

Forschung

Präparatwirksamkeit in Laborbedingungen

Zur Entwicklung eines Labortests für das Hormmistpräparat

Alain Morau,



Dr. Jürgen Fritz,



Fachgebiet Ökologischer
Land- und Pflanzenbau,
Universität Kassel-Witzenhausen,
Nordbahnhofstr. 1a,
37213 Witzenhausen;
j.fritz@uni-kassel.de

Die Wirkung kleinster Mengen bioaktiver Substanzen ist nicht nur eine grundlegende Frage für die Biologisch-dynamische Landwirtschaft, sondern auch für andere Forschungsbereiche wie Medizin, Physiologie oder Toxikologie. Auffallend ist, wie die in den letzten Jahrzehnten gewonnenen Kenntnisse über diese Disziplinen überschreitende Frage zu neuen Einsichten, ja zu Paradigmenwechseln führen. Insbesondere in der Toxikologie wankt heute das Paradigma der Grenzwerte¹, mindestens in Bezug auf chemische Stoffe die endokrine Störungen verursachen. Vandenberg et al. (2012) haben nämlich anhand von hunderten wissenschaftlichen Studien gezeigt, dass die Wirkung dieser Stoffe bei niedrigen Konzentrationen nicht aufgrund der Wirkung bei höheren Konzentrationen vorausgesagt werden kann, weil der Bezug zwischen Dosis und Wirkung nicht linear ist. Diese wissenschaftliche Erkenntnis kann weitläufige rechtliche Konsequenzen haben, weil heutige Grenzwerte dadurch in Frage gestellt werden. Im Alltagsleben betrifft dies insbesondere den Verbrauch zahlreicher Gegenstände aus Polycarbonat-Kunststoff (Lebensmittelverpackung, Getränkeflaschen u.a.) die den Weichmacher Bisphenol A enthalten.

Wirkungsforschung zu bioaktiven Substanzen

Weitere bedeutende Beispiele finden sich in anderen Bereichen. In der Pflanzenphysiologie führte der Nachweis von pflanzlichen Signalstoffen zu neuen Forschungsbereichen wie der Pflanzenkommunikation. In der Landwirtschaft werden Biostimulantien, beispielsweise Algenextrakt oder Huminstoffe, zur Stimulierung des Pflanzenwachstums und Stresseffektverminderung immer mehr in Betracht gezogen. Insofern haben diese wissenschaftlichen Fortschritte der letzten Jahrzehnte die Frage nach der Wirksamkeit der Biodynamischen Präparate in größere Nähe zum wissenschaftlichen Diskurs gebracht als vor 90 Jahren. Die geringen angewendeten Mengen sind für die heutige Wissenschaft nicht mehr seltsam.

Wie aber wurden diese wissenschaftlichen Fortschritte erzielt? Das ist insbesondere eine Frage der Methodik. Die Wirkung kleiner Menge bioaktiver Substanzen ist sensibel für eine Vielzahl von Faktoren, und dadurch ist ihre Wiederholbarkeit eine Herausforderung. Dementsprechend gewannen Laboruntersuchungen an Bedeutung. Insbesondere war in den letzten Jahrzehnten eine systematische Entwicklung von standardisierten Labor-Biotests in der Toxikologie, Medizin und Physiologie zu beobachten. Dabei wurden die gezielten Reaktionen von Test-

organismen auf bioaktive Substanzen unter kontrollierten Bedingungen verfolgt und reproduziert. Diese Labortests sind als Messinstrumente für die Bioaktivität von Substanzen zu verstehen.

Bei der Erforschung der Biodynamischen Präparate wurde hingegen ein anderer Weg eingeschlagen. Seit der Begründung des Versuchs- bzw. Forschungsringes 1924 wurden die Untersuchungen meistens in Freilandversuchen durchgeführt. Wahrscheinlich war ein Grund dafür, dass der Biodynamischen Landwirtschaft eine ganzheitliche Anschauung zugrunde liegt. Diese Forschungen haben wertvolle Früchte gebracht, da die Wirksamkeit der Biodynamischen Präparate auf Ertrag, Qualität und Bodeneigenschaften mehrfach erfolgreich statistisch aufgezeigt wurde. Jedoch bleibt die Wiederholbarkeit der Ergebnisse ungenügend und ein wissenschaftliches Grundverständnis der Wirkungsweise der Biodynamischen Präparate fehlt.

Deswegen sollte das Potenzial von Laboruntersuchungen untersucht werden, um die komplexen Pflanzenreaktionen auf die Präparateanwendung besser zu verfolgen (Scheper et al. 2007). Mit diesem Hintergrund lief 2011–2017 ein Forschungsprojekt an der Landbauschule Dottenfelderhof (Bad Vilbel) in Kooperation mit der biodynamischen Koordinationsstelle an der Universität Kassel. Ziel war, einen standardisierten Biotest für das Hormmistpräparat zu entwi-

Testsensibilität: Fähigkeit, Ergebnisse zur Bestimmung einer untersuchten Substanz zu liefern.

Teststabilität: Stabilität der Methode in Abhängigkeit von der Zeit

Testspezifität: Fähigkeit, eine spezifische Substanz ohne Störung durch andere Komponenten zu bestimmen.

ckeln. Gewählt wurde ein Kressestest, der am Hiscia Institut zur präklinischen Untersuchung für das Krebsheilmittel Iscador® entwickelt wurde (Baumgartner et al. 2014). Im Folgenden wird ein Überblick der durchgeführten Untersuchungen dargestellt.²

Methode

Kressesamen werden auf ein Chromatographiepapier gelegt und in einen mit Wasser gefüllten Plastikbeutel eingetütet (16 Samen pro Beutel). Als Behandlung wurde einmalig ein Tropfen beim Ansetzen der Versuche mit einer Mikroliterspritze auf das Chromatographiepapier gelegt (Abb. 1). Drei Dosierungsvarianten wurden untersucht: (1) 1µl-Tropfen Wasser als Kontrollvariante; (2) 1µl-Tropfen einer frisch gerührten Hornmistlösung (Variante D1µl); (3) 0,1µl-Tropfen der Hornmistlösung (D0,1µl). Die untersuchten Dosierungen orientierten sich an der Verdünnung der Hornmistpräparat-Suspension im Bodenwasser unter biodynamischen Praxisbedingungen, basierend auf Schätzungen von Giannattasio et al. (2013).

Für jede Variante wurden 20 Beutel (Wiederholungen) angesetzt. Die Beutel wurden im Dunkeln im Temperaturschrank in einer randomisierten vollständigen Blockanlage aufgehängt. Mit Ausnahme der Applikation des Tropfens erfolgten alle Schritte des Testverfahrens auf codierten Beuteln.

Markiert wird jeden Tag die Wachstumsentwicklung von Spross



A. Morau

und Wurzel der Keimlinge (Abb. 2). Am Ende des Experimentes (nach etwa einer Woche) werden die Beutel fotografiert, die Markierungen zur Wachstumsentwicklung mit einem Bildanalyseprogramm quantifiziert und der Wachstumsverlauf jedes Keimlings rekonstruiert. Die Versuche wurden auf dem Dottenfelderhof (Bad Vilbel) durchgeführt. In den im Weiteren beschriebenen Versuchen wurde das örtliche Hofpräparat untersucht.

Ergebnisse 2011–2013: Testsensibilität und -Stabilität

2011–2013 wurde eine langzeitige Versuchserie von 76 einzelnen Experimenten durchgeführt. Die Experimente wurden wöchentlich angesetzt mit den drei Dosierungsvarianten. Es wurde festgestellt, dass das Wurzelwachstum der Kresspflanzen in 28 von 76 Experimenten signifikant von den Hornmistbehandlungen beeinflusst wurde. Zwischen den einzelnen Experimenten fluktuierte die Wirkung des

Hornmistpräparats stark (von -32,7 % bis +17,7 % im Vergleich zur Kontrolle).

Eine Hypothese zur Erklärung der Schwankungen war die Veralterung des Hornmistpräparats, das 2010 ausgegraben wurde. Ein zweites Hornmistpräparat aus 2012 wurde deswegen in einer anderen Serie untersucht. Diese Serie von 38 Experimenten wurde parallel 2012–2013 zu der ersten durchgeführt. In 17 einzelnen Experimenten war eine Wirkung des Hornmistpräparats signifikant, die ebenfalls stark schwankte (zwischen -16,9 % und +16,3 % im Vergleich zur Kontrolle). Die Ergebnisse der zwei Serien waren kohärent miteinander.

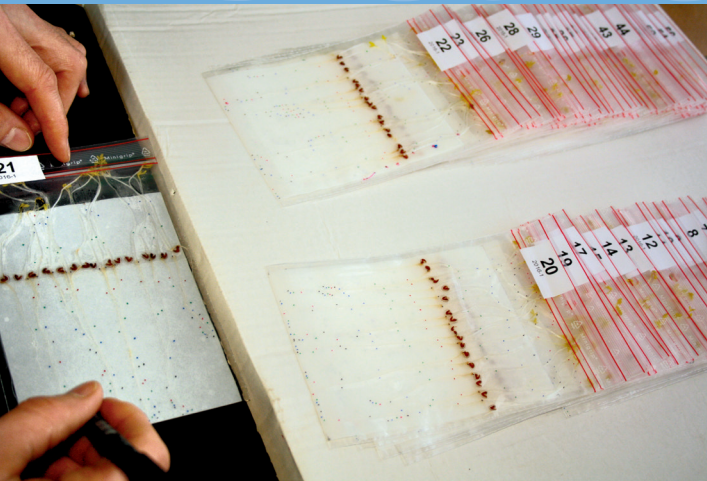
Zum Verständnis der erheblichen Schwankungen wurde geprüft, ob das Hornmistpräparat eine ausgleichende Wirkung auf hohes bzw. niedriges Wachstumsniveau hatte. Mit einer dafür geeigneten statistischen Prüfung wurde die Hypothese einer stabilisierenden Wirkung

Abbildung 1: Zugabe eines Tropfens der Behandlung (u.a. Hornmistpräparat) zu den Keimlingen mit der Mikroliterspritze

Fußnoten

1) In der Toxikologie wird das Wort des Paracelsus „Die Dosis macht die Gift“ so interpretiert, „dass es für jeden Stoff eine individuelle Dosis oder Konzentration gibt, unterhalb derer das Risiko einer Vergiftung Null oder zumindest vernachlässigbar klein ist.“ (Deutsche Gesellschaft für Toxikologie e.V. <http://www.toxikologie.de/toxikologie.html>)

2) Zu diesen Ergebnissen befinden sich wissenschaftliche Publikationen in Vorbereitung, deshalb können sie hier noch nicht ausführlich vorgestellt werden.



A. Morau

Abbildung 2: Tägliche Längenmessung der Würzelchen der behandelten Keimlinge

von Hornmist auf das Keimlingswachstum bestätigt.

2013–2014: die „Durststrecke“

In 2013–2014 wurde die erste Versuchserie fortgesetzt, aber es wurden kaum signifikante Wirkungen nachgewiesen. Der Grund dafür wurde erst Anfang 2015 verstanden, als die Wichtigkeit eines Parameters erkannt wurde: nämlich der Störung des Geotropismus der Kressekeimlinge während des täglichen Waagrechtlichens der Beutel bei den Längenmessungen (Abb. 2).

2015–2017: systematische Ermittlung von Einflussfaktoren

2015–2017 wurden einflussreiche Faktoren systematisch ermittelt (Fritz und Morau 2017). 2015 wurde der Einfluss der Störung des Geotropismus untersucht. In einer Reihe von 8 Experimenten wurden

2 Faktoren untersucht; die Dosierungen (Kontrolle, D1 μ l und D0,1 μ l) und die Dauer des Waagrechtlichens der Beutel (1, 20, 40, und 60 min). Es lagen hoch signifikante ($p < 0,001$) Wechselwirkungen zwischen den zwei Faktoren vor. In den Varianten mit ausgeprägter Störung (20, 40 und 60 min) wurde das Wurzelwachstum im Vergleich mit der störungsfreien Variante (1min) signifikant gehemmt (im Durchschnitt: -14,7%, $p < 0,001$). Zudem wirkten die Behandlungen mit Hornmistpräparat fördernd auf das Wurzelwachstum bei ausgeprägter Störung (kompensierende Wirkungsweise, Abb. 3). Diese Wirkungen waren hoch signifikant bei 40 min (D1 μ l: +9,5 %, $p < 0,001$; D0,1 μ l: +8,1 %, $p = 0,001$), und tendenziell bei 20 min und 60 min. Die Liegezeit von 40 min war somit optimal für den Test.

Der Einfluss des Wasservolumens in den Beuteln wurde ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse waren ähnlich: (1) bei hoher Wasserdosierung wurde das Wurzelwachstum der Kressekeimlinge gehemmt und (2) nur unter diesen Stressbedingungen wirkte das Hornmistpräparat wachstumsfördernd.

Dadurch wurden zwei Bausteine zum Verständnis der kompensierenden Wirkungsweise des Hornmistpräparats anhand dieser zwei Stressfaktoren gewonnen. Des Weiteren wurde unter diesen Stressbedingungen der Einfluss der Lichteinwirkung ermittelt. Dabei wurden die Kressekeimlinge während der täglichen Längemessung mit unterschiedlichen Lichtquellen während einer kurzen Zeit (1 Minute) beleuchtet: unkontrolliertes Raumlicht oder Neonlicht bei verschiedenen Stärken (100, 500, 1000, 1500 Lux). Es lagen wieder Wechselwirkungen vor. Die Ergebnisse bestätigten die fördernde Wirkung des Hornmistpräparats, die in allen Lichtvarianten vorlag.

Das Neon-Licht steigerte allerdings die wachstumsfördernde Wirkung des Hornmistpräparats (bis +11,6 % bei 1000 lux, $p < 0,0001$) stärker als das Raumlicht (+3,7 %, nicht signifikant). Die Interaktion zwischen dem Licht und dem Hornmistpräparat war diesmal synergetisch.

2016–2017 wurde die Zusammensetzung des Kulturwassers in den Fokus genommen. In den oben dargestellten Experimenten wurde das örtliche Brunnenwasser angewandt, was sich als ein nicht zu kontrollierender Faktor unerwünscht erwies. Zur Suche nach einer standardisierbaren Alternative wurden verschiedene Wässer (destilliertes Wasser und Mineralwässer) untersucht. Die Ergebnisse wiesen auf einen Einfluss des Mineralgehaltes des Kulturwassers auf die Wirksamkeit des Hornmistpräparats hin. Es traten signifikante Wirkungen von Hornmistpräparat-Behandlungen hauptsächlich bei Quellwasser mit einem mittleren Mineralgehalt (100–600 mg je Liter) auf. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein besonderes Mineralwasser als Wasser für die Kulturen weiter untersucht (Morau und Fritz 2017). Jedoch zeigte sich in den vorläufigen Ergebnissen die Wirkung des Hornmistpräparats in diesem Mineralwasser weniger reproduzierbar als im örtlichen Brunnenwasser.

Diskussion

Die Untersuchungen von 2011 bis 2017 durchliefen mehrere Phasen. 2011–2013 wurde die Testsensibilität und -Stabilität über einen langen Zeitraum untersucht. Der Zeitraum 2013–2014 war eine „Durststrecke“, in der kaum signifikante Wirkungen nachgewiesen werden konnten. 2015–2017 wurden beeinflussende Faktoren ermittelt und dadurch die Stabilität des Testes besser verstanden. Aus den be-

Danksagung

Wir danken sowohl der Stiftung zur Forschungsförderung der Anthroposophischen Gesellschaft, dem Rudolf Steiner-Fonds für wissenschaftliche Forschung e.V., der Mahle Stiftung GmbH und der Berneburg-Stiftung für ihre finanzielle Unterstützung in 2011–2014, als auch der Software AG Stiftung und dem Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN) für ihre finanzielle Unterstützung in 2015–2017.

Wir danken auch der Landbauschule Dottenfelderhof, Dr. H. Spieß und C. Matthes für die ursprüngliche Idee und Impulse, Prof. H.-P. Piepho für die statistische Auswertung und Prof. Jürgen Heß mit unseren Kollegen am Fachgebiet Ökologischer Land- und Pflanzenbau an der Universität Kassel für die Unterstützung und die kritischen und anregenden Gespräche.

schriebenen Ergebnissen ergeben sich drei wesentliche Schlussfolgerungen:

- Die Wiederholbarkeit der Wirksamkeit der Hornmistlösung konnte über mehrere Monaten gewährleistet werden. Das ist ein wichtiges Ergebnis, weil in früheren Studien zwar die Wirksamkeit der Biodynamischen Präparate statistisch gezeigt wurde, eine Wiederholbarkeit der Ergebnisse aber nicht erreicht wurde. Allerdings bleibt diese Wiederholbarkeit im Kresstest über eine längere Zeitperiode noch instabil.

- Die regulierende Wirkung des Hornmistpräparats wurde statistisch belegt. Diese Wirkungsweise entspricht den Hinweisen früherer Studien (Dewes und Ahrens 1990, Raupp und König 1996, Goldstein und Barber 2005). Da diese Studien meistens unter natürlichen Bedingungen stattgefunden haben, spricht diese Entsprechung dafür, dass die Testergebnisse auf Praxisbedingungen übertragen werden können.

- Die Wirkungsweise des Hornmistpräparats wurde präzisiert, indem eine kompensierende Wirkungsweise gegenüber zwei Stressfaktoren (Störung des Geotropismus, Wasserüberdosierung) beschrieben wurde. Wechselwir-

kungen mit dem Licht und der Wasserzusammensetzung wurden ebenfalls beschrieben. Die Sensibilität der Wirksamkeit des Hornmistpräparats in Wechselwirkung mit so verschiedenen Faktoren weist darauf hin, dass das Hornmistpräparat die Anpassungsfähigkeit und die Resilienz der Pflanzen gegenüber ihrer Umgebung erhöht. In Bezug auf eine erfolgreiche Testentwicklung müssen allerdings weitere Einflussfaktoren besser verstanden, standardisiert und kontrolliert werden, um die Teststabilität zu gewährleisten.

Es stellt sich zudem die Frage, inwiefern der biodynamische Herstellungsvorgang des Hornmistpräparats der gezeigten Wirksamkeit in diesem Kresstest zugrunde liegt (Frage der Testspezifität). In der Tat können mit dem Hornmistpräparat chemisch vergleichbare Substanzen wie Huminstoffe bei sehr niedrigen Dosierungen auch eine Wirksamkeit in Laboruntersuchen zeigen. Es bleibt somit offen, inwieweit das Hornmistpräparat in seiner Wirksamkeit von anderen Substanzen sich unterscheidet.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Forschung haben die Testsensibilität nachgewiesen und dadurch die Mach-

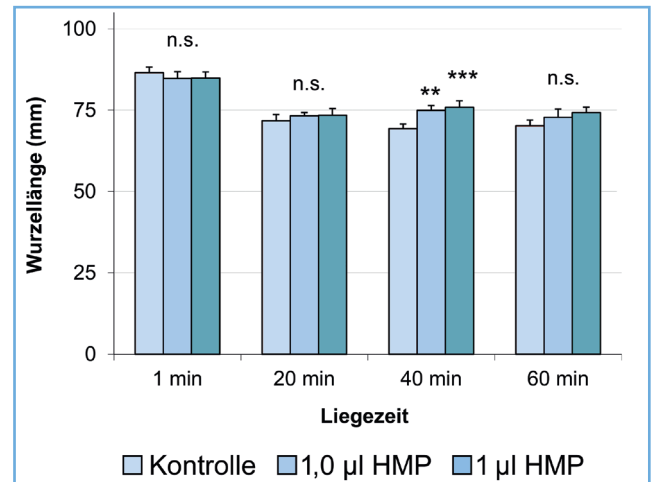


Abbildung 3: Wurzellänge in Abhängigkeit von Liegezeit und Dosierung. Mittelwerte von 8 Experimenten (Balken: Standardfehler). Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede von HMP-Behandlung zur Kontrolle bei gleicher Liegezeit: n.s. nicht signifikant; * 0,01<P<0,05; ** 0,01<P<0,001; *** 0,001<P (Wald-Statistik, Tukey-Kramer Test).

barkeit des Vorhabens gezeigt. Allerdings bleibt die Wiederholbarkeit der Ergebnisse über lange Zeitperioden schwierig zu realisieren. Es wurde gezeigt, wie komplex die Wirkungsweise des Hornmistpräparates durch die Interaktionen mit mehreren Faktoren ist. Die Entwicklung eines solchen Biotests ist insofern eine Herausforderung, sie führt allerdings auch zu bedeutenden Erkenntnisgewinne bezüglich der Wirksamkeit des Hornmistpräparats. Insofern zeigte dieses Forschungsprojekt das Potenzial von Laboruntersuchungen zur Ermittlung der Biodynamischen Präparate und sollte weitergeführt werden. ●

Referenz

BAUMGÄRTNER S, FLÜCKIGER H, KUNZ M, SCHERR C und URECH K (2014) Evaluation of Preclinical Assays to Investigate an Anthroposophic Pharmaceutical Process Applied to Mistletoe (*Viscum album* L.) Extracts. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine; <http://dx.doi.org/10.1155/2014/620974>. • Dewes T und Ahrens E (1990) Wechselwirkungen zwischen organischer Düngung und der Anwendung des biologisch-dynamischen Präparates P500 im aeroben Inkubationsversuch. *Agribiological Research*; 43(1): 65–73. • GIANNATTASIO M, VENDRAMIN E, FORNASIER F, ALBERGHINI S, ZANARDO M, STELLIN F, CONCHERI G, STEVANATO P, ERTANI A, NARDI S, RIZZI V, PIFFANELLI P, SPACCINI R, MAZZEI P, PICCOLO A, und SQUARTINI A (2013) Microbiological features and bioactivity of a fermented manure 1 product (Preparation 500) used in biodynamic agriculture. *Journal in Microbiology and Biotechnology*; 23(5): 644–651. • GOLDSTEIN WA und BARBER W (2005) Yield and root growth in a long-term trial with biodynamic preparations. In: Köpke U, Niggli U, Neuhoff D, Cornish P, Lockeretz W and Willer H ed. *Researching Sustainable Systems. Proceedings of the First Scientific Conference of the International Society of Organic Agriculture Research (ISOFAR)*. Bonn: IOL. S. 214–217. • FRITZ J und MORAU A (2017) Entwicklung, in-house Validierung und Praxiserprobung eines Biotests mit Gartenkresse zur Erfassung der Pflanzenreaktionen nach Behandlungen mit dem biologisch-dynamischen Hornmistpräparat. Abschlussbericht – Projekt 130E006 Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft. <http://orgprints.org/32104/1/32104-130E006-uni-kassel-fritz-2017-gartenkresse-hornmistpraeparat.pdf> • MORAU A und FRITZ J (2017) Standardisierung eines Kresstestes für das biologisch-dynamische Hornmistpräparat. In *Beiträge der 14. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau*, Verlag Dr. Köster, Berlin. S. 326–329. • RAUPP J. und KONIG UJ (1996) Biodynamic Preparations Cause Opposite Yield Effects Depending Upon Yield Levels. *Biological Agriculture and Horticulture*; 13: 175–188. • SCHEPER C, RAUPP J und BAARS T (2009) Mögliche Wirkungswege der biologisch-dynamischen Hornpräparate aus naturwissenschaftlicher Perspektive. In: *Beiträge zur 10. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau*, Verlag Dr. Köster, Berlin. Band 1, S. 123–126. • VANDENBERG L, COLBORN T, HAYES T, HEINDEL J, JACOBS D, LEE D H, SHIODA T, SOTO A, VOM SAAL F, WELSHONS W, ZOELLER T, und MYERS J (2012) Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*; 33(3).