

Abschlussbericht

zum Entscheidungshilfe-Verbundforschungsvorhaben

„Auswirkungen von Glyphosat auf aus Tierhaltungen stammende Bakterien“

(Akronym: Glypho-Bak)

Ausführende Stelle: Physiologisches Institut, Tierärztliche Hochschule
Förderkennzeichen: 2815HS016
Vorhabensbezeichnung: Teilvorhaben 2
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

In diesem Verbundforschungsvorhaben war das übergeordnete Ziel, Erkenntnisse darüber zu erlangen, ob und wenn ja, in welcher Weise der Einsatz von Glyphosat eine Beeinflussung des mikrobiellen Ökosystems in der Nutztierhaltung nach sich zieht. Das Vorhaben hatte verschiedene Schwerpunkte. Es sollte eine mögliche Resistenzinduktion gegen Glyphosat bei relevanten tier- und humanpathogenen Keimen, der Einfluss von Glyphosat *in vitro* und *in vivo* auf den mikrobiellen Stoffwechsel und das Mikrobiom im Rinderpansen und im Schweinedarm, sowie eine Chelatbildung durch Glyphosat beim Rind untersucht werden.

Das Verbundforschungsvorhaben war in vier Teilvorhaben unterteilt. Im Rahmen des vorliegenden Teilvorhabens 2 wurden *in vitro* Fermentationsversuche mit bovinem Panseninhalt durchgeführt, die durch die Entnahme von Proben die Basis für die angestrebten Analysen darstellten. Folgende Tasks wurden durch das Physiologische Institut der Tierärztlichen Hochschule (TiHO- PI) bearbeitet:

- **Task 1** *Literaturrecherche/-übersicht zum Stand der Wissenschaft*
- **Task 5.1** *Fermentationsversuche mit bovinem Pansensoft*
- **Task 8.1.1** *Qualitative und quantitative Analyse des Glyphosats und seiner Metabolite*
- **Task 9** *Bedeutung von Glyphosat für eine Chelatierung und die ruminale/enterale Resorption*
- **Task 10** *Einfluss von Glyphosat auf die ruminale Synthese von Mikrobenprotein*

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen von **Task 1** sollte eine umfassende Literaturrecherche zur Thematik erfolgen. Das Physiologische Institut sollte dabei insbesondere Hinweisen über durch Glyphosat verursachte Beeinträchtigungen der mikrobiellen Abbau- und Syntheseleistungen in den Vormägen der Wiederkäuer nachgehen, sowie einer durch Glyphosat beeinflussten Chelatbildung in den Vormägen und damit einhergehend einer Beeinflussung der Resorption und Exkretion von Spurenelementen und Mineralstoffen.

Der Teil der Literaturrecherche des Teilvorhabens 2 wurde Ende des Jahres 2017 fertiggestellt und an die Kooperationspartner des FU-ITU übermittelt.

Innerhalb von **Task 5.1** sollte mit Hilfe der Pansensimulationsmethode (RUSITEC, *rumen simulation technique*) der Einfluss von Glyphosat, Glyphosat-Tallowamin-Kombinationen und ggfs. Tallowamin POEA-15 auf biochemische Parameter des mikrobiellen Vormagenstoffwechsels auf der Grundlage von Dosis-Wirkungsbeziehungen untersucht werden. Zu diesen Parametern zählen der pH-Wert, das Redoxpotential, die Bestimmung der Konzentration und Produktion der kurzkettigen Fettsäuren (SCFA), der Ammoniak-Konzentration, der Verdaulichkeiten der Rohnährstoffe und der mikrobiellen Proteinsynthese mittels des Isotops ¹⁵N. Die Spendertiere für die Versuche sollten wie im Antrag beschrieben aus dem Physiologischen Institut stammen. Es sollten neben Versuchen unter physiologischen Bedingungen, auch solche durchgeführt werden, in denen definierte pathogene Erreger und antibiotikaresistente Bakterien in die Fermentationsgefäße verbracht werden.

Die biochemischen Analysen sollten im Physiologischen Institut durchgeführt werden, während die Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft (Metagenom- und Metabolom-Analyse) und die Bestimmung der Glyphosat-Konzentrationen in den gewonnenen Proben durch das UL-IB und die Beschreibung der quantitativen und qualitativen Effekte von Glyphosat auf pathogene Erreger durch FU-ITU erfolgen soll. Darüber hinaus werden Proben entnommen, in denen eine mögliche Chelatbildung von Mengen- und Spurenelementen durch Glyphosat untersucht werden soll. Bis etwa September des Jahres 2018 sollten diese Fermentationsversuche abgeschlossen worden sein.

Für die Vergleichbarkeit der In-vitro-Versuche am TiHo-PI mit den In-vivo-Versuchen in TUM-LT sollte der bovine Pansensaft von zumindest ähnlich gefütterten Spendertieren stammen. Aus diesem Grund wurde versucht, die Fütterung der zwei Rinder des TiHo-PI auf dieselben Rationen (basierend auf Mais- und Grassilage) umzustellen, wie sie in TUM-LT gefüttert werden. Das gestaltete sich schwierig, da die zwei Rinder am TiHo-PI die Futteraufnahme verweigerten. Allerdings wurde in Erfahrung gebracht, dass das Futter der Rinder im Institut für Tierernährung des Friedrich-Loeffler-Instituts in Braunschweig hauptsächlich aus Mais- und Grassilage besteht. Die Alternative zur Futterumstellung der eigenen Rinder war also der Bezug von Pansensaft aus Braunschweig, was mit dem Auto von Hannover aus in Kürze zu erreichen ist. Es konnte mit Hilfe von Thermoskannen sichergestellt werden, dass der Pansensaft über den Transportweg nicht abkühlte und das anaerobe Milieu erhalten wurde.

Es konnten bis zum Ende des Jahres 2017 alle vier geplanten Fermentationsversuchen mit dem RUSITEC-System unter physiologischen Bedingungen durchgeführt, d.h. Versuche, in denen noch keine pathogenen Erreger oder antibiotikaresistente Bakterien zum Einsatz gekommen sind. Diese vier Versuche unterscheiden sich nicht voneinander, sondern stellen Wiederholungen für die Behandlungen dar. Da in einem Versuch aufgrund der nur 12 verfügbaren Fermentationsgefäße nur max. 12 Ansätze gleichzeitig bearbeitet werden können, wurde ein Experte für Statistik aus dem Institut für Biometrie, Tierärztliche Hochschule, für das Design der Versuche zu Rate gezogen.

Es wurden zwei glyphosathaltige Formulierungen und reines Glyphosat (ohne Adjuvantien) in jeweils drei Dosierungen getestet. Hinzu kommen Fermenter, denen als Kontrolle kein Glyphosat verabreicht wird. Um alle Behandlungen und die Kontrolle gleichzeitig untersuchen zu können, waren mehrere identische Versuche notwendig, um eine ausreichende Stichprobengröße zu erhalten. Die Versuche waren also die Wiederholungen, woraus für jede Behandlung mit Glyphosat oder der glyphosathaltigen Formulierung eine Stichprobengröße von $n = 4$ resultiert. Abweichend hiervon dienten pro Versuch drei Fermentationsgefäße als Kontrolle, also nach vier Versuchen insgesamt 12.

Es wurden drei Dosierungen der glyphosathaltigen Formulierungen (Durano, RoundUp) und des reinen Glyphosats eingesetzt, um folgende Ziel-Konzentrationen in den Fermentationsgefäßen zu erreichen: 10 mg/l, 1 mg/l, 0,1 mg/l. Dabei entspricht 0,1 mg/l der bisher höchsten *in vivo* gemessene Konzentration. Die zwei weiteren Konzentrationen stellen Szenarien in beide Richtungen dar.

Für die RUSITEC-Versuche wurden folgende Parameter erhoben bzw. Proben entnommen:

- pH-Werte
- Redoxpotential
- $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentration
- Konzentration der SCFA (daraus Berechnung der Produktion der SCFA)
- Mikrobielle Proteinsynthese
- Microbiom-/Metabolom-Analyse
- Analyse der Glyphosat-Konzentration
- Erfassung des Abbaus der Rohnährstoffe

- Analyse der Chelatbildung durch Glyphosat

Aus allen Versuchen liegen Ergebnisse vor für die pH-Werte, das Redoxpotential, die NH₃-N-Konzentration, die Produktion der SCFA, den Abbau der Rohnährstoffe, den Anteil des Isotops ¹⁵N für die mikrobielle Proteinsynthese, das Metaproteom (Berichterstattung durch das UL-IB), die Glyphosat-Konzentration und aus der Analyse der Mengen- und Spurenelemente zwecks Einschätzung der Chelatbildung. Die Ergebnisse der Microbiom-Analyse (oder 16S Analytik) sind dem Schlussbericht des UL-IB zu entnehmen. Es wurde für die Auswertung und Erstellung von Graphiken der Mittelwert aus diesen vier Versuchen für die einzelnen Parameter gebildet.

Im Januar des Jahres 2018 wurde der erste RUSITEC-Versuch unter der Zugabe definierter Erreger durchgeführt. Der Versuch wurde mit sechs Fermentern durchgeführt. Alle Fermenter erhielten antibiotikaresistente *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* als Zugabe während der Versuchsphase. Drei Fermenter erhielten zusätzlich RoundUP in der Konzentration 10 mg/l, um dessen Einfluss auf die Bakterien zu bestimmen. Es wurden für TiHo-PI die Werte für das Redoxpotential und den pH-Wert ermittelt. Darüber hinaus erfolgte die Probennahme für die Analyse der Glyphosat-Konzentrationen und für das Microbiom und Metabolom. Die gesamte Berichtserstattung zu diesem Projektteil sollte durch FU-ITU erfolgen.

Das Ziel von **Task 8.1.1** war die qualitative und quantitative Analyse des Glyphosats und seiner Metabolite. Dieser Teil des Vorhabens sollte mittels GC-MS/MS und/oder LC-MS/MS Techniken in Proben aus den Fermentationsversuchen im RUSITEC-System erfolgen durch den Projektpartner UL-IB, um Rückschlüsse auf den Abbau des Glyphosats im *in vitro* Modell ziehen zu können. Die Etablierung der Analyse am UL-IB gestaltete sich schwierig, letztendlich gelang es aber und zumindest in den flüssigen Proben konnten plausible Glyphosat-Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Analyse von Glyphosat in den Futterresten aus dem RUSITEC jedoch mussten an ein Servicelabor abgegeben werden (Wessling GmbH). Dadurch konnte der ursprüngliche Zeitplan nicht eingehalten werden und es wurde u.a. aus diesem Grund eine Verlängerung des Vorhabens notwendig.

Task 9 umfasste die Bedeutung von Glyphosat für eine Chelatierung und die ruminale/enterale Resorption. Aus allen vier Fermentationsversuchen sollten Proben für die Analyse der Chelatbildung von Spuren- und Mengenelementen (Ca, Mg, P, Na, K, Zn, Cu, Fe, Mn) durch den Zusatz von Glyphosat entnommen werden. Ob sich ein Zusammenhang zwischen der

Chelatbildung und der Glyphosat-Zugabe herstellen lässt, soll überprüft werden, indem die Proben auf den Gehalt an Spuren- und Mengenelementen in Abhängigkeit von der Dosierung an Glyphosat oder der glyphosathaltigen Formulierungen untersucht werden. Dieser Task sollte bis Ende 2018 abgeschlossen worden sein. Die Analyse der Chelatbildung gestaltete sich jedoch schwieriger als erwartet. Verschiedene Ansätze wurden geprüft, was auch hier eine Verlängerung des Vorhabens notwendig machte. Die letztlichen Analysen wurden dann mit Hilfe des TUM-LT durchgeführt.

In **Task 10** wurde der Einfluss von Glyphosat auf die ruminale Synthese von Mikrobenprotein untersucht. Da sich eine veränderte ruminale Mikrobiota unter dem eventuellen Einfluss von Glyphosat auch auf die mikrobielle Proteinsynthese auswirken kann, ist es von großer Bedeutung, die ruminale Synthese des mikrobiellen Proteins zu quantifizieren. Dies erfolgte unter Verwendung des natürlichen Stickstoff-Isotops ^{15}N und dessen Zugabe in die Fermentationsgefäße des RUSITEC-Systems.

Ursprünglich war geplant, das Vorhaben bis Ende des Jahres 2018 zu beenden. Einige Faktoren jedoch wirkten sich nachteilig auf das Erreichen dieses zeitlichen Zieles aus. Zum einen kam es zu einer Kündigung des Doktoranden, der die Versuche durchführen sollte. Es musste eine qualifizierte Ersatzperson gefunden werden, und wir entschieden uns für einen Hiwi, der in der Vergangenheit schon RUSITEC-Versuche durchgeführt hatte. Die zweite Schwierigkeit ergab sich durch die Etablierung der Glyphosat-Analyse am UL-IB. Diese verlief nicht reibungslos und trug daher weiter zu der zeitlichen Verzögerung des Abschlusses des Vorhabens bei. Dies trifft auch für die Analyse der Chelatbildung zu. Daher wurde das Vorhaben um ein halbes Jahr bis zum 30.6.2019 verlängert.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Glyphosat (*N*-(Phosphonomethyl)-Glycin) wurde 1950 von dem Schweizer Chemiker Henri Martin entwickelt (Franz et al. 1997). Seine Verbreitung als aktiver Wirkstoff in kommerziell erhältlichen Herbiziden startete im Jahr 1974 (Franz et al. 1997). Bis heute sind auf Glyphosat basierende Herbizide diejenigen, die weltweit am häufigsten verwendet werden. Bei Glyphosat handelt es sich um ein Organophosphorherbizid, welches die 5-Enolpyruvyl-Shikimate-3-Phosphat synthase (EPSPS) im Shikimat Weg inhibiert (Boocock & Coggins 1983; Steinrücken & Amrhein 1980). Dadurch wird die Produktion aromatischer Aminosäuren aus Shikimat-3-Phosphat reduziert oder

inhibiert und Shikimat-3-Phosphat wird zu Shikimat, welches in den Zellen akkumuliert (Steinrücken & Amrhein 1980). Es sind verschiedene Gründe für den darauffolgenden Zelltod durch die Inhibierung der EPSP denkbar: eine unzureichende Aminosäure Synthese (Jaworski 1972), welche am ehesten vermutet wird, oder eine Depletion von Kohlenstoff oder Phosphat für andere essentielle Stoffwechselwege (Servaites et al. 1987; Siehl 1997).

Da EPSPs sowohl in Pflanzen als auch in Mikroorganismen und Pilzen vorhanden ist (Siehl 1997), handelt es sich bei Glyphosat um ein nicht selektives Herbizid. Es wurde allgemein angenommen, dass Glyphosat nicht schädlich für das Tierreich aufgrund der fehlenden EPSPs ist (Williams et al. 2012). Jedoch befinden sich im Verdauungstrakt von Tieren auch Mikroorganismen, die eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der physiologischen Funktion des Darms spielen (Jandhyala et al. 2015). Glyphosat wird verdächtigt, die gastrointestinale Mikroflora zu beeinflussen, so dass es zu einer Dysbiose kommt.

Es wurde eine größere Empfindlichkeit der sog. nützlichen Mikroorganismen der Microbiota beim Geflügel, wie *Enterococcus* und *Lactobacillus*, gegenüber des Herbizids Roundup UltraMax[®] verglichen mit potentiell pathogenen Bakterien beobachtet bei getrennter Kultivierung (Shehata et al. 2013). Ob dieser Effekt dem Glyphosat alleine zuzuschreiben ist oder den Hilfsstoffen, die im Herbizid enthalten sind, bleibt in dieser Studie unbeantwortet. In einem anderem Experiment wurde neben dem Herbizid Roundup UltraMax[®] mit einer Glyphosat-Konzentration von 450 mg/ml auch Glyphosat (N-(Phosphonomethyle)glycin) alleine eingesetzt (Krüger et al. 2013). Das Ziel dieser Untersuchung war es, inhibierende Effekte beider Substanzen auf Kulturen von *Enterococcus spp.* und *Clostridium botulinum* zu dokumentieren, aber auch inhibierende Effekte von *Enterococcus* in einer Kokultur mit *C. botulinum*. Die Autoren berichten, dass das Wachstum von *C. botulinum* reduziert wurde und die Produktion von Botulinum-Toxin durch *Enterococcus spp.* in der Kokultur inhibiert wurde, aber es lassen sich in dieser Studie keine Informationen über signifikante Änderungen finden. Die Zugabe hoher Dosierungen (1 mg/ml) von Roundup UltraMax[®] oder Glyphosat zu einer Kultur von *C. botulinum* führte zu reduziertem Wachstum. Die Autoren schlußfolgern, dass Roundup UltraMax[®] toxischer zu sein scheint als Glyphosat alleine. Dieser verstärkende Effekt von Glyphosat durch die Formulierung (in diesem Fall Roundup[®]) wird auch in einer Studie mit *Geotrichum candidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* beschrieben (Clair et al. 2012). In geringen Konzentrationen wird das Wachstum von *Enterococcus spp.* durch Roundup UltraMax[®] und

Glyphosat reduziert (Krüger et al. 2013). Allerdings fehlt ein Ansatz, der den Zusammenhang zwischen dem Additiv, *C. botulinum* und *Enterococcus spp.* in dieser Untersuchung herstellt. Effekte von Roundup UltraMax® und Glyphosat auf eine Kokultur von *C. botulinum* und *Enterococcus spp.* wurden nämlich nicht untersucht. Daher kann auch keine Schlußfolgerung im Hinblick auf Effekte von Glyphosat oder dem Herbizid auf eine Kokultur gezogen werden. Außerdem werden keine Informationen über statistisch signifikante Änderungen in dieser Untersuchung bereitgestellt. Außerdem bleibt die Frage offen, wie die komplette Mikrobiota im Darm auf die Applikation von Roundup Ultramax® reagiert, denn Shehata et al. (2013) und Krüger et al. (2013) haben nur den Einfluss auf einzelne Spezies getrennt voneinander untersucht.

Ein Schritt weiter sind Ackerman et al. (2015) gegangen. Hier wurde der Einfluss von Glyphosat auf die gesamte ruminale Mikrobiota *in vitro* in einem Batch-System untersucht. Jedoch ist eine Inkubationsperiode von 48 Stunden nicht ausreichend, um Rückschlüsse auf den Pansenstoffwechsel *in vivo* ziehen zu können. Zusammengefasst wurde beobachtet, dass, obwohl die Zahlen einiger Protozoa und Bakterien-Spezies significant abnahmen infolge der Zugabe von Glyphosat (insbesondere bei den höchsten Konzentrationen von 100 µg/ml), das Ausmaß dieser Veränderungen jedoch relativ gering war und somit die Bedeutung der Änderung unklar bleibt (Ackermann et al. 2015).

Im Gegensatz dazu kann mit der Rumen-Simulationstechnik (RUSITEC), einer semi-kontinuierlichen Inkubationsmethode, die gesamte Mikroorganismen-Population aus dem Pansen über längere Zeiträume untersucht werden. Diese Methode wurde angewendet, um den Einfluss eines glyphosathaltigen Herbizids in zwei Dosierungen auf den ruminalen Stoffwechsel und die Bakterien *in vitro* über einen längeren Zeitraum (sechs Tage Äquilibration, zehn Tage Kontroll- und Versuchsperiode) zu untersuchen (Riede et al. 2016). Es wurde eine signifikante Abnahme der NH₃-N-Konzentration und ein Anstieg der Isovalerat-Produktion infolge einer hohen Glyphosat-Zugabe von 2.92 mg täglich festgestellt. Dieser Befund führte zur Diskussion darüber, ob glyphosathaltige Herbizide möglicherweise eine Stimulation des mikrobiellen Wachstums bewirkt haben könnten bei gleichzeitigem Anstieg des Proteinabbaus (Riede et al. 2016). Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass die hohe Dosis von 2.92 mg täglich die maximale dietätische Zufuhr von Glyphosat bei Rindern übersteigt, welche sich auf 103 mg/kg Trockenmasse beläuft (Germany 2013). Adverse Effekte von glyphosathaltigen Herbiziden auf

den ruminalen Stoffwechsel oder die mikrobielle Gemeinschaft der Bakterien und Clostridien konnten nicht nachgewiesen werden (Riede et al. 2016).

Da Glyphosat als Chelatbildner in der Lage ist, Spurenelemente zu binden (Sprankle et al. 1975, Glass 1984), wird in einer deskriptiven Untersuchung vermutet, dass es einen Einfluss auf die Konzentrationen der Spurenelemente im Pansen des Wiederkäuers geben könnte, welcher zu einem Defizit von Mn, Cu, Zn, Se, Co, B und Fe aber auch Mengenelementen wie Mg und Ca führt und auf diese Weise die Gesundheit der Wiederkäuer beeinflusst (Krüger et al. 2013). Allerdings gibt es keine Ergebnisse aus experimentellen Untersuchungen hierzu. Dies gilt auch für Effekte von Glyphosat oder dessen Formulierung auf die mikrobielle Proteinsynthese.

Die Ergebnisse einer deskriptiven Studie von vier ruminalen Pilz-Spezies führte zu der Schlußfolgerung, dass Glyphosat einen modulierenden Effekt auf die Mycobiota in Milchkühen habe (Schrödl et al. 2014). Dafür wurden Blut-, Urin- und Pansensaftproben von 14 Milchviehbetrieben in Deutschland untersucht. Die Mengen von Glyphosat wurden im Urin mit Hilfe eines ELISA gemessen. Hohe Level an Glyphosat wurden mit einer reduzierten Anzahl an Mucorales-Spezies im Pansensaft assoziiert. Jedoch handelt es sich bei dieser Untersuchung nicht um eine kontrollierte Fütterungs-Studie, und das Fütterungsregime sowie die Glyphosatzmengen, welche von den Tieren aufgenommen wurden, waren unbekannt. Daher existiert keine Grundlage für diese Spekulationen.

Hüther et al. (2005) führte eine kontrollierte Fütterungsstudie an Milchkühen durch, in der der Einfluss von Glyphosat auf verschiedene ruminale Fermentations-Parameter untersucht wurde. Es wurden keine adversen Effekte von Roundup Ultra® auf den Abbau der Trockenmasse oder NDF gefunden. Ruminale Fermentations-Parameter wie pH-Wert und Ammoniak waren im normalen Bereich für alle Behandlungen. Obwohl keine Effekte von Glyphosat nachgewiesen worden sind, diskutieren die Autoren mögliche kurzzeitige Veränderungen im bakteriellen Wachstum und der Aktivität, aber auch entwickelte Resistenzen gegenüber der Behandlung mit Roundup Ultra®, welche verantwortlich sein könnten für dieses Ergebnis. Jedoch war dies nicht Teil der Untersuchung.

Eine weitere kontrollierte Fütterungsstudie widmete sich dem Einfluss von Glyphosat auf die Exkretionswege bei der Milchkuh (von Soosten et al. 2016). Es wurde berichtet, dass Glyphosat zu $61 \pm 11\%$ via Fäzes und zu $8 \pm 3\%$ via Urin ausgeschieden wird, und zwar unabhängig vom mit

dem Futter aufgenommenen Level an Glyphosat. Die Exkretion von Aminomethylphosphonsäure (AMPA), dem Hauptabbauprodukt von Glyphosat, erfolgte zu $48 \pm 8\%$ via Fäzes und $10 \pm 3\%$ via Urin. Weder Glyphosat noch AMPA wurden in der Milch nachgewiesen. Die scheinbare Retention von Glyphosat und AMPA lag bei $31 \pm 13\%$ und $42 \pm 9\%$. Die Ergebnisse lassen die Schlußfolgerung zu, dass Glyphosat metabolisiert sein worden könnte.

Obwohl die aufgenommene Glyphosat-Menge unbekannt ist, wurde in keiner von 114 deutschen Muttermilchproben Glyphosat nachgewiesen (Steinborn et al. 2016). Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse von Von Soosten et al. (2016).

2 Material und Methoden

Die Rumen-Simulationstechnik wurde von Czerkawski und Breckenridge entwickelt und 1977 erstmals beschrieben. Es handelt sich dabei um eine semi-kontinuierliche Inkubationsmethode zur langzeitigen In-vitro-Untersuchung des mikrobiellen Stoffwechsels im Pansen von Wiederkäuern. Es wurde vier identische Versuchsdurchgänge der Rumen-Simulationstechnik mit zwölf Fermentern (Volumen ca. 700 ml) nach dem Standard Protokoll (Öztürk et al. 2005) durchgeführt. Zu Versuchsbeginn wurde sowohl gepoolter fester als auch flüssiger Panseninhalt aus zwei ausgewachsenen Rindern über eine Pansenfistel entnommen. Als Spendertiere dienten die Rinder des Instituts für Tierernährung des Friedrich-Loeffler-Instituts in Braunschweig. Der flüssige Panseninhalt wurde mittels Filtration durch quadratisch zugeschnittenen doppeltlagigen Verbandmull (Gazin[®], 80 cm x 5 m, Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, D-56579 Rengsdorf) aus dem festen Panseninhalt gewonnen. Es wurden der pH-Wert und das Redoxpotential in der Flüssigkeit bestimmt. Für die Inokulation wurde zunächst pro Fermenter 70 g fester Panseninhalt in einen Nylonbeutel eingewogen. Dieser wurde zusammen mit einem weiteren, substratgefüllten Nylonbeutel in das Innengefäß verbracht und in dem Fermenter platziert. Anschließend wurde 730 ml flüssiger Panseninhalt hineingegossen. Während der gesamten Dauer wurde der flüssige Panseninhalt bei 39°C temperiert.

Die gesamte Versuchsdauer wurde unterteilt in eine Äquilibrationsphase von sechs Tagen und eine Versuchsphase von neun Tagen. Die Nylonbeutel wurden mit 15 g einer Mischung von getrockneter Grassilage (49,5%), getrockneter Maissilage (39,7%), Weizenschrot (5,0%), getrockneter Sojakuchen (5,0%) und Mineralfutter (0,8%) gefüllt (OS 92,14% TM; XP 12,92% TM;

XL 4,61% TM; NDF 50,85% TM; ADF 25,39% TM; ADL 2,46% TM). Es wurde sichergestellt, dass alle Substanzen glyphosatfrei waren. Es handelte sich um die gleiche Futtermischung, die auch für die *in vivo* Versuche der TUM-LT verwendet wurde. Während der Versuchsphase wurden drei Dosierungen (0.1 mg/l, 1 mg/l, 10 mg/l) von Glyphosat (monoisopropylamine salt solution; 400 mg/ml) und von zwei glyphosathaltigen Herbiziden (Roundup LB plus und Durano TF; 486 mg/ml) täglich direkt in die Fermenter appliziert. Die Lösungen enthielten die erwarteten Glyphosat-Konzentrationen, wie Analysen durch die Firma Wessling GmbH zeigten. Die niedrigste Glyphosat-Dosierung entsprach der *in vivo* am höchsten gefundenen (Von Soosten et al. 2016). Daraus folgt, dass pro Versuchsdurchgang jeweils nur ein Fermenter eine Dosierung der entsprechenden Zugabe erhalten hat. Drei Fermenter dienten als Kontrolle. Die Fermenter wurden mit einem dem Speichel von Wiederkäuern nachempfundenen Puffer (28 mmol/l NaCl; 7,69 mmol/l KCl; 0,5 mmol/l HCl (1N); 0,22 mmol/l CaCl₂ · 2 H₂O; 0,63 mmol/l MgCl₂ · 6 H₂O; 4,3 mmol/l NH₄Cl; 10 mmol/l Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 10 mmol/l NaH₂PO₄ · H₂O; 97,90 mmol/l NaHCO₃; 0,70 mmol/l NH₄Cl (10 At.% ¹⁵N)) perfundiert. Der Flüssigkeitsturnover lag bei einem Mal pro Tag.

Eine Übersicht über den Versuchablauf und die Probennahmen gibt Abb.1. Die Glyphosat-Analysen des Futters, der Glyphosat-Stammlösungen und der Futterreste am letzten Tag aus den Fermentern erfolgten durch die Firma Wessling GmbH. Die Analyse der Fermenterüberläufe wurde von den Kooperationspartnern UL-IB ausgeführt. Hierfür wurden Überlauf-Proben von Tag 16 verwendet.

Täglich wurden der pH-Wert und das Redoxpotential in den Fermenterflüssigkeiten bestimmt. Der pH-Wert wurde über 30 s mit einem pH-Meter (Digital-pH-Meter 646, Knick GmbH & Co. KG, D-14163 Berlin) und einer pH-Elektrode (InLab[®] Routine, Mettler-Toledo GmbH, D-35353 Gießen) gemessen. Täglich wurde dafür vor der ersten Messung das pH-Meter für den pH-Wert von 4,01 und 7,00 (pH-Pufferlösungen, Mettler-Toledo GmbH, D-35353 Gießen) kalibriert. Im Anschluss wurde das Redoxpotential [mV] über 60 s mit Hilfe eines pH-Meters (Digital-pH-Meter 646, Knick GmbH & Co. KG, D-14163 Berlin) und einer Redox-Elektrode (InLab[®] 501 bzw. InLab[®] Redox Pro, Mettler-Toledo GmbH, D-35353 Gießen) erfasst.

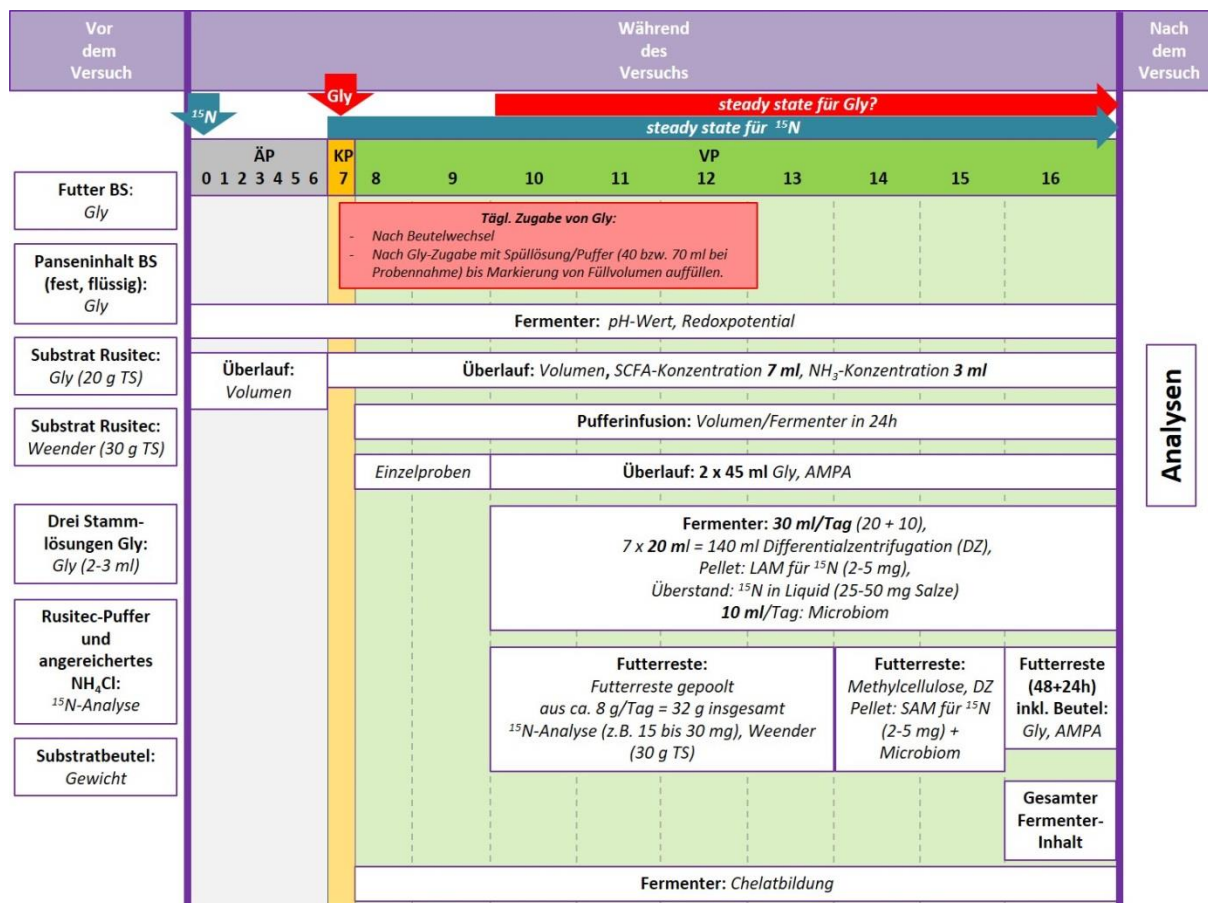


Abb. 1: Übersicht über den Versuchsablauf.

Die Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) und des $\text{NH}_3\text{-N}$ in den Überläufen/Effluents wurden ebenfalls täglich bestimmt. Die Konzentrationen der SCFA Acetat, Propionat, Butyrat, Isovalerat und Valerat wurden gaschromatographisch (Gaschromatograph 5890 Series II, Hewlett Packard, D-71034 Böblingen) bestimmt. Dafür wurden die tiefgefrorenen Proben aus der Überlaufflüssigkeit bei 4°C im Kühlschrank aufgetaut. Die Proben wurden 20 min bei 4°C und 40.000 g zentrifugiert (Rotor SM24, Sorvall® RC-5C, Sorvall Instruments, Du Pont Company, Wilmington, USA). Vom Überstand wurde 1 ml abgenommen, mit 100 µl 98%-iger Ameisensäure versetzt und vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min folgte ein zehnmütiger Zentrifugationsschritt bei 4.000 g (Minifuge 2, Heraeus-Christ GmbH, D-38835 Osterode). Vom Überstand wurde 1 ml in luftdicht verschließbare Rollrand-Ampullen (Agilent Technologies GmbH & Co. KG, D-76337 Waldbronn) überführt. Für die Gaschromatographie wurde eine von Hand gestopfte Trennsäule aus Glas (Länge: 1,8 m; Ø innen: 2 mm) verwendet. Als Trennmateriale diente Chromosorb WAW 80/100 mesh, mit 20% Neopentyl-Glycol-Succinat (NPGS) und 2% ortho-Phosphorsäure (Analyt-MTC Messtechnik GmbH, D-79379 Müllheim). Nach

jeder zehnten Probe wurde ein externer Standard (Merck KGaA, D-64271 Darmstadt) gemessen, wodurch eine Berechnung der Konzentrationen der einzelnen SCFA [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] in der Überlaufflüssigkeit möglich war. Die Produktionsraten [$\text{mmol}\cdot\text{d}^{-1}$] für Acetat, Propionat, Butyrat, Isovalerat und Valerat wurden mit Hilfe der über 24 h gesammelten Überlaufvolumina [$\text{ml}\cdot\text{d}^{-1}$] ermittelt. Zusätzlich wurden die molaren Anteile der einzelnen SCFA an der gesamten Menge der SCFA berechnet.

Die Bestimmung der Ammoniak-Konzentration in der Überlaufflüssigkeit und in der RUSITEC-Pufferlösung wurde photometrisch mit der Harnstoff/Ammoniak-Test-Combination (Roche Diagnostics, D-68305 Mannheim) durchgeführt. Dieser Nachweis beruht auf der Berthelot-Reaktion. Ammoniak bildet dabei in Anwesenheit von Hypochlorit und Phenol einen blauen Farbstoffkomplex, dessen Absorption im Photometer (DU 640, Beckman Coulter GmbH, D-47807 Krefeld) bei einer Wellenlänge von 546 nm messbar ist.

Die Weender Rohnährstoff-Analyse des Futters und der Futterreste wurde durch TUM-LT durchgeführt. Es wurden der Gehalt der Rohasche (XA), der organischen Substanz (OS), des Rohproteins (XP), der neutralen (NDF), der sauren Detergenzienfaser (ADF) und des Säure-Detergenz-Lignins (ADL) untersucht (VDLUFA 2006). Die Verdaulichkeiten der Futterreste nach 48 h Inkubation im Fermenter konnte anhand der Ergebnisse der Analyse unter Verwendung eines Standards (unverdautes Futter) berechnet werden.

Der natürlich vorkommende Stickstoff besteht hauptsächlich aus dem Isotop ^{14}N . Das ebenfalls stabile Isotop ^{15}N macht nur einen Anteil von 0,3663% aus. Zur Bestimmung der mikrobiellen Proteinsynthese wurde das Isotop ^{15}N als Tracersubstanz für die Markierung der Mikroben eingesetzt, indem mit der Pufferlösung ein höherer ^{15}N -Anteil als natürlich verfügbar zugeführt wurde. Dies wurde durch die Zugabe von $0,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ mit einem ^{15}N -Anteil von 10 Atom% realisiert. Nach der Aufbereitung der Proben wurde der erreichte ^{15}N -Anteil in den Futterresten, in der Fermenterflüssigkeit und in den sog. Referenzmikroben der LAM und SAM gemessen. Zunächst wurden aus der Fermenterflüssigkeit für die Gewinnung der LAM für die Bestimmung der mikrobiellen Proteinsynthese täglich 20 ml entnommen und bei -20°C eingefroren. Am Ende des RUSITEC-Versuchs wurden die für jeden Fermenter gesammelten Proben über die gesamte Versuchsphase vereinigt und aufbereitet. Die zwei Beutel an Tag 14 und 15 dienten der Gewinnung der an die Futterpartikel gebundenen Mikroorganismen (*solid associated microorganisms*, SAM) genau wie die LAM für die Bestimmung der mikrobiellen Proteinsynthese.

Zur Ablösung der SAM von den Futterpartikeln wurde Methylcellulose eingesetzt (Minato et al. 1966). Die letzten zwei Nylonbeutel wurden zunächst in 150 ml vorgewärmter Methylcellulose-Lösung (5 g Methylcellulos; 45 g NaCl; ad 5000 ml Aqua dest.) bei 39°C für 45 min inkubiert. Nach der Zugabe von 200 ml 4°C kalter Methylcellulose-Lösung schloss sich eine vierstündige Inkubation der Beutel bei 4°C an. Die Beutel wurden gut ausgequetscht und der Inhalt verworfen. Die Differentialzentrifugation (Brandt & Rohr 1981) erfolgte anschließend zur Isolierung der Referenzmikroben für die Lösung der SAM und für die über die Versuchsphase vereinigten Proben der LAM. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach der ersten Zentrifugation bei 2.000 g für 5 min (Rotor SS34, Sorvall® RC-5C, Sorvall Instruments, Du Pont Company, Wilmington, USA) wurde der Überstand bei -20°C üN eingefroren. Dieser wurde danach im Kühlschrank aufgetaut und einer zweiten Zentrifugation bei 2.000 g für 5 min unterzogen. Wiederum wurde der Überstand abgenommen, in eine neues Zentrifugen-Röhrchen überführt und das Pellet verworfen. Es folgte eine Zentrifugation bei 27.500 g für 15 min. Anschließend wurde der komplette Überstand der LAM-Proben für die spätere Analyse des ¹⁵N-Anteils in der Fermenterflüssigkeit abgenommen. Die von Futterpartikeln reine Mikrobenmasse der SAM und LAM bildete nun das Pellet, welches mit 10 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen und bei 27.500 g für 15 min zentrifugiert wurde. Nach erneutem Waschen des Pellets wurde die letzte Zentrifugation wiederholt, der Überstand verworfen, das Pellet in neue Probengefäße überführt, gewogen und bei -20°C eingefroren. Für die Bestimmung der ¹⁵N-Anreicherung im Massenspektrometer musste nicht nur die Mikrobenmasse, sondern auch der abgenommenen Überstandes der zentrifugierten Fermenterflüssigkeit gefriergetrocknet und danach mit einem Glasstab staubfein zerrieben werden. Die ¹⁵N-Anreicherung in den Futterresten, der Fermenterflüssigkeit und der Referenzmikroben (SAM, LAM) wurde mit einem Massenspektrometer (TracerMAT, Thermo Fisher Scientific GmbH, D-63303 Dreieich) nach Veraschung in einem Elementaranalysator (EA 1108, Fisons Instruments GmbH, D-55252 Mainz-Kastel) gemessen.

Der täglich von den LAM assimilierte Stickstoff wurde aus dem Input von ¹⁵N minus dem Output von ¹⁵N geteilt durch den ¹⁵N-Anteil am gesamten N der isolierten LAM-Referenzmikroben errechnet. Zur Ermittlung des täglich assimilierten Stickstoffs durch die SAM wurde folgender Rechenweg gewählt: $((^{15}\text{N in den Futterresten} - ^{15}\text{N natürliche Anreicherung}) \times \text{N Menge in den Futterresten}) / (^{15}\text{N in den SAM} - ^{15}\text{N natürliche Anreicherung})$. Die synthetisierten Mengen des mikrobiellen Proteins von LAM bzw. SAM wurden durch Multiplikation von N_{LAM} bzw. N_{SAM} mit

6,25 unter der Annahme eines Protein-Stickstoffgehalts von 16% berechnet. Das insgesamt synthetisierte Mikrobenprotein ergibt sich aus der Summe des LAM- und SAM-Proteins. Aus der Division des gesamten synthetisierten Proteins [$\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$] durch die fermentierte OS [$\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$] wurde die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese (EMP) errechnet. Sie gibt die gesamte Menge des mikrobiell synthetisierten Proteins pro kg abgebauter OS an.

Für die Analyse der Mengen- und Spurenelemente durch TUM-LT wurde Fermenterflüssigkeit verwendet, die mittels Differentialzentrifugation in einen Überstand und das Pellet separiert wurde. Dann wurde ein Mikrowellenaufschluss für die weitere Analyse durchgeführt. Die Messung der Proben erfolgte für Na mittels Atomabsorptionsspektrometrie, für die anderen Elemente durch Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma.

Proben für die Analyse des Metaproteom und des Microbiom wurden ebenfalls entnommen und dem UL-IB zur Verfügung gestellt.

Die Effekte der Behandlung, der Glyphosat-Konzentration, der Zeit und deren Interaktion wurde statistisch analysiert mit dem Mixed Models Analysis (SAS Enterprise Guide).

3 Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Die Ergebnisse der vier gleich aufgebauten RUSITEC-Versuche mit den jeweiligen Mittelwerten ($\text{MW} \pm \text{SD}$; $n = 4$) ist in den folgenden Abbildungen dargestellt. Die pH-Werte für alle Behandlungen und der Kontrollen liegen zwischen 6,4 und 6,8 (Abb. 2). Für die Redoxpotentiale wurden Werte von -300 mV bis -200 mV erreicht (Abb. 2). Es gibt keinen statistisch signifikanten Einfluss von Glyphosat oder glyphosathaltiger Formulierungen auf den pH-Wert oder das Redoxpotential.

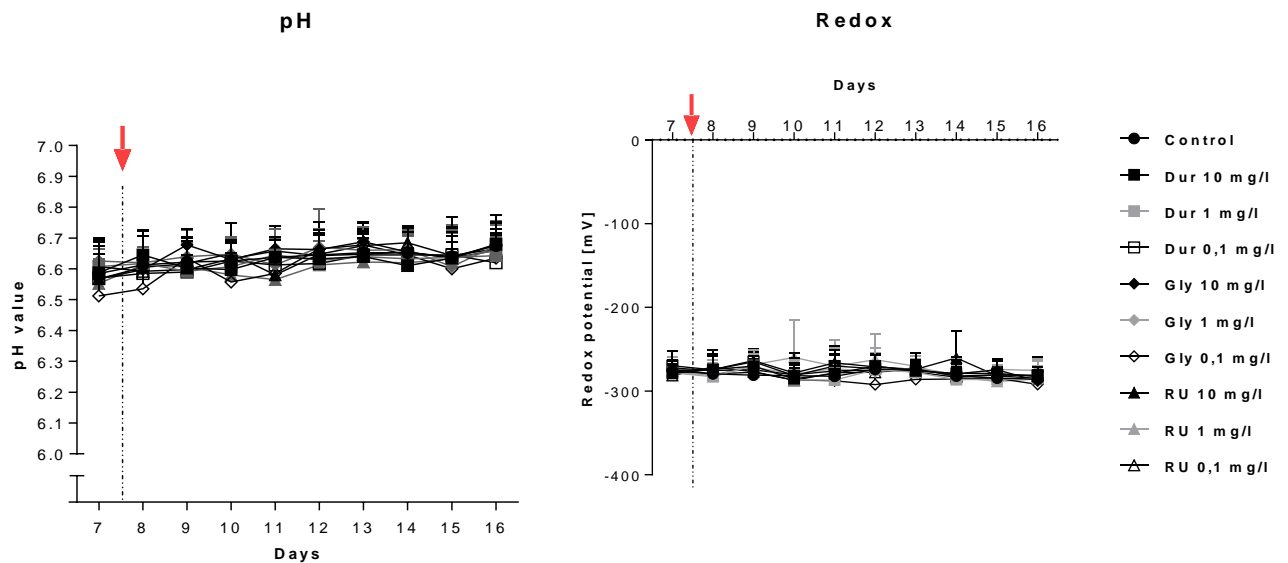


Abb. 2: Verlauf der pH-Werte und der Redoxpotentiale über die Versuchszeit (roter Pfeil: Zugaben; Dur: Durano; Gly: reines Glyphosat; RU: RoundUp; MW \pm SD; n = 4)

Die Konzentrationen des $\text{NH}_3\text{-N}$ liegen im Bereich von 7,5 mmol/l bis 15 mmol/l (Abb. 3), und damit über den 5 mmol/l, die mit dem Puffer infundiert werden, um ein optimales mikrobielles Wachstum zu erzielen. Ohne Ergebnisse aus den ^{15}N -Analysen lässt sich auch hier schon sagen, dass die Synthese von mikrobiellem Protein, also mikrobielles Wachstum, stattgefunden hat. Es gibt keinen signifikanten Einfluss von Glyphosat oder glyphosathaltiger Formulierungen auf die $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentrationen.

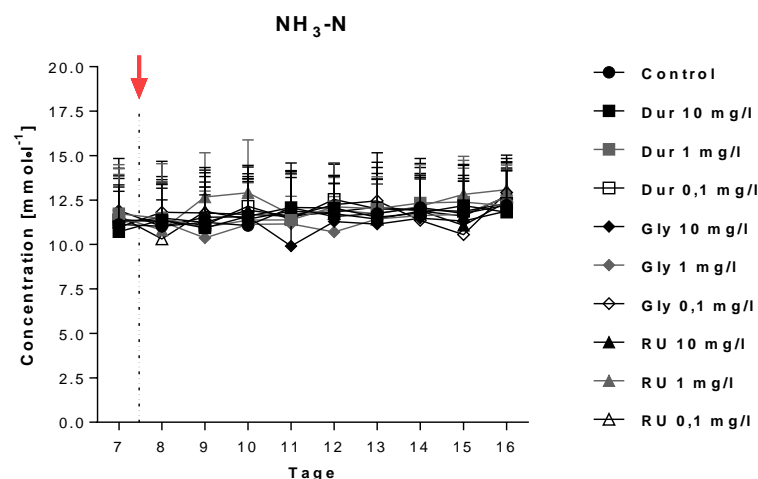


Abb. 3: Verlauf der $\text{NH}_3\text{-N}$ -Konzentrationen über die Versuchszeit (roter Pfeil: Zugaben; Dur: Durano; Gly: reines Glyphosat; RU: RoundUp; MW \pm SD; n = 4)

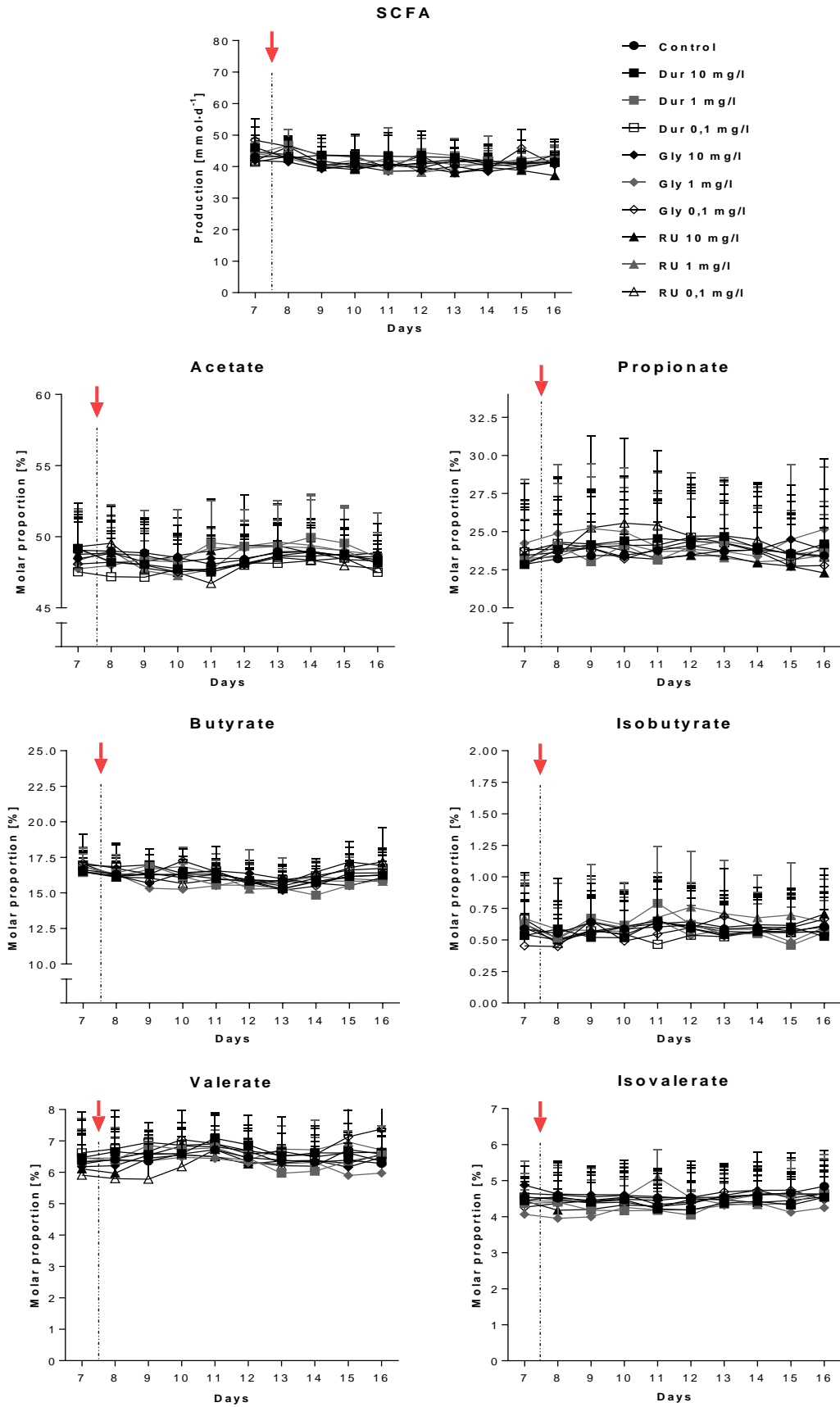


Abb. 4:

Verlauf der SCFA-Produktionen und der molaren Anteile über die Versuchszeit (roter Pfeil: Zugaben; Dur: Durano; Gly: reines Glyphosat; RU: RoundUp; MW ± SD; n = 4)

Die Produktion der gesamten SCFA beläuft sich auf 40 mmol/d bis 50 mmol/d (Abb. 4). Als molare Anteile ergeben sich im Mittel für Acetat 47-52%, für Propionat 22-25%, für Butyrat 15-20%, für Isobutyrat 0,5-0,75%, für Valerat 6-7% und für Isovalerat 4-5%. Die SCFA-Produktionen und die molaren SCFA-Anteile liegen im physiologischen Bereich. Es gibt keinen signifikanten Einfluss von Glyphosat oder glyphosathaltiger Formulierungen auf diese Parameter.

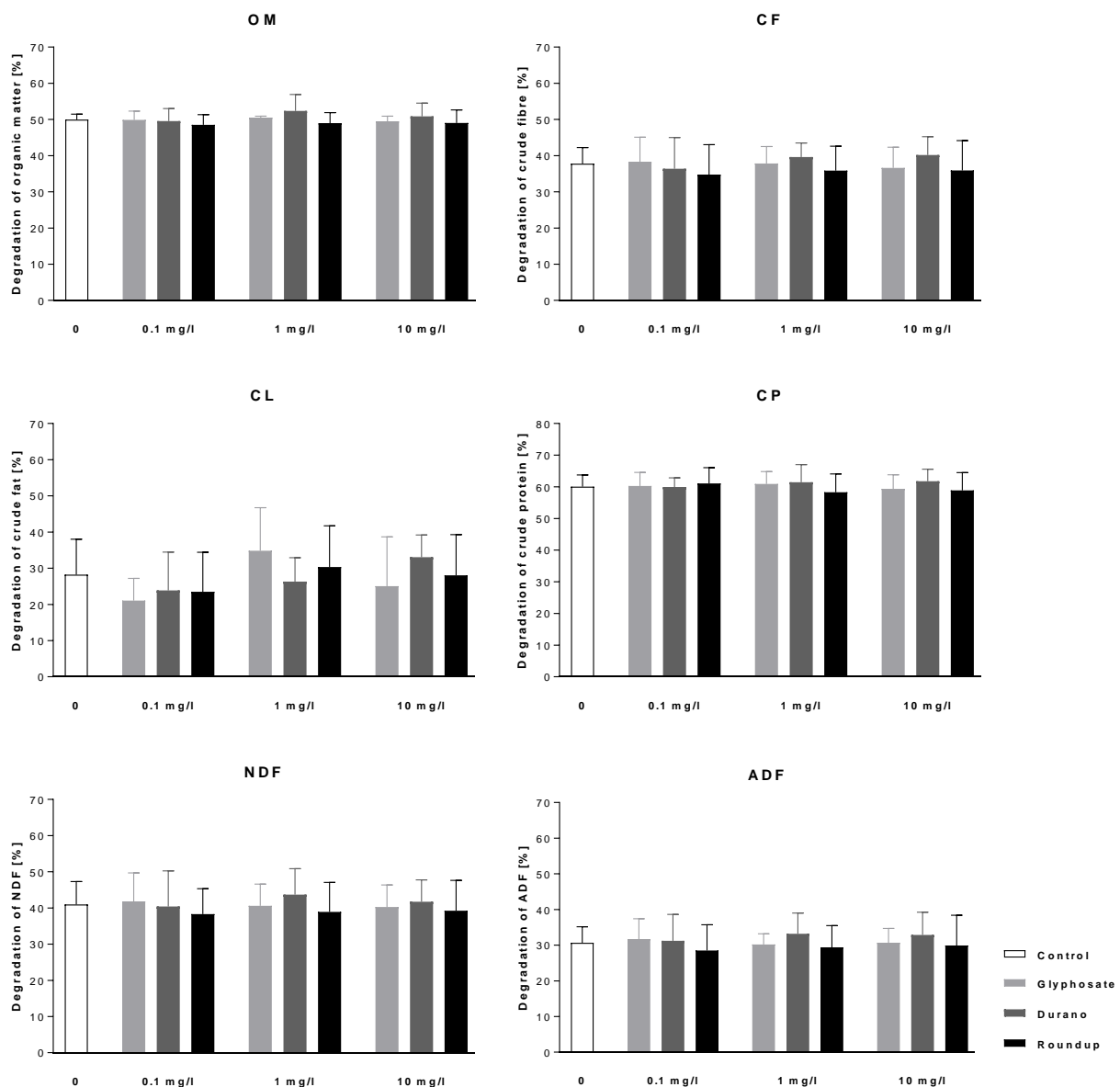


Abb. 5: Abbau der Rohnährstoffe (roter Pfeil: Zugaben; Dur: Durano; Gly: reines Glyphosat; RU: RoundUp; OM: organische Substanz; CF: Rohfaser; CL: Rohfett; CP: Rohprotein; NDF: neutrale Detergenzienfaser; ADF: saure Detergenzienfaser; MW \pm SD; n = 4).

Der Abbau der Rohnährstoffe ist Abb. 5 zu entnehmen. Der Abbau der organischen Substanz liegt bei 50%, der Rohfaser bei 30-40%, des Rohfetts bei 20-30%, des Rohproteins bei 60%, der NDF bei 35-40% und der ADF bei 30%. Dies sind Werte, die im physiologischen Bereich liegen. Wie die

Abbildungen deutlich zeigen, gibt es keinen signifikanten Einfluss von Glyphosat oder glyphosathaltiger Formulierungen auf den Abbau der einzelnen Rohnährstoffe.

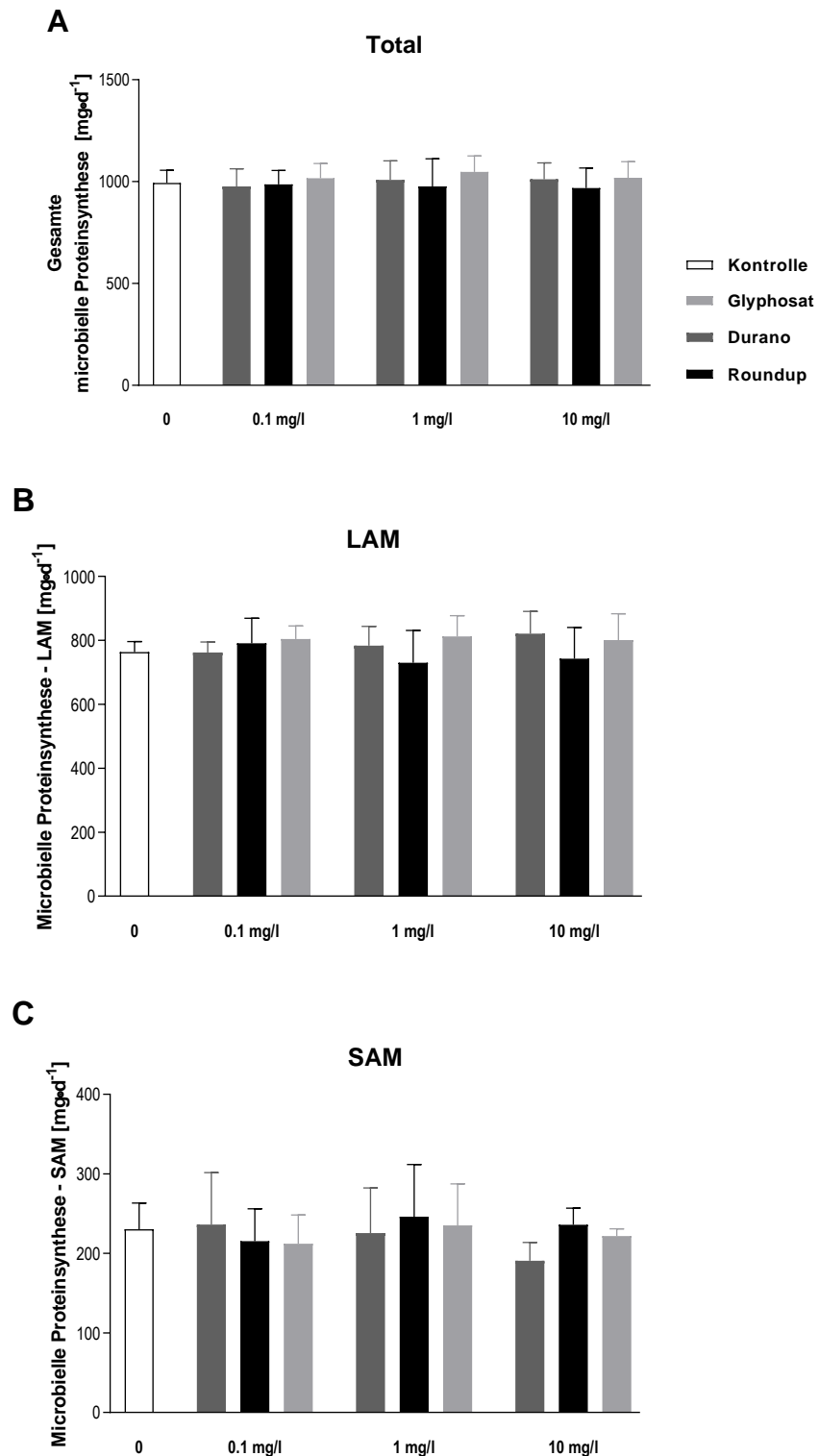


Abb. 6: Ergebnisse zur mikrobiellen Proteinsynthese für die gesamten Mikroorganismen (A), die *liquid associated microorganisms* (LAM; B) und die *solid associated microorganisms* (SAM; C) (n = 4; MW+SD).

Die Ergebnisse zur mikrobiellen Proteinsynthese sind in Abb. 6 dargestellt. Insgesamt wurden etwa 1000 mg mikrobielles Protein täglich in den Fermentern gebildet (Abb. 6A). Erfolgt eine Differenzierung nach *liquid associated* und *solid associated microorganisms* (LAM und SAM), so wurden durch die LAM etwa 800 mg/d (Abb. 6B) und durch die SAM (Abb. 6C) zwischen 200 und 300 mg/d gebildet. Es handelt sich dabei um unauffällige Werte, die aus *in vitro* Untersuchungen bereits bekannt sind. Statistisch wurde kein Unterschied in der Behandlung (Art des Glyphosats) oder der Konzentration festgestellt. Es gab auch keine signifikante Interaktion beider Faktoren.

Die Abb. 7 zeigt die Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese in g pro kg abgebauter Organischer Substanz. Pro Kilogramm abgebauter organischer Substanz wurden zwischen 150 und 250 g mikrobielles Protein synthetisiert. Diese gebildeten Mengen waren nicht signifikant verschieden zwischen der Behandlung oder der Glyphosat-Konzentration. Insgesamt lässt sich auch für diesen Parameter sagen, dass es sich um durchaus unauffällige Werte für *in vitro* Untersuchungen handelt.

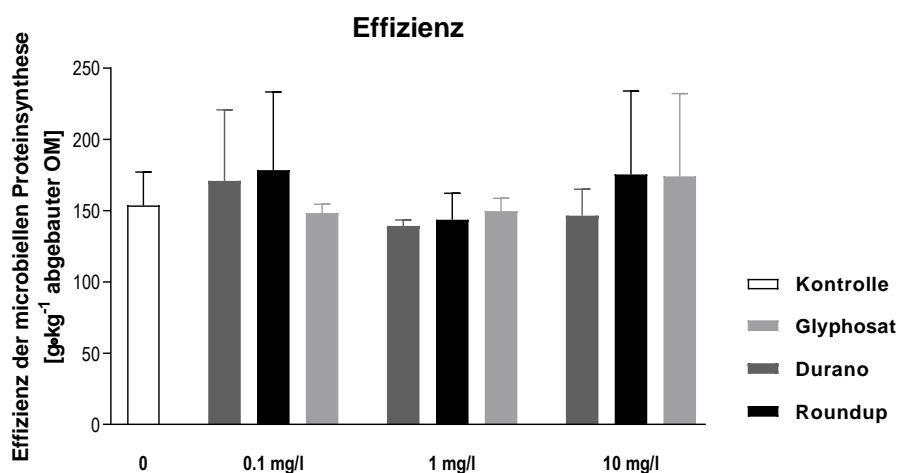


Abb. 7: Ergebnisse zur Effizienz der mikrobiellen Proteinsynthese (n = 4; MW+SD).

Die prozentualen Anteile des Mikroorganismen-Proteins für *liquid associated microorganisms* (LAM) und *solid associated microorganisms* SAM aus dem NH₃-Pool sind der Abb. 8 zu entnehmen. Zwischen 80 – 90% des Stickstoffs, der für die Synthese der LAM verwendet wurde, stammt aus dem NH₃-Pool in den Fermentern (Abb. 8A). Für die SAM wurden Werte zwischen 80 – 100% bestimmt (Abb. 8B). Es gab weder signifikante Effekte der Behandlung, der Konzentration von Glyphosat noch eine Interaktion der beiden Faktoren.

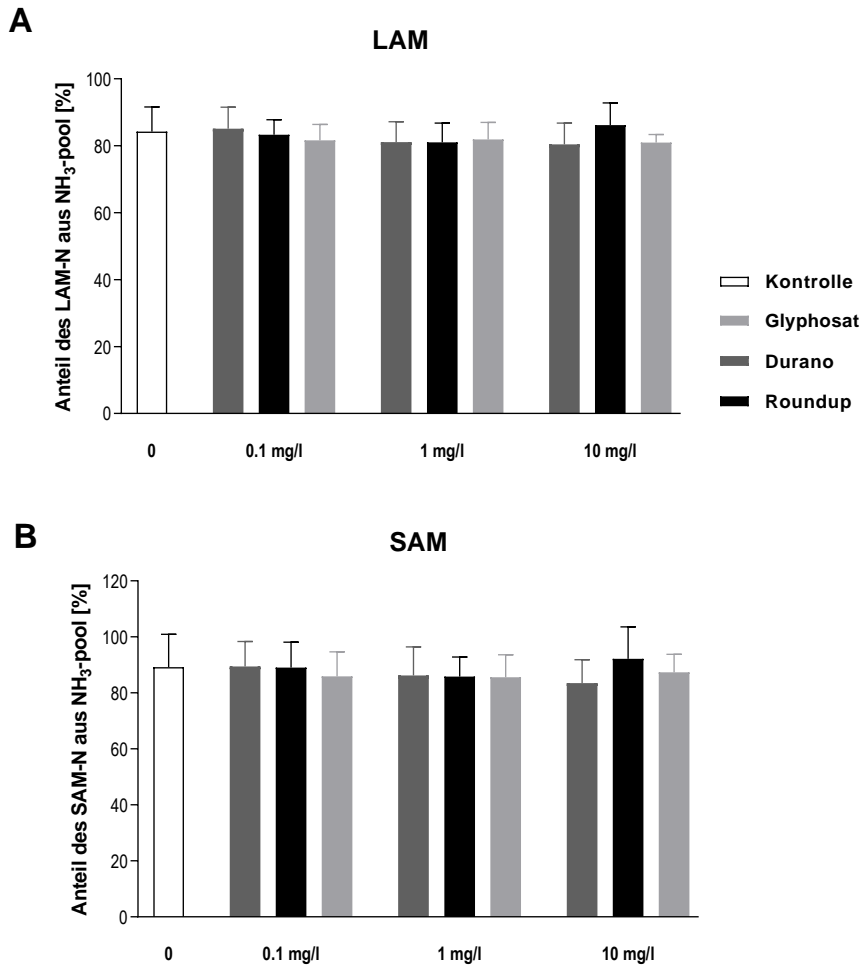


Abb. 8: Prozentuale Anteile des Mikroorganismen-Proteins für *liquid associated microorganisms* (LAM; A) und *solid associated microorganisms* SAM (B) aus dem NH₃-Pool (n = 4; MW+ SD).

Nach täglicher Zugabe von Glyphosat bzw. der glyphosathaltigen Formulierungen in die Fermenter kam es ab Tag 12 zu einem *steady state* in der Fermenterflüssigkeit. In Abb. 9A sind die Glyphosat-Mengen in den Fermentern dargestellt. Es zeigt sich, dass die angestrebten Mengen erreicht wurden. In den Kontroll-Fermentern wurde kein Glyphosat nachgewiesen.

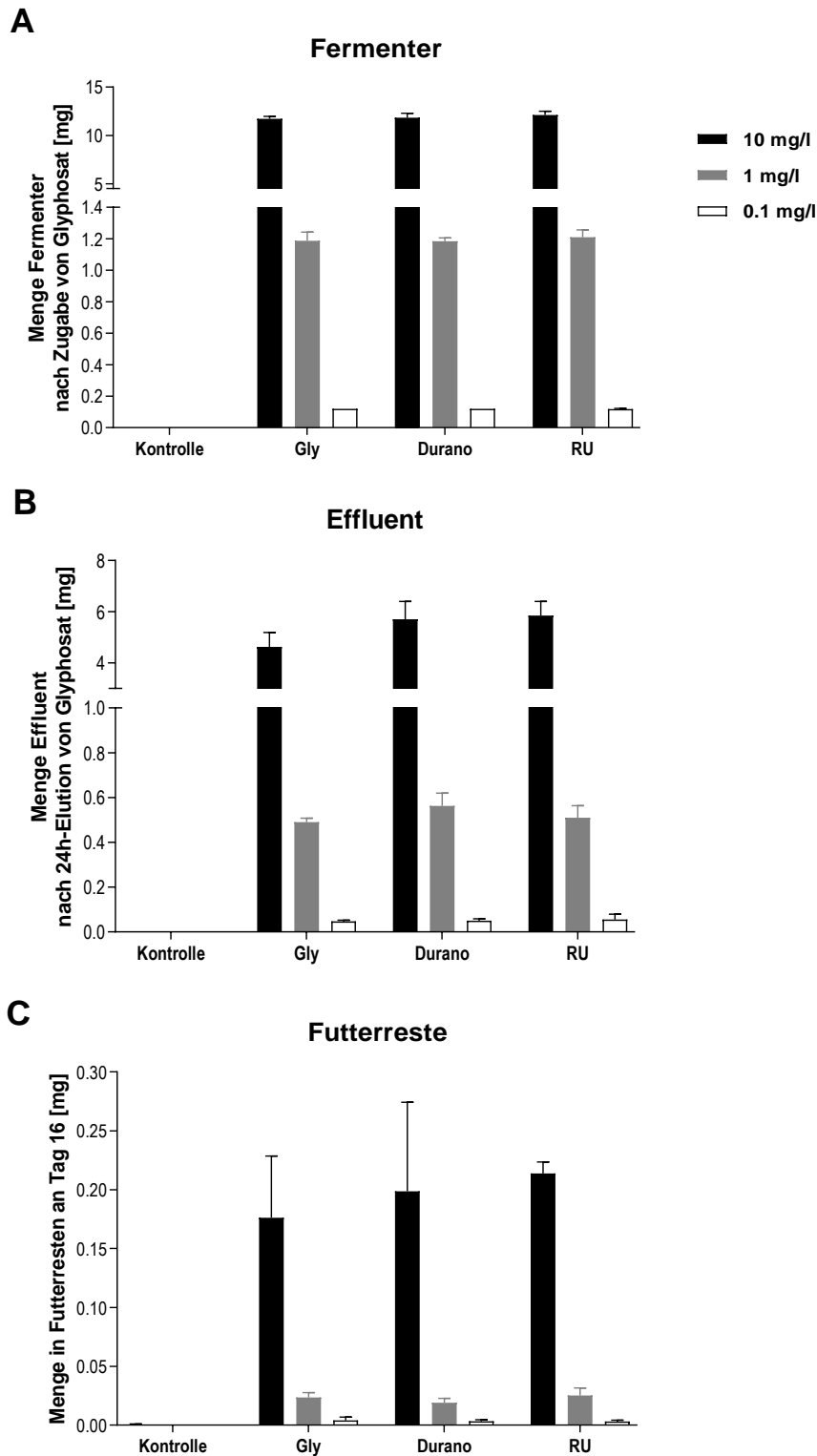


Abb. 9: Tägliche Menge an Glyphosat nach Zugabe in die Fermenter (A), nach Auswaschung im Effluent nach 24h (B) und in den Futterresten (C) (n = 4; MW+ SD).

Nach einem Zeitintervall von 24 Stunden wurde die Menge an Glyphosat in den Überläufen/im Effluent der Fermenter gemessen. Es wurde festgestellt, dass nur ein Teil der gesamten Glyphosat-Menge ausgewaschen wurde. Es handelte sich dabei um Werte zwischen 40 – 60%

(Abb. 9B). Abb. 9C zeigt die Glyphosat-Menge in den Futterresten. Bei der höchsten Dosierung von 10 mg/l liegen die Werte bei etwa 0,15 – 0,2 mg unabhängig von der Art der Behandlung. Diese Werte zeigen, dass eine Adsorption von Glyphosat an die Futterreste stattgefunden hat, denn das zugegebene Futter war nachgewiesener Weise glyphosاتفrei. Allerdings erklärt dies alleine nicht die Diskrepanz zwischen der Glyphosat-Menge in den Fermentern und den Überläufen. Eine Adsorption an die Fermenteroberfläche ist ebenfalls denkbar. Wahrscheinlicher ist jedoch auf Grundlage der *in vivo* Bilanz von Von Soosten et al. (2016), dass ein Metabolismus stattgefunden hat. Es wurde dort gezeigt, dass ein Verlust von 1/3 des Glyphosats am Duodenum stattfindet. Dies passt zu den hier gezeigten Ergebnissen.

Tab. 1a und 1b zeigen die Ergebnisse der Analyse der Spuren- und Mengenelemente in der flüssigen Phase und den sedimentierbaren Partikeln. Die statistische Auswertung hat zu keinen signifikanten Unterschieden geführt. Lediglich beim Mangan gab es bei den sedimentierbaren Partikeln vom F-test eine statistische Signifikanz. Der multiple Mittelwertvergleich ergab jedoch keine statistische Bestätigung. Somit kann eine Chelatierung durch Glyphosat auf der Grundlage der vorliegenden Daten ausgeschlossen werden.

Die Messungen zum ruminalen Metaproteom und Microbiom wurden am UL-IB durchgeführt. Dabei konnten weder für das Microbiom noch für das Metaproteom signifikante Effekte durch Glyphosat als Reinsubstanz oder in den verwendeten kommerziellen Formulierungen nachgewiesen werden. Die Details zu diesem Projektteil sind im Abschlussbericht des UL-IB dargestellt.

Tab. 1a: Spuren- und Mengenelemente im RUSITEC (Mittelwerte aus den vier Versuchen).

	Kontrolle	Glyphosat [mg/L]			Durano [mg/L]			Roundup [mg/L]			SEM	p <
		0,1	1	10	0,1	1	10	0,1	1	10		
Gesamter Pansensaft												
Ca [mg/L]	175	186	151	180	167	175	177	178	180	179	9,2	0,965
Mg [mg/L]	254	268	242	210	238	243	235	259	268	245	8,9	0,229
Na [mg/L]	4002	3906	4028	3884	3984	3947	4055	3867	3851	4007	46	0,299
K [mg/L]	677	676	691	653	682	660	668	682	659	703	13	0,829
Zn [µg/L]	4,18	4,00	3,58	3,95	3,67	3,84	4,36	3,94	4,38	4,19	0,28	0,982
Cu [µg/L]	1,10	0,97	1,04	1,03	0,94	0,96	1,22	1,01	1,17	1,04	0,08	0,765
Fe [µg/L]	9,42	9,19	8,96	8,92	9,67	9,61	10,93	9,77	10,79	10,29	0,61	0,889
Mn [µg/L]	7,24	6,94	6,93	6,15	6,78	6,51	6,74	7,22	7,33	7,48	0,29	0,547
Flüssige Phase												
Ca [mg/L]	30,9	31,3	29,9	27,6	29,1	30,7	31,7	28,6	32,1	27,7	1,4	0,553
Mg [mg/L]	10,4	8,1	10,4	8,4	8,1	9,1	10,7	8,9	10,9	9,0	0,63	0,267
Na [mg/L]	3487	3458	3499	3403	3499	3460	3520	3371	3378	3456	42	0,612
K [mg/L]	574	578	586	561	587	564	559	583	559	592	12	0,818
Zn [µg/L]	40,1	54,7	52,8	51,8	54,8	48,8	65,1	54,2	58,9	62,9	4,1	0,096
Cu [µg/L]	38,0	35,3	38,5	40,3	37,0	41,7	42,1	36,9	41,7	38,9	1,2	0,416
Fe [µg/L]	801	918	881	829	914	878	941	887	860	866	29	0,280
Mn [µg/L]	188	188	252	239	215	227	247	228	267	203	17	0,265

Tab. 1b: Spuren- und Mengenelemente im RUSITEC (Mittelwerte aus den vier Versuchen).

	Kontrolle	Glyphosat [mg/L]			Durano [mg/L]			Roundup [mg/L]			SEM	p <
		0,1	1	10	0,1	1	10	0,1	1	10		
Partikelmasse [g TM/L]	14,4	13,9	13,8	13,8	13,5	14,1	15,5	14,3	14,8	14,8	2,0	0,724
Sedimentierbare Partikel												
Ca [mg/g TM]	9,97	11,22	8,89	11,13	10,40	10,33	9,69	10,55	10,01	10,46	0,43	0,241
Mg [mg/g TM]	17,50	19,12	17,48	14,79	17,47	17,22	15,05	17,83	17,54	16,35	0,55	0,215
Na [mg/g TM]	35,53	32,21	38,44	35,30	35,94	34,49	34,96	34,99	32,46	37,56	1,66	0,795
K [mg/g TM]	7,21	7,09	7,64	6,77	7,13	6,81	7,09	7,01	6,83	7,62	0,21	0,873
Zn [µg/g TM]	280,0	287,3	258,1	284,4	269,2	268,1	281,6	275,1	292,3	282,7	15	0,993
Cu [µg/g TM]	69,9	66,7	73,1	72,2	65,7	64,1	74,2	67,1	76,0	67,4	4,1	0,831
Fe [µg/g TM]	601	613	612	593	667	652	698	638	677	667	38	0,885
Mn [µg/g TM]	513	503	516	444	513	466	449	510	489	517	12	0,043
Beitrag der flüssigen Phase [% an der Gesamtmenge]												
Ca [%]	18,22	16,93	20,16	15,81	18,21	17,90	18,04	16,73	18,63	15,87	1,04	0,629
Mg [%]	4,23	3,07	4,33	4,10	3,39	3,90	4,40	3,55	4,26	3,71	0,30	0,678
Na [%]	87,16	88,51	86,88	87,62	87,82	87,66	86,85	87,13	87,78	86,29	0,47	0,874
K [%]	84,74	85,54	84,87	85,80	85,97	85,59	83,89	85,44	84,87	84,19	0,43	0,562
Zn [%]	1,01	1,37	1,47	1,37	1,51	1,27	1,42	1,41	1,41	1,51	0,11	0,126
Cu [%]	4,14	3,65	4,08	3,89	4,11	4,79	3,85	3,72	3,54	3,93	0,37	0,949
Fe [%]	8,77	9,87	9,97	9,42	9,78	9,21	8,72	9,29	8,68	8,68	0,50	0,981
Mn [%]	2,53	2,78	3,72	4,22	3,37	3,47	3,72	3,29	4,00	2,95	0,29	0,100

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Aus den Studienergebnissen dieses Teilprojektes ergeben sich eindeutige Schlussfolgerungen, die für die Verwertung dieser Ergebnisse von erheblicher Bedeutung sind. So sind bislang in keiner anderen Studie derart umfassende Untersuchungen zur Bedeutung von Glyphosat für den Vormagenstoffwechsel durchgeführt worden. Die Daten liefern damit eine weitreichende Grundlage für die Beurteilung eines möglichen Risikopotentials von Glyphosat für die relevanten biochemischen und mikrobiologischen Merkmale des Vormagenstoffwechsels. Sie zeigen, dass Glyphosat unter den hier gewählten Versuchsbedingungen zu keiner Beeinflussung des mikrobiellen Vormagenstoffwechsels führt. Diese Befunde sind also für die weitere Beurteilung

von Glyphosat von großem Nutzen, und sie werden als Originalarbeiten in wissenschaftlichen Journalen verwertet werden.

4 Zusammenfassung

Die Ergebnisse aus den vier RUSITEC-Versuchen haben gezeigt, dass chemisch reines Glyphosat oder Glyphosat-haltige kommerzielle Formulierungen die relevanten biochemischen Messgrößen des mikrobiellen Vormagenstoffwechsels nicht beeinflussen.

Die Ergebnisse der Glyphosat-Bilanz deuten aufgrund der Wiederfindungsrate auf eine Metabolisierung von Glyphosat in den Fermentern hin.

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

Die ursprünglich geplanten Ziele konnten mit den durchgeführten Studien erreicht werden. Da die Untersuchungen unter den Bedingungen eines vom pH-Milieu ungestörten Vormagenstoffwechsels durchgeführt wurden, ergibt sich die Frage, ob Glyphosat den Vormagenstoffwechsel beeinflussen kann, wenn in den Vormägen Bedingungen einer subakuten oder akuten Azidose herrschen. Da dies häufiges Merkmal in der Haltung hochleistender Milchkühe darstellt, ergeben sich daraus wichtige Fragestellungen für weiterführende Untersuchungen.

6 Literaturverzeichnis

Ackermann W, et al. (2015). The influence of glyphosate on the microbiota and production of botulinum neurotoxin during ruminal fermentation. Current Microbiology **70**(3): 374-382.

Boocock MR, Coggins JR (1983). Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. FEBS Letters **154**: 127-133.

Brandt M, Rohr K. (1981). Beiträge zur Quantifizierung der N-Umsetzungen in den Vormägen von Milchkühen. Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde **46**: 39-48.

Clair E, et al. (2012). Effects of Roundup((R)) and glyphosate on three food microorganisms: *Geotrichum candidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Current Microbiology **64**(5): 486-491.

Czerkawski, JW, Breckenridge G. (1977) Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). British Journal of Nutrition **38**: 371-384.

- Franz JE, Mao MK and Sikorski JA. Glyphosate: A unique and global herbicide. ACS Monograph No 189. American Chemical Society, Washington, DC, 653 pp. (1997).
- Germany (2013). Renewal assessment report (RAL) on the active substance glyphosate prepared by the Rapporteur Member State Germany in the framework of Regulation (EC) No 1107/2009. Available at www.efsa.europa.eu.
- Glass RL (1984). Metal complex formation by glyphosate. Journal of Agricultural and Food Chemistry **32**: 1249-1253.
- Hüther L, et al. (2005). Effect of glyphosate contaminated feed on rumen fermentation parameters and in sacco degradation of grass hay and corn grain. Archives in Animal Nutrition **59**(1): 73-79.
- Jandhyala SM, et al. (2015). Role of the normal gut microbiota. World Journal of Gastroenterology **21**(29): 8787-8803.
- Krüger M, et al. (2013). Field investigations of glyphosate in urine of danish dairy cows. Environmental and Analytical Toxicology **3**(5).
- Jaworski EG (1972). Mode of Action of N-Phosphonomethylglycine: Inhibition of Aromatic Amino Acid Biosynthesis. Journal of Agricultural and Food Chemistry **20**: 1195-1198.
- Krüger M, et al. (2013). Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on *Clostridium botulinum*. Anaerobe **20**: 74-78.
- Minato H, et al. (1966). Ecological treatise on the rumen fermentation. I. The fractionation of bacteria attached to rumen digesta solids. Journal of General and Applied Microbiology **12**: 39-52.
- Öztürk H, et al. (2005). Influence of living and autoclaved yeasts of *Saccharomyces boulardii* on in vitro ruminal microbial metabolism. Journal of Dairy Science **88**: 2594-2600.
- Riede S, et al. (2016). Investigations on the possible impact of a glyphosate-containing herbicide on ruminal metabolism and bacteria in vitro by means of the 'Rumen Simulation Technique'. Journal of Applied Microbiology **121**(3): 644-656.
- Schrödl W, et al. (2014). Possible effects of glyphosate on Mucorales abundance in the rumen of dairy cows in Germany. Current Microbiology **69**(6): 817-823.
- Servaites JC, Tucci MA, Geiger DR (1987). Glyphosate Effects on carbon assimilation, ribulose biphosphate carboxylase activity, and metabolite levels in sugar beet leaves. Plant Physiology **85**: 370-374.
- Shehata AA, et al. (2013). The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. Current Microbiology **66**(4): 350-358.
- Siehl DL (1997). Inhibitors of EPSP synthase, glutamine synthase and histidine synthase. Herbicide activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology. R. M. Roe, J. D. Burton and R. J. Kuhr. Amsterdam, The Netherlands, IOS Press: 37-67.
- Sprankle P, et al. (1975). Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in the soil. Weed Science **23**: 229-234.
- Steinborn A, et al. (2016). Determination of Glyphosate Levels in Breast Milk Samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry **64**(6): 1414-1421.
- Steinrücken HC, Amrhein N (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. Biochemical and Biophysical research communications **94**: 1207-1212.
- VDLUFA (2006) Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik. Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. VDLUFA-Verlag, Darmstadt, Deutschland.

von Soosten D, et al. (2016). Excretion pathways and ruminal disappearance of glyphosate and its degradation product aminomethylphosphonic acid in dairy cows. Journal of Dairy Science **99**(7): 5318-5324.

Williams AL, et al. (2012). Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: a critical analysis. Journal of Toxicology and Environmental Health B Critical Reviews **15**(1): 39-96.