

**Monika Krüger**

## **Schadwirkungen durch Glyphosat-haltige Herbizide auf Böden, Umwelt, Tiere und Menschen in Europa – Vorboten des geplanten TTIP Abkommens?**

### **Zusammenfassung**

Das TTIP, das in Geheimverhandlungen unter Umgehung der Verfassungsorgane der jeweiligen Länder zwischen Europa und USA ausgehandelt wird, wird regulatorische Fragen für Gesundheit und Pflanzenschutz in Europa involvieren, da die Industrieverbände der USA nicht das Vorsorgeprinzip, sondern eine wissenschaftsbasierte Risikobewertung neu zuzulassender Chemikalien favorisieren. Anhand von Glyphosat, das als Totalherbizid in Europa mehr als zwei Jahrzehnte zugelassen ist, wird gezeigt, dass die alleinige Berücksichtigung vom Antragsteller gelieferter Studien durch die europäischen Behörden in keinem Fall ausreichend waren, die Schäden in Umwelt, Tieren und Menschen objektiv darzustellen. Ausgehend von der chemischen Verbindung Glyphosat wird auf die Wirkung in den einzelnen Systemen eingegangen.

### **1. Glyphosat – Entwicklung und Vermarktung**

Das Molekül N-(Phosphonomethyl)Glycin wurde erstmals 1950 durch den Chemiker Henri Martin in einem kleinen Schweizer pharmazeutischen Unternehmen (Firma Cilag) synthetisiert. Da die Substanz keine pharmazeutische Perspektive besaß, wurde sie nicht weiter bearbeitet. 10 Jahre später, gingen die Rechte an der Substanz nach Übernahme der Firma Cilag auf Johnson & Johnson über. Glyphosat wurde zusammen mit anderen Substanzen an Sigma-Aldrich verkauft und gelangte erst von dort als fertige Entwicklung, deren biologische Aktivität aber weithin unbekannt war, zu Monsanto. Im Rahmen der Suche von Phosphonsäuren als Weichmacher für Wasser untersuchte die Monsanto Company (St. Louis, MO) mehr als 100 Substanzen, die von der Aminophosphonsäure (AMPA) abgeleitet waren. Später weitete Monsanto die Untersuchungen dieser Substanzen auf deren herbizide Aktivität für mehrjährige Unkräuter aus. N-(Phosphonomethyl)Glycin (später Glyphosat genannt) wurde dann durch Monsanto 1970 synthetisiert und getestet. Seit 1971 liegen mehrere Patente zum Wirkstoff vor. Die Einführung als Herbizid

erfolgte unter dem Produktnamen Roundup® (Isopropylaminsalz von Glyphosat mit Beistoff) und wurde nach der Einführung in den 70er Jahren das weltweite führende Herbizid. Nach Erlöschen des Patentschutzes außerhalb der USA 1991 fiel der Preis des Produktes dramatisch. In den USA erlosch der Patentschutz 2000 und zahlreiche Generika erschienen auf dem Markt durch Unternehmen wie Dow, Syngenta, NuFarm etc. Zurzeit sind die Hauptproduzenten Chemieunternehmen in China, die 2010 835.900 t produzierten. Ca. 300.000 t werden jährlich exportiert. Die weltweite Glyphosatproduktion lag 2010 bei 1,1 Mio t, demgegenüber lag der weltweite Verbrauch bei 0,5 Mio t (Székács und Darvas, 2012). Durch die Entwicklung, Patentierung und Zulassung Glyphosat-resistenter gentechnisch veränderter Organismen (GVO) erlebte Glyphosat eine deutliche weltweite Intensivierung des Einsatzes. Seit 1996 ist GVO-Soja in der EU für die Verwendung als Futtermittel und Lebensmittel mit einem derzeitigen Rückstandshöchstwert von 20mg/kg zugelassen. Der europäische Import von GVO-Soja lag 2013 bei ca. 50 Mio. t (Hensel, 2014). Demgegenüber lag der chinesische Import 2013 bei 68 Mio t (Zhen-yu, 2014).

## **2. Eigenschaften von Glyphosat**

Glyphosat ist das Phosphonomethylderivat der Aminosäure Glycin (Abb. 1). Es ist eine amphotere chemische Verbindung mit einer basischen zentralen sekundären Aminofunktion und zwei endständigen sauren Gruppen. Daher besitzt es eine sehr gute Wasserlöslichkeit (11,6g/l bei 25°C), geringe Fettlöslichkeit und ist in organischen Lösungsmitteln so gut wie nicht löslich. Es besitzt ein relativ geringes Molekulargewicht (169 g) und wird wegen der guten Wasserlöslichkeit schnell von der Pflanze absorbiert und in ihr transloziert. Einmal in der Pflanze wird es in nur geringem Umfang metabolisiert und verteilt sich systemisch. Im Boden wird es fest an die Bodenmatrix absorbiert und von Mikroorganismen zu nicht toxischen Verbindungen abgebaut, die wiederum zu Ammoniak, Wasser und CO<sub>2</sub> degradiert werden. Die herbizide Wirkung erfolgt durch die Hemmung der 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSPS), wodurch die Transformation von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Shikimat-3-Phosphat verhindert wird. Glyphosat ist ein Analogon von Phosphoenolpyruvat (PEP) und bindet an die katalytische Seite von EPSPS (Baird et al. 1971). Involviert ist darin auch die Chelatierung von Mangan, das für die Reduktion von Flavinmononucleotid (FMN), dem Co-Faktor von EPSPS benötigt wird (Cerdeira and Duke, 2006). Dieses Analogiekonzept (Székács und

Darvas, 2012) wurde erfolgreich zur Entwicklung verschiedener biologisch aktiver Substanzen angewendet, zur Insektenkontrolle, (Hammock et al. 1988), bei Sulfonylharnstoff-Mikroherbiziden (Schloss und Aulabaugh, 1990) oder Verbindungen, die sich von Glyphosat ableiten lassen (Marzabadi et al., 1992; Anderson et al., 1995). Die EPSPS-Blockade führt zu einer Reduktion der Synthese der aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin) und ihrer Abkömmlinge wie Cinnamat (Zimsäureethylester) und alle davon abgeleiteten phenolischen Verbindungen. Der Pool von aromatischen Aminosäuren wird wahrscheinlich weiter durch den Anstieg der Phenylalanin-Ammonium-Lyase im Glyphosat behandeltem Pflanzengewebe reduziert. Die Blockierung des Shikimat-Weges führt zur Akkumulation hoher Shikimat-Konzentrationen im Gewebe mit einem Verlust der Feedback-Kontrolle und unreguliertem Kohlenstofffluss im Stoffwechselweg.

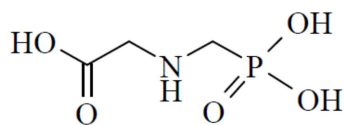


Abb. 1: Glyphosatmolekül

Glyphosat gehört zur Gruppe der Phosphonate. Diese sind analoge Verbindungen, zu ihren Aminosäuren, bei denen die Carboxylgruppe (-COOH) durch eine Phosphonsäure oder verwandte Gruppen ersetzt wurde. Diese Phosphonate agieren als Antagonisten von Aminosäuren, hemmen Enzyme, die in den Aminosäurestoffwechsel involviert sind und beeinflussen so die physiologische Aktivität von Zellen. Indem sie strukturell analog zu ihrer Aminosäure sind, konkurrieren sie mit der um die aktiven Bindungsstellen von Enzymen und Rezeptoren. Diese Aktivitäten können antibakteriell, Pflanzenwachstum regulierend oder neuromodulierend sein. Einige Bakterien, Pilze, Algen und Protozoen besitzen wie die meisten Pflanzen für Glyphosat sensitive EPSPS (Claire et al, 2012; Shehata et al. 2013). Andere Bakterien können tolerant bis resistent sein, da ihre EPSPS eine Q-loop Region besitzt, die zu einer erhöhten Polarität führt (Carr et al. 2011). Die EPSPS ist ebenfalls in die vorletzte Stufe des Shikimatweges für die Biosynthese vieler sekundärer Metabolite einschließlich Tetrahydrofolat, Ubiquinon und Vitamin K

involviert (Gruys und Sikorski, 1999). Es konnten zwei Klassen von EPSPS bei Bakterien identifiziert werden, die weniger als 50% Aminosäureidentität besitzen (Fitzgibbon und Braymer, 1990). Klasse I EPSPS kommen generell in Pflanzen und Mikroorganismen vor und sind für Glyphosat empfindlich. Im Gegensatz dazu besitzen Klasse II EPSPS gewöhnlich eine natürliche Toleranz für Glyphosat und eine hohe Affinität für Phosphoenolpyruvat. Klasse II EPSPS wurden bei einigen Bakterien identifiziert, z. B. *Pseudomonas* sp. strain PG2982 (Fitzgibbon und Braymer, 1990), *Agrobacterium tumefaciens* sp. Strain CP4, *Clostridium perfringens*, *Clostridium acetobutylicum*, *Fusobacterium nucleatum* (Carr et al. 2011). Glyphosat-Resistenz wurde auch bei Geflügel-Isolaten von *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis* und *S. Gallinarum* nachgewiesen (Shehata et al. 2013). Eine Einpunktmutation in der *S. Typhimurium* EPSPS wurde als Ursache für deren Glyphosat-Resistenz festgestellt (Stalker et al. 1985). Die intensive Nutzung von Glyphosat in der industrialisierten Landwirtschaft führte zur weitverbreiteten Kontamination von verschiedenen Ökosystemen, von wo aus es Pflanzen, Mikroorganismen, Tiere und viele Komponenten in der Nahrungskette beeinflusst. Der Abbau von Glyphosat erfolgt nicht nur zu Ammoniak und CO<sub>2</sub>, sondern sein primäres Abbauprodukt ist Aminomethylphosphonat (AMPA), das in unreifen Saaten (Lorenzetti et al. 2004), Erntegut (Duke et al. 2003) und Wasser (Sanchis et al. 2012) festzustellen war und ebenfalls toxisch ist (Abb. 2). Auch die Abbau-bzw. Stoffwechselprodukte von Glyphosat besitzen antibakterielle Wirkung.

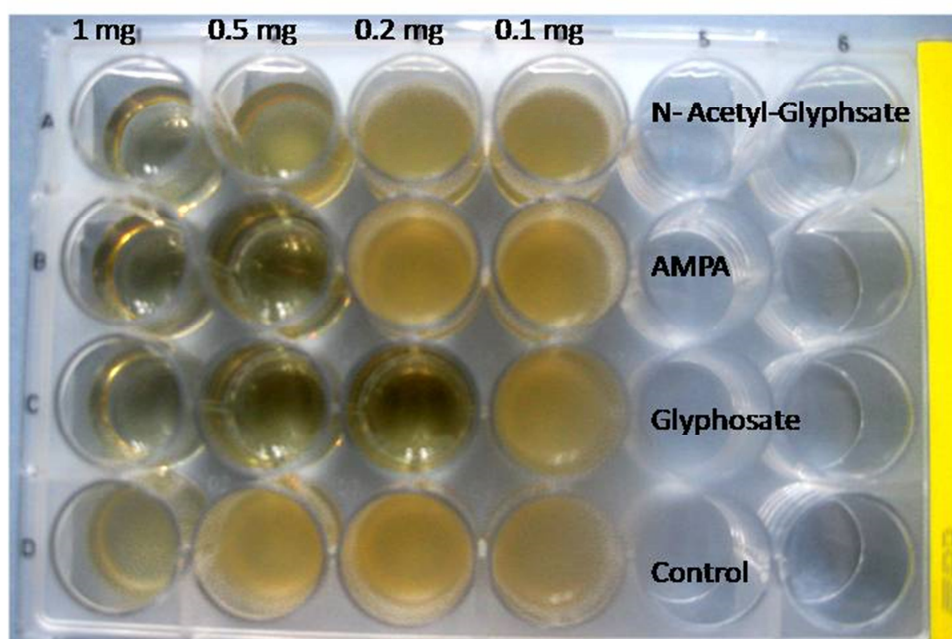


Abb. 2: Antibakterielle Aktivität von Glyphosat für *Enterococcus faecalis* im Vergleich zu seinen Stoffwechselprodukten AMPA und N-Acetyl-Glyphosat.

Zurzeit existieren unterschiedliche Auffassungen zur Sicherheit von Glyphosat, da Langzeitstudien an warmblütigen Tieren, auch solche, die in die Nahrungskette eingehen sowie Menschen bisher nicht durchgeführt worden sind (De Roos et al. 2005) oder von den zulassenden Behörden nicht akzeptiert wurden (Seralini et al. 2012). Der hemmende Effekt von Glyphosat auf den Shikimatstoffwechselweg, der bei Menschen und Tieren nicht vorkommt und dessen Fehlen einer der Hauptgründe für die Zulassung des Herbizids war, ist aber nicht der einzige Weg, wie Glyphosat Nichtziellebewesen beeinflussen kann. Zahlreiche Publikationen liegen dazu vor. So berichten Poletta et al. (2009), Paganelli et al. (2010), Antoniou et al. (2012) und Carrasco (2013) über Genotoxizität. Die Hemmung des Cyp450-Enzymkomplexes (Samsel and Seneff, 2013) wirft ein ganz neues Licht auf die Prozesse, insbesondere solche, die die Detoxifizierung von Giftstoffen (Xenobiotika) involvieren. Schon sehr frühzeitig wurde die chelatierende Wirkung von Glyphosat auf zweiwertige Kationen nachgewiesen. (Huber, 2007, Zobiolo et al. 2009, Zobiolo et al. 2010). Störungen (Dysbiosen) in der Zusammensetzung der normalen Magen-Darm-Mikrobiota (MDM) durch Glyphosat waren feststellbar (Shehata et al. 2012, Krüger et al. 2013). In vitro-Untersuchungen hinsichtlich des zytotoxischen Effekts von Glyphosat konnten auch bei sehr niedrigen Konzentrationen festgestellt werden (Benachour et al. 2007, Benachour et al. 2009, Gasnier et al. 2010). In einer Langzeitstudie konnten Seralini et al. (2012) signifikant höhere mamäre Tumorraten bei weiblichen Ratten feststellen, die 0,05 ppb Glyphosat (0,1ppb ist der Rückstandshöchstwert im Trinkwasser Europas) mit dem Trinkwasser aufnahmen. Schwere Nephropathien und Lebervergrößerungen wurden ebenfalls festgestellt. Die gleichen Untersucher (Seralini et al. 2012) und El-Shenavi (2009) stellten massive Veränderungen in Stoffwechselparametern der Versuchstiere sowie einen Anstieg der Sauerstoffradikale fest.

### **3. Glyphosatwirkung auf Mikroorganismen**

In dem US Patent US 7,771,736B2 vom 10.08.2010 unter dem Titel "Glyphosat formulations and their use for the inhibition of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase", eingereicht von William Abraham, Patentinhaber Monsanto Technology LLC, St. Luis, MO (US) wird die antibakterielle Wirkung auf pathogene Protozoen und

Bakterien beschrieben. Danach ist der Shikimat-Zyklus ein sehr alter Weg, der in den primären und sekundären Metabolismus von Bakterien, niederen Eukaryoten und Pflanzen involviert ist. Glyphosat wirkt auf Bakterien bakteriostatisch. Im primären Metabolismus besteht die Funktion des Shikimatweges darin, die Präkursoren zur Produktion von aromatischen Aminosäuren und der Paraaminobenzoessäure herzustellen. Der Shikimat – Weg schließt Enzyme und Metabolite ein, die die Umwandlung von 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulon-3-Phosphat (DAHP) zu Chorismat einschließen, von dem Punkt aus die drei Wege zu Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin führen. Der Shikiminsäureweg, der zur Biosynthese aromatischer Komponenten einschließlich Aminosäuren, Pflanzenhormonen und Vitaminen führt, wird durch Glyphosat gehemmt, da dadurch die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat (PEP) und 3-Phosphoshikiminsäure zu 5-Enolpyruvyl-3-Phosphoshikiminsäure durch Bindung an EPSPS erfolgt. Bei Verlust der EPSPS durch genetische Manipulation, man spricht von aro-Mutanten, zeigt sich, dass diese im Falle von pathogenen prokaryoten und eukarioten Einzellern ihre Virulenz verlieren. Dieser Effekt wird auch zur Entwicklung von Lebendimpfstoffen verwendet. Der Shikimatweg wurde bei *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* (Malaria) und *Cryptosporidium parvum* nachgewiesen. Das Patent weist auch darauf hin, dass durch Oxalsäure und weitere Dikarbonsäuren und deren Salze, die Wirkung von Glyphosat auf EPSPS verstärkt wird und sieht deren Zumischung zu Herbizidformulierungen als sinnvoll an. Demzufolge dürfte auch die Fütterung von Zuckerrübenschnitzeln an Rinder und Schweine die Wirkung von Glyphosat verstärken, da Zuckerrüben zu den Oxalsäureakkumulatoren gehören (Nuss und Loewus, 1978). Neben den bereits erwähnten pathogenen Protozoen und weiteren Mitgliedern des Phylum Apicomplexa schätzen die Patentinhaber alle Mikroorganismen, die eine EPSPS besitzen als empfindlich für Glyphosat ein. Dazu gehören Neisseriaceae, Vertreter der *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, *Yersinia*, *Morganella*, *Proteus*, *Enterobacter*), *Pasteurellaceae* (*Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*), *Mycobacteriaceae*, *Nocardaceae*, *Brucellaceae*, *Streptococcaceae*, *Micrococcaceae*, *Bacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Chlamydiaceae*, *Listeriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterococcaceae*, *Cardiobacteriaceae*, *Campylobacteriaceae*, *Aeromonadaceae*, auch Pilze wie *Aspergillus* spp. und Hefen. Diese Einschätzung wurde durch ein zweites Patent (Carr et al. 2011) unter dem Titel „EPSP synthase domains conferring glyphosate

resistance“ (EP 2 327 785 A2) teilweise widerlegt. Die Patentinhaber beschreiben Glyphosat-resistente EPSPS von Bakterien und identifizierten dafür eine Q-Loop-Region in der DNA mit gesteigerter Polarität. Demzufolge wird zwischen Glyphosat – sensiblen EPSPS (Klasse I) und – toleranten bis –resistenten EPSPS (Klasse II) unterschieden. Diese Domäne kommt in bestimmten Bakterien entweder in der Einzahl, in manchen auch doppelt oder häufiger vor. Glyphosat-resistente oder -tolerante bakterielle EPSPS-Polypeptide, besser ihre kodierenden Gene, werden verwendet, um diese in Nutzpflanzen wie Soja, Mais, Raps, Baumwolle zu inserieren, um diese Pflanzen Glyphosat-resistent zu machen. *Agrobacterium tumefaciens* Stamm CP4, nach zufälliger Mutagenese *Salmonella* Typhimurium Stamm CT7 wurden als Glyphosat-resistent identifiziert. Als natürlich Glyphosat resistent werden *Clostridium perfringens*, *Clostridium acetobutylicum*, *Fusobacterium nucleatum* und *Methanopyrus kandleri* beschrieben. In den letzten Jahren wurden eine Anzahl von Glyphosat-resistenten Bakterien-Spezies identifiziert. Dazu gehören *Streptococcus pneumoniae* (Liu et al. 2000), *Cyanobacterium* spp. (Powell et al. 1991), *Bacillus subtilis* (Fischer et al. 1987), *Pseudomonas putida* Stamm 4G-1, das aus dem Boden einer Glyphosat produzierenden Fabrik in China isoliert wurde (Sun et al. 2005), *Escherichia coli*-Mutanten wurden mittels Einzelpunktmutationen im EPSPS-Gen konstruiert (Healy-Fried et al. 2007). Lu et al (2013) stellen fest, dass eine Glyphosatbehandlung (200mM) nicht ausschließlich den Shikimatweg beeinflusst. Nahezu alle Gene, die Proteine des Shikimatweges und des spezifischen aromatischen Aminosäurepfades kodieren, werden dereguliert. Weiterhin wird die Expression vieler Gene, die die Energiebildung und den Stoffwechsel kodieren, unterdrückt. Im Gegensatz dazu werden durch die Glyphosatbehandlung 50 Gene, die z. B. die Zellmotilität und Chemotaxis kodieren, hochreguliert. Die Wirkung auf Vertreter der MDM von Rindern und Hühnern wurde von Krüger et al. (2013) und Shehata et al. (2012) untersucht. Insbesondere gesundheitsfördernde Bakterien wie *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. *Bifidobacterium* spp. wurden reduziert. Gerade diese Bakterien besitzen einen antagonistischen Effekt auf pathogene Bakterien wie *Salmonella*-Serovare, *Clostridium perfringens* und *Clostridium botulinum*, die zahlreiche Erkrankungen in den Tierbeständen verursachen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Clair et al. für in der Lebensmitteltechnologie bedeutsame Mikroorganismen - *Geotrichum candidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* und *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* erarbeitet. Sie konnten feststellen, dass

Roundup®) einen inhibitorischen Effekt auf das mikrobielle Wachstum und auf den antimikrobiellen Effekt gegen Pathogene bei niedrigen Konzentrationen besitzt, was bei Glyphosat allein nicht festzustellen war (Clair et al. 2012).

#### **4. Wirkung von Glyphosat auf Magen-Darm-Mikrobiota**

Die Magen-Darm-Mikrobiota (MDM) bildet das Metabolom im Magen-Darm-Trakt (MDT) und wird maßgeblich von der Diät sowie den dort befindlichen Mikroorganismen bestimmt. Großen Einfluss auf die MDM und den Wirtsorganismus besitzen die in der Nahrung enthaltenen Polyphenole, die hauptsächlich über den Shikimisäurestoffwechselweg gebildet werden. Glyphosat induziert vermehrt die Synthese von polyphenolischen Flavonoiden in Pflanzen und Mikroorganismen, die in Konkurrenz zu den aromatischen Aminosäuren stehen. Das erfolgt nicht nur in Pflanzen, sondern auch von der MDM des MDT. Die MDM bildet aber auch Vitamine, detoxifiziert Xenobiotika und besitzt Bedeutung für die immunologische Homöostase sowie Stabilität der Magen-Darm-Barriere (Samsel und Seneff, 2013). Die gleichen Autoren schlussfolgern, dass ein großer Teil der sogenannten Zivilisationskrankheiten auf die sehr häufige Anwendung von Glyphosat zurück geht, insbesondere auf Dysbiosen der MDM. Fischer et al. (1986) konnten feststellen, dass das Muster der Wachstumshemmung durch Glyphosat bei verschiedenen Bakterienarten unterschiedlich ist, da insbesondere nicht alle Endprodukte des Shikimat-Weges bei jedem Bakterium gebildet werden. Die Endprodukte des Shikiminsäureweges, die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin kontrollieren direkt die frühen Stoffwechselprodukte im Kreislauf. In Gegenwart von Glyphosat kommt es hinter der blockierten EPSPS zu einer Akkumulation von Shikimate-3-Phosphate (S3P). Ein Effekt, der durch die reduzierte Konzentration der Endprodukte zustande kommt, da der normale Feedback über die Aminosäuren nicht erfolgt oder das initiale Enzym des Stoffwechselweges, die 3-Deoxy-D-Arabino-Heptulosonat 7-Phosphate (DAHP)-Synthase, unterdrückt ist. Drei molekulare Ereignisse durch Glyphosat können dazu gezählt werden. 1. Mangel an aromatischen Aminosäuren, 2. Energieabfluss durch den Verbrauch von einem Molekül PEP und einem Molekül ATP für die Akkumulation jedes Moleküls S3P, 3. mögliche Toxizität akkumulierter Intermediate wie DAHP oder S3P. Samsel und Seneff (2013) weisen darauf hin, dass durch bakteriellen Überwuchs von anaeroben Bakterien wie Clostridien, Bacteroidetes und Desulfovibrio im MDK

Stoffwechselprodukte (volatile Fettsäuren, Ammoniak, Phenole und Schwefelwasserstoff) entstehen, die Auswirkungen auf den gesamten Körper des Wirtes (Mensch und Tier) besitzen. Autismus bei Kindern wird mehr und mehr damit in Zusammenhang gebracht. Eine gesteigerte Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase durch Glyphosat und damit verstärktes Auftreten von Ammoniak im Körper wird damit in Verbindung gebracht. Ähnliche Ergebnisse haben Krüger et al. (2014) im Zusammenhang mit chronischem Botulismus erarbeitet (Abb. 3 und 4).



Abb. 3: Unter chronischem Botulismus verendete Kuh



Abb. 4: typischer visköser Speichel bei Kuh mit chronischem Botulismus

Auch hier war eine Dysbiose bei Tieren festzustellen, bei denen *C. botulinum* im Kot bzw. Pansensaft festzustellen war. Im Pansensaft von *C. botulinum*-positiven Tieren waren signifikant höhere Konzentrationen von Archea, der *Bacteroides-Prevotella*-Gruppe, der *B. fragilis* Gruppe, von *B. distasonis*, der *C. histolyticum*-Gruppe, *Lactobacillus*, Schwefel-reduzierender Bakterien (SRB), Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria festzustellen. Parallel dazu war ein signifikanter Abfall der

Euryarcheota nachweisbar. Durch die Degradierung von Mucin durch Clostridien, Bifidobakterien und *B. fragilis* wird Sulfat freigesetzt, das mit dem H<sub>2</sub> aus der Pansenfermentation zu Sulfid reduziert wird. Clostridien und Enterobakterien bilden H<sub>2</sub> durch Reduktion von Pyruvat. Als Konsequenz nutzen die SRB H<sub>2</sub>, um H<sub>2</sub>S, ein sehr toxisches Gas zu bilden, das das Epithel des MDT schädigt. (Krüger et al. 2014). Samsel und Seneff (2013) weisen auf die Rolle erhöhter LPS-Konzentrationen im MDT in Beziehung zur Induktion von Entzündungskaskaden und dadurch auf die vordergründige Verwertung von Tryptophan in Makro- und Mikrophagen zu Kynurenin, was zu einem Mangel an freiem Tryptophan in der Blutbahn und damit zu Symptomen im Gehirn durch Mangel an Serotonin und Melatonin mit den dadurch induzierten mentalen Störungen sowie Schlaflosigkeit führt. Kynurenin reduziert die unter der mikrobiellen Abwehr in den Phagozyten durch Sauerstoffradikale induzierten DNA-Brüche in diesen Zellen. Krüger et al. (2014) haben in Untersuchungen zum Einfluss von Dysbiosen auf den Nachweis von *C. botulinum* im Pansensaft von Milchkühen einen signifikanten Unterschied zwischen *C. botulinum*-positiven und -negativen Pansensäften im Gehalt Gram-negativer Enterobakterien (Gammaproteobacteria) festgestellt (Tab. 1).

Tab.1: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung von Pansensäften *C. botulinum*-positiver (n=21) und – negativer (n=64) Pansensäfte mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

|        | BoNT+  |        | BoNT–  |        | P value        |
|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|
|        | Mean   | SD     | Mean   | SD     |                |
| Eub    | 2,E+08 | 3,E+08 | 3,E+08 | 3,E+08 | No significant |
| Arch   | 2,E+07 | 1,E+07 | 8,E+06 | 1,E+07 | 0.003          |
| Eury   | 7,E+06 | 7,E+06 | 2,E+07 | 2,E+07 | 0.03           |
| Bac    | 3,E+07 | 4,E+07 | 2,E+06 | 5,E+06 | 0.0001         |
| Cfb    | 2,E+05 | 1,E+05 | 4,E+05 | 7,E+05 | No significant |
| Bfra   | 3,E+06 | 3,E+06 | 5,E+05 | 9,E+05 | 0.0001         |
| Bdis   | 1,E+07 | 1,E+07 | 7,E+06 | 7,E+06 | 0.005          |
| Chis   | 4,E+05 | 6,E+05 | 2,E+05 | 2,E+05 | 0.001          |
| Clit   | 1,E+05 | 4,E+03 | 2,E+05 | 4,E+05 | No significant |
| Clept  | 1,E+07 | 1,E+07 | 2,E+07 | 2,E+07 | No significant |
| Erec   | 1,E+07 | 8,E+06 | 1,E+07 | 1,E+07 | No significant |
| Lab    | 2,E+07 | 2,E+07 | 4,E+06 | 5,E+06 | 0.0001         |
| Srb    | 9,E+06 | 9,E+06 | 3,E+06 | 6,E+06 | 0.0004         |
| Alf1b  | 7,E+06 | 1,E+07 | 4,E+05 | 1,E+06 | 0.0001         |
| Gam42a | 5,E+06 | 5,E+06 | 2,E+06 | 3,E+06 | 0.0003         |

Eub=Gesamtbakterienzahl, Arch=Archea, Eury=Euryarcheota, Bac=Bacteroides-Prevotella-Gruppe, Cfb=Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides, Bfra=Bacteroides

fragiles-Gruppe, Bdis=Bacteroides distasonis, Chis=C. histolyticum-Gruppe, Clit=C. lituseburensis –Gruppe, Clept=C. leptum-Gruppe, Erec=Eubacterium rectale, Lab=Lactobacillus, Srb=Sulfat-reduzierende Bakterien, Alf1b=Alphaproteobacteria, Gam42a=Gammaproteobacteria (LPS-Bildner).

In Kotproben von Milchkühen, die an dem mit großer Sicherheit durch *Clostridium* (C.) *perfringens* Typ A induzierten Hämorrhagischen Darm-Syndrom (HDS) litten, konnten ebenfalls extrem hohe Gram-negative Enterobakterienzahlen nachgewiesen werden (Tab.2, Abb. 5, 6 und 7). *C. perfringens* gehört zu den Glyphosat-resistenten Bakterienarten, die bei Niederbruch ihrer Antagonisten wie Laktobazillen, *Bacillus* spp., die Glyphosat-empfindlich sind, verstärkt proliferieren (Shehata et al. 2012).

Tab. 2: Ergebnis der bakteriologischen Kot-Untersuchung von Milchkühen mit HDS

| Tier-Nr. | GKZ* aerob                         | GKZ*, Gramnegative                 | GKZ* anaerob                       | Cl. perfringens                    |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 1        | $5,9 \cdot 10^6$                   | <b><math>2,7 \cdot 10^6</math></b> | $1,4 \cdot 10^7$                   | $2,15 \cdot 10^4$                  |
| 2        | $8,0 \cdot 10^5$                   | $5,3 \cdot 10^5$                   | 0                                  | $<10^3$                            |
| 3        | $2,9 \cdot 10^6$                   | $1,8 \cdot 10^5$                   | $1,0 \cdot 10^6$                   | $1,0 \cdot 10^3$                   |
| 4        | $2,4 \cdot 10^6$                   | <b><math>3,1 \cdot 10^6</math></b> | $3,0 \cdot 10^8$                   | $<10^3$                            |
| 5        | $2,5 \cdot 10^7$                   | <b><math>2,1 \cdot 10^6</math></b> | $1,0 \cdot 10^6$                   | $1,4 \cdot 10^4$                   |
| 6        | $2,0 \cdot 10^6$                   | $2,0 \cdot 10^5$                   | 0                                  | $<10^3$                            |
| 7        | $9,8 \cdot 10^8$                   | <b><math>9,8 \cdot 10^8</math></b> | $8,1 \cdot 10^8$                   | $<10^3$                            |
| 8        | $1,5 \cdot 10^6$                   | <b><math>&gt;10^6</math></b>       | 0                                  | $1 \cdot 10^3$                     |
| 9        | <b><math>4,6 \cdot 10^9</math></b> | <b><math>2,9 \cdot 10^9</math></b> | <b><math>3,4 \cdot 10^9</math></b> | <b><math>1,7 \cdot 10^7</math></b> |
| 10       | $1,1 \cdot 10^7$                   | <b><math>6,7 \cdot 10^6</math></b> | $1,8 \cdot 10^6$                   | $3,55 \cdot 10^4$                  |
| Referenz | $10^6$ - $10^7$                    | $10^4$ - $10^5$                    | $10^7$ - $10^8$                    | $<10^4$                            |

GKZ: Gesamtkeimzahl



Abb. 5: HDS-Kuh mit typischer Kopfhaltung (Foto: Haunroth)



Abb. 6: Blaurot verfärbte Dünndarmteile (Jejunum) bei einer Kuh mit HDS (Foto: Haunroth)

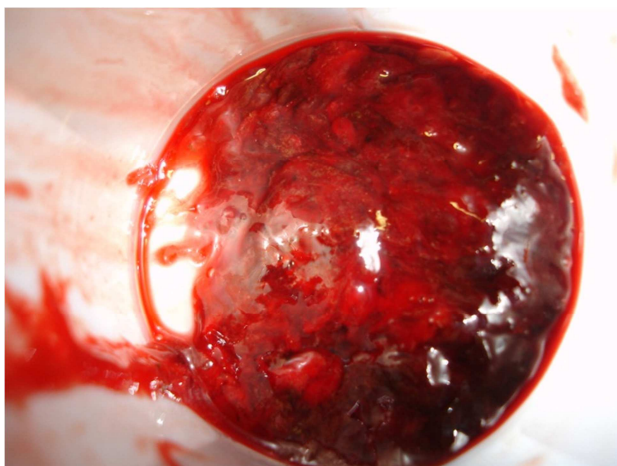


Abb. 7: Blutkoagula im Kot von HDS-Kuh (Foto: Jäkel)

## 5. Wirkung von Glyphosat im Körper von Menschen und Tieren

### 5. 1. Wirkung auf Enzymsysteme

Glyphosat gehört aufgrund seiner chemischen Struktur zu den anionischen kosmotropen Substanzen. Es ist in der Lage Blutproteine auszusalzen, was zur dissiminierten Koagulopathie in den Blutgefäßen führt. Es hemmt das **Cytochrom P450-System** (CYP), von denen es 18 verschiedene Klassen beim Menschen gibt. Es hemmt eines der CYP-Enzyme, die Aromatase, die Testosteron in Östrogen umwandelt. In Rinder- und Schweinebeständen sind dadurch Fruchtbarkeitsprobleme an der Tagesordnung. Fruchtbarkeitsprobleme treten auch in der menschlichen Population auf, da Roundup bereits in geringen Mengen auf die Testosteron bildenden Leydig-Zellen einwirkt, die von diesem Hormon weniger produzieren (Clair et al. 2012). Weiterhin wird die Retinolsäurekonzentration erhöht, weil ein CYP-Enzym gehemmt wird, das in den Katabolismus dieses Vitamin A - Abkömmlings involviert ist. Die Retinolsäure spielt eine Schlüsselrolle in der embryonalen Entwicklung, wo ihre streng regulierte Konzentration die Entwicklungsstadien beeinflusst. Neurale Defekte und kraniofaziale Missbildungen sind das Ergebnis. Abb. 8 zeigt missgebildete Ferkel, deren Mutttersauen Futter mit einer Glyphosatkonzentration von ca. 1ppm in den ersten 40 Tagen der Trächtigkeit erhielten (Krüger et al. 2014). Studien zeigten, dass sowohl in Pflanzen als auch Tieren detoxifizierende CYP-Enzyme gehemmt werden. So sind Mitglieder der CYP5- und CYP7-Klasse unbedingt für die Bildung wasserlöslicher Gallensäuren aus Cholesterol in der Leber notwendig. Gallensäuren sind essentiell für die Fettverdauung, haben aber auch eine antimikrobielle (bakteriostatische) Wirkung auf die Magen-Darm-Mikrobiota des oberen Dünndarms (Inagaki et al. 2006; Hofmann and Eckmann, 2006). Die Cholesterol- und Vitamin D3-Synthese hängen ebenfalls von Enzymen der CYP-Gruppe ab. Wachsende Defizienzen von Vitamin D3 in der deutschen Bevölkerung sind damit nicht ein Ergebnis vermehrter Anwendung von Sonnenschutzmitteln, sondern hängen direkt von der Kontamination der Lebensmittel mit glyphosathaltigen Herbiziden ab. Viele CYP-Enzyme sind auch an der Steroidsynthese, z.B. Cortisol, Aldosteron, beteiligt, die alle vom Cholesterol abstammen. In der Nahrung und im Trinkwasser enthaltenes Glyphosat kann über den enterohepatischen Kreislauf direkt in die Leber gelangen und hier diverse CYP-Enzyme zerstören. Das Cytochrom P450-System besitzt auch zentrale Funktion bei

der Detoxifizierung von Xenobiotika, dazu gehören auch andere phosphororganische Verbindungen sowie Mykotoxine und Bakterientoxine (Samsel und Seneff, 2013).

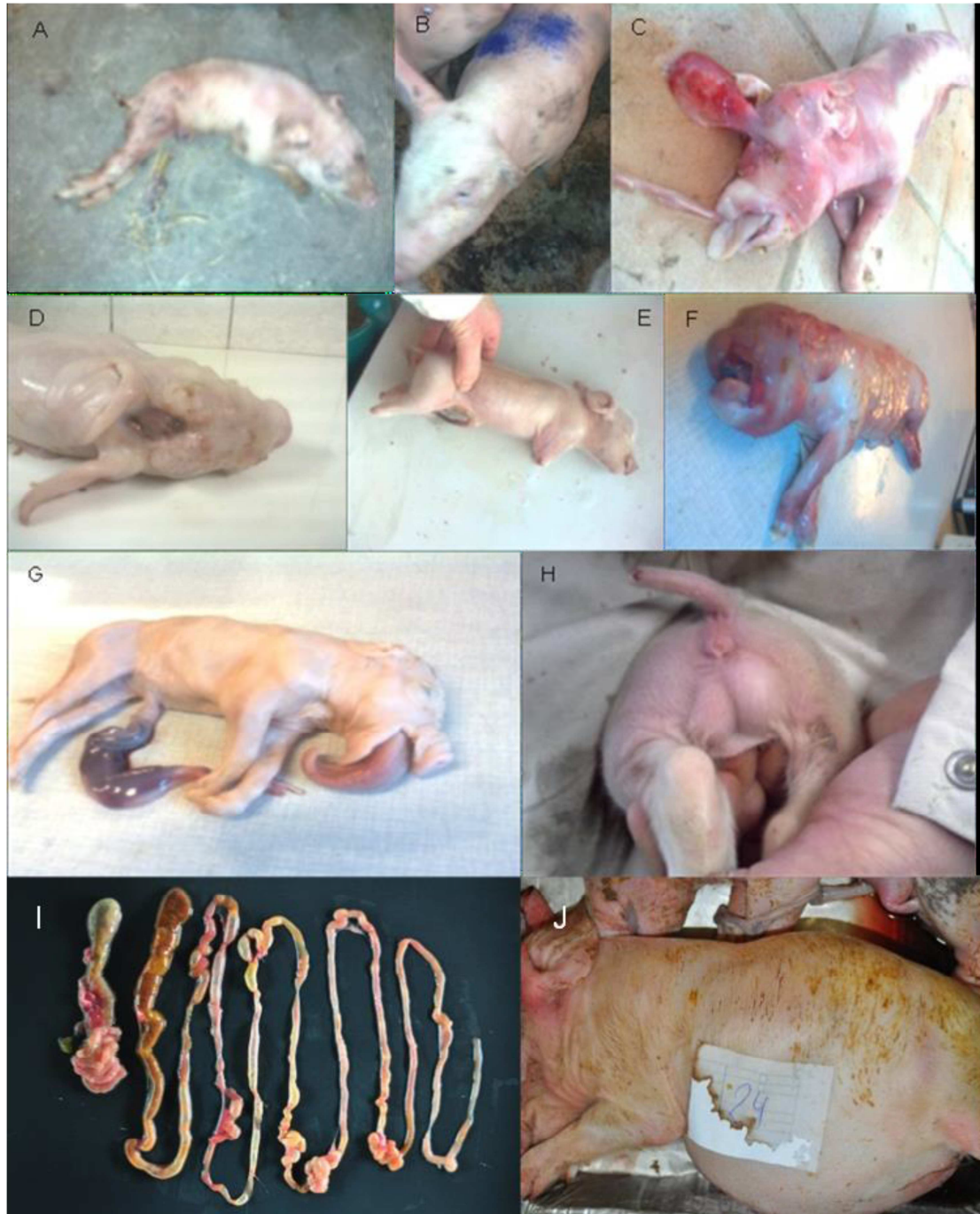


Abb. 8: Bilder missgebildeter Ferkel eines Dänischen Schweinebestandes. A: spinale Missbildung, B: nicht ausgebildetes Ohr, C: Kraniale Missbildung, D: Loch im Schädeldach, E: lebend geborenes Ferkel mit verkürzten Beinen und nur einem ausgebildeten Auge, F: Ferkel mit nur einem Auge mitten auf der Stirn (Zyklop) sowie Elefantenrüssel mit Knochen, G: Elefantenzunge, H: weibliches Ferkel mit Hoden, I: Unverbundener Dünn- und Dickdarm, J: maximal vergrößerter Bauch des Ferkels, dessen Darm unter I gezeigt wurde.

Paganelli et al. (2010) konnten ähnliche Effekte bei Embryonen von Afrikanischen Krallenfröschen und Hühnern feststellen. Eine parallele Behandlung mit einem Retinolsäureantagonisten verhinderte diese Missbildungen. Da der Cytochrom P450-Enzymkomplex in der Leber eine zentrale Rolle bei der Detoxifizierung von Xenobiotika spielt, besitzt dessen Inaktivierung durch Glyphosat zentrale Bedeutung. Nach Mao et al. (2011) laufen ähnliche Prozesse in der Honigbiene ab, bei der die Hemmung dieses Enzymkomplexes zu einer Reduzierung der Detoxifizierung anderer Organophosphate beiträgt und zum Sterben der Bienen führt.

## 5. 2. Chelatierung von Mengen- und Spurenelementen

Eine ganz wesentliche Wirkung von Glyphosat besteht im **Chelatieren** von zweiwertigen kationischen Mengen- und Spurenelementen. In Sojabohnen kam es durch Glyphosatbehandlung zur Reduktion der Gehalte an Fe, Mn, Ca und Mg. Cu und Zn waren nicht reduziert. Inwieweit an Glyphosat gebundenes Cu und Zn für den Konsumenten aber verfügbar ist, bleibt dahin gestellt (Kakmak et al. 2009). Demgegenüber stellten Bohn et al. (2013) eine signifikante Zn-Reduktion im Vergleich mit biologischem Soja fest. Then (2013) veröffentlichte das Untersuchungsergebnis auf Glyphosat von argentinischem Soja (Tab. 3). Die Proben überschritten hoch signifikant die europäischen Rückstandshöchstwerte. Der Spurenelementgehalt wurde nicht ermittelt. Glyphosat besitzt eine hohe Kapazität zur Chelatierung von zweiwertigen Kationen, wie Calcium (Ca), Magnesium (Mg), Mangan (Mn) und Eisen (Fe) (Lundager-Madsen et al., 1978; Motekaitis and Martell, 1985; Barja et al., 2001). Kationische Nährstoffe binden leicht an das Glyphosatmolekül über die Carboxyl- und Phosphonat-Gruppen und bilden schwer lösliche und sehr stabile Komplexe. Calcium präzipitiert Glyphosat im Verhältnis 1:1 in wässriger Lösung (Gauvrit et al., 2001; Schoenherr und Schreiber, 2004). Bei Anwesenheit von Mn in Roundup® -Verdünnungen in Spraytanks kommt es zu einer Bildung stabiler Mn–Glyphosat-Komplexe, die Penetration und Translokation über die Blätter reduziert. Ähnliche antagonistische Reaktionen wurden für Ca- und Mg-Ionen gezeigt (Nalewaja and Matysiak, 1991, Thelen et al., 1995). Demgegenüber besitzen monovalente Cationen in Glyphosat-Verdünnungen keinen Einfluss auf die Phytotoxizität (Stahlman and Phillips, 1979). Darum empfehlen die Hersteller kein

hartes Wasser zur Herstellung der Spray-Verdünnungen zu verwenden. Glyphosat konkurriert mit anorganischen Phosphaten um die Sorptionsstellen in Böden und Sedimenten (Hance, 1976; Carlisle and Trevors, 1988). Es bindet mittels Phosphonsäureradikal an die Bodenmatrix durch einen ähnlichen Mechanismus wie anorganisches Phosphat (Morillo et al. 2000).

Tab. 3: Analyseergebnisse von 11 argentinischen Sojaprobe n auf Glyphosat und AMPA (Then, 2013)

| #   | Rückstände (mg/kg), Juni 2013 |       |                      | Rückstände (mg/kg), Sept. 2013 |      |                       |
|-----|-------------------------------|-------|----------------------|--------------------------------|------|-----------------------|
|     | Glyphosat<br>(acid)           | AMPA  | Glyphosat<br>(Summe) | Glyphosat<br>(acid)            | AMPA | Glyphosate<br>(Summe) |
| M1  | 5,3                           | <0,05 | <5,34                |                                |      |                       |
| M2  | 7,4                           | 6     | 16,54                | 1,4                            | 10   | 16,63                 |
| M3  | 11,6                          | <0,05 | <11,67               | 7,5                            | 46   | <b>77,54</b>          |
| M4  | 22,5                          | 18,1  | <b>50,06</b>         |                                |      |                       |
| M5  | 18,8                          | 13,7  | <b>39,66</b>         |                                |      |                       |
| M6  | 11                            | 13,2  | <b>31,10</b>         | 12                             | 12   | <b>30,27</b>          |
| M7  | 19,4                          | 22,6  | <b>53,81</b>         |                                |      |                       |
| M8  | 11,3                          | 23,6  | <b>47,23</b>         |                                |      |                       |
| M9  | 25,8                          | 47    | <b>97,36</b>         | 16,2                           | 52,5 | <b>96,14</b>          |
| M10 | 14,3                          | <0,05 | <14,38               |                                |      |                       |
| M11 | 23,9                          | 33,8  | <b>75,36</b>         | 4                              | 46,5 | <b>74,80</b>          |

Spurenelemente sind Aktivatoren oder Inhibitoren vieler Stoffwechselfunktionen. Bei ihrem Fehlen sind zahlreiche physiologische Funktionen bei Pflanzen, Tieren und Menschen nicht mehr realisierbar (Johal und Huber, 2009). Spurenelemente sind die aktiven Zentren einer großen Gruppe von Enzymen, den Aminopeptidasen, die in zahlreiche physiologische Prozesse wie Angiogenese, Antigenpresentation, Neuropeptid- und Hormonproprocessing, Schwangerschaft und Reproduction, Proteinturnover, Erinnerung, Entzündung, Tumorwachstum, Krebs und Metastasierung, Blutdruck und Bluthochdruck auf die eine oder andere Art involviert sind. Es sind ubiquitäre Enzyme, die unter den Lebewesen weit verbreitet sind. Man findet sie in vielen subzellulären Organellen, im Cytoplasma, als Membrankomponenten mit essentiellen zellulären Funktionen. Sie können die erste Peptidbindung in einer Polypeptidkette unter Freisetzung einer einzigen Aminosäure (Aminopeptidasen im eigentlichen Sinn) oder Dipeptide oder Tripeptide (Dipeptidyl- und Tripeptidylpeptidasen) vom Polypeptidsubstrat hydrolysieren. Bei der Mehrzahl handelt es sich um Metalloenzyme, nur Cystein- und Serinpeptidasen, die auch zur

Gruppe gehören, sind eine Ausnahme. Die strikten Metallo-Aminopeptidasen bilden die größte und homogenste Klasse dieser Enzyme. Sie besitzen ein oder zwei Metallionen in ihren aktiven Zentren. Gemeinsam mit anderen Peptidasen wirken sie im Konzert, um diverse proteolytische Stoffwechselwege zu komplettieren. Eine gemeinsame Eigenschaft aller Metallo-Aminopeptidasen ist, dass das aktive Zentrum mit Metallion (in den meisten Fällen Zn) von einer hydrophilen Hülle umgeben ist, die in eine hydrophobe Gruppe eingebettet ist. Außerhalb des Menschen sind nur wenige Metallo-Peptidasen bei Tieren und Insekten bekannt. Eine große Gruppe bekannter Enzyme wird von Bakterien gebildet, die z. B. auch an der Verdauung von Nahrung im MDT beteiligt sind (Mucha et al. 2010). Mangel an Spurenelementen bes. Zn, kann das ganze enzymatische Gefüge zum Stillstand bringen. Für die Funktion der Enzyme ist nicht nur das Metallion im aktiven Zentrum von Bedeutung. Enzyme wie z.B. die Leucin-Aminopeptidase (im Zytoplasma) werden durch  $Mg^{++}$  und  $Mn^{++}$  aktiviert, aber durch  $Zn^{++}$ ,  $Co^{++}$  und Chelatoren inaktiviert, demgegenüber wird die Alanin-Aminopeptidase (Zellmembran, bes. Niere, MDT) durch  $Co^{++}$  aktiviert (Sanderink et al. 1988). Spurenelementmängel wurden von Krüger et al. (2013) in acht dänischen Milchviehbeständen (30 Tiere pro Bestand) untersucht. Sie fanden differierende Glyphosatkonzentrationen im Urin der Tiere (Abb. 8) und insgesamt sehr niedrige (weit unter dem Referenzbereich) Mn- und Co-Spiegel. Die Medianwerte von Cu, Zn und Se befanden sich den Referenzbereichen, unklar ist hierbei, ob diese Spurenelemente im Blut frei verfügbar oder an Glyphosat chelatiert waren.

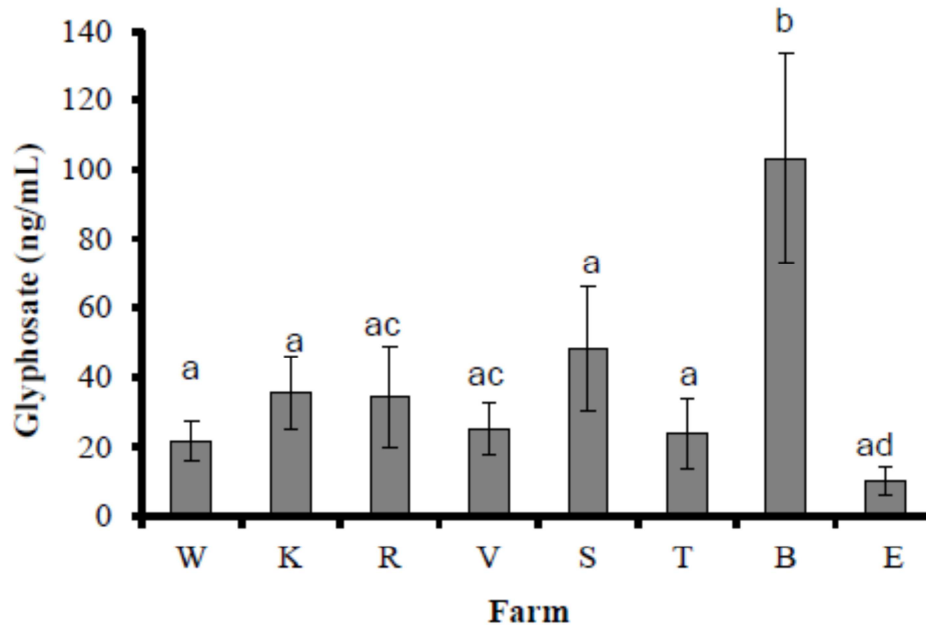


Abb. 8: Glyphosatsnachweis im Urin dänischer Milchkühe (Krüger et al. 2013), Signifikante Unterschiede bei ungleichen Buchstaben,  $P < 0,05$ .

### 5.3. Disseminierende Koagulopathien

Diese Zirkulationsstörungen können unter Glyphosatwirkung auf zwei Wegen entstehen. Im ersten Fall erfolgt das durch Glyphosat selbst (Samsel und Seneff, 2013), im zweiten Fall durch aus dem MDT transloziertes LPS (bakterielles Endotoxin) Gram-negativer Bakterien (Hidesako et al. 2003). Durch Glyphosat erfolgt ein Shift der MDM in Richtung LPS-Produzenten (Wodds et al. 2003). Die verstärkte Bildung von Cytokinen und Immunglobulinen auf das LPS induziert eine Öffnung der MDT-Barriere aufgrund einer chronischen Entzündung. LPS und weitere Teile der MDF translozieren. Das Phänomen wird als „Leaky gut syndrome“ bezeichnet. In Abb. 9 ist das Ohr einer Kuh gezeigt, bei der vermutlich durch Koagulopathie die Durchblutung der Ohrränder gestört ist. In Abb. 10 sind die abgestorbenen Schwanzenden zweier Kühe dargestellt. Gewebe von distalen Körperenden (Ohren, Schwänze) werden durch die Koagulopathie minder durchblutet und nekrotisch. Infolge der Schädigung des CYP-Enzymsystems kann die Leber auch nicht mehr an der Detoxifizierung des LPS teilnehmen. Als amphiphiles Molekül deponiert der Körper LPS im Fettgewebe. Dadurch wird der Fettgewebsaufbau unterstützt.



Abb. 9: Ohrtrandnekrosen infolge dissiminierender Koagulopathie bei einer Milchkuh (Foto: A. Gerlach).

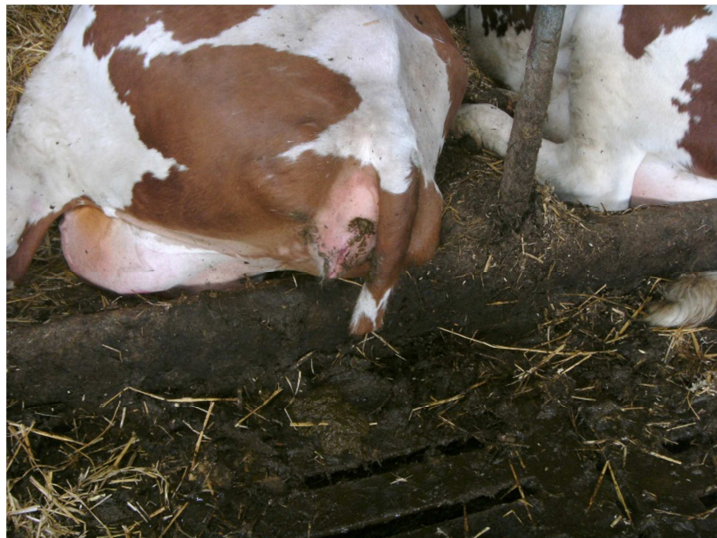


Abb. 10: Abgestorbene Schwanzenden infolge disseminierende Koagulopathie bei Milchkühen /Fotos: A. Gerlach)

## 5.4 Toxische Aktivitäten

### 5.4.1 Akute Toxizität

Nach oraler Applikation liegt die LD50 für Ratten bei  $>5$  g/kg Körpermasse (Balaszczak, 1988), nach Inhalation bei  $>4.98$  mg/kg Körpermasse für den gleichen Rattenstamm (McDonald & Anderson, 1989). Demnach ist die inhalative Toxizität

1000fach größer als die orale. Das würde bedeuten, dass bei Ausbringung auf dem Feld und Verfrachtung durch Windbewegung oder bei Ausscheidung mit dem Urin von Milchkühen (der Landwirt steht in einem Graben beim Melken hinter der Kuh) und Einatmen von Aerosolen schon mit kleinen Mengen Vergiftungsgefahr besteht. An Hunden wurden bis 1000 mg/kg Körpermasse über 7 und 14 Tagen oral appliziert. In der 7-Tage-Gruppe war bei männlichen Tieren nur das Leberenzym ALT leicht erhöht, das Cholesterol leicht erniedrigt, in der 14-Tage-Gruppe war bei den Rüden ebenfalls die ALT leicht erhöht (Goburdhun & Oshodi, 1989). Auch mit höheren Dosierungen wurden keine deutlichen toxischen Effekte nachgewiesen. Demgegenüber untersuchten Talbot et al. (1991) akute Intoxikationen durch orale unbeabsichtigte oder beabsichtigte Glyphosatinkorporierung bei 93 Patienten. Bei einer durchschnittlichen Menge von  $184 \pm 70$  ml eines 41%igen Glyphosat-haltigen Herbizids in Fällen mit tödlichem Ausgang (7 Patienten) wurden  $1,25 \pm 0,48$  g/kg bei 60kg Durchschnittsgewicht aufgenommen. Das liegt weit unter der LD50 von Ratten. Die Autoren beschreiben in diesen Fällen Blutdruckabfall, Unansprechen auf intravenöse Flüssigkeitsapplikation und Lungenödem bei normalem zentralen Venendruck. In 80 beabsichtigten Vergiftungsfällen waren Erosionen im Magen-Darm-Trakt (66%), Schlundentzündung (43%), Dysphagie (31%) und gastrointestinale Hämorrhagien (8%) festzustellen. Duodenitis (26%), Duodenalulcera (8,7%), kardiovaskuläre Störungen (18%), renale Veränderungen (14%), erhöhte Serumkreatininwerte (100%), erhöhte Leberenzyme (19%), ZNS-Symptome (12%) waren feststellbar. Es scheinen damit erhebliche Unterschiede zwischen den Reaktionsmustern von Menschen und den herangezogenen Versuchstieren zu existieren. Untersuchungen von Tsui et al (2005) an Wasserflöhen zeigen, dass die Kombination von Glyphosat mit Quecksilber und Selen die Toxizität dieser Schwermetalle steigert, nicht die von Cadmium, Kupfer, Chrom, Nickel, Blei und Zink. Quecksilber ist im Konservierungsstoff Thiomersal, das häufig in Impfstoffen enthalten ist sowie im Amalgam zur Zahnkonservierung enthalten.

#### **5.4.2 Chronische Toxizität**

Untersuchungen zur chronischen Toxizität an Mäusen (728d) und Ratten (365d), die durch die zulassende Behörde bewertet wurden, wiesen trotz hoher Dosierungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuch- und Kontrollgruppen aus (Pfeil und Niemann, 2004). Demgegenüber waren Seralini et al. (2012) in der Lage in

einer 2jährigen Studie an Ratten mit sehr geringen Glyphosatkonzentrationen (50ng/l Glyphosat) zahlreiche Veränderungen bei den Tieren nachzuweisen. Bei diesen niedrigen Konzentrationen waren schwere hormonabhängige Störungen der Gesäuge, der Nieren und Lebern festzustellen. Signifikante biochemische Störungen und physiologische Abweichungen waren bei beiden Geschlechtern festzustellen.

#### **5.4.3 Zytotoxizität**

1996 wurde ein Patent durch Camden (1996) unter dem Titel“ A pharmaceutical composition containing N-phosphonoglycine derivatives for inhibiting the growth of viruses and cancer”. Mit dieser pharmazeutischen Komposition sollen das Wachstum von Krebs und Tumoren in Säugetieren, besonders in Menschen und wamblütigen Tieren gehemmt werden. Die Komposition ist auch gegen Viren effektiv. Sie enthält N-Phosphonoglycinderivate, die auch herbizide Wirkung besitzen. Eine Kombination mit einem Chemotherapeutikum ist möglich. In dem Patent wird davon ausgegangen, dass viele Herbizide und Fungizide allein oder in Kombination mit anderen Herbiziden/Fungiziden eine antitumoröse Wirkung besitzen. Die Applikation des Wirkstoffes erfolgt danach oral, rektal, topisch, parenteral, intravenös oder durch Einspritzen oder Umspritzen des Tumors. Eine Menge von 2-400mg/kg Körpermasse des N-Phosphonoglycin-Derivates wird zur Tumorbehandlung empfohlen. Die Dosis für Menschen ist niedriger anzusetzen als für Versuchstiere, z. B. Mäuse. Die Prüfung der EC-50 (Konzentration des Wirkstoffes, die 50% der Zellen abtötet) von Glyphosat ergab die in Tab. 3 dargestellten Ergebnisse. Die Empfindlichkeit tumoröser und gesunder Zellen ist demnach sehr unterschiedlich. Gesunde Keratinozyten sind anfälliger als Fibroblasten. Heu et al (2012) bestätigen diese Ergebnisse mit ihren Untersuchungen. Sie fanden eine Störung des Membranpotentials in den Mitochondrien von Keratinozyten (Hautzellen (HaCaT)), was zum Absterben der Zellen führte. Sie sehen insbesondere die verletzte Haut als Ort einer vermehrten Penetration des Herbizids. Mit dem gleichen Zellsystem konnten Gehin et al. (2006) mit Glyphosat allein oder mit Roundup 3 plus® signifikante Veränderungen im antioxidativen Status der Zellen feststellen wie z. B. Glutathionverminderung, enzymatische Störungen (Catalase, Glutathion-peroxidase und Superoxide dismutase) sowie Anstieg der Lipidperoxidation. Durch Zusatz von Antioxidantien wie Vitamin C und E konnte dieser Prozess beeinflusst werden.

Tab. 3: EC-50 von Glyphosat (ppml) für tumoröse und gesunde Zellen (Camden, 1996)

| Wirkstoff  | HT29  | HT29  | M    | MXI   | A54   | A54   | BC     | BC     | CC     | CC     | FB     | FB    |
|------------|-------|-------|------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
|            | 9     | 9     | XI   |       | 9     | 9     |        |        |        |        |        |       |
| Glyphosat  | 5.41  | 3.73  | 36.5 | 14.6  | 25.9  | 22.3  | 1.59   | 5.54   | 3.09   | 3.21   | 86.1   | 35.8  |
| Adriamycin | 0.003 | 0.006 | 0.02 | 0.001 | 0.003 | 0.009 | 0.0015 | 0.0039 | 0.0035 | 0.0093 | 0.0065 | 0.001 |

HT29: Colocarcinom, MXI: Mammatumorzelle, A549: Lungentumorzelle, **BC: Bronchialepithelzelle, CC: Keratinozyten, FB: Fibroblasten.**

Olorunsogo et al (1979) stellten bereits fest, dass die einmalige intraperitoneale Applikation von 15, 30, 60 und 120 mg/kg Körpermasse des Isopropylsalzes von Glyphosat an Ratten (Wistar) zu einer Entkopplung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung in Leberzellen bei Glyphosatintoxikation führt. Dadurch war die Energiegewinnung der Tiere massiv gestört. Dieser Energiemangel ist auch häufig bei Glyphosatintoxikationen von Nutztieren und Menschen zu beobachten.

## 5. 5 Hormonzerstörung

Die sexuelle Entwicklung eines Individuums steht pre- und neonatal unter hormoneller Kontrolle und ist demzufolge sensitiv für exogene Substanzen mit hormoneller Wirkung. Störungen in der hormonellen Regulierung in der prenatalen oder frühen postnatalen Entwicklung können negative Effekte auf das männliche Reproduktionssystem haben (Mably et al. 1992). Die reproduktive Toxizität von Glyphosat für Ratten (reduzierte epididymale Spermienkonzentration) lag 20 % unter der der Kontrollen bei 20 und 50g Glyphosat pro kg Körpermasse (Morrissey et al. 1988). Bei Kananinchenböcken wurden reduzierte Ejakulatmengen, Spermienkonzentrationen sowie deformierte Spermien festgestellt (Yousef et al. 1995). Walsh et al. (2000) konnten anhand der Hemmung der Steroidgenese durch Zerstörung des Steroid-Akut-Regulationsproteins (StAR) durch Roundup® zeigen, dass dieses kommerzielle Produkt die reproduktive Funktion der Tiere hemmt. Richard et al. (2005) konnten feststellen, dass die Konzentration des Enzyms Aromatase (ein Cyp450-Enzym), das Testosteron in Östrogen umwandelt, durch Glyphosat-haltige Herbizide in Konzentrationen unterhalb der in der Landwirtschaft

verwendeten, reduziert wird. Niedrige Östrogenspiegel im Gehirn männlicher Individuen während der Pubertät können die Fruchtbarkeit beeinflussen. Dallegrave et al. (2007) konnten in ihren Untersuchungen an Ratten die hormonzerstörende Wirkung bestätigen. Es konnte eine reduzierte Spermienzahl und Reduktion der täglichen Spermienproduktion bei den Nachkommen behandelten Mütter festgestellt werden. Konzentrationsabhängig wurde eine Reduktion des Testosteronlevels sowie ein Anstieg des Prozentsatzes abnormaler Spermien in der Pubertät und später festgestellt. Die Erniedrigung der Östrogenspiegel bei weiblichen Tieren führt zu Fruchtbarkeitsproblemen. Bei Kühen und Sauen müssen oft mehr als zwei Besamungen durchgeführt werden. Die Remontierungsquoten in den Beständen liegen oft >40%. Normalerweise werden ca. 30% der Bestände durch Färsen oder Jungsauen remontiert.

## **6. Nachweis von Glyphosat in Organen, Sekreten, Muskulatur von Menschen und Tieren**

Nachweise von Glyphosat konnten von Krüger et al. (2014) in Urinen von deutschen Kühen ( $n=343$ , MW  $20,13 \text{ ng/ml} \pm 25,24$ ), dänischen Kühen ( $n=242$ , MW  $36,75 \text{ ng/ml} \pm 29,62$ ), Schweinen ( $n=40$  MW  $36,51 \pm 15,71$ ), Hasen ( $n=139$ , MW  $14,84 \text{ ng/ml} \pm 21,37$ ) und Mastkaninchen ( $n=77$ , MW  $74,24 \text{ ng/ml} \pm 49,81$ ) realisiert werden. Von Bedeutung ist hierbei, dass sich dänische und deutsche Kühe signifikant unterscheiden ( $P < 0,001$ ). Beunruhigend ist die Konzentration von Glyphosat in den Mastkaninchenurinen. Die Konzentration liegt 3,7mal über der Konzentration von Milchkühen. Wenn man davon ausgeht, dass in Organ- und Fleischproben von konventionellen Schlachtrindern ähnliche Werte wie in den Urinen gefunden wurden (Tab. 4), sind in Kaninchenfleisch, das als diätetisch hochwertig bezeichnet wird, ebenfalls Konzentrationen oberhalb von  $50\text{-}60 \text{ ng/g}$  Glyphosat zu erwarten. Interessant sind auch die Glyphosatwerte in den Hasenurinen. Hasen sind standorttreu und spiegeln die Belastung der jeweiligen Umwelt sehr gut wieder. Die Untersuchung erfolgte wegen der zurück gehenden Bestände in Nordrhein-Westfalen. Auf die negative Wirkung von Glyphosat für die Fruchtbarkeit von Tieren und Menschen wurde bereits eingegangen. Bei Schlachtschweinen ( $n=40$ ) konnten im Magengewebe  $113,91 \text{ ng/g} \pm 10,41$  Glyphosat nachgewiesen werden. Geht man davon aus, dass Schweinemägen auch zu Hundefutter verwertet werden, kann die in Hundefutter ( $n=7$ , MW  $152,21 \text{ ng/g} \pm 108,05$ ) nachgewiesene Glyphosatmenge

nachvollzogen werden. In Konsummilchproben unterschiedlicher Molkereien wurde Glyphosat nachgewiesen (Tab.4). Die nachgewiesenen Mengen liegen unter denen im Urin, sind aber hinsichtlich ihrer gesundheitsbeeinträchtigenden Möglichkeiten bedenklich. Der Nachweis von Glyphosat in Lebensmitteln tierischer Herkunft kann zur Belastung der Konsumenten führen. In Urinen von sich konventionell ernährenden Menschen (n=99, MW 2,38ng/ml±3,77) wurde signifikant (P<0,002) mehr Glyphosat festgestellt als bei sich überwiegend biologisch ernährenden Personen (n=41, MW 0,60 ng/ml±0,58). In 8 untersuchten Muttermilchproben waren in einer Probe 10,8ng/ml Glyphosat enthalten. Bei der Spenderin handelte es sich um eine konventionelle Esserin.

(Tab. 4: Glyphosatgehalte in Organen und Muskulatur von Schlachtrindern und Konsummilch (Schledorn 2014))

| Glyphosatkonzentration in ng/ml |            |    |                    |            |
|---------------------------------|------------|----|--------------------|------------|
| Rinderorgane                    | Mittelwert | n  | Standardabweichung | Medianwert |
| Dünn-Dickdarm                   | 28,01      | 32 | 16,55              | 23,29      |
| Leber                           | 14,88      | 41 | 18,57              | 9,46       |
| Niere                           | 14,19      | 26 | 28,25              | 4,01       |
| Lunge                           | 17,25      | 23 | 43,59              | 4,87       |
| Muskulatur                      | 16,31      | 6  | 7,17               | 16,29      |
| Konsummilch<br>ng/ml            | 8,91       | 57 | 12,83              | 3,26       |

## 7. Glyphosat in Futter-und Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft

Rückstandswerte (Verordnung Nr. 441/2012) für ausgewählte Futter- und Nahrungsmittel sind in Tab. 5 dargestellt. Dazu gehören GVO- Getreide und Ölfrüchte (Soja, Raps, Mais) sowie Nicht-GVO-Produkte, die vor der Ernte mit Roundup trocken gespritzt werden (Vorerntesikkation, seit Mai 2014 durch BVL nur in Ausnahmen noch zugelassen).

Tab. 5: Verordnung Nr. 441/2012 der EU- Kommission. Rückstands-

## höchstgehalte von Glyphosat in einigen Futter- und Lebensmitteln

| Futtermittel                  | Höchstgehalte<br>mg/kg |
|-------------------------------|------------------------|
| Leinsamen                     | 10                     |
| Sonnenblumenkerne             | 20                     |
| Rapssamen                     | 10                     |
| Sojabohne                     | 20                     |
| Gerste                        | 20                     |
| Mais                          | 1                      |
| Hafer                         | 20                     |
| Roggen                        | 10                     |
| Weizen , Dinkel,<br>Tritikale | 10                     |
| Süßlupine                     | 10                     |

Die in Tab. 6 ausgewiesenen Glyphosatzmengen in den Futtermitteln für Nutztiere liegen zwar deutlich unter den Rückstandshöchstwerten der EU-Verordnung Nr. 441/2012, doch ist an Nutztieren eine chronische Applikation mit geringen Glyphosatzmengen bisher hinsichtlich ihrer Folgen für die Tiere nicht untersucht worden. In Tab. 7 sind die Glyphosatzkonzentrationen von konventionellen Getreidekörnern, Brot, Brötchen sowie Biogetreide/-mehl dargestellt. Der Mittelwert der Bioprodukte war gegenüber den konventionellen Produkten signifikant reduziert, doch nicht frei von Glyphosat. Nur drei von 7 Produkten lagen unter der Nachweisgrenze des Testsystems. Das spricht für ungewollte Kontaminationen über Regen und Luft oder für kriminelles Verhalten. In Tab. 6 sind die Glyphosatzkonzentrationen in Futtermitteln dargestellt. Bis auf Weizenkörner liegen die Glyphosatzkonzentrationen deutlich über den Lebensmitteln (Tab. 7).

Tab. 6: Glyphosatnachweis in Futtermitteln (Schledorn, 2013, unveröffentlicht)

| Glyphosatkonzentration in ng/g |            |    |                    |            |
|--------------------------------|------------|----|--------------------|------------|
| Futtermittel                   | Mittelwert | n  | Standardabweichung | Medianwert |
| Milchkühe (Pellets)            | 325,3      | 10 | 261,4              | 230        |
| Mastschweine                   | 802,4      | 17 | 830,9              | 576,4      |
| Geflügel                       | 613,9      | 4  | 243,9              | 579,6      |

Tab. 7: Glyphosatgehalte in Getreide und Getreideprodukten (Schledorn 2013, unveröffentlicht)

| Produkt                 | n | Glyphosat ng/g±Stabw. |
|-------------------------|---|-----------------------|
| Weizenkörner            | 2 | 637,1±5,25            |
| Weizenmehl              | 6 | 15,16±5,45            |
| Weizenbrötchen          | 2 | 35,96±5,15            |
| Roggenmehl              | 2 | 14,74±10,4            |
| Roggenkleie             | 1 | 233,95                |
| Roggenbrot              | 3 | 20,3±9,6              |
| Malzpulver              | 1 | 78,02                 |
| Bio-Getreidekörner/mehl | 7 | 6,70±10,29            |

## 8. Glyphosatakkumulation im Körper von Menschen und Tieren

Nur etwa 2% des oral aufgenommenen Glyphosats werden Im Körper von Menschen zu AMPA (Aminomethylphosphonsäure) abgebaut (Williams et al. 2000). Da aber ein Abbau von Glyphosat in den GVO-Pflanzen wie z. B. in Soja stattfindet (Bohn et al. 2013) werden AMPA und Glyphosat gemeinsam oral mit Futter/Nahrung aufgenommen und über Fäkalien und Urin ausgeschieden. In eigenen Untersuchungen konnten sowohl AMPA als auch Glyphosat im Urin von Mastkaninchen nachgewiesen werden (Tab. 8). Die Unterschiede zwischen den Beständen dürften auf die Belastung der Futtermittel zurück gehen. Nach einmaliger

oder wiederholter oraler Applikation von 10 mg/kg C<sup>14</sup>- markiertem Glyphosat an Ratten werden nach 7 Tagen die höchsten Konzentrationen im Knochen nachgewiesen (einmalige Applikation: 0,552 ppm bei männlichen Tieren, 0,313 ppm bei weiblichen Tieren; wiederholte Applikation: männliche Tiere 0,748, weibliche Tiere 0,462 ppm). In weiteren Rattenversuchen waren 8h nach einmaliger oraler Applikation 98,6% des Glyphosats ausgeschieden, 1,4% waren in den Organen und Geweben nachweisbar (Pfeil und Niemann, 2004). Vasiliuk et al. (2005) stellten mit radioaktiv markiertem Glyphosat demgegenüber fest, dass 2h nach oraler Applikation 34% der Radioaktivität mit dem Darmbewebe verbunden waren. Die Autoren konnten mit Dünndarm-und Dickdarm-Zellkulturen nachweisen, dass bei hohen Glyphosatdosen (>10mg/ml) die Darmpermeabilität steigt. Da mit dem Futter Glyphosat und AMPA kontinuierlich anfluten, kommt es zu einer lebenslänglichen Auseinandersetzung mit diesen toxischen Substanzen. In eigenen Untersuchungen konnte über 24 h eine Konstanz in den Glyphosatausscheidungen (Messung aller 6h) mittels Urin bei Milchkühen festgestellt werden.

Tab. 8: Nachweis von Glyphosat und AMPA im Urin von Mastkaninchen mittels Massenspektroskopie (µg/l) (Hoppe, 2013, unveröffentlicht)

| Bestand  | Glyphosat<br>Mittelwert | Min.  | Max. | AMPA<br>Mittelwert | Min.  | Max.  |
|----------|-------------------------|-------|------|--------------------|-------|-------|
| A (n=15) | 12,5                    | 3,2   | 42,3 | 1,4                | 0,4   | 5,1   |
| B (n=7)  | 34,7                    | 31,87 | 40,7 | 20,4               | 14,01 | 33,04 |

## 9. Fazit

Die beschriebenen Eigenschaften Glyphosat-haltiger Herbizide auf Böden, Umwelt, Menschen und Tiere (Chelator, Bakteriostatikum, Hormonzerstörer, Zytostatikum), die auf den Wirkstoff Glyphosat und auf die verwendeten Penetrationsmittel und anderen Beistoffe zurück gehen, sind ausreichend, ein sofortiges Verbot auf EU-Ebene auszusprechen. Der Nachweis dieses Wirkstoffes und seines Hauptmetaboliten in der Nahrungskette unterstützen diesen Gedanken. Der hauptsächliche Eintrag erfolgt über die gentechnisch veränderten (GVO), Glyphosat-resistenten Futter-und Lebensmittel (Soja, Mais, Raps, Zuckerrüben, etc.). Diese sind seit 1996 in Europa zugelassen (pro Jahr zwischen 38-50 Mio Tonnen). Bisher

erfolgte in Europa keine Zulassung des Anbaus Glyphosat-resistenter GVO. Dieses könnte aber durch das TTIP aufgehoben werden.

## References

Székács A, Darvas B . (2012): Forty years with glyphosate. In: Herbicides-properties, synthesis and control of weeds, M. N. A.E.-G. Hasaneen, Ed., InTech, Rijeka, Croatia, 2012.

Hensel A. (2014): Persönliche Mitteilung, Glyphosat Symposium, Berlin, 20.01.2014

Zhen-yu Mi. (2014): We must face the harm caused by GM soybeans to 1.3 billion Chinese people. Science and Technology Abstracts Newspaper, April, 25, 2014).

Baird DD, Upchurch RP, Homesley WB, Franz JE. (1971): Introduction of a new broadspectrum postemergence herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control. Proceedings North Central Weed Control Conference 26, 64-68.

Cerdeira AL, Duke SO. (2006): The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: a review. J Environ Qual 35: 1633-1658.

Hammock BD, Gee SJ, Harrison RO, Jung F, et al. (1991): Immunochemical technology in environmental analysis: Addressing critical problems. In: Immunochemical methods for environmental analysis, Van Emon, J. and Mumma, R.O. (Eds.), ACS Symp. Ser., 442: 112-139, American Chemical Society, ISBN 978-0851866277, Washington, DC, USA.

Marzabadi MR, Font JL, Gruys KJ, Pansegrau PD, Sikorski JA. (1992): Design & synthesis of a novel EPSP synthase inhibitor based on its ternary complex with shikimate-3-phosphate and glyphosate. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2: 1435-1440.

Schloss JV, Aulabaugh A. (1990): Acetolactate synthase and ketol-acid reductoisomerase: targets for herbicides obtained by screening and de novo design. Zeitschrift für Naturforschung, 45c: 544-551.

Clair E, Linn L, Travert C, Amiel C, Séralini GE, Panoff JM. (2012) Effects of Roundup(®) and glyphosate on three food microorganisms: *Geotrichum candidum*,

*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Curr Microbiol.* 486-491

Shehata AA, Schrödl W, Aldin AA, Hafez HM, Krüger M (2013): The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry micro-biota in vitro. *Curr Microbiol.* 350-358.

Carr B, Hammer PE, Hinson TK, Vande Berg B. (2011): EPSP synthase domains conferring glyphosate resistance. EP 2011 No. 2 327 785 A2.

Gruys KJ, Sikorski JA. (1999): Inhibitors of tryptophan, phenylalanine, and tyrosine biosynthesis as herbicides. *Plant amino acids, Biochemistry and Biotechnology.*

Fitzgibbon JE, Braymer HD. (1990): Cloning of a gene from *Pseudomonas* sp. strain pg2982 conferring increased glyphosate resistance. *Appl Environ Microbiol.* 56:3382-3388.

Stalker DM, Hiatt WR, Comai L. (1985): A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. *J Biol Chem.* 260: 4724-4728.

Lorenzatti E, Maitre MI, Argelia L, Lajmanovich R, Peltzer P, Anglada M. (2004): Pesticide residues in immature soybeans of Argentina croplands. *Fresenius Environ Bull* 13:675-678.

Duke SO, Baerson SR, Rimando AM. (2003): Herbicides: Glyphosate. In J.R Plimmer, D.W Gammon, and N.N Ragsdale (eds.) *Encyclopedia of Agrochemicals.*

Sanchís J, Kantiani L, Llorca M, Rubio F, Ginebreda A, et al. (2012): Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 402: 2335-2345.

De Roos AJ, Svec MA, Blair A, Rusiecki JA, Dosemeci M, et al. (2005): Glyphosate results revisited: De Roos et al. respond. *Environ Health Perspect.* 113: A366-A367.

Séralini G-E, Clair E, Mesnage R, Gress S, N Defarge N et al. (2012): Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food and Chemical Toxicology* xxx (2012) xxx–xxx.

Poletta GL, Larriera A, Kleinsorge E, Mudry, MD. (2009): Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the comet assay and the micronucleus test. *Mutat Res* 672: 95-102.

Paganelli A, Ganzzo V, Acosta H, López LS, Carrasco AE. (2010): Glyphosate based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chem Res Toxicol* 23: 1586-1595.

Antoniou M, Habib MEM, Howard CV, Jennings RC, Leifer tC, Nodari RO, Robinson CJ, Fagan J. (2012): Teratogenic effects of Glyphosate-based herbicides: Divergence of regulatory decisions from scientific evidence. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0525.S4-006>.

Carrasco A. (2013): Teratogenesis by glyphosate based herbicides and other pesticides. Relationship with the retinoic acid pathway. In: Breckling, B. & Verhoeven, R. (2013) *GM-Crop Cultivation – Ecological Effects on a Landscape Scale. Theorie in der Ökologie* 17. Frankfurt, Peter Lang, p. 113-117.

Samsel A, Seneff S. (2013): Glyphosate's suppression of Cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: Pathways to modern diseases. *Entropy* 2013, 15, 1416-1463; doi:10.3390/e15041416.

Huber D. (2007): What about glyphosate-induced manganese deficiency? *Fluid J.* Fall: 20-22.

Zobiole LHS, de Oliveira RS, Huber DM, Constantin J, de Castro C, et al. (2009): Glyphosate reduces shoot concentration of mineral nutrients in glyphosateresistant soybeans. *Plant soil* 328: 57-69.

Zobiole LHS, Oliveira RS, Kremer RJ, Constantin J, Yamada T, et al. (2010): Effect of glyphosate on symbiotic N<sub>2</sub> fixation and nickel concentration in glyphosate-resistant soybeans. *Appl Soil Ecol* 44: 176-180.

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

Krüger M, Shehata AA, Schrödl W, Rodloff A. (2013) Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on *Clostridium botulinum*. *Anaerobe* 20: 74-78.

Benachour N, Sipahutar H, Moslemi S, Gasnier C, Travert C, et al. (2007): Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Arch Environ Contam Toxicol* 53: 126-133.

Benachour N, Séralini GE. (2009): Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem Res Toxicol* 22: 97-105.

Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnon MC, et al. (2009): Glyphosate based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262:184-191.

Séralini GE, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, et al. (2012): Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food Chem Toxicol* 50: 4221-4231.

El-Shenawy NS. (2009): Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environ Toxicol Pharmacol* 28: 379-385.

Nuss RF, Loewus FA. (1978): Further Studies on oxalic acid biosynthesis in oxalate accumulating plants. *Plant Physiol.* 61: 590-592.

Liu WS, Kallender H, Payne DJ. (2000): Characterization of *Streptococcus pneumoniae* 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase and its activation by univalent cations. *Eur. J. Biochem.* 267: 222–227.

Powell HA, Kerby NW, Rowell P (1991): Natural tolerance of cyanobacteria to the herbicide glyphosate. *New Phytologist* 119: 421–426.

Fischer RS, Rubin JL, Gaines CG, Jensen RA. (1987): Glyphosate sensitivity of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Bacillus subtilis* depends upon state of activation induced by monovalent cations. *Arch. Biochem. Biophys.* 256: 325–334.

Sun Y-C, Chen Y-C, Tiann Z-X et al. (2005): Novel *aroA* with high tolerance to glyphosate, encoded by a gene of *Pseudomonas putida* 4G-1 isolated from an extremely polluted environment in China. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4771

Healy-Fried ML, Funke T, Priestman MA, Han H, Schönbrunn E. (2013): Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of *pro101* in *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *J. Biol.Chem.* 282: 32949–32955.

Lu W, Li L, Chen M, Zhou Z, et al. (2013): Genome-wide transcriptional responses of *Escherichia coli* to glyphosate, a potent inhibitor of the shikimate pathway enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Mol. BioSyst.* 9, 522-531).

Clair E1, Linn L, Travert C, Amiel C, Séralini GE, Panoff JM. (2012): Effects of Roundup® and glyphosate on three food microorganisms: *Geotrichum candidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Curr Microbiol.* 2012 May;64(5):486-91. doi: 10.1007/s00284-012-0098-3. Epub 2012 Feb 24.

Samsel A, Seneff S. (2013): Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 enzymes and amino acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases: *Entropy*, 15: 1416-1463.

Krüger M, Shehata, AA, Grosse-Herrenthey A, Ständer N, Schrödl W. (2014): Relationship between gastrointestinal dysbiosis and *Clostridium botulinum* in dairy cows. *Anaerobe*, 27: 100-105.

Krüger M, Schrödl W, Pedersen I, Schledorn P, Shehata AA. (2014): Detection of glyphosate in malformed piglets. Krüger et al., *J Environ Anal Toxicol.* 4:5, <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0525.1000230>.

Paganelli A, Gnazzo V, Acosta H, Lpez SL, Carrasco AE (2010): Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chem. Res.Toxicol.* 23: 1586–1595.

Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR. (2011): CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proc. Natl. Am. Soi.* 2011, 108, 12657–12662.

Clair E, Mesnage R, Travert C, Séralini GE. (2012): A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicol. In Vitro*, 26: 269–279.

Inagaki T, Moschetta A, Lee Y-K, Peng L, Zhao G, et al. (2006): Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103, 3920–3925.

Hofmann AF, Eckmann L.(2006): How bile acids confer gut mucosal protection. *PNAS*, 103: 4333–4334.

Cakmak I, Yazici A, Tutus Y, Ozturk L. (2009): Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean. *Europ. J. Agronomy* 31: 114–119.

Bøhn T, Cuhra M, Traavik T, Sanden M, Fagan J, Primicerio R. (2013): Compositional differences in soybeans on the market: glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.054>

Johal GS, Huber DM. (2009): Glyphosate effects on diseases of plants. *Europ. J. Agronomy*, 31: 144–152.

Then C. (2013): Hohe Rückstandsmengen bei Sojabohnen in Argentinien. *TESTBIOTECH Hintergrund*, 22-10-2013.

Lundager-Madsen HE, Christensen HH, Gottlieb-Petersen C. (1978): Stability constants of copper (II), zinc, manganese (II), calcium, and magnesium complexes of N-(phosphonomethyl) glycine (glyphosate). *Acta Chem. Scand. A* 32, 79–83.

Motekaitis RJ, Martell AE. (1985): Metal chelate formation by N-(phosphonomethyl)glycine and related ligands. *J. Coord. Chem.* 14, 139–149.

Barja BC, Herszage J, dos Santos Afonso M. (2001): Iron (III)–phosphonate complexes. *Polyhedron* 20, 1821–1830.

Cakmak I, Yazici A, Tutus Y, Ozturk L. (2009): Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean. *Europ. J. Agronomy* 31: 114–119.

Gauvrit C, Gaudry J, Lucotte T, Cabanne F. (2001): Biological evidence for a 1:1 Ca<sup>2+</sup>-glyphosate association in deposit residuals on the leaf surface of barley. *Weed Res.* 41: 433–445.

Schoenherr, J, Schreiber L. (2004): Interactions of calcium ions with weakly acidic active ingredients slow cuticular penetration: a case study with glyphosate. *J.Agric. Food Chem.* 52: 6546–6551.

Nalewaja J, Matysiak R. (1991): Salt antagonism of glyphosate. *WeedSci.* 39: 622–628.

Thelen KD, Jackson EP, Penner D. (1995): The basis for the hard-water antagonism of glyphosate activity. *Weed Sci.* 43: 541–548.

Stahlman PW, Phillips WM. (1979): Effects of water quality and spray volume on glyphosate phytotoxicity [Sorghum]. *Weed Sci.* 27: 38–41.

Hance RJ. (1976): Adsorption of glyphosate by soils. *Pestic. Sci.* 7: 363-366.

Carlisle SM, Trevors JT. (1988): Glyphosate in the environment. *Water, Air Soil Pollut.* 39: 409-420.

Morillo E, Undabeytia T, Maqueda C, Ramos A. (2000): Glyphosate adsorption on soils of divercent characteristics. Influence of copper addition. *Chemosphere*, 40: 103-107.

Sanderink G-J, Artur Y, Siesf G. (1988): Human aminopeptidases: A review of the literature. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 26: 795-807.

Hidesakua A, Yukiob S, Tomotakac Y, Yasuo O, Tomoea M, et al. (2003): Pathophysiology of disseminated intravascular coagulation (DIC) progresses at a different rate in tissue factor-induced and lipopolysaccharide-induced DIC models in rats. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 14: 221–228.

Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, Alessio D, Tso P. (2003): A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J. Nutr.* 133: 1081–1087.

Blaszczak DL. (1988): Acute oral toxicity study in rats. Test material: glyphosate wet cake. Unpublished report, Bio/dynamics project No. 4885-88, Monsanto reference No. BD-88-114, dated 20 September 1988, from Bio/dynamics Inc., East Millstone,

New Jersey, USA. Submitted to WHO by Monsanto Int. Services SA, Brussels, Belgium.

Goburdhun R, Oshodi RO. (1989): Glyphosate: oral maximum tolerated dose study in dogs. Unpublished report No 5660, IRI project No. 640683, dated 22 June 1989, from Inveresk Research International, Musselburgh, Scotland. Submitted to WHO by Cheminova A/S, Lemvig, Denmark.

Talbot AR, Shiaw M-H, Huang J-S, Yang S-F, Goo T-S, Wang S-H, Chen C-L, Sanford TR. (1991): Acute poisoning with a glyphosate-surfactant herbicide ('Roundup'): A review of 93 cases. *Hum. Exp. Toxicol.* 10: 1-8.

Tsui MTK, Wang WX, Chu LM. (2005): Influence of glyphosate and its formulation (Roundup (R)) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental pollution*, 138: 59-68.

Pfeil R, Niemann L. (2004): Glyphosate-First draft. In: Pesticide residues in food – 2004 Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues Evaluations, p. 95-169, WHO/PCS/06.1

Séralini G-E, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, Malatesta M, Hennequin D, de Vendôme JS. (2012): Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.005>.

Camden J. (1996): A pharmaceutical composition containing N-phosphonoglycine derivatives for inhibiting the growth of viruses and cancer. PTC/US96/04954.

Olorunsogo OO, Bababunmi EA, Bassir O.(1979): Effect of glyphosate on rat liver mitochondria in vivo. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 22: 357-364.

Heu C, Elie-Caille C, Mougey V, Launayd S, Nicod L. (2012): A step further toward glyphosate-induced epidermal cell death: Involvement of mitochondrial and oxidative mechanisms. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34: 144–153.

Gehin A, Guyon C, Nicod L. (2006): Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 22: 27–34.

Mably TA, Moore RW, Peterson RE. (1992): In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 114:97–107.

Yousef MI, Salem MH, Bertheussen K. (1995): Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. *J. Environ Sci Health.* 30: 513–534.

Walsh LP, McCormick C, Martin C, Stocco DM. (2000): Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environ Health Perspect.* 108: 769–776.

Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour, Seralini GE. (2005): Differential effects of glyphosate and Roundup® on human placental cells and aromatase. *Environ Health Perspect.* 113: 716–720.

Dallegrave E, Mantese FD, Oliveira RT, Andrade AJM, Dalsenter PR, Langeloh A. (2007): Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch Toxicol.* 81: 665–673.

Krüger M, Schledorn P, Schrödl W, Hoppe H-W, Lutz W, Shehata AA. (2014): Detection of glyphosate residues in animals and humans. *J Environ Anal Toxicol*, 4:2, <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0525.1000210>.

Williams GM, Kroes R, Munro IC. 2000: Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul. Toxicol. Pharm.* 31: 117–165.

Vasiluk, L., Pinto, L.J., Moore, M.M., 2005. Oral bioavailability of glyphosate: studies using two intestinal cell lines. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 153-160.