

EINGANG

04. SEP. 2019

Referat 324

Abschlussbericht

zum Entscheidungshilfe-Verbundforschungsvorhaben

„Auswirkungen von Glyphosat auf aus Tierhaltungen stammende Bakterien“

(Akronym: Glypho-Bak)

Ausführende Stelle: Universität Leipzig, Institut für Biochemie
Förderkennzeichen: 2815HS018
Vorhabensbezeichnung: Teilvorhaben Universität Leipzig
Laufzeit des Vorhabens: 01.01.2016 bis 30.06.2019
Berichtszeitraum: 01.01.2016 bis 30.06.2019
Projektpartner im Forschungsverbund: <ol style="list-style-type: none">1. Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Tier- und Umwelthygiene (FU-ITU)2. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Physiologisches Institut (TiHo-PI)3. Technische Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Lehrstuhl für Tierernährung (TUM-LT)4. Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Institut für Biochemie (UL-IB)


Leipzig, den 27.08.2019, Prof. Dr. Martin von Bergen

Prof. Dr. Martin von Bergen
Ltr. Dept. Molekulare Systembiologie
Department of Molecular Systems Biology (MOLSYB)
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ
Permoserstraße 15
04318 Leipzig
GERMANY

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Literaturrecherche/-übersicht zum Stand der Wissenschaft

Eine umfangreiche Literaturrecherche wurde durchgeführt, bei der sich auf die drei Fragestellungen in diesem Teilvorhaben konzentriert wurde. Erstens, die Regulierung des bakteriellen Synthesestoffwechselweges der aromatischen Aminosäuren und wie Glyphosat diese hemmt. Der zweite Schwerpunkt wurde auf die beschriebene Wirkung von Glyphosat und dessen Formulierungen auf Bakterien gesetzt. Zuletzt wurde der Stand der publizierten Messmethoden von Glyphosat zusammengetragen.

Mikrobiomuntersuchung im Rumen Bioreaktor Modell (Task 7)

Die Proben aus den Fermentern von TiHo-PI, die als Modellsystem des Kuhpanns dienen, sollten auf Änderungen in der taxonomischen und metabolisch funktionellen Zusammensetzung untersucht werden, die durch Glyphosat und Formulierungen von Glyphosat (Roundup und Durano) hervorgerufen werden. Die Untersuchungen wurden mittels Omics-Analysen durchgeführt.

Mikrobiomuntersuchung des Rumen aus Kühen (Task 7)

Proben aus dem Pansen von fistulierten Kühen von TUM-LT wurden auf Änderungen der Zusammensetzung des Mikrobioms untersucht. Es sollte der Einfluss von Glyphosat und dessen Formulierung Roundup auf die taxonomische und metabolisch funktionelle Zusammensetzung des Rumenmikrobioms untersucht werden. Hierzu wurden Omics-Methoden angewandt.

Mikrobiomuntersuchung in Bioreaktormodell des Schweinekolons (Task 7)

Basierend auf einer Chemostat-Methodik wurde ein Bioreaktormodell des Schweinekolon etabliert. Anhand dieses Reaktormodells sollte der Einfluss von Glyphosat/Roundup auf das Mikrobioms dieses Darmmodells des Schweins auf taxonomischer und funktioneller Ebene untersucht werden. Hierzu wurde auf Omics-Technologien zurückgegriffen.

Quantitative Glyphosat- und Aminomethylphosphonsäure- (AMPA) Messungen aus komplexen biologischen Matrices (Task 8.1.1)

Es wurde eine Messmethode zur qualitativen und quantitativen Analyse von Glyphosat und dessen Hauptabbauprodukt AMPA aus biologischen Probenmaterial etabliert. Diese Analytikmethode zur absoluten Quantifizierung der Metabolite kann dann für die Messung der Proben aller vier Projektpartner genutzt werden.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpfte wurde

Der Stand der Wissenschaft vom Einfluss von Glyphosat auf das Mikrobiom am Beginn des Vorhabens war spärlich. Die meisten publizierten Studien bezogen sich auf Daten des Wachstums von *in vitro* Reinkulturen, aber nicht auf bakteriellen Gemeinschaften *in vivo*. Eine *in vitro* Studie hat gezeigt, dass einige pathogene Bakterienarten wie bestimmte Salmonellen, *Clostridium perfringens* und *Clostridium botulinum* gegenüber Glyphosat resistent sind, während nützliche Bakterienspezies von den Gattungen Bifidobacterium, Enterococcus und Lactobacillus durch Glyphosat gestört werden [1]. Eine weitere *in vitro* Studie konnte aufdecken, dass Glyphosat das Wachstum von Milchsäurebakterien hemmt [2]. Ackermann *et al.* untersuchte die Auswirkung von 100µg/mL Glyphosat auf das Mikrobiom im Kuhpannen mithilfe eines Bioreaktor-

Modellsystems und fand einige Änderungen in Bezug auf der Zellzahl von Protozoa und *Clostridium histolyticum* [3]. Dies konnte in einer weiteren Studie nicht bestätigt werden, die ebenfalls das Mikrobiom des Kuhrumens analysiert, in den sie einen Bioreaktor als Modellsystem nutzen [4]

2. Material und Methoden

Quantitative Glyphosat- und Aminomethylphosphonsäure- (AMPA) Messungen aus komplexen biologischen Matrices

Glyphosat und AMPA wurden aus 100 μL Probenmaterial mithilfe von 1 mL eines Methanol:Acetonitril:Wasser (3:1:2) Gemisches extrahiert. Die Proben im Extraktiongemisch wurden gevortext (5 min), zentrifugiert (14000 g; 10 min; RT) und der Überstand im Vakuumkonzentrator getrocknet. Der getrocknete Extrakt wurde dann in 100 μL Reinstwasser aufgenommen und sofort mittels LC-MS/MS analysiert (Abbildung 1).

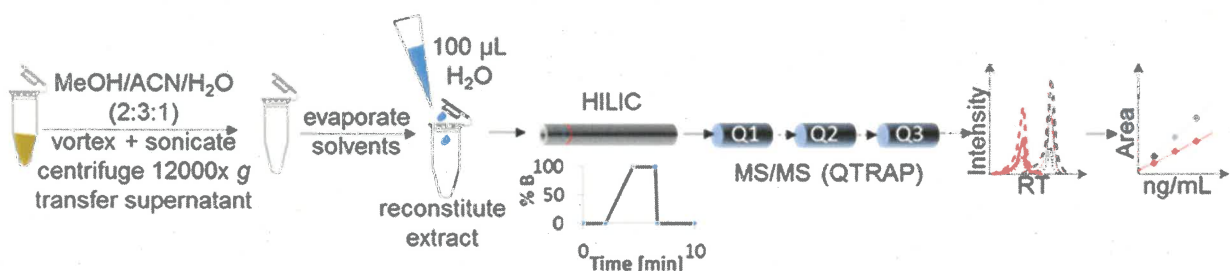


Abbildung 1: Arbeitsschritte der Probenaufbereitung und LC-MS/MS Analyse von Glyphosat und AMPA der etablierten Messmethode

Pro Probe wurden jeweils 10 μL in das Massenspektrometer injiziert und gemessen. Als Trennsäule wurde eine BEH Amide Säule (2.1x100 mm, 1.7 μm) von Waters (Milford, USA) verwendet. Die chromatographische Trennung erfolgte durch einen Gradienten bestehend aus Lösung A (66 % H₂O, 33 % Acetonitril, 10 mM Ammoniumacetat, 0.04 %

Ammoniumhydroxid; pH 9) und Lösung B (10 % H₂O, 90 % Acetonitril, 10 mM Ammoniumacetat, 0.04 % Ammoniumhydroxid; pH 9). Der Gradient lief bei einer konstanten Flussrate von 0.4 mL/min. Anfangs wurde für 2 min mit 0 % B äquilibriert, innerhalb von 2.5 min wurde dann ein Gradient auf 100 % B gefahren, dieser für 2 weitere Minuten gehalten, um dann für 3.4 min auf 0 % B zurückzukehren.

Tabelle 1: MRM Übergänge und Einstellungen für Glyphosat und AMPA Messungen

Q1	Q3	Time (msec)	ID	DP (volts)	CE (volts)
110	79	50	AMPA_1	-60	-60
110	63	50	AMPA_2	-60	-60
168	79	50	Glypho_1	-110	-110
168	63	50	Glypho_2	-30	-30
168	150	50	Glypho_3	-30	-30
168	124	50	Glypho_4	-30	-30
168	81	50	Glypho_5	-30	-30

Identifikation und Quantifizierung von AMPA und Glyphosat basierte auf spezifischen MRM Übergängen auf einer QTRAP® 5500 (AB Sciex, Framingham, USA) im negativen Messmodus. Ionenquellen-Einstellungen waren wie folgt: Ionenspray Spannung: -4.5 kV, Temperatur: 450 °C, curtain gas Fluss: 35, Kollisionsgas: medium und Ionenspray-gas von 40 und 60. Die Übergänge und die spezifischen „Declustering“ Potentiale (DP) und Kollisionsenergien (CE) können der Tabelle 1 entnommen werden. Datenaufnahme und -analyse wurde mittels Analyst® Software (Version 1.6.2, AB Sciex) durchgeführt.

Schweinedarm Bioreaktormodell

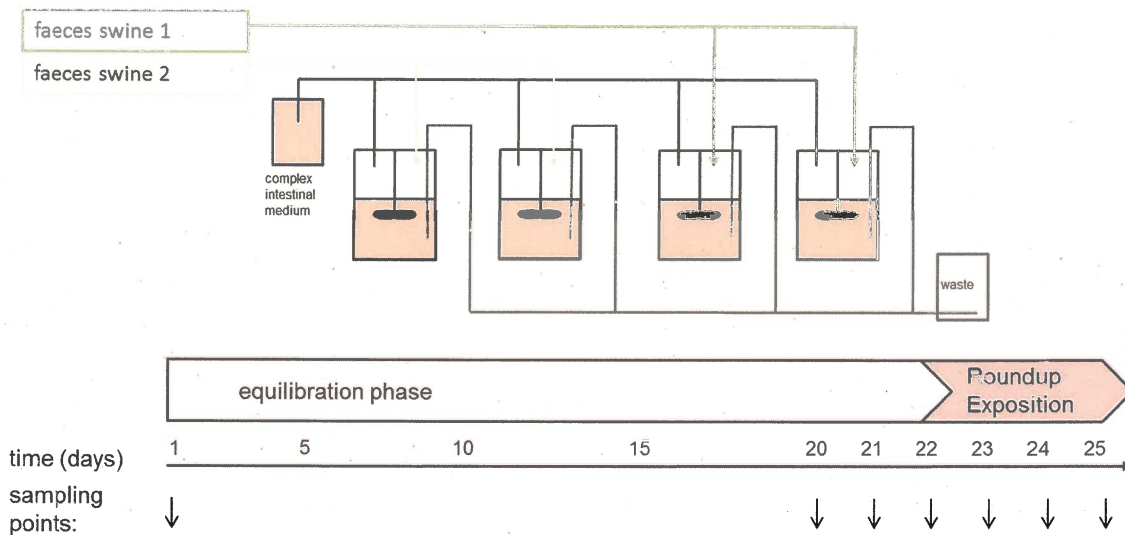
Acetonitril, Methanol, Ammoniumacetat und Ammoniumhydroxid wurden alle über Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA) bezogen. Alle Lösungsmittel für die Massenspektrometrie waren „analytical grade“ Reinheit. Roundup® unkrautfrei LB plus (Monsanto Agrar Deutschland GmbH, PZN 024142-00 wurde als Glyphosat-Formulierung für das Experiment eingesetzt. RoundUp wurde als 10 µg/mL Lösung, verdünnt in Reinstwasser, eingesetzt. Die PBS Bestandteile NaCl, Na₂HPO₄ und KH₂PO₄ wurden über Merck (Darmstadt, Germany) bezogen. Das Nährmedium wurde mittels unten aufgeführter Bestandteile selbst hergestellt (Tabelle 3).

Drei parallel laufende Bioreaktorsysteme (A, B und C) bestehend aus Multifors2 bioreactor system (Infors, Switzerland) wurden mit 0.5 g Bakterien, die aus dem Darm von 8 bis 9 Wochen alten Ferkeln gewonnen wurden, an Tag 0 innokuliert (Schwein 1 → Bioreaktor A und B, Schwein 2 → Bioreaktor C). Die Bakterien wurden bei 37 °C, unter kontinuierlichem Rühren von 150 rpm und anaeroben Bedingungen in komplexem intestinalen Medium (Tabelle 2) kultiviert. Der pH-Wert (6.5) wurde durch zugeben von 1M NaOH konstant gehalten und eine mittlere Verweildauer des Medium von 48 h wurde eingestellt. Um zu verhindern, dass langsam wachsende Bakterienarten ausgewaschen werden, wurde der Austausch des Mediums erst ab Tag 1 eingestellt.

Tabelle 2. Zusammensetzung des komplexen intestinalen Bioreaktormediums

Ingredient	Quantity [g/L]	Supplier
Arabinogalactan (larch wood)	2	Sigma-Aldrich
Bile Acids sodium salt	0.5	Sigma-Aldrich
Calcium chloride x 2H ₂ O	0.15	Merck
Di-Potassium hydrogen phosphate	0.25	Roth

Guar gum	2	Sigma-Aldrich
Hemin (bovine)	0.05	Sigma-Aldrich
Inulin	1	Serva
L-cysteine hydrochloride	0.5	Biochemica
Magnesium sulfate	0.64	Roth
Menadione	0.001	Sigma-Aldrich
Mucin (porcine gastric Type II)	4	Sigma-Aldrich
Pectin (citrus peel)	2	Sigma-Aldrich
Potassium chloride	4.5	Roth
Potassium di-hydrogen phosphate	0.25	Roth
Sodium chloride	4.5	Roth
Sodium hydrogen carbonate	1.5	Roth
soy peptone (papainic)	13	Merck
Starch (wheat)	5	Roth
Xylo-oligosaccharide (corn)	2	Roth
Yeast extract	4.5	Chemsolut



key parameters	medium:	complex intestinal medium (Swine)
	pH:	6.5
	Inoculation:	4 reactors (duplicates) 0.5g faeces per bioreactor
stress phase	concentration:	228 mg/day Glyphosat acid from "Roundup LBplus Unkrautfrei"

Abbildung 2: Versuchsaufbau

Die Bioreaktoren liefen für 25 Tage. Nach Tag 20, was einem Turnover von 10 entspricht, wurde die bakterielle Gemeinschaft als stabil angesehen. Zwischen Tag 20 und 23 wurden täglich Proben entnommen, die als Kontrolle des Versuches dienen (Abbildung 2). An Tag 23 wurde das Medium der Bioreaktoren mit 10.7 mM Roundup versetzt. Es wurden täglich Proben bis Tag 25 entnommen, die dann den Roundup-Expositionsproben entsprachen (Abbildung 2).

Bestimmung der Bakteriellen Biomasse aus Bioreaktorproben

Um die Biomasse in den Proben zu bestimmen, wurde 1 mL des Mediums zentrifugiert (3200 g; 4 °C; 10 min) und das Pellet zweimal mit PBS (140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 7 mM KH₂PO₄) gewaschen. Die Pellets wurden in einem

Vakuumkonzentrator (MicroCenvac NB-503CIR, Acondor) bei 45 C getrocknet und das Trockengewicht mit eine Feinwaage (AC 210 S, Sartorius) bestimmt.

Quantitative Glyphosat- und Aminomethylphosphonsäure- (AMPA) Messungen aus komplexen biologischen Matrices

Quantifizierung Kurzkettige Fettsäuren wurden im Überstand der Reaktorproben nach Wissenbach *et al.* untersucht [5] .

OMICS-Analysen am Mikrobiom

DNA und Proteine wurden aus den SAM-und LAM-Proben nach vorheriger Zentrifugation (10.000 g, 10 min, 4 °C) extrahiert. Aus den gewonnen bakteriellen Pellets wurden DNA sowie Proteine wurden aus den gewonnen Pellets wurden die Proteine für die Analyse des Metaproteom die DNA für die 16S rRNA Gen-Sequenzierungsanalyse, nach Haange *et al.* extrahiert, untersucht und statistisch ausgewertet.[6].

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Quantitative Glyphosat und Aminomethylphosphonsäure (AMPA) Messungen aus komplexen biologischen Matrizen

Nach intensiver Etablierungsphase der Probenaufbereitung sowie der Messmethodik wurde ein Verfahren entwickelt, welches sich eignet, Glyphosat und AMPA aus biologischem Material zu quantifizieren. Diese Messung basiert auf einer chromatographischen Trennung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie welche an ein Massenspektrometer (MS/MS Detektion) gekoppelt ist. Die MS/MS

Quantifizierung basiert auf einer sogenannten „targeted Multiple Reaction Monitoring“ Methode [7].

Nach viel testen von verschiedene Methoden zu Probenaufbereitung und Messung wurde eine Methode entwickelt, die sich eignet um Glyphosat und AMPA in biologischen Proben zu quantifizieren. Diese Messung basierte auf eine gerichtete hochleistungsflüssigkeitschromatographische Trennung gekoppelt mit MS/MS-Detektion (HPLC-MS/MS). Die MS/MS Quantifizierung wurde mittels eine „Multiple Reaction Monitoring“ Methode (MRM) durchgeführt.

Die etablierte Methode ließ eine Quantifizierung im niedrigen ng/mL Bereich bis hoch zu 500 ng/mL zu. Dieser Bereich entspricht der Sensitivität, die benötigt wurde, um in diesem Vorhaben valide Aussagen über die Glyphosat- und AMPA-Mengen zu treffen.

Im Vergleich von Glyphosat oder AMPA in reinen Wasser zu Glyphosat in verschiedenen biologischen Nährmedien konnte nur eine geringe Verschlechterung der Intensität beobachtet werden (Tabelle 3). Weiter erkennt man eine sehr gute Linearität im Messbereich vom Detektionslimit (LOD) bis zu 500 ng/mL sowohl in Wasser als auch in komplexen Medien (Abbildung 3).

Tabelle 3: Detektions- und Quantifizierungsgrenzen (LOD und LOQ) von Glyphosat und AMPA in allen untersuchten Matrizen

Matrix	Glyphosate [ng/mL]		AMPA [ng/mL]	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Water	<2 ng/mL	<2 ng/mL	<2 ng/mL	<2 ng/mL
CIM	2 ng/mL	<20 ng/mL	5 ng/mL	<20 ng/mL
CIM human	5 ng/mL	20 ng/mL	5 ng/mL	20 ng/mL
BHI medium	10 ng/mL	<50 ng/mL	10 ng/mL	50 ng/mL

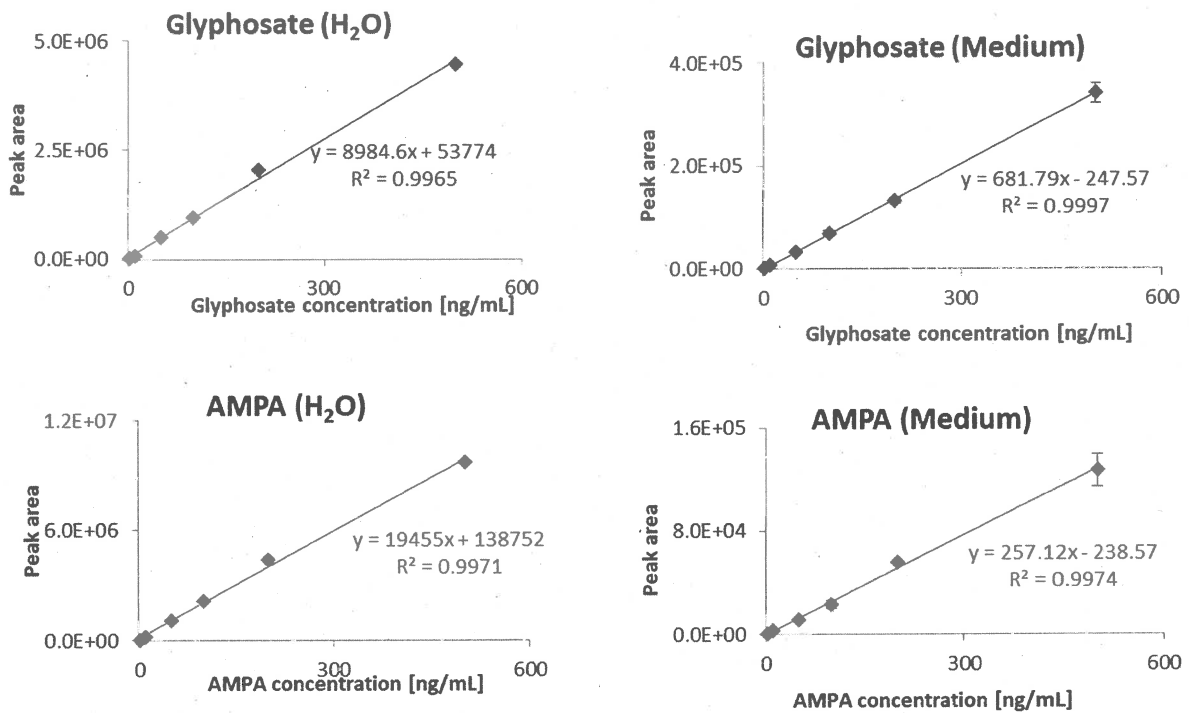


Abbildung 3: Kalibrationskurven von Glyphosat und AMPA in komplexem intestinalen Medium (CIM) und reinem Wasser mit der etablierten quantitativen Messmethode

Mikrobiomuntersuchung des Rumen Bioreaktor Modell

Unsere Projektpartner von TiHo-PI schickten uns Mikrobiomproben und Proben der Reaktorflüssigkeit. Diese Proben entsprachen den Endzeitpunkten der Reaktorläufe. Es wurde Reaktoren jeweils mit Glyphosat als Reinsubstanz, als Formulierungen Roundup oder Durano bei verschiedenen Konzentrationen an Glyphosat (0.1, 1 und 10 mg/mL) versetzt. Die Flüssigkeits- (LAM) als auch die Feststoff-assoziierten Mikroben (SAM) wurden jeweils separat untersucht.

In den Reaktorflüssigkeitsproben konnte mittels der etablierten Messmethode die Glyphosatkonzentration bestimmt und ausgewertet werden. Unabhängig vom eingesetzten Glyphosat-Träger (Reinsubstanz, Roundup, Durano) konnten vergleichbare Konzentrationen nachgewiesen werden. Weiterhin erkannte man keinen

großen Abbau an Glyphosat, da die gemessenen Konzentrationen der eingesetzten Menge ziemlich entsprachen (Abbildung 4).

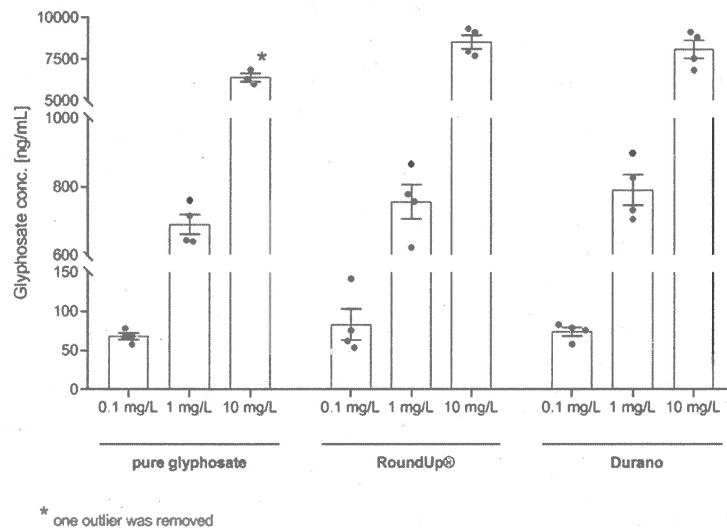


Abbildung 4: Gemessene Glyphosatkonzentration aus den Bioreaktorproben der TiHo-PI.

Die Proben wurden außerdem metaproteomisch untersucht, womit sowohl die taxonomische als auch die funktionelle Zusammensetzung des Mikrobioms bestimmt werden konnte.

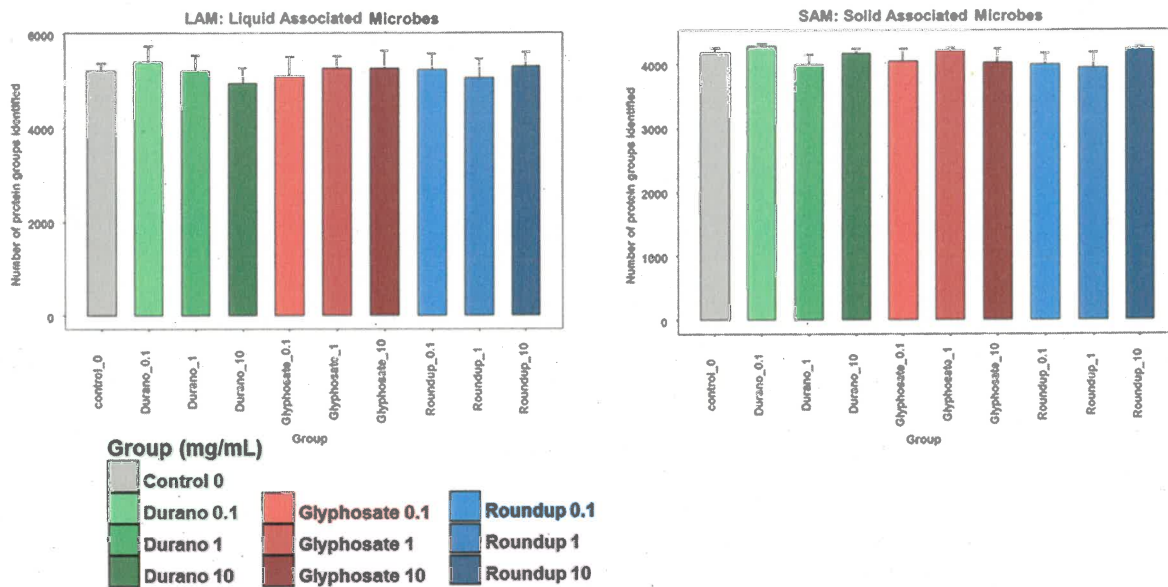


Abbildung 5: Mittelwert der Anzahl der identifizierten Proteine. (Zahl hinter dem Gruppennamen entspricht der Glyphosatkonzentration in mg/mL)

Nach Präparation der Proben konnte eine ausreichende Proteinmenge erzielt werden, um mit der Analyse fortzufahren (

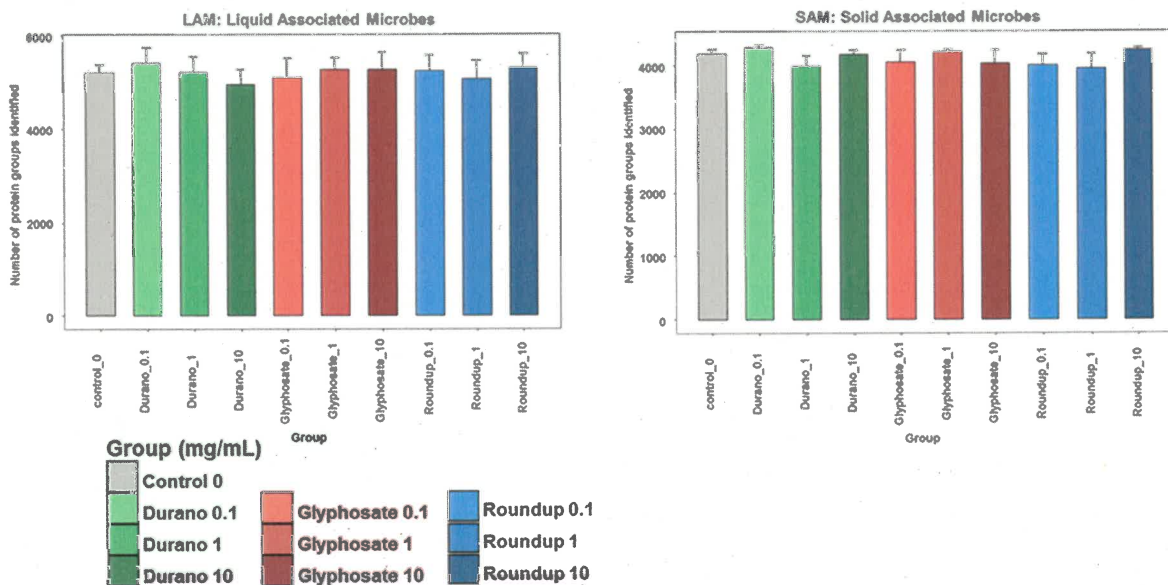


Abbildung 5). Weiterhin kann man erkennen, dass weder die Konzentration an Glyphosat noch deren Formulierung einen Einfluss auf die Anzahl an identifizierbaren Proteinen hatte.

Die Alpha-Diversität, ein Wert für die Komplexität des Mikrobioms basierend auf der Anzahl der Bakterienarten und deren Verteilung, zeigte weder für die Art der Glyphosat-Formulierungen noch für die Glyphosatkonzentration (Abbildung 6) eine Änderung. Eine Dysbiose oder Abfall der Alpha-Diversität ist häufig ein Zeichen für eine Störung des Mikrobioms.

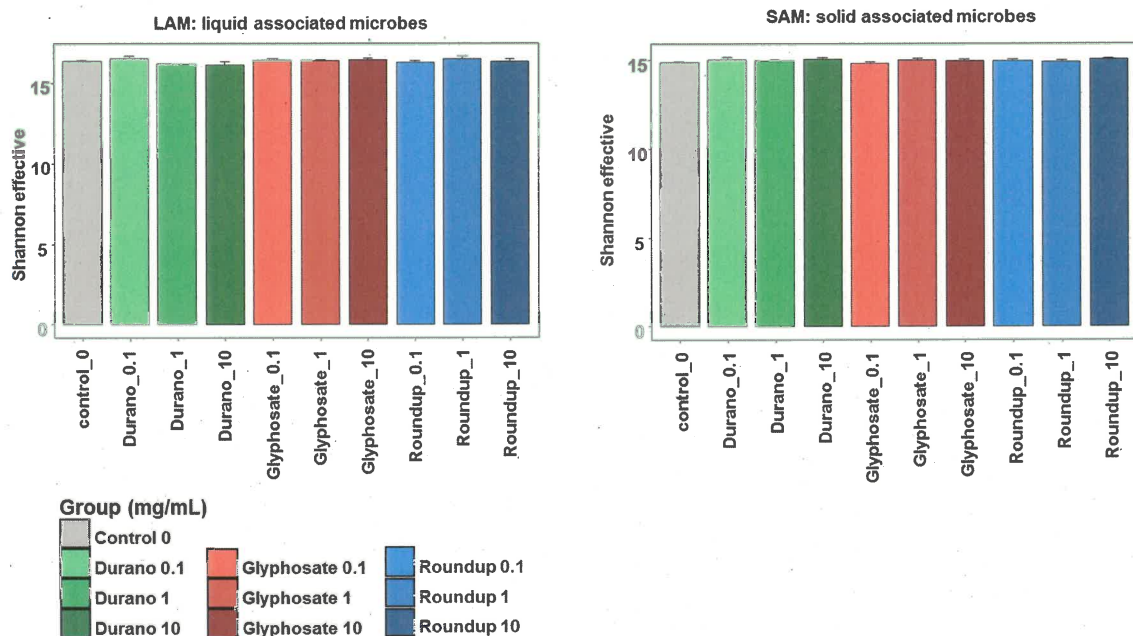


Abbildung 6: Alpha-Diversität der Mikrobiota bei verschiedenen Glyphosatkonzentrationen und verschiedenen Formulierungen. (Zahl hinter dem Gruppennamen entspricht der Glyphosatkonzentration in mg/mL)

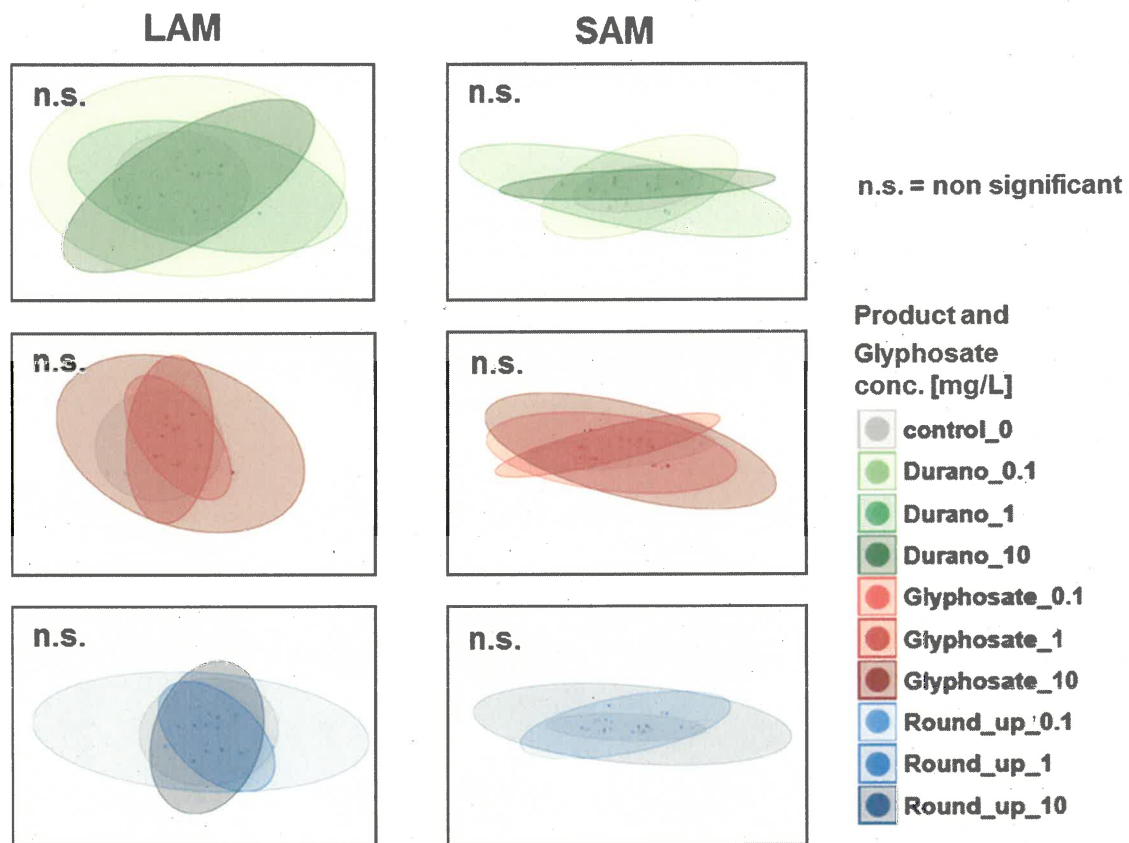
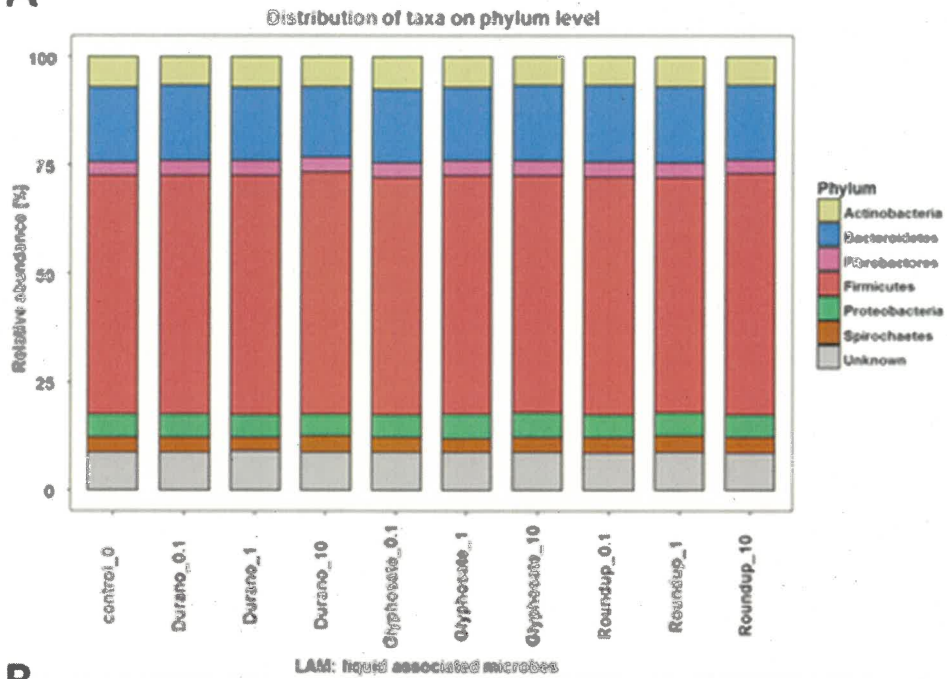


Abbildung 7: Änderungen des Metaproteoms basierend auf einer Hauptkomponenten (PCA)-analyse von flüssigkeits- oder feststoff-assoziierten Mikroben (LAM oder SAM). (n.s. = kein signifikanter Unterschied, Ellipsen: Vertrauensbereich von 95%). (Zahl hinter dem Gruppen)

Es konnte keine globale Änderung beobachtet werden. Die verschiedenen eingesetzten Glyphosatkonzentration des reinen Glyphosats als auch der Produkte Roundup und Durano zeigten auf die Zusammensetzung des Mikrobioms keine Auswirkung (Abbildung 7).

A



B

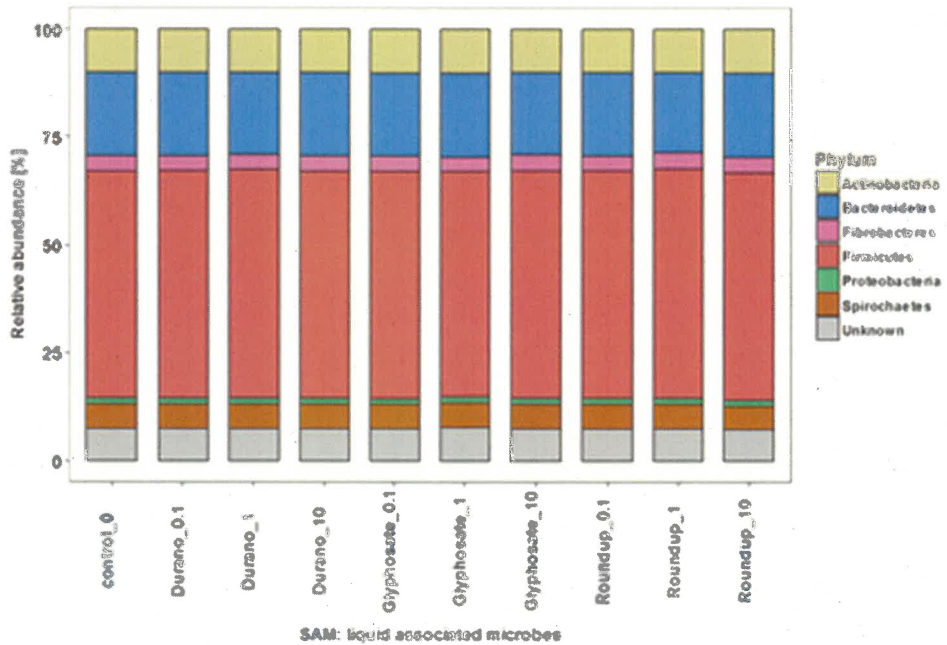


Abbildung 8: Taxonomische Verteilung der Mikroben basierend auf der Konzentration an Glyphosat und Glyphosat-Formulierung von den flüssigkeits-assoziierten Mikroben (A) und den feststoff-assoziierten Mikroben (B) auf Phylumebene. (Zahl hinter dem Gruppennamen entspricht der Glyphosatkonzentration in mg/mL).

Um auch kleinere Änderungen des Mikrobioms aufgrund von Glyphosat oder Glyphosat-Formulierungen zu finden, wurde die taxonomische Zusammensetzung des Mikrobioms untersucht.

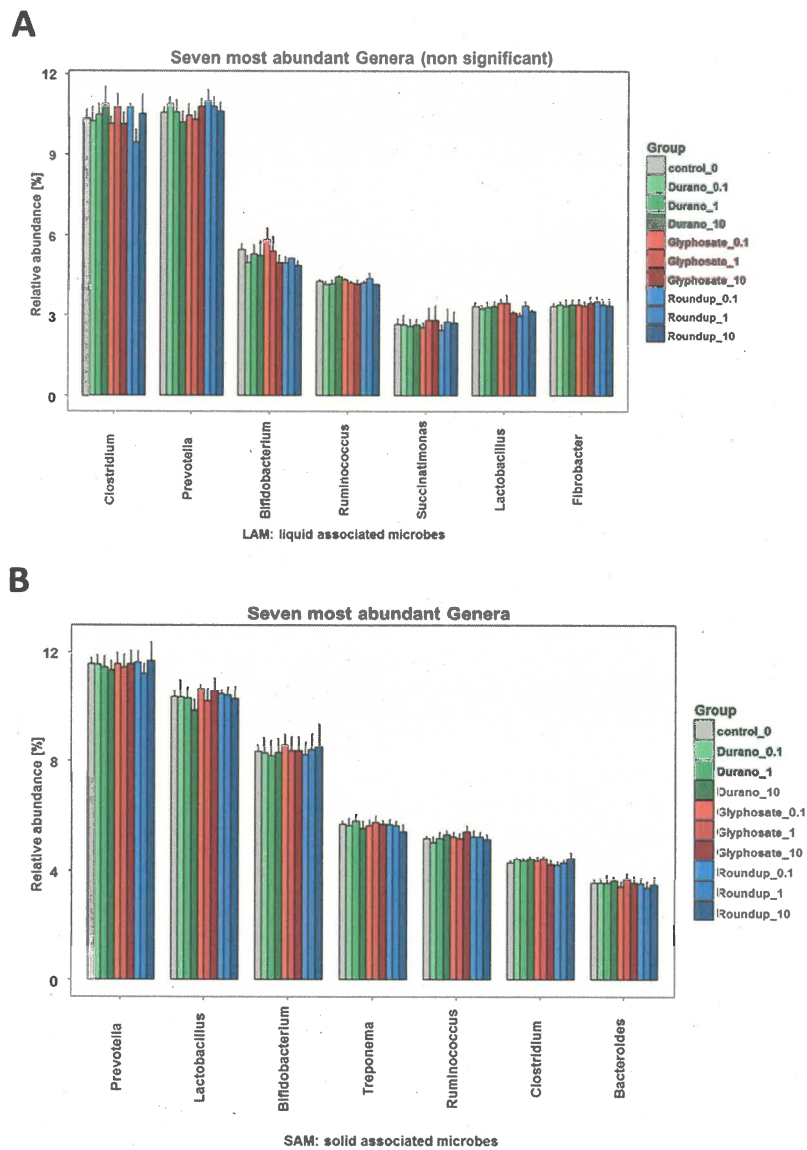


Abbildung 9: Abundanz der sieben häufigsten Bakteriengattungen basierend auf die Konzentration an Glyphosat von den flüssigkeits-assoziierten Mikroben (A) und den feststoff-assoziierten Mikroben (B). (Zahl hinter dem Gruppennamen entspricht der Glyphosatkonzentration in mg/mL).

Es lässt sich keine Verschiebung in der Verteilung der einzelnen bakteriellen Phyla erkennen (Abbildung 8). Dies galt sowohl für die flüssigkeits-assoziierten Mikroben als auch für die feststoff-assoziierten Mikroben. Bei detaillierter Auflösung der Taxa auf Gattungsebene konnten ebenfalls keine Änderungen in der Abundanz der einzelnen Gattungen durch Glyphosat oder dessen Formulierungen beobachtet werden (Abbildung 9).

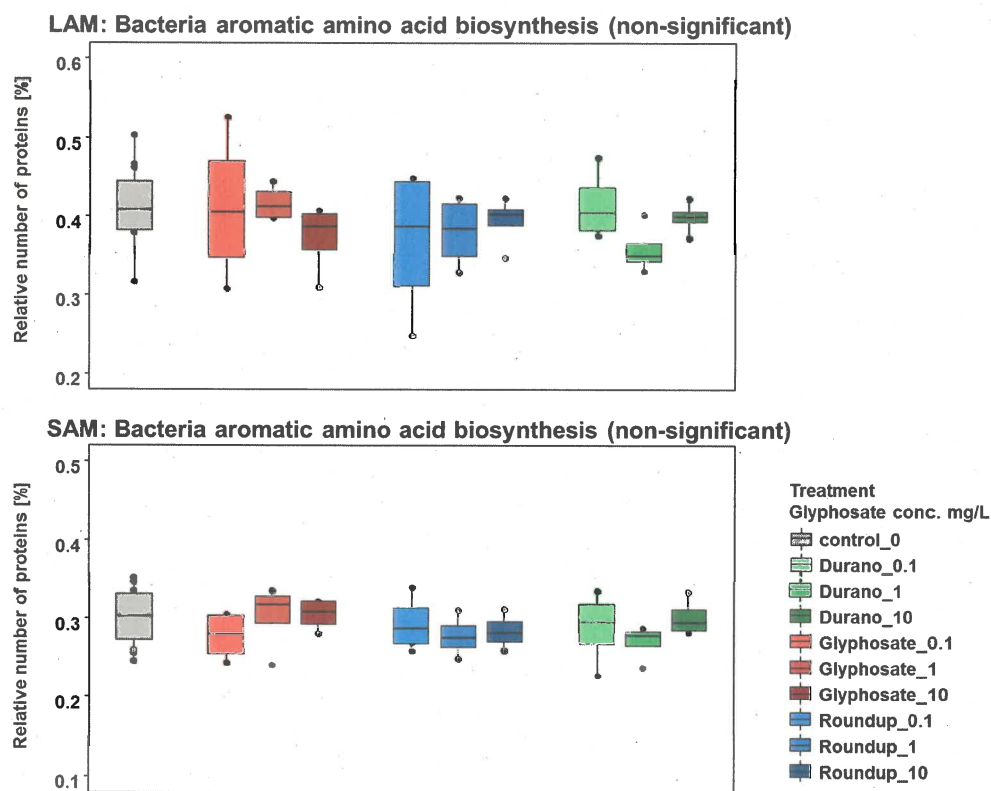


Abbildung 10: Änderungen nach Behandlung mit Roundup, Durano oder reinem Glyphosat in relative Anzahl der Proteine, die der aromatischen Aminosäurebiosynthese zuzuordnen sind.

Die Metaproteomik lässt auch eine Analyse der Stoffwechselproteine zu. Von großem Interesse waren natürlich die Proteine, die in der aromatischen Aminosäuresynthese eine Rolle spielen. Dies beruht darauf, dass die Störung dieses Stoffwechselweges durch die Hemmung des Enzymes Enolpyruvylshikimate-3-phosphate-synthase

(EPSPS) die primäre Wirkungsweise von Glyphosat auf Pflanzen und Bakterien darstellt. Man erkannte hierbei keine An- oder Abreicherung der Proteine in Zusammenhang mit der Glyphosatkonzentration, weder mit der Reinsubstanz noch mit einer der Formulierungen. Dies konnte für die flüssigkeits-assoziierten sowie für die feststoff-assoziierten Mikroben beobachtet werden (Abbildung 10).

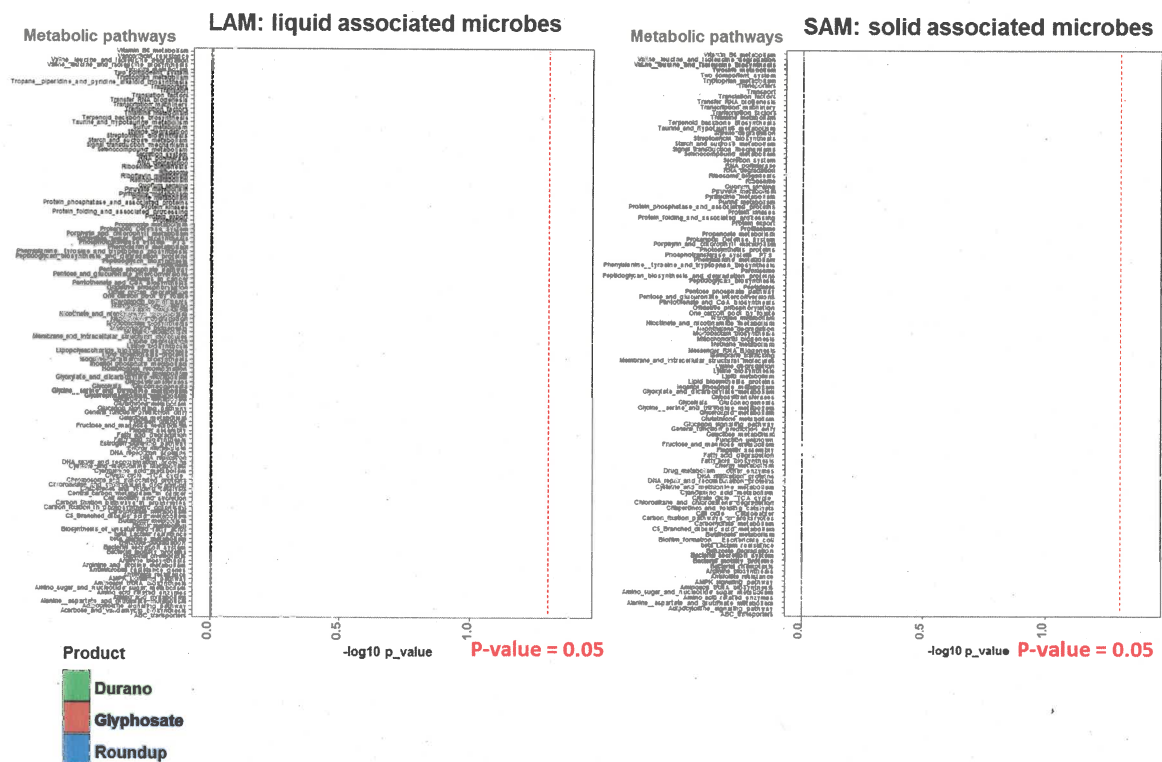


Abbildung 11: Signifikante Änderungen in den metabolischen Stoffwechselwegen nach Behandlung mit Roundup, Durano oder reinem Glyphosat. Wäre ein Stoffwechselweg für einen der untersuchten Stoffe signifikant verändert, würde ein Balken erkennbar sein, der über die rot gestrichelte Linie hinausgeht.

Es wurden daraufhin auch alle weiteren metabolischen Stoffwechselwege im Mikrobiom auf signifikante Änderungen in den beteiligten Enzymen untersucht. Um eine ausreichende funktionelle Abdeckung zu gewährleisten, wurden nur die

Stoffwechselwege betrachtet, bei denen mindestens 10 % der dazu gehörigen Enzyme durch der Metaproteomik identifiziert werden konnten. Wie Abbildung 11 entnommen werden kann, existiert kein Stoffwechselweg, der signifikant durch Glyphosat oder seine Formulierungen verändert wurde. Dies wurde sowohl für LAM als auch SAM Mikroben beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass weder Glyphosat noch einer seine Formulierungen in Konzentrationen von 0.1 bis 10 mg/mL einen sichtbaren Einfluss auf das Mikrobiom aus dem Rumenmodell haben. Weder wurden Änderungen auf taxonomischer noch auf funktioneller Ebene identifiziert. Die primäre Wirkungsweise von Glyphosat besteht in der Hemmung des Synthesestoffwechselweges der aromatischen Aminosäuren. Allerdings konnten auch dort keine Änderungen der Proteinabundanzen erkannt werden.

Mikrobiomuntersuchung im Kuhrumens nach Glyphosat Einwirkung

Die TUM-LT haben Mikrobiomproben aus fistulierten Kühen bereitgestellt. Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt: eine Gruppe erhielt Tierfutter, dass mit dem reinen Glyphosat belastet wurde, eine weitere erhielt RoundUp-additives Futter und als Kontrollgruppe dienten Tiere, die unbelastetes Futter erhielten. Als Glyphosat-Menge wurde die höchste Konzentration des Ansatzes des Bioreaktormodells (siehe unter 2) ausgewählt.

Es wurden keine Änderungen durch die Behandlung mit Glyphosat oder dessen Formulierung Roundup in der Alpha-Diversität beobachtet (Abbildung 12).

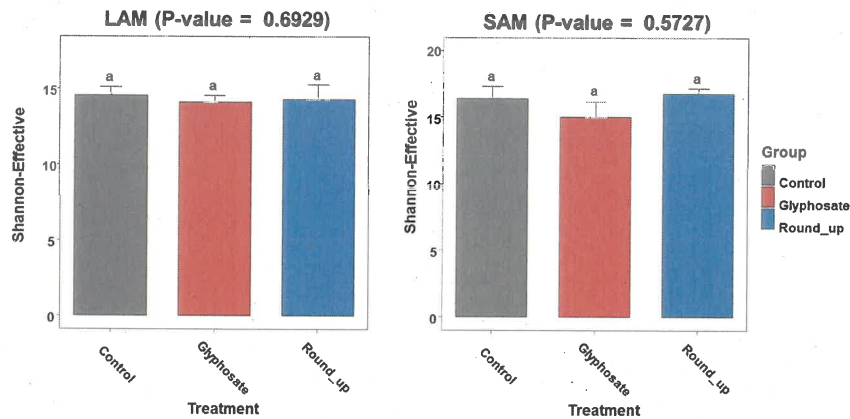


Abbildung 12: Alpha-Diversität des Mikrobioms nach Behandlung mit Glyphosat in Reinform oder als Formulierung Roundup. Wäre ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Behandlungen vorhanden, würden verschiedene Buchstaben über den Säulen stehen.

Eine Hauptkomponentenanalyse der Daten zeigte keine globalen Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Behandlungen mit Glyphosat oder Roundup, weder für die LAM noch für die SAM (Abbildung 13).

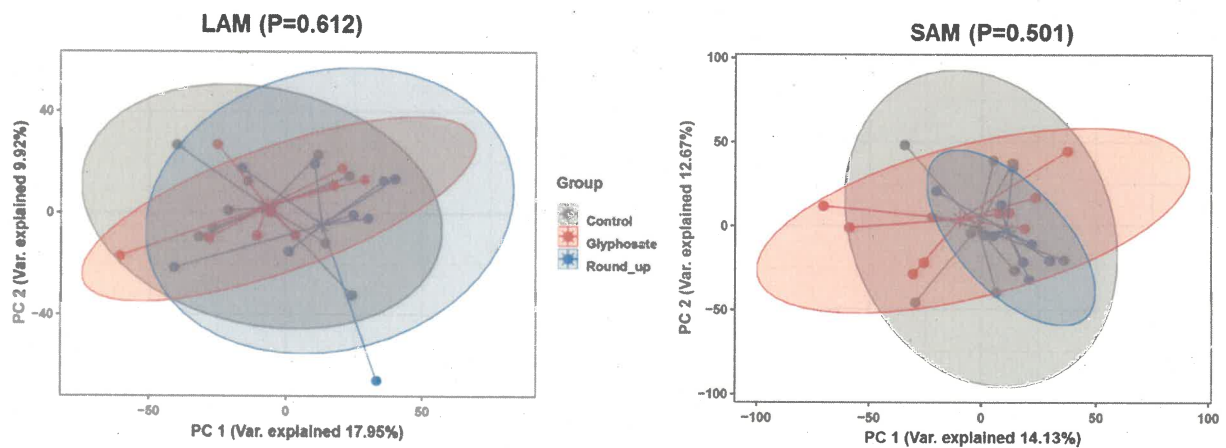


Abbildung 13: Änderungen des Metaproteoms basierend auf einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) von flüssigkeits- oder feststoff-assoziierten Mikroben (LAM oder SAM). Die Punkte stellen die einzelnen Proben dar, Sterne die Centroids der Proben und die Ellipsen den Vertrauensbereich von 95 %.

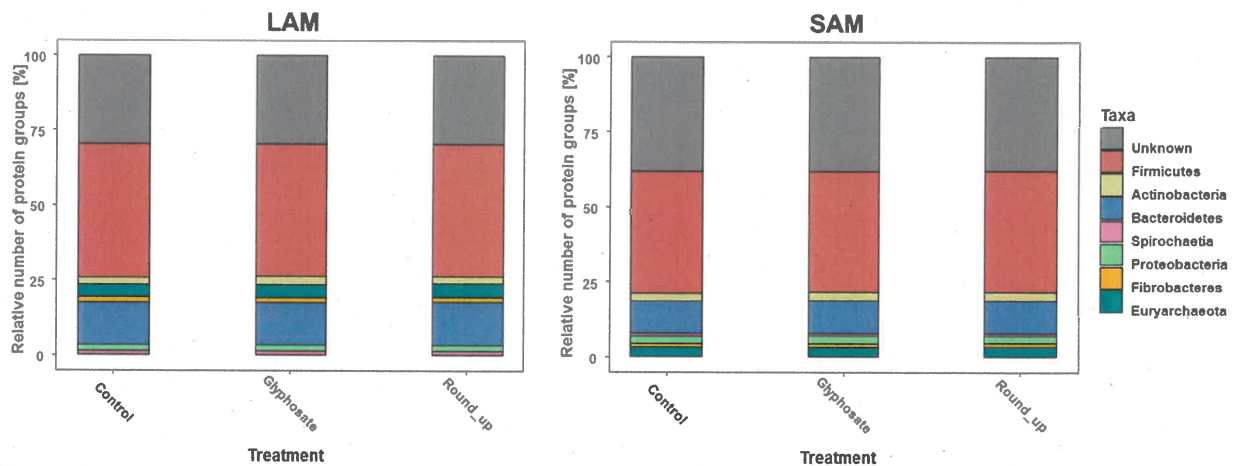


Abbildung 14: Taxonomische Verteilung der Mikroben von den flüssigkeits-assoziierten Mikroben (A) und den feststoff-assoziierten Mikroben (B) auf Phylumebene.

Einen Einfluss von Glyphosat oder Roundup konnte auf der Verteilung der Taxa in den LAM oder SAM Mikrobiomen weder auf Phylumebene (Abbildung 14) noch auf Gattungsebene (Abbildung 15) beobachtet werden.

Um funktionelle Änderungen im Mikrobiom durch den Einfluss von Glyphosat oder Roundup zu untersuchen, wurden die metabolischen Enzyme auf Ebene der Stoffwechselwege analysiert. Es konnte keine Änderung in der Abundanz der Enzyme, die zur Biosynthese von aromatischen Aminosäuren benötigt werden, beobachtet werden (Abbildung 16).

Alle weiteren untersuchten metabolischen Stoffwechselwege zeigten ebenfalls keine Änderung in ihren Proteinabundanzen durch die Behandlung mit Glyphosat oder Roundup (Abbildung 17).

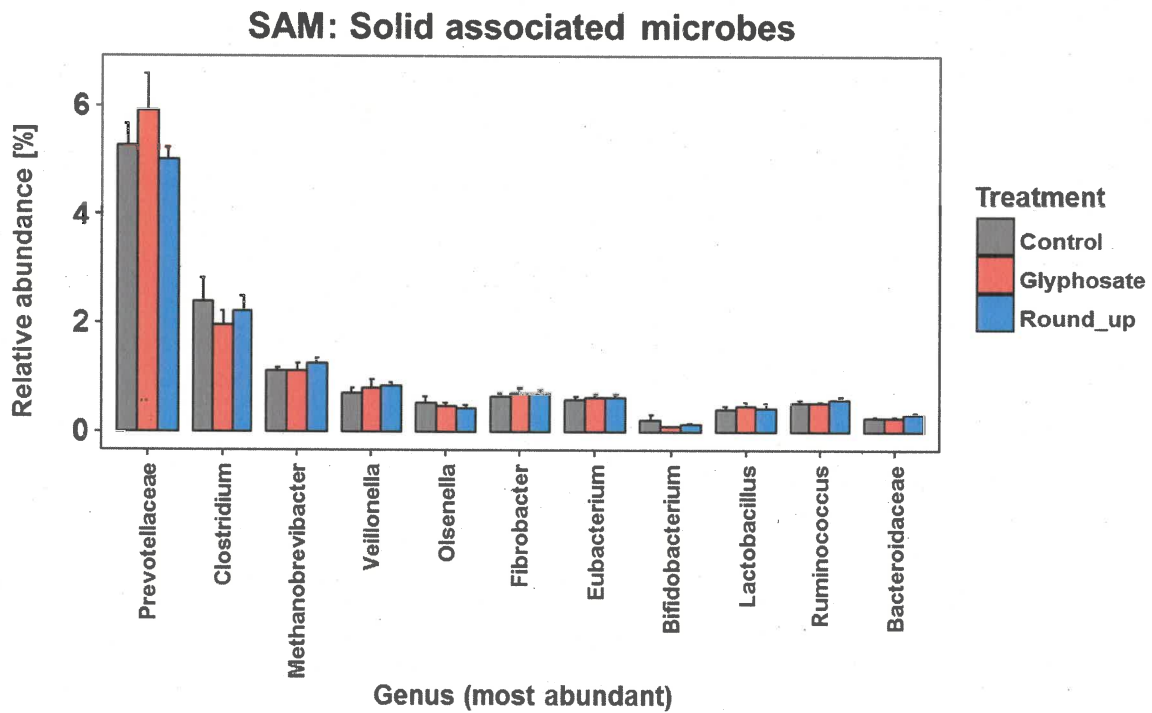
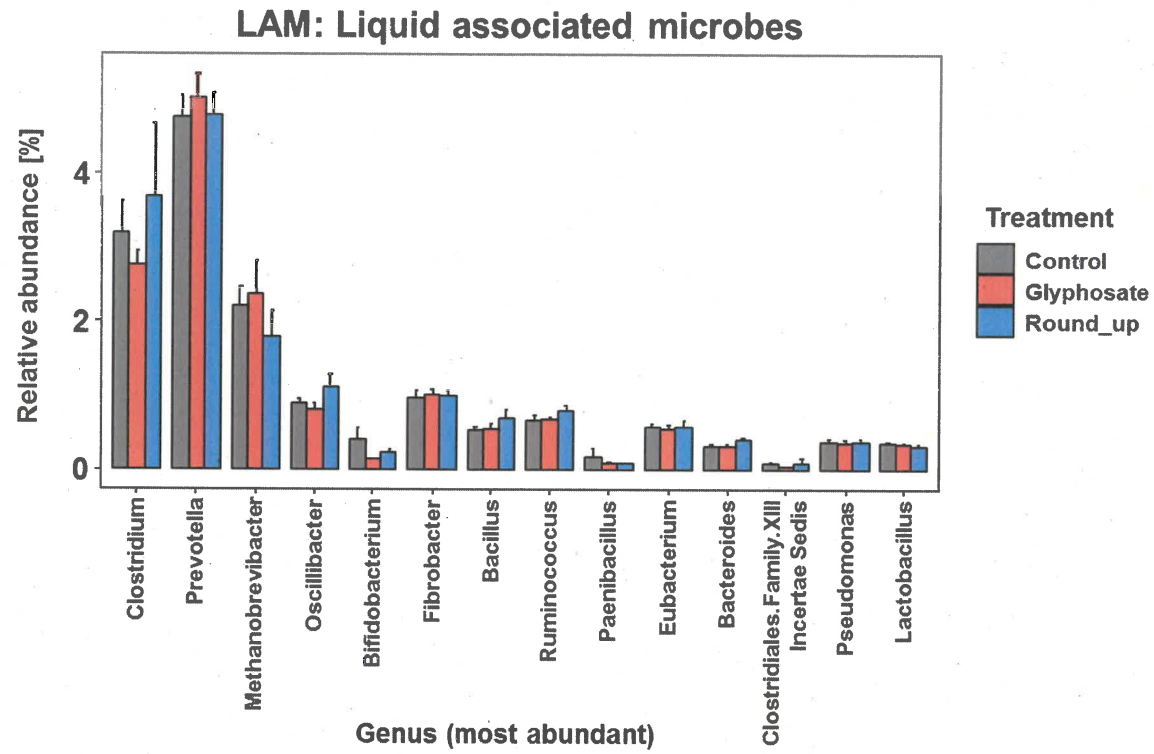


Abbildung 15: Abundanz der häufigsten Bakteriengattungen unter den flüssigkeits-assoziierten Mikroben (oben) und den feststoff-assoziierten Mikroben (unten).

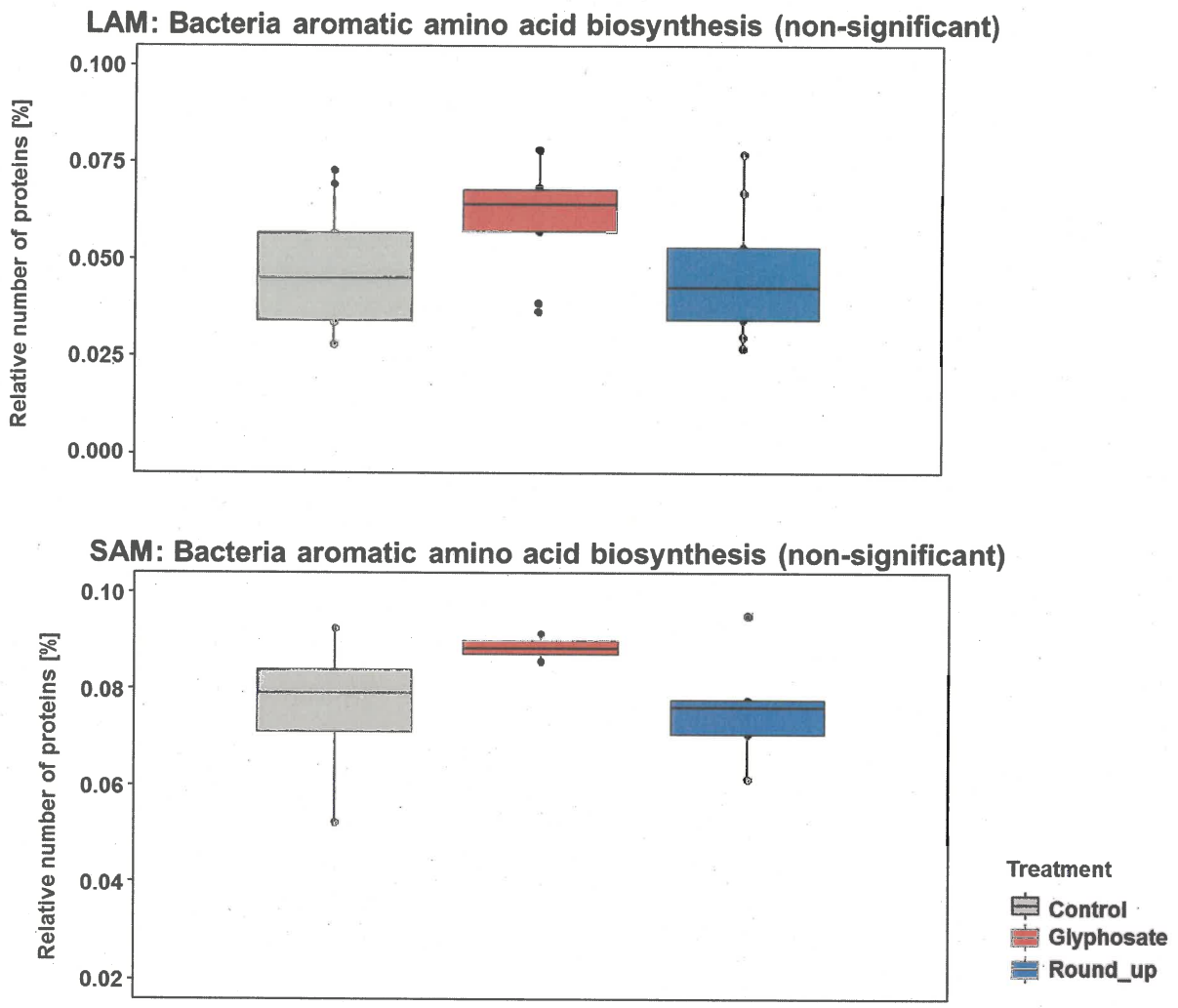


Abbildung 16: Änderungen nach Behandlung mit Roundup, Durano oder reinem Glyphosat in der relativen Anzahl der Proteine, die zur aromatische Aminosäurebiosynthese zuzuordnen sind.

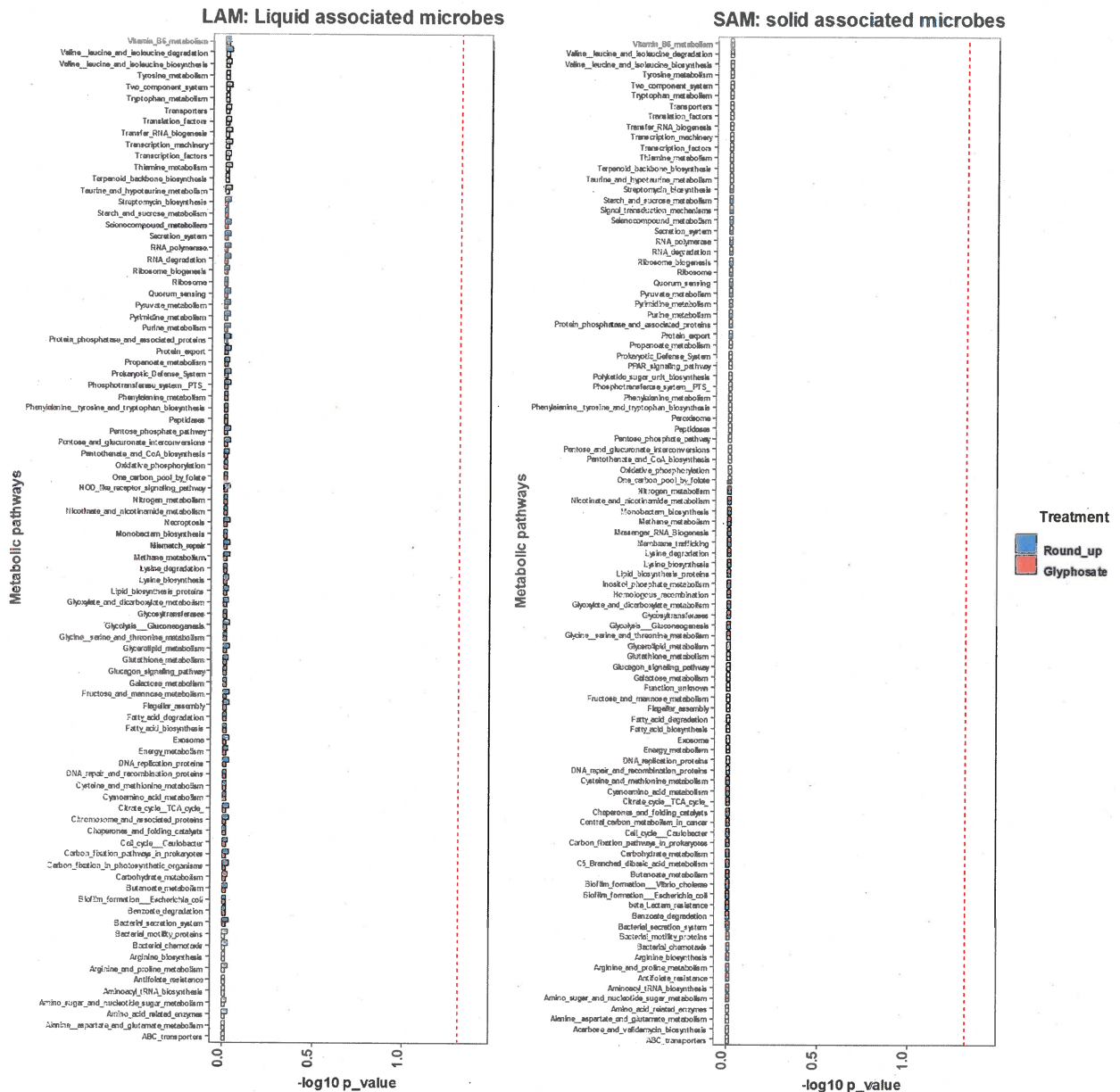


Abbildung 17: Signifikante Änderungen in den metabolischen Stoffwechselwegen nach Behandlung mit Roundup oder reinem Glyphosat. Wäre ein Stoffwechselweg für einen der untersuchten Stoffe signifikant verändert, würde ein Balken erkennbar sein, der über die rot gestrichelte Linie hinausgeht.

Mikrobiomuntersuchung im Bioreaktormodell des Schweinekolons

Ein Bioreaktor-Modellsystem des Mikrobioms eines Schweinedickdarms wurde etabliert.

Um Auswirkungen der Glyphosat-Formulierung Roundup zu untersuchen wurde nach

einer Äquilibration des Mikrobioms Roundup (10.7 mM Glyphosat Konzentration) kontinuierlich hinzugeben. Es wurde dann mittels Omics-Techniken die taxonomische und funktionelle Zusammensetzung des Mikrobiom-Modellsystem verfolgt.

Wie zu erwarten war, ergab die Glyphosat-Messung, dass erst Glyphosat nach Zugabe von Roundup detektiert werden konnte (Abbildung 18 A). Die Biomasse pro 1 mL Bioreaktorflüssigkeit hat sich nach Roundup-Zugabe nicht signifikant geändert (Abbildung 18 B).

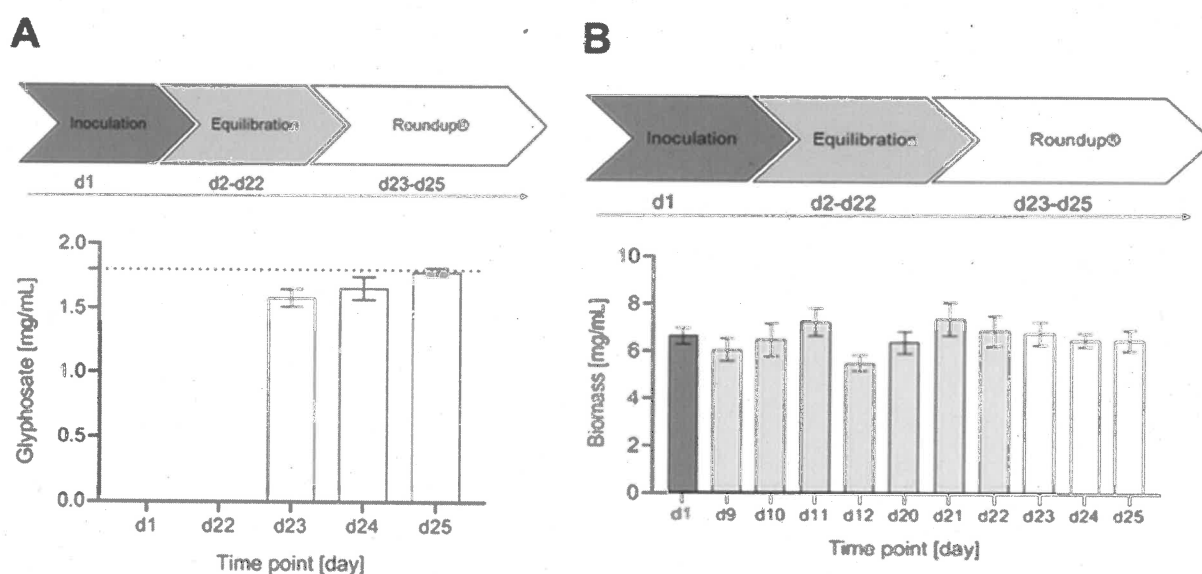


Abbildung 18: Konzentration an Glyphosat im Bioreaktor (A) und die Biomasse der Bakterien aus 1 mL Bioreaktorflüssigkeit (B).

Die absolute und relative Quantifizierung der kurzkettigen Fettsäuren in der Bioreaktorflüssigkeit fand in der Kontroll- und Expositionsproben statt. Kurzkettige Fettsäuren sind die Hauptfermentationsprodukte der Bakterien des Darms und somit kann eine Änderung in der Zusammensetzung dieser eine Änderung in der Bakteriengemeinschaft darstellen. Wie man erkennen kann, gab es weder eine Ballung

der Proben nach Tagen (Abbildung 19), noch eine Änderung im Profil der kurzkettigen Fettsäuren (Abbildung 19).

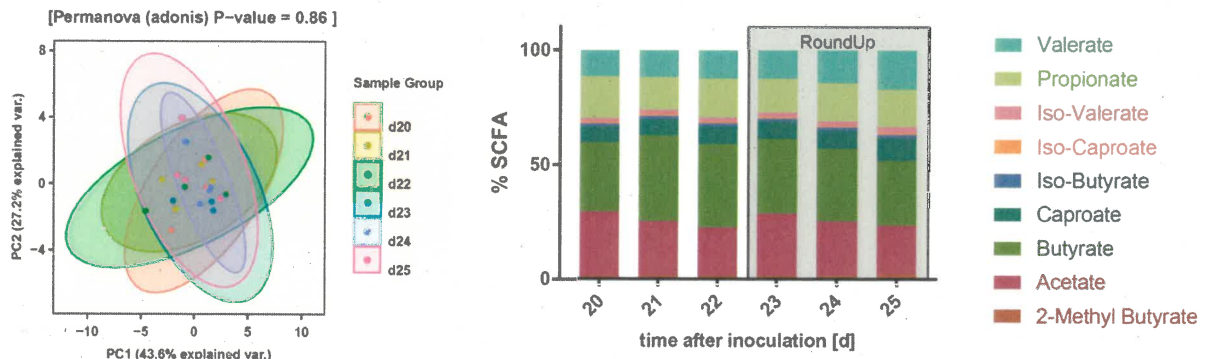


Abbildung 19: Gerichtete Metabolom-Untersuchung der kurzkettigen Fettsäuren. PCA der kurzkettigen Fettsäuren (A) und relative Abundanz der einzelnen gemessenen kurzkettigen Fettsäuren (B).

Das Mikrobiom zeigte weder eine Änderung in ihrer taxonomische noch funktionellen Zusammensetzung nach der Zugabe von Roundup (Abbildung 20).

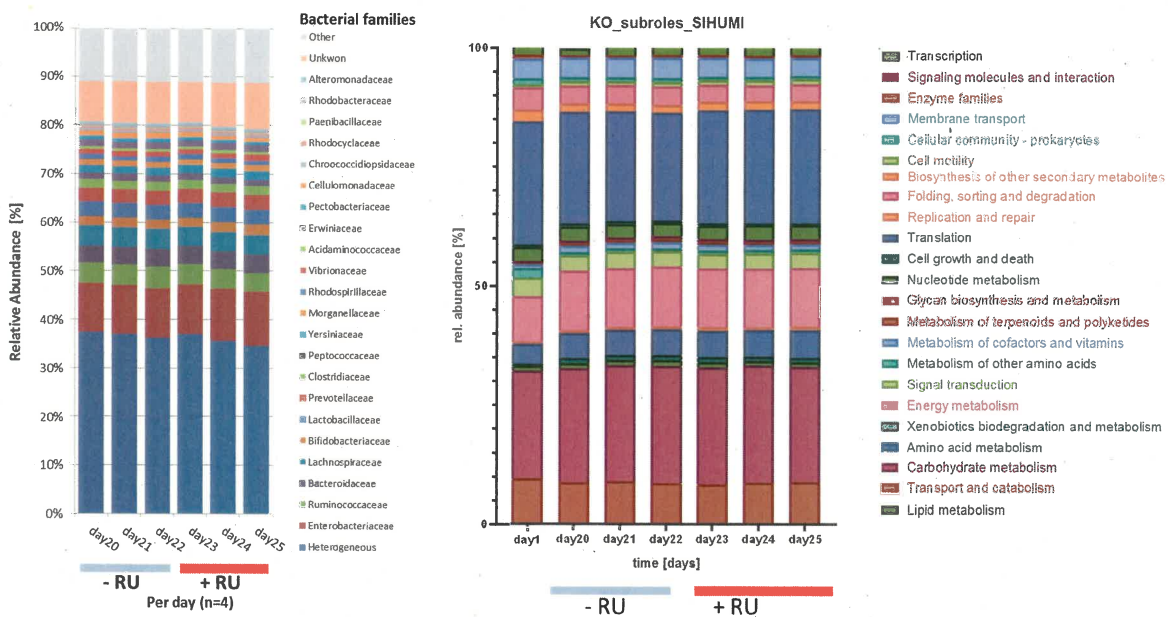


Abbildung 20: Taxonomische (links) und funktionelle Zusammensetzung der Proteine aus dem Mikrobiom vor (-RU) und nach (+RU) Roundup Behandlung.

Um einen tieferen Einblick auf mögliche Veränderungen in den Funktionen des Mikrobioms zu untersuchen, wurden die einzelnen Aminosäure Abbau- und Synthesewege auf Proteinebene analysiert. Keiner dieser Wege zeigte eine Veränderung nach Roundup Exposition, auch nicht der Stoffwechselweg der aromatischen Aminosäurebiosynthese, obwohl dieser von Glyphosat gehemmt werden sollte (Abbildung 21).

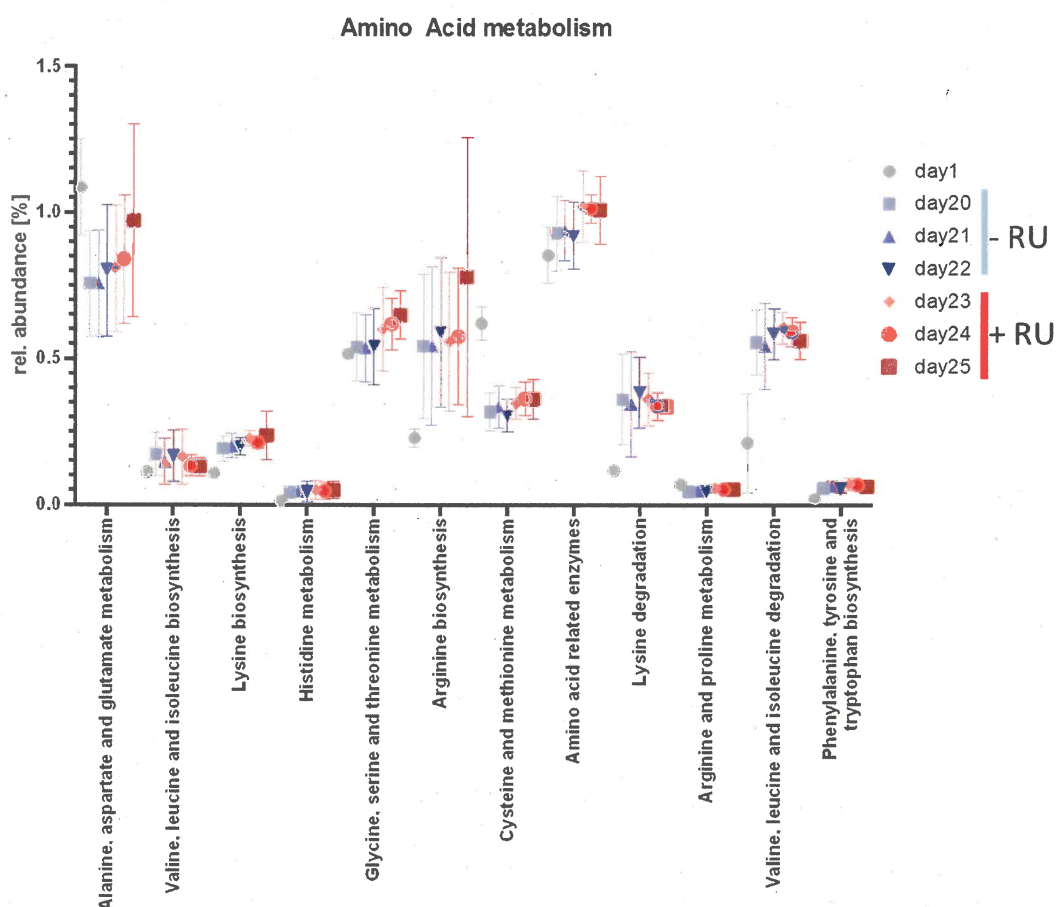


Abbildung 21: Änderung der Proteinabundanz der Aminosäuren Stoffwechselwege vor (-RU) und nach (+RU) Roundup Behandlung.

Es konnten mehrere 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthasen (EPSPS) aus verschiedenen Bakterienarten identifiziert werden. Die EPSPS ist das primäre Ziel von

Glyphosat und wird durch Glyphosat gehemmt. Es wurde keine Änderung in der Abundanz der verschiedenen EPSP- Synthasen beobachtet (Abbildung 22).

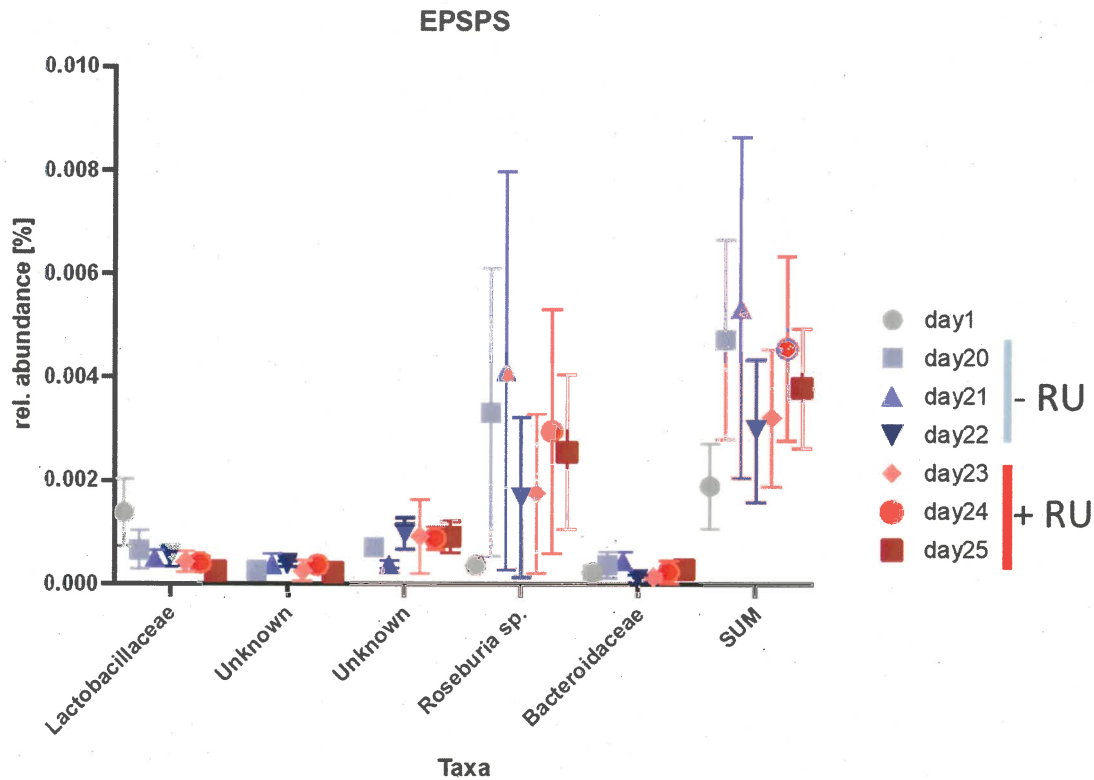


Abbildung 22: Änderung der Proteinabundanz der verschiedenen detektierten 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthasen (EPSPS) vor (-RU) und nach (+RU) Roundup Behandlung.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die vorliegenden Studien stellen umfangreiche Untersuchungen über den Einfluss von Glyphosat auf die Mikrobiome von Nutztieren dar. Mittels OMICS-Technologien konnte erstmalig der Einfluss von Glyphosat auf die taxonomische Zusammensetzung und die metabolische Funktionen von Mikrobiomen aus Nutztieren *in vivo* und *in vitro* untersucht werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass Glyphosat und dessen untersuchten Formulierungen, in den angewendeten Konzentrationen, keine Einflüsse auf die taxonomische und physiologische Zusammensetzung der Mikrobiome im Kuhpannen oder im Schweinedarm haben. Die Ergebnisse werden für mehrere wissenschaftliche Publikationen bearbeitet.

4 Zusammenfassung

Es wurden alle Proben aus dem Bioreaktor des Kuhpannens der TiHo-PL molekularbiologisch untersucht und kein Einfluss des Glyphosats auf die Zusammensetzung oder die Physiologie der vorhandenen Mikroben beobachtet. Dies wurde durch die molekularbiologische Untersuchung der *in vivo* Proben aus dem Kuhpannen bestätigt. Auch das Mikrobiom aus dem Bioreaktormodell des Schweinedarms zeigte weder eine Veränderung auf taxonomischer noch auf funktioneller Ebene.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass weder Glyphosat noch die untersuchten kommerziell verfügbaren Formulierungen in den untersuchten Konzentrationen einen signifikanten Einfluss auf der Artenzusammensetzung noch deren metabolischen Funktionen auf das Mikrobiom im Kuhpannen oder im Schweinedarm haben.

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

Ziel des gesamten Vorhabens war es, den Einfluss von Glyphosat oder kommerziell erhältliche Glyphosat-Formulierungen daraufhin zu untersuchen ob sie eine Änderung der Mikrobiota aus dem Kuhpansen oder aus dem Schweinedarm auslösen. Das Teilvorhaben der UL-IB setze sich aus der Analyse der eigenen Proben aus einem Schweinedarm-Bioreaktormodell und aus der Analyse von Proben, die durch Projektpartner bereitgestellt wurden, zusammen. In beiden Fällen wurde zur molekularbiologischen Untersuchung der Proben auf OMICS-Technologien zurückgegriffen.

Hierzu wurde erst eine Methode entwickelt, um Glyphosat und seinen Metaboliten AMPA in komplexen biologischen Matrices zu quantifizieren. Diese Methode basiert auf einer LC-MS/MS Technik. Ein Manuskript wurde fertiggestellt und bei „Rapid Communication in Massspectrometry“ eingereicht. Zurzeit befindet es sich im Revisionsprozess.

Bei der Etablierung des Schweinedarm-Bioreaktormodells gab es Schwierigkeiten. Durch Zusteuern von Arbeitskraft aus dem Arbeitskreis auf eigene Kosten konnte eine Verschleppung vermieden werden und das Modellsystem erfolgreich etabliert werden. Ein weiteres Manuskript zu den Ergebnissen des Schweinedarm-Bioreaktormodells ist in Bearbeitung.

Die OMICS-Analysen wurden erfolgreich abgeschlossen, außer der Untersuchung der Bakteriellen DNA basierend auf der 16S rRNA-Gensequenzierung. Obwohl alle DNA-

Proben extrahiert, aufgereinigt und zur Sequenzierung zu einem kommerziellen Unternehmen geschickt wurden, lagen die Ergebnisse dieser Sequenzierung beim Schreiben dieses Abschlussberichtes noch nicht vor. Diese Ergebnisse werden selbstverständlich innerhalb von 3 Monaten nachgereicht. Der hierfür eingearbeitete Mitarbeiter konnte über Haushaltsmittel für mindestens 2 weitere Jahre am UFZ gehalten werden, so dass diese Analysen gesichert sind. Auf der Basis unserer langjährigen Erfahrung mit der metaproteomischen und der taxonomischen Analyse von Mikrobiomproben mittels 16SrRNA erwarten wir keine Hinweise auf taxonomische Effekte von Glyphosat, da metaproteomische Analysen in der Vergangenheit stets sensitiver für die Detektion von Effekten waren.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass unter den gegebenen Konditionen kein signifikanter Effekt von Glyphosat oder den verwendeten Formulierungen festzustellen war. Es gibt aus dem Bioreaktorversuch Hinweise auf sub-signifikante Effekte in Bezug auf die Expression der EPSPS und der Abundanz einzelner kurzkettiger Fettsäuren.

Eine mögliche Ursache, weshalb die Mikrobiota so aussergewöhnlich stabil war, könnte in der Verwendung von Medium liegen, dass auf die Nahrungssituation von adulten Tieren angepasst war. In diesem sind auch aromatische Aminosäuren enthalten, was eine etwaige Hemmung der EPSPS unnötig macht, da bei Aminosäurekonzentrationen von $>10 \mu\text{M}$ keine Neubildung von aromatischen Aminosäuren gebraucht wird.

Auf dieser Basis und weil es nicht-signifikante Effekte im Reaktorversuch gab erscheint es ratsam, diesen Fragen weiter nachzugehen. Wir schlagen deshalb Experimente mit jungen Schweinen, und deren Mikrobiom im Bioreaktor mit angepasster Diät vor, die die Situation während des Abstillens simulieren. Für diesen Zeitraum ist nämlich bekannt,

dass es zu einem Mangel in der Verfügbarkeit von aromatischen Aminosäuren kommen kann. Um auf der Seite der Detektion empfindlicher zu werden schlagen wir weiterhin die Verwendung von metatranskriptomischer Analytik neben der bisher verwendeten Metaproteomik vor, wie sie beide im Department für Molekulare Systembiologie gut etabliert sind. Angesichts des hohen gesellschaftlichen Interesses erscheint es angeraten, die jeweils empfindlichste Technik mit der entsprechenden persönlichen Expertise zu verknüpfen, um wirklich unanfechtbare Ergebnisse zu erhalten.

Während der Laufzeit des Projektes erschien eine Studie, die einen Effekt von Glyphosat auf die Bienengesundheit (Westliche Honigbiene, *Apis Mellifera*), insbesondere die Empfindlichkeit in Bezug auf eine Infektion des Dickdarmes berichtete. Diese Studie ist allerdings in Teilen oberflächlich: so wurden nur taxonomische Informationen aus dem Dickdarm herangezogen und keinerlei funktionale Informationen gesammelt. Ferner wurden für die Experimente nur gekäfigte Bienen verwendet, welche sich in der Lebensweise und Ernährung doch deutlich von Freilandbienen unterscheiden. Es erscheint sehr ratsam, diese Experimente mit Freilandbienen zu wiederholen und gleichzeitig dabei die Datenlage zu funktionalen Aspekten der Mikrobiota-Wirts-Interaktion in der Honigbiene zu verbessern, um molekulare Marker für die individuelle Bienengesundheit zu erhalten und für toxikologische Untersuchungen zugänglich zu machen. Darüber hinaus bietet das Bienenmodell mit den als gnotobiotische Organismen geschlüpften Imagos die Chance, die Mikrobiota-Wirts-Interaktion auf Speziesebene molekular aufzulösen.

Da aus sich aus politischen Gründen eine Abkehr von Glyphosat abzeichnet, erscheint es dringend angeraten, die Nachfolgeprodukte mit ähnlicher Stringenz zu untersuchen

wie Glyphosat. Darunter ist die Testung auf mögliche Mikrobiom-vermittelte toxische Effekte zu verstehen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Shehata AA, Schrodli W, Aldin AA, Hafez HM, Kruger M. The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Curr Microbiol* 2013;**66**:350-8.
- 2 Clair E, Linn L, Travert C, Amiel C, Seralini GE, Panoff JM. Effects of Roundup((R)) and glyphosate on three food microorganisms: *Geotrichum candidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Curr Microbiol* 2012;**64**:486-91.
- 3 Ackermann W, Coenen M, Schrodli W, Shehata AA, Kruger M. The influence of glyphosate on the microbiota and production of botulinum neurotoxin during ruminal fermentation. *Curr Microbiol* 2015;**70**:374-82.
- 4 Riede S, Toboldt A, Breves G, Metzner M, Kohler B, Braunig J, *et al.* Investigations on the possible impact of a glyphosate-containing herbicide on ruminal metabolism and bacteria in vitro by means of the 'Rumen Simulation Technique'. *J Appl Microbiol* 2016;**121**:644-56.
- 5 Wissenbach DK, Oliphant K, Rolle-Kampczyk U, Yen S, Hoke H, Baumann S, *et al.* Optimization of metabolomics of defined in vitro gut microbial ecosystems. *International journal of medical microbiology : IJMM* 2016;**306**:280-9.

6 Haange SB, Jehmlich N, Hoffmann M, Weber K, Lehmann J, von Bergen M, *et al.* Disease Development Is Accompanied by Changes in Bacterial Protein Abundance and Functions in a Refined Model of Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis. *J Proteome Res* 2019;**18**:1774-86.

7 Kitteringham NR, Jenkins RE, Lane CS, Elliott VL, Park BK. Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;**877**:1229-39.