tierhaltungen. Insgesamt sollten so 200 Isolate auf ihre MHK gegenüber Glyphosat untersucht werden. Basierend auf diesen Daten wurde dann der epidemiologische Cutoff-Wert von *E. coli* und Salmonellen gegenüber Glyphosat und glyphosathaltigen Herbiziden (z.B. Roundup®) ermittelt. Im Rahmen von **Task 2.2** sollten zudem auch Umgebungsproben aus der Stallumgebung sowie Proben vor und nach Gülleausbringung sowie Glyphosatbehandlung genommen und untersucht werden.

In **Task 3** wurde untersucht, ob Glyphosat und/oder die darin ggf. enthaltenen Beistoffe (z.B. polyethoxyliertes Tallowamin POEA-15) eine Resistenzinduktion in Bakterien hervorrufen können. Dies erfolgte durch das ITU mittels mehrfacher (bis zu

10fache) Passagen ausgewählter Isolate der vorstehend genannten Keime in Kulturmedium mit subletalen Glyphosat-Konzentrationen in Kombination mit einer nachfolgenden MHK-Bestimmung und abschließender Stabilitätsprüfung. Im Rahmen dieser laborexperimentellen Resistenzinduktionsversuche wurden in **Task 3.1** vergleichende Ansätze mit dem komplexen Wirkstoffgemisch (bzw. dem zugelassenen Pflanzenschutzmittel Roundup®) und mit Glyphosat durchgeführt. Bei festgestellter Resistenzinduktion erfolgte anschließend jeweils eine Kontrolle der Stabilität dieser herabgesetzten Empfindlichkeit durch mehrfache (bis zu 10fache) Passagen in Abwesenheit von Glyphosat bzw. dem Herbizid. Im Anschluss an die Induktions- und Stabilitäts-Passagen erfolgte jeweils eine Bestimmung der MHK gegenüber Glyphosat/dem Herbizid.

Die während der Fermenterversuche (Task 5) und experimentellen Infektionen beim Schwein (Task 6) dotierten und gegenüber verschiedenen Glyphosat-Konzentrationen exponierten definierten Isolate von *E. coli*, ESBL-bildende *E. coli* und *S. Typhimurium* sollten in **Task 3.2** ebenfalls auf eine stattgefundene bzw. vorliegende MHK-Erhöhung hin untersucht werden. Zudem wurden die im Rahmen dieses Projektteils untersuchten Stämme parallel einem Antibiotikaresistenzscreening (MHK-Bestimmung, Resistenzgene) unterzogen, um Veränderungen im Sinne einer Co-Induktion von Antibiotika (AB)-Resistenzen aufzudecken (**Task 3.3**).

Im Rahmen von **Task 4** wurden durch FU-ITU ausgewählte Isolate aus Task 2 (Screening von Tier- und Umweltisolaten) und 3 (experimentelle Resistenzinduktion) weiterführend molekularbiologisch untersucht. Dabei sollte in **Task 4.1** das *aroA* Gen auf den EPSPS-Typ untersucht werden und in **Task 4.2** weitere Untersuchungen (Ganzgenom-Sequenzierung, Proteomics) angeschlossen werden. In **Task 4.3** könnte bei konkreten Fragestellungen Klonierungs- und Transformationsexperimente oder ein gezieltes *knock-out* identifizierter Gene angeschlossen werden.

In **Task 5** sollten durch TiHo-PI und UL-IB und FU-ITU in Fermentationsversuchen mögliche qualitative und quantitative Veränderungen der Biozönose in Folge einer Glyphosatzugabe untersucht werden. Hierzu sollten wenn möglich die in Task 3 resistenzinduzierten Stämme von *E. coli* und *Salmonella* sp. verwendet werden. Die Aufgabe des ITU im Rahmen des **Task 5.3** bestand in Beschreibung der quantitativen und qualitativen Effekte (Anreicherung, Resistenzbildung) von Glyphosat auf definierte pathogene Erreger.

Im **Task 6.1** und **6.2** kamen im ITU bereits gut etablierte Infektions- und Kolonisationsmodelle zur Abklärung Glyphosat-bedingter Effekte auf die Mikrobiota im Tier zum Einsatz. Folgende porcine Kolonisierungs-/Infektionsmodelle wurden dabei vom ITU hinsichtlich des Effekts von Glyphosat beurteilt: ESBL-negative *S. Typhimurium* (**Task 6.1.1**) und ESBL-bildende *E. coli* (**Task 6.1.2**). Hierbei sollten zusätzlich zu Glyphosat-sensiblen Isolaten auch Glyphosat-resistente Isolate, die vorzugsweise in den Versuchen zur Resistenzinduktion in Task 3 generiert wurden, eingesetzt werden.

Im Rahmen des **Task 7.3** sollten vom ITU und UL-IB das mikrobielle Metabolom, Metaproteom und eine Analyse von Stoffflüssen mittels stabiler Isotopen-markierter Substrate aus Darmproben zu den Endpunkten der Tierversuche untersucht werden. Um eine Übersicht der mikrobiellen Gemeinschaft zu erhalten, sollten weiterhin aus intestinalen Schweineproben ein 16S rRNA Profil und eine Metagenomsequenzierung erstellt werden.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Glyphosat wird seit rund 40 Jahren im landwirtschaftlichen Sektor als Herbizid eingesetzt [1]. Seine Wirksamkeit ist auf den Shikimate-Pathway fokussiert, welcher 1956 als Biosyntheseweg für aromatische Aminosäuren (Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan) beschrieben wurde [2]. Mittels Inhibierung der EPSP-Synthase kommt es zu einem Abbruch in der Synthese dieser essentiellen Aminosäuren was sich zunächst als eine Schwächung des Wachstums ausprägt und im weiteren Verlauf letale Folgen nach sich zieht. Da dieser Stoffwechselweg ausschließlich in Pflanzen und Mikroorganismen gefunden wurde stellt er einen idealen Ausgangspunkt für den Herbizideinsatz dar – ohne zu einer gesundheitlichen Belastung von höheren Lebewesen (Tiere, Menschen) zu führen [3].

Die Tatsache, dass auch Bakterien diesen Stoffwechselweg zur Synthese aromatischer Verbindungen verwenden, wirft die Frage auf, ob und in wieweit sich ein weit verbreiteter Einsatz des Pflanzenschutzmittels Glyphosat auch auf die bakterielle Umwelt-Flora auswirkt. Da insbesondere Mikroorganismen durch ihre kurzen Generationszeiten und genetische Flexibilität dazu prädestiniert sind, sich innerhalb kürzester Zeit an neue Umgebungszusammensetzungen anzupassen, zieht dieses unweigerlich die Frage nach dem Auftreten von etwaigen Glyphosat-Resistenzen nach sich. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass bisher 3 Klassen von EPSP-Synthasen (kodiert vom Gen *aroA*) beschrieben wurden [4]. Synthasen vom Typ I kommen sowohl in Pflanzen als auch in einem Großteil von Bakterien vor (so z.B. auch bei *Escherichia coli* oder *Salmonella Typhimurium*) [5]. Organismen mit einer EPSP-Synthase vom Typ I reagieren natürlicherweise sensitiv auf die Anwesenheit von Glyphosat. Wie vielfach auch in anderen Zusammenhängen beschrieben, besteht auch im Hinblick auf den Einsatz von Glyphosat die Annahme, dass ein längerfristiger Einsatz glyphosathaltiger Pflanzenschutzmittel eine Anpassung (adaptive Mutation) der Bakterien auslöst [6, 7].

So kann eine Glyphosat-Unempfindlichkeit mittels Veränderung der Typ I EPSP-Synthase z.B. eine Folge der natürlichen Selektion, der gerichteten Evolution oder einer ortsspezifischen Mutation sein [5]. Eine Resistenzinduktion durch das gezielte Einfügen von Punktmutationen wurde vielfach in der Literatur beschrieben - z.B. gezielte Modifikation von *E. coli* oder *Salmonella* Typ I EPSPS [5, 8, 9]. Solch ein gentechnischer Ansatz spielt auch im Hinblick auf die Herstellung herbizidresistenter Nutzpflanzen eine Rolle. Darüber hinaus konnte bereits 1983 mittels chemischer Substanzen wie Ethylmethansulfonat (mutagen) eine *Salmonella Typhimurium* Mutante erzeugt werden, welche sich durch ihre gesteigerte Glyphosat-Toleranz auszeichnete [10]. Nur wenige Publikationen sind hingegen zu finden, in denen *aroA*-Gene bakterieller Isolate aus Glyphosat-kontaminierten Umweltproben untersucht worden sind - und in denen dann eine erhöhte Unempfindlichkeit auf das Herbizid nachgewiesen wurde. Hierbei handelte es sich um ein in China isoliertes *Enterobacter*-Isolat, um DNA-Fragmente nicht-kultivierter Bodenbakterien [4, 7, 11] oder aber um *Pseudomonas*- bzw. *Halomonas*- Isolate die für das Vorhandensein von EPSPS des Typs II bekannt sind [7]. Diese EPSPS vom Typ II kommen natürlicherweise ausschließlich in Bakterien vor und wurden bisher z.B. in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Agrobacterium sp.* CP4, *Bacillus subtilis* oder versch. *Pseudomonaden* gefunden. Dieser Typ weist im Vergleich zu EPSP Typ I eine deutlich

gesteigerte Toleranz gegenüber hohen Glyphosat-Konzentrationen auf [5, 7]. Enzyme vom Typ II stellen auch häufig die Grundlage für die Herstellung glyphosatresistenter Nutzpflanzen (z.B. Tabak) dar. Hierbei werden bakterielle Gene mittels Agrobakterium-vermittelter Transformation in die Pflanzen eingeschleust [7]. Des Weiteren wurde in *Pseudomonas putida* eine EPSPS des Typs III beschrieben [4]. Auch dieses Enzym vermittelt eine natürliche Glyphosatresistenz. Verglichen mit den Typen I und II liegt die Sequenz-Homologie auf genomischer Ebene allerdings bei < 30 % [12]. Ebenfalls beschrieben wurde eine Glyphosat-N-acetyltransferase (GAT), welche eine gesteigerte Glyphosat-Toleranz in *E. coli*, in Tabak und in Mais hervorruft [13] und auch die Oxidation von Glyphosat (Spaltung der Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung innerhalb des Glyphosats) trägt zu einer herabgesetzten Phytotoxizität bei [14].

Darüber hinaus rückte der der Shikimate-Pathway in den vergangenen Jahren in den Fokus der humanmedizinischen Infektionsforschung. So gibt es insbesondere im Bereich der Tuberkuloseforschung (*M. tuberculosis*), aber auch bei Malaria (*Plasmodium falciparum*), *Helicobacter pylori*-Infektionen oder bei Pilzinfektionen (*Cryptococcus neoformans*) zunehmend Forschungsansätze die auf den Shikimate-Pathway als Ansatzpunkt möglicher antibakterieller Behandlungsstrategien abzielen [15-19].

Hier ist auch der Einsatz von *aroA*-Mutanten bei der Impfstoffentwicklung zu erwähnen. Insbesondere bei der Generierung von Lebend-Impfstoffen wird vielfach auf *aroA*-Deletionsmutanten zurückgegriffen. Beispiele hierfür wären Vakzinen gegen Colibacillose, Typhus, Shigellose (*Shigella flexneri*), Atemwegserkrankungen beim Schwein (*B. bronchoseptica*), *Salmonella enterica* (Geflügel und Schwein), u.v.a.. Da der Verlust des *aroA*-Gens zu einem Bedarf an aromatischen Aminosäuren (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, p-Aminobenzoat (PABA), 2,3-Dihydroxybenzoat) führt, das PABA aber beispielsweise im Gewebe von Wirbeltieren nicht vorkommt, führt dieser Mangel zu einer Schwächung des in-vivo Wachstums und damit auch zu einer stark herabgesetzten Virulenz des Bakteriums.

Diese hier nur im Ansatz vorgestellten Forschungsansätze der vergangenen Jahre machen zum einen deutlich, welche weitverzweigten Konsequenzen ein Eingriff in den grundlegenden Shikimate-Pathway erzeugen kann. Daraus ergeben sich zahlreiche, derzeit leider noch nicht abschätzbare Effekte auf Umweltkeime, als auch auf Tier- und Menschenpathogene, die mit dem Einsatz glyphosathaltiger Pflanzenschutzmittel einhergehen können.

Die Tatsache, dass die Glyphosat-toleranten EPSP-Synthasen vom Typ II u.a. in pathogenen Keimen wie z.B. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* oder verschiedenen Pseudomonaden vorkommen [7], lässt vermuten, dass der Einsatz glyphosathaltiger Pflanzenschutzmittel - über den Mechanismus der Co-Selektion - zu einer Anreicherung/ Ausbreitung (tier-)pathogener- und/oder antibiotikaresistenter Keime führen könnte. Zudem wird spekuliert, dass adaptiv erworbene EPSPS-Mutationen oder andere Mutationen zoonotisch relevanter Erreger, welche zu einer gesteigerten Glyphosatresistenz führen, ebenfalls zu einer Anreicherung/Ausbreitung dieser Keime beitragen könnten. Derlei Vermutungen, die eine Anreicherung pathogener Erreger unter Glyphosateinfluss in der Darmflora von Geflügel und Rindern andeuten, wurden bereits von Shehata et al., 2013 [20] und Krüger et al., 2013 [21] geäußert. Allerdings basieren diese Hypothesen lediglich auf MHK-Bestimmungen

verschiedener Bakterien mit diskussionswürdigem experimentellem und statistischem Ansatz und nicht auf experimentellen in vitro-Untersuchungen und in-vivo Experimenten im lebenden Tier oder in der Umwelt.

Darüber hinaus wurde vom Institut für Physiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover (vorgestellt von Prof. Breves im Rahmen des Symposiums „Gesundheitliche Bewertung von glyphosathaltigen Pflanzenschutzmitteln“ anlässlich der „Grünen Woche“, Berlin, Januar 2014) in einer *in-vitro* Studie mittels eines semi-kontinuierlichen Inkubationsmodells zur Simulation des Vormagenstoffwechsels der Einfluss eines glyphosathaltigen Pflanzenschutzmittels auf die ruminale Fermentation Stoffwechselprozesse und die mikrobielle Gemeinschaft untersucht. Eine zentrale Fragestellung dieses Vorhabens war, ob *Clostridium sporogenes* als Surrogat für *Clostridium botulinum* in Anwesenheit von Glyphosat im Vormageninhalt angereichert wird. Die dargestellten Untersuchungsergebnisse legen nahe, dass Glyphosat keinen negativen Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft im Pansen ausübt und dass die Eliminationskinetik von *Clostridium sporogenes* durch Glyphosat nicht beeinflusst wird. Allerdings lassen auch diese Untersuchungen eine Vielzahl von Fragen unbeantwortet. So erlaubt die dort angewandte Untersuchung der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft verwendete Untersuchungsmethode (SSCP – single strand conformation polymorphism) ausschließlich qualitative Aussagen. Im Hinblick auf die Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft innerhalb des Intestinaltraktes oder der Umwelt sind jedoch nicht nur Veränderungen der Spezieszusammensetzung sondern auch die mengenmäßige Verteilung der Keime und insbesondere deren Aktivitäten von großem Interesse.

Die Mikrobiomforschung der vergangenen 10 Jahre ist durch die Techniken der kulturunabhängigen Bestimmung der Phylogenie mittels gezielter (16SrRNA-Gene) oder globaler Sequenzierung (Metagenomik; [22]) stark befördert worden. Mit diesen Techniken konnten Zusammenhänge zwischen der Zusammensetzung des Mikrobioms und verschiedenen Phenotypen und Krankheitsbildern aufgeklärt werden [23, 24]. Die Korrelation der Abundanz von einzelnen Bakteriengruppen mit humanen Krankheitsbildern wie Adipositas oder entzündlichen Darmerkrankungen deutet auf spezifische Funktionen dieser Bakterien hin. Diese können mit den aktuell entwickelten Methoden der Metaproteomik [25] und Metabolomics [26] nun auch gezielt untersucht werden, so dass aktuell nach der Erfassung von phylogenetischen Assoziationen nun funktionale Zusammenhänge in den Vordergrund rücken. Darüber hinaus haben die Metagenomdaten zu der Hypothese geführt, dass die Wirte durch Absonderung von Antikörpern und bestimmten Metaboliten eine für sie günstige Mikrobiota fördern und dass eine solche intakte Symbiose durch pure Verdrängung die Besiedlung mit ungünstigen Bakterien verhindere [27]. Eine ebenfalls generelle Hypothese lautet, dass eine höhere Diversität einer gesünderen Darmflora entspreche und weniger häufig eine Dysbiose eintreten lasse [27].

Bislang sind zwar viele Daten zum humanen Mikrobiom bekannt und in Datenbanken abgelegt, aber es existieren kaum Metagenomdaten zu Nutztieren. Das erschwert in diesem konkreten Fall die Suche nach vorhandenen EPSP-Synthasegenen. Es mehren sich die Anzeichen, dass einige toxikologische Effekte von Xenobiotika durch ein Wechselspiel von Wirt und Mikrobiota verursacht werden [28]. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, bei der Untersuchung von Effekten von Xenobiotika die Wirkungen auf die Zusammensetzung und die Funktionalität der Mikrobiota einzubeziehen, wie auch von Autoren des BfR gefordert wurde [29].

2. Material und Methoden

In **Task 1.1** wurde eine umfassende Literaturrecherche zu den Grundlagen und zum Auftreten von mikrobiellen Resistenzen gegen Glyphosat sowie zur möglichen Co-Selektion von Antibiotikaresistenzen und zu einer möglichen Anreicherung (Verschiebungen im enteralen Mikrobiom) von für Mensch und Tier pathogenen Erregern im Zusammenhang mit einem Glyphosateinsatz durchgeführt.

Im Rahmen von **Task 2** wurde durch das ITU ein umfangreiches Screening von Tier- und Umweltisolaten auf eine vorliegende Erhöhung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) gegenüber Glyphosat mittels MHK-Bestimmung gegenüber Glyphosat und gegenüber der Kombination von Glyphosat mit Netzmitteln (in der Formulierung Roudup® LB Plus) im Mikrodilutionsverfahren durchgeführt. Dafür wurden Verdünnungsreihen von max. 160 mg/ml bis minimal 1,25 mg/ml hergestellt. Die Minimale Hemmkonzentration entspricht dabei der geringsten Konzentration, die nach 16-24 h Inkubationszeit ein sichtbares Wachstum verhindert. Dabei wurde die MHK neben Glyphosat als reines Isopropylaminsalz und in Roundup® LB Plus auch in 2 verschiedenen Kulturmedien (Müller Hinton (MH) I und MH II) bestimmt.

Tabelle 1 : Übersicht der untersuchten E. coli-Isolate

Herkunft	Sammlungszeitraum Art der Isolate	Anzahl Isolate	Tierarten	Antibiotika- Resistenzstatus
ECOR- Sammlung	bis 1983 Klinisch und Kommensale	65	diverse	non-ESBL
BfR	2014 bis heute Kommensale Isolate (ZoMo)	90	Geflügel, Schwein, Rind	ESBL und non- ESBL
BVL	2014 bis heute Klinische Isolate	83	Geflügel, Schwein, Rind	ESBL und non- ESBL

Um die Repräsentativität und auch die Aussagekraft dieser Untersuchungen zu erhöhen wurden nicht nur, wie ursprünglich geplant, Isolate aus Schweinehaltungen untersucht, sondern zu gleichen Teilen auch Isolate vom Geflügel und z.T. auch vom Rind. Zudem erfolgten diese Untersuchungen mit aktuellen klinischen und kommensalen Isolaten der amtlichen Stammsammlungen des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) und des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). Vergleichend hierzu wurden auch historische, repräsentative Isolate für Salmonellen (vor 1990, BfR) und für *E. coli* (ECOR-Sammlung vor 1970) untersucht, um die Frage zu beantworten, ob es nach Zulassung von Glyphosat in Deutschland zu einer Erhöhung der MHK gekommen ist. Dieses

Vorgehen erschien insgesamt zielführender, als eine Untersuchung von Isolaten aus der Stallumgebung sowie vor und nach einem Glyphosat-Feldeinsatz (Task 2.2). Es wurden somit insgesamt wesentlich mehr als die ursprünglich geplanten 200 Isolate auf ihre MHK gegenüber Glyphosat und glyphosathaltigen Herbiziden untersucht. Insgesamt wurden 238 repräsentative, kommensale und klinische *E. coli*-Isolate (Tabelle 1) und 225 *Salmonella spp.*-Isolate (Tabelle 2) untersucht.

Tabelle 2 : Übersicht der untersuchten *Salmonella*-Isolate

Herkunft	Sammlungszeitraum	Anzahl Isolate	Tierarten	Serovare	Antibiotika-Resistenzstatus
BfR	2014 bis 2018 Zoonosemonitoring	120	Schwein, Geflügel	Typhimurium, Enteritidis, Infantis	48 mit verschiedenen AB- Resistenzen, 45 sensitive Proben
BfR	vor 1990 Zoonosenmonitoring	105	Schwein, Geflügel	Typhimurium, Enteritidis, Infantis	unbekannt

Um in **Task 3** eine Aussage treffen zu können, ob Glyphosat und/oder die in den Herbizid-Gemischen ggf. enthaltenen Beistoffe in Form der Formulierung Roundup® LB Plus eine Resistenzinduktion oder eine MHK-Erhöhung bei Bakterien hervorrufen können, wurden 2 verschiedene Resistenzinduktionsversuche durchgeführt. Von der Untersuchung einzelner Hilfs- und Beistoffe musste dabei leider abgesehen werden, da diese von den Firmen leider nicht deklariert und mitgeteilt werden und das BfR diese auch nicht offenlegen durfte.

Bei den Versuchen wurden ausgewählte Salmonellen- und *E. coli*-Isolate in 2 verschiedenen Versuchsansätzen untersucht. Dabei wurde zum einen ein klassisches Resistenzinduktionsprotokoll mit kleinen Volumina und mehreren Replikaten und zum anderen eine leicht abgewandelte Form im Rahmen eines Screenings - ähnlich der Protokolle zur Induktion von Biozidresistenzen - mit größerem Volumina und einer erhöhten Isolate-Anzahl anstatt den Replikaten genutzt. Beginnend mit subletalen Glyphosat/Roundup-Konzentrationen (entsprechend 1/4 bis 1/2 MHK-Konzentration), die sich im Verlauf des Versuches steigern und abschließender Stabilitätsprüfung, wurde versucht eine Resistenz zu induzieren. Das Vorliegen einer auf diese Weise indizierten Glyphosat-Resistenz wurde mit einer nachfolgenden MHK-Bestimmung überprüft. Die Versuche erfolgten sowohl mit dem komplexen Wirkstoffgemisch Roundup® LB Plus als auch mit Glyphosat als Reinsubstanz in Salzform.

Die Isolate mit einer stabil indizierten MHK-Erhöhung gegenüber Glyphosat wurden im Verlauf des **Task 4** nun näher charakterisiert und sequenziert um eine eventuelle genetische Ursache für die erhöhten MHK-Werte zu identifizieren. Dabei wurde der Task 4.1 (Analyse des *aroA*-Gens mittels PCR) übersprungen und direkt eine Ganzgenom-Sequenzierung aller Isolate mit einer verringerten Glyphosat-Sensitivität (Task 4.2) durchgeführt.

Anschließend wurden ausgewählte interessante Isolate im weiteren Verlauf proteomisch untersucht, um mögliche Unterschiede in der Proteinexpression feststellen zu können.

Die Isolate wurden außerdem auf mögliche Kreuzresistenzen gegen humanmedizinisch relevante Antibiotika getestet.

Weiterhin wurden Unterschiede in Empfindlichkeit, Wachstum und Fitness mittels vergleichenden Wachstumskurven von ursprünglichen Isolaten (Ancestor) und den entstanden Mutanten untersucht. Dafür wurden die Wachstumskurven, die jeweils in der Ab- und Anwesenheit von RU in einer Verdünnungsreihe von 0.3125 bis 80 mg/ml Glyphosat-Salz durchgeführt wurden, mithilfe eines frei verfügbaren Internetprogramms, dem GRcalculator (GR = growth rate), analysiert und bewertet.

In **Task 5** sollten in Fermentationsversuchen mögliche qualitative und quantitative Veränderungen der Biozönose in Folge einer Glyphosatzugabe untersucht werden. Hierzu sollten auch die in Task 3 resistenzinduzierten Stämme von *E. coli* und *Salmonella* sp. verwendet werden. Da es jedoch keine resistenzinduzierten Isolate vom Rind zum Zeitpunkt der Versuche gab, wurden andere gut selektierbare Isolate genutzt.

Es wurde ein Fermenter-Versuch mit einer worst case Konzentration an Roundup® LB Plus von 10 mg/l und je einem pathogenen *E. coli*- und *Salmonella* ser. Typhimurium-Isolat in Kooperation mit TiHo-PI durchgeführt.

Dabei wurden insgesamt 6 Fermentationsgefäße mit 10^8 KbE der jeweiligen Erreger inokuliert.

In drei der Fermenter wurde täglich die entsprechende Menge Roundup® LB Plus gegeben, wohingegen die anderen 3 als Kontrolle dienten. Proben wurden nach 0h, 0,5h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168h quantitativ und qualitativ mittels Selektionsmedien auf die entsprechenden Erreger hin untersucht. Bestimmung der MHK und Antibiotika-Resistenzprofile wurde von Isolaten gegen Ende des Versuches durchgeführt und mit den ursprünglichen Werten verglichen.

Für die Fermentationsversuche fürs Schwein bei UL-IB wurde UL-IB entsprechendes Startmaterial (Dickdarm von frisch euthanasierten Schweinen) vom ITU bereitgestellt.

Im **Task 6.1** sollten im ITU bereits gut etablierte Infektions- und Kolonisationsmodelle zur Abklärung Glyphosat-bedingter Effekte auf die Mikrobiota im Tier zum Einsatz kommen.

Dabei wurden Gruppen mit je 14 Absatzferkeln aus einem serologisch Salmonellen-frei getesteten Betrieb nach einer Adaptationsphase oral mittels Magenschlundsonde mit 10^8 KbE eines *Salmonella* ser. Typhimurium DT104-Stammes infiziert. Bei allen im Versuch eingesetzten Schweinen lag eine natürliche Besiedlung mit ESBL-*E. coli* vor (SPF-Tiere sowohl für *Salmonella* als auch für *E. coli* waren leider nicht verfügbar),

sodass diese nicht extra experimentell infiziert werden mussten.

Der Infektion schloss sich ein dreiwöchiger Beobachtungszeitraum an. Währenddessen erfolgte täglich die Erfassung klinischer Parameter, wöchentlich eine Blutprobennahme und 2x wöchentlich eine qualitative und quantitative bakteriologische Untersuchung von Rektaltupfern bzw. Kotproben. Die Gewinnung der Kotproben erfolgte rektal mittels Rektaltupfer, die der Blutproben mittels Vacuette aus der *Vena jugularis*.

Sieben Tage *post infectionem* wurde für Kontrollzwecke die Hälfte der Tiere einer Gruppe euthanasiert und Darminhalt (Jejunum, Ileum, Caecum und Colon) sowie Organproben (Tonsille, Gallenblaseninhalte, Milz, Mandibular-Lymphknoten, Ileocaecal-Lymphknoten) entnommen. Dieses Vorgehen diente der Definition der Ausgangskeimzahlen in den einzelnen Versuchsgruppen (bezogen auf ESBL-*E. coli* und Salmonellen in den einzelnen Darmabschnitten und Organen) vor der Fütterung von Glyphosat oder der Glyphosat-haltigen Formulierung Roundup. Anschließend erfolgte eine 14 tägige Fütterung mit Glyphosat/Roundup in den entsprechenden Gruppen. Neben einer Kontrollgruppe wurde dabei jeweils eine Tiergruppe mit der „worst-case“ Glyphosat-Konzentration von 2,85 mg Glyphosat/kg KGW/d und der „worst-case“ Roundup-Konzentration von 2,85 mg Glyphosat/kg KGW/d getestet. Proben für eine Untersuchung des kompletten Metagenoms und Metaboloms wurden konserviert und letzten Endes an eine externe Firma zur Untersuchung des 16sRNA Profils weitergeleitet.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

TASK 1 UMFASSENDE LITERATURRECHERCHE

Eine Übersicht über die Literatur ist im Anhang zu finden.

TASK 2.1/2.2 SCREENING VORHANDENER ISOLATE VON SCHWEIN UND RIND, MHK-BESTIMMUNG, BESTIMMUNG EPIDEMIOLOGISCHER CUT-OFF

Die Ermittlung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) gegenüber Glyphosat und dem Glyphosat-haltigen Herbizid Roundup® LB Plus wurde anhand von 238 aktuellen und historischen *E. coli*-Isolaten und 225 aktuellen und historischen *Salmonella*-Isolaten durchgeführt.

Die MHK gegenüber Glyphosat wurde dabei jeweils in zwei unterschiedlichen reichhaltigen Medien, der Müller-Hinton I Bouillon und der Müller-Hinton II Bouillon, ermittelt. Abschließend wurde eine abschließende statistische Auswertung der erhaltenen Daten durchgeführt.

Untersuchungen der MHK in MH I

In *Salmonella* spp.-Isolaten liegen die MHK-Werte zwischen 10 mg/ml und 80 mg/ml Isopropylaminsalz (IPA) gegenüber reinem Glyphosat-Salz und zwischen 20 mg/ml und 80 mg/ml IPA in der Formulierung Roundup® LB Plus (siehe Abbildung 1). Der Median und Modus liegt in beiden Fällen bei 40 mg/ml, der epidemiologische Cut-off bei 80 mg/ml.

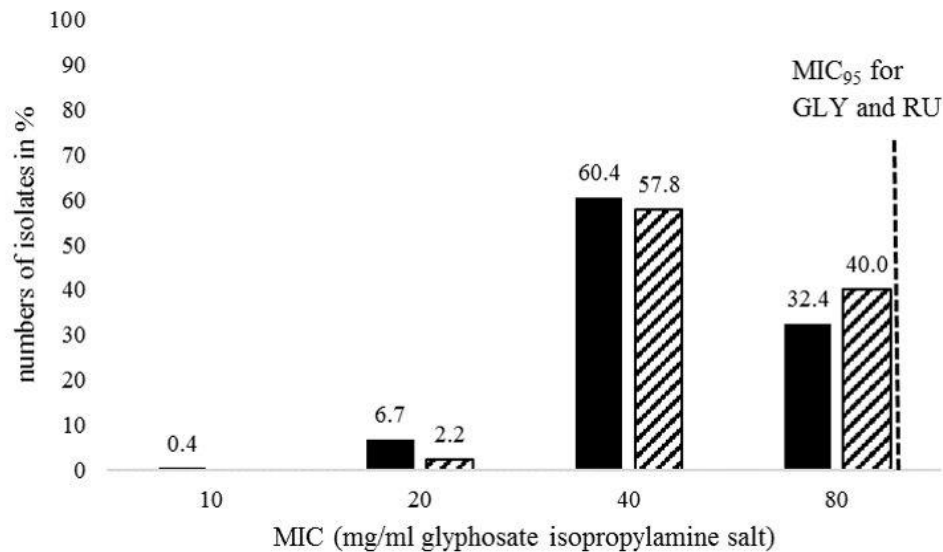


Abbildung 1 : MHK gegenüber Glyphosat als Isopropylamin-Salz (schwarz) und Roundup LB plus (schraffiert) in mg/ml für *Salmonella* spp., ermittelt in Müller-Hinton I Bouillon. MIC₉₅ als epidemiologischer Cut-Off für GLY und RU entsprechend eingezeichnet.

Statistische Auswertungen mittels einfachen non-parametrischen Tests und Modellierungen ergaben abhängig vom Test signifikante Unterschiede zwischen dem Isolationszeitpunkt, der Tierart und dem Serovar (siehe Tabelle 3).

In allen Tests zeigten rezente Isolate gegenüber Glyphosat und auch gegenüber Roundup® LB Plus signifikant höhere MHK als die untersuchten historischen Isolate. In den einfachen non-parametrischen Tests zeigten Isolate vom Schwein höhere Werte als die Isolate vom Geflügel. In der Modellierung war dies jedoch nur gegenüber Glyphosat signifikant, nicht gegenüber Roundup® LB Plus.

Die Serovare Typhimurium und Enteritidis hatten höhere Werte als Isolate des Serovars Infantis. Bei Roundup® LB Plus gab es zudem auch signifikante Unterschiede zwischen Typhimurium und Enteritidis selbst (mit niedrigeren Werten bei letztgenanntem Serovar).

Tabelle 3 : P-Werte der statistischen Auswertung der MHK-Daten aller *Salmonella* spp.-Isolate. Signifikante P-Werte fettgedruckt.

Vergleichende Kategorie	Glyphosat-Isopropylaminsalz		Roundup® LB Plus	
	Mann-Whitney/Kruskall-Wallis-Test	univariate Varianzanalyse	Mann-Whitney/Kruskall-Wallis-Test	univariate Varianzanalyse
Isolationszeitpunkt	0,012	0,006	<0,001	<0,001
Tierart	0,027	0,030	0,021	0,174
Serovar	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>S. Typhimurium</i> <> <i>S. Enteritidis</i>	0,147	0,238	0,002	<0,001
<i>S. Typhimurium</i> <> <i>S. Infantis</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
<i>S. Enteritidis</i> <> <i>S. Infantis</i>	<0,001	0,001	0,030	0,030

Bei den untersuchten *E. coli*-Isolaten lagen die MHK-Werte zwischen <1,25 mg/ml und 20 mg/ml IPA gegenüber reinem Glyphosat-Salz und bei 20 mg/ml und 80 mg/ml IPA gegenüber der Formulierung Roundup® LB Plus (siehe Abbildung 2). Der Median und Modus lag bei Glyphosat bei 10 mg/ml und bei Roundup® LB Plus bei 40 mg/ml, die epidemiologischen Cut-off Werte entsprechend bei 20 bzw. 40 mg/ml, womit es jeweils ein Isolate gab, die oberhalb dieser epidemiologischen Grenzen lagen.

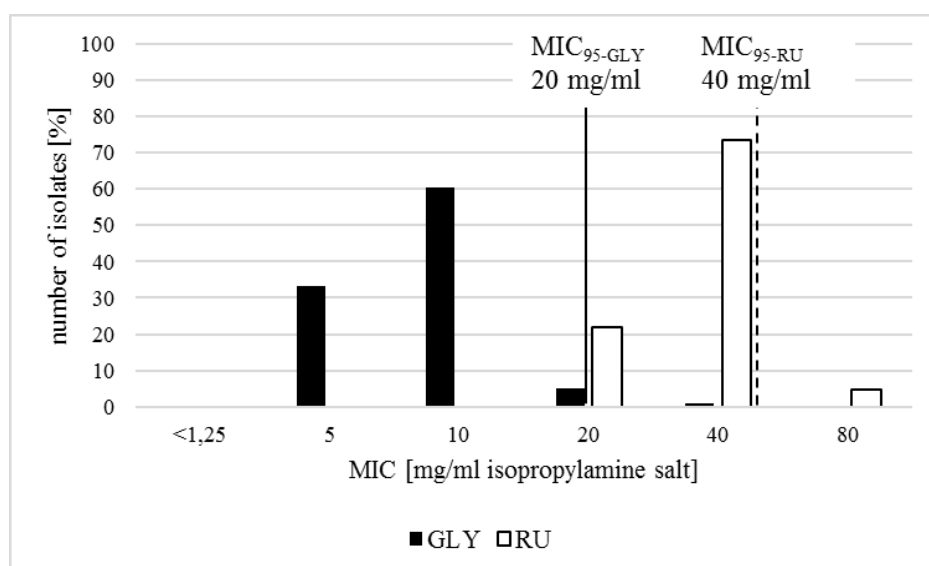


Abbildung 2 : MHK gegenüber Glyphosat als Isopropylamin-Salz (GLY, schwarz) und Roundup® LB Plus (RU, weiß) in mg/ml für *E. coli*, ermittelt in Müller-Hinton I Bouillon. MIC₉₅ als epidemiologischer Cut-Off für GLY und RU entsprechend eingezeichnet.

Statistische Auswertung mittels einfachen non-parametrischen Tests und mittels verschiedener Modellierungen ergaben abhängig vom Test signifikante Unterschiede zwischen dem Isolationszeitpunkt, dem ESBL-Status, der Einteilung in kommensale und pathogene Isolate sowie der Tierart (siehe Tabelle 4 und 5).

Tabelle 4 : P-Werte der statistischen non-parametrischen Auswertung der MHK-Daten aller *E. coli*-Isolate. Signifikante Werte fettgedruckt.

Vergleich zwischen		Mann-Whitney-U test	
		Glyphosat	RoundUp
historischen und	rezenten Isolaten	0.014	0.667
ECOR Kollektion	Kommensale <i>E. coli</i>	<0.001	0.623
ECOR Kollektion	Pathogene <i>E. coli</i>	0.498	0.780
Pathogene <i>E. coli</i>	Kommensale <i>E. coli</i>	0.004	0.861
non-ESBL	ESBL	0.018	0.362
Geflügel	Schwein	<0.001	0.004
Geflügel	Rind	0.001	0.007
Schwein	Rind	0.078	0.627

Tabelle 5 : P-Werte der statistischen Modellierung der MHK-Daten aller *E. coli*-Isolate. Signifikante Werte fettgedruckt. Univariate Varianzanalyse in Glyphosat und ordinale Regression in Roundup® LB Plus. Modell A untersucht den Isolationszeitpunkt, ESBL-Status und Tierart wohingegen Modell B ohne die ECOR-Sammlung die Kategorien Pathogen oder Kommensal, ESBL-Status und Tierart betrachtet.

Glyphosat		Univariate Varianzanalyse		Roundup® LB Plus		Ordinale Regression	
		Modell A	Modell B			Modell A	Modell B
Vergleich zwischen				Vergleich zwischen global		0.009	0.004
historischen und	rezenten Isolaten	0.726	-	historischen und	rezenten Isolaten	0.293	-
Pathogene <i>E. coli</i>	Kommensale <i>E. coli</i>	-	<0.001	Pathogene <i>E. coli</i>	Kommensale <i>E. coli</i>	-	0.314
non-ESBL	ESBL	0.013	0.035	non-ESBL	ESBL	0.443	0.479
Geflügel	Schwein	<0.001	<0.001	Geflügel	Mensch	0.031	-
Geflügel	Rind	0.01	0.002	Geflügel	Schwein	-	0.001
Schwein	Rind	0.608	0.229	Geflügel	Rind	-	0.002

Im einfachen non-parametrischen Test waren die MHK-Werte der rezenten Isolate höher als die der historischen gegenüber Glyphosat, jedoch nicht gegenüber Roundup® LB Plus.

Diese Signifikanz wurde in dem angewendeten statistischen Modell nicht bestätigt. Die Geflügel-Isolate hatten in allen statistischen Untersuchungen höhere MHK-Werte als die vom Schwein oder Rind isolierten Isolate.

Der Unterschied zwischen pathogenen und kommensalen *E. coli*-Isolaten war bei Glyphosat (nicht jedoch bei Roundup® LB Plus) signifikant, wobei die pathogenen Isolate höhere Werte aufwiesen.

Untersuchungen der MHK in MH II

Median und Modalwert der *Salmonella*-Isolate gegenüber Glyphosat lagen in MH II um eine Verdünnungsstufe höher bei 80 mg/ml IPA. Statistisch gesehen wurden die Ergebnisse aus MH I für Glyphosat alle und für Roundup® LB Plus alle bis auf die Serovar-Unterschiede bestätigt.

Die MHK-Werte für *E. coli* in MH II unterschieden sich hingegen signifikant von den Werten in MH I. Vor allem gegenüber reinem Glyphosat-Salz waren die Isolate in MH II weniger empfindlich. Der Median und Modalwert lag dementsprechend eine Verdünnungsstufe höher bei 20 mg/ml IPA.

Eine Analyse der Werte mittels statistischen non-parametrischen Tests ergab folglich auch weniger statistisch signifikante Unterschiede und nur die MHK-Werte der Geflügel-Isolate waren auch hier statistisch signifikant höher gegenüber Glyphosat und Roundup® LB Plus als die von Schwein und Rind. Die Tendenzen erschienen hingegen gleich.

Untersuchungen der MHK in pH7

Exemplarische Untersuchungen der MHK in einem pH-adjustiertem Medium, ergaben bei *E. coli* eine erhöhte Toleranz (MHK) gegenüber Glyphosat. Bei den Salmonellen-Isolaten, die von Beginn an höhere MHK-Werte hatten, gab es hingegen keine auffälligen Veränderungen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es sowohl Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber dem reinen Glyphosat-Salz und der Formulierung Roundup® LB Plus und zugleich auch Unterschiede zwischen den untersuchten Salmonellen- und *E. coli*-Isolaten gab.

Aktuelle Isolate zeigten dabei höhere MHK-Werte als historische. Dies ist statistisch gesichert für *Salmonella* spp. und gilt tendenziell auch für *E. coli* (nur signifikant gegenüber Glyphosat in einfachen vergleichenden Tests, jedoch nicht in der Modellierung). Für *E. coli* muss man jedoch beachten, dass bei den Isolaten der ECOR Sammlung, die zwar repräsentativ für die Gesamtheit der *E. coli* in dem besagten Zeitraum sind, es fast keine Isolate aus dem Nutztierbereich gibt. Für eine gesicherte Aussage müssten daher künftig mehr historische *E. coli*-Isolate aus dem Nutztierbereich untersucht werden, die uns jedoch für die Untersuchungen nicht zur Verfügung standen.

Es gab des Weiteren bei beiden Erregern signifikante Unterschiede zwischen den Wirtstierarten, wobei bei *E. coli* die Geflügel-Isolate und bei *Salmonella* spp. die Schweine-Isolate höhere MHK-Werte aufweisen.

Pathogene *E. coli* weisen gegenüber Glyphosat höhere MHK-Werte auf als kommensale Isolate und bei den Salmonellen zeigen sich MHK-Unterschiede zwischen den drei untersuchten Serovaren, wobei das Serovar Infantis die niedrigsten MHK-Werte aufweist.

Insgesamt befinden sich alle gefundenen MHK-Werte in einem engen Konzentrations-Bereich von nur wenigen Verdünnungsstufen. Deutlich resistente Subpopulationen sind nicht erkennbar. In künftigen Untersuchungen sollten zur Verifizierung der gefundenen Sachverhalte diese und weitergehende Untersuchungen in mehreren Laboren gleichzeitig und mit einem noch repräsentativeren Isolate-Kollektiv durchgeführt werden. Zudem sollten die Isolate mit einer erhöhten Glyphosat-Unempfindlichkeit (MKH > MIC₉₅) in weiterführenden Untersuchungen auf die genetischen Grundlagen dieser Unempfindlichkeit hin untersucht werden.

TASK 3.1/3.2 RESISTENZINDUKTION GEGENÜBER GLYPHOSAT UND DER FORMULIERUNG ROUNDUP® LB PLUS

In einem ersten Ansatz wurde ein modifiziertes Protokoll von Perron et al. (2005) zur Induktion von Antibiotika-Resistenzen angewandt.

Dabei wurden jeweils zwei *E. coli*-Isolate (je ein non-ESBL und ein ESBL-produzierendes Isolat) und zwei *Salmonella*-Isolate (eines der Isolate zusätzlich mit einem Resistenz-Marker gegen Nalidixinsäure) verwendet. Auswahlkriterium für diese vier Isolate war die gute Eignung, in den später durchzuführenden Fermenter- und experimentellen Tierversuchen eingesetzt werden zu können.

Es zeigte sich allerdings, dass mit diesem sehr aufwändigen Versuchsprotokoll keine dauerhafte (nach Stabilitätspassage noch präsente), genetisch fixierte Erhöhung der MHK gegenüber Glyphosat oder der Formulierung Roundup® LB Plus, die das als epidemiologischen Cut-Off festgelegte 95% Perzentil übersteigt, erzielt werden konnte (vergleiche Tabelle 6 für Glyphosat und Tabelle 7 für Roundup).

Tabelle 6 : Vergleich der MHK für Glyphosat vor und nach den Resistenzinduktions-Experimenten für E. coli und Salmonella spp.

Stamm	MHK [mg/ml]	MHK am Ende des Experiments [mg/ml]	MHK nach Stabilitätspassage [mg/ml]
non-ESBL <i>E.coli</i>	10	40	20
ESBL <i>E.coli</i>	10	20	10
S. Typhimurium	80	80	80
S. Typhimurium DT104	40	80	40

Tabelle 7 : Vergleich der MHK für Roundup LB plus vor und nach den Resistenzinduktions-Experimenten für *E. coli* und *Salmonella* spp.

Stamm	MHK [mg/ml]	MHK am Ende des Experiments [mg/ml]	MHK nach Stabilitätspassage [mg/ml]
non-ESBL <i>E. coli</i>	40	80	Kein Wachstum
ESBL <i>E. coli</i>	40	80	40
<i>S. Typhimurium</i>	80	80	Kein Wachstum
<i>S. Typhimurium</i> DT104	40	80	80

Um die Chancen der Resistenzinduktion gegenüber Glyphosat und/oder Roundup® LB Plus zu erhöhen, wurden daher in einem deutlich umfangreicheren zweiten Versuchsansatz deutlich mehr Isolate (vor allem auch solche mit einer bereits hohen Ausgangs-MHK) in größeren Reaktionsvolumina mit einer zugleich langsameren Steigerung der Glyphosat-Konzentrationen (entspricht dem Protokoll zur Induktion von Biozid-Resistenzen) untersucht. Des Weiteren wurde der Versuch nun in pH-adjustiertem Medium durchgeführt, um die Azidität von Glyphosat auszugleichen und somit die Verhältnisse im Tier besser widerspiegeln zu können.

Das Grundprinzip des Versuches blieb aber insgesamt gleich. Nach einer Phase der Adaptation an die Versuchsbedingungen wurden die Isolate in einer bestimmten Menge Glyphosat/Roundup® LB Plus inkubiert. Bei einem Wachstum wurde die Kultur jeweils parallel in die gleiche und in eine um 10 mg /ml erhöhte Konzentration überimpft. Am Ende wurde eine Stabilitätspassage ohne Zusatz der entsprechenden Substanz durchgeführt.

Die initiale MHK gegenüber pH-adjustiertem Roundup® LB Plus lag bis auf 2 *E. coli*-Isolate, die bei einer Verdünnungsstufe höher wuchsen, bei allen benutzten Isolaten bei 40 mg/ml.

Während des Versuches konnte man ein Wachstum bei Konzentrationen zwischen 40 und 90 mg/ml sehen. Einige Isolate zeigten nach den Resistenzinduktionsexperimenten eine erhöhte MHK gegenüber Roundup® LB Plus (Tabelle 8).

Die vielversprechendsten Isolate, die für einen Einsatz in weiteren Untersuchungen am ehesten in Frage kamen, wurden zunächst mithilfe einer Pulsfeldgelanalyse verglichen, um einerseits eventuelle Kontaminationen durch die große Menge an Isolaten zu kontrollieren und andererseits Rückschlüsse zwischen den ursprünglichen und den präadaptierten Wildtyp-Isolaten und den jeweiligen Evolutionsisolaten ziehen zu können (Abbildung 3). Die Auswertung wurde dabei nach Tenover et al. (1995) durchgeführt; bei 1 - 3 Banden Unterschied werden die Isolate als eng verwandt kategorisiert.

Tabelle 8 : Übersicht der Isolate, mit einem erhöhten MHK-Wert gegenüber Roundup® LB Plus nach den Resistenzinduktionsversuchen. Vielversprechende Isolate, die weiter untersucht wurden, sind fettgedruckt und unterstrichen.

Isolat	MHK pH7 vor dem Versuch	Einfrierennummer	höchstes Wachstum in mg/ml	Tag	MHK pH7 nach dem Versuch	MHK pH7 nach Stabilitäts-passage
<u>Pathogener E. coli</u>	80	<u>13257</u>	90	d22	160	160
Pathogener <i>E. coli</i>	40	13274	80	d24	80	80
Pathogener <i>E. coli</i>	40	13282	80	d24	80	80
<i>E. coli</i>	40	13341	80	d20	80	80
<u>S. Typhimurium</u>	40	<u>12468</u>	90	d17	160	160
<u>S. Typhimurium</u>	40	<u>12471</u>	90	d24	80	160
<u>S. Typhimurium</u>	40	<u>12472</u>	90	d24	80	160
S. Enteritidis	40	12538	80	d24	80	80

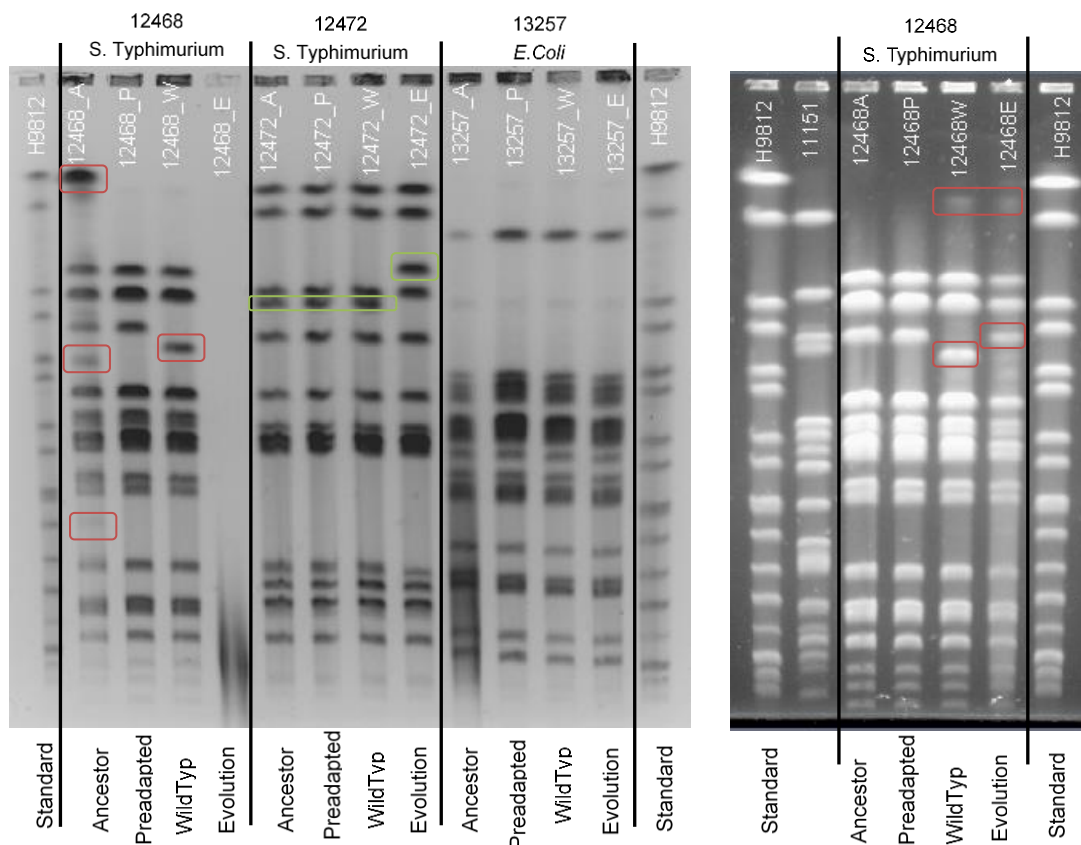


Abbildung 3 : Pulsfeldgelanalyse ausgewählter Isolate aus dem Evolutions-Screening. Vergleich zwischen ursprünglichem Stamm (Ancestor), an Versuchsbedingungen gewöhnten Stamm (Preadapted), Kontrollstamm (WildTyp) und Mutante am Ende des Versuchs (Evolution) der vielversprechendsten Isolate.

Die isolierten Reinkulturen, schienen einerseits aus den ursprünglichen Startisolaten zu stammen, andererseits schienen sich infolge der Exposition gegenüber dem glyphosathaltigen Herbizid Roundup® LB Plus Änderungen auf DNA-Ebene ergeben zu haben. Für weitere Informationen wurden die vier Isolate ganzgenomsequenziert (siehe Task 4.3).

Da aus den Resistenzinduktionsversuchen eine MHK-Erhöhung um 1-2 Verdünnungsstufen nach der Stabilitätspassage resultierte und dies zudem vermehrt bei den untersuchten Salmonellen-Isolaten, wurde ein weiteres Evolutions-Screening mit Salmonellen-Isolaten durchgeführt. Gleichzeitig wurden tägliche Kontaminationskontrollen durchgeführt.

Die präadaptierten Salmonellen des zweiten Evolutions-Screenings wuchsen zu Beginn des Versuches in Konzentrationen von bis zu 40 mg/ml Glyphosat-Isopropylaminsalz in Roundup® LB Plus in pH 7 adjustiertem Medium (MHK von 80 mg/ml). Während des Versuches konnten die Konzentrationen, in denen Wachstum auftrat auf bis zu 80 mg/ml gesteigert werden (Tabelle 9).

Nach Versuchsende mit einer jeweils durchgeführten Stabilitätspassage konnte bei zwei Isolaten eine Erhöhung der MHK um eine Verdünnungsstufe (von 80 mg/ml auf 160 mg/ml) beobachtet werden (Tabelle 9). Diese Isolate wurden gemeinsam mit den 4 Isolaten aus dem ersten Evolutions-Screening sequenziert.

Tabelle 9 : Übersicht der MHK aus dem zweiten Evolutions-Screening in RoundUp [mg/ml Glyphosat-Isopropylaminsalz in der Formulierung] der präadaptierten Stämme, der entsprechenden Wildtypen und nach dem Versuch mit anschließender Stabilitätsphase. Isolate, die weiter untersucht wurden fettgedruckt.

Isolat	MHK – präadaptiert [mg/ml]	MHK – Wildtyp d10 [mg/ml]	MHK – nach Stabilitätspassage [mg/ml]
12468	S.Typhimurium	80	80
12471	S.Typhimurium	80	80
12472	S.Typhimurium	80	80
12538	S.Enteritidis	80	160
12539	S.Enteritidis	80	160
13339	S.Typhimurium	80	80

Bei den parallel durchgeführten Evolutionsexperimenten mit reinem Glyphosat wurde keine stabil exprimierte MHK-Erhöhung beobachtet und es kam demnach bei unseren Untersuchungen nur bei Einfluss des glyphosathaltigen Herbizids Roundup® LB Plus zu einer stabil exprimierte MHK-Erhöhung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen von Evolutionsversuchen mit einer Exposition gegenüber langsam steigenden Glyphosatkonzentrationen eine MHK-Erhöhung gegenüber Glyphosat induziert werden kann. Dies erscheint bei Exposition gegenüber dem glyphosathaltigen Herbizid Roundup® LB Plus deutlich häufiger der Fall zu sein als bei Exposition gegenüber reinem Glyphosat. Zudem scheinen Salmonellen hierfür empfänglicher als *E. coli*.

In künftigen Untersuchungen sollten die gefundenen Sachverhalte ggfs. mit anderen pathogenen Bakterienspezies sowie mit anderen glyphosathaltigen Herbiziden verifiziert werden.

TASK 3.3 UNTERSUCHUNG DER RESISTENZEN GEGENÜBER ANTIBIOTIKA

Um Veränderungen im Sinne einer Co-Induktion von AB-Resistenzen aufzudecken wurden die in Task 3.1/3.2 resistenzinduzierten Isolate anschließend auf ihre Empfindlichkeit gegenüber gängig genutzten Antibiotika hin untersucht.

Die Ergebnisse der Untersuchung mit dem automatisierten Testsystem VITEK ergaben nur vereinzelte, geringe Unterschiede in der Antibiotika-Sensitivität der resistenzinduzierten Isolate vor und nach dem Evolutionsexperiment. Bemerkenswert war hierbei jedoch, dass nach dem Evolutionsexperiment ausschließlich Erniedrigungen der MHK und demnach Empfindlichkeitssteigerungen feststellbar waren.

So zeigte das Salmonellen-Isolat 12472 vor dem Experiment eine MHK von 8 µg/ml gegenüber Piperacilin/Tazobactam und nach dem Experiment eine MHK von unter 4 µg/ml. Nach der Klassifizierung Sensitiv/Resistent stellte dies jedoch keine Änderung in der Einstufung des Isolates als sensibel dar.

Gleiches galt für das Salmonellen-Isolat 12538. Dies zeigte vor dem Experiment eine MHK von 2 µg/ml für Colistin. Nach dem Experiment zeigte das Isolat eine MHK für Colistin von unter 0,5 µg/ml. Auch hier änderte die Änderung der MHK insgesamt nichts an der Einstufung des jeweiligen Isolats als sensibel gegenüber dem Antibiotikum.

Zusammenfassend lässt sich insgesamt folgern, dass infolge einer induzierten MHK-Erhöhung gegenüber Glyphosat keine Resistenzinduktion gegen andere antimikrobiellen Wirkstoffe, hier insbesondere Antibiotika, beobachtet werden konnte.

TASK 4.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER RESISTENZINDUZIERTEN STÄMME AUS TASK 3

Zur molekularen Charakterisierung der Isolate aus den Resistenzinduktionsversuchen (Task 3) wurde DNA isoliert, anschließend bei -20° C konserviert und zur Sequenzierung mittels Illumina-Sequencing versandt (BiGenDiv in Berlin). Die ermittelten Ganzgenomsequenzen wurden verglichen und analysiert. Die so ermittelte Lokalisierung der identifizierten Mutationen der einzelnen Isolate ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10 : Mutationen, die bei den untersuchten Isolaten mit erhöhtem MHK durch Vergleich der Sequenzen mit dem Ausgangsisolat gefunden wurden. Farblich unterlegt sind die Mutations-Regionen, die durch ihre Lokalisation einen Zusammenhang mit der Reduktion der Roundup-Sensitivität sehr wahrscheinlich machen.

Isolat (Herkunft)	Passage	Gen	Produkt	Mutation	MHK-Steigerung [mg/ml]
<i>E. coli</i> ESBL 13257 (Ferkel, Gastritis)	22	<i>rplF</i>	50S ribosomal subunit protein L6	missense	80 → 160
		<i>nagK</i>	N-acetyl-D-glucosamine kinase	missense	
			hypothetical protein	missense	
		<i>sppA</i>	protease IV	missense	
	17	intergenic space	upstream of <i>aroA</i>	SNP	40 → 160

<i>Salmonella</i> Typhimurium 12468 (Mastschwein, Kot)		<i>rcsB</i>	transcriptional regulator RcsB (Two component system regulator)	missense	
<i>Salmonella</i> Typhimurium 12472 (Mastschwein, Kot)	24	<i>rpoS</i>	RNA polymerase sigma factor RpoS	truncation	
		<i>aroA</i>	3-phosphoshikimate 1- carboxyvinyltransferase	missense	40 → 160
<i>Salmonella</i> Enteritidis 12538 (Schwein, Kot)	10	<i>ycfM</i>	Lipoprotein YcfM	missense	
		<i>aroA</i>	3-phosphoshikimate 1- carboxyvinyltransferase	missense	
		<i>hofP</i>	DNA utilization protein HofP	missense	
		<i>malT</i>	HTH-type transcriptional regulator malT	missense	80 → 160
		<i>mutL</i>	DNA mismatch repair protein MutL	missense	
<i>thrB</i>	homoserine kinase	missense			
<i>Salmonella</i> Enteritidis 12539 (Schwein, Kot)	10	intergenic space	upstream of the <i>serC/aroA</i> operon	SNP	80 → 160

Die Isolate 13257, 12468, 12472, 12538 und 12539 zeigten dabei entsprechend Mutationen, die durch ihre Lokalisation den Schluss zuließen, dass sich diese Mutationen als Anpassung an die steigende RU-Konzentration im Versuch etablieren konnten. Konkret waren dies:

E. coli 13257: keine Mutation, die in Bezug zur Behandlung mit Roundup stehen könnte

Salmonella Typhimurium 12468: Eine Punktmutation upstream des *AroA*-Gens

Salmonella Typhimurium 12472: Eine missense Mutation innerhalb des *AroA*-Gens

Salmonella Enteritidis 12538: Eine missense Mutation innerhalb des *AroA*-Gens

Salmonella Enteritidis 12539: Eine Punktmutation in der upstream-Region des *AroA*-Operons

Um mögliche Fitnessunterschiede zwischen den ursprünglichen (ancestor) und den mutierten (mutant) Isolaten feststellen zu können, wurden Wachstumskurven in einer mit pH7 adjustierten Verdünnungsreihe (80 mg/ml bis 0,3125 mg/ml) erstellt und diese anschließend statistisch mittels dem online zur Verfügung stehenden GRCalculator ausgewertet.

Mit Ausnahme des Salmonellen-Isolats 12538, bei dem die Mutationen anscheinend mit Fitnessverlusten einherging, wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen dem Ancestor und den resistenzinduzierten Mutanten festgestellt.

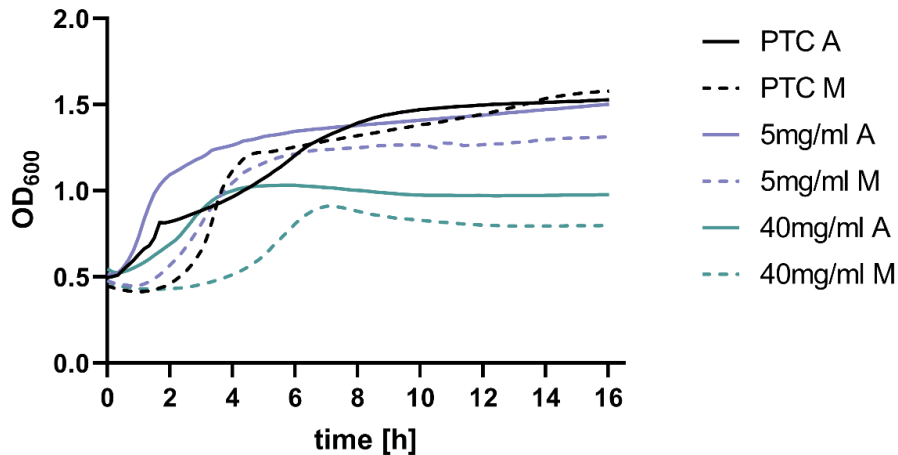


Abbildung 4 : Auszug der Wachstumskurven des *Salmonella ser. Enteritidis* Isolats 12538. Die Kurven zeigen das Wachstum von ursprünglichen Isolate (A, durchgezogene Kurven) und der Mutanten nach dem Evolutionsexperiment (M, gestrichelte Kurven) mit 5 oder 40 mg/ml Glyphosat in Roundup LB Plus. Die mutant strains zeigen ein verzögertes Wachstum und erreichen bei Glyphosat-Zugabe auch eine geringere maximale OD im Vergleich zum Ancestor.

In Abbildung 4 ist die Wachstumskurve des Isolates 12538 dargestellt, das einen Fitness- Verlust infolge der induzierten MHK-Erhöhung gegenüber Glyphosat aufweist.

Abbildung 5 zeigt beispielhaft dagegen eines der anderen 5 von 6 Isolate, die sich in ihrem Wachstum nicht signifikant vom jeweiligen Ancestor unterscheiden und demzufolge keinen Fitness-Verlust infolge der induzierten MHK-Erhöhung gegenüber Glyphosat aufweisen, sondern teils sogar die Tendenz zu einer höheren Fitness nach induzierter MHK-Erhöhung. Die statistische Auswertung dazu erfolgt exemplarisch in den Abbildungen 6 und 7.

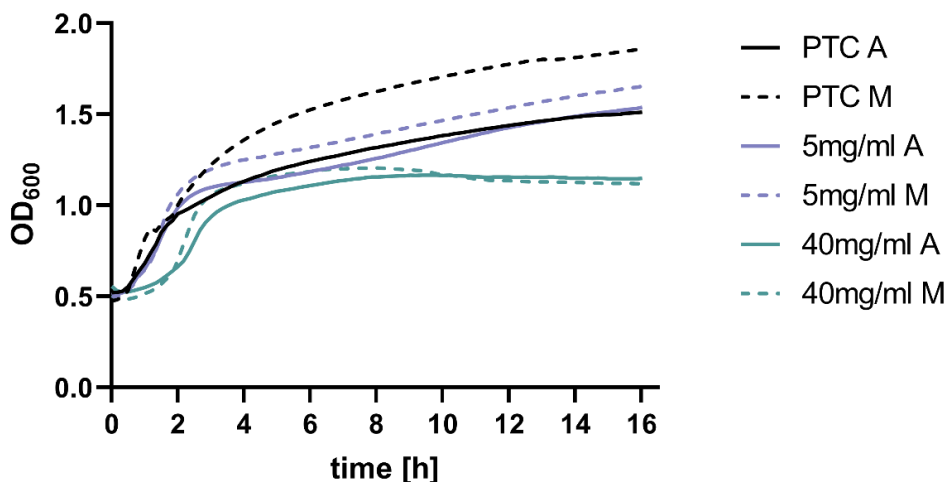


Abbildung 5: Auszug der Wachstumskurven des *Salmonella Typhimurium* Isolats 12468. Die Kurven zeigen das Wachstum des ursprünglichen Isolats (A, durchgezogene Kurven) und der Mutanten nach dem Evolutionsexperiment (M, gestrichelte Kurven) mit 5 oder 40 mg/ml Glyphosat in Roundup LB Plus. Die Wachstumsraten sind dabei vergleichbar. Die Positivkontrolle der Mutante sowie die Mutante mit 5 mg/ml Glyphosat in Roundup LB Plus erreichen dabei sogar eine höhere finale OD als der entsprechende Ancestor.

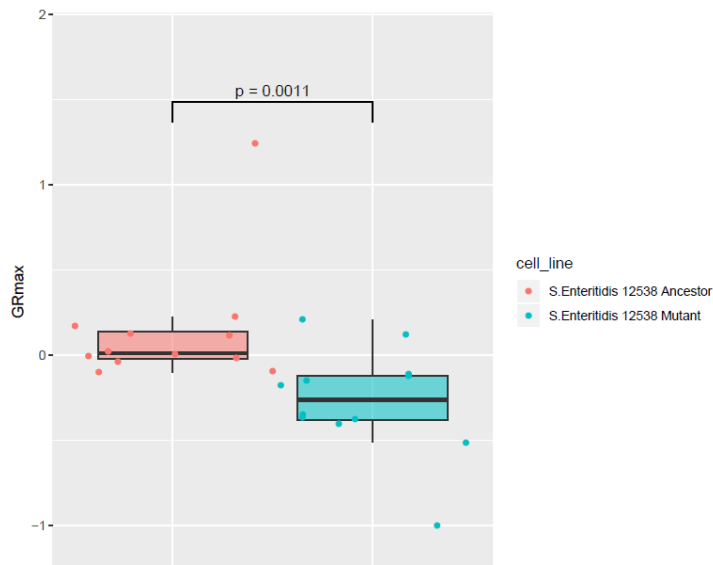


Abbildung 6: Statistische Auswertung der Wachstumskurven des Isolates 12538. GRmax betrachtet die maximal gemessenen Wachstumsraten. Die Mutante (türkis dargestellt) hat insgesamt signifikant schlechtere Wachstumsraten als das ursprüngliche Isolat (Ancestor, rosa dargestellt).

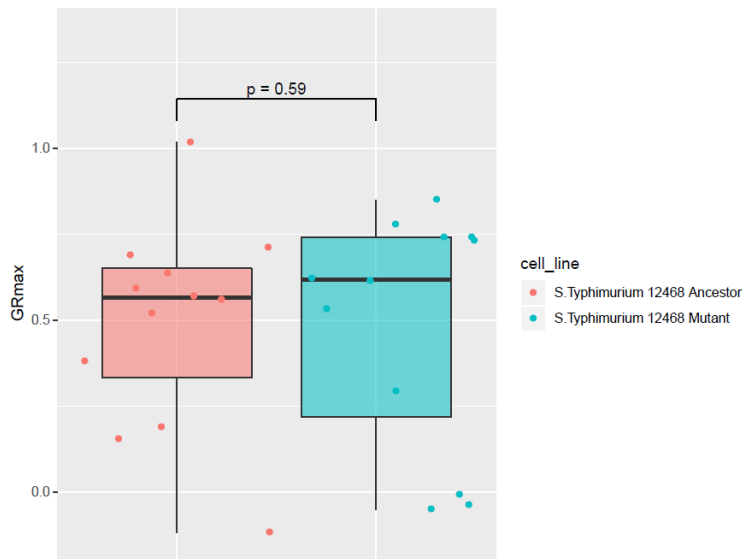


Abbildung 7 : Statistische Auswertung der Wachstumskurven des Isolates 12468. GRmax betrachtet die maximal gemessenen Wachstumsraten. Die Mutante (türkis dargestellt) hat keine signifikant sich unterscheidende Wachstumsraten als das ursprüngliche Isolat (Ancestor, rosa dargestellt).

TASK 4.2 PROTEINBIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER RESISTENZINDUZIERTEN STÄMME AUS TASK 3

Die Isolate, die eine erhöhte MHK gegenüber Roundup® LB Plus zeigten (Mutants) wurden zusammen mit den entsprechenden Ursprungsisolaten (Ancestors) mittels markierungsfreier massenspektrometrischer Quantifizierung (label-free quantification) untersucht. Dabei wurden vergleichend die Isolate in purem Medium sowie in Medium mit Roundup® LB Plus (1/4 der jeweiligen MHK) bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase inkubiert und anschließend im Hinblick auf ihre Proteinexpression hin untersucht.

Dabei haben wir erstmalig eine große Anzahl an Enterobacteriaceae sub-inhibitorischen Roundup-Konzentrationen ausgesetzt. Trotz der Heterogenität der eingesetzten Stämme wurden zum Teil große Übereinstimmungen zwischen den unterschiedlichen Umweltisolaten festgestellt.

Die Analyse identifizierte eine große Anzahl an Proteinen (Tabelle 11). Eine erhebliche Anzahl dieser Proteine wird dabei differentiell exprimiert (Tabelle 12).

Tabelle 11: Anzahl aller identifizierten Proteine

Isolat	Anzahl aller identifizierten Proteine
<i>Escherichia coli</i> 13257	945
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis 12538	1053
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis 12539	934
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium 12468	858
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium 12472	1022

Tabelle 12: Anzahl der statistisch signifikant unterschiedlich regulierten Proteine (Student's T Test). Unterschiede in der Proteinexpression beziehen sich im Vergleich auf Gruppe 1 (fettgedruckt).

Isolat	Vergleich (Gruppe 1 vs Gruppe 2)	Anzahl der regulierten Proteine		
		Total	Down-reguliert in Gruppe 1	Up-reguliert in Gruppe 1
<i>Escherichia coli</i> 13257	Mutante vs Ancestor	218	151	67
	Ancestor/Roundup (RU) vs Ancestor	278	198	80
	Mutante/RU vs Mutante	119	72	47
	Mutante/RU vs Ancestor/RU	143	92	51
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis 12538	Mutante vs Ancestor	144	88	56
	Ancestor/RU vs Ancestor	245	165	80
	Mutante/RU vs Mutante	1	1	0
	Mutante/RU vs Ancestor/RU	40	39	1

<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis 12539	Mutante vs Ancestor	27	6	21
	Ancestor/RU vs Ancestor	259	116	143
	Mutante/RU vs Mutante	14	13	1
	Mutante/RU vs Ancestor/RU	83	51	32
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium 12468	Mutante vs Ancestor	80	57	23
	Ancestor/RU vs Ancestor	3	1	2
	Mutante/RU vs Mutante	65	13	52
	Mutante/RU vs Ancestor/RU	0	0	0
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium 12472	Mutante vs Ancestor	167	76	91
	Ancestor/RU vs Ancestor	70	24	46
	Mutante/RU vs Mutante	101	42	59
	Mutante/RU vs Ancestor/RU	85	46	39

Insgesamt lässt sich sagen, dass es infolge einer induzierten MHK-Erhöhung gegenüber Glyphosat zu mannigfaltigen Änderungen in der Expression von Proteinen kommt.

Bisher konnte von den vorhandenen Datensätzen leider nur die Datensätze der exprimierten Proteome der 5 Ancestor-Stämme mit Roundup® LB Plus im Vergleich zu den Ancestor-Stämmen ohne Glyphosatwirkung detailliert ausgewertet werden, und somit die Auswirkung von Glyphosat auf *E. coli*- und *Salmonella*-Isolate ohne induzierte MHK-Erhöhung.

Eine Übersicht der verschieden exprimierten Proteinklassen in den Ancestor-Isolaten mit Roundup® LB Plus-Exposition in Konzentrationen zwischen 10 und 20 mg/ml (1/4 MHK der entsprechenden Isolate) ist in Tabelle 13 zu finden.

Tabelle 13 Einteilung der unterschiedlich exprimierten Proteine im Vergleich zwischen Ancestor mit Roundup (1/4 MHK in neutralem Medium) und Ancestor ohne Roundup.

Proteinklassen, die vermehrt exprimiert werden		
COG Code	Anzahl	Beschreibung
E	50	Amino acid transport and metabolism
C	43	Energy production and conversion
M	37	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
F	28	Nucleotide transport and metabolism
S	28	Function unknown
J	27	Translation, ribosomal structure and biogenesis
O	27	Post-translational modification, protein turnover, and chaperones
P	23	Inorganic ion transport and metabolism
G	17	Carbohydrate transport and metabolism
H	17	Coenzyme transport and metabolism
K	17	Transcription
Q	16	Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism

Proteinklassen, die weniger exprimiert werden		
J	119	Translation, ribosomal structure and biogenesis
F	78	Nucleotide transport and metabolism
S	36	Function unknown
M	32	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
K	31	Transcription
G	29	Carbohydrate transport and metabolism
E	25	Amino acid transport and metabolism
H	25	Coenzyme transport and metabolism
C	24	Energy production and conversion
D	16	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning
L	16	Replication, recombination and repair
I	12	Lipid transport and metabolism
P	10	Inorganic ion transport and metabolism

Dabei führte Roundup® LB Plus zu einer verminderten Expression von Proteinen, die für Wachstum und Metabolismus (wie z.B. Transkription, Translation, Zellteilung) zuständig sind. So sind weniger Proteine, die im Zusammenhang mit dem Maltose- und Fructose-Stoffwechsel stehen nachweisbar. Gleichzeitig scheinen Beweglichkeits- und Zellteilungs-assoziierte Mechanismen runterreguliert zu werden. Interessanterweise wurden auch Antibiotikaresistenz-Proteine (beta-Laktamasen) runterreguliert. Dies ist in Zusammenhang zu bringen mit der Beobachtung in den Studien zum MHK-Vergleich verschiedener *E. coli*-Kollektive, in denen einerseits ESBL-*E. coli* signifikant niedrigere MHK-Werte gegenüber Glyphosat hatten und sich andererseits unter den Isolaten, die eine MHK über dem MIC₉₅ für Roundup® LB Plus aufwiesen, keine ESBL-bildenden *E. coli* befanden.

Roundup® LB Plus führte zu vermehrtem Nachweis von Proteinen, die mit einer Stressantwort der Bakterien in Verbindung stehen. Dabei sind vermehrt Proteine der osmotischen Regulation, Betain-Produktion und Außenmembrane nachzuweisen. Ein vermehrtes Vorkommen von Siderophoren (Enterobactin) legt eine vorliegende Konkurrenz zwischen Bakterien und Glyphosat in Roundup® LB Plus um Eisen nahe. Weiterhin waren, wie aufgrund des Wirkungsmechanismus von Glyphosat zu erwarten, auch Proteine des Shikimate-Pathways betroffen. Mit Multidrug Resistance assoziierte Effluxpumpen (*acrA*, *TolC*) sowie Proteasen, die auch bei persistierenden Bakterien (sog. Persistenz) eine wichtige Rolle spielen, waren unter Wirkung von Roundup® LB Plus vermehrt nachweisbar. In einigen Fällen wurden Antibiotikaresistenzproteine sowie Biofilm- und Stressassoziierte Proteine (*marR*, *rpoS*) vermehrt gebildet.

Es scheint daher, dass Enterobacteriaceae (hier *E. coli* und Salmonellen) in Gegenwart sub-inhibitorischer Konzentrationen von Roundup® LB Plus verstärkt Mechanismen der Stressantwort, der Persistenz sowie des Eisen- und Shikimate-Stoffwechsel aktivieren und gleichzeitig dazu grundsätzliche Vorgänge im Zellmetabolismus sowie der

virulenzassoziierten Motilität und der Plasmidsynthese herunter regulieren. Antibiotikaresistenz-assoziierte Proteine können rauf- oder runterreguliert werden.

Die weitere Analyse der bereits vorliegenden Daten zum Verständnis der mit der induzierten MHK-Erhöhung gegenüber Glyphosat einhergehenden funktionellen Zusammenhänge steht noch aus und wird bis Ende des Jahres 2019 vorliegen.

TASK 5.3 FERMENTATIONSVERSUCHE MIT DOTIERTEN PATHOGENEN ERREGERN

Für den *in-vitro*-Infektionsversuch mittels Pansen-Simulationstechnik (RUmen SIMulation TECHnique = RUSITEC) an der TiHo-PI wurden verschiedene Selektivplatten zur Selektion der eingesetzten Erreger intensiv getestet (Tabelle 14). Final wurde dann Chrom-Orientierungsagar versetzt mit 2 µg/ml Cefotaxim und 4µg/ml Enrofloxacin (im weitergehenden Text als Chrom+ bezeichnet) verwendet, um den gegen diese Antibiotika resistenten (ESBL-) *E. coli*-Stamm zu selektieren sowie XLD-Agar für den Nachweis des verwendeten Salmonellen-Stamms.

Tabelle 14 : Übersicht der beiden in den Fermentern eingesetzten Isolate.

13339 <i>Salmonella</i> ser. Typhimurium DT104	BB440 isoliert vom Schwein	MHK Gly	MHK Gly pH7	MHK RU	MHK RU pH7
		40 mg/ml	80 mg/ml	40 mg/ml	80 mg/ml
13262 <i>E. coli</i>	isoliert vom Rind	MHK Gly	MHK RU	MHK Enrofloxacin	MHK Cefotaxim
		5 mg/ml	20 mg/ml	>16 µg/ml	>32 µg/ml

Eine schematische Übersicht des zeitlichen Ablaufs des Versuches ist in Abbildung 8 dargestellt.

Gestartet wurde der Versuch mit einer Pansensaft-Mischprobe von drei verschiedenen Kühen des FLI in Braunschweig. Es folgte vor dem Versuchsbeginn eine 8-tägige Kalibrierungsphase. Drei Tage vor der Zugabe der Bakterien wurden die Fermenter quantitativ und qualitativ auf Freiheit von Salmonellen und *E. coli* hin untersucht.

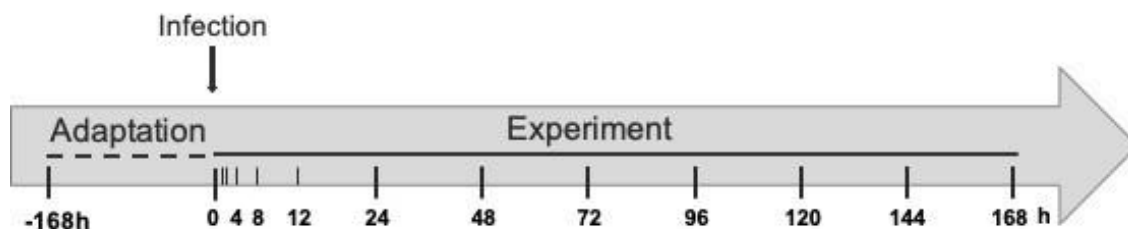


Abbildung 8: Versuchsübersicht der Fermentorenversuche mit den beiden dotierten Erregern. Dargestellt sind die Probenahmezeitpunkte der Proben -1 bis 12. Die Roundup-Gabe erfolgte nach Infektion täglich.

Nach Infektion mit jeweils insgesamt 10^8 KbE (resultierend in 10^6 KbE/ml) der entsprechenden Isolate wurden drei der sechs Fermenter täglich mit RoundUp® LB

Plus dotiert, um eine Konzentration von 10 mg/l Glyphosat in den Fermentern zu erreichen. Diese Konzentration entspricht einer ca. 10-fach höheren Konzentration („worst case“-Konzentration) als die von Schnabel et al. (2017) postulierte reale Belastung von circa 1 mg/l im Pansen (im Durchschnitt Aufnahme von 79,1 mg Glyphosat/d bzw. auf 100l Pansen bezogen: 0,791 mg/l).

Die Verlaufskurven für die *E. coli*- und *Salmonella* Typhimurium-Keimzahlen in den Fermentern mit und ohne Roundup-Zugabe sind in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt.

Die Keimzahl des *E. coli*-Stamms sank in den ersten 24 Stunden bereits um 2 log-Stufen und anschließend stetig weiter, so dass nach 5 Tagen weder qualitativ noch quantitativ ein Wachstum festzustellen war (Abbildung 9).

Auch bei den Salmonellen war die Keimzahl nach 24 Stunden bereits um 2 log-Stufen gefallen, jedoch waren sie (mit Ausnahme des Fermenters 6) bis zum Versuchsende an Tag 7 noch nachweisbar (Abbildung 10).

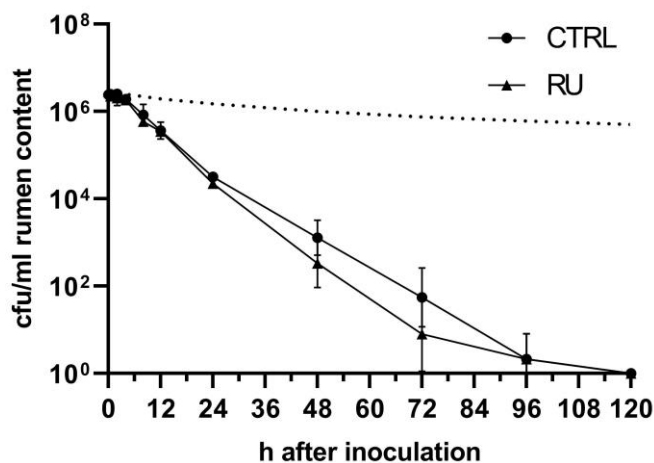


Abbildung 9: Verlauf der logarithmierten KbE des dotierten ESBL-*E. coli*-Isolates der Kontroll- (CTRL) und Roundup (RU)-Fermenter und der durch den Zu- und Ablauf des Puffers bedingte, rechnerische Verlust (gepunktete Linie).

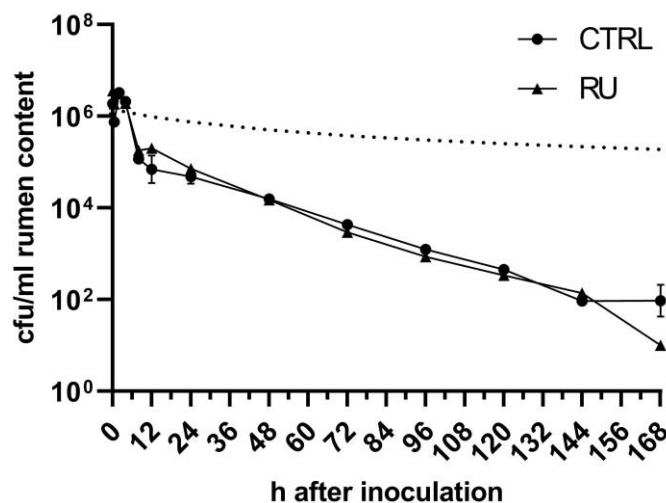


Abbildung 10: Verlauf der logarithmierten KbE des dotierten *Salmonella*-Isolates der Kontroll- (CTRL) und Roundup (RU)-Fermenter und der durch den Zu- und Ablauf des Puffers bedingte, rechnerische Verlust (gepunktete Linie).

Der Vergleich der Mediane der Kontrollfermenter mit den worst-case Fermentern, ergab keine signifikanten Unterschiede für das *Salmonella* Typhimurium-Isolat sowie das ESBL-*E. coli*-Isolat ($P = 0.753$ und $P = 0.678$, mittels Wilcoxon-Test oder $P = 0.967$ und $P = 0.825$ mit dem T-Test).

Ein statistischer Vergleich der Keimzahlen zu jedem Probenzeitpunkt ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15 : Statistische Analyse der Kontrollfermenter und der Fermenter mit 10 mg/l Roundup als worst-case Szenario zu jedem Probennahme-Zeitpunkt mittels T-Test für quantitative Nachweise oder Chi-Quadrat-Test für qualitative Nachweise ($x =$ nicht berechenbar, da beide Gruppen gleich).

Zeitpunkt		T-Test		Chi-Quadrat Test
		<i>E. coli</i>	<i>Salmonella ser. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>
P0	Inokulation	$P = 0.244$	$P = 0.855$	x
P1	0,5h	$P = 0.558$	$P = 0.503$	x
P2	2h	$P = 0.456$	$P = 0.309$	x
P3	4h	$P = 0.706$	$P = 0.970$	x
P4	8h	$P = 0.275$	$P = 0.540$	x
P5	12h	$P = 0.687$	$P = 0.539$	x
P6	24h	$P = 0.151$	$P = 0.792$	x
P7	48h	$P = 0.178$	$P = 0.339$	x
P8	72h	$P = 0.257$	$P = 0.355$	$P = 0.273$
P9	96h	$P = 1$	$P = 0.534$	$P = 0.273$
P10	120h	-	$P = 1$	x
P11	144h	-	$P = 0.729$	$P = 0.273$
P12	168h	-	$P = 0.163$	x

Zur Überprüfung einer eventuellen Änderung der Empfindlichkeit gegenüber Roundup® LB Plus wurde von jeweils 3 Isolaten jedes Stammes und jedes Fermenters eine MHK-Bestimmung durchgeführt. Dabei wurden Isolate von den Zeitpunkten ausgewählt, an denen immer noch ein solides Wachstum festgestellt wurde. Bei *E. coli* waren das Isolate nach 2 Tagen in den Fermentern 2,4 und 5 und nach 3 Tagen in den Fermentern 1,3 und 6. Bei *Salmonella* wurden Isolate nach 5 Tagen aus allen Fermentern untersucht. Dabei wurden keine Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber Glyphosat beobachtet (Tabelle 16).

Weiterhin wurde für jeweils ein Isolat beider Infektionsstämme aus jedem Fermenter ein Antibiotikaresistenzprofil mittels VITEK® ermittelt (Testkarte AST N-248 mit humanmedizinisch relevanten Antibiotika). Die beobachteten geringen Unterschiede in den Profilen lagen überwiegend innerhalb von 1-2 Verdünnungsstufen, was normalen Abweichungen entspricht (Tabelle 17). Einzige Ausnahme hiervon waren *E. coli*-Isolate aus den Fermenter 1, 4 (mit Roundup LB Plus) und 5, wo das Ursprungsisolat eine MHK von $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ gegenüber Cefepim zeigte und die drei getesteten Isolate bei $4 \mu\text{g/ml}$ lagen. Die Unterschiede erscheinen aber auch unabhängig von der Zugabe von

Roundup LB Plus, was, wie auch schon in der Literatur berichtet, an einer fehlerhaften Empfindlichkeit gegenüber Cefepim im VITEK 2 liegen kann.

Tabelle 16 : Minimale Hemmkonzentration (MHK) von Isolaten aus dem Fermenter-Experiment zum Zeitpunkt vor der Extinktion. Vergleich in RU und RU pH7 mit dem Ursprungsisolat.

Fer- menter	RU yes/ no	Probe	Tag	<i>E. coli</i>		<i>Salmonella ser. Typhimurium</i>			
				MHK RU	MHK RU pH7	Probe	Tag	MHK RU	MHK RU pH7
1	no	8	3	40 mg/ml	80 mg/ml	10	5	80 mg/ml	80 mg/ml
2	yes	7	2	40 mg/ml	80 mg/ml	10	5	80 mg/ml	80 mg/ml
3	no	8	3	40 mg/ml	80 mg/ml	10	5	80 mg/ml	80 mg/ml
4	yes	7	2	40 mg/ml	80 mg/ml	10	5	80 mg/ml	80 mg/ml
5	no	7	2	40 mg/ml	80 mg/ml	10	5	80 mg/ml	80 mg/ml
6	yes	8	3	40 mg/ml	80 mg/ml	10	5	80 mg/ml	80 mg/ml
Ancestor	-	-	-	40 mg/ml	80 mg/ml	-	-	80 mg/ml	80 mg/ml

Tabelle 17 : MHK in µg/ml mittels VITEK® getestet. Unterschiede zum Ancestor-Isolat sind fettgedruckt. Fermenter markiert mit * gehören zur RU-Gruppe. R = resistent, S = sensibel.

	Ceftazidim	Cefepim	Aztreonam
<i>E. coli</i> Ancestor	16 R	≥ 64	16 R
<i>E. coli</i> Fermenter 1	16 R	4	≥ 64 R
<i>E. coli</i> Fermenter 4	4 S	4	≥ 64 R
<i>E. coli</i> Fermenter 5	16 R	4	16 R

	Piperacillin/ Tazobactam	Moxifloxacin
<i>Salmonella ser. Typhimurium</i> Ancestor	8 S	0,5 S
<i>Salmonella ser Typhimurium</i> Fermenter 1	≤ 4 S	1 R
<i>Salmonella ser Typhimurium</i> Fermenter 2*	≤ 4 S	0,5 S
<i>Salmonella ser Typhimurium</i> Fermenter 3	≤ 4 S	0,5 S

TASK 6.1/6.2 UNTERSUCHUNG ZUR WIRKUNG VON GLYPHOSAT IM TIER-MODELL

Im **Task 6.1** sollte ein im ITU bereits gut etabliertes Infektions- und Kolonisationsmodell zur Abklärung Glyphosat-bedingter Effekte auf die Mikrobiota im Tier zum Einsatz kommen. Eine Übersicht über den Ablauf der *in vivo* Versuche mit Schweinen findet sich in Abbildung 11.

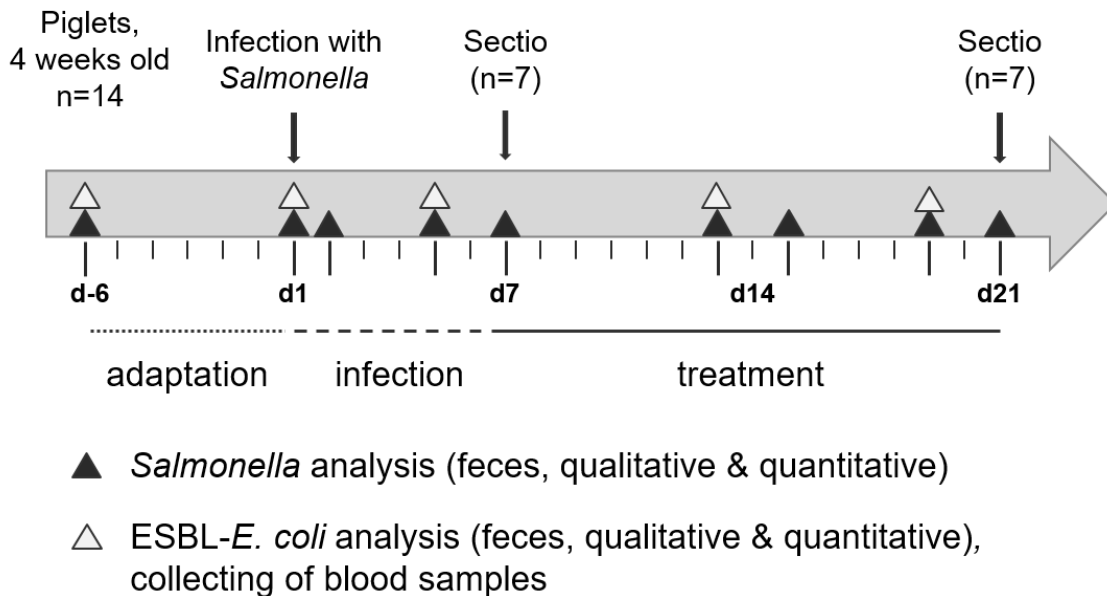


Abbildung 41: Schematischer Ablauf des Tierversuchs. Unterteilung in Adaptationsphase (adaptation), Infektion (infection) und Fütterungsphase (treatment).

Zur Infektion wurde derselbe gut etablierte und bereits in der Vergangenheit eingesetzte und publizierte *Salmonella* ser. Typhimurium Stamm genutzt, der auch im Fermenterversuch eingesetzt wurde (vgl. Tabelle 14). Dieser zeichnet sich durch eine Nalidixinsäure-Resistenz aus, wodurch er auf XLD-Selektionsplatten mit einem Zusatz von 50µg/ml Nalidixinsäure sehr gut zu selektieren und wiederzufinden ist. ESBL-*E. coli* wurden nicht aktiv zusätzlich inokuliert, sondern nur die Ausscheidung der natürlicherweise bei den Tieren bereits vorkommenden ESBL-*E. coli* überwacht. Die Tiere wurden mit ca. 10^8 KBE *Salmonella* per Magensonde inokuliert. Die genaue Keimzahl für jede Gruppe findet sich in Tabelle 18.

Tabelle 18 : Übersicht finalen OD und der inokulierten Keimzahl an *Salmonella* Typhimurium in cfu auf MüllerHinton-Agar (MH) in den verschiedenen Gruppen.

Gruppe	OD	cfu
Kontrollgruppe	0,759	1,59E+08
Gruppe Roundup worst-case	0,75	2,63E+08

Glyphosat worst-case	0,740	1,79E+08
----------------------	-------	----------

Die Kotproben wurden im Laufe des Versuches 2-mal wöchentlich rektal entnommen. Die Untersuchung auf Salmonellen erfolgte quantitativ auf XLD mit Nalidixinsäure bzw. auf MacConkey mit Cefotaxim für ESBL *E. coli*. Falls die quantitative Untersuchung negativ war erfolgte auch eine qualitative Untersuchung nach Voranreicherung.

Eine Woche nach Infektion wurde bei den Tieren, die nicht als interne Kontrolle dienten, mit der Verabreichung von Glyphosat bzw. Roundup begonnen. Folgende Konzentrationen waren in der Literatur für Glyphosat-Rückstände im Schweinefutter zu finden:

- Renewal Assessment Report [2013; Daten von 2009]:
0,209 mg/kg bw/d für Schweine (Getreide, Rüben)
als maximum dietary burden für Glyphosat
- EFSA [2018]
2,85 mg/kg bw/d für Schweine

Die EFSA-Konzentration ist eher eine theoretische als eine realistische Konzentration und circa das 10-fache der berichteten Menge aus dem Renewal Assessment Report. Diese Konzentration von 2,85 mg/kg Körpergewicht ist somit als „worst-case“ anzusehen und diente daher als Grundlage für unsere Fütterungsversuche.

Die Tiere wurden wöchentlich gewogen und das Durchschnittsgewicht errechnet (Tabelle 19). Roundup® LB Plus bzw. Glyphosat wurde dann entsprechend der berechneten Menge einmal täglich oral den Tieren verabreicht.

Tabelle 19 : Durchschnittsgewichte der Gruppen in kg an den verschiedenen Messtagen.

Gruppe	d0	d5	d12	d20	d26
Roundup worst-case	9,8	10,4	10,7	12,6	14,4
Glyphosat worst-case	7,4	7,8	8,0	10,2	12,4
Kontroll-Gruppe	7,4	8,0	8,6	9,1	11,4

In die finale Auswertung gingen 41 von 42 Ferkeln (21 weiblich und 20 männlich).

Eine Übersicht der mittleren Salmonellen-Ausscheidung ist in Abbildung 12 für die quantitativen Daten und in Abbildung 13 für die qualitativen Daten dargestellt. Dabei ergaben sich keinerlei statistisch signifikante Unterschiede der Salmonella-Keimzahlen zwischen den Gruppen infolge einer Glyphosat- oder Roundup-Exposition. Lediglich an Tag 13 konnten in der qualitativen Detektion vermehrt positive Tiere gefunden werden, dies aber in der nicht mit Glyphosat behandelten Kontrollgruppe.

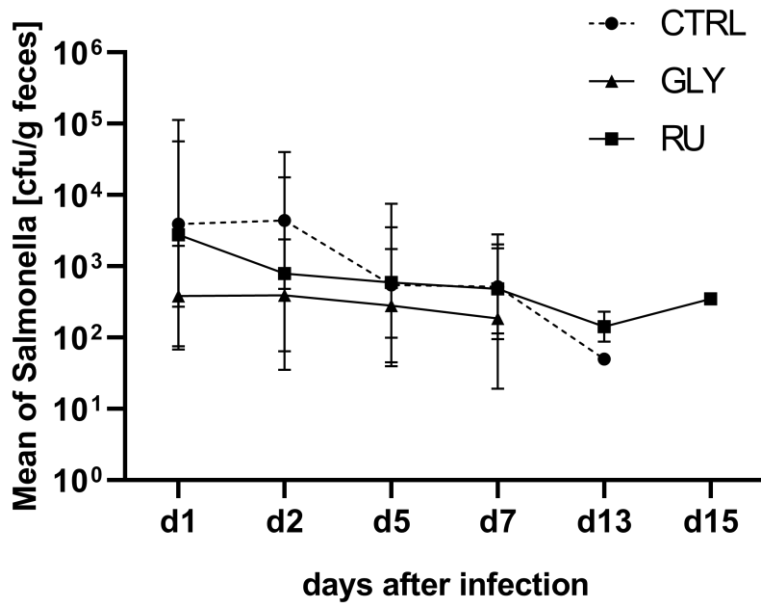


Abbildung 12: Mittlere quantitative Salmonellenausscheidung im Kot im Verlauf des Versuches für die einzelnen Tiergruppen (Glyphosat = GLY, Roundup = RU, Kontrolle = CTRL). Die Fütterung mit RU/GLY folgte ab Tag 7 in den entsprechenden Gruppen.

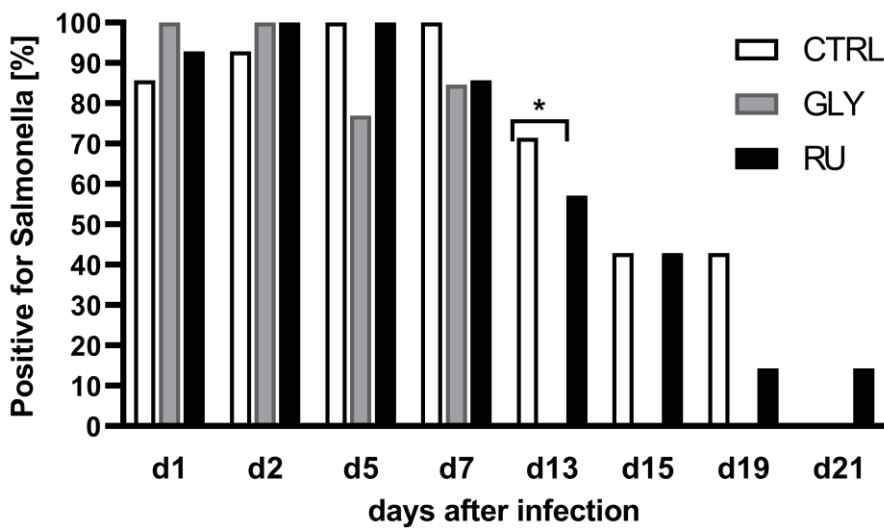


Abbildung 13: Anteil qualitativ positiver Kotproben im Laufe des Versuches in den unterschiedlichen Gruppen (Glyphosat = GLY, Roundup = RU, Kontrolle = CTRL). Die Fütterung mit RU/GLY folgte ab Tag 7 in den entsprechenden Gruppen. Statistisch signifikante Unterschiede sind markiert (*, $P \geq 0,05$).

In der abschließenden Sektion konnten nur noch bei einzelnen Proben einiger weniger Tiere Salmonellen quantitativ nachgewiesen werden (Tabelle 20). Qualitativ Salmonella-positive Proben sind in Abbildung 14 aufgelistet. Dabei gab es jeweils keinerlei statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Glyphosat- und Roundup- behandelten Gruppen und im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Tabelle 20 : Salmonellen-Keimzahl der einzelnen Tiergruppen in den einzelnen Organen und Geweben am Ende des Fütterungsexperiments nach 14 Tagen. M= mean, SD= Standardabweichung. To=Tonsille, LM= Mandibularlymphknoten, Sp=Milz, Bi= Galle, LI= Ileocaecallymphknoten, Je= Jejunum, Il= Ileum, Ca= Caecum, Co= Colon

	Control		worst case RU		worst case GLY	
	M	SD	M	SD	M	SD
To	0	0	993	2090	6557	13238
LM	0	0	0	0	0	0
Sp	0	0	0	0	0	0
Bi	0	0	0	0	0	0
LI	0	0	0	0	0	0
Je	0	0	0	0	0	0
Il	0	0	0	0	0	0
Ca	0	0	14	35	0	0
Co	0	0	0	0	0	0

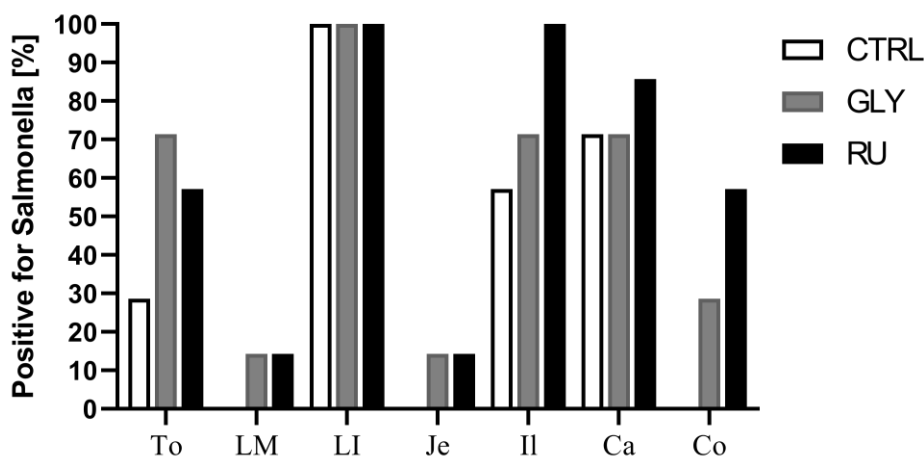


Abbildung 14: Salmonellen-Nachweise der einzelnen Tiergruppen in den einzelnen Organen und Geweben am Ende des Fütterungsexperiments nach 14 Tagen (Glyphosat = GLY, Roundup = RU, Kontrolle = CTRL). To=Tonsille, LM= Mandibularlymphknoten, LI= Ileocaecallymphknoten, Je= Jejunum, Il= Ileum, Ca= Caecum, Co= Colon

Die Ausscheidung von ESBL-*E. coli* stieg nach der Infektion mit Salmonellen zunächst teils an (wahrscheinlich infolge der damit induzierten Dysbiose), um danach langsam in allen Gruppen abzusinken (Abbildung 15).

Dabei zeigten sich infolge der Fütterung von Glyphosat oder Roundup® LB Plus jeweils mit der „worst case“-Dosierung von 2,85 mg Glyphosat pro kg Körpergewicht keine statistisch signifikanten Unterschiede in der quantitativen (Abbildung 15) oder qualitativen (Abbildung 16) Ausscheidung von ESBL-*E. coli* in den entsprechenden Gruppen.

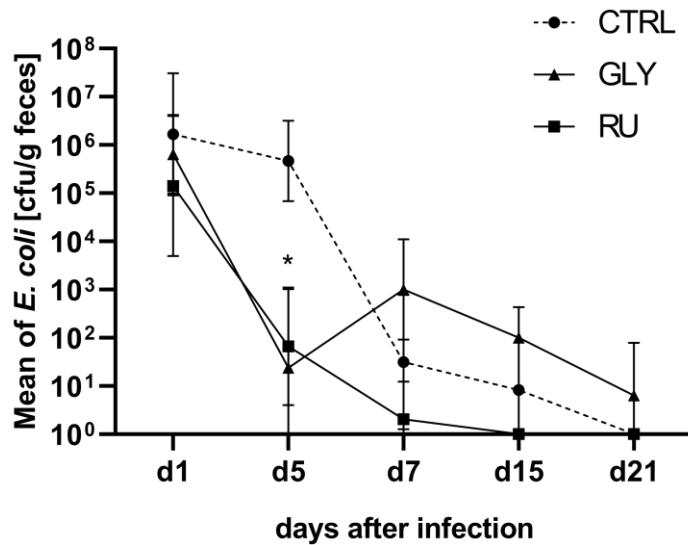


Abbildung 15: Mittlere Ausscheidung von ESBL E. coli im Kot im Verlauf des Versuches für die einzelnen Gruppen (Glyphosat = GLY, Roundup = RU, Kontrolle = CTRL). Fütterung mit RU/GLY folgte ab Tag 7 in den entsprechenden Gruppen. Statistisch signifikante Unterschiede gekennzeichnet (*, $P \geq 0,05$).

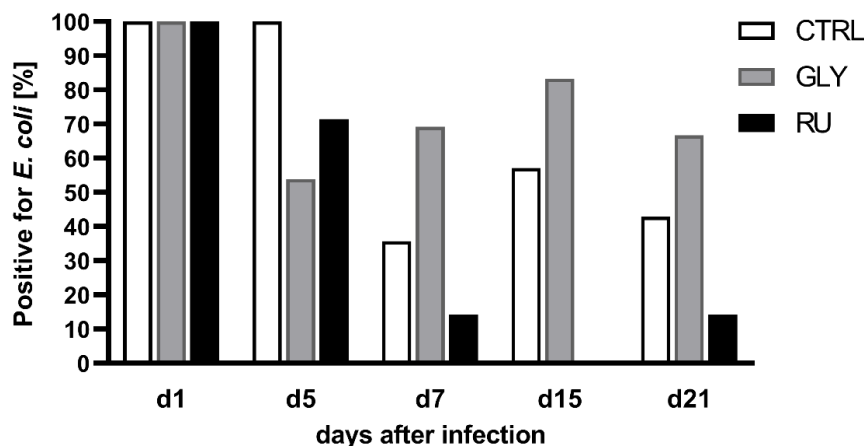


Abbildung 16: Anteil qualitativ positiver Kotproben im Laufe des Versuches in den unterschiedlichen Gruppen (Glyphosat = GLY, Roundup = RU, Kontrolle = CTRL). Glyphosat-/Roundup-Gabe ab Tag 7.

Die Untersuchungen zur möglichen MHK-Erhöhung gegenüber Glyphosat am Ende der 14-tägigen Glyphosat-Fütterung ergaben keine Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen den aus dem Caecum der Schweine isolierten Salmonellen und dem eingesetzten Infektionsstamm (MHK für RU, RU in pH7 und GLY in pH7 = 80 mg/ml Isopropylamin-Glyphosat und MHK für GLY = 40 mg/ml Isopropylamin).

Zur Charakterisierung des Gesamtmikrobioms wurden Caecum- und Kotproben aus den entsprechenden Gruppen bei den Sektionen entnommen, eingefroren und inzwischen zur Genomanalyse mittels 16sRNA geschickt. Deren Ergebnis und die entsprechende Auswertung wird bis Ende des Jahres 2019 vorliegen

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

In diesem Projekt, wurden weltweit erstmalig eine große Anzahl von nutztierassoziierten Enterobacteriaceae (Salmonellen und *E. coli*) aus der Zeit vor dem verbreiteten Einsatz von Glyphosat vergleichend mit einer großen Anzahl von Isolaten aus den vergangenen vier Jahren auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Glyphosat und dem glyphosathaltigen Herbizid Roundup® LB Plus hin untersucht.

Des Weiteren wurden Versuche zur Resistenzinduktion gegenüber Glyphosat bzw. Roundup® LB Plus durchgeführt und molekularbiologisch-genetisch sowie proteinbiochemisch ausgewertet. „Worst case“-Konzentrationen von Glyphosat in Roundup, wie sie unter extremen Umständen auch in Futtermitteln vorkommen können, wurden *in vitro* im Tiermodell Schwein und *in vivo* mittels des Pansen-Fermentationssystems (RUSITEC) untersucht, um eine mögliche Anreicherung von Salmonellen und *E. coli* sowie eine MHK-Erhöhung gegenüber Glyphosat und eine Co-Induktion von Antibiotikaresistenzen zu untersuchen.

Diese Untersuchungen stellen eine wichtige Grundlage zur Beurteilung einer möglichen Beeinflussung des mikrobiellen Ökosystems und insbesondere einer möglichen MHK-Erhöhung oder Toleranzentwicklung gegenüber Glyphosat und einer Anreicherung zoonotischer Erreger in der Nutztierhaltung dar.

4. Zusammenfassung

Um eine Übersicht über die Empfindlichkeiten von Nutztier-assoziierten Enterobacteriaceae gegenüber Glyphosat (als reines Isopropylamin-Salz, IPA) und der glyphosathaltigen Formulierung Roundup® LB Plus zu erhalten, wurden insgesamt 238 *E. coli* und 225 *Salmonella enterica* Isolate untersucht und deren minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt. Dabei wurde ein Teil dieser Isolate vor dem intensiven Gebrauch von glyphosathaltigen Herbiziden vor 1990 asserviert und diente als historische Kontrolle-Gruppe, der andere Teil wurde zwischen 2014 und 2018 isoliert. Die Isolate stammten jeweils von Schweinen und Geflügel, einige *E. coli*-Isolate auch vom Rind.

Der Median und Modalwert der untersuchten *Salmonella enterica* – Isolate lag bei 40 mg/ml sowohl in purem Glyphosat als auch in Roundup® LB Plus (bezogen auf Glyphosat-IPA). Den epidemiologischen cut-off (MIC₉₅) überschritt keines der Isolate. Für *E. coli* lagen Median und Modalwerte in Roundup® LB Plus ebenfalls bei 40 mg/ml IPA, in der reinen Glyphosat-Lösung jedoch bei 10 mg/ml. Der entsprechend errechnete cut-off entspricht 20 mg/ml für Glyphosat (2 Isolate mit einer MHK über dem cut-off) und 40 mg/ml für Roundup® LB Plus (11 Isolate mit einer MHK über dem cut-off).

Statistisch gesehen haben aktuelle Isolate eine höhere MHK als historische. Für *Salmonella enterica* ist dies durch mehrere statistische Ansätze gesichert (non-parametrische Tests, Modellierungen, in MH I und MH II). Für *E. coli* sind die Ergebnisse hinweisend (signifikanter Unterschied bei non-parametrischer Untersuchung in Glyphosat, jedoch Mangel an Nutztier-assoziierten historischen Isolaten in der Kontrollgruppe). Des Weiteren haben pathogene *E. coli*-Isolate höhere

MHK-Werte als kommensale *E. coli*. *E. coli* Isolate vom Geflügel weisen statistisch signifikant höhere MHK-Werte auf als Isolate vom Schwein und Rind, wohingegen bei den Salmonellen die Isolate vom Schwein eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Glyphosat aufweisen. Basierend auf der MIC₉₅ bzw. auf dem epidemiologischen Cutoff₉₅ gibt es Glyphosat-resistente *E. coli*-Isolate, die sämtlich non-ESBL sind und mehrheitlich vom Geflügel stammen und als pathogen einzustufen sind.

Zur Untersuchung einer möglichen Resistenzinduktion, wurde neben dem Ansatz eines klassischen Evolutionsversuches (kleine Volumina, 2 Isolate, jeweils 5 Replikate) auch ein erweitertes Screening ähnlich der Resistenzinduktion von Bioziden durchgeführt (größere Medienvolumina, größere Isolate-Anzahl, kleinere Schritte der Konzentrationssteigerung). Generell gestaltete sich die Dynamik der Adaptation an höhere Glyphosat-Konzentrationen langwierig und fand insgesamt nur im sehr niedrigen Bereich statt. Dabei konnten nur Erhöhungen um eine bis zwei MHK-Stufen und überwiegend nur in Roundup® LB Plus erreicht werden. Mehrheitlich waren dies *Salmonella*-Isolate. Die Isolate, die am Ende der Versuche nach Stabilitätspassage eine MHK-Erhöhung aufwiesen, wurden sequenziert und molekularbiologisch weiter untersucht.

Eine MHK-Erhöhung gegenüber Glyphosat und Roundup® LB Plus ist prinzipiell also möglich, jedoch geschieht das insgesamt nur sehr langsam. Insbesondere bei *Salmonella* sp. fanden sich unter Roundup-Wirkung Mutationen im Bereich der *aroA*-Gene. Diese Mutationen gehen dabei meist ohne Fitnesskosten einher, was eine über lange Zeit stabil exprimierte höhere MHK (wenn einmal erworben) bzw. ein langes Überleben dieser Stämme auch ohne Glyphosatwirkung wahrscheinlich macht. Bei den zum Berichtszeitpunkt noch nicht gänzlich ausgewerteten Proteom-Untersuchungen zeigte sich, dass Enterobacteriaceae (hier insbesondere *E. coli* und Salmonellen) in Gegenwart sub-inhibitorischer Konzentrationen von Roundup® LB Plus verstärkt Mechanismen der Stressantwort, der Persistenz sowie des Eisen- und Shikimate-Stoffwechsel aktivieren und gleichzeitig dazu grundsätzliche Vorgänge im Zellmetabolismus sowie der virulenzassoziierten Motilität und der Plasmidsynthese verringern. Eine Co-Induktion von Antibiotikaresistenzen scheint hingegen infolge der Induktion einer MHK-Erhöhung gegenüber Glyphosat in der Regel nicht gegeben zu sein.

Bei der Untersuchung des Verhaltens von *E. coli* und *Salmonella* Typhimurium im *in vitro* Pansen-Fermentationssystem (RUSITEC) bei Vorliegen einer worst-case Konzentration von 10 mg/l Glyphosat in der Formulierung Roundup® LB Plus, gab es keinen Selektionsvorteil für die dotierten pathogenen Enterobacteriaceae (Inokulation von je 10⁶ KbE/ml *E. coli* und *Salmonella* Typhimurium zu Versuchsbeginn). Die Anzahl der inokulierten Bakterien sank stetig in allen untersuchten Fermentern, unabhängig der Roundup-Gabe. Eine MHK-Erhöhung gegenüber Glyphosat und eine Resistenzbildung gegen Antibiotika erfolgte dabei nicht.

Um Effekte auf zoonotische Enterobacteriaceae *in vivo* zu untersuchen, wurden Absatzferkel mit 10⁸ KbE *Salmonella* Typhimurium infiziert und eine Woche nach der Infektion mit der sehr hohen Konzentration von 2,85 mg Glyphosat pur oder in Roundup® LB Plus pro kg Körpermasse und Tag gefüttert. Dabei wurde die

Ausscheidung von Salmonellen und ESBL-*E. coli* zweimal wöchentlich qualitativ und quantitativ untersucht. Nach einer Fütterungsphase von 2 Wochen wurden die Tiere euthanasiert und Organproben entnommen. Dabei gab es innerhalb des Versuches und in der finalen Sektion keine statistisch signifikanten Unterschiede (weder quantitativ noch qualitativ) der Glyphosat- und der Roundup-exponierten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die orale Aufnahme von Glyphosat in Form von Roundup® LB Plus in sehr hohen Dosierungen resultiert im Tierversuch daher nicht in einer Anreicherung (Selektion) der applizierten zoonotischen Enterobacteriaceae. Eine Resistenzbildung gegenüber Glyphosat oder Antibiotika erfolgte auch hier nicht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine MHK-Erhöhung gegenüber Glyphosat bei zoonotischen Erregern aus der Nutztierhaltung möglich ist. Dies geschieht jedoch nur langsam, führt dann aber nicht zwingend zu Fitnessverlusten. Dementsprechend ist eine Erhöhung der MHK gegenüber Glyphosat über die letzten Jahrzehnte für *Salmonella sp.* und zum Teil auch für *E. coli* nachweisbar. Pathogene *E. coli* weisen dabei eine höhere MHK gegenüber Glyphosat auf als kommensale. Unter länger anhaltender Glyphosateinwirkung kommt es aber auch bei extrem hohen Glyphosat-Konzentrationen weder im Fermenter, noch bei Schweinen zu einer Anreicherung von Salmonellen und ESBL-bildenden *E. coli* oder zu einer entsprechenden MHK-Erhöhung gegenüber Glyphosat bei diesen Keimen.

Einschränkend ist festzuhalten, dass diese Ergebnisse sämtlich unabhängig verifiziert bzw. bestätigt werden sollten.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweis auf weiterführende Fragestellungen

Das ursprünglich geplante Versuchsprogramm wurde hinsichtlich der Zielstellungen sämtlich erfolgreich abgearbeitet. Geringfügige Abweichungen bei der finalen Herangehensweise waren durchweg gut begründet. So wurde im Vergleich zum ursprünglichen Projektantrag (Task 2.1) mehr als doppelt so viele Bakterien-Isolate hinsichtlich der Empfindlichkeit spezieller Bakteriengruppen gegenüber Glyphosat und glyphosathaltiger Herbizide untersucht. Anstatt der ursprünglich vorgeschlagenen 200 Isolate wurden insgesamt 468 Isolate der Spezies *E. coli* und *Salmonella enterica* untersucht. Aufgrund der Möglichkeit, eine große Zahl repräsentativer historischer, vor dem verbreiteten Einsatz von Glyphosat im Pflanzenbau isolierter Bakterien-Isolate direkt zu untersuchen und mit repräsentativen aktuellen Isolaten derselben Bakterien-Spezies zu vergleichen, wurde die geplante Sammlung von Isolaten vor und nach Glyphosatbehandlung eines Feldes (Task 2.2) durch diesen Ansatz ersetzt. Eine Konzentration auf Enterobacteriaceae erfolgte, da in der Nutztierhaltung Restmengen von Glyphosat über das Futter aufgenommen werden und somit Bakterien im Gastrointestinaltrakt diesen Glyphosatkonzentrationen am ehesten ausgesetzt sind. Von der ursprünglich geplanten Untersuchung von MRSA-Isolaten (Methicillin resistenten *Staphylococcus aureus*) wurde daher abgesehen, da diese sich hauptsächlich auf der Haut von Schweinen befinden, wo eine Exposition gegenüber Glyphosat bei Nutztieren in ungleich geringeren Konzentrationen zu erwarten ist.

Jedoch war es aus Kapazitätsgründen auch leider nicht möglich gram-positive Darmbakterien, hier insbesondere Enterokokken zu untersuchen.

Bei den Resistenzinduktionsversuchen des Task 3 sollten ursprünglich auch einzelne Hilfs- und Beistoffe, die in Formulierungen vorkommen, untersucht werden. Da es nicht möglich war herauszufinden, welche Stoffe konkret in Herbizid-Formulierungen in welchen Konzentrationen enthalten sind, musste dieser Punkt entfallen. Jedoch wurden alle Untersuchungen zumindest in der Vorversuchsphase immer vergleichend mit reinem Glyphosat und der glyphosathaltigen Formulierung Roundup® LB Plus durchgeführt.

Durch die Entscheidung, bei Isolaten aus den Evolutions- bzw. Resistenzinduktionsversuchen direkt das gesamte Genom zu sequenzieren, wurde die ursprünglich geplante Untersuchung des *aroA*-Genes mittels PCR obsolet (Task 4.1). Klonierungs-, Transformations- und Deletions-Experimente (Task 4.3) waren aufgrund der Ergebnislage nicht indiziert.

Weiterführende Untersuchungen zur Wirkung von Glyphosat auf Bakterien in der Nutztierhaltung sollten ggfs. folgende Ansätze verfolgen:

Insgesamt sollten zur Verifizierung der gefundenen Sachverhalte die Untersuchungen zur Glyphosat-Empfindlichkeit wichtiger zoonotischer Erreger in künftigen Untersuchungen in mehreren Laboren gleichzeitig und mit einem ggfs. noch repräsentativeren Isolate-Kollektiv durchgeführt werden. Zudem sollte in einer systematischen Studie untersucht werden, ob die beobachteten Toleranzsteigerungen gegenüber Glyphosat und Roundup® LB Plus auf eine Glyphosat-Exposition oder auf eine Co-Induktion durch Resistenzbildung gegenüber Antibiotika zurückzuführen sind. Weiterhin sollten die Isolate mit einer erhöhten Glyphosat-Unempfindlichkeit ($MKH > MIC_{95}$) in weiterführenden Untersuchungen systematisch auf die genetischen Grundlagen dieser Unempfindlichkeit hin untersucht werden. In weiterführenden Untersuchungen sollte auch die Wirkung von Glyphosat auf Enterokokken sowie auch zu enteralen Kommensalen erfolgen, um auch Aussagen hinsichtlich der Glyphosat-Empfindlichkeit bei dieser klinisch wichtigen bzw. für die Darmgesundheit wichtigen Bakteriengruppen zu erlangen sowie zu einer etwaig über die Zeit zugenommenen erhöhten Glyphosat-Unempfindlichkeit. Weiterhin scheinen pH-Wert und Medium (Anzahl an Salzen, die Umgebungsbedingungen, Ansäuerung, Supplementierung) einen bisher noch nicht genau definierbaren Einfluss auf die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber Glyphosat zu haben. Dies sollte aufgeklärt werden und darauf basierend ein Standard-Protokoll für künftige derartige Untersuchungen entwickelt werden.

Da Glyphosat anscheinend eher bakteriostatisch und erst in hohen Dosen bakterizid wirkt, ist der Einfluss von Glyphosat auf eine Persistenz von pathogenen Erregern in der Umwelt bisher noch ungeklärt. Sub-letale Konzentrationen, die in der Umwelt auch vorhanden sein können, könnten einen Einfluss auf Stressreaktion und auf den horizontalen Gentransfer von Virulenz- und Antibiotikaresistenz-Genen bzw. -Plasmiden haben. Die Assoziation zwischen Glyphosat und Antibiotikaresistenz ist weiter offen.

Die Proteomdaten der glyphosatempfindlichen Ancestor-Bakterien, die in den Resistenzinduktionsversuchen gegenüber subinhibitorischen Konzentrationen von Roundup LB Plus exponiert waren und der daraus generierten Mutanten zeigen, dass

an Persistenz, Motilität, Eisenakquisition, Plasmidreplikation, Antibiotikaresistenz und Pathogenität beteiligte Proteine bei einer Glyphosateinwirkung vermehrt exprimiert werden. Da diese Prozesse für die Persistenz und die Infektiosität von Infektionserregern sowie für den Erfolg von Antibiotika-Behandlungen wichtig sind, erscheint es sinnvoll, mittels glyphosatempfindlicher Ancestor-Bakterien und daraus generierter resistenter Mutanten weiter zu untersuchen, wie diese Prozesse genau beeinflusst werden. Insbesondere sollten phänotypische Persistenz-, Motilitäts- und Konjugations-Assays durchgeführt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen könnten dann die glyphosatbedingte Pathogenität und das Überleben der generierten unempfindlichen Stämme *ex vivo* und *in vivo* beurteilt werden. In diesem Kontext sollte die Roundup® LB Plus-resistente Mutante von *S. enteritidis* 12538, die eine erhöhte konstitutive Expression eines Virulenzeffektorproteins zeigt, in Zellkulturversuchen und wenn danach angezeigt anschließend tierexperimentell auf das Vorliegen einer erhöhten Pathogenität untersucht werden.

Nachdem die Untersuchungen mittels der Fermenter-Modelle sowie im Schweine-Tiermodell keinen quantitativen und qualitativen Effekt von Glyphosat hinsichtlich des Vorkommens von Salmonellen und *E. coli* in stabil etablierten enteralen Mikrobiomen ohne Nährstoffmangel aufzeigten bleibt die Frage offen, welche Einwirkungen Glyphosat- bzw. Roundup®-Rückstände auf ein sich entwickelndes Mikrobiom bei ggfs. zusätzlich zeitgleich auftretendem Mangel aromatischer Aminosäuren hat, bei dem glyphosatunempfindliche Erreger einen Selektionsvorteil haben könnten. Solche Zustände kommen physiologischer Weise zum Beispiel bei Eintagsküken und neu geborenen Ferkeln in den ersten Lebenstagen vor, sowie pathologischer Weise bei Enteritiden oder enteralen und ruminalen Stoffwechsel-Imbalancen.

Die vorstehend beschriebenen Ansätze bzw. Fragestellungen sollten künftig ggfs. auch für die für Glyphosat diskutierten Substitutionskandidaten bzw. für andere Herbizide mit einer antimikrobiellen Wirkung im Sinne einer Risikobewertung untersucht werden.

Berlin, 31.08.2019



Univ.-Prof. Dr. Uwe H. Rösler

6. Anhang

Literatur zum Stand der Wissenschaft

Effekte von Glyphosat auf Bakterien

Der Shikimate Pathway und EPSPS Enzyme bei Bakterien

Du, W. *et al.* Characterization of *Streptococcus pneumoniae* 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase and its activation by univalent cations. *Eur. J. Biochem.* 267, 222–227 (2000).

Herrmann, K. M. & Weaver, L. M. The shikimate pathway. 473–503 (1999).

O'Connell, C., Pattee, P. a & Foster, T. J. Sequence and mapping of the *aroA* gene of *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1449–60 (1993).

Schulz, A., Krüper, A. & Amrhein, N. Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. *FEMS Microbiol. Lett.* 28, 297–301 (1985).

Steinrücken, H. C. & Amrhein, N. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae* 2. Inhibition by glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine]. *Eur. J. Biochem.* 143, 351–357 (1984).

Mechanismen der Glyphosate-Resistenz bei Bakterien

Cherepenko, E., & Karpenko, O. (1999). Uptake of the herbicidal glyphosate by *Escherichia coli* K-12. *Bioscience Reports*, 19(1), 43–49. <http://doi.org/10.1023/A:1020198007883>

Eschenburg, S., Healy, M. L., Priestman, M. A., Lushington, G. H. & Schönbrunn, E. How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Planta* **216**, 129–135 (2002).

Fei, Y. Y., Gai, J. Y., & Zhao, T. J. (2013). Identification of regulated genes conferring resistance to high concentrations of glyphosate in a new strain of *Enterobacter*. *FEMS Microbiology Letters*, 349(2), 135–143. <http://doi.org/10.1111/1574-6968.12306>

Fitzgibbon, J. E., & Braymer, H. D. (1990). Cloning of a gene from *Pseudomonas* sp. strain PG2982 conferring increased glyphosate resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(11), 3382–3388.

Funke, T., Yang, Y., Han, H., Healy-Fried, M., Olesen, S., Becker, A., & Schönbrunn, E. (2009). Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97??? Ile and Pro101??? Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(15), 9854–9860. <http://doi.org/10.1074/jbc.M809771200>

Liu, C. M., McLean, P. A., Sookdeo, C. C., & Cannon, F. C. (1991). Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1799–1804.

Penalzoza-Vazquez, A., Mena, G. L., Herrera-Estrella, L., & Bailey, A. M. (1995). Cloning and sequencing of the genes involved in glyphosate utilization by *Pseudomonas pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 538–543.

Pipke, R., & Amrhein, N. (1988). Isolation and characterization of a mutant of *Arthrobacter* sp. Strain GLP-1 Which utilizes the herbicide glyphosate as its sole source of phosphorus and nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(11), 2868–2870. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/54/11/2868.abstract>

Pollegioni, L., Schonbrunn, E., & Siehl, D. (2011). Molecular basis of glyphosate resistance - Different approaches through protein engineering. *FEBS Journal*, 278(16), 2753–2766. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08214.x>

Priestman, M. A., Funke, T., Singh, I. M., Crupper, S. S. & Schonbrunn, E. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. *FEBS Lett.* **579**, 728–732 (2005).

Sun, Y. C., Chen, Y. C., Tian, Z. X., Li, F. M., Wang, X. Y., Zhang, J., Wang, Y. P. (2005). Novel AroA with high tolerance to glyphosate, encoded by a gene of *Pseudomonas putida* 4G-1 isolated from an extremely polluted environment in China. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4771–4776. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4771-4776.2005>

Stalker, D. M., Hiatt, W. R. & Comai, L. A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. *J. Biol. Chem.* **260**, 4724–4728 (1985)

Staub, J. M., Brand, L., Tran, M., Kong, Y. & Rogers, S. G. Bacterial glyphosate resistance conferred by overexpression of an *E. coli* membrane efflux transporter. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 641–647 (2012).

Gerichtete Evolution der Glyphosat-Toleranz

Castle, L. A. *et al.* Discovery and Directed Evolution of a Glyphosate Tolerance Gene (2004).

Cherepenko, Y., & Hovorun, D. M. (2005). Bacterial multidrug resistance unrelated to multidrug exporters: Cell biology insight. *Cell Biology International*, 29(1), 3–7. <http://doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.11.006>

Fei, Y. Y., Gai, J. Y., & Zhao, T. J. (2013). Identification of regulated genes conferring resistance to high concentrations of glyphosate in a new strain of *Enterobacter*. *FEMS Microbiology Letters*, 349(2), 135–143. <http://doi.org/10.1111/1574-6968.12306>

Jin, D. *et al.* Identification of a New Gene Encoding EPSPS with High Glyphosate Resistance from the Metagenomic Library. 350–355 (2007). doi:10.1007/s00284-007-0268-x

Tian, Y. *et al.* Improvement of Glyphosate Resistance through Concurrent Mutations in Three Amino Acids of the *Ochrobactrum*. **77**, 8409–8414 (2011).

Zhan, T. *et al.* Improving Glyphosate Oxidation Activity of Glycine Oxidase from *Bacillus cereus* by Directed Evolution. **8**, 1–10 (2013).

Physiologische Antwort von Bakterien auf Glyphosate

Fischer, R. S., Berry, A., Gaines, C. G., & Jensen, R. A. (1986). Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 168(3), 1147–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3096971>

Li, L., Zhou, Z., Jin, W., Wan, Y., & Lu, W. (2015). A transcriptomic analysis for identifying the unintended effects of introducing a heterologous glyphosate-tolerant EPSP synthase into *Escherichia coli*. *Molecular BioSystems*, 11(3), 852–858. <http://doi.org/10.1039/C4MB00566J>

Lima, I. S., Baumeier, N. C., Rosa, R. T., Campelo, P. M. S., & Rosa, E. A. R. (2014). Influence of glyphosate in planktonic and biofilm growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 971–975. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300029>

Lu, W., Li, L., Chen, M., Zhou, Z., Zhang, W., Ping, S., Lin, M. (2013). Genome-wide transcriptional responses of *Escherichia coli* to glyphosate, a potent inhibitor of the shikimate pathway enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Mol Biosyst*, 9(3), 522–530.

<http://doi.org/10.1039/c2mb25374g>

Romero, D. M., Ríos de Molina, M. C., & Juárez, Á. B. (2011). Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **74**(4), 741–747. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.10.034>

MHK gegenüber Glyphosat in verschiedenen Bakterienspezies

Ackermann, W., Coenen, M., Schrödl, W., Shehata, A. A. & Krüger, M. The influence of glyphosate on the microbiota and production of botulinum neurotoxin during ruminal fermentation. *Curr. Microbiol.* **70**, 374–382 (2014).

Clair, E. *et al.* Effects of roundup® and glyphosate on three food microorganisms: *Geotrichum candidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Curr. Microbiol.* **64**, 486–491 (2012).

Kurenbach, B. *et al.* Sublethal Exposure to Commercial Formulations of the Herbicides Changes in Antibiotic Susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mbio.Asm.Org* **6**, 1–9 (2015).

Krüger, M., Ali, A., Schrödl, W. & Rodloff, A. Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on *Clostridium botulinum*. *Anaerobe* **20**, 74–78 (2013).

Shehata, A. A., Schrödl, W., Aldin, A. A., Hafez, H. M. & Krüger, M. The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Curr. Microbiol.* **66**, 350–358 (2013).

Shehata, A. A., Kühnert, M., Haufe, S. & Krüger, M. Neutralization of the antimicrobial effect of glyphosate by humic acid in vitro. *Chemosphere* **104**, 258–261 (2014).

Co-Induktion von Antibiotikaresistenzen durch Glyphosat

Kurenbach, B. *et al.* Sublethal Exposure to Commercial Formulations of the Herbicides Changes in Antibiotic Susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mbio.Asm.Org* **6**, 1–9 (2015).

Penaloza-Vazquez, A., Mena, G. L., Herrera-Estrella, L., & Bailey, A. M. (1995). Cloning and sequencing of the genes involved in glyphosate utilization by *Pseudomonas pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(2), 538–543.

Glyphosat in der Behandlung von Infektionen

Coggins, J. R. *et al.* Experiences with the shikimate-pathway enzymes as targets for rational drug design. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 548–552 (2003).

Roberts, F. *et al.* Evidence for the Shikimate Pathway in Apicomplexan Parasites. **393**, 801–805 (1998).

Nosanchuk, J. D. *et al.* Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2001.

7. Literaturverzeichnis

1. Duke, S.O. and S.B. Powles, *Glyphosate: a once-in-a-century herbicide*. *Pest Management Science*, 2008. **64**(4): p. 319-25.
2. Srinivasan, P.R., *et al.*, *THE BIOSYNTHESIS OF SHIKIMIC ACID FROM D-GLUCOSE*. *Journal of Biological Chemistry*, 1956. **220**(1): p. 477-497.
3. Herrmann, K.M. and L.M. Weaver, *The Shikimate Pathway*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999. **50**: p. 473-503.

4. Fei, Y.Y., J.Y. Gai, and T.J. Zhao, *Identification of regulated genes conferring resistance to high concentrations of glyphosate in a new strain of Enterobacter*. FEMS Microbiol Lett, 2013. **349**(2): p. 135-43.
5. Funke, T., et al., *Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97 -> Ile and Pro101 -> Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from Escherichia coli*. J Biol Chem, 2009. **284**(15): p. 9854-60.
6. Foster, P.L., *Adaptive mutation: implications for evolution*. BioEssays, 2000. **22**(12): p. 1067-1074.
7. Cao, G., et al., *A novel 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase shows high glyphosate tolerance in Escherichia coli and tobacco plants*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38718.
8. He, M., Y.F. Nie, and P. Xu, *A T42M substitution in bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) generates enzymes with increased resistance to glyphosate*. Biosci Biotechnol Biochem, 2003. **67**(6): p. 1405-9.
9. He, M., et al., *A new type of class I bacterial 5-enopyruvylshikimate-3-phosphate synthase mutants with enhanced tolerance to glyphosate*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2001. **1568**(1): p. 1-6.
10. Comai, L., L.C. Sen, and D.M. Stalker, *An Altered aroA Gene Product Confers Resistance to the Herbicide Glyphosate*. Science, 1983. **221**(4608): p. 370-1.
11. Jin, D., et al., *Identification of a new gene encoding EPSPs with high glyphosate resistance from the metagenomic library*. Curr Microbiol, 2007. **55**(4): p. 350-5.
12. Sun, Y.C., et al., *Novel AroA with high tolerance to glyphosate, encoded by a gene of Pseudomonas putida 4G-1 isolated from an extremely polluted environment in China*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(8): p. 4771-6.
13. Castle, L.A., et al., *Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene*. Science, 2004. **304**(5674): p. 1151-4.
14. Zhan, T., et al., *Improving glyphosate oxidation activity of glycine oxidase from Bacillus cereus by directed evolution*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79175.
15. Pereira, J., et al., *Shikimate Kinase: A Potential Target for Development of Novel Antitubercular Agents*. Current Drug Targets, 2007. **8**(3): p. 459-468.
16. Tapas, S., et al., *Structural analysis of chorismate synthase from Plasmodium falciparum: a novel target for antimalaria drug discovery*. Int J Biol Macromol, 2011. **49**(4): p. 767-77.
17. Han, C., et al., *Biochemical characterization and inhibitor discovery of shikimate dehydrogenase from Helicobacter pylori*. FEBS J, 2006. **273**(20): p. 4682-92.
18. Nosanchuk, J.D., R. Ovalle, and A. Casadevall, *Glyphosate inhibits melanization of Cryptococcus neoformans and prolongs survival of mice after systemic infection*. J Infect Dis, 2001. **183**(7): p. 1093-9.
19. Schonbrunn, E., et al., *Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1376-80.
20. Shehata, A.A., et al., *The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro*. Current Microbiology, 2013. **66**(4): p. 350-8.
21. Krüger, M., et al., *Glyphosate suppresses the antagonistic effect of Enterococcus spp. on Clostridium botulinum*. Anaerobe, 2013. **20**: p. 74-8.
22. Warnecke, F., et al., *Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 560-5.
23. Maslowski, K.M., et al., *Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43*. Nature, 2009. **461**(7268): p. 1282-6.
24. Turnbaugh, P.J., et al., *A core gut microbiome in obese and lean twins*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 480-4.
25. Ottman, N., et al., *The function of our microbiota: who is out there and what do they do?* Front Cell Infect Microbiol, 2012. **2**: p. 104.
26. Goodacre, R., *Metabolomics of a superorganism*. J Nutr, 2007. **137**(1 Suppl): p. 259S-266S.

27. Lozupone, C.A., et al., *Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 220-30.
28. Zhang, L., et al., *Persistent Organic Pollutants Modify Gut Microbiota-Host Metabolic Homeostasis in Mice Through Aryl Hydrocarbon Receptor Activation*. Environ Health Perspect, 2015. **123**(7): p. 679-88.
29. Tralau, T., J. Sowada, and A. Luch, *Insights on the human microbiome and its xenobiotic metabolism: what is known about its effects on human physiology?* Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2015. **11**(3): p. 411-25.