

Hans-Peter Malkomes

# Einfluss Kupfer-haltiger anthropogener Einträge auf Bodenmikroorganismen – eine Übersicht.

## I. Mikrobielle Populationen

Influence of anthropogenic copper pollution on soil microorganisms – an overview.  
I. Microbial populations

211

### Zusammenfassung

Kupfer ist ein essentielles Spurenelement, jedoch wirkt es in höheren Konzentrationen oft toxisch gegenüber verschiedenen Organismen. Eine Kontamination von Böden mit diesem Schwermetall kann verschiedene Ursachen haben (z. B. Emissionen, Klärschlammapplikation, Cu-haltige Pflanzenschutz- und Düngemittel) und – neben den seltenen Fällen hoher natürlicher Cu-Gehalte – zu sehr hohen Cu-Konzentrationen im Boden führen, die sich zudem viele Jahre erhalten oder sogar noch akkumulieren können. Speziell in land- und forstwirtschaftlich sowie gartenbaulich genutzten Böden, aber auch in natürlichen Ökosystemen, sollte jedoch trotz der Cu-Belastungen eine funktionsfähige Biozönose mit hoher Biodiversität erhalten bleiben, wobei dem Mikroorganismenanteil wegen seiner großen Biomasse und Diversität sowie seinen vielfältigen Umsatzleistungen eine wichtige Rolle zukommt. Da inzwischen viele hundert Veröffentlichungen – besonders aus den letzten drei Jahrzehnten – zum Einfluss von Kupfer und seinen Verbindungen auf Bodenmikroorganismen vorliegen, wird hier zunächst nur auf mikrobielle Populationen eingegangen, während mikrobielle Aktivitäten in einer nachfolgenden Übersichtsarbeit dargestellt werden.

In einzelnen Kapiteln wird der Einfluss von Kupfer auf die mikrobielle Diversität und Biomasse, auf allgemeine mikrobielle Populationen sowie auf ausgewählte Mikroorganismengruppen behandelt. Diese sind Stickstoff-bindende Mikroorganismen, die Mykorrhiza, nematophage

Pilze und gegenüber Phytopathogenen antagonistische sowie gegen Schadinsekten entomopathogene bodenbürtige Mikroorganismen. Der Beeinflussung der Cu-Wirkung durch andere Umweltchemikalien ist ebenfalls ein Kapitel gewidmet. Entsprechend der Vielzahl an Veröffentlichungen ist die Bandbreite der beobachteten Cu-Wirkungen sehr groß. Aus nahezu allen Bereichen liegen sowohl deutliche Wirkungen niedriger – durchaus praxisnaher oder sogar geringerer – Cu-Dosierungen gegenüber Bodenmikroorganismen vor als auch kaum feststellbare Effekte sehr hoher Cu-Gehalte. Hinzu kommen mehr oder weniger ausgeprägte direkte Effekte der eingesetzten Cu-haltigen Pflanzenschutzmittel. Einige Mikroorganismen bilden offensichtlich bei hohen bis sehr hohen Cu-Belastungen tolerante Populationen, allerdings oft zu Lasten der mikrobiellen Diversität. Da einerseits Cu-Gehalte im Boden im Allgemeinen sehr lange erhalten bleiben und andererseits anhand der vorliegenden Literatur Wirkungen auf essentielle Bodenmikroorganismen kaum auszuschließen sind, ist zumindest Zurückhaltung beim Einsatz Cu-haltiger Pflanzenschutz- und Düngemittel zu empfehlen. Eine abschließende Diskussion und Beurteilung von anthropogenen Cu-Belastungen auf Bodenmikroorganismen ist in der nachfolgenden zweiten Übersichtsarbeit unter Einbeziehung mikrobieller Aktivitäten vorgesehen.

**Stichwörter:** Kupfer, Pflanzenschutzmittel, Boden, Bakterien, Pilze, Algen, Antagonisten, Biomasse, Biodiversität, Populationen

### Institut

Früher: Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Braunschweig

### Kontaktanschrift

Dr. H.-P. Malkomes, Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig, Germany, E-Mail: ackerbau@jki.bund.de

### Zur Veröffentlichung angenommen

Januar 2010

**Abstract**

The heavy metal copper is an essential trace element, but at higher concentrations it may be toxic to several organisms. Soil contaminations by copper may be due to several sources, e.g. emissions, application of sludge, copper-containing pesticides and fertilizers. Besides few cases where high natural copper contents exist these pollutions may contribute to very high Cu concentrations in soils which persist or even accumulate during many years. In soils used for agriculture, forestry or horticulture – but also in natural ecosystems – the copper pollution nevertheless should guarantee a functional biocenosis and high biodiversity. This especially applies to microorganisms which mainly contribute to biomass, diversity and turnover rates in soil. Until now several hundreds of publications – especially from the last three decades – are available on effects of copper including its chemical substances on soil microorganisms. Therefore, the review presented here concentrates on microbial populations, whereas effects of copper on microbial activities will be presented in a succeeding overview.

In several chapters the influence of copper on the soil microbial biomass and diversity, on common microbial populations, nitrogen-fixing microorganisms and the mycorrhiza, on nematophagous fungi and soil-borne microorganisms antagonistic to phytopathogens as well as entomopathogens against phytophagous insects will be presented by several examples. An additional chapter describes some effects of copper in combination with further pollutants on soil microorganisms. Depending on the multitude of publications great amplitudes of the observed effects of copper exist. Nearly from all presented areas significant influences of low copper concentrations – at practical or even lower dosages – are reported as well as very low effects of very high ones. In addition more or less direct effects of copper-containing pesticides are reported. Obviously some microorganisms may be able to build up copper-tolerant populations due to high or very high copper pollution, which often are accompanied by a decreased microbial diversity in soil. Because the copper content in soil normally persists over a long time and from literature data effects of copper on microbial populations in soil cannot be avoided in many cases we suggest a restrained application of copper-containing pesticides and fertilizers. A final discussion and evaluation of the effects of copper on soil microorganisms should also include microbial activities and, therefore, will be done in a succeeding second part of the review.

**Key words:** Copper, pesticides, soil, bacteria, fungi, algae, antagonists, biomass, biodiversity, populations

**Einleitung**

Das Schwermetall Kupfer ist in der Natur weit verbreitet. Als essentielles Spurenelement ist es am Stoffwechsel von Organismen beteiligt, doch wirken höhere Konzent-

rationen oft toxisch. KRATZ et al. (2009) nennen in ihrer Übersichtsarbeit typische Kupfer-Gehalte in unbelasteten Böden von 2 bis 100 mg/kg, es werden aber auch Werte von 142 und 276 mg/kg erwähnt. Der austauschbare Anteil des Kupfers beträgt dabei oberhalb eines pH-Werts von 5 weniger als 1%, darunter nimmt er merklich zu. Wegen seiner geringen Mobilität im Boden kann sich Kupfer bei langjähriger Einwirkung anreichern, besonders wenn die Aufnahme durch Pflanzen und die Auswaschung geringer sind als der Eintrag. Vor allem im Bereich industrieller Emissionen können sehr hohe Kupfergehalte – oft begleitet von weiteren Schwermetallbelastungen – im Boden auftreten. Aber auch in landwirtschaftlich genutzten Böden kann der Kupfergehalt z. B. durch Mineral- und Wirtschaftsdünger, Kompost, Klärschlamm und Kupfer-haltige Pflanzenschutzmittel, speziell Fungizide angehoben werden. Besonders im Obst-, Wein- und Hopfenbau wurden – u. a. nach dem langjährigen und häufigen Einsatz Kupfer-haltiger Pflanzenschutzmittel – in verschiedenen Ländern teilweise hohe Bodenbelastungen von über 1500 mg Cu/kg gemessen (STRUMPF et al., 2009). Von den zahlreichen Kupfer-haltigen Pflanzenschutzmitteln dürften vor allem anorganische Mittel mit hohem Cu-Gehalt wie z. B. die Bordeaux-Mischung (Kupfersulfat + Calciumhydroxid), Kupferhydroxid, Kupferoxid, Kupferoxychlorid und Kupfersulfat beteiligt gewesen sein, die neben einer fungiziden teilweise auch eine herbizide Wirkung aufweisen.

Bei derartig hohen und lang anhaltenden Belastungen des Bodens mit Kupfer stellt sich naturgemäß die Frage nach einer möglichen Beeinträchtigung der für den Erhalt der Bodenfruchtbarkeit wichtigen Mikroorganismen. Leider gibt es nur sehr wenige Übersichtsarbeiten, die sich ausschließlich auf die Ökotoxikologie von Kupfer hinsichtlich Bodenmikroorganismen beziehen und daraus eine Beurteilung der hier behandelten Situation ermöglichen. Allerdings ist die Zahl derjenigen Übersichtsarbeiten groß, die ökotoxikologische Fragestellungen des Kupfers neben denen anderer Schwermetalle oder Pflanzenschutzmittel behandeln. Fast unübersehbar ist dagegen die Anzahl an Originalveröffentlichungen, in denen der Einfluss von Kupfer in Ionen- oder Metallform, in Emissionen, als Umweltschadstoff, in Düngern oder Pflanzenschutzmitteln auf Bodenmikroorganismen – mit einem Schwerpunkt etwa zwischen den Jahren 1990 und 2000 – untersucht wurde.

Da Kupfer-haltige Verbindungen bereits seit langem auch als Pflanzenschutzmittel eingesetzt wurden, sollte man bereits ein Minimum an standardisierten mikrobiologisch-ökotoxikologischen Daten zur C- und N-Mineralisierung aus Zulassungsverfahren oder vergleichbaren Untersuchungen erwarten können. Aber selbst wenn diese vorlägen, erfordert eine ausreichende ökotoxikologische Beurteilung – besonders im Hinblick auf die Wirkung der Kupferanreicherung (auch aus anderen Quellen) im Boden – weitaus umfangreichere Untersuchungen, wie sie nachfolgend und im zweiten Teil der Arbeit (MALKOMES, 2010) berücksichtigt werden. Soweit wie möglich werden neuere Untersuchungen bevorzugt. Da

die zitierten Untersuchungen sehr heterogen sind und sich teilweise auf die Cu-Gehalte im Boden beziehen, teilweise aber auch auf eine direkte Kontamination mit verschiedenen Cu-Verbindungen, die wiederum unterschiedliche chemische Eigenschaften (z. B. Wasserlöslichkeit) aufweisen, wird eine Beurteilung zusätzlich erschwert. Die zahlreichen Veröffentlichungen zur besonderen Situation industrieller Emissionen werden – auch wegen der häufigen Mischkontamination – hier nur am Rande berücksichtigt.

### Einfluss von Kupfer auf die mikrobielle Biomasse und Diversität

Angaben zum Einfluss einer Cu-Belastung des Bodens auf die mikrobielle Biomasse als Summe aller Bodenmikroorganismen liegen vor allem aus Untersuchungen mit mehreren Schwermetallen vor, so dass sich die Wirkungen teilweise nur schwer zuordnen lassen. Hinzu kommen Interpretationsunterschiede je nach verwandter Methode zur Biomassebestimmung (z. B. ATP-Gehalt, verschiedene Atmungsmethoden). WANG et al. (2002) fanden in einem durch Immissionen belasteten Boden eine negative Korrelation zwischen dem verfügbaren Cu- und Zn-Gehalt und dem mikrobiellen Biomasse-Kohlenstoff und -Stickstoff. Auch BROOKES und MCGRATH (1984) beobachteten selbst 20 Jahre nach einer letzten Klärschlammdüngung noch negative Effekte der enthaltenen Schwermetalle (z. B. etwa 8 – 90 mg/kg extrahierbares Kupfer) auf die mikrobielle Biomasse (ATP- und Begasungsmethode). Spätere Untersuchungen zeigten, dass die mikrobielle Biomasse im Boden anfangs offensichtlich kaum große Unterschiede zwischen stark und gering mit Schwermetallen (u. a. Kupfer) belastete Klärschlammgaben aufwies (CHANDER et al., 1995). Aber nach 64 Wochen verursachte die zweifach über dem damaligen EU-Limit (300 mg Cu/kg) liegende Cu-Gabe dennoch eine 20%-ige Hemmung des Biomasse-C. Ergänzende Laborversuche mit verschiedenen Schwermetallen als Sulfate (140 mg Cu/kg) über 50 Tage zeigten schließlich nur relativ geringe Veränderungen der mikrobiellen Biomasse und bewiesen, dass solche Kurzzeitbebrütungsversuche nur bedingt als Modell für chronische Schwermetallbelastungen geeignet sind (RENELLA et al., 2002). Das Fungizid Kupferoxychlorid (als Miedzian 50WP) selbst erhöhte die mikrobielle Biomasse (SIR-Methode) mit der niedrigsten Dosierung (1 mg/kg), hemmte sie jedoch mit 100 mg/kg (NOWAK und BŁASZAK, 2004). Die Anwendung des Fungizids Bordeaux-Mischung mit 16 und 48 kg Cu/ha ergab im Feld keinen signifikanten Einfluss auf den mikrobiellen Biomasse-C, während dieser im Gefäßversuch (20 und 60 mg Cu/kg) in einem Boden abnahm (RANJARD et al., 2006a). WILKE (1987) fand nach langjähriger Anwendung von Kupfersulfat (jährlich 10 und 20, insgesamt 140 und 280 mg Cu/kg) zur Simulation einer Kupferbelastung im Boden von Betonparzellen sogar 10 Jahre nach der letzten Applikation und vorhandenen Cu-Auswaschungsverlusten von etwa 13% noch eine ver-

ringerte mikrobielle Biomasse (ATP-Gehalt, Atmungsmethode).

Während früher mikrobielle Diversitätsuntersuchungen im Boden vor allem auf „klassischen Populationsmethoden“ beruhten, haben moderne Nachweismethoden (z. B. Phospholipidfettsäureprofile PLFA, Denaturierungsgradienten-Gelelektrophorese DGGE, Substratnutzungsmuster BIOLOG) in den letzten Jahren zu einem Informationsgewinn geführt. Dementsprechend konzentriert sich die hierzu verfügbare Literatur vorwiegend auf die letzten 15 Jahre, wobei auch hier oft gemischte Schwermetallbelastungen durch Emissionen usw. im Vordergrund stehen. Bereits frühzeitig wiesen ZELLES et al. (1994) darauf hin, dass es durch den langjährigen Einsatz Cu-haltiger Fungizide in Hopfenböden zu einem erhöhten Cu-Gehalt (150 mg/kg) und damit verbunden zu einer Veränderung der Mikroorganismengemeinschaft (z. B. Anstieg gram-positiver Bakterien) kommen kann. Auch in Böden von Obstanlagen und Weinbergen verursachte die langjährige Applikation Cu-haltiger Fungizide erhöhte Cu-Gehalte (z. B. 145,5 – 296,7 mg/kg), die wiederum toxisch gegenüber der Bakteriengemeinschaft sein können (VITTI et al., 2008). In einem über 30 Jahre jährlich viermal mit Kupfersulfat belasteten Weinbergsboden und daraus resultierenden unterschiedlich hohen Cu-Gehalten (215 und 372 mg/kg) in zwei Anbaulagen ließen sich anhand des DGGE-Profiles und von Bakterienisolaten ebenfalls Verschiebungen der Bakteriengemeinschaft feststellen (DELL'AMICO et al., 2008). Zwar war an beiden Standorten der Anteil Cu-toleranter Bakterien hoch, doch herrschten im geringer mit Cu belasteten Boden gram-positive Bakterien vor, im höher belasteten dagegen gram-negative. Auch in einem dreijährigen Feldversuch verursachte die jährliche Applikation des Fungizids Bordeaux-Mischung (16 und 48 kg Cu/ha) erhöhte Cu-Gehalte im Boden (RANJARD et al., 2008). Während die wiederholte Anwendung der niedrigeren Dosierung zu einer erhöhten Stabilität der Mikrobengemeinschaft gegenüber dem Metallstress führte, induzierte die höhere eine veränderte, aber danach ebenfalls stabile Struktur der Bakterienpopulation. Zusätzlicher Klimastress kann diese Reaktionen beeinflussen. Aus ihrem Mikrokosmenexperiment mit einem unbelasteten (29,3 mg Cu/kg) und einem belasteten Boden (214 mg Cu/kg) schlossen BERNARD et al. (2009), dass einige Bakterienpopulationen (z. B. *Gamma*proteobacteria) durch Kupfer gehemmt werden, während andere langsam wachsende dagegen gefördert werden. Ebenfalls in Mikrokosmen mit verschiedenen sandigen Böden applizierten DU PLESSIS et al. (2005) in abgestufter Dosierung das Fungizid Kupferoxychlorid (0, 30, 100, 1000 mg Cu/kg) und erzielten damit EDTA-extrahierbare Cu-Gehalte von 0,83 – 1008,15 mg/kg. Bei der höchsten Dosierung war die mittels BIOLOG ermittelte Anzahl der von Mikroorganismen im Test verwerteten C-Quellen verringert. Während Bakterienpopulationen differenziert auf die Cu-Belastung reagierten, waren Protisten – speziell aus nicht kultivierten Flächen – generell empfindlich. In Vergleichsuntersuchungen mittels PLFA-Methoden von einem frisch mit Kupferchlorid (50,

200, 2000 mg Cu/kg) behandelten und einem früher in einer Holzschutzanlage mit Kupfer kontaminierten (3392 mg Cu/kg) und für die Versuche gemischten Boden wurden vorwiegend aerobe Bakterien dosisabhängig verringert (WILKE et al., 2005). Dieser Effekt war im Boden mit gealterten Cu-Rückständen ab der mittleren Dosierung ausgeprägter. Versuche mit gestaffelten Gaben von Kupfersulfat zu zwei Böden zeigten ebenfalls, dass sich die PLFA-Muster und damit die Struktur der Mikroorganismengemeinschaft im Boden mit steigender Dosierung (ab 75 mg Cu/kg) änderte (Yao et al. 2006). So erhöhte sich z. B. der Anteil gram-negativer Bakterien und die mikrobielle Diversität nahm ab. Im Laborversuch applizierte PEČIULYTE (2001) Kupfersulfat (65 mg Cu/kg) zu Gartenboden und isolierte danach 378 Pilzkolonien, die 15 Gattungen und 29 Arten angehörten. Durch Kupfer wurden potenziell phytopathogene Pilze der Gattung *Acremonium*, *Cylindrocarpon* und *Nigrospora* und Antagonisten der Gattung *Gliocladium* stimuliert, andere jedoch verringert. Unter Laborbedingungen mischten MORENO et al. (2003) Kupfersulfat (3 g Cu/kg) in einen Boden, wovon bereits nach 24 h ein Großteil des Cu sorbiert war. Die Anzahl Bakterien und Pilze wurde zwar nicht beeinträchtigt, doch wurde die mikrobielle Diversität verringert und gram-positive Stäbchen-Bakterien und Pilze gefördert. Davon waren 140 Stämme gegenüber hohen Cu-Konzentrationen (50, 140 und 310 mg/L) tolerant, darunter besonders *Bacillus* und *Penicillium*. In Gefäßversuchen mit vier australischen Böden verursachten gestaffelte Dosierungen von Kupfernitrat (60 – 1500 mg Cu/kg) ebenfalls eine dosisabhängige Beeinträchtigung der funktionalen mikrobiellen Diversität (BIOLOG) und Biomasse, wobei nach 45 Tagen die Wirkung erst ab 300 mg Cu/kg auftrat, nach 270 Tagen jedoch bei allen Dosierungen (BANU et al., 2004).

### Einfluss von Kupfer auf die Hauptgruppen mikrobielle Populationen

Die Anzahl vorhandener Veröffentlichungen über den Einfluss von Kupfer und dessen Verbindungen auf mikrobielle Populationen ist so groß, dass hier nur ein repräsentativer Querschnitt vorgestellt werden kann. Besonders Gewicht wurde dabei auf Arbeiten gelegt, die eine möglichst breite Palette mikrobieller Populationen erfasst haben. Etwa zwischen den Jahren 1980 und 2000 – mit Schwerpunkt in den 90er Jahren – wurden offensichtlich die meisten dieser ökotoxikologischen Untersuchungen durchgeführt. Da einige Mikroorganismengruppen nachfolgend separat behandelt werden, kann an dieser Stelle auf sie verzichtet werden.

Einige Veröffentlichungen zur Situation von Weinbergs- und ähnlichen – oft langjährig mit Kupfer kontaminierten – Böden weisen auf die Cu-Gefährdung hin. So wuchsen in einem Gefäßversuch mit Boden, der 13 Jahre zuvor u. a. einer Cu-Belastung (750 kg/ha) ausgesetzt war, Testpflanzen (*Agrostis capillaris*) zwar schwächer, doch wurde die Bakterien- und Protozoenanzahl nicht beeinflusst (BOON et al., 1998). In einem mit verschiedenen

Dosierungen von Kupfersulfat kontaminierten Boden waren nach 6 Jahren noch 42,3 bzw. 189,6 mg Cu/kg vorhanden (SZILI-KOVACS, 2008). Hier war jedoch bereits beim niedrigen Cu-Gehalt die Anzahl Aktinomyzeten sowie copiotropher und oligotropher Bakterien leicht reduziert, während die Pilzzahl unbeeinflusst blieb. Eine mehr als 50-jährige Cu-Kontamination verschiedener Böden (12 – 3000 mg Cu/kg) beeinträchtigte sowohl Pilze, Bakterien und Aktinomyzeten im Boden (DUMESTRE et al., 1999). Dabei trat mit steigenden Cu-Gehalten eine Tendenz zu größeren Populationen Cu-toleranter Bakterien, Aktinomyzeten und Pilze auf. ESSWEIN und SCHWARTZ (1939) hatten bereits sehr früh festgestellt, dass nach der Anwendung von Bordeaux-Brühe und Kupfersulfat die Anzahl Algen und heterotropher Bakterien in Weinbergböden reduziert war. Dagegen wurde in Obstanbauböden auf der Krim, in denen der Cu-Gehalt durch 10-jährige Anwendung von Cu-Fungiziden auf 40 – 180 mg/kg angestiegen war, eine Tendenz zu erhöhten Bodenpilzzahlen beobachtet (IVANOVA, 1987). Die Anwendung von Kupferoxychlorid zu Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) verursachte – ähnlich wie andere Fungizide – eine Verringerung der Pilz- und Bakterienpopulation, wobei der Effekt in der Rhizosphäre deutlicher ausfiel als im Boden (SHUKLA et al., 1987). In japanischen Weinbergböden wurde eine positive Korrelation zwischen den Cu-Gehalten und der Isolierungshäufigkeit Cu-resistenter Streptomyzeten gefunden (HAYAKAWA et al., 1982). Zur Simulation einer Cu-Belastung von Weinbergböden applizierten COURDE et al. (1998) 4 Jahre lang jeweils 12 bzw. 50 kg Kupfersulfat pro ha und erzielten Cu-Gehalte im Boden zwischen 12 und 90 mg/kg. Hierdurch wurden Bakterien- und Pilzpopulationen verringert. Einzelne Bakteriengruppen wurden unterschiedlich durch 50 kg/ha beeinflusst: *Arthrobacter*, *Nitrosococcus*, *Bacillus* und *Variovorax* wurden mehr oder weniger deutlich stimuliert, *Pseudomonas*, *Rhizobium* und *Alcaligenes* dagegen gehemmt. Die langjährige Anwendung Cu-haltiger Fungizide hatte in spanischen Weinbergböden zu Cu-Gehalten von 35 bis 550 mg/kg geführt (DIAZ-RAVIÑA et al., 2007). Parallel dazu mittels „Thymidin- und Leucin-Incorporation-Technique“ durchgeführte Untersuchungen zeigten in Böden mit mehr als 100 mg Cu/kg eine Beeinträchtigung anhand der erhöhten Cu-Toleranz der Bakterien. ZANCAN et al. (2006) fanden in Weinbergböden, die infolge der früheren Anwendung von Cu-Fungiziden (z. B. Kupferoxychlorid) gegenüber den anderen Standorten einen erhöhten Cu-Gehalt von 53 mg/kg aufwiesen, weniger Algen (z. B. Chlamydomyceen, Chlorophyceen) und Cyanobacteria als in weniger belasteten Böden. Allerdings ist anhand der Versuchsanordnung der Einfluss weiterer Faktoren nicht auszuschließen.

In zahlreichen Labor- und Feldversuchen wurde weiterhin der Einfluss verschiedener anorganischer Cu-Verbindungen – darunter sehr häufig Kupfersulfat – auf zahlreiche Bodenmikroorganismen untersucht. Die Anwendung hoher Dosierungen von Kupfersulfat (200 und 2000 mg Cu/kg) reduzierte die Populationen von Pilzen, Bakterien und Aktinomyzeten in einem Tonboden, während diese in einem Sandboden teilweise stimuliert wurden (HEMIDA et

al., 1997). In einem Gefäßversuch mit Ackerbohnen (*Vicia faba*) testeten KUCHARSKI et al. (2000) die Reaktion zahlreicher Mikroorganismengruppen gegenüber verschiedenen Dosierungen (20 – 100 mg Cu/kg) von Kupfersulfat. Dabei kam es – meistens deutlicher im mit Nitragin beimpften Boden – teilweise zu dosisabhängigen Veränderungen mikrobieller Populationen: Tendenziell stimuliert durch Kupfersulfat wurden im Nitragin-Boden Pilze, Aktinomyzeten, oligotrophe Bakterien, copiotrophe Bakterien mit und ohne Sporen sowie Ammonifikanten, während N-Immobilisierer und *Azotobacter* ab 100 mg Cu/kg verringert wurden. In einem weiteren Gefäßversuch mit einem lehmigen Sandboden und Sommergerste wurde ebenfalls Kupfersulfat (400 – 1200 mg Cu/kg) sowohl mit als auch ohne eine Beimpfung mit *Streptomyces viridis* bzw. *S. odorifer* appliziert (KUCHARSKI und WYSZKOWSKA, 2004). Wie Tab. 1 am nicht beimpften Boden zeigt, wurden alle untersuchten mikrobiellen Populationen – darunter auch Bodenpilze – durch Kupfersulfat dosisabhängig verringert, wobei oligotrophe Bakterien am stärksten reagierten. Die beimpften Böden verhielten sich weitgehend ähnlich. RAGUOTIS (1999) behandelte einen podsolierten Sandboden mit Kupfersulfat (50 bis 10000 mg Cu/kg) und untersuchte 2 Monate danach zahlreiche mikrobielle Populationen. Bakterien auf verschiedenen Nährböden wurden durch 50 und 100 mg Cu/kg stimuliert, ab 500 mg/kg dagegen – wie Aktinomyzeten insgesamt – dosisabhängig reduziert. Pilze wurden indessen weniger beeinflusst und waren ab 5000 mg Cu/kg sogar zahlreicher. Cellulolyten, *Clostridium pasteurianum*, Nitrifikanten und Denitrifikanten wurden meistens erst ab 1000 mg Cu/kg stärker verringert. KOSTOV und VAN CLEEMPUT (2001) behandelten einen sandigen Lehm- und einen Sandboden mit hohen Dosierungen von Kupfersulfat

(500, 1500 und 3000 mg Cu/kg) und beobachteten ebenfalls unterschiedliche mikrobielle Reaktionen: Während Bakterien ab 500 mg Cu/kg je nach Boden um 31,3% bzw. 26,3% und Streptomyzeten um 41,4% bzw. 70% verringert wurden, waren Pilze toleranter und wurden sogar vorübergehend um 10,6% bzw. 200% stimuliert. Durch höhere Dosierungen (ab 1500 mg Cu/kg) wurden jedoch die Pilze ebenfalls – allerdings nur im Sandboden – dosisabhängig verringert. Auch die Behandlung eines Alfisols mit Kupfersulfat (87 – 676 mg Cu/kg) veränderte mikrobielle Populationen (OLAYINKA und BABALOLA, 2001). Bakterien wurden bereits ab 87 mg Cu/kg um 87,1% und Nitrifikanten um 5,5% reduziert, Pilze dagegen um 75,2% gefördert. Die höheren Dosierungen ab 348 mg Cu/kg wirkten hier ebenfalls bei Pilzen stark stimulierend. Dadurch veränderte sich auch das Verhältnis von Bakterien zu Pilzen von 2352:1 im Kontrollboden zu 2,5:1 bei der höchsten Cu-Belastung. LEVINSKAITE (2001) beobachtete die Reaktion von 32 Isolaten von *Penicillium*-Arten gegenüber Kupfersulfat (0,2 – 10 mM Cu) in vitro und fand eine unterschiedliche Toleranz. Am empfindlichsten gegenüber 0,2 mM Cu waren *P. implicatum* (30,7% Hemmung), *P. atramentosum* (28,6%) und *P. chermesinum* (26,5%), während *P. ochrochloron* (92,8% Hemmung), *P. expansum* (94,3%) und *P. humuli* (94,7%) am tolerantesten gegenüber 5 mM Cu waren. In anderen Untersuchungen wurde kurz nach der Applikation hoher Dosierungen von Kupferchlorid (1500 und 2500 mg Cu/kg) zum Boden die Anzahl kultivierbarer Bakterien deutlich verringert, doch stieg sie während der nachfolgenden Bebrütung wieder an (PIOTROWSKA-SEGET und KOZDROJ, 2008). Kurz nach der Cu-Kontamination dominierten gram-positive Bakterien. Es scheint, dass eine oder wenige Metall-tolerante Populationen die Bakteriengemeinschaft dominieren können.

**Tab. 1. Einfluss von Kupfersulfat im Gefäßversuch auf verschiedene Mikroorganismengruppen (Kolonien-bildende Einheiten) im lehmigen Sandboden (verändert nach KUCHARSKI and WYSZKOWSKA, 2004)**

*Influence of copper sulphate in a pot trial on several microbial populations (colony forming units) in a loamy sand soil (modified after KUCHARSKI and WYSZKOWSKA, 2004)*

Dosierung (dosage) (mg Cu/kg)	Mikrobielle Populationen (microbial populations)						
	Oligo (x 10 <sup>8</sup> )	Oligo-S (x 10 <sup>7</sup> )	Copio (x 10 <sup>8</sup> )	Copio-S (x 10 <sup>7</sup> )	Cellul (x 10 <sup>6</sup> )	Aktino (x 10 <sup>8</sup> )	Pilze (x 10 <sup>6</sup> )
0	143,75 (100,0%)	26,66 (100,0%)	76,11 (100,0%)	44,96 (100,0%)	19,94 (100,0%)	106,31 (100,0%)	38,65 (100,0%)
400	103,48 (72,0%)	21,62 (81,1%)	69,01 (90,7%)	35,74 (79,5%)	18,16 (91,1%)	91,86 (86,4%)	31,91 (82,6%)
800	48,02 (33,4%)	16,36 (61,4%)	57,75 (75,9%)	32,46 (72,2%)	14,39 (72,2%)	86,18 (81,1%)	23,40 (60,5%)
1200	40,53 (28,2%)	15,90 (59,6%)	31,59 (41,5%)	15,51 (34,5%)	13,17 (66,0%)	60,36 (56,8%)	14,01 (36,2%)
r	-0,97	-0,96	-0,96	-0,96	-0,98	-0,97	-1,00

Oligo = oligotrophe Bakterien (*oligotrophic bacteria*); Oligo-S = oligotrophe Endosporen-bildende Bakterien (*oligotrophic endosporous bacteria*); Copio = copiotrophe Bakterien (*copiotrophic bacteria*); Copio-S = copiotrophe Endosporen-bildende Bakterien (*copiotrophic endosporous bacteria*); Cellul = zellulolytische Bakterien (*cellulolytic bacteria*); Aktino = Aktinomyzeten (*actinomycetes*); Pilze (*fungi*); r = Korrelationskoeffizient (*correlation coefficient*)

Auch anhand der Differenzierung des Einflusses verschiedener Cu-Bindungsformen in einem in der Nähe einer Kupferhütte entnommenen Boden stellten SUN et al. (2006) fest, dass die Toleranz einer Bakteriengemeinschaft im belasteten Boden anstieg, während empfindliche Bakterien abnahmen. Dabei scheint der Einfluss des austauschbaren Kupfers auf die Toxizität größer zu sein als der anderer Bindungsformen.

### Einfluss von Kupfer auf Stickstoff-bindende Mikroorganismen

Die vorhandene Literatur über den Einfluss von Kupfer auf Stickstoff-bindende Mikroorganismen bezieht sich im Wesentlichen auf freilebende Bakterien (z. B. *Azotobacter*), potenziell assoziativ symbiontische freilebende Bakterien (*Azospirillum*) sowie mit Leguminosen symbiontisch lebende Knöllchenbakterien (z. B. *Rhizobium*), wobei hier Art und Verhalten der Wirtspflanzen mit zu berücksichtigen sind. Der alleinige Einfluss hoher Kupfergehalte im Boden auf diese Organismengruppen wurde – im Gegensatz zu Schwermetall-Mischbelastungen – vergleichsweise wenig untersucht. Doch gestatten auch Veröffentlichungen, in denen z. B. Kupfersulfat zur Simulierung einer Kupferbelastung des Bodens verwendet wurde, gewisse Rückschlüsse.

In ihren Untersuchungen mit vier bakteriologischen Toxizitätstests fanden HORVATH et al. (1997) bei Cu-kontaminierten Boden- und Sedimentproben (16 bis 6140 mg/kg) eine ausgeprägte Empfindlichkeit des freilebenden *Azotobacter agilis*. In Gefäßversuchen reduzierte Kupferchlorid ab 367,7 mg Cu/kg *Azotobacter chroococcum* dosisabhängig (ATHAR und AHMAD, 2002). Die Stickstoffbindung durch heterotrophe freilebende Bakterien wurde in vitro durch 50 mg Cu/kg (als Chlorid) gehemmt, die der etwas resistenteren Stickstoff-bindenden Cyanobacteria dagegen erst durch 125 mg Cu/kg (MÅRTENSSON, 1993). Auch Kupfer in Acetatform erwies sich mit 0,05 – 50 mM/kg als hemmend (bis 20%) gegenüber *Azotobacter* spp. (NOWAK et al., 2001).

DIAS-JUNIOR et al. (1998) fanden kein *Azospirillum* spp. in mit Schwermetallen, darunter 8 bis 887 mg Cu/kg, be-

lasteten Böden. Dagegen hatte eine fungizide Bordeaux-Mischung in vitro keinen negativen Einfluss auf *Azospirillum* sp. (RAJI und PILLAI, 2000). Kupfersulfat zur Simulierung einer Cu-Belastung hemmte indessen einzelne Stämme von *Azospirillum* sp. – einem potenziellen Bestandteil von Biodüngern – in vitro bereits ab 25 mM Cu/L dosisabhängig, andere dagegen erst ab 200 (BIRO et al., 1995). Auch in Acetatform hemmte Kupfer ab 10 mg/kg *Azospirillum* sp. (STRZELCZYK et al., 1997).

In Gefäßversuchen, in denen Kupfer über Ionenaustauscher appliziert wurde, fanden KOPITKE et al. (2007) bereits ab 0,2 µM eine 10%-ige Hemmung der Knöllchenbildung durch *Rhizobium*, beim Wachstum der Leguminose *Vigna unguiculata* (Cowpea) aber erst ab 1,0 µM. Dem steht die relativ geringe Empfindlichkeit von *Rhizobium* gegenüber Kupfer aus einem langjährig mit Klärschlamm versetzten Boden in einem Lumineszenz-Biosensortest entgegen (CHAUDRI et al., 2000). Dort hatte ein Cu-Gehalt von 620 µg/L in der Bodenlösung, was etwa 349 mg Cu/kg im Boden entspricht, keinen signifikanten Einfluss. Die Samenbeizung mit dem Fungizid Kupferoxychlorid gegen phytopathogene Pilze hemmte die Knöllchenbildung durch Rhizobien bei den Leguminosen *Lablab purpureus*, *Phaseolus vulgaris* und *Vigna radiata* (MUTHOMI et al., 2007). Eine Bodenapplikation des Fungizids (als Copperthom) reduzierte die Knöllchenanzahl nur zeitweise bei den Leguminosen *Dolichos biflorus* und *Vigna mungo*, aber nicht bei *Cajanus cajan* und *V. unguiculata* (UDAIYAN et al., 1995). Ein anderes Fungizid, nämlich die Bordeaux-Mischung, hemmte das symbiontische Bakterium *Bradyrhizobium* sowohl unter Laborbedingungen als auch zeitweise im Freiland in der Rhizosphäre von *Vigna unguiculata* (RAJI und PILLAI, 1996). MATSUDA et al. (2002) führten Laborversuche mit Kupfersulfat zur Ermittlung der Cu-Toleranz zahlreicher Isolate verschiedener Rhizobien (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*) von mehreren Wirtspflanzen und unterschiedlich mit Schwermetallen belasteten Orten durch. Es zeigte sich, dass die Herkunft keinen Einfluss auf die Cu-Toleranz der Bakterien hatte. Die entsprechenden DT<sub>50</sub>-Werte sind in Tab. 2 zusammengestellt. In einem Feldversuch applizierten LAGUERRE

**Tab. 2. Schwankungsbereiche der Kupfer-Toleranz (DT<sub>50</sub>) von Rhizobien-Isolaten verschiedener Wirtspflanzen und Wuchsorte gegenüber Kupfersulfat im Nährmedium (verändert nach MATSUDA et al., 2002)**

*Copper tolerance (DT<sub>50</sub>) of rhizobia isolated from several host plants and locations when growing on nutrient media containing copper sulphate (modified after MATSUDA et al., 2002)*

Rhizobien (rhizobia)	DT <sub>50</sub> (mg Cu/L)		
	Caesalpinoideae	Papilionideae	Mimosoideae
<i>Azorhizobium</i>		2,8 (n = 2)	
<i>Bradyrhizobium</i>	6,0 – 30,3 (n = 16)	9,4 – 38,5 (n = 13)	9,4 – 60,0 (n = 16)
<i>Mesorhizobium</i>	7,8 (n = 1)		
<i>Rhizobium</i>	10,7 – 12,3 (n = 2)	7,0 – 13,0 (n = 5)	7,5 (n = 5)
<i>Sinorhizobium</i>	10,7 (n = 1)		7,5 (n = 2)

n = Anzahl Isolate (number of isolates)

et al. (2006) 8 Jahre lang 12,5 und 50 kg Kupfersulfat pro ha und untersuchten Rhizobien-Populationen. Am Versuchsende 3 Jahre nach der letzten Applikation wiesen die Böden 14,0 bzw. 91,0 mg Cu/kg auf. Die Rhizobien an *Vicia sativa* wurden durch den höheren Cu-Gehalt verringert, nicht aber die an *Phaseolus vulgaris*. Die Diversität der Rhizobien-Genotypen wurde durch die Cu-Anwendung nicht verändert. In einem Feldversuch mit *Rhizobium*-Beimpfung zu „greengram“ (*Vigna radiata*) erhöhten 2,5 mg Cu/kg als Kupfersulfat zwar die Knöllchenbildung, bereits 5 mg/kg hemmten jedoch (PRASAD und RAM, 1988). Auch bei Sojapflanzen (*Glycine max*) verringerte Kupfersulfat die Knöllchenbildung durch *Rhizobium japonicum* zeitweise (KIM, 1976). MÅRTENSSON (1992) beobachtete in vitro bei *Rhizobium* spp. von kleinsamigen Leguminosen bereits eine Hemmung durch 10 mg Cu/L, wobei die einzelnen Stämme unterschiedlich empfindlich waren. Die Rhizobien reagierten teilweise sensibler als die nicht beimpfte Wirtspflanze Rotklee (*Trifolium pratense*).

### Einfluss von Kupfer auf die Mykorrhiza

Von den beiden Mykorrhizaformen dürfte die vesikuläre-arbuskuläre (VA) Mykorrhiza in landwirtschaftlichen Böden eine größere Bedeutung besitzen als die Ektomykorrhiza, die vor allem in Forstböden wichtig ist. Veröffentlichungen über den alleinigen Einfluss hoher Cu-Gehalte im Boden auf die Mykorrhiza sind – im Gegensatz zu denen industrieller Schwermetall-Mischemissionen – nicht sehr zahlreich. Der VA-Mykorrhizapilz *Glomus mosseae* erwies sich als hoch empfindlich gegenüber Kupfer und anderen Schwermetallen, doch wurde in belasteten Böden auch ein resistenter Stamm nachgewiesen (GILDON und TINKER, 1981). In einem Küvetten-Testsystem wurde das Hyphenwachstum dieses Pilzes bereits durch 50 und 500 mg Cu/kg gehemmt (SCHÜEPP und BODMER, 1989). In einem vorwiegend mit Kupfer (0,009 – 38 mmol/kg) kontaminierten Boden wurde während einer fünfjährigen Beobachtungszeit eine dosisabhängige Verringerung der mit VA-Mykorrhizapilzen infizierten Pflanzen (*Agrostis capillaris*) beobachtet, obwohl der Pilz im Boden vorhanden war (GRIFFIOEN et al., 1994).

Einige Cu-Fungizide wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Mykorrhiza untersucht. Kupferoxychlorid (35,3 kg AS/ha) beeinflusste die Ektomykorrhiza (u.a. *Suillus*- und *Cenococcum*-Typen) an „Scots pine“ (*Pinus sylvestris*) nicht signifikant (MANNINEN et al., 1998). Aber in vitro wurden die meisten von 64 getesteten Ektomykorrhizapilzen (z. B. *Cantharellus cibarius*, *Corticium bicolor*, *Paxillus involutus*, *Suillus* spp.) durch 1 und 10 mg/L des Fungizids gehemmt (LAATIKAINEN und HEINONEN-TANSKI, 2002). Unter Freilandbedingungen wurde auch die VA-Mykorrhiza (*Glomus* spp.) an verschiedenen Leguminosen durch das Fungizid (als Copperthom; 4 L/m<sup>2</sup>) verringert (UDAIYAN et al., 1995).

Ergebnisse aus Versuchen, in denen Kupfersulfat zur Simulation erhöhter Cu-Gehalte im Boden eingesetzt

wurde, lassen ebenfalls gewisse Rückschlüsse auf die Wirkung einer Cu-Belastung des Bodens zu. In Gefäßversuchen verringerte das als Fungizid eingesetzte Kupfersulfat (333,3 g/m<sup>3</sup> blue copper) die Entwicklung der Ektomykorrhiza an Sämlingen von *Pinus patula* und *P. caribaea*, ohne jedoch die Lebensfähigkeit des Inokulums zu reduzieren (SINGH et al., 1987). In vitro reagierten einige Ektomykorrhizapilze unterschiedlich empfindlich auf Kupfer in Sulfatform (JONES und MUEHLCHEN, 1994): Während auf Nährböden *Laccaria laccata* bereits durch 10 mg Cu/L und *Suillus variegatus* durch 100 mg Cu/L gehemmt wurden, tolerierte *Thelephora terrestris* 100 und 500 mg Cu/L. Ebenfalls in vitro wurden 39 Isolate der Ektomykorrhizapilze *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Suillus bovinus*, *S. luteus* und *S. variegatus* gegenüber Kupfersulfat getestet (BLAUDEZ et al., 2000). Auch hier reagierten die einzelnen Arten unterschiedlich: *S. bovinus* wuchs selbst bei 10 mg Cu/L nicht mehr, während *P. tinctorius* und *S. luteus* noch 30 mg Cu/L tolerierten. Dabei war es nicht ausschlaggebend, ob das Pilzisolat aus einem kontaminierten oder unkontaminierten Standort kam. Ebenfalls in Nährmedien mit Zusatz von Kupfersulfat wurden Isolate der Ektomykorrhizapilze *Pisolithus tinctorius* (EC<sub>50</sub> 1,18 mmol/L) und *Scleroderma bovinus* (EC<sub>50</sub> 0,12 mmol/L) mit steigender Cu-Konzentration gehemmt (GRAZZIOTTI et al., 2001). Allerdings wurde das Wachstum von *P. tinctorius* sogar durch niedrige Cu-Konzentrationen (ca. 0,5 mmol/L) begünstigt. Ein anderer Ektomykorrhizapilz (*Xerocomus chrysenteron*) wurde in vitro mit Cu-Konzentrationen von 10 bis 80 mg/L kontaminiert und danach sein Wachstum sowie die Proteinausscheidungen erfasst (ZHENG et al., 2009). Der Pilz wuchs bei allen Dosierungen etwa gleich gut, lediglich seine APase-Aktivität nahm ab 30 mg Cu/L dosisabhängig ab. Damit erwies er sich als möglicher Kandidat zur Phytoremediation von mit Cu belasteten Böden.

Als Fungizid appliziert verringerte Kupfersulfat mit 112 und 224 kg Cu/ha zwar das Wachstum von „Sour orange“ (*Citrus aurantium*), aber nicht die Infektion und Sporulation des Endomykorrhizapilzes *Glomus etunicatus* (NEMEC, 1980). Normalerweise ist zu erwarten, dass eine Mykorrhizainfektion zu einer verstärkten Aufnahme mineralischer Elemente durch die Pflanze führt. Von verschiedenen Ericaceen (*Calluna vulgaris*, *Rhododendron ponticum*, *Vaccinium macrocarpon*) isolierte endophytische Mykorrhizapilze wuchsen noch in einer Nährlösung mit bis zu 75 mg Cu/L (als Kupfersulfat), doch wiesen die Pflanzen in den Sprossen – nicht jedoch in den Wurzeln – geringere Metallkonzentrationen auf (BRADLEY et al., 1982). Auch bei den tropischen bzw. subtropischen Pflanzen *Capsicum annum*, *Eupatorium odoratum* und *Stylosanthes guianensis* wurde weder die VA-Mykorrhizainfektion mit *Glomus macrocarpus* noch dessen Entwicklung durch niedrige Cu-Konzentrationen (als Kupfersulfat) von 0,2 bis 25 mg/kg verringert (FABIG, 1982). Die bei beimpften Pflanzen meist bessere P-Versorgung wurde nur durch die höchsten toxischen Elementgaben beeinträchtigt. In weiteren Untersuchungen reduzierte ba-

sisches Kupfersulfat [ $\text{CuSO}_4 \cdot 3 \text{ Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ] ab 19 bis 34 mg Cu/kg mit steigender Konzentrationen das Sämlingswachstum von „Carrizo citrange“ (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*) und die Besiedlung mit dem VA-Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* logarithmisch (GRAHAM et al., 1986). Bei Zwiebeln (*Allium cepa*) führte Kupfersulfat nach Inokulation mit *Glomus deserticola* ab 320 mg Cu/kg bzw. mit *G. fasciculatum* bereits ab 240 mg Cu/kg zu verringertem Wachstum (TALEVA und DJONOVA, 1998). WAN et al. (1998) beobachteten in ihrem Testsystem *Daucus carota* und dem VA-Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* sogar bereits bei 6,25 mg/kg Kupfersulfat ein reduziertes Wachstum.

### Einfluss von Kupfer auf Antagonisten von phytopathogenen Mikroorganismen sowie auf nematophage Pilze

Über den Einfluss anthropogener Cu-Gehalte im Boden auf antagonistische Bodenmikroorganismen liegen kaum Untersuchungen vor, so dass eine endgültige Aussage schwierig sein dürfte. Allerdings beobachtete GRAY (1988), dass nematophage Pilze offensichtlich empfindlich gegenüber Kupfer im Boden reagieren. Dabei traten jedoch zwischen den einzelnen Parasitierungsarten der verschiedenen Pilze (z. B. Endoparasiten, Encystierung, Fallensteller) Unterschiede auf. So war der Endoparasit *Meria coniospora* teilweise tolerant gegenüber Kupfer.

Auch einige Cu-haltige Pflanzenschutzmittel wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf antagonistische Bodenmikroorganismen untersucht. Während MACHOWICZ-STEFANIAK et al. (1998) bis 100 mg/L des Fungizids Kupferoxychlorid (Miedzian 50 WP) keinen Einfluss auf den Pilz *Trichoderma harzianum* sowie das Bakterium *Pseudomonas fluorescens* beobachteten, wurde der Pilz *Gliocladium catenulatum* dosisabhängig sowie das antagonistische Bakterium *Bacillus* sp. generell gehemmt. Auch in anderen Untersuchungen scheinen offensichtlich antagonistische *Trichoderma*-Arten durch das Fungizid kaum beeinträchtigt zu werden (KOLASE et al., 2001).

Jedoch hemmte das als Mikronährstoff eingesetzte Kupfersulfat das Wachstum eines Stamms von *Trichoderma viride* in vitro bereits ab 10 mg/L dosisabhängig (GAO et al., 2008). Dagegen wurden in einem unter Laborbedingungen mit 65 mg Cu/kg als Kupfersulfat versetzten Gartenboden mehr gegen verschiedene Phytopathogene antagonistische Pilzarten (z. B. *Gliocladium*) gefunden (PEČIULYTE und LUGAUSKAS, 2001). Auch beobachteten VAGVÖLGYI et al. (2009) beim Test mit Kupfersulfat in vitro eine hohe Cu-Toleranz (bis etwa 300 mg Cu/L) von 20 aus dem Boden isolierten und gegen phytopathogene Pilze (z. B. *Alternaria*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*) antagonistischen Bakterien. Dabei erhöhten Cu-Konzentrationen bis über 100 mg/L sogar den antagonistischen Effekt. Gegen Kupfer empfindliche Mutanten von *Pseudomonas fluorescens*, die gegen *Phytophthora parasitica* antagonistisch waren, wurden jedoch bereits durch 10 bis 15 mg Kupfersulfat pro kg Boden stark verringert (YANG et al., 1993).

### Einfluss von Kupfer auf entomopathogene Mikroorganismen

Über diesen Themenbereich liegen nur wenige Untersuchungen – oft sogar nur für bestimmte Cu-Verbindungen bei direkter Kontamination – vor. Die nachfolgend zitierten Veröffentlichungen erlauben daher nur eine erste Einschätzung und gewähren nur bedingt (z. B. bei Kupfersulfat und -hydroxid) Rückschlüsse auf den Einfluss von erhöhten Cu-Rückständen im Boden.

Das Fungizid Kupferoxychlorid verringerte zeitweise die Atmung von *Metarhizium anisopliae* im Boden (MOCHI et al., 2005). Auch in Reinkultur wurde dieser Pilz durch eine praxisnahe Dosierung des Mittels deutlich reduziert (RACHAPPA et al., 2007). Ebenso kann die Verträglichkeit des Fungizids mit dem Bakterium *Bacillus thuringiensis* verringert werden (BHATTACHARYYA et al., 1998). Auch die multifunktionelle Verbindung Kupfersulfat im Boden beeinträchtigte die Entomopathogenität des Pilzes *Paecilomyces fumoso-roseus* (JAWORSKA et al., 1998). In vitro hemmte das mit 200 mg/L als Fungizid eingesetzte Kupfersulfat den Pilz *Metarhizium anisopliae* – ähnlich wie andere entomopathogene Pilze – kaum und lag damit etwa im Bereich verschiedener konventioneller Mittel (LUZ et al., 2007). Verglichen mit anderen aus mit Kupfer belasteten Forstböden isolierten Pilzen wies *Beauveria bassiana* unter in vitro-Bedingungen eine relativ hohe Toleranz ( $\text{ED}_{50}$  250 mg Cu/L) gegenüber Kupfersulfat auf (ARNEBRANT et al., 1987). Andererseits beeinträchtigte das in vitro als Fungizid mit 2,5 g/L eingesetzte „Kosoide WP“ (Kupferhydroxid) die entomopathogenen Pilze *Beauveria bassiana* und *Metarhizium anisopliae* stark (AHMED et al., 2001).

### Beeinflussung der Kupferwirkungen auf Bodenmikroorganismen durch andere Umweltchemikalien

In vielen Fällen werden Böden nicht nur mit Kupfer verschiedener Form und Herkunft belastet, sondern im Fall von Emissionen kommen oft weitere Schwermetalle hinzu. Aber auch im landwirtschaftlichen und gartenbaulichen Bereich werden neben kupferhaltigen auch weitere Pflanzenschutzmittel eingesetzt. Oft ist nichts über derartige Kombinationswirkungen auf Bodenmikroorganismen bekannt. In einigen Fällen – besonders im Emissionsbereich – liegen allerdings bereits Untersuchungen über die Wirkung kombinierter Umweltchemikalien vor, die nachfolgend ebenfalls exemplarisch herangezogen werden.

In ihren Untersuchungen hatten RENELLA et al. (2002) keine starken Effekte von frisch zugesetztem Kupfersulfat (140 mg Cu/kg) auf die mikrobielle Biomasse gefunden. Auch die Kombination mit Cd (12 mg/kg) und/oder Zn (300 mg/kg) in Sulfatform änderte wenig an diesem Verhalten. XIE et al. (2009) untersuchten die funktionale mikrobielle Diversität anhand von Substratnutzungsmustern in unterschiedlich gedüngtem und mit Kupferchlorid (100 mg Cu/kg) sowie dem Insektizid Cypermethrin (10 mg/kg) versetztem Boden. Kupferchlorid war nur ge-

ring wirksam. Dies wurde auch durch die Kombination mit dem in dieser Dosierung allein ebenfalls kaum wirksamen Insektizid nicht verändert. Weiterhin wurde die Kombination von Kupferoxid (128 mg/kg) mit dem Fungizid Mefenoxam (4 mg/kg) in Labormikrokosmen mikrobiell (Biomasse mittels Atmung, DGGE) untersucht (DEMANOU et al., 2006). Einzeln angewandt erhöhten beide Mittel vorübergehend den mikrobiellen Biomasse-Kohlenstoff, aber auch ihre Kombination wirkte ähnlich. Kupferoxid hemmte dabei auch nicht den mikrobiellen Abbau von Mefenoxam. Beide Mittel verringerten zwar den Anteil empfindlicher Pilze und scheinen neue Bakteriengemeinschaften zu fördern, jedoch ohne deutlichen additiven Effekt. In vitro untersuchten ZHANG et al. (2003) den Einfluss von Kupfersulfat, dem Herbizid Acetochlor und dem Insektizid Methamidophos bzw. deren Kombinationen auf die indigene Mikrobienpopulation im Boden. Ab 62,5 mg Acetochlor/L und 3,75 mg Cu/L hemmten beide Mittel sehr stark. Darunter nahm die Wirkung der Kombination zwar ab, aber es traten teilweise stärkere Effekte auf als bei den Einzelmitteln. Die  $IC_{50}$  lag dann für Acetochlor bei 13,26 mg/l, für Kupfer bei 0,58 mg/L. Auch die Kombination von Methamidophos und Kupfer erhöhte teilweise die Wirkung gegenüber den Einzelmitteln. Die  $IC_{50}$  lag für das Insektizid bei 26,18 und für Kupfer bei 1,54 mg/L.

In vitro-Tests mit nicht bodenbürtigen Mikroorganismen wie *Photobacterium phosphoricum* (Microtox) und dem Protozoen *Colpidium campylum* ergaben bei beiden eine starke synergistische Wirkung zwischen Kupfersulfat und den Fungiziden Zineb und Maneb, während die Einzelmittel weniger toxisch waren (VASSEUR et al., 1988). Im Microtox-Test begannen die wirksamen Konzentrationen bereits bei 20 µg Cu/L und 9 µg/L bei den beiden Fungiziden, im Protozoentest dagegen erst bei 63 µg Cu/L und 50 µg Zineb/L bzw. 400 µg Maneb/L. Das Insektizid Carbaryl wies dagegen nur bei höheren Konzentrationen (0,2 mg Cu/L, 8 mg Carbaryl/L) geringe Interaktionen mit Kupfer auf. Auch die im Holzschutzbereich verwendete Kombination von Kupfersulfat mit Pentachlorphenol (PCP) wurde mittels Bakterientest (*Escherichia coli*) untersucht (ZHU et al., 2001). Gegenüber den Einzelmitteln wurde der cytotoxische Effekt durch nicht (5,0 µM Cu) und subtoxische Konzentrationen (0,2 mM PCP) der kombinierten Mittel erhöht. In Bodenextrakten untersuchten NAGLER et al. (1997) die Wirkung von Kupfernitrat (200 und 500 µM Cu) und dessen Kombination mit dem Insektizid Parathion (2 mg/L) auf die Testbakterien *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas fluorescens*. Dabei entsprach die Hemmung der Kombination auf *B. subtilis* etwa der des Kupfers allein, nämlich etwa 42% bei 200 µM Cu und 93% bei 500 µM Cu. KUNGOLOS et al. (2009) verwendeten in Mikrobiotests neben *Daphnia magna* und der Alge *Pseudokirchneriella subcapitata* auch das Bakterium *Vibrio fischeri* zur Ermittlung der Wirkung von Kupferchlorid-dihydrat und dessen Kombination mit den Pflanzenschutzmitteln Fosthiazat, Metalaxyl-M und Imidacloprid. Kupfer erwies sich dabei mit einer  $IC_{50}$  von 0,18 mg/L als das toxischste Mittel gegenüber *V. fischeri*

bzw. mit 0,05 mg/L gegenüber *P. subcapitata*; Imidacloprid war dagegen am wenigsten toxisch. Die interaktiven Effekte von Kupfer mit den Mitteln hingen von den Testorganismen, den verwendeten Mitteln und deren Konzentrationen ab: In Kombination mit Fosthiazat wirkte Cu etwas schwächer, mit Metalaxyl-M dagegen teilweise etwas stärker als erwartet gegenüber *V. fischeri*.

Im Gewächshausversuch testeten WYSZKOWSKA et al. (2007) über 56 Tage u. a. den Einfluss von Kupfer und Nickel (als Chloride) sowie deren Kombinationen auf verschiedene Mikroorganismen in zwei Böden. Die Population von *Azotobacter* spp. wurde durch beide Schwermetalle (50 mg Cu/kg, 200 mg Ni/kg) gehemmt, wobei diese kombiniert stärker wirkten als einzeln. Andere Mikroorganismengruppen (z. B. Ammonifikanten, N-Immobilisierer, *Arthrobacter*) reagierten meistens nicht so empfindlich. Ergänzende Gefäßversuche mit weiteren Schwermetallen (Cd, Pb, Zn) in Kombination mit Cu (150 und 450 mg/kg) als Chloride in einem Boden mit und ohne Hafer (*Avena sativa*) zeigten, dass zwar der Pflanzenbewuchs die Reaktion verschiedener Mikroorganismengruppen (z. B. *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, zellulolytische Bakterien) gegenüber der Belastung veränderte, doch unterschied sich der Effekt der Einzelmittel kaum von dem ihrer Kombination (WYSZKOWSKA et al., 2008). RANJARD et al. (2006b) fanden im Kurzzeittest bei der Bakteriendiversität im Boden verglichen mit den Einzelmitteln allerdings eine kumulative Wirkung der kombiniert als Chloride angewandten Schwermetalle Cu (50 – 300 mg/kg), Cd (2 – 40 mg/kg) und Hg (2 – 20 mg/kg). BRESSAN et al. (2008) beobachteten nach der Anwendung „geringer Stressereignisse“ (z. B. durch 50 mg Cu/kg als Chlorid) eine Verringerung der Empfindlichkeit der Bakteriendiversität im Boden gegenüber einem „starken Stress“ durch 100 mg HgCl<sub>2</sub>/kg. Auch die Wirkung von Kupfersulfat (10 mg Cu/kg) und dessen Kombination mit anderen Schwermetallsulfaten (Cd, Pb, Sb, Zn) auf die Ektomykorrhiza von *Pinus sylvestris* wurde untersucht (HARTLEY et al., 1999). Im Feld mit Kupfer kontaminierter Boden war für diese Mykorrhiza kaum toxisch, während der mit allen Schwermetallen kontaminierte Boden stärker wirkte. Vermutlich kann die Toxizität multipler Schwermetallkontaminationen gegenüber der Ektomykorrhiza nicht aus der individuellen Toxizität der Metalle abgeleitet werden.

### Schlussbetrachtungen

Wie an zahlreichen vorher zitierten Beispielen ersichtlich, können langjährig – z. B. in Weinbergböden – durch Cu-haltige Pflanzenschutz- und Düngemittel angereicherte praxisnahe Kupferkonzentrationen bereits zu Veränderungen verschiedener mikrobieller Populationen führen. Diese Aussage wird untermauert durch zahlreiche Versuche unter Labor- und Freilandbedingungen, wo die Einflüsse verschiedener Cu-Belastungen (z. B. als Pflanzenschutzmittel oder in Form anorganischer Salze) gezielt untersucht wurden. Allerdings scheinen anhand von

Kurzzeitversuchen durchaus nicht immer die erst in Langzeitversuchen zu beobachtenden deutlicheren Wirkungen vorhersehbar zu sein. Soweit sie die mikrobielle Biomasse oder auch große Mikroorganismenpopulationen betreffen, geben die Ergebnisse zunächst nur einen Rahmen vor, in dem logischerweise nicht alle Mikroorganismenarten gleichartig reagieren, sondern sich durchaus abweichend verhalten können. Dies wird sowohl an den mikrobiellen Reaktionen im Kapitel Diversität als auch in dem der allgemeinen Populationen deutlich. Einzelne Gruppen kultivierbarer oder biochemisch unterscheidbarer Bakterien sowie Pilze scheinen toleranter gegenüber Cu-Belastungen im Boden zu sein als andere und können daher – zusammen mit einer daraus resultierenden Verschiebung innerhalb der gesamten mikrobiellen Biomasse – zu einer modifizierten und ggf. sogar reduzierten mikrobiellen Diversität führen. Normalerweise ist bei Cu-Belastungen mit einer – in einigen Fällen durchaus auch beobachteten – dosisabhängigen Reaktion der Bodenmikroorganismen zu rechnen. Da zahlreiche Veröffentlichungen bereits merkliche Einflüsse relativ geringer Cu-Konzentrationen im Boden auf mikrobielle Populationen dokumentieren, andere allerdings selbst bei extrem hohen Dosierungen keine Effekte fanden, dürften – neben methodisch bedingten Mängeln – wohl zahlreiche sekundäre Einflüsse (z. B. Dosierung, Applikationsform, Boden, pH-Wert, Nährstoffe, Humus, Klima, Pflanzen, Beobachtungsdauer) modifizierend wirksam sein. In wie weit diese Punkte auch zu einem veränderten mikrobiellen Leistungsniveau und daraus resultierend einer veränderten Bodenfruchtbarkeit führen, kann allerdings erst abschließend im Zusammenhang mit der Darstellung des Cu-Einflusses auf mikrobielle Aktivitäten im zweiten Teil der Übersichtsarbeit (MALKOMES, 2010) beurteilt werden. Dies trifft auch für die Einflüsse auf Mikroorganismen im Zusammenhang mit der gesamten Bodenbiozönose zu. Trotz dieser noch ausstehenden abschließenden Beurteilung von anthropogenen Cu-Belastungen auf Bodenmikroorganismen sei an dieser Stelle bereits der Hinweis erlaubt, Cu-haltige Pflanzenschutz- und Düngemittel wegen der potenziellen langen Persistenz von Cu-Rückständen im Boden möglichst zurückhaltend einzusetzen.

## Literatur

- AHMED, S.A., E.S. EL-BAROUGY, M.H. NAIEM, 2001: Occurrence and distribution of entomopathogenic fungi and entomoparasitic nematodes in north Sinai governorate, Egypt. *J. Agric. Sci. Mansoura Univ.* **26**, 5041-5049.
- ARNEBRANT, K., E. BÅÅTH, A. NORDGREN, 1987: Copper tolerance of microfungi isolated from copper polluted and unpolluted forest soil. *Mycologia* **79**, 890-895.
- ATHAR, R., M. AHMAD, 2002: Heavy metal toxicity: Effect on plant growth and metal uptake by wheat, and on free living *Azotobacter*. *Water Air Soil Pollut.* **138**, 165-180.
- BANU, N.A., B. SINGH, L. COPELAND, 2004: Influence of copper on soil microbial biomass and biodiversity in some NSW soils. *SuperSoil 2004: 3<sup>rd</sup> Australian New Zealand Soils Conf.*, Sydney 2004, 9 pp.
- BERNARD, L., P.A. MARON, C. MOUGEL, V. NOWAK, J. LÉVÊQUE, C. MAROL, J. BALESDENT, F. GIBIAT, L. RANJARD, 2009: Contamination of soil by copper affects the dynamics, diversity, and activity of soil bacterial communities involved in wheat decomposition and carbon storage. *Appl. Environ. Microb.* **75**, 7565-7569.
- BHATTACHARYYA, B., P. DUTTA, A. BASIT, B.C. DAS, 1998: Compatibility of some common pesticides to *Bacillus thuringiensis*. *J. Agric. Sci. Soc. North East India* **11**, 233-234 (zit.: CABI Abstr.).
- BIRO, B., H.H.E.A.F. BAYOUMI, M. KECSKES, 1995: Associative symbiotic N<sub>2</sub>-fixers and scavenger strains, affected by Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in vitro. *NATO ASI Ser., Ser. G* **37**, 495-500.
- BLAUDEZ, D., C. JACOB, K. TURNAU, J.V. COLPAERT, U. AHONEN-JONNARTH, R. FINLAY, B. BOTTON, M. CHALOT, 2000: Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals in vitro. *Mycol. Res.* **104**, 1366-1371.
- BOON, G.T., L.A. BOUWMAN, J. BLOEM, P.F.A.M. RÖMKENS, 1998: Effects of a copper-tolerant grass (*Agrostis capillaries*) on the ecosystem of a copper-contaminated arable soil. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 1964-1971.
- BRADLEY, R., A.J. BURT, D.J. READ, 1982: The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. VIII. The role of mycorrhizal infection in heavy metal resistance. *New Phytol.* **91**, 197-209.
- BRESSAN, M., C. MOUGEL, S. DEQUIEDT, P.A. MARON, P. LEMANCEAU, L. RANJARD, 2008: Response of soil bacterial community structure to successive perturbations of different types and intensities. *Environ. Microb.* **10**, 2184-2187.
- BROOKES, P.C., S.P. MCGRATH, 1984: Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. *J. Soil Sci.* **35**, 341-346.
- CHANDER, K., P.C. BROOKES, S.A. HARDING, 1995: Microbial biomass dynamics following addition of metal-enriched sewage sludges to a sandy loam. *Soil Biol. Biochem.* **27**, 1409-1421.
- CHAUDRI, A.M., K. LAWLOR, S. PRESTON, G.I. PATON, K. KILLHAM, S.P. MCGRATH, 2000: Response of a *Rhizobium*-based luminescence biosensor to Zn and Cu in soil solution from sewage sludge treated soils. *Soil Biol. Biochem.* **32**, 383-388.
- COURDE, L., T. VALLAËYS, R. CHAUSSOD, J. LÉVÊQUE, F. ANDREUX, 1998: Faut-il craindre des effets secondaires du cuivre sur la biocoenose des sols viticoles? *Revue Oenol.* **25** (86), 19-21.
- DELL'AMICO, E., M. MAZZOCCHI, L. CAVALCA, L. ALLIEVI, V. ANDREONI, 2008: Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil. *Microb. Res.* **163**, 671-683.
- DEMANOU, J., S. SHARMA, U. DÖRFLER, R. SCHROLL, K. PRITSCH, T. NJINE, U. BAUSENWEIN, A. MONKIEDJE, J.C. MUNCH, M. SCHLOTTER, 2006: Structural and functional diversity of soil microbial communities as a result of combined applications of copper and mefenoxam. *Soil Biol. Biochem.* **38**, 2381-2389.
- DIAS-JUNIOR, H.E., F.M.S. MOREIRA, J.O. SIQUEIRA, R. SILVA, 1998: (Heavy metals, microbial density and activity in a soil contaminated by wastes from zinc industry). *Revista Brasil. Cienc. Solo* **22**, 631-640 (in Port.).
- DIÁZ-RAVIÑA, M., R. CALVO DE ANTA, E. BÅÅTH, 2007: Tolerance (PICT) of the bacterial communities to copper in vineyard soils from Spain. *J. Environ. Qual.* **36**, 1760-1764.
- DUMESTRE, A., S. SAUVÉ, M. MCBRIDE, P. BAVEYE, J. BERTHELIN, 1999: Copper speciation and microbial activity in long-term contaminated soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **36**, 124-131.
- DU PLESSIS, K.R., A. BOTHA, L. JOUBERT, R. BESTER, W.J. CONRADIE, G.M. WOLFAARDT, 2005: Response of the microbial community to copper oxychloride in acidic sandy loam soil. *J. Appl. Microb.* **98**, 901-909.
- ESSWEIN, A., W. SCHWARTZ, 1939: Untersuchung über die Wirkung des Kupfers auf die Mikroorganismen des Bodens und über die Aufnahme von Kupfer durch die höhere Pflanze. *Zbl. Bakter., 2. Abt.* **100**, 99-110.
- FABIG, B., 1982: Einfluss von Al und den Schwermetallen Fe, Mn, Zn, Cu, Pb und Cd auf die Effizienz der VA-Mykorrhiza bei tropischen und subtropischen Pflanzen. *Göttingen: Diss. Univ.*, 180 S.
- GAO, Z., S. ZHAO, J. ZHUANG, J. GAO, T. LI, 2008: (Effect of regular soil fungicides and fertilizers on strain T23 of *Trichoderma viride*). *Acta Phytophylacica Sinica* **35**, 74-80 (in Chin.).
- GILDON, A., P.B. TINKER, 1981: A heavy metal-tolerant strain of a mycorrhizal fungus. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **77**, 648-649.
- GRAHAM, J.H., L.W. TIMMER, D. FARDELMANN, 1986: Toxicity of fungicidal copper in soil to citrus seedlings and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytopathology* **76**, 66-70.
- GRAY, N.F., 1988: Ecology of nematophagous fungi: Effect of the soil nutrients N, P and K and seven major metals on distribution. *Plant Soil* **108**, 286-290.
- GRAZZIOTTI, P.H., J.O. SIQUEIRA, F.M. MOREIRA, D. CARVALHO, 2001: (Zn, Cu, and Cd effects on the behaviour of ectomycorrhizal fungi in culture medium). *Revista Brasil. Cienc. Solo* **25**, 831-837 (in Port.).
- GRIFFIOEN, W.A.J., J.H. IETSWAART, W.H.O. ERNST, 1994: Mycorrhizal infection of an *Agrostis capillaris* population on a copper contaminated soil. *Plant Soil* **158**, 83-89.
- HARTLEY, J., J.W.G. CAIRNEY, P. FREESTONE, C. WOODS, A.A. MEHARG, 1999: The effects of multiple metal contamination on ectomycorrhizal Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedlings. *Environ. Pollut.* **106**, 413-424.

- HAYAKAWA, M., S. IINO, H. NONOMURA, 1982: (Heavy metal resistance and melanoid pigment production in the streptomycete flora of copper-polluted vineyard soils). *Hakko Kogaku (Kaishi)* **60**, 1-9 (in Jap.).
- HEMIDA, S.K., S.A. OMAR, A.Y. ABDEL-MALLEK, 1997: Microbial populations and enzyme activity in soil treated with heavy metals. *Water Air Soil Pollut.* **95**, 13-22.
- HORVATH, B., K. GRUIZ, B. SARA, 1997: Ecotoxicological testing of soil by four bacterial biotests. *Toxicol. Environ. Chem.* **59**, 223-235.
- IVANOVA, A.S., 1987: (Copper in orchard soils of the Crimea). *Agrokhimiya* (10), 76-82 (in Russ.).
- JAWORSKA, M., D. ROPEK, J. ANTONKIEWICZ, C. JASIEWICZ, 1998: (Effect of soil contamination by heavy metals on the pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumoso-roseus*). *Chem. Inz. Ekol.* **5**, 737-742 (in Poln.).
- JONES, D., A. MUEHLCHEN, 1994: Effects of the potentially toxic metals, aluminium, zinc, and copper on ectomycorrhizal fungi. *J. Environ. Sci. Health, A* **29**, 949-966.
- KIM, H.-D., 1976: Effect of insecticides on the nodulation activity of *Rhizobium japonicum*. *Korean J. Microb.* **14**, 36-38.
- KOLASE, S.V., C.D. DEOKAR, D.M. SAWANT, 2001: Fungicidal effect on the survival of *Trichoderma* spp. *Madras Agric. J.* **88**, 318-319.
- KOPITITKE, P.M., P.J. DART, N.W. MIENZIES, 2007: Toxic effects of low concentrations of Cu on nodulation of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environ. Poll.* **145**, 309-315.
- KOSTOV, O., O. VAN CLEEMPUT, 2001: Microbial activity of Cu contaminated soils and effect of lime and compost on soil resiliency. *Compost Sci. Utiliz.* **9**, 336-351.
- KRATZ, S., S. HANEKLAUS, E. SCHNUG, 2009: Kupfergehalte in Acker- und Grünlandböden und das Verhältnis dieser Gehalte zu den durch Pflanzenschutz ausgebrachten Kupfermengen. *Journal für Kulturpflanzen* **61**, 112-116.
- KUCHARSKI, J., A. HŁASKO, J. WYSZKOWSKA, E. JASTRZEBSKA, 2000: (Response of microorganismen und faba bean on soil contamination with copper). *Zeszyty Probl. Nauk Roln.* **472**, 449-455 (in Poln.).
- KUCHARSKI, J., J. WYSZKOWSKA, 2004: Inter-relationship between number of microorganisms and spring barley yield and degree of soil contamination with copper. *Plant Soil Environ.* **50**, 243-249.
- KUNGOLOS, A., C. EMMANOUIL, V. TSIRIDIS, N. TSIROPOULOS, 2009: Evaluation of toxic and interactive toxic effects of three agrochemicals and copper using a battery of microbiotests. *Sci. Total Environ.* **407**, 4610-4615.
- LAATIKAINEN, T., H. HEINONEN-TANSKI, 2002: Mycorrhizal growth in pure cultures in the presence of pesticides. *Microb. Res.* **157**, 127-137.
- LAGUERRE, G., L. COURDE, R. NOUAÏM, L. LAMY, C. REVILLIN, M.C. BREUIL, R. CHAUSSOD, 2006: Response of rhizobial populations to moderate copper stress applied to an agricultural soil. *Microb. Ecol.* **52**, 426-435.
- LEVINSKAITE, L., 2001: Fungi of the genus *Penicillium* under the influence of heavy metals. Metal-tolerance of various isolates. *Bot. Lithuan.* **7** (1), 79-91.
- LUZ, C., M.C.B. NETTO, L.F.N. ROCHA, 2007: In vitro susceptibility to fungicides by invertebrate-pathogenic and saprobic fungi. *Mycopathologia* **164**, 39-47.
- MACHOWICZ-STEFANIAK, Z., E. ZALEWSKA, E. KRÓL, 1998: Susceptibility of antagonistic microorganisms to some fungicides. *Ann. Agric. Sci., Ser. E* **27**, 91-97.
- MALKOMES, H.-P., 2010: Einfluss Kupfer-haltiger anthropogener Einträge auf Bodenmikroorganismen – eine Übersicht. II. Mikrobielle Aktivitäten. *Journal für Kulturpflanzen* (im Druck).
- MANNINEN, A.-M., T. LAATIKAINEN, T. HOLOPAINEN, 1998: Conditions of Scots pine fine roots and mycorrhiza after fungicide application and low-level ozone exposure in a 2-year field experiment. *Trees Struct. Funct.* **12**, 347-355.
- MÄRTENSSON, A.M., 1992: Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. *Soil Biol. Biochem.* **24**, 435-445.
- MÄRTENSSON, A.M., 1993: Use of heterotrophic and cyanobacterial nitrogen fixation to study the impact of anthropogenic substances on soil biological processes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **50**, 466-473.
- MATSUDA, A., F.M. de S. MOREIRA, J.O. SIQUEIRA, 2002: (Tolerance of rhizobia genera from different origins to zinc, copper and cadmium). *Pesqu. Agropecu. Brasil.* **37**, 343-355 (in Port.).
- MOCHI, D.A., A.C. MONTEIRO, J.C. BARBOSA, 2005: Action of pesticides to *Metarhizium anisopliae* in soil. *Neotrop. Entom.* **34**, 961-971.
- MORENO, A.M., J. GONZALEZ, L. PEREZ, C. DE LA ROSA, M.A. MOSSO, P. PRIETO, 2003: (Contamination of soils with copper in laboratory experimental conditions and effects on microbial communities). *Bol. Real Soc. Espan. Hist. Nat., Sec. Geol.* **98**, 123-131 (in Span.).
- MUTHOMI, J.W., P.E. OTIENO, G.N. CHEMINING'WA, J.H. NDERITU, J.M. WAGACHA, 2007: Effect of legume root rot pathogens and fungicide seed treatment on nodulation and biomass accumulation. *J. Biol. Sci.* **7**, 1163-1170.
- NAGLER, U.M., R. KLEINE, L.E. MACASKIE, 1997: Toxizitätsuntersuchungen in Bodenextrakten – Kombinationswirkung von Schwermetallen und einem Pestizid. *LaborPraxis* **21** (9), 80-84.
- NEMEC, S., 1980: Effects of 11 fungicides on endo mycorrhizal development in sour orange. *Canad. J. Bot.* **58**, 522-526.
- NOWAK, A., M. BŁASZAK, 2004: (The influence of adjuvant addition on fungicide action changing the amount of biomass of soil microorganisms). *Folia Univ. Agric. Stetin., Agric.* **242** (98), 115-122 (in Poln.).
- NOWAK, A., K. PRZYBULEWSKA, K. STOPA, K. SZCZYKAŁA, 2001: (The influence of heavy metals (Cu, Cd, Pb, Hg) on selected elements of nitrogen cycle). *Folia Univ. Agric. Stetin.* **221**, 159-164 (in Poln.).
- OLAYINKA, A., G.O. BABALOLA, 2001: Effects of copper sulphate application on microbial numbers and respiration, nitrifier and urease activities, and nitrogen and phosphorus mineralization in an alfisol. *Biol. Agric. Hort.* **19**, 1-8.
- PEČIULYTE, D., 2001: Effect of copper sulfate on the soil fungal community structure. *Ekologija (Vilnius)* (1), 31-35.
- PEČIULYTE, D., A. LUGAUSKAS, 2001: Improvement of *Trichoderma viride* biotic activity by copper sulfate introduction into soil. *Bull. Polish Acad. Sci., Biol. Sci.* **49**, 299-307.
- PIOTROWSKA-SEGET, Z., J. KOZDROJ, 2008: Changes in culturable bacterial community of soil treated with high dosages of Cu and Cd. *Plant Soil Environ.* **54**, 520-528.
- PRASAD, J., H. RAM, 1988: Effect of zinc and copper and *Rhizobium* inoculation on nodulation and yield of greengram (*Vigna radiata*). *Indian J. Agric. Sci.* **58**, 230-232.
- RACHAPPA, V., S. LINGAPPA, R.K. PATIL, 2007: Effect of agrochemicals on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. *Karnataka J. Agric. Sci.* **20**, 410-413.
- RAGUOTIS, A., 1999: (Effect of heavy metals Cu and Zn on soil microflora). *Ekologija (Vilnius)* (3), 78-83 (in Lit.).
- RAJI, P., M.V.R. PILLAI, 1996: Effect of plant protection chemicals on *Bradyrhizobium* in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *J. Trop. Agric.* **34**, 125-128.
- RAJI, P., M.V.R. PILLAI, 2000: Effect of plant protection chemicals on *Azospirillum* in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Legume Res.* **23** (3), 177-179.
- RANJARD, L., A. ECHAIRI, V. NOWAK, D.P.H. LEJON, R. NOUAÏM, R. CHAUSSOD, 2006a: Field and microcosm experiments to evaluate the effects of agricultural Cu treatment on the density and genetic structure of microbial communities in two different soils. *FEMS Microb. Ecol.* **58**, 303-315.
- RANJARD, L., L. LIGNIER, R. CHAUSSOD, 2006b: Cumulative effects of short-term polymetal contamination on soil bacterial community structure. *Appl. Environ. Microb.* **72**, 1684-1687.
- RANJARD, L., V. NOWAK, A. ECHAIRI, V. FALOYA, R. CHAUSSOD, 2008: The dynamics of soil bacterial community structure in response to yearly repeated agricultural copper treatments. *Res. Microb.* **159**, 251-254.
- RENELLA, G., A.M. CHAUDRI, P.C. BROOKES, 2002: Fresh additions of heavy metals do not model long-term effects on microbial biomass and activity. *Soil Biol. Biochem.* **34**, 121-124.
- SCHÜEPP, H., M. BODMER, 1989: Method to investigate side effects of pesticides on hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizae. In: "Methodological aspects of the study of pesticide behaviour in soil", INRA Versailles 1988, 237-240.
- SHUKLA, A.K., B.K. TIWARI, R.R. MISHRA, 1987: Effect of benomyl, copper oxychloride and mancozeb on rhizosphere microflora of potato. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad., B* **53**, 273-278.
- SINGH, S., S.N. MUKHERJEE, S. CHANDRA, 1987: Effect of fungicide treatment of soil on mycorrhizal development in pines. *Indian Forester* **113**, 681-683.
- STRUMPF, T., U. STENDEL, C. VETTER, 2009: Gesamtgehalt von Kupfer in Böden des Kernobstanbaus, Weinbergen und Hopfenanlagen. *Journal für Kulturpflanzen* **61**, 117-125.
- STRZELCZYK, E., A. POKOJSKA-BURDZIEJ, C.Y. LI, 1997: Effect of Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> on auxins production by *Azospirillum* strains. *Acta Microbiol. Pol.* **46**, 263-270.
- SUN, S.-J., J. XU, S.-G. DAI, X. HAN, 2006: Influence of copper speciation on toxicity to microorganisms in soils. *Biomed. Environ. Sci.* **19**, 409-413.
- SZILI-KOVACS, T., 2008: Effect of some metal salts on the cultivable part of soil microbial assemblage in a calcareous loam cropland 6 years after contamination. *Acta Biol. Szeged.* **52**, 201-204.
- TALEVA, A., E. DJONOVA, 1998: (Effect of heavy metal (Cu and Cd) on the VA mycorrhiza root colonization and development of onion (*Allium cepa*)). *Pochvozn. Agrokhim. Ekol.* **33** (2), 15-18 (in Bulg.).
- UDAIYAN, K., S. MANIAN, T. MUTHUKUMAR, S. GREEP, 1995: Biostatic effect of fumigation and pesticide association on an endomycorrhizal-*Rhizobium*-legume tripartite association under field conditions. *Biol. Fertil. Soils* **20**, 275-283.
- VAGVÖLGYI, C., K. KÖRÖSI, Z. ANTAL, G. TUROCCI, L. MANCZINGER, 2009: The effect of copper on the effectiveness of biocontrol bacterium strains. *Cereal Res. Commun.* **37** (Suppl.), 589-592.

- VASSEUR, P., D. DIVE, Z. SOKAR, H. BONNEMAIN, 1988: Interactions between copper and some carbamates used in phytosanitary treatments. *Chemosphere* **17**, 767-782.
- VITI, C., D. QUARANTA, R. DE PHILIPPIS, G. CORTI, A. AGNELLI, R. CUNIGLIO, L. GIOVANNETTI, 2008: Characterizing cultivable soil microbial communities from copper fungicide-amended olive orchard and vineyard soils. *World J. Microb. Biotechnol.* **24**, 309-318.
- WAN, M.T., J.E. RAHE, R.G. WATTS, 1998: A new technique for determining the sublethal toxicity of pesticides to the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 1421-1428.
- WANG, X.-L., J.-M. XU, Z.-M. XIE, H.-Y. YAO, W.-Y. SHI, 2002: (Effects of Cu and Zn contamination on soil biological indicators of environmental quality). *J. Zhejiang Univ., Agric. Life Sci.* **28** (2), 190-194 (in Chin.).
- WILKE, B.-M., 1987: Langzeitwirkungen von Kupfer und Zink auf die mikrobielle Aktivität eines humosen, lehmigen Sandes. *Landwirtsch. Forsch.* **40**, 336-343.
- WILKE, B.-M., M. MAI, A. GATTINGER, M. SCHLOTER, P. GONG, 2005: Effects of fresh and aged copper contaminations on soil microorganisms. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **168**, 668-675.
- WYSZKOWSKA, J., E. BOROS, J. KUCHARSKI, 2007: Effect of interactions between nickel and other heavy metals on the soil microbiological properties. *Plant Soil Environ.* **53**, 544-552.
- WYSZKOWSKA, J., J. KUCHARSKI, A. BOROWIK, E. BOROS, 2008: Response of bacteria to soil contamination with heavy metals. *J. Elementol.* **13**, 443-453.
- XIE, W., J. ZHOU, H. WANG, X. CHEN, Z. LU, J. YU, X. CHEN, 2009: Short-term effects of copper, cadmium and cypermethrin on dehydrogenase activity and microbial functional diversity in soils after long-term mineral or organic fertilization. *Agric. Ecosyst. Environ.* **129**, 450-456.
- YANG, C.-H., J.A. MENGE, D.A. COOKSEY, 1993: Role of copper resistance in competitive survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Appl. Environ. Microb.* **59**, 580-584.
- YAO, H.-Y., Y.-Y. LIU, D. XUE, C.-Y. HUANG, 2006: Effect of copper on phospholipid fatty acid composition of microbial communities in two red soils. *J. Environ. Sci. (China)* **18**, 503-509.
- ZANCAN, S., R. TREVISAN, M.G. PAOLETTI, 2006: Soil algae composition under different agro-ecosystems in north-eastern Italy. *Agric. Ecosyst. Environ.* **112**, 1-12.
- ZELLES, L., Q.Y. BAI, R.X. MA, R. RACKWITZ, K. WINTER, F. BEESE, 1994: Microbial biomass, metabolic activity and nutritional status determined from fatty acid patterns and polyhydroxybutyrate in agriculturally-managed soils. *Soil Biol. Biochem.* **26**, 439-446.
- ZHANG, H., Q. ZHANG, Q. ZHOU, C. ZHANG, 2003: Binary-joint effects of acetochlor, methamidophos, and copper on soil microbial population. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **71**, 746-754.
- ZHENG, W., Y. FEI, Y. HUANG, 2009: Soluble protein and acid phosphatase exudate by ectomycorrhizal fungi and seedlings in response to excessive Cu and Cd. *J. Environ. Sci. (China)* **21**, 1667-1672.
- ZHU, B.-Z., S. SHECHTMAN, M. CHEVION, 2001: Synergistic cytotoxicity between pentachlorophenol and copper in a bacterial model. *Chemosphere* **45**, 463-470.