



Einfluss eines glyphosathaltigen Pflanzenschutzmittels auf
die ruminale Fermentation und mikrobielle Gemeinschaft
in vitro unter besonderer Berücksichtigung von Clostridia

Gerhard Breves, Susanne Riede
Physiologisches Institut

Hintergrund

Glyphosat

- N-(phosphonomethyl)-Glycin
- Wirkstoff in Pflanzenschutzmittel
- Bisherige Bewertung: geringe Toxizität, hohe Umweltverträglichkeit
- Neue Vermutung: Rückstände von Glyphosat und Tallowaminen (Surfactant) im Futter könnten die mikrobielle Population im Pansen von Wiederkäuern beeinflussen, indem für pathogene Clostridia ein Wachstumsvorteil gegenüber gesundheitsfördernden Mikroorganismen entsteht

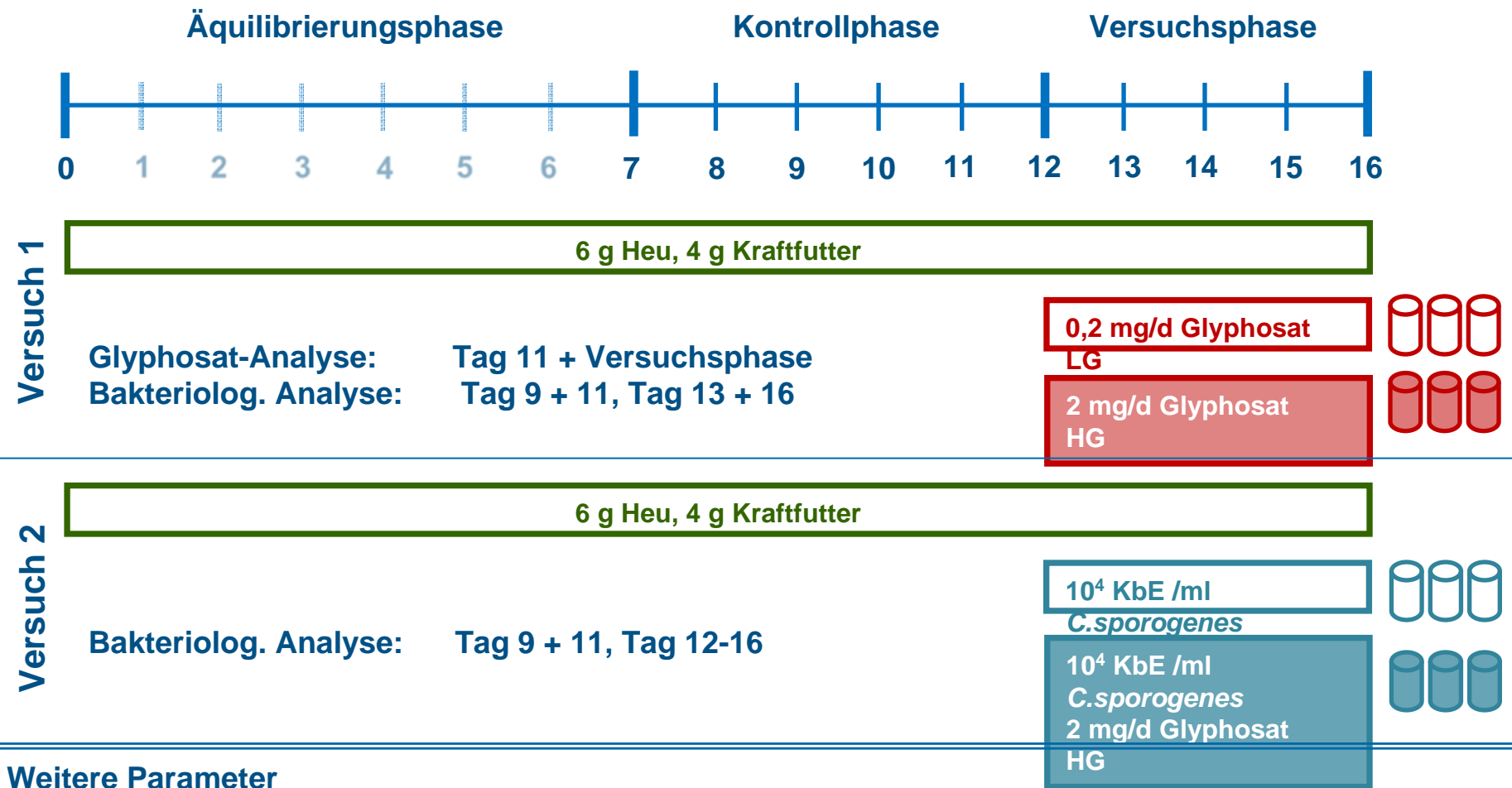
1. Einfluss eines glyphosathaltigen Pflanzenschutzmittels, welches Tallowamine enthält, auf die Quantität der Mikroorganismen (insbes. Clostridia), auf die mikrobielle Gemeinschaft und den mikrobiellen Vormagenstoffwechsel *in vitro*.
2. Quantitative Bestimmungen zur Aufnahme, renalen und faecalen Ausscheidung von Glyphosat bei laktierenden Kühen

Versuchsdesign: *In-vitro*-Versuche 1 und 2

Rumen-Simulationstechnik



Versuchsdesign: *In-vitro*-Versuche 1 und 2



Weitere Parameter

pH & Redoxpotential, SCFA-Produktion (+ molare Anteile), NH₃-N-Konzentration, Verdaulichkeit der OS
 Mikrobielle Gemeinschaft (Bacteria, Clostridia): Tag 9 + 11, Tag 13 + 16

Ergebnisse: Versuch 1

Glyphosat-Analyse

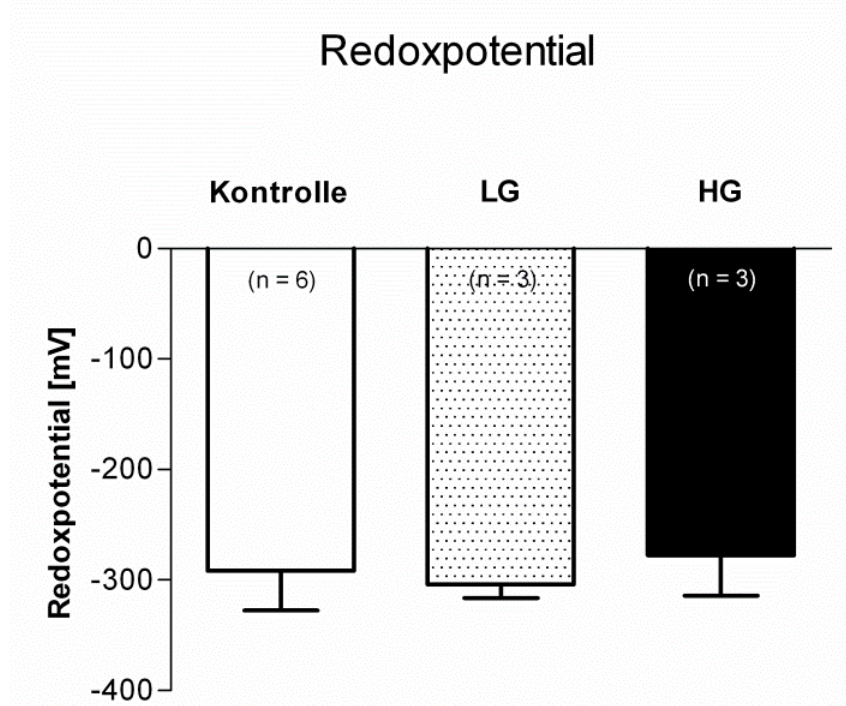
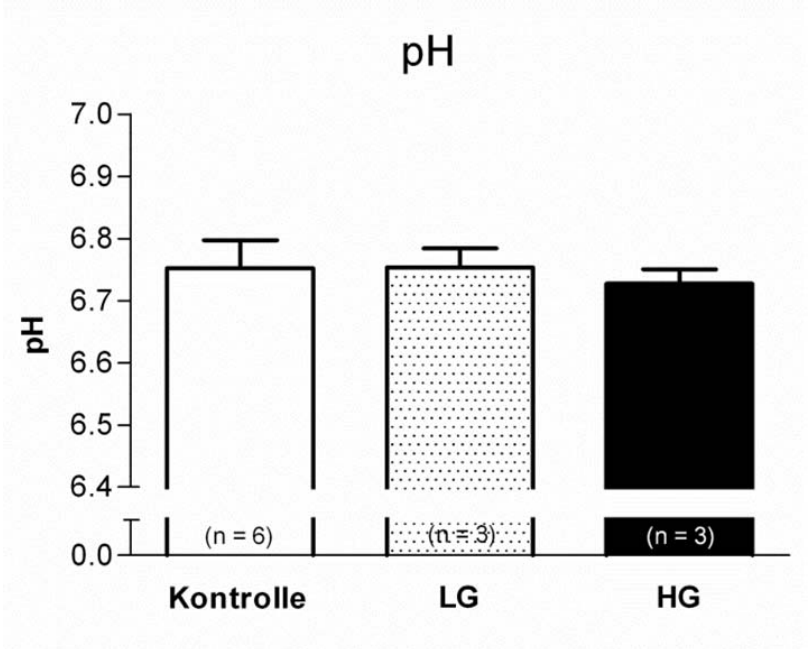
Glyphosat	Fermenter					
	A	B	C	D	E	F
Zugabe [mg/d]	0,42	2,92	0,42	2,92	0,42	2,92
Kontrollphase (Tag 11)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Versuchsphase gepoolt [mg/kg] = [mg/L]	0,33	2,97	0,34	2,95	0,34	3,39
Menge im Überlauf [mg/d]	0,27	2,20	0,25	2,21	0,26	2,51
Wiederfindung im Überlauf [%]	64,3	75,3	59,5	75,7	61,9	85,9

n.n. = unter der Nachweisgrenze von 0,05 mg/kg

QuPPE-Methode (LC-MS-MS)
Dr. Iris Suckrau, LAVES, Oldenburg

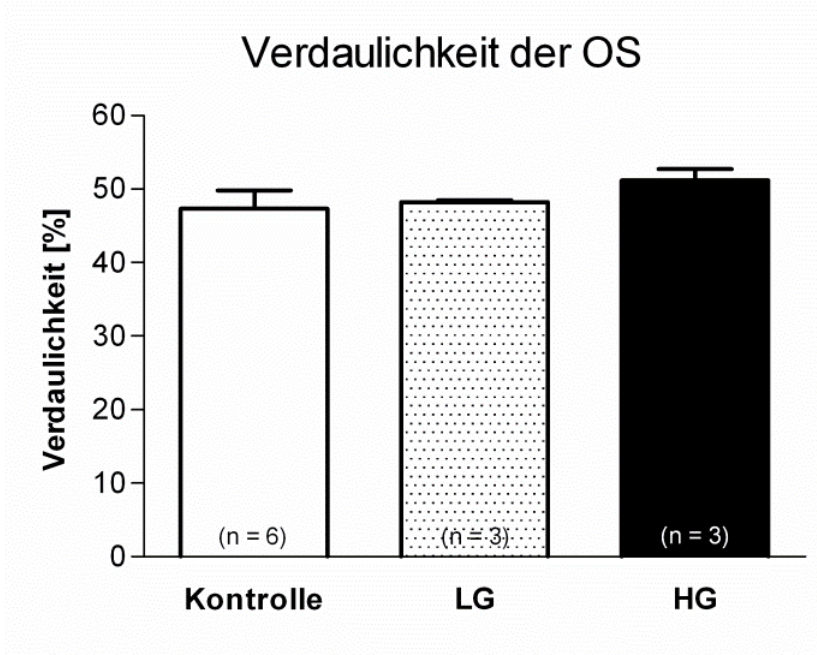
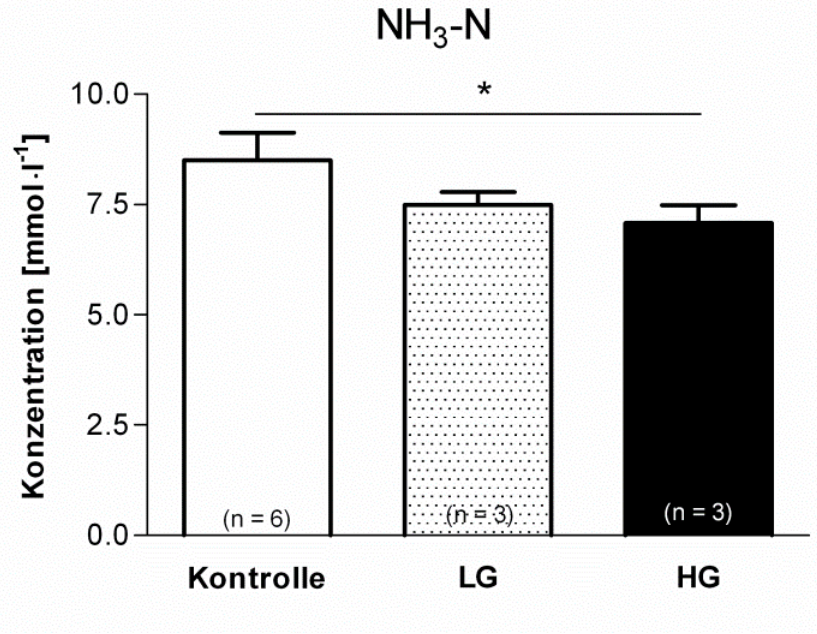
Ergebnisse: Versuch 1

pH & Redoxpotential



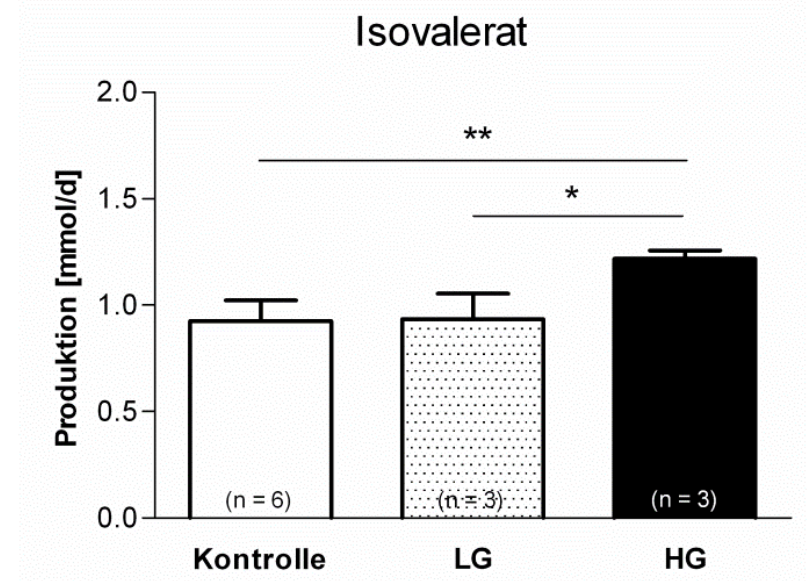
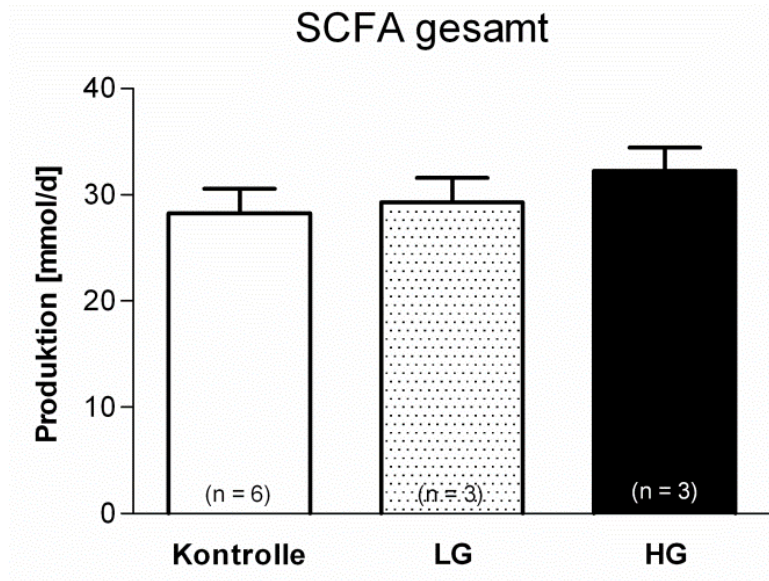
Ergebnisse: Versuch 1

NH₃-N-Konzentration & Verdaulichkeit



Ergebnisse: Versuch 1

SCFA-Produktion



Ergebnisse: Versuch 1

Bakteriologische Untersuchung: Clostridia

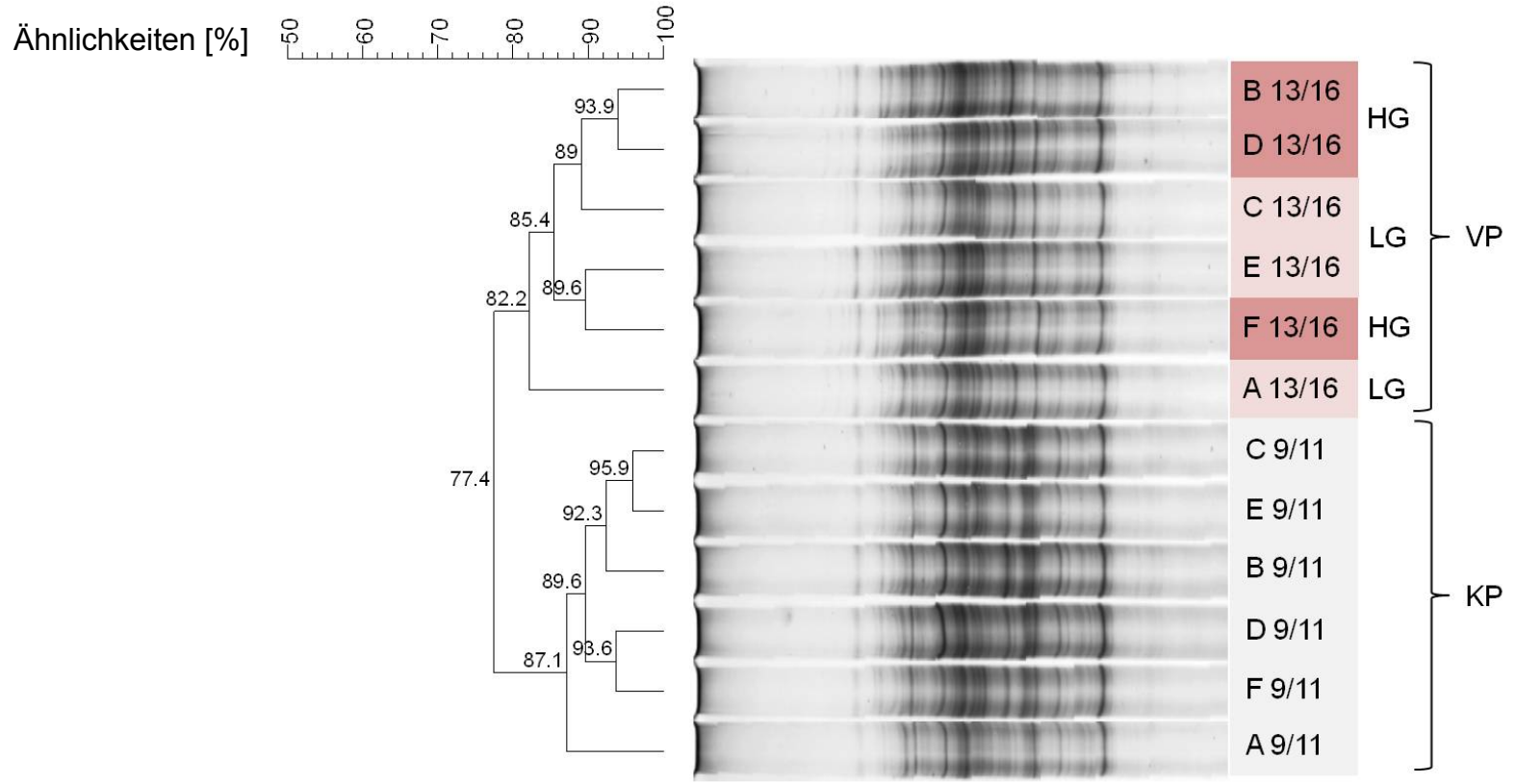
Phase	Tag	Fermenter					
		A	B	C	D	E	F
KP	9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	$>10^0 < 10^1$ <i>C. perfringens</i> nicht typisiert
	11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Zugabe		+ LG	+ HG	+ LG	+ HG	+ LG	+ HG
VP	13	$>10^0 < 10^1$ <i>C. perfringens</i> A (≤ 4 NE; $\beta 2$ negativ)	$>10^0 < 10^1$ <i>C. perfringens</i> A (≤ 4 NE; $\beta 2$ negativ) $>10^0 < 10^1$ <i>C. bifermentans</i>	n.n.	n.n.	n.n.	$>10^0 < 10^1$ <i>C. perfringens</i> A (≤ 4 NE; $\beta 2$ negativ)
	16	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Außerdem: *Aerococcus viridans*, *Bacillus cereus* group, *Bacillus licheniformis*, *Bacteroides graminisolvens*, *Citrobacter* spp., *Enterococcus faecalis*, *Escherichia hermannii*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leucobacter*, *Morganella*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Riemerella M2878*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* spp., unbekannte Erreger

Auffällig: *Bifidobacterium* spp. nur in Versuchsphase nach Glyphosat-Zugabe (bis 1700×10^4 KbE/ml)

Ergebnisse: Versuch 1

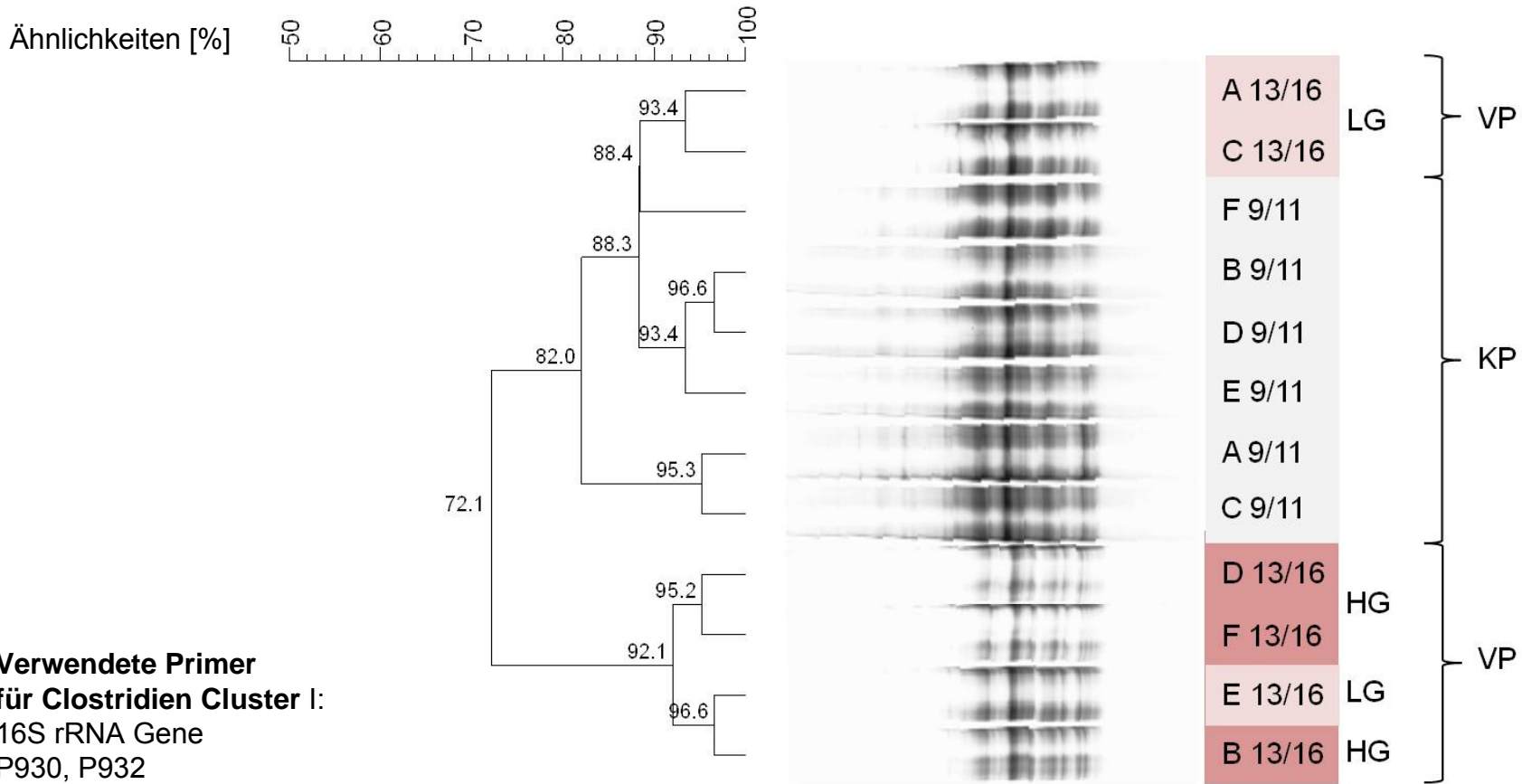
SSCP-Analyse: Mikrobielle Gemeinschaft Bacteria



Kontroll- vs. Versuchsphase p < 0,01

Ergebnisse: Versuch 1

SSCP-Analyse: Mikrobielle Gemeinschaft Clostridia



**Verwendete Primer
für Clostridien Cluster I:**
16S rRNA Gene
P930, P932
Dohrmann et al. 2011

Keine signifikanten Unterschiede

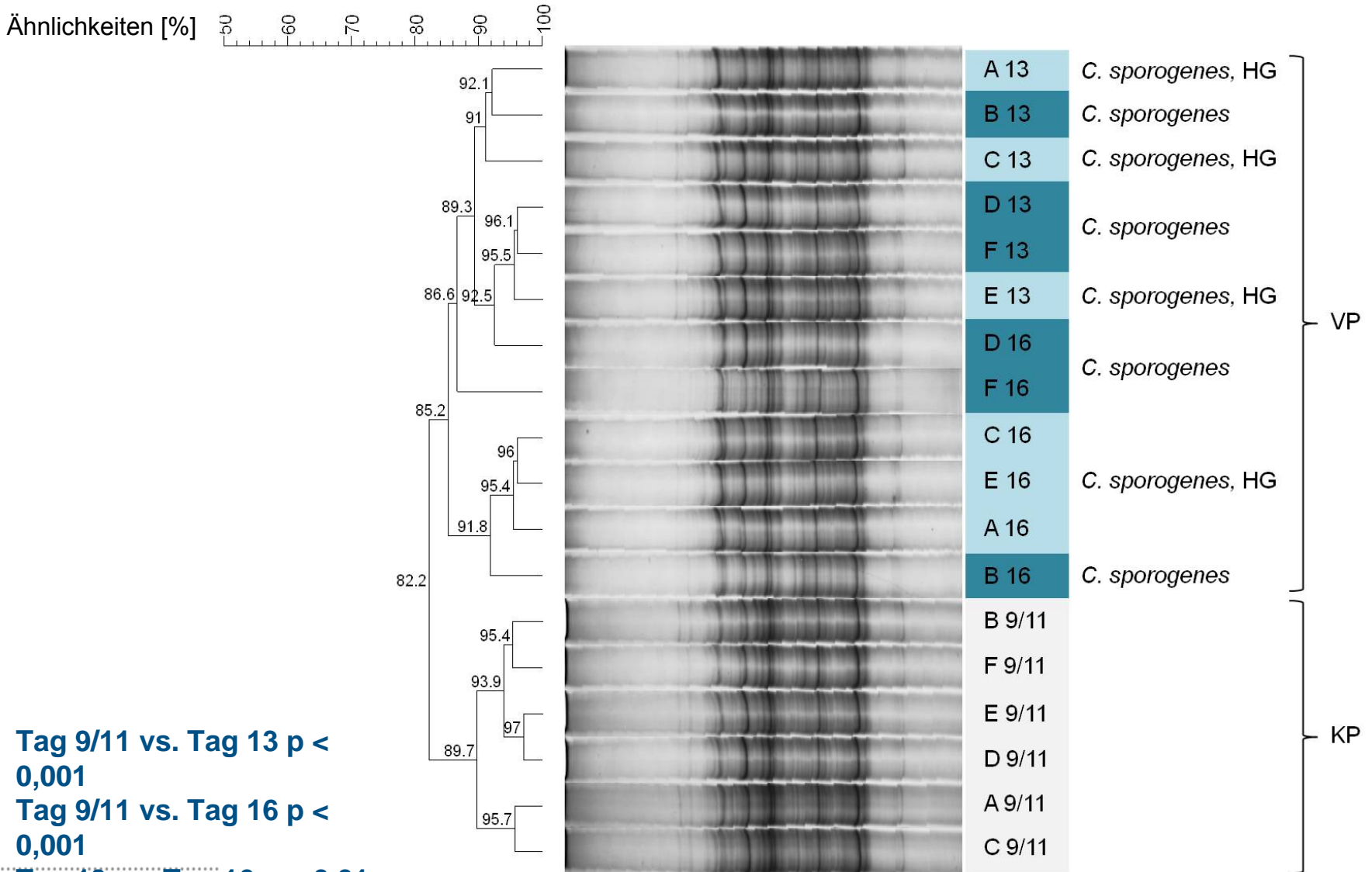
Ergebnisse: Versuch 2

Bakteriologische Untersuchung

Phase	Tag	Fermenter					
		A	B	C	D	E	F
KP	9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	6x10 ⁸ C. sartagoforme	n.n.
Zugabe		10 ⁴ C. sporogenes + HG	10 ⁴ C. sporogenes	10 ⁴ C. sporogenes + HG	10 ⁴ C. sporogenes	10 ⁴ C. sporogenes + HG	10 ⁴ C. sporogenes
VP	12	2x10 ⁴ C. sporogenes	1x10 ⁴ C. sporogenes	3x10 ⁴ C. sporogenes	5x10 ⁴ C. sporogenes	2x10 ⁴ C. sporogenes	1x10 ⁴ C. sporogenes
	13	2x10 ³ C. sporogenes	2x10 ³ C. sporogenes	1x10 ³ C. sporogenes	>10 ³ <10 ⁴ C. sporogenes	in 1 g n.n.	>10 ⁰ <10 ¹ C. sporogenes
	14	7x10 ² C. sporogenes	1x10 ³ C. sporogenes	3x10 ² C. sporogenes	1x10 ³ C. sporogenes	3x10 ⁷ C. sporogenes	2x10 ³ C. sporogenes
	15	2x10 ² C. sporogenes	2x10 ² C. sporogenes	>10 ¹ <10 ² C. sporogenes	>10 ² <10 ³ C. sporogenes	>10 ⁰ <10 ¹ C. sporogenes 1x10 ⁸ C. sartagoforme	in 1 g n.n.
	16	>10 ¹ <10 ² C. sporogenes	1x10 ² C. sporogenes	>10 ¹ <10 ² C. sporogenes	2x10 ⁴ C. sporogenes	2x10 ⁷ C. sartagoforme	in 1 g n.n.

Ergebnisse: Versuch 2

SSCP-Analyse: Mikrobielle Gemeinschaft Bacteria



Tag 9/11 vs. Tag 13 $p < 0,001$

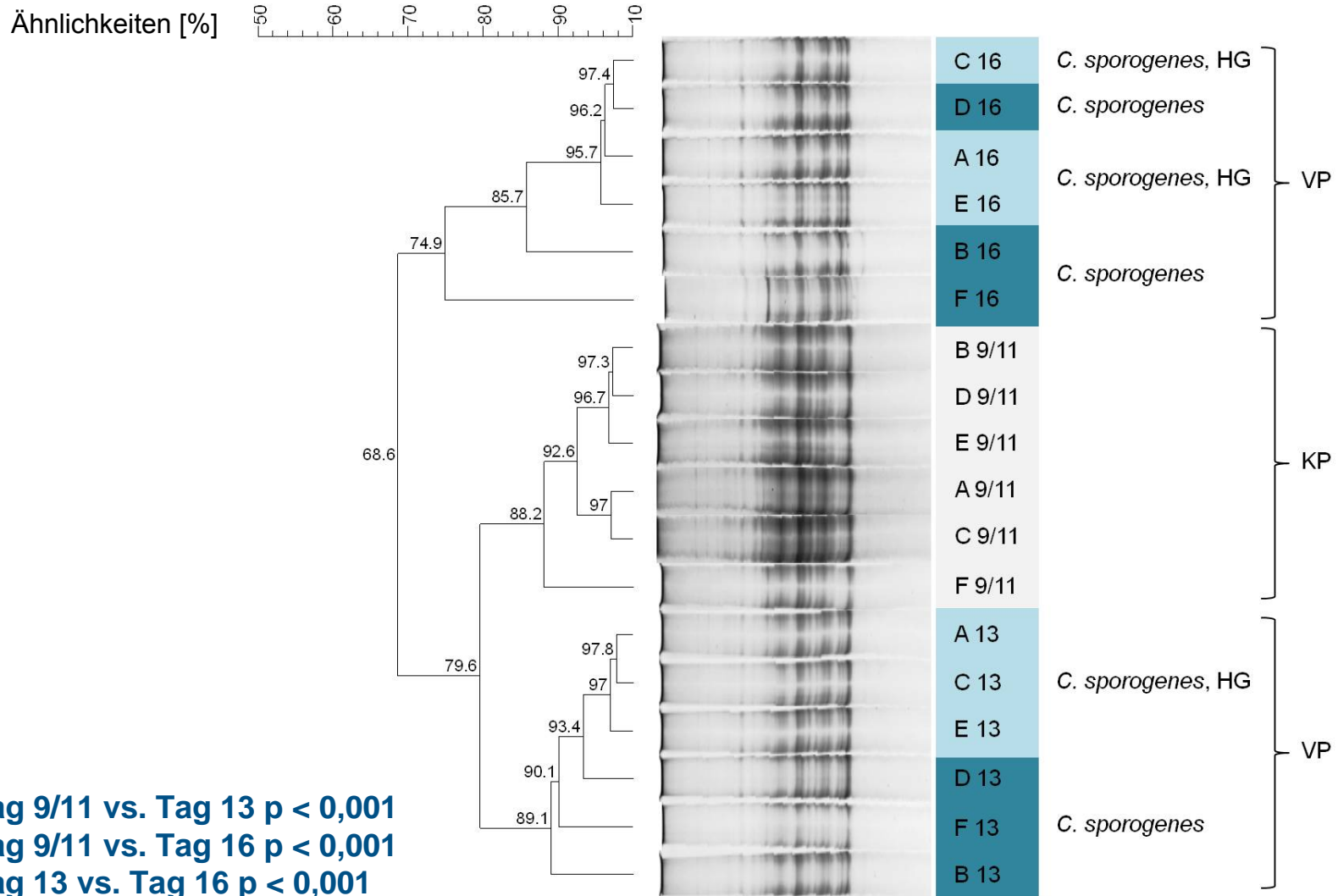
Tag 9/11 vs. Tag 16 $p < 0,001$

Tag 13 vs. Tag 16 $p < 0,01$

22.01.2014

Ergebnisse: Versuch 2

SSCP-Analyse: Mikrobielle Gemeinschaft Clostridia



Tag 9/11 vs. Tag 13 $p < 0,001$
Tag 9/11 vs. Tag 16 $p < 0,001$
Tag 13 vs. Tag 16 $p < 0,001$

Schlussfolgerungen/Fazit

- Trotz hoher Dosis kein Hinweis auf grundlegende Veränderungen des mikrobiellen Vormagenstoffwechsels durch Glyphosat
- Erniedrigte NH_3 -N-Konzentrationen, erhöhte Isovalerat-Produktion (Versuch 1): Stimulation des mikrobiellen Wachstums bei gleichzeitig hohem Proteinabbau (?)
- Nachweis von *Bifidobacterium spp.* (nicht-pathogen) nach Glyphosat-Zugabe (Versuch 1) → ursächlich für veränderte Bacteria-Profile?
- Kein verstärktes Wachstum/Anreicherung von *C. sporogenes* durch Glyphosat-Zugabe (Versuch 2)
- Kein Hinweis auf negativen Einfluss von Glyphosat auf die mikrobielle Gemeinschaft

In-vivo-Untersuchungen zur Glyphosat-Bilanz bei laktierenden Kühen: Futterzusammensetzung

Grundfutter- /Krafftutterverhältnis: 45%/55%

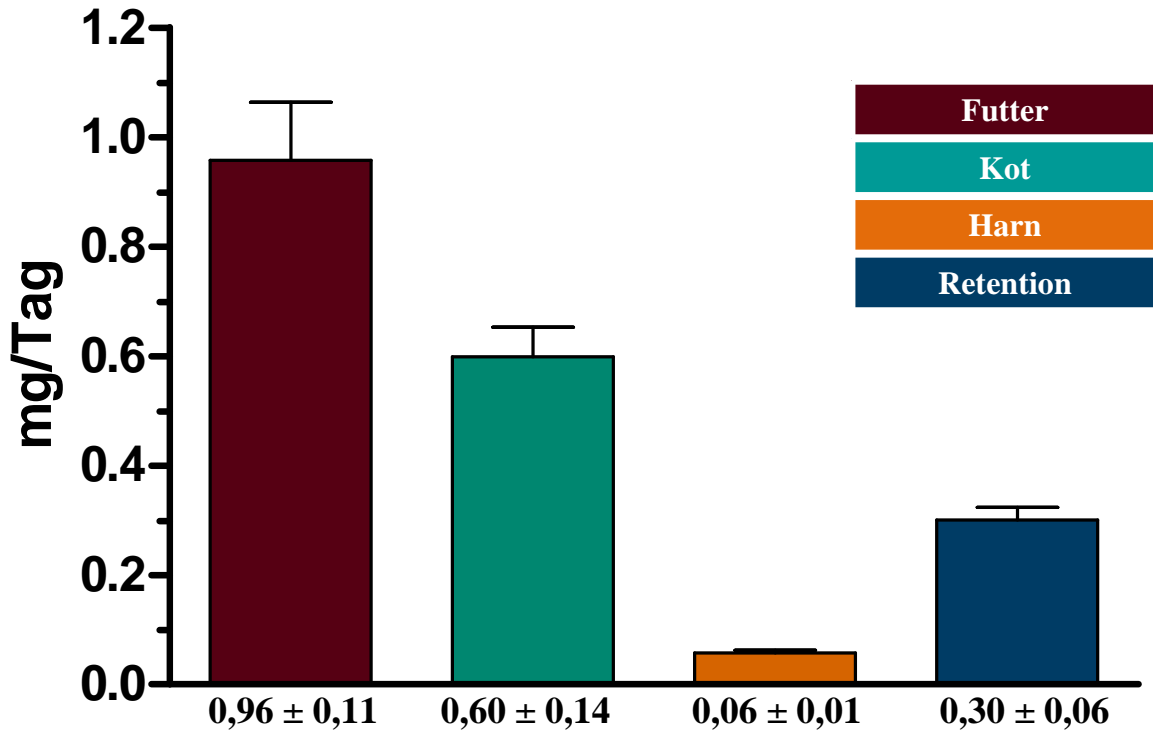
Grundfutter: Maissilage

Zusammensetzung des Krafftutters	
Komponente	Anteil (%)
Rapsextraktionsschrot	15,0
Weizen	29,0
Gerste	14,7
Mais	29,0
Harnstoff	1,0
Trockenschnitzel	8,4
Futterkalk	1,5
Viehsalz	0,2
Premix	1,2

Ergebnis der Rohnährstoffanalyse der TMR	
Komponente	
TS (total %)	52,50
XP (g/kg TS)	130,44
XA (g/kg TS)	45,14
XL (g/kg TS)	31,06
XF (g/kg TS)	133,95
NDF (g/kg TS)	351,95
ADF (g/kg TS)	155,92
Stärke (g/kg TS)	438,96

Ergebnisse: *In-vivo*-Untersuchung

Glyphosataufnahme mit dem Futter, faecale und renale Ausscheidung und Retention bei Milchkühen [mg/Tag; $\bar{X} \pm SD$]



Futteraufnahme: 14,3 ± 1,6 kg T/Tag
Laktationstag: ~145
Anzahl der Tiere = 7
Anzahl der Bilanztage = 5

Glyphosat-Analytik
Harn, Kot: GC – MS – MS
Futter: LC – MS

Wessling GmbH,
48341 Altenberge

In-vivo-Untersuchung

Schlussfolgerungen/Fazit

- Bei praxisüblicher Fütterung von Milchkühen tägliche Glyphosataufnahme ca. 1 mg
- Ausscheidung von etwa 70% des aufgenommenen Glyphosat über Kot und Harn
- Retention: Metabolismus?/Gewebliche Fixierung?/Adsorption?/Milch?