

## Herbizide

# Anpassung von Modellbakterien an das Jahrhundertherbizid Glyphosat

INGE SCHWEDT, FABIAN M. COMMICHAU  
FG MOLEKULARE MIKROBIOLOGIE, INSTITUT FÜR BIOLOGIE,  
UNIVERSITÄT HOHENHEIM

**Investigations on the adaptation mechanisms of well-studied model bacteria to the once in-a-century herbicide glyphosate can reveal novel functional relationships between seemingly well-studied cellular processes.**

DOI: 10.1007/s12268-024-2170-5  
© Die Autorinnen und Autoren 2024

■ Der Schweizer Chemiker Henri Marin synthetisierte Glyphosat [*N*-(Phosphonomethyl)glycin] erstmalig 1950 [1]. Die Wirkung von Glyphosat als Herbizid entdeckte jedoch erst in den 1970er-Jahren der beim US-Unternehmen Monsanto forschende Chemiker John E. Franz. Seit 1974 wird Glyphosat in der Landwirtschaft eingesetzt, um das Wachstum unerwünschter Pflanzen zu verhindern. Die Entwicklung transgener, Glyphosat-resistenter Nutzpflanzen machte Glyphosat zum weltweit dominierenden Herbizid [1].

Glyphosat wird oft als das perfekte Herbizid bezeichnet, da es ein hochwirksames Breitbandherbizid ist, unter Verwendung von Formulierungshilfsstoffen gut aufgenommen und im pflanzlichen Gewebe verteilt wird und als toxikologisch und ökologisch unbedenklich gilt. Darüber hinaus wird Glyphosat durch die mikrobielle Aktivität des Bodens schnell abgebaut.

Die Wirkung von Glyphosat beruht auf der spezifischen Hemmung der 5-Enolpyruvyl-Shikimat-3-Phosphat(EPSP)-Synthase des Shikimat-Stoffwechselwegs. Die EPSP-Synthase katalysiert in Archaeen, Bakterien, Pilzen, Pflanzen und weiteren Eukaryoten die Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) und Shikimat-3-Phosphat zu EPSP (**Abb. 1A**). Glyphosat konkurriert mit PEP um die Bindung an das katalytische Zentrum der EPSP-Synthase [2]. EPSP wird weiter zu Chorismat umgewandelt, das als Vorstufe für die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren, von Tetrahydrofolsäure (THF), Chinonen und Sekundärmetaboliten dient (**Abb. 1A**). THF

ist ein essenzieller Ko-Faktor für die Purin- und Pyrimidin-Biosynthese, und Chinone fungieren als Elektronen-Carrier in der Atmungskette. Die Hemmung der EPSP-Synthase durch Glyphosat führt daher zum Zelltod. Glyphosat ist für Tier und Mensch nicht toxisch, da tierische und menschliche Zellen keine EPSP-Synthase besitzen.

### Identifizierung des ersten Glyphosat-Transporters

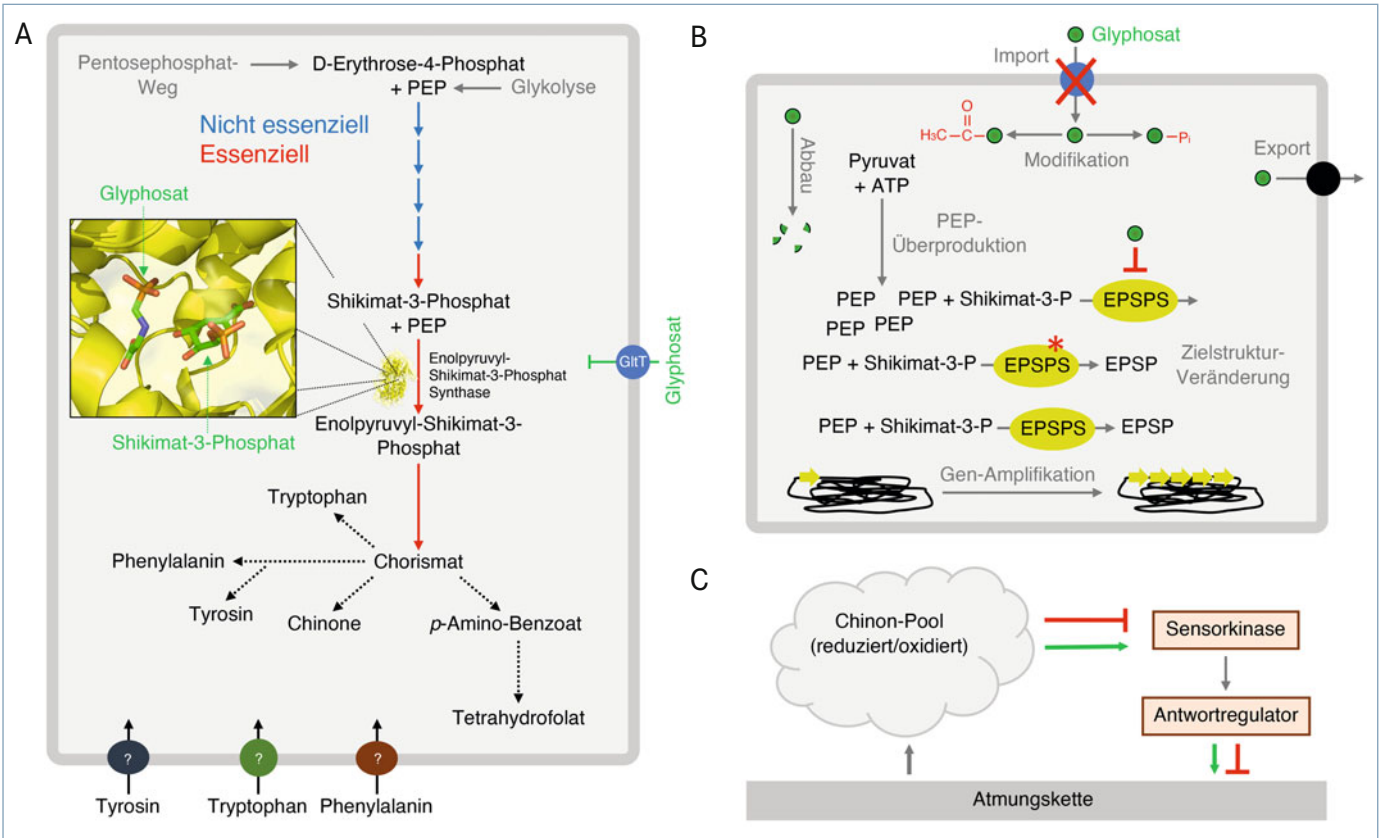
Als Bodenbakterium kommt *Bacillus subtilis* mit Herbiziden und anderen wachstumshemmenden Substanzen in Kontakt. Über den Einfluss von Glyphosat auf das Wachstum von *B. subtilis* war jedoch bislang nur wenig bekannt. Darüber hinaus war bisher unklar, wie Glyphosat in eine Zelle transportiert wird. Eine einzige, knapp 40 Jahre alte Studie zeigte, dass Glyphosat das Wachstum von *B. subtilis* hemmt [3]. Interessanterweise beobachteten die Autor:innen auch, dass die Wachstumsrate der Bakterienkulturen nach einigen Stunden wieder zunahm. Die Ursache für dieses Phänomen wurde jedoch nicht aufgeklärt.

Vor wenigen Jahren zeigte meine Arbeitsgruppe (damals ansässig in Göttingen), dass sich *B. subtilis* durch die Inaktivierung eines Gens, das für einen Glutamat-Transporter codiert, an toxische Mengen des Herbizids rasch anpasst [4]. Interessanterweise transportiert dieser Glutamat-Transporter auch das Herbizid Glufosinat, das die Glutaminsynthetase hemmt. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass *Escherichia coli* das Glypho-

sat ebenfalls über einen Glutamat-Transporter aufnimmt [4, 5]. Es ist daher anzunehmen, dass das Herbizid auch in anderen Organismen über Glutamat-Transporter aufgenommen wird. Der in der alten Studie beschriebene Wiederanstieg des Bakterienwachstums ist daher sehr wahrscheinlich auf die Entstehung Glyphosat-resistenter *B. subtilis*-Mutanten zurückzuführen [3]. Die sehr einfach zu isolierenden Glyphosat-resistenten *B. subtilis*-Mutanten eignen sich möglicherweise gut dazu, um pflanzliche Glyphosat-Transporter zu identifizieren. Ein heterolog überproduzierter Glyphosat-Transporter

Hier steht  
eine Anzeige.

 Springer



**Abb. 1:** Einfluss von Glyphosat auf den Grundstoffwechsel und Glyphosat-Resistenzmechanismen. **A**, Shikimat-Stoffwechselweg in *Bacillus subtilis*. Der Glutamat-Transporter GltT ist für die Aufnahme von Glyphosat verantwortlich. Der Ausschnitt des Strukturmodells zeigt die EPSP-Synthase aus *Agrobacterium* sp. CP4 mit den Liganden Glyphosat und Shikimat-3-Phosphat (PDBid: 2GGA). Die Transporter für die Aufnahme der aromatischen Aminosäuren in *B. subtilis* sind unbekannt. **B**, Mechanismen, die in den Bakterien Glyphosat-Resistenz verleihen. Glyphosat-Resistenz kann durch die Inaktivierung und Überexpression von Aufnahmesystemen erreicht werden. Das Herbizid kann abgebaut und durch kovalente Modifikation unschädlich gemacht werden. Die Überproduktion von PEP verdrängt Glyphosat aus dem aktiven Zentrum der EPSP-Synthase (EPSPS) und verhindert die Inaktivierung des Enzyms. Veränderungen der EPSP-Synthase-Sequenz und die Überproduktion des Enzyms durch Genamplifikation ermöglicht den Bakterien das Wachstum in Gegenwart von Glyphosat. **C**, Hypothetischer regulatorischer Einfluss des zellulären Chinon-Pools auf ein Zwei-Komponentensystem. Das Zweikomponentensystem reguliert in *B. subtilis* die Zusammensetzung der Atmungskette in Abhängigkeit zur Sauerstoffverfügbarkeit. Die Regulation der Sensorkinase des Zweikomponentensystems ist unbekannt, und der regulatorische Einfluss des Redoxzustands des Chinonpools auf das System ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

sollte die Glyphosat-Sensitivität der *B. subtilis*-Mutanten nämlich wieder herstellen.

**Anpassungsmechanismen der Bakterien an Glyphosat**

Bakterien können sich auf vielfältige Weise an Glyphosat anpassen [6]. Ähnlich wie in Pflanzen ist auch in den Bakterien die Glyphosat-Resistenz häufig mit Veränderungen der Herbizid-Zielstruktur verknüpft. So führen Mutationen im EPSP-Synthase-Gen dazu, dass die codierte EPSP-Synthase weniger sensitiv gegenüber Glyphosat ist (**Abb. 1B**). Oftmals reicht ein einziger Aminosäureaustausch aus, um die EPSP-Synthase unempfindlich gegenüber Glyphosat zu machen. In der Regel geht die Erniedrigung der Glyphosat-Sensitivität jedoch mit einer Verringerung der EPSP-Synthase-Aktivität einher, wodurch die Fitness der Spezies beeinträchtigt wird.

Bakterien können sich auch durch die vermehrte Synthese der EPSP-Synthase aufgrund von Mutationen im Promotor oder durch die Amplifikation des EPSP-Synthase-Gens an Glyphosat anpassen (**Abb. 1B**, [4]). In beiden Fällen bilden die Zellen genügend Vorstufen für die Synthese der aromatischen Aminosäuren, von Chinonen und THF, da Glyphosat nur einen Teil der EPSP-Synthase-Moleküle hemmt. Glyphosat kann auch durch kovalente Modifikation (Acetylierung und Phosphorylierung) entschärft werden. Darüber hinaus überleben viele Bakterien in Gegenwart von Glyphosat, da sie das Herbizid abbauen und sogar als Phosphorquelle nutzen können (**Abb. 1B**). Es konnte auch gezeigt werden, dass sowohl die reduzierte Aufnahme als auch der verbesserte Export von Glyphosat die Herbizid-Resistenz erhöhen (**Abb. 1B**).

Kürzlich konnten wir aus kommerziell erhältlichen Glyphosat-Formulierungen (RoundUp®) *Burkholderia antina*- und *Burkholderia cenocepacia*-Stämme isolieren, die in Gegenwart sehr hoher Glyphosat-Konzentrationen überleben [7]. Um die Ursache für die hohe Glyphosat-Resistenz in diesen *Burkholderia*-Isolaten zu verstehen, isolierten und charakterisierten wir Glyphosat-resistente Mutanten eines *B. anthina*-Stamms, der zuvor mit dem Herbizid nicht in Berührung gekommen ist. Durch vergleichende Genomsequenzierungen und Metabolom-Analysen konnten wir einen neuen Glyphosat-Resistenzmechanismus aufdecken [5]. So führt die Veränderung eines Regulators der PEP-Synthase zur Überproduktion von PEP, was die Bindung von Glyphosat an das aktive Zentrum der EPSP-Synthase verhindert (**Abb. 1B**).

Es muss nun untersucht werden, ob die zelluläre PEP-Konzentration in den *Burkholderia*-Isolaten aus der RoundUp®-Lösung erhöht ist. Darüber hinaus wäre es interessant zu testen, ob eine erhöhte PEP-Synthese auch in Pflanzen die Resistenz gegenüber Glyphosat steigert.

### Besonderheiten des Shikimat-Stoffwechselwegs in *B. subtilis*

Labor- und Umweltisolate von *B. subtilis* entwickeln ausschließlich durch die mutationsbedingte Inaktivierung eines Glutamat-Transporter-Gens eine Resistenz gegenüber Glyphosat (Abb. 1B, [4]). Sogar *B. subtilis*-Stämme mit zwei Kopien des Glutamat-Transporter-Gens reichern keine Mutationen im EPSP-Synthase-Gen an [4]. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die EPSP-Synthase in *B. subtilis* keine Aminosäure-Austausche toleriert, die gleichzeitig die Glyphosat-Sensitivität und die Enzymaktivität verringern. Tatsächlich sind sowohl die EPSP-Synthase als auch zwei weitere Enzyme des Shikimat-Stoffwechselwegs für das Wachstum von *B. subtilis* in Komplexmedium (z. B. LB-Medium) essenziell (Abb. 1A, [4, 8]). Im Gegensatz dazu benötigt *Escherichia coli* keines der Enzyme des Shikimat-Stoffwechselwegs für das Wachstum in LB-Medium. Die Entbehrlichkeit der Enzyme in *E. coli* könnte dadurch zu erklären sein, dass das Bakterium Transporter für die Aufnahme von Intermediaten des Shikimat-Stoffwechselwegs besitzt. Es ist auch vorstellbar, dass promiskuitive Enzyme die fehlenden Enzyme partiell ersetzen.

Kürzlich konnten wir zeigen, dass eine EPSP-Synthase-Mutante von *B. subtilis* mit Chinonen in LB-Medium lebensfähig ist [8]. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die EPSP-Synthase-Aktivität in diesem Organismus kritisch ist, um ausreichend Chinone für eine funktionsfähige Atmungskette herstellen zu können.

Darüber hinaus konnten wir ausgehend von der EPSP-Synthase-Mutante Suppressor-Mutanten isolieren, die sogar in Minimalmedium mit *para*-Aminobenzoesäure, Chinonen und den aromatischen Aminosäuren lebensfähig sind (Abb. 1C). Die meisten der Suppressoren besitzen Mutationen in Genen, die für ein Zweikomponenten-System codieren (unveröffentlicht). Interessanterweise ist das Zweikomponentensystem an der Regulation der aeroben und anaeroben Atmung beteiligt. Die weitere Charakterisierung der Suppressor-Mutanten wird dabei helfen, die

Rolle des Chinon-Pools und dessen Redox-Zustand bei der Regulation des Zweikomponenten-Systems aufzudecken. Somit können Untersuchungen zu den Anpassungsmechanismen von Modellbakterien an das Jahrhundertherbizid Glyphosat neue funktionelle Zusammenhänge zwischen scheinbar gut verstandenen Prozessen offenlegen.

### Risiken für Resistenz, Biodiversität, Bestäuber

Obwohl Glyphosat nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft für Mensch und Tier als nicht krebserregend eingestuft wurde, so wird die Verwendung von Glyphosat kontrovers diskutiert. Zum einen führt der übermäßige Einsatz von Glyphosat zur Entstehung Herbizid-resistenter Pflanzen und gefährdet dadurch die wertvolle Herbizid-Ressource für die Landwirtschaft. Zum anderen steht Glyphosat im Verdacht, die Biodiversität zu mindern, weil Nutzpflanzen und andere Organismen gleichermaßen abtötet werden. Darüber hinaus stört Glyphosat die Darmflora von Bienen und Hummeln und macht die wichtigen Bestäuber anfälliger gegenüber Infektionen [8, 9]. Aufgrund der Verlängerung der Genehmigung von Glyphosat durch die EU-Kommission um weitere zehn Jahre muss die Wirkung des Herbizids auf die Biodiversität und den Zellstoffwechsel ausgewählter Organismen weiterhin untersucht werden.

### Danksagung

Wir danken allen Studierenden und unseren Kollaborationspartnern, die an der Glyphosat-Forschung mitgewirkt haben und uns weiterhin unterstützen. ■

### Literatur

- [1] Duke SO, Powles SB (2008) Glyphosat: a once in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci* 64: 319–325
- [2] Schönbrunn E, Eschenburg S, Shuttleworth WA et al. (2001) Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase in atomic detail. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1376–1380
- [3] Fischer RS, Berry A, Gaines CG et al. (1986) Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in *Eubacteria*. *J Bacteriol* 168: 1147–1154
- [4] Wicke D, Schulz LM, Lentjes S et al. (2019) Identification of the first glyphosate transporter by genomic adaptation. *Environ Microbiol* 21: 1287–1305
- [5] Schwedt I, Collignon M, Mittelstädt C et al. (2023) Genomic adaptation of *Burkholderia anthina* to glyphosate uncovers a novel herbicide resistance mechanism. *Environ Microbiol Rep* 15: 727–739
- [6] Hertel R, Gihardt J, Martienssen M et al. (2021) Molecular mechanisms underlying glyphosate resistance in bacteria. *Environ Microbiol* 23: 2891–2905
- [7] Hertel R, Schöne K, Mittelstädt C et al. (2022) Characterization of glyphosate-resistant *Burkholderia anthina* and *Burkholderia cenocepacia* isolates from a commercial Roundup® solution. *Environ Microbiol Rep* 14: 70–84
- [8] Schwedt I, Schöne K, Eckert M et al. (2023) The low mutational flexibility of the EPSP synthase in *Bacillus subtilis* is due to a higher demand for shikimate pathway intermediates. *Environ Microbiol* 25: 3604–3622
- [9] Motta EVS, Raymann K, Moran NA (2018) Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: 10305–10310
- [10] Weidenmüller A, Meltzer A, Neupert S et al. (2022) Glyphosate impairs collective thermoregulation in bumblebees. *Science* 376: 1122–1126

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.  
**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Fabian M. Commichau  
 FG Molekulare Mikrobiologie  
 Institut für Biologie  
 Universität Hohenheim  
 Garbenstraße 30  
 D-70599 Stuttgart  
 Fabian.commichau@uni-hohenheim.de  
<https://mikrobiologie.uni-hohenheim.de>

### AUTORINNEN UND AUTOREN



#### Inge Schwedt

2013–2017 Bachelor (B. Sc.), BTU Cottbus-Senftenberg. 2017–2019 Master (M. Sc.), TU Wien, Österreich. 2020–2023 Promotion, BTU Cottbus-Senftenberg, Universität Hohenheim. Seit 2024 PostDoc an der Universität Marburg.



#### Fabian M. Commichau

1997–2003 Biologiestudium an der RWTH Aachen. 2006 Promotion, 2006–2008 PostDoc an der Universität Göttingen. 2008–2009 PostDoc in Basel, Schweiz. 2009–2011 DSM Nutritional Products Ltd., Grenzach-Wyhlen/Kaiseraugst, Schweiz. 2011–2019 Gruppenleiter an der Universität Göttingen. 2015 Habilitation. 2019–2022 W3-Professor für Synthetische Mikrobiologie, BTU Cottbus-Senftenberg. Seit 2022 Professor und Leiter FG Molekulare Mikrobiologie, Universität Hohenheim.