

**Ihmisen yleisten suolistobakteerien glyfosaattiherkkyys perustuen
bakteerien 5-enolipyruvyyilisikimaatti-3-fosfaattisyntaasien (EPSPS)
proteiinisekvensseihin ja laboratoriokokeisiin**

Lydia Leino

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto
Biologian laitos

TURUN YLIOPISTO

Biologian laitos

LEINO, LYYDIA: Ihmisen yleisten suolistobakteerien glyfosaattiherkkyys perustuen bakteerien 5-enolipyruvyyilisikimaatti-3-fosfaattisyntaasien (EPSPS) proteiinisekvensseihin ja laboratoriokokeisiin

Pro gradu -tutkielma, 59 s., 5 liitettä

Ekologia ja evoluutiobiologia

Marraskuu 2021

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Glyfosaattipohjaiset rikkakasvintorjunta-aineet (GBH) ovat maailman käytetyimpiä herbisidejä. Niiden sisältämän glyfosaatin jäämät ravinnossa ja juomavedessä voivat altistaa ihmisen suolistomikrobiston glyfosaatille. Glyfosaatin toiminta perustuu lähes kaikilla kasveilla, sienillä ja bakteereilla esiintyvän sikimaattikierron häiritsemiseen EPSPS-entsyymiin (5-enolipyruvyyilisikimaatti-3-fosfaattisyntaasi) sitoutumalla, mikä estää elintärkeiden aromaattisten aminohappojen muodostumisen eliössä. EPSPS-entsyymejä esiintyy bakteereissa glyfosaatille sensitiivisinä ja resistentteinä muotoina. Mahdolliset erot bakteerien glyfosaatinsietokyvyssä voivat pitkäaikaisessa glyfosaattialtistuksessa johtaa suolistomikrobiston epätasapainoon, millä voisi olla kokonaisvaltaisia vaikutuksia ihmisen terveydelle.

Selvitin ihmisen yleisten suolistobakteerien glyfosaatinsietokykyä analysoimalla 890 tietokannoista löytyvää EPSPS-aminohapposekvenssiä 101 suolistobakteerilajilta uuden bioinformatiikkatyökalun avulla. Lisäksi altistin laboratoriossa viisi eri bakteerikantaa (*Escherichia coli* IHE3034, *Salmonella enterica* SL1344, *Shigella flexneri* M90T, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ja *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) puhtaalle glyfosaatille sekä Roundup Flex -glyfosaattivalmisteelle.

54 %:lla yleisistä suolistobakteerilajeista esiintyi ainoastaan glyfosaattisensitiivisiä EPSPS-muotoja (esimerkiksi suvut *Escherichia* ja *Faecalibacterium*), kun taas 29 %:lla esiintyi ainoastaan resistenttejä muotoja (esimerkiksi suvut *Helicobacter* ja *Dorea*). Lisäksi 7 %:lla bakteereista esiintyi lajinsisäistä vaihtelua ja 10 %:lla toistaiseksi luokittelemattomia EPSPS-sekvenssimuotoja. Bakteeriviljelyt osoittivat, että glyfosaattivasteessa oli vaihtelua bakteerilajista ja käytetystä glyfosaattivalmisteesta riippuen. Patogeeninen *S. enterica* SL1344 -kanta osoitti huomattavan suurta sietokykyä sekä puhtaalle glyfosaatille että Roundup Flexille.

Kaiken kaikkiaan tulokset viittaavat siihen, että ihmisen suolistobakteerilajien välillä on vaihtelua glyfosaatinsietokyvyssä. EPSPS-sekvenssin lisäksi bakteerien glyfosaattivasteeseen vaikuttavat myös epäsuorat mekanismit, joita tulee jatkossa tutkia lisää. Näin ollen glyfosaatti ihmisravinnossa saattaa muokata suolistomikrobistoa ja johtaa 1) sieto- ja muuntautumiskykyisempien bakteerien hallitsevuuteen ja 2) mikrobiston monimuotoisuuden vähenemiseen suolistossa. Jatkossa tulee tutkia glyfosaatin määrää suolistossa ja sen vaikutusta suolistomikrobistoon yhteisönä, sekä mikrobiston muutosten vaikutusta ihmisen terveyteen ja hyvinvointiin.

ASIASANAT:

glyfosaatti, suolistomikrobisto, EPSPS, sikimaattikierto, herbisidit, bioinformatiikka, resistenssi

UNIVERSITY OF TURKU

Department of Biology

LEINO, LYYDIA: Glyphosate sensitivity of common human gut bacteria based on their 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) protein sequences and laboratory experiments

Master's thesis, 59 pp., 5 app.

Ecology and evolutionary biology

November 2021

The originality of this thesis has been checked in accordance with the University of Turku quality assurance system using the Turnitin OriginalityCheck service.

Glyphosate-based herbicides (GBH) are the most used herbicides in the world. The human gut microbiome may be exposed to glyphosate via residues in human nutrition. The herbicide inhibits the production of vital aromatic amino acids by targeting the EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) enzyme in the Shikimate pathway, almost universally present in plants, fungi, and bacteria. EPSPS enzymes occur in glyphosate sensitive or resistant forms. In bacteria, these differences in the glyphosate sensitivity may lead to a dysbiosis of the gut microbiome after a long-term exposure to the herbicide, which could have pervasive effects on human health.

I assessed the glyphosate susceptibility of common human gut bacteria by analyzing 890 EPSPS protein sequences belonging to 101 species, by using a new bioinformatic tool. Moreover, I cultured five bacterial strains (*Escherichia coli* IHE3034, *Salmonella enterica* SL1344, *Shigella flexneri* M90T, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) and treated them with pure glyphosate and a glyphosate manufacture Roundup Flex.

The results indicate that 54% of the common gut bacteria species only had glyphosate sensitive strains (including genera such as *Escherichia* and *Faecalibacterium*) and 29% only had resistant strains (including genera *Helicobacter* and *Dorea*). Moreover, 7% of the species showed intraspecific variation, and 10% had EPSPS sequences that are yet to be classified. Cell cultures showed that bacteria growth depends on species and glyphosate manufacture. The pathogenic bacteria *S. enterica* SL1344 showed high tolerance to both glyphosate manufactures.

In conclusion, the intrinsic sensitivity to glyphosate is variable among gut bacteria. Moreover, additional indirect mechanisms participate in the sensitivity to glyphosate and should be considered in future studies. Thus, the presence of glyphosate in human food may accentuate this variation, leading to 1) a dominance of tolerant and easily adapting bacteria, and 2) a decrease of diversity in the human gut microbiome. Further studies are needed to investigate the amount of glyphosate in human gut and its effects on microbial communities, as well as to human health.

KEYWORDS:

glyphosate, microbiome, EPSPS enzyme, Shikimate pathway, herbicide, bioinformatics resource, resistance

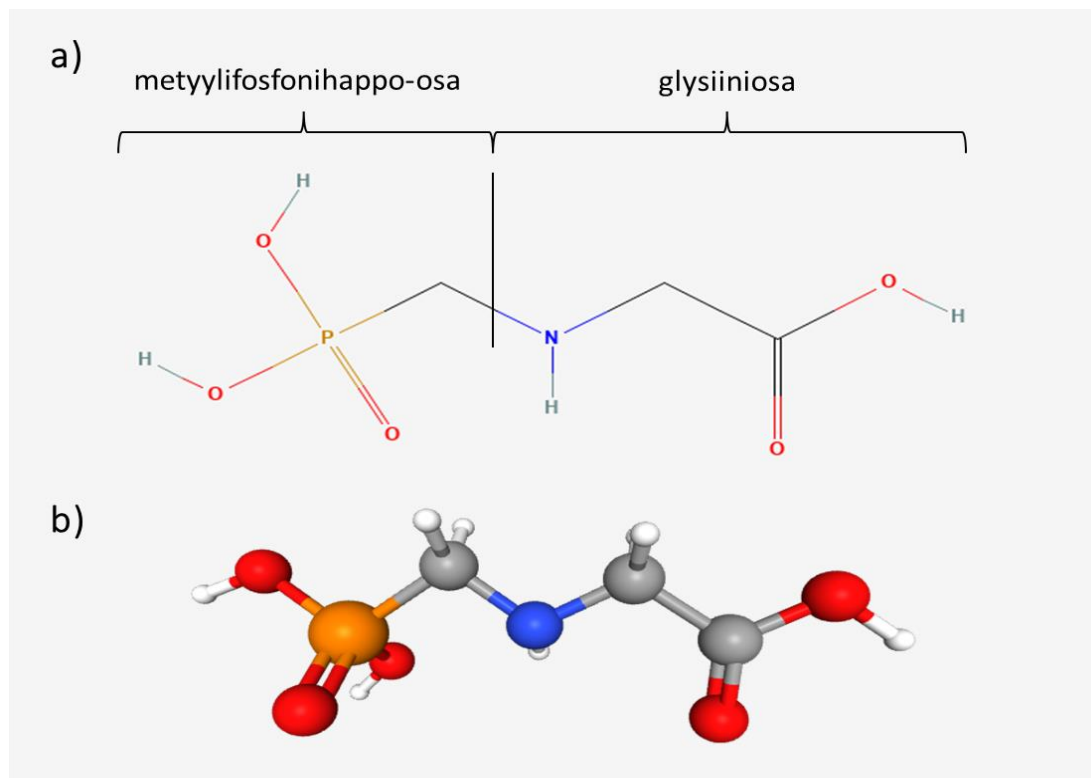
Sisällys

1. Johdanto	1
1.1 Glyfosaatti	1
1.2 Suolistomikrobisto ja sen altistuminen glyfosaattijäämille	2
1.3 EPSPS-entsyymi ja glyfosaatin toimintaperiaate	6
1.4 EPSPS-luokan määrittely aktiivisen keskuksen aminohappojen perusteella	9
1.5 Tutkimuksen tavoitteet ja hypoteesit	11
2. Aineisto ja menetelmät	13
2.1 Bioinformatiivisen aineiston keruu	13
2.2 Laboratoriokokeet	15
2.3 Tilastolliset menetelmät	21
3. Tulokset	23
3.1 Bioinformatiiviset tulokset: EPSPS-sekvenssien luokitukset	23
3.2 Glyfosaattivalmisteiden vaikutus koebakteerien kasvuun laboratoriossa	29
4. Pohdinta	39
4.1 Suolistobakteerien glyfosaattisensitiivisyys bioinformatiivisten tulosten valossa	39
4.2 Suolistobakteerien glyfosaattisensitiivisyys in vitro -kokeiden valossa	42
4.3 Muita glyfosaatin toimintaan vaikuttavia mekanismeja EPSPS-luokan lisäksi	48
4.4 Yhteenveto	50
Kiitokset	52
Lähteet	53
Liitteet	

1. Johdanto

1.1 Glyfosaatti

Glyfosaatti (N-(fosfonometyyli)glysiini, molekyylikaava $C_3H_8NO_5P$) on eniten käytetty kasvinsuojeluaine maailmassa. Se on syntetttinen fosfonihappo, joka muodostuu metyylifosfonihaposta ja glysiinistä hapettavan kytkeytymisen kautta (kuva 1). Glyfosaatti on ainoa rikkakasvimyrkky, jonka vaikutus kohdistuu kasvien entsyymiin nimeltä 5-enolipyruvyyilisikimaatti-3-fosfaattisyntaasi (EPSPS) (NCBI PubChem, 2021b). EPSPS toimii osana kasvien ja monien mikro-organismien sikimaattikiertoa, jonka tehtävä on tuottaa organismille elintärkeitä aminohappoja (Herrmann & Weaver, 1999).



Kuva 1. Glyfosaattimolekyylin kemiallinen rakennekaava a) kaksiulotteisena ja b) kolmiulotteisena. Glyfosaatti muodostuu metyylifosfonihaposta ja glysiinistä. Kuvat on noudettu PubChem -tietokannasta (NCBI PubChem, 2021a).

Glyfosaattipohjaisten rikkakasvimyrkköjen (engl. glyphosate-based herbicides, GBH) käyttömäärät maataloudessa ovat kasvaneet etenkin glyfosaattiresistenteiksi geenimuunneltujen viljelylajikkeiden kehittämisen seurauksena, ja erilaisia GBH-tuotteita on tullut runsaasti markkinoille niin koti- kuin ammattikäyttöön (Nandula, 2010;

Helander ym., 2018). Tunnetuimpia näistä ovat Monsanto-yhtymän (nyk. Bayer) valmisteet kuten Roundup®, joka patentoitiin ensimmäisenä GBH-valmisteena 1970-luvulla (Nandula, 2010).

Keskustelua GBH-valmisteiden turvallisuudesta ihmisille ja ympäristölle on käyty pitkään (Helander ym., 2012; Samsel & Seneff, 2013; Landrigan & Belpoggi, 2018). Alun perin ajateltiin, että EPSPS-entsyymien esiintyminen vain kasveilla ja mikro-organismeilla sulkee pois ihmisiin kohdistuvat haittavaikutukset (William ym., 2000; Krüger ym., 2014). Myöhemmin on kuitenkin ymmärretty mikrobien suuri merkitys sekä ympäristön että ihmisen hyvinvoinnille (Huttenhower ym., 2012; Helander ym., 2018).

1.2 Suolistomikrobisto ja sen altistuminen glyfosaattijäämille

Viime vuosina mikrobiutkimus on edennyt vauhdikkaasti, kun tutkimusmenetelmien kehitys on mahdollistanut mikrobiyhteisöjen kartoittamisen edullisesti ja nopeasti (Douglas & Werren, 2016). Vuonna 2010 Qin ym. julkaisivat ihmisen suolistomikrobien metagenomin ja sen pohjalta tehtyjä päätelmiä suoliston bakteerilajiston monimuotoisuudesta, koostumuksesta ja runsaudesta. Ihmisessä elää monimuotoinen mikrobiyhteisö, jonka metagenomi sisältää yhteensä yli 3,3 miljoonaa geeniä – 150 kertaa enemmän kuin ihmisen oma genomi (Qin ym., 2010). Ihmisessä elävien bakteerien määrä ja monimuotoisuus ovat suurimmillaan suolistossa: suolistobakteerilajeja tunnetaan noin 1000–1150, joista yksilöltä löytyy noin 160 lajia (Qin ym., 2010). Noin 18 näistä lajeista löytyy todennäköisesti lähes kaikista ihmisistä (Qin ym., 2010; Claesson ym., 2011). Jokaisen ihmisen suolistomikrobisto on yksilöllinen, mutta yleensä bakteroidien ja firmikuuttien pääjaksoihin kuuluvat bakteerit ovat selvästi runsaslukuisimmat – niihin kuuluu noin 90 % kaikista suolistobakteereista (Qin ym., 2010; Claesson ym., 2011; Huovinen, 2012).

Suoliston mikrobisto vaikuttaa ihmisen terveyteen hyvin kokonaisvaltaisesti. Bakteerit liittyvät esimerkiksi immuunijärjestelmän, ruuansulatuksen, painonhallinnan ja hermoston toimintaan (Gerritsen ym., 2011; Huovinen, 2012). Normaaliflooraksi kutsutaan esimerkiksi iholla, suolistossa ja limakalvoilla esiintyvää mikrobistoa, joka on yleensä haitatonta ja osaltaan ehkäisee haitallisten mikrobien kasvua (Tieteen termipankki, 2014). Isännän genomilla on todennäköisesti jonkin verran vaikutusta suolistomikrobiston syntyyn ja koostumukseen: erään arvion mukaan mikrobiotaksonien keskimääräinen periytyvyys on noin 2 % (Rothschild ym., 2018). Jotkin taksonit

periytyvät jopa suoraan äidiltä lapselle, vaikka syntymässä lapsella onkin suolistomikrobistoa vasta harvakseltaan (Tsiaoussis ym., 2019). Normaalissa alatiesynnytyksessä tapahtuva altistuminen äidin suolistomikrobeille vaikuttaa lapsen suolistomikrobiston kehittymiseen ja suojaa lasta sairaalaympäristön opportunistisilta patogeeneilta, kuten *Enterococcus faecalis* ja *Salmonella enterica* -bakteereilta (Korpela ym., 2020). Patogeenien osuus suolistomikrobistosta on suurempi lapsilla, jotka syntyvät keisarileikkauksella tai joiden äidit ovat saaneet antibioottihoitoa (Shao ym., 2019; Korpela ym., 2020).

Geenejä suurempi merkitys suolistomikrobiston muotoutumisessa on ulkoisilla tekijöillä (Rothschild ym., 2018). Bakteriyhteisö muokkautuu vahvasti ympäristön vaikutuksesta etenkin lapsuusaikana, jolloin puolustusjärjestelmä kehittyy ja ravitsemus vaihtuu (Huovinen, 2012; Doolittle & Booth, 2017). Koostumukseen vaikuttavatkin esimerkiksi ikä, elämäntyyli ja ravinto (Clavel ym., 2005; Maier ym., 2010; Claesson ym., 2011; Huovinen, 2012), sekä lääkkeet ja mahdollisesti syntetisoidut aineet, joita ei esiinny luonnossa (ksenobiootit) (Tsiaoussis ym., 2019). Suolistomikrobiston koostumuksen epätasapainotila (dysbioosi), jossa mikrobiston diversiteetti on vähentynyt tai runsaussuhteet muuttuneet usein patogeenisten bakteerien eduksi, on yhdistetty useisiin sairauksiin. Näistä esimerkkejä ovat ärtyvän suolen oireyhtymä (IBS), tulehdukselliset suolistosairaudet (IBD) (mukaan lukien Crohnin tauti ja haavainen paksusuolitulehdus) sekä autismikirjon häiriöt (Gerritsen ym., 2011). Suoliston dysbioosia voivat tunnetusti aiheuttaa muun muassa antibiootit (Dethlefsen ym., 2008) tai yhä kasvavan todistusaineiston perusteella altistuminen ksenobiooteille, kuten glyfosaatille (Samsel & Seneff, 2013; Mesnage ym., 2018; Tsiaoussis ym., 2019; Barnett & Gibson, 2020)

Ihminen ja ihmisen suolistomikrobisto voivat altistua maataloudessa käytetyille rikkakasvintorjunta-aineille ruoan välityksellä. Glyfosaatti on yksi useimmin havaituista torjunta-aineista elintarvikkeissa (Medina-Pastor & Triacchini, 2020) johtuen esimerkiksi suurista käyttömääristä, joilla pyritään hävittämään rikkakasvit glyfosaatille sietokykyisiksi geenimuunneltujen lajikkeiden (kuten soiijapavun, rapsin ja maissin) viljelyssä (Krüger ym., 2014). Myös pakkotuleennuttaminen eli sadon yhtäaikainen kypsyttäminen keinotekoisesti juuri ennen sadonkorjuuta aiheuttaa runsaasti jäämiä – erityisesti viljojen, kuten kauran ja vehnän tuleennuttaminen glyfosaatilla on maailmalla yleinen menetelmä (Barnett & Gibson, 2020; Mesnage ym., 2021). Kanadassa ruokatarvikkeiden rutiinitarkastukset ovat paljastaneet, että lähes 30 % kaikista ruokatuotteista ja noin 37 % viljapohjaisista tuotteista sisältävät glyfosaattia, ja että

tuleennuttamiskäytäntö lisää glyfosaattijäämiä ruoassa (Canadian Food Inspection Agency, 2017; Barnett & Gibson, 2020). Suomessa pakkotuleennuttaminen on kiellettyä. Glyfosaattikäsittely viljelyalalla ennen kylvöä kuitenkin mahdollistaa suorakylvön muokkaamattomaan maahan, mikä vähentää maaperän eroosiota ja ravinnehuuhtoumaa (Helander ym., 2012; Heap & Duke, 2018).

Viljatuotteiden, hedelmien, vihannesten ja muiden maataloustuotteiden, kuin myös juomaveden kulutus voivat altistaa glyfosaattijäämille, mikä on aiheuttanut huolta yleisen terveyden puolesta (Krüger ym., 2014; Nielsen ym., 2018). Glyfosaattia on havaittu koehenkilöiden virtsassa useissa tutkimuksissa ympäri maailman ja runsaasti etenkin Yhdysvalloissa, jossa glyfosaattia käytetään maanviljelyssä runsaammin kuin Euroopassa (Krüger ym., 2014; Niemann ym., 2015). Tavanomaista ruokavaliota noudattavien ihmisten virtsasta on löytynyt enemmän glyfosaattijäämiä kuin luomuravinnolla eläviltä, ja sama ilmiö on havaittu useilla eläimillä (Krüger ym., 2014).

Eläinkokeet viittaavat siihen, että glyfosaatti voi kulkeutua ravintoketjussa usealla trofiatasolla ja kertyä eläinkudoksissa suolistoon, maksaan, lihaksiin, pernaan, munuaisiin tai muniin (Krüger ym., 2014; Ruuskanen ym., 2020b). Eläinperäisistä ruokatuotteista on kuitenkin sisäelimiä lukuun ottamatta löytynyt hyvin vähän jäämiä (Euroopan komissio, 2013). Ihmisen suolistossa esiintyvän glyfosaatin määrää ei ole pystytty varmistamaan, mutta esimerkiksi Yhdysvalloissa ihmiselle turvallisiksi määritellyllä päiväsaannilla (engl. acceptable daily intake, ADI) 1,75 mg painokiloa kohti /vrk glyfosaatti muutti rottien suolistomikrobiston koostumusta huomattavasti (Mao ym., 2018). EU:n määrittelemä ADI on matalampi: 0,50 mg painokiloa kohti /vrk (Medina-Pastor & Triacchini, 2020). Lisäksi glyfosaattivalmiste Roundup® on osoittanut antimikrobisia vaikutuksia maataloudessa suositeltua matalammilla pitoisuuksilla (Clair ym., 2012). Onkin todettu, että turvasuosituksia laadittaessa ei ole huomioitu glyfosaatin epäsuoria vaikutuksia, kuten vaikutusta ihmisen hyvinvoinnin kannalta tärkeään suolistomikrobistoon (Barnett & Gibson, 2020).

Tuore katsausartikkeli nostaa esiin glyfosaatin sekä Roundup-glyfosaattivalmisteissa esiintyvän tehosteaine POEA:n (polyetoksyloitu talialkyyliamiini, myynti EU:ssa kiellettiin vuonna 2017) raportoituja terveyshaittoja ympäristölle ja ihmiselle, kuten kasvanut riski syövälle, hormonihäiriöille, keliakialle ja autismille (Samsel & Seneff, 2013; Meftaul ym., 2020). Glyfosaattialtistuksen, jota aiheutuu esimerkiksi Kanadassa etenkin vehnän suuresta kulutuksesta, on suolistomikrobiston dysbioosin myötä arveltu lisäävän erilaisten suolistoon, immuunijärjestelmään ja mielenterveyteen liittyvien

ongelmien määrää (Barnett & Gibson, 2020). Vanhemmassa, glyfosaattivalmistaja Monsanto työntekijöiden kanssa yhteistyössä tehdyssä katsauksessa puolestaan on tyrmätty glyfosaatin mahdolliset negatiiviset terveysvaikutukset (Williams ym., 2000). Kirjallisuudessa nostetaan usein esiin riippumattoman tutkimuksen tärkeys, sillä riippumattomien tutkijoiden ja kaupallisten tahojen tulosten välinen kontrasti glyfosaattiin liittyvissä terveystutkimuksissa on suuri (Samsel & Seneff, 2013; Landrigan & Belpoggi, 2018; Mao ym., 2018).

Aiemmissa tutkimuksissa on kartoitettu glyfosaatin vaikutusta eläinten suolistomikrobistoon. Tsiaoussiksen ym. (2019) kirjoittaman katsausartikkelin mukaan useat eläinkokeet tukevat väitettä, että glyfosaatti muuttaa mikrobiston koostumusta, kun taas jotkin tutkimukset antavat vähemmän osviittaa tästä. Esimerkiksi in vitro -kokeiden perusteella siipikarjalla tavallisesti esiintyvistä bakteerilajeista glyfosaatti vaikuttaa monien haitallisten bakteerien, kuten *Salmonella*- ja *Clostridium*-lajien eduksi (Shehata ym., 2013) ja vastaavasti lehmän pötsiä jäljittelevissä olosuhteissa suosii botuliini-neurotoksiinia tuottavaa *Clostridium botulinum* -lajia (Ackermann ym., 2015). Lisäksi suolistomikrobiston muutoksia on havaittu esimerkiksi mehiläisillä (Motta ym., 2018), kilpikonnilla (Kittle ym., 2018), linnuilla (Ruuskanen ym., 2020a) ja lehmän pötsiä vastaavissa olosuhteissa (Ackermann ym., 2015; Riede ym., 2016).

Ihmisen kannalta merkityksellisempiä eläinkokeita ovat jyrsijöillä tehdyt glyfosaattikokeet. Esimerkiksi rotilla on havaittu muutoksia suolistomikrobiston koostumuksessa ja metaboliassa ja osoitettu näiden johtuvan nimenomaan glyfosaatin aiheuttamasta bakteerien sikimaattikierron estymisestä (Mesnage ym., 2021). Myös hiirillä glyfosaattialtistus muutti suolistomikrobiston koostumusta ja runsautta: se vähensi firmikuuttien ja bakteroidien pääjaksoihin sekä *Corynebacterium*- ja *Lactobacillus*-sukuihin kuuluvia bakteereja ja lisäsi hiirten masentuneisuuskäyttäytymistä (Aitbali ym., 2018). Eräässä tutkimuksessa Roundupille® kanto- ja imetysaikana altistettujen hiirten poikasilla esiintyi huomattavia muutoksia suolistomikrobistossa: mm. *Lactobacillus*-suvun vähenemistä ja bakteroidien lisääntymistä (Mao ym., 2018). Koska syntymän jälkeinen suolistomikrobisto on tärkeässä roolissa puolustusjärjestelmän kehittämisessä, glyfosaatin varhain aiheuttamalla dysbioosilla voisi olla tuhoisia seurauksia vastustuskyvylle (Barnett & Gibson, 2020).

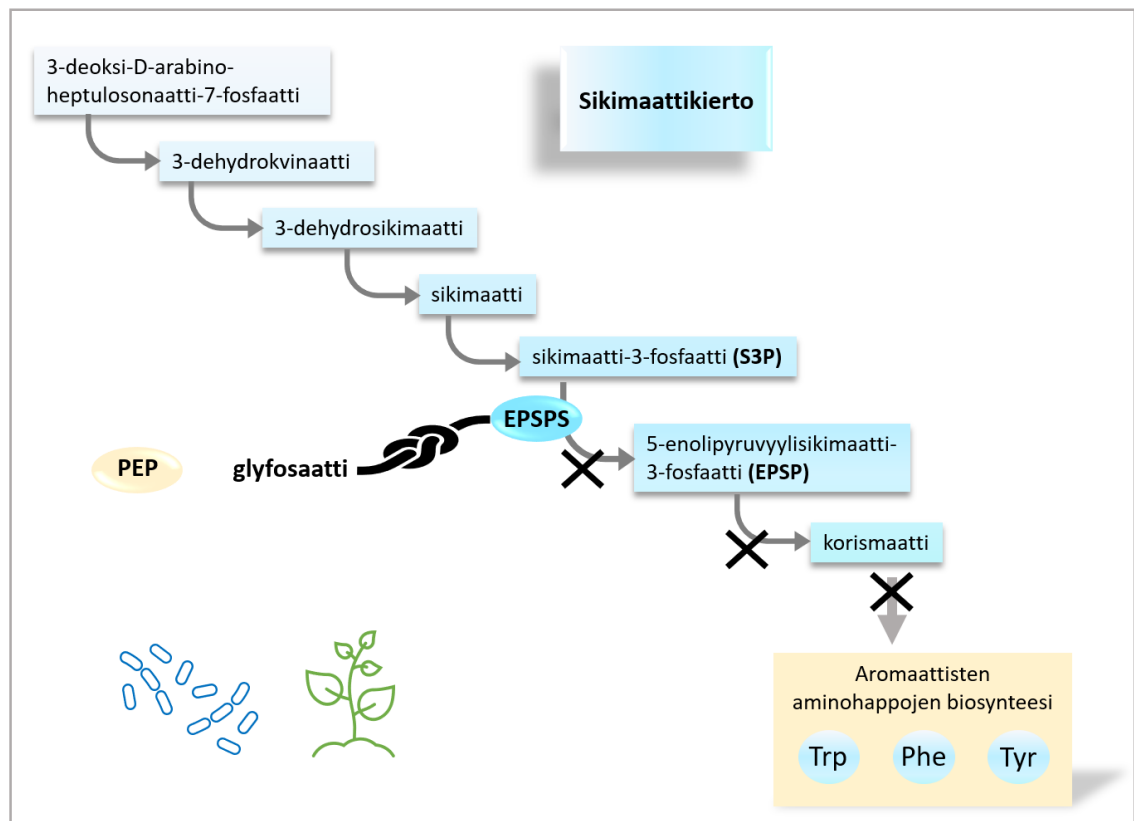
Tutkimusta glyfosaatin vaikutuksista ihmisen suolistomikrobistoon on kuitenkin tehty vain vähän – eritoten kokeellista tutkimusta. Eläinkokeet indikoivat, että glyfosaatti saattaa vaikuttaa ihmisen suolistomikrobiston koostumukseen, koska sillä voi olla

antibioottisen kaltaisia mikrobiston tasapainoa häiritseviä vaikutuksia. Koska glyfosaatti yhdistettynä dikarboksyylihappoihin voi estää myös joidenkin haitallisten mikro-organismien, mukaan lukien *Toxoplasma gondii* (aiheuttaa toksoplasmoosia) ja *Plasmodium falciparum* (aiheuttaa malariaa) -itiöeläimien tarvitsemien aminohappojen biosynteesin, sen on aiemmin ajateltu olevan myös potentiaalinen hoitokeino glyfosaattisensitiivisiä bakteereja vastaan (Richards ym., 2006; Abraham, 2010). Glyfosaatti onkin patentoitu antibioottina vuonna 2010 (Abraham, 2010).

Useissa tutkimuksissa on havaittu, että glyfosaattivalmisteet kuten Roundup® voivat olla pelkkää glyfosaattia haitallisempia eliöille (Clair ym., 2012; Nielsen ym., 2018). Kauppavalmisteet sisältävät ainesosia, joiden tehtävänä on esimerkiksi edistää glyfosaatin vesiliukoisuutta tai pienentää veden pintajännitystä. Näitä ainesosia kutsutaan surfaktanteiksi tai apuaineiksi. Esimerkiksi POEA on apuaine, joka lisää glyfosaatin absorboitumista kasvisoluihin ja joka on monissa yhteyksissä todettu itse glyfosaattia myrkyllisemmäksi mm. bakteereille (Williams ym., 2000; Van Bruggen ym., 2018; Meftaul ym., 2020). Lisäksi glyfosaatin hajoamistuote AMPA (aminometyyli-fosfonihappo) on toksinen yhdiste, joka yhdessä glyfosaatin kanssa voi säilyä maaperässä hajoamatta pitkäänkin etenkin pohjoisissa ekosysteemeissä (Helander ym., 2012; Van Bruggen ym., 2018; Meftaul ym., 2020). Hajoamaton glyfosaatti voi altistaa tulevat satokasvit jäämille maaperässä ja lisätä glyfosaatin huuhtoumaa vesistöihin, mikä lisää ihmisenkin riskiä altistua glyfosaatille (Helander ym., 2012).

1.3 EPSPS-entsyymi ja glyfosaatin toimintaperiaate

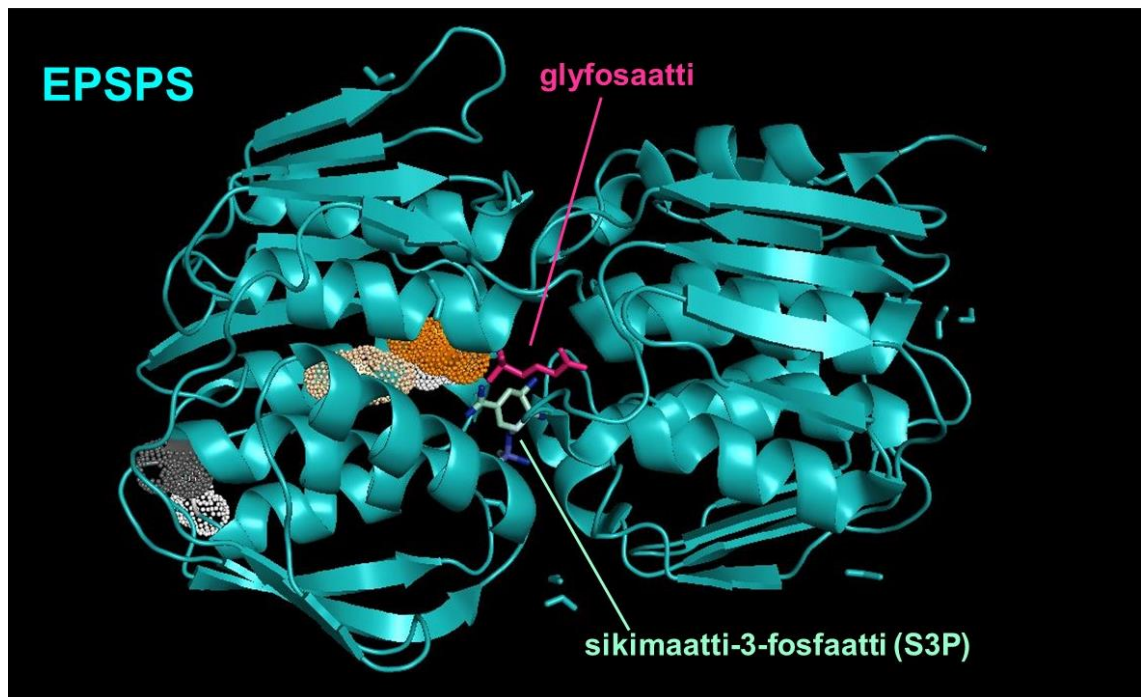
Glyfosaatin vuosikymmeniä kestänyt suursuosio kasvinsuojeluaineena perustuu siihen, että aine on edullista ja että sen tunnettu, sikimaattikiertoon liittyvä toimintamekanismi on tehokas ja spesifi (Heap & Duke, 2018). Käytännössä kaikilla kasveilla on sikimaattikierto, mutta sitä esiintyy myös bakteereilla, arkeoneilla, levillä, sienillä ja yksisoluisilla eukaryooteilla (Richards ym., 2006; Krüger ym., 2014). Sikimaattikierto on seitsenportainen metaboliaketju (kuva 2), jonka tarkoituksena on tuottaa korismaatista aromaattisia aminohappoja (tryptofaania, fenyylialaniinia ja tyrosiinia) sekä folaatteja, jotka ovat välttämättömiä ravintoaineita (Knaggs, 2001). Organismit, joilla ei ole sikimaattikiertoa, hankkivat nämä aminohapot ja ravintoaineet ravinnostaan (Nielsen ym., 2018).



Kuva 2. Kasveilla ja mikrobeilla esiintyvä sikimaattikierto, jonka seitsenportaisessa metaboliaketjussa muodostuu korismaattia. Korismaatti puolestaan on esiaste elintärkeiden aromaattisten aminohappojen tryptofaanin, fenyylialaniinin ja tyrosiinin biosynteesissä. Glyfosaatti katkaisee sikimaattikierron sitoutumalla EPSPS-entsyymiin PEP:n (fosfoenolpyruvaatti) tilalle. Tällöin kierron viimeiset vaiheet ja aminohapposynteesi estyvät.

EPSPS on entsyymi, jota sikimaattikierron organismit tuottavat katalysoimaan kierron toiseksi viimeistä vaihetta (Herrmann & Weaver, 1999). Entsyymi muodostuu kahdesta samankaltaisesta domeenista, joiden yhtymäkohdassa sijaitsee entsyymin aktiivinen keskus (Light ym., 2016). Aktiivisessa keskuksessa EPSPS muodostaa fosfoenolpyruvaatti-molekyylistä (PEP) ja sikimaatti-3-fosfaatti-molekyylistä (S3P) 5-enolipyruvylisikimaatti-3-fosfaattia (EPSP:tä) (Herrmann & Weaver, 1999).

Normaalisti PEP siis sitoutuksi EPSPS:ään ja S3P:hen, jotta entsyymi voi tuottaa EPSP:tä. Glyfosaattimolekyylillä kuitenkin sitoutuu PEP:n tilalle estäen näin EPSPS-entsyymin normaalin toiminnan (kuva 3) (Herrmann & Weaver, 1999; Light ym., 2016). Tämä johtaa korismaatin synteesin estymiseen, jolloin myös eliölle elintärkeät aromaattiset aminohapot ja folaatit jäävät muodostumatta (Helander ym., 2012; Light ym., 2016).



Kuva 3. *Escherichia coli* -bakteerin EPSP-syntaasin eli EPSPS:n 3D-mallinnos, jossa EPSPS:ään on sitoutunut glyfosaattimolekyyli PEP:n tilalle. Kyseinen EPSPS on glyfosaatille herkkä muoto. Kuvassa näkyvät myös aminohapot Gly96 (vaaleanharmaa lähellä keskusta), Thr97 (oranssi), Pro101 (beige), Gly137 (vaaleanharmaa ulkoreunalla) ja Ala183 (tummanharmaa), joiden mutaatiot voivat aiheuttaa vaihtelevan voimakasta glyfosaattiresistenssiä. Toteutin mallinnuksen PyMOL:lla käyttäen RCSB PDB:n lähdettä 1G6S (The PyMOL Molecular Graphics System).

EPSPS-entsyymistä tunnetaan kuitenkin useampia tyyppejä, joista osa on todistettusti glyfosaatille sietokykyisempiä. Usein tämä perustuu aminohappomuutosten myötä tapahtuvaan entsyymien PEP-affiniteetin kasvuun, jolloin glyfosaatin on hankalampi sitoutua PEP:n paikalle (Priestman ym., 2005; Light ym., 2016). Resistenssiä kasvattavia mutaatioita voi tapahtua aktiiviseen keskukseen kuuluvissa aminohapoissa (esimerkiksi kuvassa 3 näkyvät aminohapot) tai muualla entsyymissä (Sammons & Gaines, 2014). Epätoivotun glyfosaattiresistenssin yleistyminen rikkakasveilla onkin kasvava huolenaihe (Sammons & Gaines, 2014).

Erilaiset EPSPS-tyypit eroavat toisistaan biokemialtaan ja fylogeniaaltaan, ja ne on toistaiseksi jaoteltu neljään luokkaan: I (α ja β , jotka kuitenkin kirjallisuudessa yleisesti esitetään a:nä ja b:nä), II, III ja IV (Light ym., 2016; Firdous ym., 2018). On havaittu, että luokan I EPSPS on glyfosaatille sensitiivinen, kun muut taas ovat resistenttejä (Light ym., 2016; Firdous ym., 2018). Lähes kaikilla kasveilla, lukuun ottamatta resistentiksi geenimuunneltuja viljelykasveja, on luokan I EPSPS (Funke ym., 2006). Lisäksi EPSPS I -entsyymejä esiintyy bakteereilla, eukaryooteilla ja arkeoneilla. EPSPS II puolestaan esiintyy lähes yksinomaan prokaryooteilla (Light ym., 2016). Muiden EPSPS-luokkien

esiintyvyydestä eliökunnassa on vähemmän tietoa, sillä ne ovat harvinaisempia (Rainio ym., 2021).

1.4 EPSPS-luokan määrittely aktiivisen keskuksen aminohappojen perusteella

EPSPS-entsyymin aktiivisen keskuksen aminohappojen perusteella voidaan määritellä EPSPS:n luokitus, joka kertoo entsyymin glyfosaattisensitiivisyydestä. Aktiivinen keskus sisältää luokasta riippuen tietyt aminohapot tietyissä positioissa (ks. sinisellä merkityt aminohapot kuvassa 4).

Samankaltaisuutta kuvaavat värit:

HUONO KESKI HYVÄ

Aktiivisen keskuksen aminohappojen väritys:

vcEPSPS Luokka I : 87
cbEPSPS Luokka II : 85
bvEPSPS Luokka III : 86
sdEPSPS Luokka IV : 86
cons : 87

luokka Ia, luokka Ib, molemmat
luokka II
luokka III, 18 motiivia on korostettu
luokka IV

```
vcEPSPS LuokkaI MES----LTLO-PIELISGEVNLPGSKSVSNRALLLAALASGTTTLTNLLDSDDIRHMLNALT
cbEPSPS LuokkaII MDY----QT-I-PSQGLSGEICVPGDKSISHRAVLLAAIAEGQTOVDGFLMGADNLMVLSALQ
bvEPSPS LuokkaIII MMMGRAKLTIIPPGKPLTGRAMPPGSKSITNRALLLAGLAKGTSRLTGALKSDDTRYMAEALR
sdEPSPS LuokkaIV MP-----VADIPGSKSITARALFLAAAADGVTTLVRPLRSDDTEGFAGGLA
cons * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

vcEPSPS LuokkaI KLGVNRYLSADKTTCEVEGLGQAFHTTQPLELFLGNAGTAMRPLAALCLGQGDYVLTGEPRM
cbEPSPS LuokkaII QMGASIQVIEDENILVVEGVGMTGLQAPPEALDCGNSGTAIRLLSGLLAGQPFNTVLTGDSGL
bvEPSPS LuokkaIII AMGVTIDEPD-DTTFIVKSGKQLQP--PAAPFLFGNAGTATRFLTAALALVDGKVIIVDGDHMH
sdEPSPS LuokkaIV RLGYRVGRTP--DSWQVDGRPGQPA-VAEADVYCRDGATTARFLPTLAAAGHGTYRFDASEQM
cons : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

vcEPSPS LuokkaI KERPIGHLVDALRQAGAQIEYLEQENFPPLRIQGTGLQAG-TVTIDGSISSQFLTAFLMSAPL
cbEPSPS LuokkaII QRPMKRIIDPLTLMGAKIDS--TGNVPLKIYGNPRLTGIHYQL-PMASQAQVSKCLLLAGLY
bvEPSPS LuokkaIII RKRPIGLVDALRSLGIDASA--ETGCEPVFINGTGRFEASRVQIDGGLSSQYVSALLMMAAG
sdEPSPS LuokkaIV RRRPLPLTRALRELGVDLRHEERDGHPLTVRAAGV-AGGEVTLDAQSSQYLTALLLGLPL
cons : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

vcEPSPS LuokkaI AOGKVTIKIVGEL-VSKPYIDIHLHIMEQFGVQVINHDY-QEFVIPAGQSYVSPGQFLVLEGDA
cbEPSPS LuokkaII ARGKTCIT---E---PAPSRDHTERLLKHFHYTLQ-KDK-QSICVSGGKGL-KANDISIPGDI
bvEPSPS LuokkaIII GDRAVDVELLGEHLGALGYIDLTVAAAMRAFGAKVE-RVSPVAVRVEPTG-Y-HAADFVIEPDA
sdEPSPS LuokkaIV TEKGLRIHV-TDL-VSVPYIEITLAMMRAFGVEVT-REG-HDFVVPVPGG-Y-RATTYAIEPDA
cons : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

vcEPSPS LuokkaI SSASYFLAAAAIKGG-EVKVTGIGKNSIQGDIQFADALEKMGAEWGD-----DYVIA
cbEPSPS LuokkaII SAAAFFIIVAATITPGSAIRLCRVGNPT--RLGVINLLKMMGADIEVTHYTEKNEEPTADITV
bvEPSPS LuokkaIII SAATYLWAAEVLSSG-KIDLGTPAEQFSQPDAKAYDLISKFE-----
sdEPSPS LuokkaIV STSSYFFAAAALSGG-EVTVPGLGEGALQGDGLGFVDVLRMRMGAEVEIGA-----DRTTV
cons * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : :

vcEPSPS LuokkaI R-RGELNAVDLDFNHIP---DAAMTIATTALFAKGTTAIRNVYNWRVKETDRLAAMATELRKV
cbEPSPS LuokkaII R-HARLKGIDIPPDQVPLTIDFEPVLLIAAAVAQKTVLRDAAELRVKETDRIAMVDGLQKL
bvEPSPS LuokkaIII ---HLPV-IDSQMQ---DAIPTLAVLAAFNEMFVRVFGIENLRVKECDRIALSSGLSRI
sdEPSPS LuokkaIV RGTGELRGLTVNMRDIS---DTMPTLAAIAPFASGPFVRIEDVANTRVKECDRLCAENLRRL
cons : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : :

vcEPSPS LuokkaI G--ATVEEGEDFIVITPPT---KLIHAAIDTYDHRMAMCFSLVA-LSDTPVTINDPKCTSKT
cbEPSPS LuokkaII G--IAAESLPDGVIIQGG---TLEGGEVNSYDDHRIAMAFVAGTLAKGPFVIRNRCDNVKTS
bvEPSPS LuokkaIII VPNLGTPEGDDLIIASDPSLAGKILTAEIDSFADHRIAMSFALAG-LKIGGITIIDPCVAKT
sdEPSPS LuokkaIV G--VRVETGPDWIEIHPGA---TPTGAEIKTYGDHRIVMSFAVTG-LRVPGISFDDPGCVRKT
cons : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : :

vcEPSPS LuokkaI FPDYFDKFAQLSR-----
cbEPSPS LuokkaII FPNFVELANEVGMNVKGVGRGGF
bvEPSPS LuokkaIII FPSYWNVLSLGVAYED-----
sdEPSPS LuokkaIV FPGFHEEFGALRAR--L-----
cons * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : : * : : :
```

T-COFFEE, Version_11.00.d625267 (2016-01-11 15:25:41 - Revision d625267 - Build 507), SCORE=873.

Kuva 4. Monisekvenssilinjaus neljästä EPSPS-referenssisekvenssistä. Eri EPSPS-luokkien vertailusekvenssit ovat peräisin bakteereilta *Vibrio cholerae* (luokka Ia ja Ib), *Coxiella burnetii* (luokka II), *Brevundimonas vesicularis* (luokka III) ja *Streptomyces davawensis* (luokka IV). Aktiiviseen keskukseen kuuluvat aminohappopositiot on korostettu sinisillä kirjaimilla. Sekvenssien samankaltaisuutta kuvataan taustaväriyksellä, jossa punainen tarkoittaa suurta samankaltaisuutta, keltainen ja vihreä keskivertoa samankaltaisuutta ja sininen heikkoa samankaltaisuutta kaikkien sekvenssien välillä. '*' tarkoittaa täydellistä samankaltaisuutta. Ia ja Ib -luokkia ei ole verrattu toisiinsa, vaan niiden aktiivisiin keskuksiin kuuluvat aminohapot on eritelty sinisen eri sävyillä. Linjaustyökaluna käytin T-Coffee -ohjelmaa (Notredame ym., 2000; Di Tommaso ym., 2011).

Luokat Ia ja Ib ovat sekvensseiltään hyvin samankaltaiset, ja ne edustavat glyfosaatille herkkää EPSPS-muotoa. Ib:n aktiivisessa keskuksessa on ainoastaan 2 aminohappoa, joita ei Ia:sta löydy, kun taas Ia:lla on 9 ikiomaa aminohappoa (kuva 4). Luokkaan II kuuluva EPSPS puolestaan on glyfosaatille resistentti, sillä sen aktiivisessa keskuksessa on I-tyyppiä suurempi PEP-affiniteetti, mikä sallii sikimaattikierron jatkumisen, kun PEP:n sitoutuu entsyymiin normaalisti (Light ym., 2016). EPSPS:ää koodaavassa *AroA*-geenissä I ja II -luokkien välinen samankaltaisuus on vain alle 30 %:n (Light ym., 2016; Firdous ym., 2018).

III-luokan EPSPS-sekvenssi puolestaan sisältää 18 tiettyä aminohappoketjun osaa, motiivia, joista yhdenkin läsnä ollessa EPSPS:n glyfosaattiresistenssi kasvaa (Carozzi & Hammer, 2010). Vaikutus eri organismien resistenssiin on todennettu geeninsiirroilla (Carozzi & Hammer, 2010). EPSPS IV on tuorein EPSPS-luokitus, joka eroaa edellisistä sekä aminohapposekvenssiltään että sekundaari- ja tertiäärirakenteeltaan (Lira ym., 2013). EPSPS IV on löydetty esimerkiksi joiltakin *Streptomyces*-suvun bakteereilta, ja kyseisen geenimuodon siirto glyfosaattiresistentistä bakteerista kasviin saa kasvissa aikaan glyfosaattiresistenssiä (Griffin ym., 2021).

Sikimaattikierron ja siihen liittyvän EPSP-syntaasin koodaus ovat tärkeitä organismin selviytymiseen vaikuttavia ominaisuuksia, jotka ovat bakteerien genomissa verrattain konservoituneita (Mesnage & Antoniou, 2020; Rainio ym., 2021). Vaikka eri EPSPS-luokkien sekvenssit paikoitellen eroavat toisistaan paljonkin, niiden aktiivinen keskus on muita osia konservoituneempi (kuvassa 4 punaiset alueet) (Rainio ym., 2021). EPSPS:n suorittamat toiminnot säilyvät siis pääasiassa muuttumattomana huolimatta eri luokkiin kuuluvien sekvenssien eroavaisuuksista, mikäli glyfosaattia ei ole läsnä.

1.5 Tutkimuksen tavoitteet ja hypoteesit

Glyfosaatin vaikutusta ihmisen suolistomikrobistoon on toistaiseksi tutkittu hyvin vähän. Tämän tutkielman tavoite on selvittää sekä bioinformatiikkaa apuna käyttäen että kokeellisesti laboratoriossa ihmisen suolistossa yleisesti esiintyvien bakteerilajien glyfosaattiherkkyyttä ja pohtia glyfosaatin vaikutuksia suoliston mikrobistoon ja ihmisen terveyteen. Tietokannoista löytyvät tiedot bakteerin EPSPS-proteiinin aminohapposekvenssistä antavat teoreettista taustaa ja hypoteesin lajin glyfosaatinsietokyvystä. Laboratoriokokeilla puolestaan voidaan testata erilaisia

glyfosaattivalmisteita eri pitoisuuksilla ja näin selvittää bakteerien käytännön glyfosaatinsietokykyä, johon muillakin kuin EPSPS:ään liittyvillä mekanismeilla voi olla vaikutusta. Laajojen bakteereilla tehtyjen glyfosaattikokeiden yhteydessä on toistaiseksi vain harvoin ilmoitettu bakteerien EPSPS-luokitusta. EPSPS-sekvenssin luokan selvittäminen auttaa hahmottamaan entsyymien merkitystä organismien glyfosaattiherkkyyden kannalta. Glyfosaatin kauppavalmisteet vastaavat eliöiden todellista altistumista puhdasta glyfosaattia paremmin, minkä vuoksi myös niiden vaikutusta on tärkeää testata.

Tutkimushypoteesini ovat seuraavat: tietokannoista haetut EPSPS-sekvenssit ja niihin perustuva ennuste bakteerilajien glyfosaatinsiedosta on yhteneväinen laboratoriokokeiden tulosten kanssa. Glyfosaatti vaikuttaa in vitro -kokeissa negatiivisesti kasvuun niillä bakteerilajeilla, joilla genomien perusteella on todettukin olevan glyfosaattialtis luokan I EPSPS. Vastaavasti muita EPSPS-luokkia omaavat bakteerit ovat glyfosaatille hyvin sietokykyisiä. Eri glyfosaattivalmisteet (puhdas glyfosaatti ja Roundup Flex) vaikuttanevat bakteerien vasteeseen eri tavoin ainesisällöstä johtuen. Bioinformatiivisen aineiston tarkastelussa on odotettavissa, että osa ihmisen suolistossa esiintyvistä bakteereista on EPSPS-sekvenssiltään glyfosaattiherkkiä ja osa resistenttejä. Lajinsisäistä vaihtelua EPSPS-luokituksessa eri bakteerikantojen välillä saattaa esiintyä, mutta enimmäkseen EPSPS:t muistuttanevat toisiaan samaan lajiin kuuluvien bakteerikantojen kesken.

Mikäli bakteerilajien glyfosaatinsietokyvyssä ilmenee eroja, on mahdollista, että ravinnon mukana elimistöön kulkeutuva glyfosaatti vaikuttaa ihmisen suolistomikrobiston monimuotoisuuteen ja valtasuhteisiin antamalla etulyöntiaseman sietokykyisemmille bakteerikannoille. Erityisen haitallisia terveysvaikutuksia voisi aiheutua sietokykyisistä haitallisista bakteereista (kuten *Salmonella*-patogeenit) tai sensitiivisistä hyödyllisistä bakteereista (kuten *Bifidobacterium*-probiootit). Näitä mahdollisuuksia pyrin selvittämään käyttämällä hyväksi mm. uutta EPSPS-luokituksen määrittämiseen soveltuvaa bioinformatiikkatyökalua. Tutkielma lisää tietoa glyfosaattialtistuksen merkityksestä mikrobiyhteisöille ja ihmisen terveydelle.

2. Aineisto ja menetelmät

2.1 Bioinformatiivisen aineiston keruu

Etsin suolistossa esiintyvien bakteerien EPSPS-proteiinisekvenssejä National Center for Biotechnology Information (NCBI) Protein Blastin (NCBI Protein, 2004) avulla hakemalla läheisiä vastaavuuksia referenssi-vcEPSPS-sekvenssille (*Vibrio cholerae* serotype O1, ks. taulukko 1). Tuhansista löytämistäni sekvensseistä tutkielman aineistoon pääsivät mukaan vain ne, joiden EPSPS-sekvenssi löytyi kokonaisena ja laji- tai kantatasolla tunnistettuna NCBI Protein -tietokannasta. Lopullinen aineisto sisältää bakteerikantojen EPSPS-sekvenssejä yhteensä 890 kappaletta 101 bakteerilajilta. Lähteenä näille etsimilleni suolistobakteereille toimi paljon siteerattu, Nature-julkaisusarjassa julkaistu Qinin ym. tutkimus (2010), joka käsittelee mm. suoliston bakteerilajistoa ja lajien genomien osuuksia, toisin sanoen runsautta suolistossa. Tutkimuksen lisämateriaalitaulukoissa 5, 8 ja 12 listataan yleisiä suolistomikrobilajeja ja -kantoja.

Lisäksi hain NCBI Protein -tietokannasta laboratoriossa testaamieni kantojen (*Escherichia coli* IHE3034, *Salmonella enterica* SL1344, *Shigella flexneri* M90T, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ja *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) EPSPS-proteiinisekvenssit ja luokittelin ne.

Eri EPSPS-luokille on aiemmin määritetty referenssisekvenssit bakteereilta *Vibrio cholerae* (luokka Ia ja Ib) (Light ym., 2016; Firdous ym., 2018), *Coxiella burnetii* (luokka II) (Priestman ym., 2005; Light ym., 2016), *Brevundimonas vesicularis* (luokka III) (Carozzi & Hammer, 2010) ja *Streptomyces davawensis* (luokka IV) (Lira ym., 2013). Nämä sekvenssit on jo aiemmin luokiteltu, ja toimivat siksi tässä tutkielmassa vertailukohtina EPSPS-luokan määrittämisessä muilla mikrobeilla (taulukko 1). Merkityksellisiä määrittämisessä ovat nimenomaan kuvassa 4 näkyvät aktiiviseen keskukseen kuuluvat aminohapot.

Taulukko 1. EPSPS-entsyymien referenssisekvenssit ja herkkyys glyfosaatille.

Luokka ja glyfosaatinsieto	EPSPS:n referenssi-aminohapposekvenssit
I a/b sensitiivinen	“vcEPSPS” <i>Vibrio cholerae</i> serotype O1 (kanta ATCC 39315 / El Tor Inaba N16961) MESLTLQPIELISGEVNLPGSKSVSNRALLAALASGTTTRLTNLLSDDIRHMLNATKLGVNYR LSADKTTCEVEGLGQAFHTTQPLELFLGNAGTAMRPLAAALCLGQGDYVLTGEPKMERPIGH LVDALRQAGAQIEYLEQENFPPLRIQGTGLQAGTVTIDGSISSQFLTAFLMSAPLAQGGKVTIKIVG ELVSKPYIDITLHIMEQFGVQVINHDYQEFVIPAGQSYVSPGQFLVEGDASSASYFLAAAAIKGG EVKVTGIGKNSIQGDIQFADALEKMGAQIEWGDDYVIARRGELNAVDLDFNHIPDAAMTIATT ALFAKGTTAIRNVYNWRVKETDRLAAMATELRKVGATVEEGEDFIVITPPTKLIHAAIDTYDDH RMAMCFSLVALSDTPVTINDPKCTSKTFPDYFDKFAQLSR
II resistentti	“cbEPSPS” <i>Coxiella burnetii</i> (kanta RSA 493 / Nine Mile phase I) MDYQTIPSQGLSGEICVPGDKSISHRAVLLAAIAEGQTQVDGFLMGADNLAMVSALQQMGASI QVIEDENILVVEGVGMTGLQAPPEALDCGNSGTAIRLLSGLLAGQPFNTVLTGDSLLQRRPMKR IIDPLTLMGAKIDSTGNVPPLKIYGNPRLTGHIYQLPMASAVKSCLLLAGLYARGKTCITEPAPS RDHTELLKHFFHYTLQKDKQSCVSGGGKLLKANDISIPGDISSAAFFIVAATITPGSAIRLCRVGV NPTRLGVINLLKMMGADIEVTHYTEKNEPTADITVRHARLKGIDIPDQVPLTIDEFPVLLIAAA VAQGGKTVLRDAAELRVKETDRIAAMVDGLQKLGAESLPDGVIIQGGTLEGGEVNSYDDHRI AMAFVAVAGTLAKGPVRIKCDNVKTSFPNFVELANEVGMNVKGVRRGGF
III resistentti	“bvEPSPS” <i>Brevundimonas vesicularis</i> MMMGRAKLTIIPPGKPLTGRAMPPGSKSITNRALLAGLAKGTSRLTGALKSDDTRYMAEALR AMGVTIDEPDDTTFIVKSGGKLQPPAAPLFLGNAGTATRFLTAAALVDGKVVDGDAHMRKR PIGPLVDALRSLGIDASAETGCPVVTINGTGRFEASRVQIDGGLSSQYVSALLMMAAGGDRAVD VELLGEHIGALGYIDLTVAMRAFGAKVERVSPVAVRVEPTGYHAADFVIEPDASAATYLWA AEVLSGGKIDLGTPAEQFSQPDAAKAYDLISKFPHLPAVIDGSQMADAIPTLAVLAAFNEMPVRF VGIENLRVKECDRIRALSSGLSRVNPNGTEEGDDLIASDPSLAGKILTAEIDSFADHRIAMSFAL AGLKIGGITILDPDCVAKTFPSYWNVLSSLGVAYED
IV resistentti	“sdEPSPS” <i>Streptomyces davawensis</i> JCM 4913 MPVADIPGSKSITARALFLAAAADGVTTLVRLSRDDTEGFAEGLARLGYRVGRTPDSWQVDG RPQGPAAVAEADVYCRDGATTARFLPTLAAAAGHGTYRFDASEQMRRRPLPLTRALRELGVDLR HEERDGHHLTVRAAGVAGGEVTLDAQSSQYLTALLLGLTEKGLRIHVTDLVSVPIEITL AMMRAFGVEVTREGHDFVVPGGYRATTYAIEPDASTSSYFAAAAALSGGEVTVPGLGEGALQ GDLGFVDVLRMGAEVEIGADRTTVRGTELGRLTVNMRDISDTMPTLAAIAPFASGPVRIEDV ANTRVKECDRLEACAENLRRLGVRVETGPDWIEIHPGATPTGAIEIKTYGDHRIVMSFAVTGLRV PGISFDDPGCVRKTFPGFHEEFALRLR

Kun olin löytänyt halutun suolistobakteerin EPSPS-sekvenssin tietokannasta, vertailin linjaamalla kyseisen EPSPS-sekvenssin sekä referenssi-EPSPS-sekvenssien (I-luokan vcEPSPS, II-luokan cbEPSPS, III-luokan bvEPSPS ja IV-luokan sdEPSPS) aktiivisten keskusten samankaltaisuutta. Sekvenssien vertailun tein Pere Puigbón ohjelmoiman bioinformatiikkatyökalun (EPSPSClass) avulla (vapaasti saatavilla osoitteessa <http://ppuigbo.me/programs/EPSPSClass/>) (Leino ym., 2021). Palvelin ilmoittaa näiden viiden sekvenssin monilinjauksen perusteella, minkä referenssisekvenssin kanssa

bakteerin EPSPS:n aktiiviseen keskukseen kuuluvat aminohapot (merkitty kuvassa 4) ovat identtiset (tai III-luokan tapauksessa montako 18 motiivista on läsnä) – eli mitä EPSPS-luokkaa juuri tarkasteltu organismi edustaa.

Keräämäni bioinformatiivinen aineisto koostuu kolmesta osasta, joita tarkastelin erikseen ja yhdessä. Pienin osa-aineisto koostuu Qinin ym. (2010) tutkimuksen lisämateriaalitaulukosta 8, jossa luetellaan 75 yleisintä suolistobakteerilajia tai -kanta ja niiden runsaus suolistossa 124 koehenkilöllä. Bakteerien runsaus on ilmoitettu >1 % genomien kattavuutena tietyllä määrällä ihmisiä (kuitenkin yli puolella koehenkilöistä) ja >10 % genomien kattavuutena tietyllä määrällä ihmisiä (vähintään yhdellä koehenkilöistä). Toiseksi pienin osa-aineisto sisällyttää edellä mainitun taulukon lisäksi Qinin ym. lisämateriaalitaulukot 5 ja 12, joissa myös listataan yleisiä suolistomikrobeja laji- ja kantatasolla (ks. liite 1). Näiden bakteerien yleisyyttä ei kuitenkaan ole tarkemmin määritetty. Suurin aineistokokonaisuus sisältää kaiken edellä mainitun lisäksi muita NCBI Protein -tietokannasta löytyviä EPSPS-sekvenssejä Qinin ym. tutkimuksessa mainituilta lajeilta, mikä on hyödyllistä lajinsisäisen vaihtelun tarkastelussa.

2.2 Laboratoriokokeet

2.2.1 Koeorganismit

Tutkimuksen empiirisessä osiossa altistin eri bakteerilajien kantoja puhdasviljelminä glyfosaatille. Kahden pilottikokeen jälkeen käsittelin viittä eri bakteerikantaa (*Escherichia coli* IHE3034, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovari Typhimurium SL1344, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ja *Shigella flexneri* M90T) kahdella eri glyfosaattituotteella: puhtaalla glyfosaatilla (Glyphosate PESTANAL[®], analytical standard 45521; puhtaus ≥98,0 %; valmistuserä BCBW9283; Sigma-Aldrich) ja Monsanto-yhtymän valmistamalla Roundup Flexillä (480 g/l glyfosaatin kaliumsuolana; valmistuserän numero ja valmistuspäivä AXG042311 103213035, 5.7.2017).

Tutkimukseen pyrin valitsemaan ihmisen suolistossa esiintyviä bakteerikantoja, jotka sisältävät bioinformatiivisen analyysin perusteella EPSPS-sekvenssiltään sekä glyfosaatille sensitiivisiä että resistenttejä bakteereja (ks. tulokset). Bakteereista *S. aureus* tosin ei ole pääasiallisesti suolistobakteeri, mutta kantajuutta esiintyy (Acton ym., 2009).

Bakteerikantojen tuli olla myös helposti viljeltävissä tietyillä resursseilla: esimerkiksi suolistossa yleisenä esiintyviä, hapettomia olosuhteita vaativia kantoja ei voitu käyttää.

Escherichia coli on gramnegatiivinen proteobakteerien pääjaksoon kuuluva laji, jonka kanta IHE3034 (toiselta nimeltään O18:K1:H7) on eristetty Suomessa vuonna 1976 ihmisen ruuansulatuskanavasta (Nordberg ym., 2014). Kyseinen kanta on myös yhdistetty vastasyntyneiden aivokalvontulehdukseen (Nordberg ym., 2014). *E. coli* IHE3034:ää viljellään aerobisissa olosuhteissa BSL-1 (turvataso 1) -vaatimukset täyttävissä työtiloissa. *E. coli* on normaaliflooraan kuuluva erittäin yleinen laji ihmisen suolistossa, mutta aiheuttaa suoliston ulkopuolella esimerkiksi suurimman osan tavallisista virtsatietulehduksista (Mueller & Tainter, 2021).

Salmonella enterica ssp. *enterica* serovari Typhimurium SL1344 on gramnegatiivinen, proteobakteereihin kuuluva ihmiselle patogeeninen bakteerikanta (Nordberg ym., 2014). Se on yhdistetty ruokamyrkytyksiin, gastroenteriittiin (maha-suolitulehdus) sekä salmonelloosiin (Nordberg ym., 2014). Kanta SL1344 on aerobinen ja helposti viljeltävä, ja sen käsittelyyn vaaditaan BSL-2-työtilat.

Enterococcus faecalis (Andrewes ja Horder) Schleifer ja Kilpper-Balz, ATCC 29212™ on eristetty ihmisen virtsasta Yhdysvalloissa. Se on grampositiivinen firmikuutteihin kuuluva bakteeri, jota viljellään BSL-2-laboratoriossa (Nordberg ym., 2014; ATCC, 2021a). *E. faecalis* on limakalvojen ja suoliston yleistä normaaliflooraa, mutta voi aiheuttaa mm. virtsatieinfektioita vastustuskyvyltään heikoille ihmisille (Duodecim Terveyskirjasto, 2016b).

Staphylococcus aureus ssp. *aureus* Rosenbach 29213™ on eristetty Yhdysvaltojen Kansasissa ihmisen ihon haavaumakohdasta. Se on aerobinen, firmikuutteihin kuuluva BSL-2-tason bakteeri, jota käytetään hyväksi muun muassa lääkekehityksessä (ATCC, 2021b). *S. aureus* on grampositiivinen laji, joka kuuluu normaaliflooraan terveellä iholla ja hengitysteiden limakalvoilla (Taylor & Unakal, 2021), mutta löytyy lisäksi noin 20 %:lla ihmisistä myös suolistosta (Acton ym., 2009). Patogeenina se aiheuttaa pääasiassa ihoinfektioita, ja verenkiertoon tai kudoksiin päästessään vakaviakin infektioita (Taylor & Unakal, 2021). Hoito on usein vaikeaa antibioottiresistenssin (mm. MRSA) kehittymisen vuoksi (Taylor & Unakal, 2021).

Shigella flexneri M90T on proteobakteereihin kuuluva gramnegatiivinen, patogeeninen bakteeri, jonka viljelyyn vaaditaan BSL-2-tilat (Molinaro ym., 2008). *S. flexneri* aiheuttaa shigelloosia eli bakteeripunatautia, jossa suolistotulehduksen vakavuus vaihtelee lievistä

vatsakivuista jopa kuolemaan (Molinaro ym., 2008; Duodecim Terveyskirjasto, 2016a). Myös *Shigella* on patogeenina haasteellinen antibioottiresistenssitaiipumuksen vuoksi (Molinaro ym., 2008).

2.2.2 Viljelymenetelmät

Esikasvatusta varten valmistin kaikille bakteereille agar-alustat: *E. coli* ja *S. enterica* -kannoille Luria-Bertani-agar (Cold Spring Harbor Protocols, 2006b) sekä *E. faecalis*, *S. aureus* ja *S. flexneri* -kantoja varten Sigma-Aldrichin mikrobiologisesti testattu Nutrient Broth N7519 -jauhe (NB), jota lisäsin veteen 8 g/l (agar-jauhetta 15 g/l). Elatusaineet autoklavoitiin (120 °C, 1 bar, 20 min) ennen steriileille petrimaljoille kaatamista.

Sivelin pakastimessa (-80 °C) säilytetyistä bakteeristokeista bakteeristoa agar-petrimaljoille ja inkuboin bakteereja noin 12 h (37 °C), kunnes pesäkkeet olivat silmämääräisesti selkeästi havaittavia (kuva 5). Valmistin *E. coli* ja *S. enterica* -kantoja varten nestemäisen LB-elatusaineen (Cold Spring Harbor Protocols, 2006a) ja *E. faecalis*, *S. aureus* ja *S. flexneri* -kantoja varten nestemäisen NB-elatusaineen (NB-jauhetta 8 g/l).



Kuva 5. Bakteerien esikasvatus pesäkkeiksi NB- ja LB-agar-mediumissa. Vasemman reunan *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri* ja *Enterococcus faecalis* kasvoivat NB-elatusaineessa, oikean reunan *Salmonella enterica* ja *Escherichia coli* puolestaan LB:ssä. Lajien välillä oli eroja kasvun voimakkuudessa.

Poimin petrimaljalta yksittäisen pesäkkeen koeputkeen, jossa oli 5 ml nestemäistä LB:tä tai NB:tä ja korkki, jonka kautta happi pääsee kulkemaan. Tämä bakteerisuspensio inkuboitui ravistelijassa (*E. coli* ja *S. enterica* 37 °C, 250 rpm; muut 37 °C, 200 rpm) noin 15 tuntia, kunnes elatusaine oli selvästi samentunut bakteerien kasvusta. Täyteen kasvaneesta bakteerisuspensiosta tein nuorennokset, eli laimensin suspensiota uudella LB- tai NB-mediumilla 1:200 (*E. faecalis* ja *S. flexneri* 1:150) uusiin, lopullisiin koeyksiköihin.

Liuotin puhtaan glyfosaattijauheen steriiliin Milli-Q® veteen (10 mg/ml). Roundup Flexistä, 480 mg/ml, laimensin vesiliuokset, joiden pitoisuudet olivat 115 (*E. coli* ja *S. enterica*) ja 112 mg/ml (=glyfosaattistokkiliuokset, ks. taulukko 2). Tämän eroavaisuuden vuoksi lopulliset *E. coli* ja *S. enterica* -kantojen käsittelypitoisuudet erosivat hieman muista bakteereista Roundup Flex -kokeissa. Pipetoin koeputkiin tuoreeseen 3 ml:n bakteerisuspensioon kutakin glyfosaattiliuosta ja Milli-Q® vettä niin, että taulukossa 2 mainitut glyfosaattipitoisuudet toteutuivat ja käsittelynesteen (vesi ja glyfosaattistokkiliuos) kokonaistilavuus pysyi aina samana (puhdas glyfosaatti+vesi=0,36 ml nestettä; Roundup Flex+vesi=0,25 ml nestettä). Milli-Q® vesi toimi siis kontrollina siten, että esimerkiksi kokeen 0-pitoisuudessa käsittelynesteen kokonaistilavuus koostui aina pelkästä vedestä, kun taas suurimmassa pitoisuudessa se koostui aina pelkästä glyfosaattistokkiliuoksesta. Steriloin kaikki glyfosaattiliuokset ennen käyttöä suodattamalla ne 0,20 µm filtlerin läpi.

Glyfosaattipitoisuudet mukailevat aiemmassa Shehatan ym. (2013) tutkimuksessa käytettyjä pitoisuuksia. Puhtaan glyfosaatin kokeissa oli neljä käsittelypitoisuutta ja Roundup Flex -kokeissa kuusi, sillä heikon vesiliukoisuuden (enintään 12 g/l) vuoksi puhtaalla glyfosaatilla ei pääse yhtä vahvoihin pitoisuuksiin kuin Roundupilla. Toistoja (replikaatteja) oli useimmiten neljä. Kolmen replikaatin tapauksissa jokin koeyksikkö oli poistettava luotettavuuden varmistamiseksi, mutta triplikaatitkin ovat aiemmissa tutkimuksissa olleet toimiva replikaattimäärä (Shehata ym., 2013; Bote ym., 2019; Pöppe ym., 2019). Mittauskertoja oli kahdesta kolmeen (ks. taulukko 2).

Taulukko 2. Koasetelma viidellä bakterikannalla ja kahdella glyfosaattivalmisteella. Eri glyfosaattipitoisuuksilla määritettiin sitä, millä vahvuuksilla glyfosaatti aiheuttaa havaittavia vaikutuksia bakteerien kasvuun.

	<i>Escherichia coli</i> IHE3034		<i>Salmonella enterica</i> SL1344	
Glyfosaattivalmiste	Puhdas glyfosaatti	Roundup Flex 480 g/l	Puhdas glyfosaatti	Roundup Flex 480 g/l
Glyfosaattistokkiliuoksen pitoisuus	10 mg/ml	115 mg/ml	10 mg/ml	115 mg/ml
Glyfosaattipitoisuudet (mg/ml) × replikaattien määrä	0 × 4 0,07 × 4 0,27 × 4 1,07 × 4	0 × 4 0,07 × 4 0,28 × 4 1,10 × 4 4,42 × 4 8,85 × 4	0 × 4 0,07 × 4 0,27 × 3 1,07 × 3	0 × 4 0,07 × 4 0,28 × 4 1,10 × 4 4,42 × 4 8,85 × 4
Mittausajankohdat (tuntia käsittelystä)	5 h 9,5 h	5,5 h 11 h 23 h	4,5 h 9,5 h	5 h 10,5 h 22,5 h
	<i>Shigella flexneri</i> M90T		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	
Glyfosaattivalmiste	Puhdas glyfosaatti	Roundup Flex 480 g/l	Puhdas glyfosaatti	Roundup Flex 480 g/l
Glyfosaattistokkiliuoksen pitoisuus	10 mg/ml	112 mg/ml	10 mg/ml	112 mg/ml
Glyfosaattipitoisuudet (mg/ml) × replikaattien määrä	0 × 4 0,07 × 4 0,27 × 4 1,07 × 4	0 × 4 0,07 × 4 0,28 × 4 1,07 × 4 4,31 × 3 8,62 × 4	0 × 4 0,07 × 4 0,27 × 4 1,07 × 4	0 × 4 0,07 × 4 0,28 × 4 1,07 × 4 4,31 × 4 8,62 × 4
Mittausajankohdat (tuntia käsittelystä)	5,5 h 9,5 h 22 h	5,5 h 9,5 h 22 h	5,5 h 9,5 h 22 h	5,5 h 9,5 h 22 h
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212			
Glyfosaattivalmiste	Puhdas glyfosaatti	Roundup Flex 480 g/l		
Glyfosaattistokkiliuoksen pitoisuus	10 mg/ml	112 mg/ml		
Glyfosaattipitoisuudet (mg/ml) × replikaattien määrä	0 × 4 0,07 × 4 0,27 × 4 1,07 × 4	0 × 4 0,07 × 4 0,28 × 4 1,07 × 4 4,31 × 3 8,62 × 4		
Mittausajankohdat (tuntia käsittelystä)	5 h 9 h 22 h	5 h 9 h 22 h		

Satunnaistin bakteeri-koeyksiköt ravistelevaan inkubaattoriin (*E. coli* ja *S. enterica*: 37 °C, 250 rpm; *E. faecalis*, *S. aureus* ja *S. flexneri*: 37 °C, 200 rpm) (kuva 6) ja otin suspensioista näytteitä mittauksia varten eri aikaväleihin: noin 5, 10 ja 22 tunnin päästä käsittelystä (taulukko 2). Mittausajankohdat vaihtelevat hieman käytännöllisistä syistä.



Kuva 6. Bakteeriviljelyvälineitä. Ylhäällä: bakteerisuspensioputkia ja LB-elatusainetta laminaarikaapissa sekä puhtaan glyfosaatin punnitusta. Alhaalla: bakteerisuspensiot ravistelevassa inkubaattorissa.

Seurasin bakteerien kasvua spektrofotometrillä (Odror Shimadzu, UV-1280, UV-VIS spectrophotometer, OD₆₀₀), jonka nollasin puhdasta LB:tä tai NB:tä sisältävällä kyvetillä (kuva 7). Spektrofotometri kertoo näytteen absorbanssin, ja nollaus poisti lukemista itse elatusaineen absorbanssin. Jokaisena mittausajankohtana otin koeyksiköistä 1 ml näytettä mitattavaksi ja panin koeyksiköt takaisin inkubaattoriin odottamaan seuraavaa mittauskertaa. Tein jokaisesta näytteestä kaksi absorbanssimittausta jokaisessa aikapisteessä ja käytin niiden keskiarvoa tilastoanalyysissä.



Kuva 7. Mittasin bakteerisuspensioiden absorbanssin spektrofotometrillä. Spektrofotometri kertoo näytteen absorbanssin valitulla aallonpituudella: mitä suurempi absorbanssi, sitä tiheämpi bakteerikasvusto.

2.3 Tilastolliset menetelmät

2.3.1 Bioinformatiikkaosion tilastolliset menetelmät

Koko bioinformatiivisen aineiston tarkastelu tapahtui selkeyden vuoksi lajitasolla. Jaoin lajit seitsemään luokkaan niiden sisältämien bakteerikantojen EPSPS:n perusteella: luokkiin I, II, III, luokittelemattomiin tai näissä esiintyviin yhdistelmiin. Lajitasolle määritettyinä lajeja oli 101. Näiltä lajeilta analysoin yhteensä 890 sekvenssiä.

Qinin ym. (2010) lisämateriaalitulokosta 8 laskimme mediaaniarvion taulukon sisältämien yleisimpien suolistobakteerien osuudesta suolistossa eri glyfosaatinsietoluokille (bakteerilajien genominen kattavuus suolistomikrobistosta koehenkilöillä >1 % – >10 %). Oletimme laskutoimituksissa, että ihmisen suolistomikrobisto sisältää kokonaisuudessaan noin 160 lajia (Qin ym., 2010).

Bioinformatiivisen aineiston käsittelyyn ja prosentuaalisten osuuksien laskemiseen käytin Exceliä.

2.3.2 Laboratoriokokeiden tilastolliset menetelmät

Analysoin bakteeriviljelyaineistoa käyttäen SAS Enterprise Guide 7.1 -tilasto-ohjelman GLIMMIX-proseduuria toistetuille mittauksille (ks. liite 2). GLIMMIX pystyy käsittelemään useita jakaumia, mutta näissä analyyseissä absorbanssien residuaalit olivat riittävän normaalijakautuneet Gaussin jakaumaoletuksen käyttämiseksi (visuaalinen tarkastelu). Homoskedastisuuden tarkastelu osoitti, että hajonnat pitoisuusluokkien välillä olivat tarpeeksi yhtäsuuret – joskin *E. coli* -kannan absorbanssien hajonta Roundup Flex -kokeen viimeisessä mittauspisteessä oli hieman suurempaa kuin muissa mittauspisteissä. Log10-muunnos aineistoille ei olennaisilta osiltaan vaikuttanut tuloksiin, joten pitäydyin muuntamattomassa aineistossa.

Mallin selittävät muuttujat ovat luokkamuuttujia: käsittelyryhmä (eli glyfosaattipitoisuus) sekä mittaushetki, joita on puhtaan glyfosaatin kokeissa kahdesta kolmeen ja Roundup Flex -kokeissa kolme. Aika ei ollut jatkuva muuttuja, sillä absorbanssin jatkuva mittaus ei ollut mahdollista. Mittaushetki on mallissa toistotekijä, sillä se luokittelee toistuvia mittauskertoja samoille koeyksiköille. Vastemuuttujana on absorbanssi – jatkuva muuttuja, joka kuvaa bakteerien kasvun määrää. Analyyseissa tutkittiin ennen kaikkea pitoisuuden ja mittaushetken yhdysvaikutusta (satunnaistekijää) absorbanssiin, eli käytännössä sitä, miten glyfosaattipitoisuuden suuruus vaikuttaa bakteerien kasvuun aikaa myöden.

Toistomittausten välisen varianssi-kovarianssirakenteen eli korrelaatorakenteen määrittämiseksi testasin erilaisia malleja, ja päädyin käyttämään rakenteita AR(1) (*S. enterica* ja *S. flexneri* puhtaalla glyfosaatilla sekä *S. flexneri* Roundup Flexillä), ARH(1) (*E. coli* ja *S. enterica* Roundup Flexillä ja *E. coli* puhtaalla glyfosaatilla), ANTE(1) (*S. aureus* puhtaalla glyfosaatilla), CSH (*S. aureus* Roundup Flexillä) ja CS (*E. faecalis* puhtaalla glyfosaatilla ja Roundup Flexillä). Testatut rakenteet ja niiden tuottamat AICc-arvot on taulukoitu liitteessä 3.

Mainitut rakenteet valitsin parsimoniaperiaatteen mukaisesti niin, että tietyllä rakenteella analyysistä saatu AICc-arvo (Akaike's Information Criterion:n pienehköille aineistoille muunnettu muoto) oli testatuista vaihtoehdoista paras eli pienin, mikä kuvaa mallin sopivuutta kyseiselle aineistolle. Parsimoniaperiaate tarkoittaa, että haetaan mahdollisimman yksinkertainen malli, jossa on mahdollisimman vähän estimoitavia parametreja. AICc-vertailuarvon tarkastelu on hyödyllinen, jos halutaan valita aineistoon

parhaiten sopiva malli joillakin biologisesti järkevillä perusteilla muodostettujen mahdollisten mallien joukosta. Lisäksi se parantaa testin tehokkuutta.

Sopivan rakenteen etsintävaiheessa käytin ”maximum likelihood”- eli suurimman uskottavuuden metodia, mutta parhaan korrelaatorakenteen löydyttyä vaihdoin metodiksi ”restricted maximum likelihood”, jonka mukaisella mallilla lopulliset tulokset on ilmoitettu.

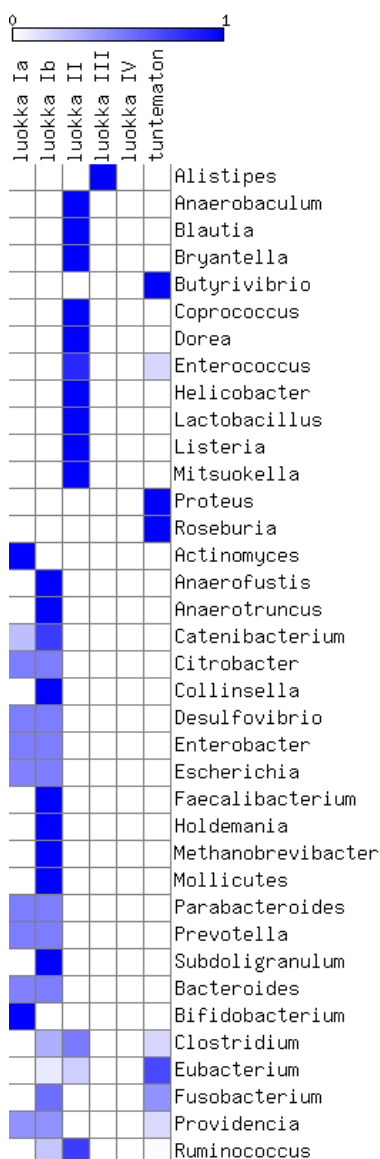
Lisäksi glyfosaattipitoisuuksien välisiin parittaisiin vertailuihin käytin Tukeyn (tasapainoisille aineistoille) ja Tukey-Kramerin (epätasapainoisille aineistoille) post-hoc testejä. Tuloksissa on ilmoitettu korjatut p-arvot sekä kasvun vertailuille eri aikapisteissä (glyfosaattipitoisuuden ja mittaushetken yhdysvaikutus) että glyfosaattipitoisuuksien vertailulle (mittaushetkiä erittelemättä). Pienimmät kasvuun tilastollisesti merkitsevästi vaikuttavat glyfosaattipitoisuudet on määritetty jälkimmäisellä tavalla analysoimalla tilastollisesti merkitsevä ero kontrollikäsittelyyn verrattuna. Näitä on mielekästä tarkastella, sillä vaikka bakteerien kasvu ei estyisikään täysin, pienelläkin haitalla voi olla merkitystä mikrobiyhteisön kannalta. Pienimmän kasvuun vaikuttavan pitoisuuden lisäksi tarkastelin vielä erikseen MIC-arvoja (pienin bakteerin kasvun kokonaan estävä pitoisuus, engl. minimum inhibitory concentration), joiden määrittämiseen herbisideille ei ole vakiintunutta standarditestaustapaa (Bote ym., 2019; Pöppe ym., 2019). Tässä tutkielmassa MIC-arvoksi määritettiin se glyfosaattipitoisuus, jossa kasvu ei tilastollisesti merkitsevästi eronnut nollasta missään mittauspisteessä noin 23 tunnin aikana (parittaiset t-testit).

3. Tulokset

3.1 Bioinformatiiviset tulokset: EPSPS-sekvenssien luokitukset

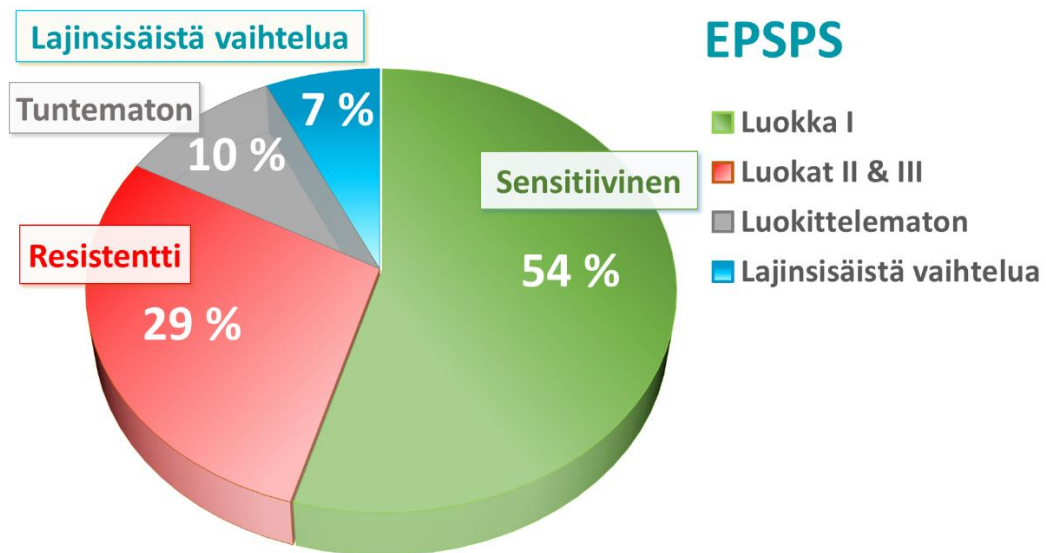
Sukutasolla tarkasteltaessa aminohapposekvenssin perusteella glyfosaattisensitiivistä EPSPS-entsyymiä eli luokan I EPSPS-sekvenssiä tuottaviin bakteerisukuihin kuuluivat muun muassa *Collinsella*, *Escherichia*, *Faecalibacterium* ja *Parabacteroides*. EPSPS:n perusteella resistenttejä bakteerisukuja olivat esimerkiksi *Helicobacter*, *Lactobacillus* ja *Dorea*. Monissa suvuissa esiintyi huomattavaa vaihtelua mahdollisessa glyfosaattiherkkyydessä: esimerkiksi *Ruminococcus bromii* -kannat (n=14) edustivat EPSPS-luokkaa I, kun taas *Ruminococcus gnavus* -kannat (n=17) luokkaa II. Valtaosa

tutkituista bakteerisuvuista oli EPSPS-luokituksensa perusteella sensitiivisiä glyfosaatille (kuva 8).



Kuva 8. Eri EPSPS-luokkien osuudet bakteerisuvuissa. Sinisen sävy kuvaa osuutta kaikista analysoiduista sekvensseistä kyseisessä suvussa. EPSPS-luokat Ia ja Ib ovat glyfosaatille sensitiivisiä; luokat II, III ja IV resistenttejä. Luokittelemattomien sekvenssien glyfosaattiherkkyyttä ei tunneta.

Lajitason tarkastelussa enemmistöllä (54 %) 101:stä yleisenä ihmisen suolistossa esiintyvistä bakteerilajista (Qin ym., 2010) kaikki löytyneet EPSPS-aminohapposekvenssit kuuluivat luokkaan I, eli olivat glyfosaatille sensitiivisiä muotoja entsyymistä (kuva 9).



Kuva 9. 101 tavallisen suolistobakteerilajin glyfosaattiherkkyys EPSPS-entsyymien aminohapposekvenssien (n=890) perusteella. 54 %:lla lajeista esiintyi ainoastaan sensitiivisiä EPSPS I -entsyymejä. Reilulla neljäsosalla lajeista puolestaan oli vain luokkien II tai III sekvenssejä, eli resistenttejä EPSPS-muotoja. Joillakin lajeilla esiintyi lajinsisäistä vaihtelua eli luokituseroja EPSPS-sekvenssien välillä. Osalla lajeista oli ainoastaan toistaiseksi tuntemattomia, luokittelemattomia EPSPS-sekvenssejä, joiden glyfosaatinsietokyvystä ei tällä hetkellä ole tietoa.

Lähes kaikki resistentit EPSPS-entsyymit olivat tyyppiä II, sillä tyyppiä III löytyi ainoastaan *Alistipes putredinis* -kannoilta, eikä tyyppiä IV tässä aineistossa esiintynyt lainkaan. Lajitason listaus kaikista tutkituista bakteereista ja niiden EPSPS-entsyymien (n=890) glyfosaatinsietokyvystä esitetään taulukossa 3. Koko aineisto kaikkine sekvensseineen (eritelty myös yksittäiset sekvenssit ja niiden tunnistetiedot sekä prosentuaalinen samankaltaisuus kunkin referenssisekvenssin kanssa) on vapaasti tarkasteltavissa osoitteessa <http://ppuigbo.me/programs/EPSPSClass/> kohdassa 'Gut Microbiome'.

Taulukko 3. Listaus yleisistä suolistobakteereista ja niiden glyfosaattiherkkyydestä lajitasolla. Lajit, joilta löytyi ainoastaan luokan I sensitiivisiä EPSPS-muotoja, on merkitty vihreällä ja luokkien II ja III resistentit lajit punaisella. Lajit, joilla esiintyi lajinsisäistä vaihtelua EPSPS:n luokituksessa, on merkitty sinisellä ja luokittelemattomat mustalla. Jos EPSPS on luokittelematon eli epäidenttinen verrattuna jokaisen referenssisekvenssin aktiiviseen keskukseen, sen herkkyyttä glyfosaatille ei tunneta. Sekvenssien kokonaismäärä n=890. Taulukossa on merkitty sekvenssien lukumäärä suluissa. EPSPS I -sekvenssit (S), EPSPS II -sekvenssit (R) ja ei olemassa olevaa luokitusta (E).

Sensitiivinen glyfosaatille (EPSPS I, 100%)		Resistentti glyfosaatille (EPSPS II, 100%)	Resistentti glyfosaatille (EPSPS III, 100%)
<i>Actinomyces odontolyticus</i> (1)	<i>Bifidobacterium longum</i> (102)	<i>Anaerobaculum hydrogeniformans</i> (1)	<i>Alistipes putredinis</i> (3)
<i>Anaerofustis stercorihominis</i> (1)	<i>Catenibacterium mitsuokai</i> (3)	<i>Blautia hansenii</i> (3)	Osa kannoista sensitiivisiä, osa resistenttejä (EPSPS I, 96% / EPSPS II, 4%)
<i>Anaerotruncus colihominis</i> (5)	<i>Citrobacter portucalensis</i> (5)	<i>Bryantella formatexigens</i> (1)	
<i>Bacteroides caccae</i> (5)	<i>Clostridium methylopentosum</i> (1)	<i>Clostridium asparagiforme</i> (2)	
<i>Bacteroides capillosus</i> (1)	<i>Clostridium nexile</i> (1)	<i>Clostridium bartlettii</i> (2)	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (28): 2/S + 1R
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i> (4)	<i>Collinsella aerofaciens</i> (9)	<i>Clostridium scindens</i> (2)	Osa kannoista sensitiivisiä, osa luokittelematta (EPSPS I, 94% / luokittelematta, 6%)
<i>Bacteroides coprocola</i> (2)	<i>Desulfovibrio piger</i> (4)	<i>Clostridium</i> sp. SS2/1 (2)	
<i>Bacteroides coprophilus</i> (2)	<i>Enterobacter cancerogenus</i> (1)	<i>Clostridium symbiosum</i> (1)	
<i>Bacteroides dorei</i> (2)	<i>Escherichia coli</i> (112)	<i>Coprococcus comes</i> (9)	<i>Bifidobacterium pseudocatenuatum</i> (46): 4S + 1E
<i>Bacteroides eggerthii</i> (3)	<i>Eubacterium siraeum</i> (4)	<i>Coprococcus eutactus</i> (6)	<i>Clostridium leptum</i> (5): 4S + 1E
<i>Bacteroides finegoldii</i> (4)	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (53)	<i>Dorea formicigenerans</i> (18)	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (2): 1S + 1E
<i>Bacteroides fragilis</i> (56)	<i>Fusobacterium mortiferum</i> (1)	<i>Dorea longicatena</i> (11)	Osa kannoista resistenttejä, osa luokittelematta (EPSPS II, 79% / luokittelematta, 21%)
<i>Bacteroides intestinalis</i> (11)	<i>Fusobacterium ulcerans</i> (1)	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (2)	
<i>Bacteroides ovatus</i> (14)	<i>Fusobacterium varium</i> (1)	<i>Eubacterium hallii/Anaerobutyrum hallii</i> (9)	
<i>Bacteroides plebeius</i> (11)	<i>Holdemania filiformis</i> (1)	<i>Helicobacter canadensis</i> (1)	<i>Clostridium</i> sp. L2/50 (2): 1R + 1E
<i>Bacteroides</i> sp. 2_2_4 (1)	<i>Methanobrevibacter smithii</i> (1)	<i>Helicobacter cinaedi</i> (2)	<i>Enterococcus faecalis</i> (4): 3R + 1E
<i>Bacteroides</i> sp. 3_2_5 (1)	<i>Mollicutes bacterium</i> (3)	<i>Helicobacter pullorum</i> (1)	<i>Ruminococcus torques</i> (8): 7R + 1E
<i>Bacteroides</i> sp. 4_3_4/FAA (1)	<i>Parabacteroides distasonis</i> (10)	<i>Helicobacter winthamensis</i> (1)	Luokittelematta (100%)
<i>Bacteroides</i> sp. 9_1_42FAA (2)	<i>Parabacteroides johnsonii</i> (4)	<i>Lactobacillus brevis</i> subsp. <i>gravesensis</i> (1)	
<i>Bacteroides</i> sp. D1 (1)	<i>Parabacteroides merdae</i> (8)	<i>Lactobacillus buchneri</i> (1)	
<i>Bacteroides stercoris</i> (20)	<i>Parabacteroides</i> sp. 2_1_7 (1)	<i>Lactobacillus hilgardii</i> (1)	<i>Bacteroides pectinophilus</i> (1)
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (13)	<i>Prevotella copri</i> (27)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (2)	<i>Butyrivibrio crossotus</i> (2)
<i>Bacteroides uniformis</i> (10)	<i>Providencia alcalifaciens</i> (1)	<i>Lactobacillus ruminis</i> (2)	<i>Clostridium spiroforme</i> (1)
<i>Bacteroides vulgatus</i> (6)	<i>Providencia rustigianii</i> (1)	<i>Listeria grayi</i> (1)	<i>Eubacterium rectale</i> (26)
<i>Bifidobacterium breve</i> (28)	<i>Providencia stuartii</i> (1)	<i>Mitsuokella multacida</i> (3)	<i>Eubacterium ventriosum</i> (1)
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (22)	<i>Ruminococcus bromii</i> (14)	<i>Ruminococcus gnavus</i> (17)	<i>Fusobacterium necrophorum</i> (1)
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> (8)	<i>Subdoligranulum variabile</i> (3)	<i>Ruminococcus lactaris</i> (3)	<i>Fusobacterium periodonticum</i> (1)
<i>Bifidobacterium dentium</i> (5)		<i>Ruminococcus obeum</i> (18)	<i>Proteus penneri</i> (1)
			<i>Providencia rettgeri</i> (1)
			<i>Klebsiella intestinalis</i> (9)

Liitteessä 1 listataan eriteltynä Qinin ym. (2010) tutkimuksessa mainittuja bakteerilajeja ja -kantoja sekä niiden EPSPS-entsyymien luokittelut ja oletettu glyfosaattiherkkyys. Liitteessä esiintyvät bakteerit ovat vahvistetusti suolistoperäisiä, toisin kuin mahdollisesti osa taulukon 3 sisältämistä sekvensseistä.

Suolistomikrobistossa hyvin yleisenä esiintyvistä lajeista/kannoista 75 on lueteltu lajikohtaisine runsausarvioineen Qinin ym. (2010) lisämateriaalitaulukossa 8. Arvioimme

näiden ”ydinlajien” muodostavan yhteensä 22–47 % suolistomikrobistosta, mikäli oletetaan, että mikrobisto koostuu 160 vaihtelevasta lajista (Qin ym., 2010). Näin ollen EPSPS:n perusteella glyfosaattisensitiiviset I-luokan ”ydinlajit” kattoivat vähintään 12–26 % ja resistentit EPSPS II-luokan lajit vähintään 6–11 % suoliston koko mikrobimetagenomista (taulukko 4).

Taulukko 4. Yhteenveto kahden aineiston tuloksista: Qinin ym. tutkimuksen (2010) lisämateriaalina julkaistussa taulukossa lueteltiin 75 yleisintä suolistobakteeria ja niiden genomisen kattavuus (>1 % ja >10 %) koehenkilöiden koko suolistomikrobistosta. Näiden tietojen pohjalta laskimme glyfosaatille EPSPS:n perusteella sensitiivisten, resistenttien ja luokittelemattomien bakteerien osuudet 64 bakteerikannalle NCBI Protein -tietokannasta löytyvistä EPSPS-sekvensseistä, sekä varovaisen arvion näiden keskeisten lajien kattavuudesta koko suolistomikrobistossa, jossa oletetaan olevan noin 160 vaihtelevaa lajia. ”Koko aineisto” puolestaan sisältää lajeja myös runsaimman mikrobiytimen ulkopuolelta.

EPSPS:n perusteella:	Suoliston runsaimmat bakteerit ¹ 64 sekvenssiä 75 lajilta tai kannalta ^{2,3}		Koko aineisto: 890 sekvenssiä 101 lajilta
	Osuus keskeisimmistä suolistolajeista (64)	Genomisen kattavuus suolistossa (75)	Osuus kaikista löydettyistä lajeista
Sensitiivisiä lajeja	65,6 % ⁴	12–26 %	54,5 %
Resistenttejä lajeja	26,6 % ⁴	6–11 %	28,7 %
Luokittelemattomia lajeja	7,8 % ⁴	2–3 %	9,9 % + lajinsisäisesti varioivia 6,9 %
Kaikki	100,0 %	22–47 %	100,0 %

¹Qinin ym. tutkimuksen lisämateriaalitalukko 8.

²Koska Qin ym. (2010) -lähdemateriaalissa bakteerien taksonominen taso vaihteli lajien ja bakteerikantojen välillä, valittiin jokaisesta lajista vain yksi EPSPS-sekvenssi, joka yleisimmin edusti sekvenssien luokitusta.

³11 kannan EPSPS-sekvenssejä ei löytynyt NCBI Protein -tietokannasta.

⁴Osuudet olisivat pienemmät (järjestyksessä 56 %, 23 % ja 7 %), mikäli otettaisiin huomioon ne Qin ym. taulukon sekvenssit, joita ei löytynyt NCBI Protein:sta. Taulukossa nyt olevat arvot ovat kuitenkin vertailukelpoisempia koko aineiston kanssa. Löytymättömätkin sekvenssit on kuitenkin otettu huomioon arviossa siitä, kuinka suuren osan Qinin ym. taulukossa esiintyvät bakteerit muodostavat kokonaismikrobistosta.

Kymmenestä yleisimmästä suolistobakteerilajista tai -kannasta (Qin ym., 2010) neljällä oli luokan I sensitiivinen EPSPS (*Faecalibacterium prausnitzii* SL3-3; *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482; *Bacteroides uniformis* ja *Bacteroides* sp. 9 1 42FAA), neljällä luokan II EPSPS (*Dorea formicigenerans*; *Clostridium* sp. SS2-1; *Eubacterium hallii* ja *Coprococcus comes*) ja kahdella luokittelematon EPSPS (*Roseburia intestinalis* M50 1 ja *Eubacterium rectale* M104 1). Kunkin bakteerin genomi kattoi merkittävän osuuden suoliston koko mikrobimetagenomista: 92 %:lla koehenkilöistä (n=124) yli 10 % per

bakteerikanta (Qin ym., 2010). Lisäksi 20 ja 50 yleisimmän bakteerikannan joukoista 35 % ja 24 % oli EPSPS:n perusteella resistenttejä, joten hallitsevampien lajien joukossa esiintyi suhteellisesti hieman enemmän EPSPS:ltään resistenttejä bakteereja kuin vähemmän hallitsevissa. Yhtätoista kantaa Qinin ym. lisämateriaalitaulukosta 8 ei huomioitu näissä luvuissa, sillä niiden EPSPS-sekvenssit eivät olleet saatavilla NCBI Protein -tietokannassa.

Laboratoriossa testaamistani viidestä bakteerikannasta kolmella oli luokan I EPSPS ja kahdella todennäköisesti luokan II EPSPS (taulukko 5). Kantojen glyfosaattisensitiivisyyttä laboratoriokokeiden perusteella käsitellään kappaleessa 3.2: ”Glyfosaattivalmisteiden vaikutus koebakteerien kasvuun laboratoriossa”.

Taulukko 5. Laboratoriossa testattujen bakteerikantojen EPSPS-sekvenssien bioinformatiivinen luokittelu. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 -kannan EPSPS-sekvenssiä ei tietokannoista löytynyt, mutta muista lajilta löytyneistä sekvensseistä (n=75) 97 % oli luokkaa II ja loput luokittelemattomia. On siis todennäköistä, että myös kannalla ATCC 29213 on luokan II EPSPS -sekvenssi (*). Luokan I EPSPS on entsyymien glyfosaattisensitiivinen muoto ja luokan II entsyymi resistentti muoto.

Bakteerikanta laboratoriokokeessa	EPSPS-luokitus
<i>Escherichia coli</i> IHE3034	I a/b
<i>Salmonella enterica</i> SL1344	I a/b
<i>Shigella flexneri</i> M90T	I a/b
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	(II)*
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	II

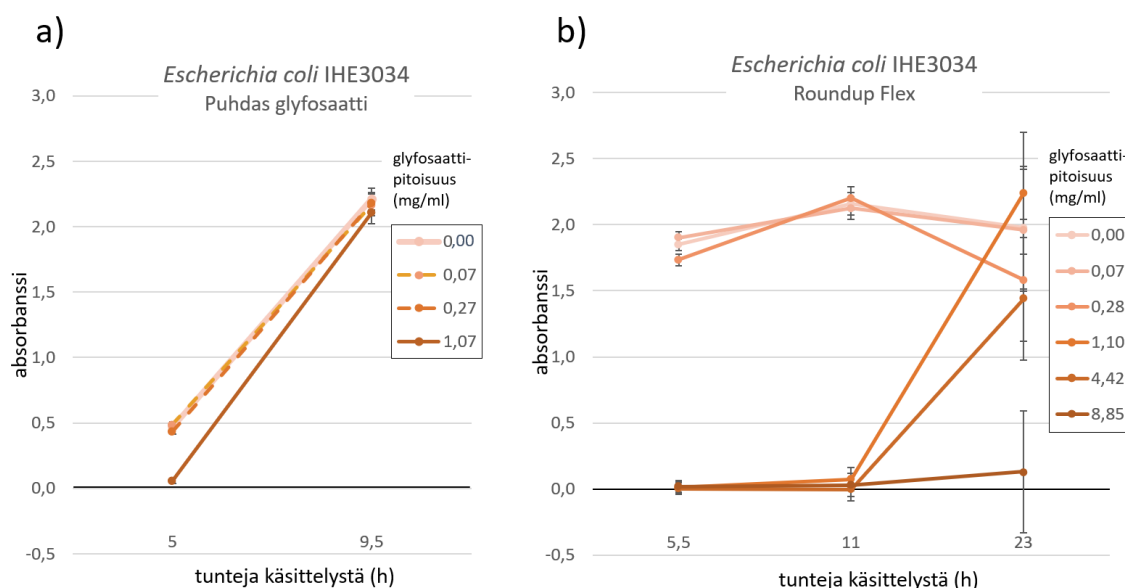
Kaikista löytämistäni kokonaisista EPSPS-sekvensseistä lähes 80 % kuului luokkaan I. Tätä lukua ei kuitenkaan voi pitää mielekkäänä vertailulukuna, sillä NCBI Protein -tietokannasta (NCBI Protein, 2004) löytyneiden sekvenssien määrä lajia kohden vaihteli sattumanvaraisesti. EPSPS-sekvenssien perusteella sensitiivistä entsyymiä tuottavaa lajia kohden löytyi keskimäärin 13 sekvenssiä, resistenttiä entsyymiä tuottavaa lajia kohden 5. Mielekkäämpää onkin tarkastella EPSPS-luokitusten tuloksia ylempien taksonien tasolla tai tarkkaan määritetyillä, tärkeillä bakteerikannoilla.

3.2 Glyfosaattivalmisteiden vaikutus koebakteerien kasvuun laboratoriossa

3.2.1 *Escherichia coli* IHE3034

Puhdas glyfosaatti: Neljän eri glyfosaattipitoisuuden (kontrolli mukaan lukien) ja mittaushetken yhdysvaikutus oli tilastollisesti merkitsevä (toistomittausanalyysi, $F_{3;12}=16,39$; $p=0,0002$, kuva 10 a), eli pitoisuuden vaikutus *E. coli* -kannan kasvuun riippui mittausajankohdasta. Viiden tunnin mittauksen kohdalla bakteerien kasvu (absorbanssi) jäi suurimmassa glyfosaattipitoisuudessa (1,07 mg/ml) jälkeen kontrollista (Tukey-Kramerin post-hoc testi, $t_{12}=31,56$; $p<0,0001$) ja muista glyfosaattikäsittelyistä, mutta ero kontrolliin tasoittui yhdeksään tuntiin mennessä (Tukey-Kramerin post-hoc testi, $t_{12}=1,96$; $p=0,54$). Muilla pitoisuuksilla ei ollut vaikutusta bakteerin kasvuun.

Roundup Flex: *E. coli* -kannan Roundup Flex -käsittelyssä glyfosaattipitoisuuden ja mittaushetken yhdysvaikutus oli tilastollisesti merkitsevä (toistomittausanalyysi, $F_{10;26,94}=18,70$; $p<0,0001$, kuva 10 b). 5–11 tunnissa kokeen aloituksesta ero pienimpien glyfosaattipitoisuuksien sekä kolmen suurimman (1,10; 4,42; 8,85 mg/ml) pitoisuuden välillä oli huomattava: suurissa pitoisuuksissa kasvu ei eronnut nollasta (parittaiset t-testit, $p>0,09$), kun taas pienet pitoisuudet pysyivät lähellä kontrollikäsittelyn kasvua (Tukey-Kramerin post-hoc testit, $p>0,06$). 11 tunnin jälkeen bakteerit kuitenkin lähtivät suuremmissakin pitoisuuksissa (1,10 ja 4,42 mg/ml) kasvuun eivätkä eronneet kontrollista 23 tunnin mittauspisteessä (Tukey-Kramerin post-hoc testit, $p>0,94$). Kasvu suurimmassa pitoisuudessa (8,85 mg/ml) ei puolestaan eronnut nollasta missään aikapisteessä (parittaiset t-testit, $p\geq 0,41$). Kyseinen 8,85 mg/ml pitoisuus oli testatuista pitoisuuksista pienin kasvun kokonaan estävä pitoisuus (MIC).



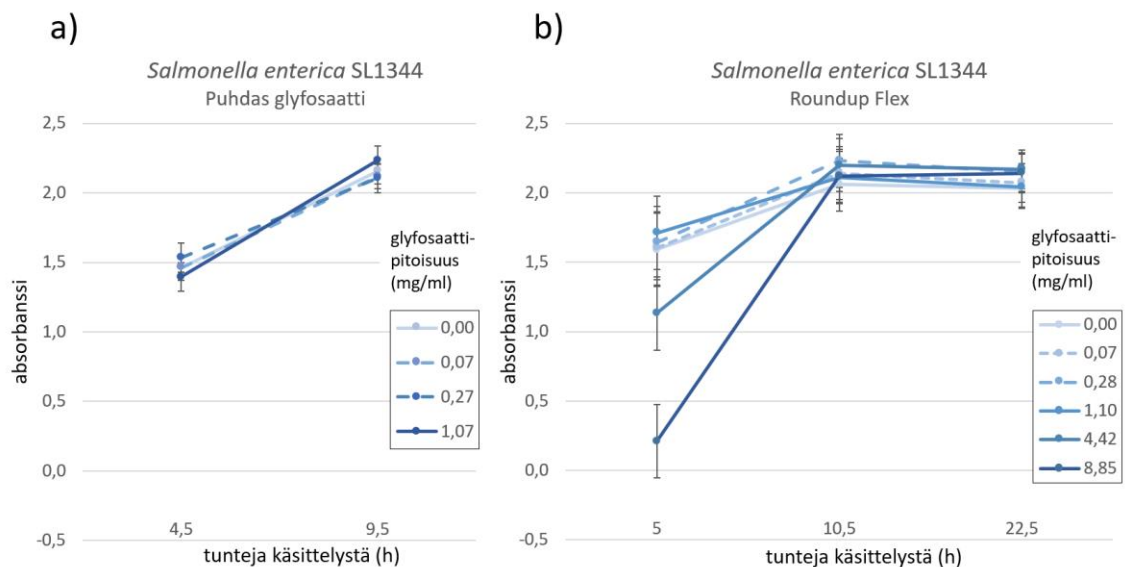
Kuva 10. *Escherichia coli* IHE3034:n kasvu puhtaalla glyfosaatilla ja Roundup Flexillä käsiteltynä (pienimmän neliösumman keskiarvot ja 95 % luottamusväli). a) *E. coli* -kannan kasvu kontrollikäsitellyssä ja kolmessa eri glyfosaattipitoisuudessa, kahdessa aikapisteessä mitattuna sekä b) *E. coli* -kannan kasvu kontrollikäsitellyssä ja viidessä eri Roundup Flex -käsitellyssä, kolmessa aikapisteessä mitattuna. a–b) Absorbanssi kuvaa bakteerien kasvua (suurempi absorbanssi tarkoittaa suurempaa kasvua) ja eri väriset viivat eri glyfosaattipitoisuuksia. Viivat eivät esitä bakteerien todellista kasvua mittauspisteiden välillä (kasvu ei välttämättä ole lineaarista pisteiden välillä), vaan ainoastaan selkeyttävät kuvaajaa. $n=4$ /pitoisuus/mittauspiste. Absorbanssin mittauksessa $\lambda=600$ nm.

3.2.2 *Salmonella enterica* SL1344

Puhdas glyfosaatti: Glyfosaattipitoisuuden ja mittaushetken yhdysvaikutus ei 9,5 tunnin aikana paljastanut huomattavia eroja *S. enterica* -kannan kasvussa koepitoisuuksien välillä (toistomittausanalyysi, $F_{3; 10}=3,71$; $p=0,0499$, kuva 11 a). Marginaalisesti tilastollisesti merkitsevä tulos voi johtua siitä, että 4,5 tunnin mittauksessa 1,07 mg/ml pitoisuudessa absorbanssi oli muita ryhmiä alempi ja 9,5 tunnin mittauksessa korkeampi. Tässä pitoisuudessa bakteerit siis kasvoivat muita nopeammin kyseisellä aikavälillä. Mikään käsittelyryhmä, edes maksimipitoisuudessa 1,07 mg/ml, ei kuitenkaan tilastollisesti merkitsevästi eronnut kontrollista missään aikapisteessä (Tukey-Kramerin post-hoc testit, $p>0,92$).

Roundup Flex: Glyfosaattipitoisuuden ja mittaushetken yhdysvaikutus oli tilastollisesti merkitsevä (toistomittausanalyysi, $F_{10; 29,54}=12,59$; $p<0,0001$, kuva 11 b), eli kaikkiaan Roundup Flex -käsitelyn glyfosaattipitoisuuden vaikutus *S. enterica* -kannan kasvuun riippui mittausajankohdasta. Alemmissa pitoisuuksissa kokonaisvaikutusta ei ollut

(Tukeyn post-hoc testit glyfosaattipitoisuuksille, $p \geq 0,88$), vaan ainoastaan suurimmassa glyfosaattipitoisuudessa 8,85 mg/ml kasvu kokonaisuudessaan heikentyi merkitsevästi kontrolliin verrattuna (ks. kohta ”Pienimmät kasvua haittaavat pitoisuudet”). Suurimmassa glyfosaattipitoisuudessa kasvu oli 5 tunnin kohdalla kontrollia pienempi (Tukey-Kramerin post-hoc testi $t_{17,31}=7,76$; $p < 0,0001$), mutta ei enää eronnut kontrollista 10,5 ja 22,5 h mittauspisteissä (Tukey-Kramerin post-hoc testit, $p=1,00$). Mikään käsittelyistä ei täyttänyt MIC-arvon kriteerejä.



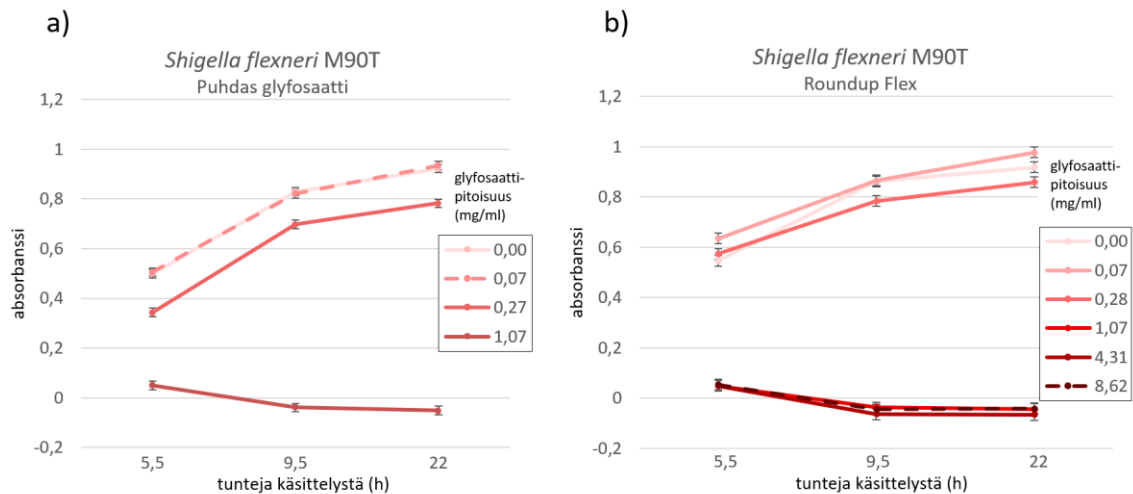
Kuva 11. *Salmonella enterica* SL1344:n kasvu puhtaalla glyfosaatilla ja Roundup Flexillä käsiteltynä (pienimmän neliösumman keskiarvot ja 95 % luottamusvälit). a) *S. enterica* -kannan kasvu kontrolli- ja glyfosaattikäsittelyissä kahdessa aikapisteessä mitattuna. Pitoisuuksilla 0 ja 0,07 mg/ml $n=4$ /mittauspiste ja pitoisuuksilla 0,27 ja 1,07 mg/ml $n=3$ /mittauspiste. b) *S. enterica* -kannan kasvu kontrolli- ja Roundup Flex -käsittelyissä kolmessa aikapisteessä mitattuna. $n=4$ /pitoisuus/mittauspiste. a–b) Absorbanssi kuvaa bakteerien kasvua ja eriväriset viivat eri glyfosaattipitoisuuksia. Viivat eivät esitä bakteerien todellista kasvua mittauspisteiden välillä (kasvu ei välttämättä ole lineaarista pisteiden välillä), vaan ainoastaan selkeyttävät kuvaajaa. Absorbanssin mittauksessa $\lambda=600$ nm.

3.2.3 *Shigella flexneri* M90T

Puhdas glyfosaatti: Glyfosaattipitoisuudella ja mittausajankohdalla oli tilastollisesti merkitsevä yhdysvaikutus (toistomittausanalyysi, $F_{6; 26,6}=272,16$; $p < 0,0001$, kuva 12 a), eli pitoisuuden vaikutus *S. flexneri* -kannan kasvuun riippui mittausajankohdasta. Kolmesta glyfosaattipitoisuudesta pienin (0,07 mg/ml) ei eronnut kontrollikasvusta

missään aikapisteessä (Tukey-Kramerin post-hoc testit $p \geq 0,997$), keskimäinen (0,27 mg/ml) noudatti tasaisesti pienempää kasvua (Tukey-Kramerin post-hoc testit aikajärjestyksessä $t_{35,67}=13,24$; $t_{35,67}=11,22$; $t_{35,67}=11,90$; kaikissa $p < 0,0001$) ja suurin (1,07 mg/ml) erosi kontrollista huomattavasti (Tukey-Kramerin post-hoc testit aikajärjestyksessä $t_{35,67}=38,07$; $t_{35,67}=45,65$; $t_{35,67}=46,61$; kaikissa $p < 0,0001$). Suurimman pitoisuuden ero nollaan kasvun suhteen vaihteli mittausajankohdasta riippuen tilastollisesti merkitsevästi nollan yläpuolelta nollan alapuolelle (parittaiset t-testit aikajärjestyksessä, $t_{35,67}=6,02$; $t_{35,67}=-4,69$; $t_{35,67}=-6,05$; kaikissa $p < 0,0001$) ja oli kokonaisuudessaan tarkasteltuna nollan alapuolella (parittaiset t-testit glyfosaattipitoisuuksille, $t_{19,39}=-2,93$; $p=0,008$) – tarkoittaen käytännössä kasvun estymistä.

Roundup Flex: Roundup Flex -käsittelyssä glyfosaattipitoisuudella ja mittaushetkellä oli tilastollisesti merkitsevä yhdysvaikutus (toistomittausanalyysi, $F_{10; 36,54}=187,73$; $p < 0,0001$, kuva 12 b). Pienimmässä glyfosaattipitoisuudessa 0,07 mg/ml kasvu oli tilastollisesti merkitsevästi kokonaisuudessaan kontrollikäsitteilyn kasvua suurempi (Tukeyn post-hoc testi glyfosaattipitoisuuksille, $t_{20,11}=-4,61$; $p=0,002$), ja vasta toiseksi pienin pitoisuus 0,28 mg/ml aiheutti tilastollisesti merkitsevästi kontrollikäsitteilyä heikomman kasvun (ks. ”Pienimmät kasvua haittaavat pitoisuudet”). Kuten puhtaassa glyfosaatissakin, suurimmat pitoisuudet (1,07; 4,31 ja 8,62 mg/ml) estivät kasvun lähes kokonaan: 5,5 h kohdalla kasvu oli merkitsevästi nollaa suurempi kaikissa pitoisuuksissa (parittaiset t-testit, $p < 0,0001$), kun taas 9,5 ja 22 h kohdalla kasvu oli nollaa pienempi (parittaiset t-testit, kaikissa $p \leq 0,0009$), eli kasvu estyi.



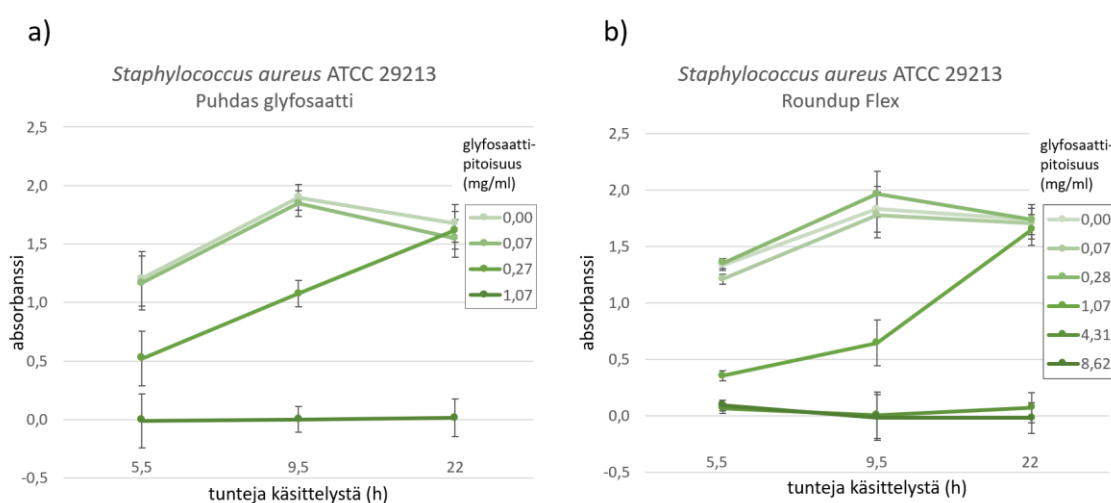
Kuva 12. *Shigella flexneri* M90T:n kasvu puhtaalla glyfosaatilla ja Roundup Flexillä käsiteltynä (pienimmän neliösumman keskiarvot ja 95 % luottamusvälit). a) *S. flexneri* -kannan kasvu kontrolli- ja glyfosaattikäsitelyissä kolmessa aikapisteessä mitattuna. n=4/pitoisuus/mittauspiste. b) *S. flexneri* -kannan kasvu eri Roundup Flex -glyfosaattipitoisuuksilla kolmessa mittauspisteessä. n=4/pitoisuus/mittauspiste, paitsi pitoisuudessa 4,31 mg/ml n=3/mittauspiste. a–b) Absorbanssi kuvaa bakteerien kasvua ja eriväriset viivat eri glyfosaattipitoisuuksia. Viivat eivät esitä bakteerien todellista kasvua mittauspisteiden välillä (kasvu ei välttämättä ole lineaarista pisteiden välillä), vaan ainoastaan selkeyttävät kuvaajaa. Absorbanssin mittauksessa $\lambda=600$ nm.

3.2.4 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

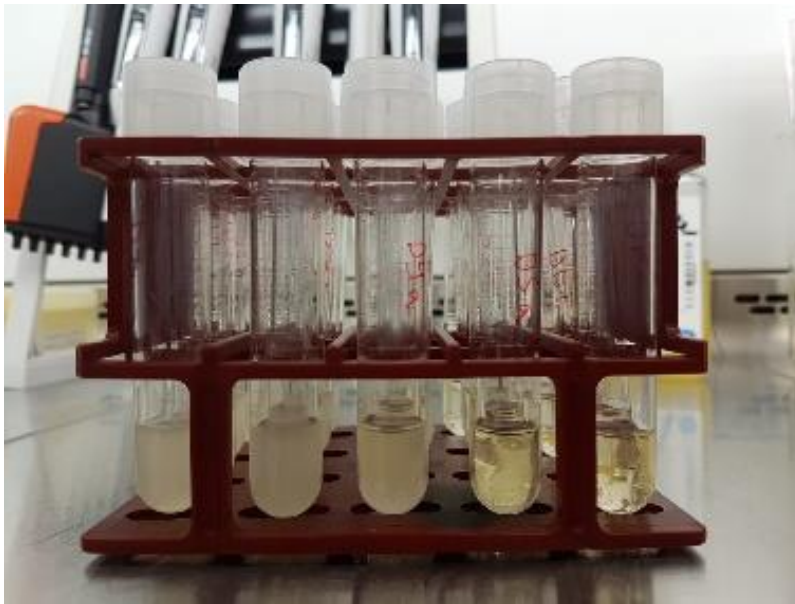
Puhdas glyfosaatti: Glyfosaattipitoisuuden ja mittaushetken yhdysvaikutus oli tilastollisesti merkitsevä (toistomittausanalyysi, $F_{6; 14,49}=27,43$; $p<0,0001$, kuva 13 a), eli pitoisuuden vaikutus *S. aureus* -kannan kasvuun riippui mittaushetkestä. Kolmesta glyfosaattikäsitelystä pienimmän pitoisuuden (0,07 mg/ml) kasvu pysytteli vain hieman kontrollin alapuolella eikä kokonaisuudessaan tilastollisesti eronnut kontrollista (Tukeyn post-hoc testi glyfosaattipitoisuuksille, $t_{12,11}=0,80$; $p=0,86$). Keskimmäinen glyfosaattipitoisuus 0,27 mg/ml heikensi *S. aureus* -kannan kasvua (ks. ”Pienimmät kasvua haittaavat pitoisuudet”) 9,5 tuntiin asti (Tukey-Kramerin post-hoc testit aikajärjestyksessä, $t_{12}=4,53$; $p=0,01$ ja $t_{12}=11,43$; $p<0,0001$), mutta 22 tuntiin mennessä bakteerien kasvu saavutti kontrollin (Tukey-Kramerin post-hoc testi, $t_{12}=0,57$; $p=1,00$). Bakteerin kasvu estyi kokonaan suurimmassa glyfosaattipitoisuudessa 1,07 mg/ml (MIC) – kasvu ei eronnut nolasta missään aikapisteessä (parittaiset t-testit, $p\geq 0,85$).

Roundup Flex: Roundup Flex -käsitelyissä glyfosaattipitoisuuden ja mittaushetken yhdysvaikutus oli tilastollisesti merkitsevä (toistomittausanalyysi, $F_{10; 26,26}=32,14$; $p<0,0001$, kuva 13 b). Viidestä eri glyfosaattipitoisuudesta kaksi pienintä, 0,07 ja 0,28

mg/ml, eivät kokonaisuudessaan eronneet kontrollista kasvun suhteen (Tukeyn post-hoc testit glyfosaattipitoisuuksille, järjestyksessä $t_{20}=1,12$; $p=0,87$ ja $t_{20}=-0,82$; $p=0,96$; kuva 14). Pitoisuudessa 1,07 mg/ml kasvu oli huomattavasti heikompaa kontrolliin verrattuna vielä 9,5 tunnin kohdalla (Tukey-Kramerin post-hoc testi, $t_{17,88}=8,64$; $p<0,001$), minkä jälkeen kasvu kiihtyi ja saavutti kontrollin 22 tuntiin mennessä (Tukey-Kramerin post-hoc testi, $t_{18,6}=0,99$; $p=1,00$, ks. ”Pienimmät kasvua haittaavat pitoisuudet”). Suurimmissa glyfosaattipitoisuuksissa 4,31 ja 8,62 mg/ml bakteerien kasvu erosi nollasta ainoastaan ensimmäisessä mittauspisteessä (parittaiset t-testit, järjestyksessä $t_{17,59}=3,05$; $p=0,007$ ja $t_{17,59}=4,31$; $p=0,0004$) – muissa kasvu estyi. MIC-arvoja ei saatu määritettyä.



Kuva 13. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213:n kasvu puhtaalla glyfosaatilla ja Roundup Flexillä käsiteltynä (pienimmän neliösumman keskiarvot ja 95 % luottamusvälit). a) *S. aureus* -kannan kasvu puhtaassa glyfosaatissa kontrolli- ja glyfosaattikäsitelyissä kolmessa aikapisteessä mitattuna. b) *S. aureus* -kannan kasvu kontrolli- ja Roundup Flex -käsitelyissä kolmessa aikapisteessä mitattuna. a–b) Absorbanssi kuvaa bakteerien kasvua ja eri väriset viivat eri glyfosaattipitoisuuksia. Viivat eivät esitä bakteerien todellista kasvua mittauspisteiden välillä (kasvu ei välttämättä ole lineaarista pisteiden välillä), vaan ainoastaan selkeyttävät kuvaajaa. $n=4$ /pitoisuus/mittauspiste. Absorbanssin mittauksessa $\lambda=600$ nm.



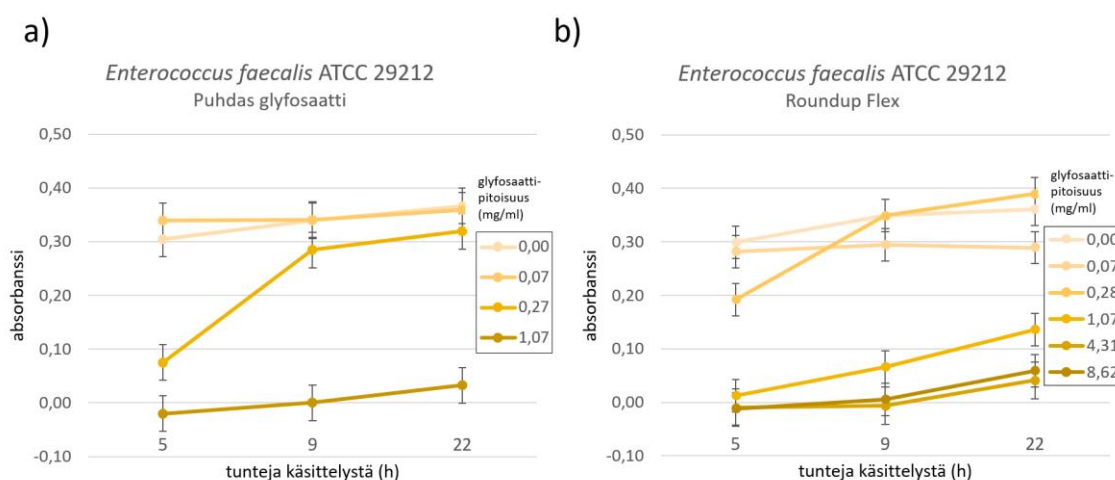
Kuva 14. Eroja *Staphylococcus aureus* -bakteerin kasvussa eri Roundup Flex -glyfosaattipitoisuuksissa 9,5 tunnin kohdalla. Glyfosaattipitoisuus suurenee vasemmalta oikealle (vahvin glyfosaattikäsittely 8,62 mg/ml ei näy kuvassa).

3.2.5 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Puhdas glyfosaatti: Puhtaassa glyfosaatissa käsittelypitoisuuden ja mittaushetken yhdysvaikutus oli tilastollisesti merkitsevä (toistomittausanalyysi, $F_{6; 24}=19,02$; $p<0,0001$, kuva 15 a), eli pitoisuuden vaikutus *E. faecalis* -kannan kasvuun riippui mittaushetkestä. Kolmesta eri glyfosaattipitoisuudesta pienin (0,07 mg/ml) ei kasvultaan eronnut kontrollista yhdessäkään mittauspisteessä (Tukey-Kramerin post-hoc testit, $p>0,92$), mutta keskimäinen 0,27 mg/ml pitoisuus oli tilastollisesti kokonaisuudessaan merkitsevästi kontrollia heikkokasvuisempi ("Pienimmät kasvua haittaavat pitoisuudet"). Tässä pitoisuudessa kasvuero oli suurimmillaan viiden tunnin kohdalla, mutta ero pieneni yhdeksään tuntiin mennessä. *E. faecalis* -bakteerin MIC-arvo puhtaassa glyfosaatissa oli suurin glyfosaattipitoisuus 1,07 mg/ml; kasvu ei eronnut nollasta yhdessäkään aikapisteessä (parittaiset t-testit, $p>0,05$). *E. faecalis* oli kyseisissä olosuhteissa testatuista bakteereista yleisesti ottaen hidaskasvuisin laji – absorbanssi pysytteli alle 0,40:ssä (vrt. *S. enterica* -kannan absorbanssi jopa 2,23).

Roundup Flex: Roundup Flex -käsittelyssä glyfosaattipitoisuuden ja mittaushetken yhdysvaikutus oli merkitsevä (toistomittausanalyysi, $F_{10; 34}=16,26$; $p<0,0001$, kuva 15 b). Viidestä eri glyfosaattipitoisuudesta kaksi pienintä (0,07 ja 0,28 mg/ml) eivät kokonaisuudessaan eronneet tilastollisesti merkitsevästi kontrollista (Tukey-Kramerin post-hoc testit glyfosaattipitoisuuksille, järjestyksessä $t_{17}=2,65$; $p=0,14$ ja $t_{17}=1,45$;

$p=0,17$) – tosin 0,28 mg/ml:ssa kasvu oli ensimmäisessä mittauspisteessä merkitsevästi heikentynyt (Tukey-Kramerin post-hoc testi, $t_{29,21}=5,13$; $p=0,001$), mutta saavutti kontrollin yhdeksässä tunnissa (Tukey-Kramerin post-hoc testi, $t_{29,21}=0,00$; $p=1,00$). 1,07 mg/ml pitoisuudessa *E. faecalis* -bakteerin kasvu oli kaikissa aikapisteissä tilastollisesti merkitsevästi pienempi kuin kontrollikäsittelyssä (Tukey-Kramerin post-hoc testit aikajärjestyksessä, $t_{29,21}=13,70$; $t_{29,21}=13,55$; $t_{29,21}=10,75$; kaikissa $p<0,0001$) (ks. ”Pienimmät kasvua haittaavat pitoisuudet”). Suurimmissa pitoisuuksissa (4,31 ja 8,62 mg/ml) kasvu erosi ensimmäistä kertaa nolasta vasta 22 tunnin kohdalla (parittaiset t-testit järjestyksessä, $t_{29,21}=2,41$; $p=0,02$ ja $t_{29,21}=4,02$; $p=0,0004$).



Kuva 15. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212:n kasvu puhtaalla glyfosaatilla ja Roundup Flexillä käsiteltynä (pienimmän neliösumman keskiarvot ja 95 % luottamusvälit). a) *E. faecalis* -kannan kasvu kontrolli- ja glyfosaattikäsittelyissä kolmessa aikapisteessä puhtaassa glyfosaatissa $n=4$ /pitoisuus/mittauspiste. b) *E. faecalis* -kannan kasvu kontrolli- ja Roundup Flex-käsittelyissä kolmessa aikapisteessä mitattuna. $n=4$ /pitoisuus/mittauspiste, paitsi pitoisuudessa 4,31 mg/ml $n=3$ /mittauspiste. a–b) Absorbanssi kuvaa bakteerien kasvua ja eriväriset viivat erivahvuisia glyfosaattipitoisuuksia. Viivat eivät esitä bakteerien todellista kasvua mittauspisteiden välillä (kasvu ei välttämättä ole lineaarista pisteiden välillä), vaan ainoastaan selkeyttävät kuvaajaa. Absorbanssin mittauksessa $\lambda=600$ nm.

3.2.6 Pienimmät kasvua haittaavat glyfosaattipitoisuudet

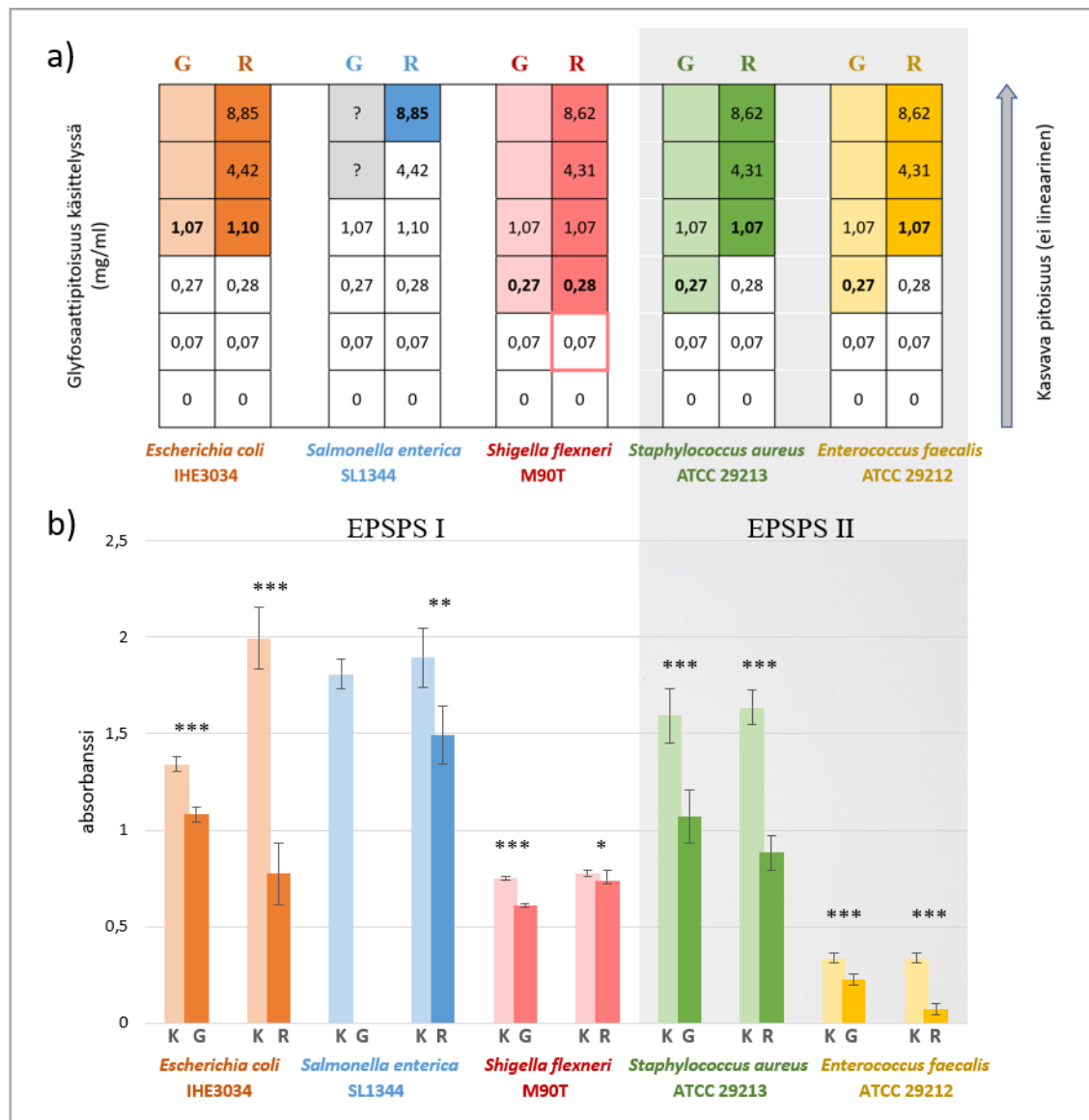
Glyfosaattikäsittelyn kasvua heikentävä vaikutus muuttui tilastollisesti merkitseväksi hieman eri pitoisuuksissa eri bakteerilajeilla (kuva 16). Joillakin lajeilla vaikutus riippui myös siitä, käsiteltiinkö niitä puhtaalla glyfosaatilla vai Roundup Flexillä. Kynnyspitoisuutena käsittelyn glyfosaattipitoisuutta, jossa ero kontrollikäsittelyyn oli tilastollisesti merkitsevä mittaushetkiä erittelemättä.

Sietokykyisin testatuista bakteereista oli *S. enterica*, jonka kasvu pieneni merkitsevästi vasta 8,85 mg/ml glyfosaattipitoisuudessa Roundup-käsittelyssä (Tukeyn post-hoc testi glyfosaattipitoisuuksille, $t_{18,41}=3,93$; $p=0,01$, kuva 16 b). Pienintä kasvuun vaikuttavaa pitoisuutta puhtaassa glyfosaatissa ei saatu selville, sillä edes voimakkaimmassa käsittelyssä (1,07 mg/ml) tilastollisesti merkitsevää vaikutusta ei ollut (Tukey-Kramerin post-hoc testi glyfosaattipitoisuuksille, $t_{10}=-0,09$; $SE=0,05$; $p=1,00$). *E. coli* puolestaan sietä bakteereista toiseksi parhaiten puhdasta glyfosaattia (Tukeyn post-hoc testi, ero kontrolliin merkitsevä 1,07 mg/ml pitoisuudessa, $t_{12}=10,18$; $p<0,0001$) – Roundup-kokeen sietokynnyksen ollessa kuitenkin samalla tasolla *S. aureus* ja *E. faecalis* -bakteerien kanssa (1,07–1,10 mg/ml) (kuva 16 a).

Vaikka *S. flexneri* -kannan kasvu Roundup-käsittelyssä oli poikkeuksellisesti merkitsevästi kontrollia suurempi pitoisuudessa 0,07 mg/ml, sen glyfosaatinsietokyky oli Roundup Flex -kokeista kuitenkin alhaisin verrattuna muihin bakteereihin. Pitoisuus 0,28 mg/ml aiheutti kasvun heikentymistä (Tukeyn post-hoc testi glyfosaattipitoisuuksille, $t_{20,11}=3,38$; $p=0,03$, kuva 16 b). Tämä kynnyspitoisuus oli kuitenkin samalla tasolla kuin puhtaan glyfosaatin kokeessa (0,27 mg/ml) (Tukeyn post-hoc testi glyfosaattipitoisuuksille, $t_{19,39}=22,59$; $p<0,0001$) – ja sama kuin *S. aureus* ja *E. faecalis* -kannoilla puhtaassa glyfosaatissa.

S. aureus ja *E. faecalis* reagoivat tilastollisesti merkitsevästi Roundup Flexiin vasta hieman suuremmassa glyfosaattipitoisuudessa (1,07 mg/ml) (Tukeyn (*S. aureus*) ja Tukey-Kramerin (*E. faecalis*) post-hoc testit glyfosaattipitoisuuksille, järjestyksessä $t_{20}=12,29$; $p<0,0001$ ja $t_{17}=14,72$; $p<0,0001$) kuin puhtaaseen glyfosaattiin (0,27 mg/ml) (Tukeyn post-hoc testit glyfosaattipitoisuuksille, järjestyksessä $t_{12,11}=5,75$; $p=0,0004$ ja $t_{12}=6,46$; $p=0,0002$).

Kaikissa kokeissa (*S. enterica* -kannan puhdasta glyfosaattia lukuun ottamatta) saatiin selville glyfosaattipitoisuus, jossa bakteerien kasvu (absorbanssi) heikentyi tilastollisesti merkitsevästi kontrolliin verrattuna (Tukeyn ja Tukey-Kramerin post-hoc testit, kaikissa $p\leq 0,03$). Kuvassa 16 b esitetään tämän ratkaisevan glyfosaattipitoisuuden keskiabsorbanssi kullekin käytetylle bakteerikannalle ja glyfosaattikäsittelylle (puhdas glyfosaatti ja Roundup Flex).



Kuva 16. Eri bakteerikantojen glyfosaatinsietokyky pitoisuuksittain: a) pienin kasvuun negatiivisesti vaikuttava glyfosaattipitoisuus sekä b) sen absorbanssi kontrolliin verrattuna.

a) Värilliset ruudut kuvaavat glyfosaattipitoisuuksia, joilla oli haitallinen vaikutus kasvuun. Pienin glyfosaattipitoisuus, jossa negatiivinen vaikutus bakteerien kasvuun (=ero kontrolliin verrattuna oli tilastollisesti merkitsevä (kaikissa $p \leq 0,03$)), on lihavoitu. Valkoiset ruudut kuvaavat pitoisuuksia, joissa glyfosaatti ei vaikuttanut kasvuun. *Salmonella enterica* -kannalla puhdas glyfosaattipitoisuus ei suurimmillaankaan (1,07 mg/ml) vaikuttanut kasvuun, joten vaikuttava pitoisuus on tuntematon (merkitty "?"). *Shigella flexneri* -kannan Roundup-käsittelyssä kasvu oli kontrollia suurempi pitoisuudessa 0,07 mg/ml (punaiset reunukset). G = Puhdas glyfosaatti, R = Roundup Flex.

b) Kuvan absorbanssit ovat keskiabsorbansseja a-kohdassa lihavoiduilla kynnyspitoisuuksilla (95 % luottamusväli). Käsittelypitoisuus siis vaihtelee kuvassa. Kuva kertoo glyfosaatin vaikutuksen voimakkuudesta (tilastollinen merkitsevyys (*)) kyseisessä kynnyspitoisuudessa puhtaassa glyfosaatissa (G) ja Roundup Flexissä (R) verrattuna kontrolliin (K, vaaleammat palkit). *S. enterica* -bakteerin kasvuun vaikuttava pitoisuus puhtaassa glyfosaatissa oli tuntematon, joten kohta on jätetty tyhjäksi. Suurempi absorbanssi kuvaa suurempaa kasvua. Kullakin bakteerilla $n=4$ /käsittely.

4. Pohdinta

4.1 Suolistobakteerien glyfosaattisensitiivisyys bioinformatiivisten tulosten valossa

4.1.1 EPSPS-luokkien osuudet suolistomikrobistossa

Ihmisen suolistobakteerien EPSPS-luokituksiin perustuen lajien glyfosaattisensitiivisyydessä on vaihtelua. Valtaosalla yleisistä 101 lajista (54 %) löytyy ainoastaan glyfosaatille sensitiivisiä EPSPS I -muotoja entsyymistä, kun taas ainoastaan resistenttejä EPSPS II tai III -muotoja löytyy 29 prosentilta lajeista. Mesnage ja Antoniou (2020) raportoivat samansuuntaisia tuloksia; 44:stä ihmisen yleisestä suolistobakteerikannasta 75 %:lla oli EPSPS I ja 20 %:lla EPSPS II (muuta luokituksia ei huomioitu tai eritelty). Vastaavia tutkimuksia ei juuri ole tehty, mihin lienee ollut yhtenä syynä sopivan sekvenssilinjaustyökalun puute. Tässä tutkielmassa käytettyä bioinformatiikkatyökalua voi jatkossa hyödyntää eri organismien EPSPS-luokitusten laajemmaksi selvittämiseksi (Leino ym., 2021; liite 4).

Edellä mainitut osuudet eivät suoraan kerro sensitiivisten tai resistenttien bakteerien absoluuttista määrää suolistossa, sillä bakteerien runsaus lajeittain vaihtelee. Tämän vuoksi runsaimpana esiintyviä lajeja kannattaa tarkastella tarkemmin; kymmenestä yleisimmin ja runsaimmin esiintyvistä lajista neljällä oli glyfosaattisensitiivinen EPSPS, neljällä resistentti EPSPS ja kaksi oli vaille EPSPS-luokitusta. Näin ollen verrattain suuri osa suoliston hallitsevimmistä mikrobistosta on glyfosaatille potentiaalisesti sensitiivistä, mikä voi olla riski suoliston mikrobitasapainolle. Koska bakteerilajistossa on vaihtelua ihmisten välillä, henkilöstä riippuen glyfosaattisensitiiviset bakteerit muodostavat vähintään 12–26 % koko suolistomikrobistosta (laskettu Qinin ym. (2010) lisämateriaalitaulukon 8 pohjalta). Resistenttiin EPSPS III -luokkaan kuului vain yksi tutkituista lajeista (*Alistipes putredinis*), eikä luokkaa IV havaittu lainkaan. Nämä EPSPS-luokat on aiemminkin havaittu muita harvinaisemmiksi (Rainio ym., 2021).

Suolistobakteereista kymmenesosalla on ainoastaan EPSPS-entsyymejä, jotka eivät täsmää mihinkään nykyisin määritettyyn luokkaan – niiden glyfosaatinsietokyvystä ei siis ole teoreettista pohjaa. Näiden tunnistamattomien EPSPS-muotojen ja niiden glyfosaatinsietokyvyn määrittämiseksi tarvitaankin lisätutkimusta. Lisätutkimusta vaatii myös se, kuinka suurella osalla suolistobakteereista ylipäänsä on aktiivinen sikimaattikierto, sillä tässä tutkielmassa analysoitiin vain täydellisiä, tunnettuja EPSPS-sekvenssejä. On mahdollista, että osa suolistobakteereista kykenee ottamaan

tarvitsemansa aminohapot ympäristöstään (toisin sanoen ihmisen aminohappopitoisesta ravinnosta) sen sijaan, että tuottaisivat niitä itse, ja pystyvät näin kiertämään glyfosaatin vaikutuksen (Nielsen ym., 2018; Mesnage & Antoniou, 2020). Mesnage ja Antoniou (2020) arvioivat tutkimuksessaan, että transkriptiivisesti aktiivinen sikimaattikierto puuttuu valtaosalta (65 %) suolistobakteereista, mikä kuitenkin poikkeaa omista löydöksistäni: valtaosalta tutkimistani bakteereista (esim. 75 yleisimmästä suolistobakteerikannasta (Qin ym., 2010) yli 85 %:lla) nimittäin löytyi täydellinen EPSPS-aminohapposekvenssi.

EPSPS-luokitus voi vaihdella bakteerisukujen sisällä huomattavasti, kuten *Ruminococcus*-suvun lajien välillä. Myös lajinsisäistä vaihtelua EPSPS-luokituksessa esiintyy jonkin verran (7 %:lla lajeista), mutta enimmäkseen saman lajin kantojen sekvenssit muistuttavat toisiaan, eikä variaatio useimmiten paljasta lajinsisäisiä eroja glyfosaattisensitiivisyydessä. Tämä kertoo sikimaattikierron konservoituneesta asemasta ja yleisyydestä suolistobakteerien keskuudessa (Mesnage & Antoniou, 2020; Rainio ym., 2021). Huomiota kuitenkin herättää *Bifidobacterium adolescentis*, jolta poikkeuksellisesti löytyi 27 sensitiivisen EPSPS I -sekvenssin lisäksi yksi EPSPS II -sekvenssi, mikä voisi viitata resistenssin kehittymiseen esimerkiksi horisontaalisen geeninsiirron kautta. Ei myöskään ole poissuljettua, että resistenttejä kantoja olisi kehittynyt niilläkin lajeilla, jotka sisältävät toistaiseksi luokittelemattomia EPSPS-sekvenssejä.

4.1.2 Glyfosaatin mahdolliset vaikutukset suolistomikrobiyhteisöön

Glyfosaatti voi mahdollisesti aiheuttaa monitahoisia terveysvaikutuksia vaikuttamalla eri lailla eri lajien ja sukujen bakteereihin. Tämän vuoksi on tärkeää tarkastella esimerkiksi erityisen hyödyllisiä, haitallisia tai runsaana esiintyviä suolistobakteerilajeja tai -sukuja. Esimerkiksi *Bacteroides*-suvun lajit, kuten *B. uniformis* ja *B. vulgatus*, ovat yleisiä suolistomikrobeja ja muodostavat monimutkaisen ja yleisesti ottaen hyödyllisen suhteen isäntäänsä (Wexler, 2007). Suvussa esiintyy kuitenkin myös suoliston ulkopuolella infektiota aiheuttavia patogeeneja (Wexler, 2007). Bioinformatiivisen analyysin perusteella useimmilla *Bacteroides*-suvun lajeilla on glyfosaatille herkkä EPSPS-muoto. Mikäli luokan I EPSPS heikentäisi *Bacteroides*-bakteerien selviytymistä suolistossa, vaikutus suoliston mikrobiyhteisöön olisi suuri. Eläimillä tehdyissä kokeissa on todettu,

että glyfosaattialtistus voi vähentää *Bacteroides*-bakteerien määrää suolistossa (Nielsen ym., 2018).

Erityisen hyödyllisiä bakteereja ihmisen terveydelle löytyy myös *Bifidobacterium*-suvusta. Runsaana esiintyvät *B. breve*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. catenulatum* ja *B. pseudocatenulatum* ovat probioottisia lajeja, joilla on todettu terveyttä edistäviä vaikutuksia (Delgado ym., 2008; Gerritsen ym., 2011). Näillä lajeilla on luokan I glyfosaattisensitiivinen EPSPS, mikä voisi hankaloittaa bakteerien selviämistä suolistossa glyfosaatin läsnä ollessa. Tästä on viitteitä aiemmista eläin- ja in vitro -kokeista (Shehata ym., 2013; Nielsen ym., 2018). Glyfosaattialtistus voisi potentiaalisesti *Bifidobacterium*-bakteereja vähentämällä vaikuttaa negatiivisesti ihmisen terveyteen.

Esimerkiksi yleistä ärtyvän suolen oireyhtymää (IBS) sairastavilla *Bifidobacterium* ja *Faecalibacterium* spp. määrän on havaittu olevan puolitoistakertaisesti terveitä verrokkeja pienempi (Rajilić-Stojanović ym., 2011). Myös *Citrobacter*-suvun edustus oli potilailla vähentynyt (Giamarellos-Bourboulis ym., 2015). Edellä mainittujen sukujen lajit sisälsivät tässä tutkielmassa glyfosaattisensitiivisiä EPSPS I -entsyymejä. Lisäksi IBS-potilailla puolitoista kertaa runsaammin esiintyvillä *Dorea*, *Ruminococcus* ja *Clostridium* spp. -lajeilla (Rajilić-Stojanović ym., 2011) oli tässä tutkielmassa enimmäkseen glyfosaattiresistenttejä EPSPS II -entsyymejä. Syy-seuraussuhteita on vaikea määrittää, mutta glyfosaattialtistus tuskin ainakaan auttaa IBS-potilaita, joiden suolistossa jo muutoinkin glyfosaattisensitiiviset bakteerisuvut ovat vähentyneet ja glyfosaattiresistentit lisääntyneet. Runsaasti glyfosaattia sisältävän länsimaisen ruokavalion (mm. pakkotuleennutettua vehnää) on arveltu edistävän suoliston dysbioosin kautta useita tulehduksellisia ruuansulatuselimistön häiriöitä (Samsel & Seneff, 2013; Tsiaoussis ym., 2019; Barnett & Gibson, 2020). Myös *Escherichia* ja *Shigella* -sukujen lajeja esiintyi enemmän IBS-potilailla (Giamarellos-Bourboulis ym., 2015), joskin *Escherichia coli* ja etenkin *Shigella flexneri* olivat tässä tutkielmassa laboratoriokokeiden ja EPSPS:n perusteella melko herkkiä glyfosaatille.

Glyfosaatin suora vaikutus bakteereihin ei ole ainoa mikrobiyhteisöä mahdollisesti muokkaava tekijä, sillä bakteerien väliset vuorovaikutukset ovat suuressa osassa yhteisön muodostumisessa. Useiden bakteerien tiedetään olevan antagonisteja muille bakteereille (kuten *Enterococcus faecium* patogeenisille *Listeria* sp., *Clostridium butyricum* ja *Clostridium perfringens* -bakteereille) tuottamalla bakteriosiineja (Klaenhammer, 1993; Shehata ym., 2013; Juturu & Wu, 2018). Glyfosaatti saattaa esimerkiksi olla merkittävä tekijä *Clostridium botulinum* -infektioiden määrän kasvussa saksalaisessa karjassa, sillä

se voi toksisuudellaan vähentää *Enterococcus* spp. -bakteerien määrää suolistossa ja näin välillisesti lisätä normaalisti suppressoitujen *Clostridium*-bakteerien määrää (Krüger ym., 2013). On havaittu viitteitä siitä, että glyfosaattialtistus hyödyttää suoliston haitallisia bakteereja, kuten *Salmonellaa*, ja toisaalta haittaa useita hyödyllisiä bakteereja, kuten *Enterococcus*-lajeja (Shehata ym., 2013). Tämänkaltaiset vuorovaikutukset, jossa glyfosaatti antaa kilpailuedun sietokykyisemmille bakteereille, voisivat johtaa bakteerilajien runsaussuhteiden muutoksiin ja suolistomikrobiston monimuotoisuuden vähenemiseen. Jatkotutkimuksia glyfosaatin mahdollisista vaikutuksista antagonistisiin bakteereihin ja yleisesti mikrobiekologiaan tarvitaan, sillä tutkimusta glyfosaatin todellisista vaikutuksista ihmisen mikrobistoon on tehty vain vähän, ja glyfosaatin kokonaisvaikutusten arvioinnin osalta (lähinnä eläin- ja laboratoriokokeita) kirjallisuus on osin ristiriitaista (esim. Mesnage & Antoniou, 2020; Nielsen ym., 2018; Shehata ym., 2013).

Tämän tutkielman bakteerilajisto rajoittuu aiemmassa Qin ym. tutkimuksessa havaittuun suolistomikrobilajistoon, eikä siksi sisällä kaikkia ihmisen ruuansulatuskanavasta löydettyjä bakteerikantoja ja -lajeja. Kirjoittajat toteavatkin, että todellinen suoliston hallitseva mikrobisto on laajempi kuin esitetty (Qin ym., 2010). Pohja-aineiston käsittelyn teki haasteelliseksi ilmoitettujen bakteerien vaihtelevat taksonomiset tasot, minkä johdosta spesifisti suolistobakteereiksi ilmoitettujen kantojen lisäksi kokonaisaineistossa voi esiintyä myös kantoja, jotka eivät ole peräisin suolistosta. Nämäkin kannat kuuluvat kuitenkin ylemmille taksoneille, joita on suolistosta löydetty. Toinen rajoittava tekijä tutkielman bioinformatiivisessa osiossa on tietokantojen keskeneräisyys, jonka vuoksi bakteerien EPSPS-proteiinisekvenssejä ei kaikille bakteerikannoille löytynyt. Osittain tähän voi olla syynä myös aiemmin mainittu transkriptiivisesti epäaktiivinen sikimaattikierto, jota saattaa esiintyä useilla bakteereilla (Mesnage & Antoniou, 2020).

4.2 Suolistobakteerien glyfosaattisensitiivisyys in vitro -kokeiden valossa

4.2.1 Glyfosaattivalmisteiden vaikutus suhteessa EPSPS-luokitukseen

Laboratoriokokeissa käsiteltiin viittä eri bakteerikantaa puhtaalla glyfosaatilla ja Roundup Flex -glyfosaattivalmisteella. Hypoteesina oli, että kannat, joilla on sensitiivinen EPSPS I -sekvenssi, olisivat herkempiä glyfosaatin vaikutukselle kuin

kannat, joilla on glyfosaattiresistentti EPSPS II -entsyymi. Tulokset ovat monitahoisia: glyfosaatilla oli negatiivinen vaikutus etenkin *Shigella flexneri* ja *Escherichia coli* -kantojen (EPSPS I) kasvuun melko matalissa pitoisuuksissa. Kuitenkin *Staphylococcus aureus* ja *Enterococcus faecalis*, joilla on glyfosaattiresistentti EPSPS II -entsyymi, olivat puhtaalle glyfosaatille käytännössä yhtä herkkiä kuin sensitiivinen *E. coli*, ja Roundup Flex -käsittelyssä jopa herkempiä. *Salmonella enterica*, jolla on glyfosaattisensitiivinen EPSPS I, puolestaan osoitti huomattavan suurta glyfosaatinsietokykyä. Bakteerien tunnetun EPSPS-luokituksen ja laboratoriossa todetun glyfosaattiherkkyyden välillä on siis epäjohdonmukaisuuksia, joista löytyy rajallisesti aikaisempaa tietoa, sillä usein EPSPS-luokituksia ei ole tehty laboratoriossa testatuille kannoille. Epäjohdonmukaisuudet voivat kuitenkin johtua bakteereissa esiintyvistä muista kuin EPSPS-luokituksiin liittyvistä glyfosaatin toiminta- ja torjuntamekanismeista. Näitä mekanismeja pohditaan myöhemmin.

In vitro -kokeissa selvinneistä glyfosaatin vaikuttavista pitoisuuksista löytyy kuitenkin vertailukohtia. *E. coli* -bakteerin glyfosaattisensitiivisyyden on aikaisemmassa tutkimuksessa todettu vaihtelevan suuresti kannasta riippuen; esimerkiksi Boten ym. (2019) 238 *E. coli* -kannan tutkimuksessa patogeeniset kannat olivat glyfosaatille sietokykyisempiä kuin kommensalistiset kannat, ja kaikkien kantojen MIC-arvo oli keskimäärin matalampi glyfosaatin isopropyyliamiinisulolassa (7,4 mg/ml) kuin Roundup LB Plus -valmisteessa (29,6 mg/ml). Tutkimus tukee tämän tutkielman tuloksia, sillä *E. coli* IHE3034:n MIC-arvoksi Roundup Flexissä osoittautui 8,85 mg/ml, mikä on edellä mainittujen arvojen välillä. Toisaalta Shehatan ym. (2013) tutkimus esitti *E. coli* MIC-arvoksi 1,2 mg/ml (Roundup UltraMax®), joka on matalampi kuin tässä ja Boten ym. (2019) tutkimuksissa. MIC-arvojen määrittämiseksi Bote ym. käyttivät bakteerisuspensioiden visuaalista tarkastelua ja Shehata ym. kasvun arviointia kiinteältä agar-kasvatusalustalta. Erot mm. metodeissa ja glyfosaattivalmisteissa voivat osaltaan selittää eroja havaituissa MIC-arvoissa. Lisäksi tässä tutkielmassa hajonta *E. coli* -bakteerin Roundup Flex -kokeen viimeisellä mittauskerralla oli suurempaa kuin muilla mittauskerroilla, vaikka hajonta testiryhmissä olikin pääasiassa pientä. Suurentunut hajonta saattaa vähentää viimeisen mittauskerran tulosten luotettavuutta toisiaan lähellä olevien käsittelyjen osalta.

EPSPS-entsyymiltään sensitiivinen (EPSPS I) *S. enterica* osoittautui huomattavan sietokykyiseksi, sillä kasvu häiriintyi vasta 8,85 mg/ml pitoisuudessa (Roundup Flex). Tämäkään pitoisuus ei kuitenkaan estänyt kasvua kokonaan. *S. enterica* -bakteerin MIC-

arvot aiemmissakin tutkimuksissa osoittavat korkeaa vastustuskykyä glyfosaatille: kannasta ja glyfosaattivalmisteesta riippuen MIC-arvo on vaihdellut 10–80 mg/ml välillä – ollen kuitenkin jälleen matalampi Shehatan ym. tutkimuksessa (5,0 mg/ml) (Shehata ym., 2013; Pöppe ym., 2019). Puhtaalla glyfosaatilla ei huonon liukoisuuden vuoksi (max 1,2 mg/ml) päästy tässä kokeessa niin suuriin pitoisuuksiin, että *S. enterica* -kannan kasvu olisi häiriintynyt. Kyseinen pitoisuus olisi kuitenkin muista bakteerikannoista päätellen todennäköisesti lähellä Roundup Flex -kokeen vaikuttavaa pitoisuutta.

S. flexneri (EPSPS I) oli laboratorioskokeissa bakteereista herkin glyfosaatille (0,27 ja 0,28 mg/ml puhtaassa glyfosaatissa ja Roundup Flexissä), mikä käy yksiin sen sensitiivisen EPSPS-muodon kanssa. MIC-arvoa ei tässä tutkielmassa käytetyillä tiukoilla kriteereillä saatu määritettyä, vaikkakin pitoisuudessa 1,07 mg/ml kasvu oli sekä glyfosaatissa että Roundup Flexissä täysin estynyt 9,5 tunnista lähtien. *S. flexneri* -lajin EPSPS-luokituksesta tai glyfosaatin vaikutuksesta bakteeriin laboratorio-olosuhteissa ei juuri löydy aikaisempaa tietoa, joten tämän tutkielman tulokset voivat toimia suuntaa-antavina jatkotutkimuksia varten.

Myös *S. aureus* -lajin glyfosaattivastetta laboratoriossa on tutkittu hyvin vähän, mutta bakteerin EPSPS-sekvenssin on aiemminkin todettu olevan luokkaa II, jolla on korkea toleranssi glyfosaatille ja joka säilyttää affiniteettinsa glyfosaatin substraatille PEP:lle (Priestman ym., 2005). Rajoituksena EPSPS-luokituksen tarkastelulle on epätietoisuus testaamani *S. aureus* -kannan tarkasta EPSPS-sekvenssistä. Laboratorioskokeet viittaavat suhteellisen alhaiseen glyfosaatinsietokykyyn sekä tässä että aiemmassa tutkimuksessa: MIC-arvoksi on aiemmin esitetty hieman matalampaa pitoisuutta (MIC=0,3 mg/ml, Roundup UltraMax®, Shehata ym., 2013) kuin tässä tutkielmassa (MIC=1,07 mg/ml, puhdas glyfosaatti). Roundup Flex -kokeessa *S. aureus* -kannan kasvu puolestaan estyi vasta suuremmassa 4,31 mg/ml pitoisuudessa 9,5 tunnista eteenpäin, vaikkakaan varsinaista MIC-arvoa ei saatu määritettyä.

E. faecalis -bakteerin (EPSPS II) glyfosaattisensitiivisyyttä on tutkittu vain vähän, mutta aiemmin havaitut MIC-arvot (0,3–0,15 mg/ml, Roundup UltraMax®) (Shehata ym., 2013, 2014) ovat hieman matalammat kuin tässä tutkimuksessa havaittu 1,07 mg/ml (puhdas glyfosaatti). Roundup Flex- käsittelyssä bakteerien kasvun häiriintyminen vaati korkeamman pitoisuuden (1,07 mg/ml) kuin puhtaassa glyfosaatissa, mutta MIC-arvoa ei saatu määritettyä.

Enemmistö aiemmista tutkimuksista esittää, että bakteerit tai esimerkiksi nisäkässolut ovat puhdasta glyfosaattia herkempiä kauppavalmisteille, jotka sisältävät apu- ja tehosteaineita (esim. Clair ym., 2012; Nielsen ym., 2018; Van Bruggen ym., 2018; Nerozzi ym., 2020). Esimerkiksi Shehatan ym. (2013) tutkimuksessa samat bakteerilajit kuin tässä tutkielmassa (pois lukien *S. flexneri*) vaikuttivat systemaattisesti olevan herkempiä Roundup UltraMaxille® kuin kummallekaan itse käyttämälleni glyfosaattituotteelle (puhdas glyfosaatti ja Roundup Flex). Erot kauppavalmisteiden välillä voivat johtua esimerkiksi eroista apuaineissa, mutta näitä on vaikeaa määrittää, sillä valmisteiden tarkka koostumus ei ole tiedossa. Päinvastaisiakin tuloksia, joissa pelkkä glyfosaatti on kaupallisia valmisteita toksisempaa, kuitenkin esiintyy (Bote ym., 2019; Pöppe ym., 2019). Tässä tutkielmassa bakteerikannat olivat joko hieman herkempiä puhtaalle glyfosaatille kuin Roundup Flexille (*S. aureus*, *E. faecalis*) tai yhtä herkkiä (*E. coli*, *S. flexneri*). Tulokseen saattaa vaikuttaa elatusaineeseen lisätyn nesteen (vesi+glyfosaattiliuos) pienempi kokonaismäärä Roundup Flex -kokeissa.

4.2.2 Laboratoriokokeiden rajoitteet ja virhelähteet

Laboratoriokokeitteni tulosten eroja verrattuna muihin tutkimuksiin selittävät erot käytetyissä elatusaineissa, glyfosaattivalmisteissa, bakteerikannoissa ja yleisesti metodeissa, sillä esimerkiksi herbisidien MIC-arvojen määrittämiseen ei ole vakiintunutta testaustapaa (Bote ym., 2019; Pöppe ym., 2019). Vakiintumattomien käytäntöjen on todettu olevan yleinen ongelma vastaavissa glyfosaattitutkimuksissa (Barnett & Gibson, 2020). Tuloksia aikaisempiin tutkimuksiin verratessa tulee myös huomioda, että tutkielmassa testipitoisuuksia oli rajattu määrä, mikä pienentää tulosten tarkkuutta. Jos pitoisuuksia olisi ollut enemmän, bakteereihin vaikuttavat glyfosaattimäärät olisivat voineet löytyä jo hieman alemmissa pitoisuuksissa. Saman tyyppistä menetelmää pitoisuuksien osalta tosin on käytetty useissa muissakin tutkimuksissa (esim. Shehata ym., 2013).

Jatkuvia mittauksia tekevää laitteistoa ei ollut saatavilla, joten sattumalla on merkitystä siinä, mihin kohtaan bakteeriston epälineaarista kasvukäyrää mittaukset osuivat. Tulevaisuudessa tutkimus olisi tehokkainta suorittaa reaaliaikaisesti bakteerikasvua seuraavalla kasvatuskaapilla. *S. flexneri* -bakteerilla tehdyissä kokeissa esiintyneet tilastollisesti merkitsevästi nollaa pienemmät absorbanssiarvot selittyvät sillä, että mittaus tehtiin puhtaalla elatusaineella nollatulla spektrofotometrillä. Elatusaine ei siis

sisältänyt glyfosaattia, Roundup Flexiä, lisättyä vettä tai bakteereja. Tämä on kuitenkin vakiintunut tapa nollata spektrofotometri. Kasvatuskokeissa ei ollut mukana kovariaatteja, mutta sellainen olisi voinut olla vaikkapa hetkellä 0 mitattu bakteerisuspensioiden absorbanssi.

E. coli ja *S. enterica* -bakteereja kasvatettiin eri elatusaineessa (LB) kuin muita kolmea lajia (NB), mikä saattaa esimerkiksi mahdollisten fenyyialaniini-, tyrosiini- ja tryptofaani-aminohappojen läsnäolosta riippuen vaikuttaa bakteerien kasvuun, sillä bakteerit saattavat kyetä korvaamaan glyfosaatin takia menettämänsä sikimaattikierron aminohapot suoraan kasvualustasta saatavilla aminohapoilla (Nielsen ym., 2018; Bote ym., 2019). LB sisälsi tarkemmin määrittelemättömiä tryptoneja ja NB peptidejä, joista molemmat voivat toimia bakteereille aminohappojen lähteenä. Tällä koeasetelmalla vaikutusta ei kuitenkaan pystytty määrittämään. Elatusaineiden pH:ta ei myöskään kontrolloitu, joten jää mahdolliseksi, että Roundup Flex-, glyfosaatti- ja kontrollikasvualustoissa bakteerit reagoivat mahdolliseen happamuuden vaihteluun.

Tulosten yleistettävyyttä ajatellen tulee huomata, että olosuhteet in vitro -kokeissa eroavat huomattavasti bakteerien luonnollisesta ympäristöstä esimerkiksi ihmisen suolistossa, eikä esimerkiksi anaerobisia suolistobakteereja ollut lainkaan mahdollista testata. Koska saman lajin eri kantojen välillä esiintyy vaihtelua glyfosaattiherkkyydessä (Bote ym., 2019; Pöppe ym., 2019), testaamiani kantoja ei voi yleistää edustamaan koko lajia.

Ihmisten ravinnossa sekä virtsassa esiintyvistä glyfosaattijäämistä on kohtuullisesti tietoa saatavilla, mutta glyfosaatin määrä ihmisen suolistossa on yhä kysymysmerkki. Siksi on haastavaa arvioida laboratoriokokeissa käytettyjen glyfosaattipitoisuuksien relevanssia oikean elämän suhteen. Eräässä katsauksessa eurooppalaisten ja yhdysvaltalaisen henkilöiden virtsasta löydetyn glyfosaatin määrä vaihteli välillä 0–29 µg/l (ammattiviljelijällä jopa 233 µg/l), kun altistuminen oli tapahtunut hengitysteitse, ihokontaktina tai ravinnon välityksellä (Niemann ym., 2015). Tässä tutkielmassa testatut pitoisuudet ovat siis todennäköisesti reilusti suurempia kuin glyfosaatin todellinen määrä suolistossa. Ne toimivat kuitenkin glyfosaattivasteen mallintamisessa laboratoriossa. Virtsanäytteiden perusteella eurooppalaisten glyfosaattialtistus voi olla kasvussa johtuen glyfosaatin lisääntyneestä käytöstä maataloudessa viime vuosikymmeninä ja suuremmista jäämämääristä tuontielintarvikkeissa (Niemann ym., 2015). Glyfosaatin pitoisuuksista suolistossa ja esimerkiksi suolistoon kertymisen mahdollisuudesta tarvitaan lisää tutkimusta.

4.2.3 Bakterien sopeutuminen glyfosaattiin ja antibiootteihin

Kirjallisuudessa useimmiten tarkasteltujen MIC-arvojen lisäksi on mielekäästä tarkastella pienimpiä vaikuttavia pitoisuuksia, koska jo pieni haitta voi suolistomikrobiyhteisössä antaa kilpailuedun muille bakteereille ja näin vaikuttaa mikrobien valtasuhteisiin. Subletaalit pitoisuudet ovat myös merkityksellisiä ympäristöstä tulevan vähäisen altistuksen mallintamisessa. Subletaalia altistusta on tutkittu melko vähän, mutta mahdollisen glyfosaatin sietokyvyn kasvun lisäksi (Pöppe ym., 2019) glyfosaattialtistuksen on todettu muuttavan bakteerien vastetta eri antibiooteille (Kurenbach ym., 2015, 2017; Bote ym., 2019). Toisaalta myös lisääntynyt antibioottien tai muiden kemikaalien käyttö voi kasvattaa bakteerien sietokykyä glyfosaatille ja muille antimikrobisille aineille (Van Bruggen ym., 2018; Pöppe ym., 2019). Muun muassa solusta useita haitallisia aineita poistavien pumppujen (engl. multi-drug efflux pumps) yliekspression kautta bakteerien on mahdollista kehittää yhteis- ja ristiresistenssiä sellaisia aineita vastaan, joille ei ole edes tapahtunut altistumista (Pöppe ym., 2019). Patogeenisten bakteerien suuremman glyfosaatinsietokyvyn syyksi on myös esitetty patogeenien tehokkaampaa reagointia stressiin ja yleisesti parempaa kykyä sopeutua häiriötekijöihin (Bote ym., 2019; Chowdhury ym., 1996). Tässäkin tutkielmassa bakteerien glyfosaatinsietokykyä saattaa jossakin määrin selittää se, että tutkimuslajit olivat patogeeneja tai potentiaalisia patogeeneja. Myös probioottisten bakteerien glyfosaatinsietoa olisi hyvä jatkossa tutkia.

Mahdollisesta bakteerien sopeutumiskyvystä tai jopa glyfosaatin hajottamisesta subletaalissa konsentraatiossa (tai toisaalta spontaanista hajoamisesta inkubaation aikana) saattaa olla viitteitä tässäkin tutkielmassa, sillä *E. coli* ja *S. enterica* (Roundup Flex), *E. faecalis* (puhdas glyfosaatti) sekä *S. aureus* -bakteereilla (molemmat) on havaittavissa viivevaihe ennen kasvuun lähtöä. Aiemmassakin tutkimuksessa on havaittu vastaavaa viivettä glyfosaattikäsittelyssä; Roundupilla® ja puhtaalla glyfosaatilla (0,08 mg/ml) käsiteltyllä *E. coli* -bakteerilla havaittiin reilun kymmenen tunnin viive ennen kasvun kiihtymistä (Nielsen ym., 2018). Syitä viiveeseen on spekuloitu vähän. Jotkin proteobakteereihin, aktinobakteereihin ja bakterioideihin kuuluvat bakteerit kuten *E. coli* kykenevät hajottamaan glyfosaattia käyttämällä hiili-fosfori-lysaasireittiä, jossa glyfosaatin kemiallisesti vakaa hiili-fosforisidos hajotetaan ja fosfori vapautuu bakteerin kasvun tarpeisiin (Mesnage & Antoniou, 2020; Stosiek ym., 2020).

Suolistobakteereistakin on jo löydetty joitakin glyfosaattia mahdollisesti hajottavia kantoja (Mesnage & Antoniou, 2020). Glyfosaatin hajottamiseen kykenevien, ihmisen suolistossa esiintyvien kantojen selvitys on jatkotutkimuksen aihe, kuin myös se, kertooko kasvun kiihtyminen jotakin bakteerin yleisestä sopeutumiskyvystä antimikrobisia aineita vastaan.

S. aureus ja *E. faecalis* ovat molemmat sekä ihmisen normaaliflooraa että potentiaalisia patogeeneja, joiden glyfosaattialtistus saattaa evoluution tai stressivasteen johdosta hankaloittaa infektioiden hoitoa heikentämällä bakteerien vastetta antibiooteille (Kurenbach ym., 2015; Pöppe ym., 2019). *Enterobacteriaceae*-heimoon kuuluvien bakteerien (kuten tässä testatut *E. coli*, *S. enterica* ja *S. flexneri*) suuri esiintyvyys ihmisen ulostenäytteissä on yhdistetty suurentuneeseen kuolemanriskiin seuraavan 15 vuoden aikana (Salosensaari ym., 2021), ja vaikka *S. flexneri* osoittautui melko glyfosaattiherkäksi, *E. coli* ja *S. enterica* -bakteereilla on vähintäänkin potentiaalia kehittää korkeampi glyfosaatin- ja/tai antibiootinsietokyky (Kurenbach ym., 2015, 2017), ja mahdollisesti vaikuttaa ihmisen terveyteen lisääntyessään suolistomikrobistossa.

4.3 Muita glyfosaatin toimintaan vaikuttavia mekanismeja EPSPS-luokan lisäksi

MIC-arvojen suhteellinen mataluus sekä *E. faecalis* että *S. aureus* -bakteerien osalta viittaa siihen, että glyfosaatti vaikuttaa näihin resistentin EPSPS II -entsyymiin omaaviin bakteereihin jonkin muun mekanismin kuin PEP-substraatin toiminnan estämisen kautta. Toisaalta ainakin *S. enterica* -bakteerilla, jolla on glyfosaattisensitiivinen EPSPS I, on luultavasti jokin mekanismi glyfosaatin vaikutuksen kiertämiseksi. Käytännössä bakteerien glyfosaattivasteeseen vaikuttavat tekijät liittyvät joko suoraan EPSPS:ää koodaavan *AroA*:n ominaisuuksiin ja muutoksiin (glyfosaatin nk. ”target site”), muihin solun toimintaan liittyviin mekanismeihin (nk. ”non-target site”) tai molempiin.

Alun perin glyfosaatille herkkäkin kanta voi kasvattaa glyfosaatinsietokykyään erilaisten *AroA*:n mutaatioiden kautta. Mutaatioita voi tapahtua joko EPSPS:n aktiivista keskusta tai sen ulkopuolista aminohapposekvenssiä koodaavassa DNA:ssa (Heap & Duke, 2018). Yksinkertaisin on sellainen pistemutaatio *AroA*:ssa, mikä johtaa yhden EPSPS-aminohapon vaihtumiseen (Sammons & Gaines, 2014). Esimerkiksi niin resistentissä rikkakasvissa (*Chloris virgata*) kuin bakteereissakin (*E. coli* ja *Salmonella typhimurium*) yhden emäsparin vaihtuminen, mikä johtaa aminohappo Pro106:n korvautumiseen esimerkiksi seriinillä, saa aikaan glyfosaattiherkkyyden vähenemisen (Nandula, 2010;

Heap & Duke, 2018). Tämä johtuu siitä, että vaikka Pro106 ei ole suorassa molekulaarisessa yhteydessä glyfosaattiin, sen korvautuminen toisella aminohapolla, kuten seriinillä tai leusiinilla, muuttaa EPSPS:n aktiivisen keskuksen rakennetta estäen glyfosaatin sitoutumisen (Sammons & Gaines, 2014). Kasveissa vaihtelevan voimakasta resistenssiä aiheuttavat pistemutaatiot, jotka muuttavat mm. jotakin seuraavista EPSPS:n aktiivisen keskuksen aminohapoista: Gly101, Thr102, Pro106, Gly144 tai Ala192 (Sammons & Gaines, 2014). *E. coli* ja vastaavilla bakteereilla vastaavat positiot ovat Gly96, Thr97, Pro101, Gly137 ja Ala183 (ks. kuva 3) (Sammons & Gaines, 2014).

Yksittäisten emäsparien mutaatioiden lisäksi organismin on mahdollista kehittää ”target site” -glyfosaattiresistenssiä muun muassa useampien emäsparien mutaatioiden, *AroA*:n duplikaation tai geeniamplifikaation sekä horisontaalisen geeninsiirron kautta (Sammons & Gaines, 2014; Heap & Duke, 2018). Amplifikaatiossa *AroA*:n kopioiden määrä genomissa voi kasvaa jopa yli sataan. Tällöin myös glyfosaatin kohde-entsyymien määrä solussa kasvaa, joten glyfosaattia tarvitaan enemmän vaikutuksen aikaansaamiseksi (Sammons & Gaines, 2014; Heap & Duke, 2018; Gaines ym., 2020). EPSPS-luokituksen määrittämisessä voikin muodostua lisäelementiksi se, että sama bakteeri voi transkriptoida useampia, jopa toisistaan poikkeavia *AroA*-alueita (Gaines ym., 2020). Kiinnostava jatkotutkimusaihe olisikin bakteereissa glyfosaattialtistuksessa tapahtuvat mutaatiot, niiden mahdollisesti aiheuttaman resistenssin voimakkuus sekä mutaatioiden akkumuloituminen.

Mahdollisia ”non-target site” -mekanismeja glyfosaatin vaikutuksen kiertämiseksi ovat aiemmin mainittujen efflux-pumppujen aktivaation sekä glyfosaatin hajotuksen lisäksi ainakin glyfosaatin vakuoliin eristäminen ja aminohappojen korvaaminen (Sammons & Gaines, 2014; Nielsen ym., 2018). Sikimaattikierron tavoitteena on valmistaa organismille elintärkeitä aminohappoja, ja glyfosaatin estäessä prosessin jotkin bakteerit (kuten Nielsenin ym. (2018) testaama *E. coli* ATCC 25922) voivat kyetä ottamaan tarvitsemansa aminohapot ympäristöstään. Tämän on arveltu lieventävän glyfosaatin suolistomikrobistovaikutuksia huomattavasti, mikäli suolistossa on riittävästi ravinnosta saatua tyrosiinia, fenyylialaniinia ja tryptofaania saatavilla (Nielsen ym., 2018). On myös viitteitä siitä, että glyfosaatin vaikutuksia ympäristöön ja esimerkiksi eläinten suolistomikrobistoon voitaisiin lieventää eräillä glyfosaattia absorboivilla orgaanisilla humushapoilla (Shehata ym., 2014). Useampien sietomekanismien akkumuloituminen bakteerisolussa antaa vahvemman resistenssin glyfosaattia vastaan (Sammons & Gaines, 2014; Heap & Duke, 2018).

Bakteerit, joilla on glyfosaatille resistentti EPSPS, voivat käytännössä olla glyfosaatille herkkiä muuta kautta. Glyfosaatti saattaa aiheuttaa bakteerissa morfologisia muutoksia, kuten turpoamista ja poimuttunutta soluseinää sekä solun sisällön ulos vuotamista (Clair ym., 2012; Shehata ym., 2013). Ainakin eläinsoluissa on myös havaittu glyfosaatin aiheuttavan oksidatiivista stressiä ja häiriöitä mitokondrion elektroninsiirtoketjussa (Bailey ym., 2018; Nerozzi ym., 2020). Lisäksi glyfosaatin hajoamistuote AMPA voi olla yhtä myrkyllistä kuin glyfosaatti (Van Bruggen ym., 2018; Meftaul ym., 2020). Roundup-valmisteissa myrkkyyvaikutusta voi olla aiheuttamassa muun muassa POEA-apuaine, jonka on todettu olevan itse glyfosaattia myrkyllisempää (Williams ym., 2000; Meftaul ym., 2020). Eri valmisteiden ainesosissa on vaihtelua, eikä aineluetteloja tarvitse pakkauksessa julkisesti ilmoittaa, joten tuntemattomia, mikrobeihin mahdollisesti vaikuttavia komponentteja saattaa esiintyä (Bote ym., 2019).

Mainitut mekanismit mutkistavat glyfosaatin mikrobistovaikutusten arviointia. Suolistomikrobiston kannalta erilaiset mekanismit voisivat tarkoittaa sitä, että valmiiksi resistentin EPSPS:n omaavat tai tavalla tai toisella sopeutumiskykyisimmät bakteerikannat (kuten useat patogeeniset bakteerit) saavat etulyöntiaseman glyfosaatin läsnä ollessa ja pääsevät normaaliin mikrobiyhteisöön verrattuna dominoivampaan asemaan. Samalla sensitiivisen EPSPS:n tai heikon sopeutumiskyvyn omaavat bakteerikannat jäisivät alakynteen.

4.4 Yhteenveto

Maailman käytetyimmän kasvinsuojeluaine glyfosaatin sekä glyfosaattia sisältävän Roundup Flex -valmisteen jäämät ravinnossa ja juomavedessä voivat potentiaalisesti vaikuttaa ihmisen suolistomikrobiston tasapainoon. Glyfosaatin toiminta perustuu elintärkeiden aminohappojen synteessin estämiseen, ja kohde-entsyymiä EPSPS:ää esiintyy bakteereissa glyfosaatille todistetusti sensitiivisinä ja resistentteinä muotoina. Vaikka tietokannoista haettujen entsyymien aktiivisessa keskuksessa esiintyi vaihtelua EPSPS I, II ja III -luokista toistaiseksi luokittelemattomiin EPSPS-muotoihin, valtaosalla suolistossa yleisesti esiintyvistä bakteereista oli entsyymin sensitiivinen I-muoto. EPSPS-entsyymiltään sensitiiviset bakteerit edustivat ainakin noin neljäsosaa koko suolistomikrobistosta, vaikka lajisto vaihtelee huomattavasti ihmisyksilöiden välillä.

Laboratoriokokeiden perusteella kävi kuitenkin ilmi, että muutkin mekanismit EPSPS-luokan lisäksi vaikuttanevat bakteerien glyfosaattiherkkyyteen. Mahdollisina mekanismeina esimerkiksi EPSPS-entsyymiltään glyfosaattisensitiiviset bakteerit voisivat ottaa aminohappoja ympäristöstään ja näin kiertää glyfosaatin toksisen vaikutuksen, kun taas EPSPS:ltään resistentit bakteerit voisivat kärsiä solun muista vaurioista. Puhtaalla glyfosaatilla oli joihinkin bakteereihin toksisempi vaikutus kuin Roundup Flexillä – ilmiö, joka vaatii lisätutkimusta, sillä enemmistö aiemmista tutkimuksista esittää Roundup-valmisteiden suurempaa toksisuutta.

Glyfosaatin vaikutusta ihmisen suolistomikrobistoon yhteisönä on monimutkaista ennustaa bakteerien välisten vuorovaikutusten vuoksi, mutta erityisen haitallista altistus voi olla, mikäli potentiaalisesti haitalliset bakteerit ovat hyödyllisiä bakteereja sietokykyisempiä. Aikaisempi näyttö viittaa tähän suuntaan, ja tässäkin tutkielmassa esimerkiksi probioottisilla *Bifidobacterium*-lajeilla oli glyfosaattiherkkä EPSPS, patogeeneja sisältävän *Clostridium*-suvun lajeilla enimmäkseen resistenttejä EPSPS-sekvenssejä ja patogeeninen *Salmonella enterica* osoitti huomattavan korkeaa glyfosaatinsietokykyä laboratorio-olosuhteissa.

Sekä bioinformatiiviset että kokeelliset tulokset osoittavat, että bakteerien välillä esiintyy vaihtelua glyfosaatinsietokyvyssä. Tämä vaihtelu voi pitkäaikaisessa glyfosaattialtistuksessa johtaa mikrobiyhteisössä sietokykyisempien bakteerikantojen valintaetuun ja dominanssiin sekä edistää glyfosaatti- ja jopa moniresistenttien kantojen muodostumista. Resistenttien kantojen kilpailuetu voi myös vähentää mikrobiston monimuotoisuutta. Glyfosaatin vaikutusten kartoitusta tulee jatkaa bakteerien EPSPS-luokitusten, muiden glyfosaatin toiminta- ja torjuntamekanismien sekä havaitun glyfosaattiherkkyyden välisten yhteyksien lisäselvittelyllä. Tärkeää on myös selvittää toteutuvan glyfosaattialtistuksen määrää ihmisen suolistossa sekä sen vaikutusta laajemmin eri bakteerikantoihin, -lajeihin ja -yhteisöihin sekä edelleen ihmisen terveyteen ja hyvinvointiin.

Kiitokset

Ensimmäiseksi haluan kiittää ohjaajiani. Kiitän Suvi Ruuskasta hyödyllisistä ja selkeistä neuvoista sisällön parantelemiseksi sekä kannustavasta ohjauksesta. Pere Puigbòlle kiitokset ensinnäkin hienon bioinformatiikkatyökalun kehittämisestä EPSPS-sekvenssien luokitteluksi; lisäksi palvelimen käyttöopastuksesta sekä aktiivisesta ohjauksesta bioinformatiivisessa osiossa. Arto Pulliaiselle suurkiitos bakteeriviljelymenetelmien opettamisesta sekä ohjaajaksi ryhtymisestä, vaikka pyyntö tulikin äkkiä. Marjo Helanderille kiitokset neuvoista, tutkielman luotsaamisesta etenkin alkutaipaleella sekä siitä, että alun perin tutustutit minut glyfosaatin aihepiiriin. Ohjaajieni lisäksi kiitän Kuopion Luonnon Ystävien Yhdistystä apurahasta tutkielman rahoittamiseksi. Lopuksi kiitän läheisiäni tärkeästä tuesta ja kannustuksesta tutkielmantekoprosessin aikana.

Lähteet

- Abraham, W. (2010). Glyphosate formulations and their use for the inhibition of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Patentti nro US 7771736 B2*.
- Ackermann, W., Coenen, M., Schrödl, W., Shehata, A. A., & Krüger, M. (2015). The influence of glyphosate on the microbiota and production of botulinum neurotoxin during ruminal fermentation. *Current Microbiology*, 70, 374–382.
- Acton, D. S., Tempelmans Plat-Sinnige, M. J., Van Wamel, W., De Groot, N., & Van Belkum, A. (2009). Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: How does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 28, 115–127.
- Aitbali, Y., Ba-M’hamed, S., Elhidar, N., Nafis, A., & Soraa, N. (2018). Glyphosate-based herbicide exposure affects gut microbiota, anxiety and depression-like behaviors in mice. *Neurotoxicology and Teratology*, 67, 44–49.
- ATCC. (2021a). *Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder) Schleifer and Kilpper-Balz 29212™. Noudettu 23. elokuuta 2021, osoitteesta <https://www.atcc.org/products/29212>
- ATCC. (2021b). *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* Rosenbach 29213™. Noudettu 23. elokuuta 2021, osoitteesta <https://www.atcc.org/products/29213>
- Bailey, D. C., Todt, C. E., Burchfield, S. L., Pressley, A. S., Denney, R. D., Snapp, I. B., ... Fitsanakis, V. A. (2018). Chronic exposure to a glyphosate-containing pesticide leads to mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species production in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 57, 46–52.
- Barnett, J. A., & Gibson, D. L. (2020). Separating the empirical wheat from the pseudoscientific chaff: A critical review of the literature surrounding glyphosate, dysbiosis and wheat-sensitivity. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–8.
- Bote, K., Pöppe, J., Merle, R., Makarova, O., & Roesler, U. (2019). Minimum inhibitory concentration of glyphosate and of a glyphosate-containing herbicide formulation for *Escherichia coli* isolates - differences between pathogenic and non-pathogenic isolates and between host species. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–11.
- Canadian Food Inspection Agency. (2017). *Safeguarding with Science: Glyphosate Testing in 2015-2016*. Ottawa.
- Carozzi, N., & Hammer, P. E. (2010). Identification of a new class of EPSP synthases. *Patentti nro US 7700842 B2*.
- Chowdhury, R., Sahu, G. K., & Das, J. (1996). Stress response in pathogenic bacteria. *Journal of Biosciences*, 21, 149–160.
- Claesson, M. J., Cusack, S., O’Sullivan, O., Greene-Diniz, R., De Weerd, H., Flannery, E., ... O’Toole, P. W. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 4586–4591.
- Clair, E., Linn, L., Travert, C., Amiel, C., Séralini, G. E., & Panoff, J. M. (2012). Effects of Roundup® and glyphosate on three food microorganisms: *Geotrichum*

- candidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Current Microbiology*, 64, 486–491.
- Clavel, T., Henderson, G., Alpert, C., Philippe, C., Rigottier-gois, L., & Blaut, M. (2005). Intestinal bacterial communities that produce active estrogen-like compounds enterodiol and enterolactone in humans. *Applied and environmental microbiology*, 71, 6077–6085.
- Cold Spring Harbor Protocols. (2006a). *LB (Luria-Bertani) liquid medium*.
- Cold Spring Harbor Protocols. (2006b). *Media containing agar or agarose*.
- Delgado, S., O’Sullivan, E., Fitzgerald, G., & Mayo, B. (2008). In vitro evaluation of the probiotic properties of human intestinal *Bifidobacterium* species and selection of new probiotic candidates. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1119–1127.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., & Relman, D. A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*, 6, 2383–2400.
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobitg, M., Montanyola, A., Chang, J. M., ... Notredame, C. (2011). T-Coffee: A web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Research*, 39, 13–17.
- Doolittle, W. F., & Booth, A. (2017). It’s the song, not the singer: an exploration of holobiosis and evolutionary theory. *Biology and Philosophy*, 32, 5–24.
- Douglas, A. E., & Werren, J. H. (2016). Holes in the hologenome: Why host-microbe symbioses are not holobionts. *mBio*, 7, 1–7.
- Duodecim Terveyskirjasto. (2016a). Shigelloosi. Noudettu 23. elokuuta 2021, osoitteesta <https://www.terveyskirjasto.fi/ltt03112>
- Duodecim Terveyskirjasto. (2016b). *Streptococcus faecalis*. Noudettu 23. elokuuta 2021, osoitteesta <https://www.terveyskirjasto.fi/ltt03248/streptococcus-faecalis>
- Euroopan komissio. (2013). EU Pesticides database (v2.2). Noudettu 5. lokakuuta 2021, osoitteesta <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/mrls/?event=search.pr>
- Firdous, S., Iqbal, S., Anwar, S., & Jabeen, H. (2018). Identification and analysis of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) gene from glyphosate-resistant *Ochrobactrum intermedium* Sq20. *Pest Management Science*, 74, 1184–1196.
- Funke, T., Han, H., Healy-fried, M. L., Fischer, M., & Schönbrunn, E. (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 13010–13015.
- Gaines, T. A., Duke, S. O., Morran, S., Rigon, C. A. G., Tranel, P. J., Anita Küpper, & Dayan, F. E. (2020). Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 295, 10307–10330.
- Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G. T., & De Vos, W. M. (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: The impact of probiotics. *Genes and Nutrition*, 6, 209–240.

- Giamarellos-Bourboulis, E., Tang, J., Pylaris, E., Pistiki, A., Barbatzas, C., Brown, J., ... Pimentel, M. (2015). Molecular assessment of differences in the duodenal microbiome in subjects with irritable bowel syndrome. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 50, 1076–1087.
- Griffin, S. L., Chekan, J. R., Lira, J. M., Robinson, A. E., Yerkes, C. N., Siehl, D. L., ... Cicchillo, R. M. (2021). Characterization of a glyphosate-tolerant enzyme from *Streptomyces svecius*: A distinct class of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69, 5096–5104.
- Heap, I., & Duke, S. O. (2018). Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Management Science*, 74, 1040–1049.
- Helander, M., Saloniemi, I., Omacini, M., Druille, M., Salminen, J., & Saikkonen, K. (2018). Glyphosate decreases mycorrhizal colonization and affects plant-soil feedback. *Science of the Total Environment*, 642, 285–291.
- Helander, M., Saloniemi, I., & Saikkonen, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in Plant Science*, 17, 569–574.
- Herrmann, K. M., & Weaver, L. M. (1999). The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 473–503.
- Huovinen, P. (2012). *Tanssii bakteerien kanssa. Pidä bakteereistasi huolta!* Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., ... White, O. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486, 207–214.
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2018). Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnology Advances*, 36, 2187–2200.
- Kittle, R. P., McDermid, K. J., Muehlstein, L., & Balazs, G. H. (2018). Effects of glyphosate herbicide on the gastrointestinal microflora of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) Linnaeus. *Marine Pollution Bulletin*, 127, 170–174.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 39–85.
- Knaggs, A. R. (2001). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 18, 334–355.
- Korpela, K., Helve, O., Kolho, K. L., Saisto, T., Skogberg, K., Dikareva, E., ... de Vos, W. M. (2020). Maternal fecal microbiota transplantation in cesarean-born infants rapidly restores normal gut microbial development: A proof-of-concept study. *Cell*, 183, 324–334.
- Krüger, M., Schledorn, P., Schrödl, W., Hoppe, H., Lutz, W., & Shehata, A. A. (2014). Detection of glyphosate residues in animals and humans. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 4.
- Krüger, M., Shehata, A. A., Schrödl, W., & Rodloff, A. (2013). Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on *Clostridium botulinum*. *Anaerobe*, 20, 74–78.
- Kurenbach, B., Gibson, P. S., Hill, A. M., Bitzer, A. S., Silby, M. W., Godsoe, W., & Heinemann, J. A. (2017). Herbicide ingredients change *Salmonella enterica* sv.

- Typhimurium and *Escherichia coli* antibiotic responses. *Microbiology*, 163, 1791–1801.
- Kurenbach, B., Marjoshi, D., Amábile-Cuevas, C. F., Ferguson, G. C., Godsoe, W., Gibson, P., & Heinemann, J. A. (2015). Sublethal exposure to commercial formulations of the herbicides Dicamba, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and glyphosate cause changes in antibiotic susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *mBio*, 6.
- Landrigan, P. J., & Belpoggi, F. (2018). The need for independent research on the health effects of glyphosate-based herbicides. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 17, 1–4.
- Leino, L., Tall, T., Helander, M., Saloniemi, I., Saikkonen, K., Ruuskanen, S., & Puigbò, P. (2021). Classification of the glyphosate target enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) for assessing sensitivity of organisms to the herbicide. *Journal of Hazardous Materials*, 408, 124556.
- Light, S. H., Krishna, S. N., Minasov, G., & Anderson, W. F. (2016). An unusual cation-binding site and distinct domain-domain interactions distinguish class II enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. *Biochemistry*, 55, 1239–1245.
- Lira, J. M., Cicchillo, R. M., & Nair, Satish, K. (2013). Novel class of glyphosate resistant genes. *Patentti nro WO 116782 Al*.
- Maier, R. M., Palmer, M. W., Andersen, G. L., Halonen, M. J., Josephson, K. C., Maier, R. S., ... Wright, A. L. (2010). Environmental determinants of and impact on childhood asthma by the bacterial community in household dust. *Applied and environmental microbiology*, 76, 2663–2667.
- Mao, Q., Manservigi, F., Panzacchi, S., Mandrioli, D., Menghetti, I., Vornoli, A., ... Hu, J. (2018). The Ramazzini Institute 13-week pilot study on glyphosate and Roundup administered at human-equivalent dose to Sprague Dawley rats: Effects on the microbiome. *Environmental Health*, 17, 1–12.
- Medina-Pastor, P., & Triacchini, G. (2020). The 2018 european union report on pesticide residues in food. *European Food Safety Authority Journal*, 18, 6057.
- Meftaul, I. M., Venkateswarlu, K., Dharmarajan, R., Annamalai, P., Asaduzzaman, M., Parven, A., & Megharaj, M. (2020). Controversies over human health and ecological impacts of glyphosate: Is it to be banned in modern agriculture? *Environmental Pollution*, 263, 114372.
- Mesnager, R., & Antoniou, M. N. (2020). Computational modelling provides insight into the effects of glyphosate on the shikimate pathway in the human gut microbiome. *Current Research in Toxicology*, 1, 25–33.
- Mesnager, R., Antoniou, M. N., Tsoukalas, D., Goulielmos, G. N., & Tsatsakis, A. (2018). Gut microbiome metagenomics to understand how xenobiotics impact human health. *Current Opinion in Toxicology*, 11–12, 51–58.
- Mesnager, R., Teixeira, M., Mandrioli, D., Falcioni, L., Ducarmon, Q. R., Zwittink, R. D., ... Antoniou, M. N. (2021). Use of shotgun metagenomics and metabolomics to evaluate the impact of glyphosate or Roundup Mon 52276 on the gut microbiota and serum metabolome of Sprague-Dawley rats. *Environmental Health Perspectives*, 129, 1–15.

- Molinaro, A., Silipo, A., De Castro, C., Sturiale, L., Nigro, G., Garozzo, D., ... Parrilli, M. (2008). Full structural characterization of *Shigella flexneri* M90T serotype 5 wild-type R-LPS and its $\Delta galU$ mutant: glycine residue location in the inner core of the lipopolysaccharide. *Glycobiology*, 18, 260–269.
- Motta, E. V. S., Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, 10305–10310.
- Mueller, M., & Tainter, C. R. (2021). *Escherichia coli*. Noudettu 24. elokuuta 2021, osoitteesta <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
- Nandula, V. K. (2010). *Glyphosate resistance in crops and weeds: History, development, and management*, s. 2, 11–12, 123. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- NCBI Protein. (2004). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Noudettu 1. elokuuta 2021, osoitteesta <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
- NCBI PubChem. (2021a). PubChem 2D and 3D structure images of CID 3496 (glyphosate). Noudettu 1. marraskuuta 2021, osoitteesta <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>
- NCBI PubChem. (2021b). PubChem Compound Summary for CID 3496, Glyphosate. Noudettu 1. marraskuuta 2021, osoitteesta <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>
- Nerozzi, C., Recuero, S., Galeati, G., Bucci, D., Spinaci, M., & Yeste, M. (2020). Effects of Roundup and its main component, glyphosate, upon mammalian sperm function and survival. *Scientific Reports*, 10, 1–9.
- Nielsen, L. N., Roager, H. M., Casas, M. E., Frandsen, H. L., Gosewinkel, U., Bester, K., ... Bahl, M. I. (2018). Glyphosate has limited short-term effects on commensal bacterial community composition in the gut environment due to sufficient aromatic amino acid levels. *Environmental Pollution*, 233, 364–376.
- Niemann, L., Sieke, C., Pfeil, R., & Solecki, R. (2015). A critical review of glyphosate findings in human urine samples and comparison with the exposure of operators and consumers. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 3–12.
- Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., ... Dubchak, I. (2014). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Research*, 42, D26–D31.
- Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302, 205–217.
- Pöppe, J., Bote, K., Merle, R., Makarova, O., & Roesler, U. (2019). Minimum inhibitory concentration of glyphosate and a glyphosate-containing herbicide in *Salmonella enterica* isolates originating from different time periods, hosts, and serovars. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 9, 35–41.
- Priestman, M. A., Funke, T., Singh, I. M., Crupper, S. S., & Schönbrunn, E. (2005). 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. *FEBS Letters*, 579, 728–732.

- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, S., Manichanh, C., ... Yang, H. (2010). A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*, 59–65.
- Rainio, M. J., Ruuskanen, S., Helander, M., Saikkonen, K., Saloniemi, I., & Puigbò, P. (2021). Adaptation of bacteria to glyphosate: a microevolutionary perspective of the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Environmental Microbiology Reports*, *13*, 309–316.
- Rajilić-Stojanović, M., Biagi, E., Heilig, H. G. H. J., Kajander, K., Kekkonen, R. A., Tims, S., & De Vos, W. M. (2011). Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, *141*, 1792–1801.
- Richards, T. A., Dacks, J. B., Campbell, S. A., Blanchard, J. L., Foster, P. G., McLeod, R., & Roberts, C. W. (2006). Evolutionary origins of the eukaryotic shikimate pathway: Gene fusions, horizontal gene transfer, and endosymbiotic replacements. *Eukaryotic Cell*, *5*, 1517–1531.
- Riede, S., Toboldt, A., Breves, G., Metzner, M., Köhler, B., Bräunig, J., ... Niemann, L. (2016). Investigations on the possible impact of a glyphosate-containing herbicide on ruminal metabolism and bacteria in vitro by means of the ‘Rumen Simulation Technique’. *Journal of Applied Microbiology*, *121*, 644–656.
- Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Kurilshikov, A., Korem, T., Zeevi, D., ... Segal, E. (2018). Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*, *555*, 210–215.
- Ruuskanen, S., Rainio, M. J., Gómez-Gallego, C., Selenius, O., Salminen, S., Collado, M. C., ... Helander, M. (2020a). Glyphosate-based herbicides influence antioxidants, reproductive hormones and gut microbiome but not reproduction: A long-term experiment in an avian model. *Environmental Pollution*, *266*.
- Ruuskanen, S., Rainio, M. J., Kuosmanen, V., Laihonon, M., Saikkonen, K., Saloniemi, I., & Helander, M. (2020b). Female preference and adverse developmental effects of glyphosate-based herbicides on ecologically relevant traits in Japanese quails. *Environmental Science & Technology*, *54*, 1128–1135.
- Salosensaari, A., Laitinen, V., Havulinna, A. S., Meric, G., Cheng, S., Perola, M., ... Niiranen, T. (2021). Taxonomic signatures of cause-specific mortality risk in human gut microbiome. *Nature Communications*, *12*, 1–8.
- Sammons, R. D., & Gaines, T. A. (2014). Glyphosate resistance: State of knowledge. *Pest Management Science*, *70*, 1367–1377.
- 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.
- Shao, Y., Forster, S. C., Tsaliki, E., Vervier, K., Strang, A., Simpson, N., ... Lawley, T. D. (2019). Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. *Nature*, *574*, 117–121.
- Shehata, A. A., Kühnert, M., Haufe, S., & Krüger, M. (2014). Neutralization of the antimicrobial effect of glyphosate by humic acid in vitro. *Chemosphere*, *104*, 258–261.

- Shehata, A. A., Schrödl, W., Aldin, A. A., Hafez, H. M., & Krüger, M. (2013). The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Current Microbiology*, 66, 350–358.
- Stosiek, N., Talma, M., & Klimek-Ochab, M. (2020). Carbon-phosphorus lyase — the state of the art. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 190, 1525–1552.
- Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2021). *Staphylococcus aureus*. Noudettu 23. elokuuta 2021, osoitteesta <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
- The PyMOL Molecular Graphics System. *Version 1.2r3pre*, Schrödinger, LLC. Tarkat molekulaariset tiedot osoitteessa <https://www.rcsb.org/3d-view/1G6S>.
- Tieteen termipankki. (2014). Normaalifloora. Noudettu 22. syyskuuta 2021, osoitteesta <https://www.tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:normaalifloora>
- Tsiaoussis, J., Antoniou, M. N., Koliarakis, I., Mesnage, R., Vardavas, C. I., Izotov, B. N., ... Tsatsakis, A. (2019). Effects of single and combined toxic exposures on the gut microbiome: Current knowledge and future directions. *Toxicology Letters*, 312, 72–97.
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment*, 616–617, 255–268.
- Wexler, H. M. (2007). *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 593–621.
- Williams, G. M., Kroes, R., & Munro, I. C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31, 117–165.

Liitteet

Liite 1. Listaus yleisistä suolistobakteereista (yhdistetty Qinin ym. tutkimuksen (2010) lisämateriaalitaulukoista 8, 5 ja 12) ja niiden EPSPS-sekvenssien luokituksesta. Nämä lajit ja kannat on spesifisti mainittu Qinin ym. tutkimuksessa, eli ne ovat vahvistetusti suolistoperäisiä. N: EPSPS-sekvenssien määrä, R: resistentti muoto, S: sensitiivinen muoto, E: sekvenssillä ei ole luokitusta eikä sen glyfosaattiherkkyyttä tunneta.

Laji/kanta	N	R/S/E	Luokka	Resistenttejä sekvenssejä (%)
<i>Actinomyces odontolyticus</i> ATCC 17982	1	S	Luokka I	0 %
<i>Anaerofustis stercorihominis</i> DSM 17244	1	S	Luokka I	0 %
<i>Anaerotruncus colihominis</i>	5	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides caccae</i>	5	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides capillosus</i>	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	4	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides coprocola</i>	2	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides coprophilus</i>	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides coprophilus</i> DSM 18228	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides dorei</i>	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides dorei</i> DSM 17855	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides eggerthii</i>	3	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides finegoldii</i>	4	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides fragilis</i> 3_1_12	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides fragilis</i> NCTC 9343	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides intestinalis</i>	11	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides ovatus</i>	14	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides plebeius</i>	11	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides</i> sp. 2_1_7	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides</i> sp. 2_2_4	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides</i> sp. 3_2_5	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides</i> sp. 4_3_47FAA	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides</i> sp. 9_1_42FAA	2	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides</i> sp. D1	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides stercoris</i>	20	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides uniformis</i>	10	S	Luokka I	0 %
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	1	S	Luokka I	0 %

Laji/kanta	N	R/S/E	Luokka	Resistenttejä sekvenssejä (%)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	26	25×S 1×R	Luokka I Luokka II	4 %
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> L2-32	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bifidobacterium bifidum</i> NCIMB 41171	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bifidobacterium breve</i>	27	S	Luokka I	0 %
<i>Bifidobacterium breve</i> DSM 20213	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	7	S	Luokka I	0 %
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> DSM 16992	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bifidobacterium dentium</i>	5	S	Luokka I	0 %
<i>Bifidobacterium longum</i> DJO10A	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 55813	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> CCUG 52486	1	S	Luokka I	0 %
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	46	45×S 1×E	Luokka I E	0 %
<i>Catenibacterium mitsuokai</i>	3	S	Luokka I	0 %
<i>Citrobacter</i> sp. 30_2	1	S	Luokka I	0 %
<i>Citrobacter</i> sp. 30_3	1	S	Luokka I	0 %
<i>Citrobacter</i> sp. 30_4	1	S	Luokka I	0 %
<i>Citrobacter</i> sp. 30_5	1	S	Luokka I	0 %
<i>Citrobacter</i> sp. 30_6	1	S	Luokka I	0 %
<i>Clostridium leptum</i>	4	S	Luokka I	0 %
<i>Clostridium leptum</i> DSM 753	1	E	E	0 %
<i>Clostridium methylpentosum</i>	1	S	Luokka I	0 %
<i>Clostridium nexile</i>	1	S	Luokka I	0 %
<i>Collinsella aerofaciens</i>	9	S	Luokka I	0 %
<i>Desulfovibrio piger</i> ATCC 29098	1	S	Luokka I	0 %
<i>Enterobacter cancerogenus</i> ATCC 35316	1	S	Luokka I	0 %
<i>Escherichia coli</i> 536	1	S	Luokka I	0 %
<i>Escherichia coli</i> APEC O1	1	S	Luokka I	0 %
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	1	S	Luokka I	0 %
<i>Escherichia coli</i> CFT073	1	S	Luokka I	0 %
<i>Escherichia coli</i> ED1a	1	S	Luokka I	0 %

Laji/kanta	N	R/S/E	Luokka	Resistenttejä sekvenssejä (%)
<i>Escherichia coli</i> HS	1	S	Luokka I	0 %
<i>Escherichia coli</i> IAI39	1	S	Luokka I	0 %
<i>Escherichia coli</i> O127:H6 str. E2348/69	1	S	Luokka I	0 %
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EC4115	1	S	Luokka I	0 %
<i>Escherichia coli</i> S88	1	S	Luokka I	0 %
<i>Escherichia coli</i> SE11	1	S	Luokka I	0 %
<i>Escherichia coli</i> SMS-3-5	1	S	Luokka I	0 %
<i>Escherichia coli</i> UTI89	1	S	Luokka I	0 %
<i>Eubacterium siraeum</i>	3	S	Luokka I	0 %
<i>Eubacterium siraeum</i> 70/3	1	S	Luokka I	0 %
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> M21/2	1	S	Luokka I	0 %
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> SL3 3	1	S	Luokka I	0 %
<i>Fusobacterium mortiferum</i> ATCC 9817	1	S	Luokka I	0 %
<i>Fusobacterium</i> sp. 4_1_13	1	S	Luokka I	0 %
<i>Fusobacterium ulcerans</i> ATCC 49185	1	S	Luokka I	0 %
<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 27725	1	S	Luokka I	0 %
<i>Holdemania filiformis</i>	1	S	Luokka I	0 %
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	6	S	Luokka I	0 %
<i>Methanobrevibacter smithii</i> ATCC 35061	1	S	Luokka I	0 %
<i>Mollicutes bacterium</i> D7	1	S	Luokka I	0 %
<i>Parabacteroides distasonis</i> ATCC 8503	1	S	Luokka I	0 %
<i>Parabacteroides johnsonii</i>	4	S	Luokka I	0 %
<i>Parabacteroides merdae</i>	8	S	Luokka I	0 %
<i>Prevotella copri</i>	27	S	Luokka I	0 %
<i>Providencia alcalifaciens</i> DSM 30120	1	S	Luokka I	0 %
<i>Providencia rustigianii</i> DSM 4541	1	S	Luokka I	0 %
<i>Providencia stuartii</i> ATCC 25827	1	S	Luokka I	0 %
<i>Ruminococcus bromii</i>	13	S	Luokka I	0 %
<i>Ruminococcus bromii</i> L2-63	1	S	Luokka I	0 %
<i>Subdoligranulum variabile</i>	2	S	Luokka I	0 %
<i>Subdoligranulum variabile</i> DSM 15176	1	S	Luokka I	0 %
<i>Alistipes putredinis</i>	3	R	Luokka III	100 %
<i>Anaerobaculum hydrogeniformans</i> ATCC BAA-1850	1	R	Luokka II	100 %
<i>Blautia hansenii</i>	3	R	Luokka II	100 %

Laji/kanta	N	R/S/E	Luokka	Resistenttejä sekvenssejä (%)
<i>Bryantella formatexigens</i>	1	R	Luokka II	100 %
<i>Clostridium asparagiforme</i>	1	R	Luokka II	100 %
<i>Clostridium asparagiforme</i> DSM 15981	1	R	Luokka II	100 %
<i>Clostridium bartlettii</i>	2	R	Luokka II	100 %
<i>Clostridium scindens</i>	2	R	Luokka II	100 %
<i>Clostridium</i> sp L2-50	2	1×R 1×E	Luokka II E	50 %
<i>Clostridium</i> sp SS2-1	2	R	Luokka II	100 %
<i>Clostridium symbiosum</i> ATCC 14940	1	R	Luokka II	100 %
<i>Coprococcus comes</i>	8	R	Luokka II	100 %
<i>Coprococcus comes</i> ATCC 27758	1	R	Luokka II	100 %
<i>Coprococcus eutactus</i>	6	R	Luokka II	100 %
<i>Dorea formicigenerans</i>	18	R	Luokka II	100 %
<i>Dorea longicatena</i>	11	R	Luokka II	100 %
<i>Enterococcus casseliflavus</i> EC10	1	R	Luokka II	100 %
<i>Enterococcus casseliflavus</i> EC20	1	R	Luokka II	100 %
<i>Eubacterium hallii</i> / <i>Anaerobutycum hallii</i>	9	R	Luokka II	100 %
<i>Helicobacter canadensis</i> MIT 98-5491	1	R	Luokka II	100 %
<i>Helicobacter cinaedi</i> CCUG 18818	2	R	Luokka II	100 %
<i>Helicobacter pullorum</i> MIT 98-5489	1	R	Luokka II	100 %
<i>Helicobacter winthamensis</i> ATCC BAA-430	1	R	Luokka II	100 %
<i>Lactobacillus brevis</i> subsp. <i>gravesensis</i> ATCC 27305	1	R	Luokka II	100 %
<i>Lactobacillus buchneri</i> ATCC 11577	1	R	Luokka II	100 %
<i>Lactobacillus hilgardii</i> ATCC 8290	1	R	Luokka II	100 %
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917	1	R	Luokka II	100 %
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	1	R	Luokka II	100 %
<i>Lactobacillus ruminis</i> ATCC 25644	2	R	Luokka II	100 %
<i>Listeria grayi</i> DSM 20601	1	R	Luokka II	100 %
<i>Mitsuokella multacida</i>	2	R	Luokka II	100 %
<i>Mitsuokella multacida</i> DSM 20544	1	R	Luokka II	100 %
<i>Ruminococcus gnavus</i>	16	R	Luokka II	100 %
<i>Ruminococcus gnavus</i> ATCC 29149	1	R	Luokka II	100 %
<i>Ruminococcus lactaris</i>	2	R	Luokka II	100 %
<i>Ruminococcus lactaris</i> ATCC 29176	1	R	Luokka II	100 %

Laji/kanta	N	R/S/E	Luokka	Resistenttejä sekvenssejä (%)
<i>Ruminococcus obeum</i>	17	R	Luokka II	100 %
<i>Ruminococcus obeum</i> A2-162	1	R	Luokka II	100 %
<i>Ruminococcus torques</i>	7	6×R 1×E	Luokka II E	86 %
<i>Ruminococcus torques</i> L2-14	1	R	Luokka II	100 %
<i>Bacteroides pectinophilus</i> ATCC 43243	1	E	E	0 %
<i>Butyrivibrio crossotus</i>	2	E	E	0 %
<i>Clostridium spiroforme</i> DSM 1552	1	E	E	0 %
<i>Eubacterium rectale</i> DSM 17629	1	E	E	0 %
<i>Eubacterium rectale</i> M104 1	1	E	E	0 %
<i>Eubacterium ventriosum</i>	7	E	E	0 %
<i>Fusobacterium</i> sp. 2_1_31	1	E	E	0 %
<i>Fusobacterium</i> sp. D11	1	E	E	0 %
<i>Fusobacterium</i> sp. D12	1	E	E	0 %
<i>Proteus penneri</i> ATCC 35198	1	E	E	0 %
<i>Providencia rettgeri</i> DSM 1131	1	E	E	0 %
<i>Roseburia intestinalis</i> L1-82	1	E	E	0 %
<i>Roseburia intestinalis</i> M50 1	1	E	E	0 %

Liite 2. Perusmuodossaan oleva SAS EG 7.1 -koodi kasvatuskokeille.

```
proc GLIMMIX data=GRADU
plots=residualpanel
plots=boxplot
plots=meanplot
method=MSPL; /* Valmiissa mallissa vaihdettu MSPL → RSPL */
nloptions maxiter=1000;

class ID pitoisuus mittaushetki;
model absorbanssi = pitoisuus
                    mittaushetki
                    pitoisuus*mittaushetki

/solution ddfm=kenwardroger;

random mittaushetki / subject=ID type=(ks. liite 3) v vcorr residual;
lsmeans pitoisuus
        mittaushetki
        pitoisuus*mittaushetki
        /cl pdiff adjust=tukey;
run;
```

Liite 3. Toistomittausten välisen korrelaatorakenteen määrittämiseksi testatut mallit. SAS EG 7.1 GLIMMIX -proseduurissa type-optiona käytettyjen korrelaatorakenteiden tuottamat AICc-arvot koebakteereille *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* ja *Enterococcus faecalis*. Käyttöön otetut alleviivatut rakenteet valittiin parsimoniaperiaatteen mukaisesti. GLY = puhdas glyfosaatti, RF = Roundup Flex.

korrelaatio- rakenne (type=)	<i>E. coli</i>		<i>S. enterica</i>		<i>S. flexneri</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. faecalis</i>	
	GLY	RF	GLY	RF	GLY	RF	GLY	RF	GLY	RF
UN	-94,83	-54,54	-31,92	-1,85	-216,66	-314,65	-39,35	-75,59	-162,17	-270,27
CS	-74,01	45,87	-36,59	-1,52	-229,97	-320,79	-20,07	-47,78	<u>-171,42</u>	<u>-278,69</u>
CSH	-94,83	-62,33	-31,92	-1,98	-226,27	-315,28	-23,63	<u>-81,62</u>	-163,26	-277,19
AR(1)	-74,01	45,87	<u>-36,59</u>	-5,49	<u>-230,09</u>	<u>-325,82</u>	-25,37	-47,49	-168,18	-272,10
ARH(1)	<u>-94,83</u>	<u>-62,52</u>	-31,92	<u>-7,15</u>	-226,54	-320,64	-29,79	-80,77	-160,07	-268,49
TOEP	-74,01	16,10	-36,59	-2,53	-225,86	-324,51	-21,86	-44,34	-168,75	-275,30
TOEPH	-94,83	-59,05	-31,92	-4,87	-221,72	-319,15	-28,31	-77,50	-159,98	-275,86
ANTE(1)	-94,83	-58,20	-31,92	-4,67	-221,81	-316,33	<u>-43,84</u>	-78,43	-158,35	-264,02



Research paper

Classification of the glyphosate target enzyme
(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) for assessing sensitivity of
organisms to the herbicide

Lydia Leino^{a,1}, Tuomas Tall^{a,1}, Marjo Helander^a, Irma Saloniemi^a, Kari Saikkonen^b,
Suvi Ruuskanen^a, Pere Puigbò^{a,c,d,*}

^a Department of Biology, University of Turku, Turku, Finland

^b Biodiversity Unit, University of Turku, Finland

^c Nutrition and Health Unit, Eurecat Technology Centre of Catalonia, Reus, Catalonia, Spain

^d Department of Biochemistry and Biotechnology, Rovira i Virgili University, Tarragona, Catalonia, Spain



ARTICLE INFO

Keywords:
Shikimate pathway
Epsps enzyme
Glyphosate
Herbicide
Resistance
Microbiome
Bioinformatics resource
Biomarkers
Sensitivity

ABSTRACT

Glyphosate is the most common broad-spectrum herbicide. It targets the key enzyme of the shikimate pathway, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), which synthesizes three essential aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine and tryptophan) in plants. Because the shikimate pathway is also found in many prokaryotes and fungi, the widespread use of glyphosate may have unsuspected impacts on the diversity and composition of microbial communities, including the human gut microbiome. Here, we introduce the first bioinformatics method to assess the potential sensitivity of organisms to glyphosate based on the type of EPSPS enzyme. We have precomputed a dataset of EPSPS sequences from thousands of species that will be an invaluable resource to advancing the research field. This novel methodology can classify sequences from nearly 90% of eukaryotes and >80% of prokaryotes. A conservative estimate from our results shows that 54% of species in the core human gut microbiome are sensitive to glyphosate.

1. Introduction

Glyphosate is the most efficient and widely used nonselective herbicide. Historically, it was commercialized in the 1970s and then became the most inexpensive herbicide after the patent expired in 2000 (Helander et al., 2012; Myers et al., 2016; Duke, 2018). Since then, numerous generic glyphosate-containing herbicides have made glyphosate-based herbicides (GBHs) the most commonly used pesticides worldwide (Duke, 2017). The dominance of GBHs in the pesticide market is mainly attributed to the use of transgenic crops such as soy, corn and canola, of which nearly 90% are glyphosate-resistant varieties (The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications ISAAA, 2017). In Europe, where transgenic crops are hardly grown, they are much used in no-till cropping, where weeds are eradicated by glyphosate prior to sowing. In addition, cereal, bean and seed crops are commonly desiccated by glyphosate before harvest.

The biochemical target enzyme for the herbicide glyphosate is 5-

enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) (Steinrücken and Amrhein, 1980), the key enzyme of the shikimate pathway, which synthesizes the three essential aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine and tryptophan) in most prokaryotes, plants and fungi (Bentley, 1990; Richards et al., 2006). Glyphosate is proclaimed safe for humans and other nontarget organisms because the shikimate metabolic pathway, inactivated by glyphosate, is not present in vertebrates. However, until recently, the presence of the shikimate pathway and diversity of EPSPS in many microbes have largely been ignored. As microbes are ubiquitous, associated with virtually all higher organisms, and essential in maintaining fundamental organismal functions (Braga et al., 2016; Wang et al., 2017; Gilbert et al., 2018), predicting the consequences of glyphosate use via its potential effects on the microbiome is challenging. The first step toward a more comprehensive understanding of how glyphosate affects higher organisms and biotic interactions involving microbes is to survey microbe susceptibilities to glyphosate.

* Corresponding author at: Department of Biology, University of Turku, Turku, Finland.

E-mail address: pepuav@utu.fi (P. Puigbò).

¹ Equal contribution of the authors

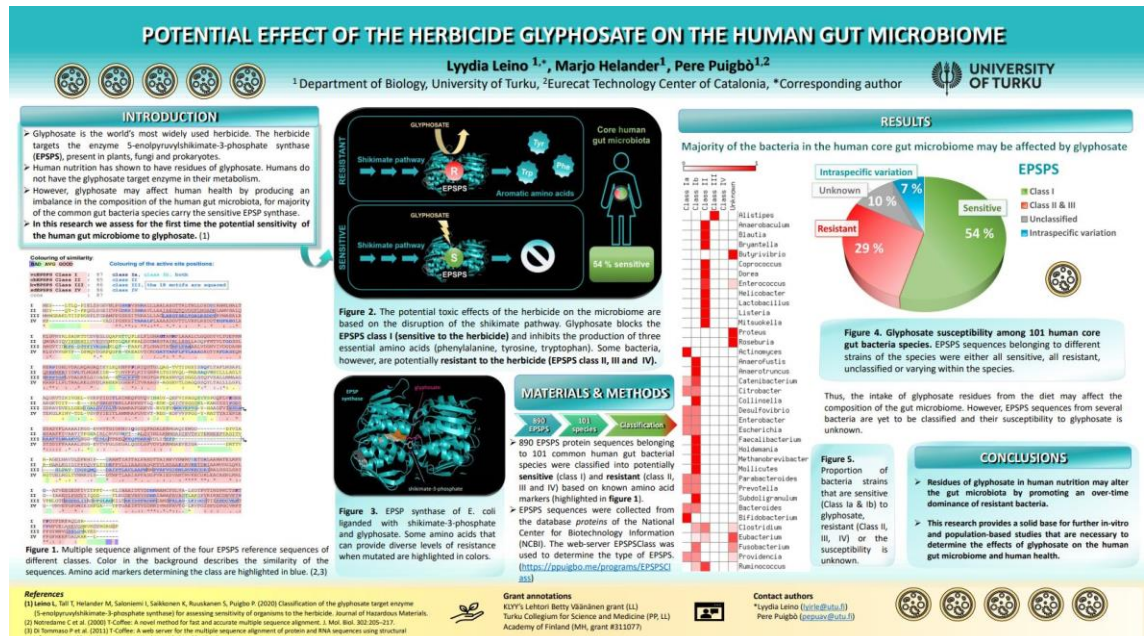
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124556>

Received 18 August 2020; Received in revised form 1 October 2020; Accepted 10 November 2020

Available online 14 November 2020

0304-3894/© 2020 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Liite 5. Tutkielman bioinformatiivista osaa esittelevä poster (ylempi kuva), joka julkaistiin American Association for the Advancement of Science (AAAS) -tiedeseuran vuosittaisessa kokoontumisessa. Osallistuin työllä opiskelijoiden posterikilpailuun, jota varten tein posterin lisäksi tiivistelmän (alempi kuva) ja nauhoitetun videoesityksen työstä sekä esittelin työn tuomaristolle. Työlle myönnettiin kolmas sija maisteriopiskelijoiden Ympäristö ja ekologia -kategoriassa, ja finalistien nimet sekä töiden otsikot julkaistiin Science-tiedelehdessä.



ANNUAL MEETING

E-POSTERS

[BACK TO EVENT PAGE](#)

[HELP](#)

Share

Eposters / Search Result

Sort By: A - Z Most Recent

Search directory...

E-POSTER LIBRARY

Filter by Category

☐ Biochemistry and Molecular Biology

☐ Brain and Behavior

☐ Cell Biology

☐ Developmental Biology, Genetics, and Immunology

☒ Environment and Ecology

☐ Medicine and Public Health

☐ Physical Sciences

☐ Science in Society

☐ Science Policy

☐ Social Sciences

POTENTIAL EFFECT OF THE HERBICIDE GLYPHOSATE ON THE HUMAN GUT MICROBIOME

FINALIST

Lydia Leino University of Turku, Turku, Finland Glyphosate is the world's most widely used herbicide for agriculture and home gardening purposes. The herbicide targets the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), present in plants, fungi and prokaryotes. Several studies have shown that human nutrition has residues of glyphosate. Humans do not have the glyphosate target enzyme in their metabolism, thus are presumably safe from the effects of the herbicide. However, glyphosate may affect human health by producing an imbalance in the composition of the human gut microbiota. The potential toxic effects of the herbicide on the microbiome are based on the disruption of the shikimate pathway. Glyphosate blocks the EPSPS class I (sensitive to the herbicide) and inhibits the production of three essential amino acids (phenylalanine, tyrosine, tryptophan). Some bacteria, however, are potentially resistant to the herbicide (EPSPS class II, III and IV). In this study, I determine the amount of bacteria putatively sensitive/resistant to glyphosate and assess the potential effects of the herbicide on gut microbial communities and human wellbeing. I classified EPSPS protein sequences from 890 strains belonging to 101 common human gut bacterial species. EPSPS sequences were collected from the database proteins of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The web-server EPSPSClass (<https://puigbo.me/programs/EPSPSClass>), that classifies EPSPS proteins into potentially sensitive (class I) and resistant (class II, III and IV) based on known amino acid markers, was used to determine the type of EPSPS. The results indicate that the majority of bacteria in the human gut microbiome may be affected by the herbicide (54% of the species are putatively sensitive, 29% are putatively resistant and 17% are unclassified or varying intraspecifically). Thus, the intake of glyphosate residues from the diet may affect the composition of the gut microbiome — e.g., the genera *Escherichia*, *Faecalibacterium* and *Collinsella* are potentially sensitive to glyphosate, whereas the genera *Helicobacter*, *Lactobacillus* and *Dorea* are potentially resistant. However, EPSPS sequences from several bacteria are yet to be classified and their susceptibility to glyphosate is unknown. In conclusion, residues of glyphosate in human nutrition may alter the gut microbiota by promoting an over-time dominance of resistant bacteria. This research provides a solid base for further in-vitro and population-based studies that are necessary to determine the effects of glyphosate on the human gut microbiome and human health.