

# Forschung

## Mikrobiologie und Bioaktivität des biodynamischen Präparats 500

Umfangreiche mikrobiologische Untersuchungen des Hornmistpräparates zeigen eine charakteristische bakterielle Komposition und spezielle Enzymaktivitäten. Letztere haben eine Wirkung vergleichbar dem pflanzeneigenen Hormon Auxin. P500 scheint die Effizienz der Bodenbakterien zu erhöhen.

Matteo Giannattasio,  
Elena Vendramin,  
Sara Albeghini,  
Marina Zanardo,  
Fabio Stellin,  
Giuseppe Concheri,  
Piergiorgio Stevanato,  
Andrea Ertani,  
Serenella Nardi,  
Andrea Squartini,  
Department of Agronomy,  
Animals, Natural resource and  
Environment DAFNAE, Univer-  
sity of Padua, I-35020 Legnaro

Flavio Fornasier,  
CRA – Centro per lo Studio  
delle Relazioni tra Pianta  
e Suolo, Gorizia

Valeria Rizzi,  
Pietro Piffanelli  
Parco Tecnologico Padano  
Foundation, I-26900 Lodi

Riccardo Spaccini,  
Allesandro Piccolo,  
Department of Soil,  
Plant Environment and Animal  
Production Univerisy of Neples  
Frederici II, I-80055 Portici

Pierluigi Mazzei,  
Interdepartmental research  
center for Nuclear magnetic  
resonance Spectroscopy,  
80055 I-Portici

Korrespondenzadresse:  
Andrea Squartini,  
squat@unipd.it

Biodynamische Landwirtschaft verwendet im Unterschied zu organischem Landbau charakteristische Zubereitungen wie die Feldspritzpräparate oder Kompostzusätze, wie sie auch in der EU-Verordnung 834/2007 beschrieben sind. Das Biodynamische Präparat 500 aus fermentiertem Kuhdung wird zur Verbesserung der Bodenfruchtbarkeit und Anregung eines kräftigen Wurzelsystems eingesetzt. Über seine chemische Zusammensetzung haben wir in einer vorhergehenden Publikation berichtet. Ergebnisse aus Langzeit-Feldversuchen, wie z. B. von MÄDER und Kollegen, zeigten, dass biodynamische Praktiken wie der regelmäßige Einsatz von Präparat 500 insgesamt die Bodenqualität verbessern: Besonders Parameter wie organische Substanz, mikrobielle Biomasse und Vielfalt waren in biodynamischen Varianten signifikant höher im Vergleich zu organischen (7, 8). Die Grundlage für diese Effekte ist in den Feldspritzpräparaten zu suchen.

Kürzere Feldversuche haben gezeigt, dass die Anwendung beider Präparate (P500 und P501) bei Linsen zu höheren Erträgen im Verhältnis zur Pflanzenbiomasse führen, aber auch zu geringeren Gehalten an Kohlenstoff und Rohprotein im Korn und zu höheren Nitratgehalten in Sommerweichweizen sowie erhöhten Ammoniak (NH<sub>4</sub>)-Gehalten im Boden. (3). Ihre Anwendung war ebenfalls mit höheren

Gehalten an mineralischem Kohlenstoff verbunden – der als Indikator für mikrobiell verfügbaren Kohlenstoff gilt, wie auch mit Unterschieden in bodenmikrobiellen Fettsäureprofilen im ersten Jahr der Studie.

Vor Kurzem haben wir die molekulare Zusammensetzung des Präparats 500 mit Kernspinresonanzspektroskopie und Thermochemolyse untersucht und im Vergleich zum Ausgangsmaterial eine Anreicherung von biolabilen Komponenten festgestellt. Im Vergleich zum Ausgangsmaterial Dung zeigten frühere Berichte, dass Präparate 500 niedrigere Werte bei pH, CO<sub>2</sub>-Atmung und C:N-Verhältnis hat, mehr Nitrat enthielt und weniger organische Substanz verlor (1). Die vorliegende Untersuchung sollte eine mikrobielle Charakterisierung des Präparats 500 liefern, sowie Hinweise auf seine biologische Aktivität.

### Material und Methoden

Zur Untersuchung diente gekauftes Präparat 500 von drei bekannten

Der Originalbeitrag wurde publiziert in jmb – Journal of Microbiology and Biotechnology (<http://www.jmb.or.kr>) der Koreanischen Gesellschaft für Mikrobiologie und Biotechnologie (KMB) unter dem Titel „Microbiological Features and Bioactivity of a Fermented Manure Product (Preparation 500) used in Biodynamic Agriculture“ in der Ausgabe vom 28. Mai 2013 S. 23(5) 644-651 und für LE in einer adaptierten Version mit freundlicher Genehmigung des jmb übersetzt und gedruckt.

italienischen Herstellern aus drei Regionen. Analysiert wurden so drei Präparate aus 2010, eines aus 2011, sowie dessen ursprünglicher Dungrohstoff.

Es wurden Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel der Proben sowie der Böden gemessen, die mikrobielle Population kultiviert und sortiert nach ARDRA, und dann von jedem Bakterienisolat DNA sequenziert, um auf der molekularen Ebene die Arten zu bestimmen. Die Vielfalt an Bakterien und Pilzen von Präparat 500 und Böden wurde mittels ARISA-Verfahren geschätzt. Die Aktivität der in Präparat 500 und

Probe	% N	% C	% S	C/N
Ausgangsmaterial Dung (Rom)	2,57	32,02	0,46	12,46
Präparat 500 (Rom)	2,74	24,80	0,58	9,06
Präparat 500 (Bolzano)	2,39	27,06	0,52	11,33
Präparat 500 (Reggio Emilia)	2,21	26,30	0,56	11,89

Tabelle 1: Prozentuale Anteile an Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel sowie C:N-Verhältnis der P500-Herkünfte

anderem Material gefundenen Enzyme wie Arylsulfatase,  $\beta$ -Gucosidase, Acetat-Esterase, Leucin-Amino-peptidase, Alkalin-Phosphatase und Chitinase wurden mit den üblichen Methoden gemessen. Weiterhin wurde die Auslösungsschwelle der Zell-zu-Zell-Kommunikation gramnegativer Bakterien anhand der Anwesenheit von N-Acyl-Homoserin-Lakton bestimmt. Komponenten pflanzlichen Materials, auch mikrobiell verändertes, das die Knöllchenbildung auslösen kann, wurden über den  $\beta$ -Galaktosidase-Test gemessen.

Die biologische Aktivität von Präparat 500 in einer Lösung von 200 mg in 60 ml Wasser – vergleichbar der Feldanwendung – wurden mittels der Wachstumsreduktion der Wurzeln von Wasserkresse (*Lepidium sativum* L.) gemessen, um einen Auxin-Effekt festzustellen. Ebenso wurde die Zunahme der Länge von Salatsprossen (*Lactuca sativa* L.) im Hinblick auf mögliche Gibberelin-Effekte gemessen. Dazu wurde die Adus-Methode verwendet. Wasserkresse und Salatsamen wurden oberflächlich entkeimt, intensiv gespült und je zehn Samen aseptisch auf Filterpapier einer Petrischale gelegt. In speziellen Lösungen keimten die Samen bei 25 °C in Dunkelheit, 48 Stunden die Wasserkresse, 72 Stunden der Salat, bevor Wurzeln bzw. Keimlinge vermessen wurden.

### Ergebnisse

**Stoffliche Analyse von Präparat und Ausgangsmaterial:** Die Messung der drei Makroelemente Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel und des C/N-Verhältnisses (Tab. 1) weisen auf einen Fermentationsvorgang unter – im Vergleich zum

Ausgangsmaterial – Verflüchtigung von Kohlenstoff ohne Stickstoffverluste hin. Das lässt auf die Aufnahme des mineralisierten Stickstoffs durch mikrobielle Biomasse schließen.

**Analyse der kultivierbaren mikrobiellen Population:** Die auf dem Nährmedium PCS kultivierbare aerobe Fraktion aus dem Präparat 500 erzielte  $2,38 \times 10^8$  koloniebildende Einheiten je g Trockengewicht, die anaerobe Bebrütung ergab  $7,85 \times 10^7$  koloniebildende Einheiten. Pilzliche Kolonien beliefen sich auf  $1,2 \times 10^6$  Einheiten. Tabelle 2 zeigt die taxonomische Zusammensetzung der Bakterienpopulation: gram-positive Arten dominieren bei geringeren Vorkommen von Actinobakterien und Gammaproteobakterien. Signifikante Unterschiede zwischen den Proben und Herkünften gab es keine. Die Zusammensetzung entspricht dem Umformungspotenzial geringer Redoxbedingungen, die eine langsame Proteolyse und Fermentation organischer Substanz fördern, also den Reifeverhältnissen bei der Entstehung von Präparat 500.

**Die Artenvielfalt von Bakterien und Pilzen,** mittels ARISA-Methode festgestellt, die bis auf einzelne Nucleotide genau ist, ergab zwischen 58 und 65 angezeigte Bakterienspezies und zwischen 32 bis 60 Pilzarten, mit einem Verhältnis von Bakterien zu Pilzen von 1,6 zu 1. Dies stimmt mit der chemischen Charakterisierung überein, die in der Ausreifung des Präparates eine Zunahme der Lignin-Komponenten zeigte, deren Abnahme mit der pilzlichen Aktivität verknüpft ist. Hier allerdings gab es Unterschiede zwischen den Jahren. Dies bestätigte auch die statistische NMDS-Analyse.

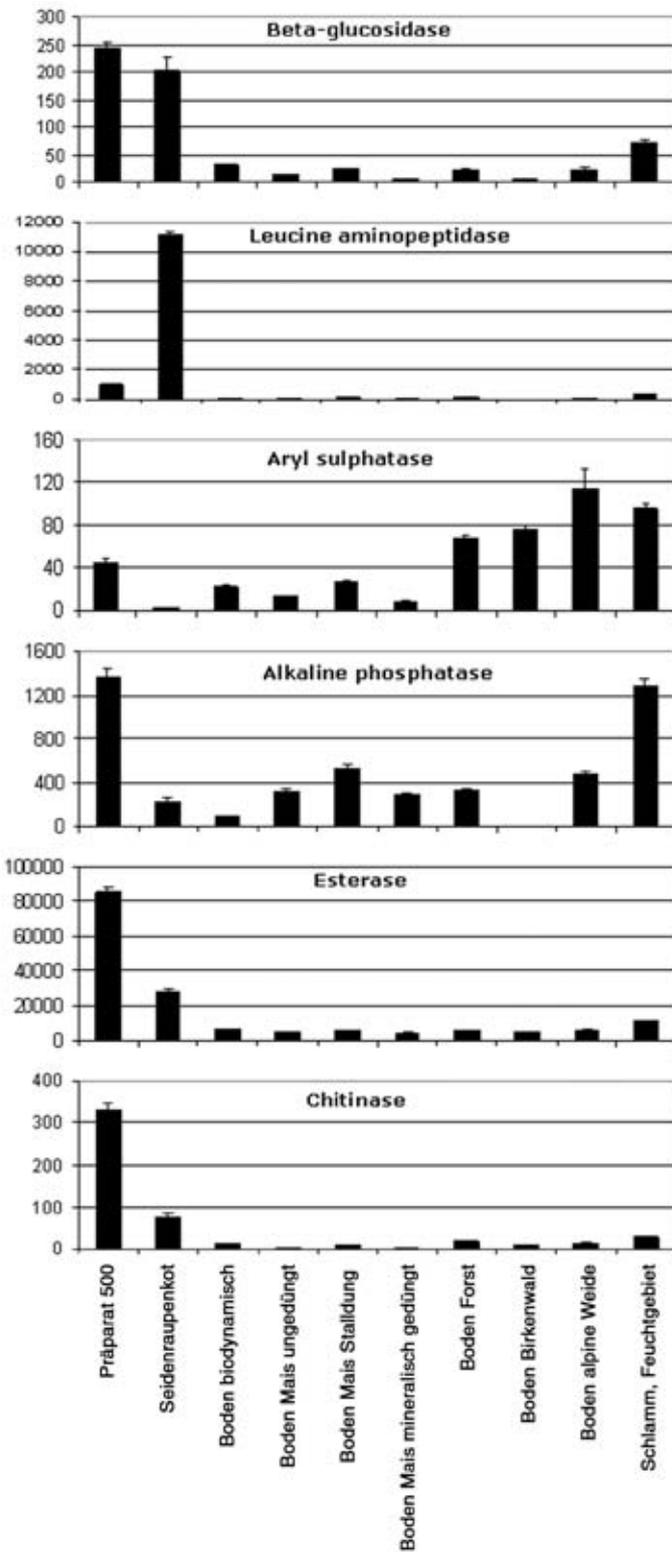


**Enzymatische Prüfung:** Die sechs untersuchten Enzymaktivitäten wurden als repräsentative Indikatoren für die vier wesentlichen Nährstoffzyklen von Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor und Schwefel ausgewählt bzw. als Anzeiger für das abbauende Potenzial durch Pilze und Gliederfüßer (Chitinase), hinzu kam die allgemeine Enzymaktivität in Form von Esterase. Präparat 500 wies hohe spezifische Aktivitäten auf, besonders für abbauende

Das biodynamische Hornmistpräparat (P500) reift über Winter im Boden: Wie ändert sich das Ausgangsmaterial Kuhdung?

Art	Taxonomische Gruppe	Prozent CFU*
Bacillus megaterium	Firmicutes	46,83
Bacillus safensis	Firmicutes	44,99
Rhodococcus coprophilus	Actinobacteria	3,65
Pseudoxanthomonas dajeonensis	Gammaproteobacteria	1,42
Microbacterium sp.	Actinobacteria	1,06
Aeromonas rivuli	Gammaproteobacteria	0,74
Bacillus pumilus	Firmicutes	0,46
Nocardia globerula	Actinobacteria	0,39
Agromyces fucusus	Actinobacteria	0,32
Sphingopyxis macrogoltabida	Alphaproteobacteria	0,11
Pseudomonas fulva	Gammaproteobacteria	0,04

Tabelle 2: Art und prozentualer Anteil der kultivierbaren Bakterienarten in P500 \*(CFU = Kolonien formende Einheit)



Enzymaktivität vom Präparat 500 im Vergleich zu Böden

Tendenzen in Form von  $\beta$ -Glucosidase oder Chitinase (Abbau komplexer Polymere). Auch das Potenzial zur Hydrolyse organischer Phosphorester ist hoch, hingegen die Aktivität der Leucin-Amino-peptidase, einem Enzym des Stickstoffkreislaufs, niedrig. Im Vergleich zu den erhöhten Werten un- bearbeiteter Böden, die über denen bearbeiteter liegen, unabhängig ob dynamisch oder konventionell, lag die Aktivität des Präparates 500 deutlich darüber (Abb 4.). Das lässt darauf schließen, dass ökologische Landbaupraktiken, stimuliert mit Präparat 500, die Aktivitätswerte in Richtung eines natürlichen Kontextes balancieren, hin zu einem intensiveren Kohlenstoffzyklus und einen effizienteren biologischen Umsatz bzw. nachhaltige Fruchtbarkeit in Bezug auf den Stickstoffkreislauf gewährleisten. Konventionell bewirtschaftete Systeme dagegen reagieren auf Gaben organischen Materials mit sehr hohen Aktivitäten.

Auf Gen-aktivierende Inhaltsstoffe, z. B. der Gene zur Knöllchenbildung bei Leguminosen gab es keine enzymatischen Hinweise: auslösende Flavonoid – ähnliche Aktivitäten oder Flavone konnten nicht festgestellt werden.

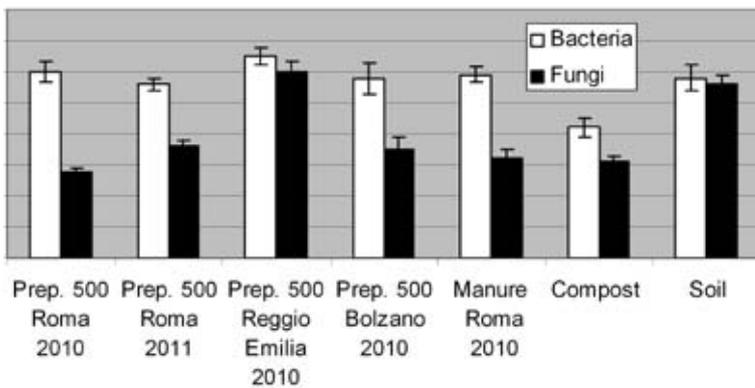
**Pflanzenhormonähnliche Aktivität:** Bei der Behandlung von Wasserkresse mit Lösung von Präparat 500 wurde eine Auxin-ähnliche Aktivität in der Größenordnung von 0,03 ppm Indolelessigsäure gemessen. Dagegen wurde hinsichtlich eines Gibberelin-ähnlichen Einflusses auf das Wachstum von Salat kein Effekt gefunden. Die Konzentration der Auxin-ähnlichen Aktivität bei einer Anwendung als Feldspritzpräparat (200 g in 60 Litern gelöst auf einen Hektar) ist in der gleichen Größenordnung wie eine Anwendung von Indol-3 Essigsäure (IAA), die in Biostimulantien wie Alfalfa-Hyd-

rolysat oder Lignosulfon-Humate vorkommt. Unsere Messungen stützen die Annahme, dass die Spritzung von Präparat 500 einen aktiven hormonähnlichen Effekt bei den Pflanzen bewirkt.

## Diskussion

Präparat 500 ist ausgestattet mit einer erheblichen enzymatisch-spezifischen Aktivität, ist daneben reich an Mikroorganismen, vor allem an Bakterien und es zeigt eine Auxin-ähnliche Wirkung. Das Vorhandensein einer reichen Mikroorganismenpopulation stimmt sowohl überein mit der parallel festgestellten chemischen Charakterisierung, wie auch mit der geringeren Anwesenheit von Pilzen. Der hohe Anteil nicht abgebauter Ligninreste dürfte die Biostimulation von Mikroorganismen und Pflanzen begründen, ähnlich wie bei Grün- oder Wurmkompost. (9) Tatsächlich zeigen verschiedene Studien die Auxin-ähnliche physiologische Wirkung von Humusextrakten aus Komposten auf Pflanzen. (2, 5) Es ist außerdem wahrscheinlich, dass der hohe Gehalt an Kohlehydraten und Peptiden in Präparat 500 die mikrobielle Vermehrung fördert und so die Aktivität der Rhizosphäre.

Von Präparat 500 wird berichtet, dass es die bodenbiologische Aktivität und die Wurzelentwicklung fördere (6, 13), obwohl es in sehr geringen Mengen ausgebracht wird. Bezogen auf die Wassermenge eines Hektars Boden bis 20 cm Tiefe – 500.000 Liter – führen die üblich ausgebrachten Mengen von 200 g Präparat je Hektar zu einer Konzentration von 0,004 Gram je Liter, bzw. zu einer molekülbezogenen Verdünnung von 2.5 Mikro-Mol. Dies ist eine im mikromolaren Bereich durchaus hohe Konzentration in Begriffen von biologischer Aktivität, wie viele Anzeichen nahele-



Die Besiedlung von Präparat 500 mit Pilzen und Bakterienarten im Vergleich verschiedener Herkunftsfte bzw. zu Boden und Kompost.

gen: So startet z. B. die durch Chito-Lipo-Oligosacchariden angeregte Knöllchenbildung der Leguminosen bereits ab einer Konzentration von 0,1 nano-Mol, also bereits bei einer um den Faktor 1000 kleineren Konzentration. Selbst wenn also die aktiven Teile des Präparates 500 deutlich geringer angenommen werden, bei z. B. einem Zehntausendstel seines Gewichtes, kommt das dieser Konzentration noch gleich.

Es ist daher unwahrscheinlich, dass bei der angewendeten Dosierung das Präparat 500 eine Wirkung als organischer Strukturdünger oder mikrobielle Impfung hat, aber es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es durch die Regulierung der Bodenbakterien wirkt. Bakterien

erkennen und reagieren auf extrem niedrige Gehalte von Signalmolekülen in ihrer Umgebung. Bei vielen höheren Pflanzen wurde die Produktion von Signal-nachahmenden Stoffen nachgewiesen, mit denen sie die Verhältnisse der Bakterien-dichte beeinflussen. Präparat 500 dürfte reichlich potenziell bioaktive Substanzen enthalten, entsprechend seiner mikrobiell vermittelten langsamen Reife unter Bedingungen geringen Sauerstoffs und der daraus hervorgehenden proteolytischen Aktivität. Ähnliche Erfahrungen mit anderen verdauten Substanzen stützen dies (11).

Ein ergänzender, weiterer möglicher Wirkungsweg von Präparat 500 kann in hormonellen Effekten auf Pflanzenwachstum und Ent-

wicklung bestehen. DEFFUNE und SCOLFIELD (4) fanden heraus, dass Huminsäuren aus diesem und anderen biodynamischen Präparaten (505 und 507) eine positive Wachstumsantwort bei Weizenkeimlingen hervorriefen. Auch eine hohe Cytokinin-Aktivität wurde bei Präparat 500 nachgewiesen (10), dazu kommt ein wirksamer Auxin-Effekt, wie in der vorliegenden Untersuchung. Demnach kann angenommen werden, dass das biodynamische Präparat 500 über die Anregung der Wurzelbildung wirkt und folglich die Pflanzen anregt, auf die Bodenvorräte an Nährstoffen zuzugreifen, die vielleicht anders unerschlossen blieben. Das deckt sich mit der empfohlenen Anwendung, die, um effektiv zu sein, einen Vorrat organischer Substanz im Boden erfordert. Es sollte auch berücksichtigt werden, dass Auxin das Bakterienwachstum anregt (12), und so mehr über die Mikroorganismen als direkt über die Pflanzen wirkt.

Untersuchungen zu weiteren Aspekten von Präparat 500, wie z. B. der Abfolge der Bakterienpopulation während der Reife im Boden mit metagenomischen Methoden sind in Arbeit. ●

Übersetzung: M. Olbrich-Majer

#### Quellen:

- BRINTON WF. 1997. Dynamic chemical processes underlying BD horn manure (500) preparation. *J Biodynamics*. 214:1-8. ●
- CANELLAS LP, DOBBS LB, OLIVEIRA AL, CHAGASA JG, AGUIAR NO, RUMJANEK VM, NOVOTNY EH, OLIVARES FL, SPACCINI R, PICCOLO A. 2012. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *Eur. J. Soil Science* 63: 315-324. ●
- Carpenter-Boggs L, Reganold JP, Kennedy AC. 2000a. Biodynamic preparations: Short term effects on crops, soils, and weed populations. *Am. J. Altern. Agric.* 15: 96-114. ●
- DEFFUNE G, and SCOLFIELD AM. 1995. Effects of humic acids and three bio-dynamic preparations on the growth of wheat seedlings. *Proc. 3rd ESA Congress, Abano-Podova, Paper ref no. 3-56.* ●
- DOBBS LB, CANELLAS LP, OLIVARES FL, AGUIAR NO, PEREIRA PERES, LE, AZEVEDO M, SPACCINI R, PICCOLO A, FACANHA AR. 2010. Bioactivity of Chemically Transformed Humic Matter from Vermicompost on Plant Root Growth. *J. Chemistry* 58: 3681-3688. ●
- KOEPF HH, PETERSSON, BB, SCHAUMANN W. 1976. *Biodynamic Agriculture*. The Anthroposophic Press, Spring Valley, New York. ●
- MÄDER P., PIFFNER L., FLIESSBACH A. and NIGGLI U. 1995. „Biodiversity of soil biota in biodynamic, organic and conventional farming systems“ eds. J. Isart, J. J. Llerena, *Biodiversity and Land Use: The Role of Organic Farming*, Bonn, 45-57 pp. ●
- MÄDER, P., FLIESSBACH, A., DUBOIS, D., GUNST, L., FRIED, P, NIGGLI, U., 2002. Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* 296: 1694-1697 ●
- SPACCINI R., MAZZEI P., SQUARTINI A., GIANNATTASIO M., PICCOLO A. 2012. Molecular properties of a fermented manure preparation used as field spray in biodynamic agriculture *Environmental Science and Pollution Research*, 438 19:4214-4225. DOI 10.1007/s11356-012-1022-x ●
- STEARN WC. 1976. Effectiveness of Two Biodynamic preparations on higher Plants and Possible Mechanisms for the observed Response. M.S. Thesis, Ohio State Univ. Columbus, OH ●
- TEJADA M, BENÍTEZ C, GÓMEZ I, PARRADO J. 2011. Use of biostimulants on soil restoration: Effects on soil biochemical properties and microbial community. *Applied Soil Ecol.* 49:11– 17 ●
- TSAVKELOVA EA, CHERDYNTSEVA TA, KLIMOVA SY, SHESTAKOV AI, BOTINA SG, NETRUSOV AI. 2007. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, 655-664. ●
- TURINEK M, GROBELNIK-MLAKAR S, BAVEC M, BAVEC F. 2009. Biodynamic agriculture research progress and priorities. *Renewable Agriculture and Food Systems* 24: 146-154.