

ГАВРИЛЮК О.А.[✉], ГОВОРУХА В.М., ТАШИРЕВ О.Б.

Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 154

[✉] gav_olesya@ukr.net, (093) 766-13-77, (096) 929-25-69

СТІЙКІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ ЧОРНОЗЕМНОГО ҐРУНТУ ДО РОЗЧИННИХ СПОЛУК МІДІ

Мета. Визначення стійкості мікроорганізмів чорноземного ґрунту України до дії токсичної міді(II). **Методи.** Вміст мідь-резистентних мікроорганізмів у чорноземі визначали підрахунком колоній на твердому поживному середовищі, що містило Cu(II). Стійкість мікроорганізмів визначали культивуванням у концентраційному градієнті Cu²⁺. **Результати.** Показано, що в чорноземному ґрунті наявні мікроорганізми, що стійкі до токсичної міді у надвисоких концентраціях – 500 мг/л Cu²⁺ (розчин CuSO₄) та 10000 мг/л Cu²⁺ (у комплексі з цитратом). Встановлено, що хелатування цитратом призводить до підвищення стійкості мікроорганізмів до Cu²⁺ у 20 разів. Визначено, що у природній екосистемі може існувати зникаюче мала кількість мікроорганізмів, що стійкі до токсичної міді у надвисоких концентраціях. Із підвищенням вмісту Cu²⁺ зменшується кількість життєздатних мікроорганізмів, що описується гіперболічною кривою. **Висновки.** Запропонований методологічний підхід не лише дозволяє виділити мідь-резистентні мікроорганізми з природних екосистем усіх географічних зон земної кулі, а й уникнути здійснення складних генетичних трансформацій із метою отримання перспективних генетично модифікованих штамів для подальшого використання у біотехнологіях очищення промислових стічних вод.

Ключові слова: мідь-резистентні мікроорганізми, чорноземний ґрунт України, диверсифіковане мікробне угруповання, природоохоронні біотехнології.

Чорноземні ґрунти є джерелом диверсифікованих мікробних угруповань, що забезпечують замкнений кругообіг речовин та енергії [1]. Мікробні угруповання ґрунту належать до різноманітних фізіологічних і таксономічних груп циклів вуглецю, азоту, фосфору та сірки. Тому чорноземний ґрунт, з огляду на мікробне різноманіття, є привабливим «генетичним ресурсом» метал-резистентних (та зокрема Cu²⁺-

резистентних) штамів, що перспективні для застосування у біотехнологіях очищення металовмісних стічних вод [2]. Зазвичай для створення таких біотехнологій виділяють окремі штами мікроорганізмів з екосистем «техногенних катастроф» [3–5]. Також використовуються методи генетичної трансформації для створення стійких до міді генетично модифікованих штамів [6, 7].

Катіон Cu²⁺ є металом комбінованої дії за своїм негативним ефектом. Він є одночасно як металом-замісником, так і металом-окиснювачем [10]. Саме тому він є дуже токсичним металом [8, 9]. Одним із факторів, що визначають токсичність міді, є високі значення редокс-потенціалу (*Eh*) утворених нею окисно-відновних систем [10]. У нейтральних умовах (рН = 7,0), типових для більшості біохімічних реакцій, вода стійка в діапазоні стандартних значень редокс-потенціалу (*E'*₀ – стандартний редокс-потенціал реакції (*Eh*, мВ) за рН=7,0 та одномолярної концентрації як окисненої, так і відновленої форм реагуючих речовин) *E'*₀ від –414 до +814 мВ. Верхня межа стійкості води визначається оборотною реакцією окиснення кисню до молекулярного кисню: 2H₂O = O₂ + 4H⁺ + 4e⁻; *E'*₀ = +814 мВ. Нижня межа стійкості води визначається оборотною реакцією відновлення протону до молекулярного водню: 2H⁺ + 2e⁻ = H₂; *E'*₀ = –414 мВ. Оскільки редокс-потенціал системи, утвореної міддю та її відновленою формою, знаходиться в межах термодинамічної стійкості води і її токсична дія визначається величиною *Eh*, то допустиме існування мікроорганізмів, стійких до високих концентрацій цього металу-окисника [10]. Виходячи з цього, ми припустили, що з екологічно чистого чорноземного ґрунту природної екосистеми можна виділити зникаюче малу кількість мікроорганізмів, які є стійкими до токсичної міді(II) у надвисокій концентрації.

Запропонований нами методологічний підхід не лише дозволяє виділити мідь-резистентні мікроорганізми з природних еко-

© ГАВРИЛЮК О.А., ГОВОРУХА В.М., ТАШИРЕВ О.Б.

стем, а й уникнути складних генетичних трансформацій із метою отримання перспективних генетично модифікованих мікроорганізмів. Водночас методологічний підхід усуне необхідність пошуку техногенних екосистем для виділення з них мікроорганізмів, стійких до міді, та дозволить виділяти їх з більшості наявних екосистем усіх географічних зон земної кулі.

У зв'язку з цим метою роботи було визначення стійкості мікроорганізмів чорноземного ґрунту України до дії токсичної міді(II).

Матеріали і методи

Для виявлення мідь-резистентних мікроорганізмів було досліджено зразок чорноземного ґрунту України, що був відібраний у фруктовому саду Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного (м. Київ).

Мідь-резистентні мікроорганізми ізолювали у стерильних умовах на м'ясо-пептонному агарі (МПА) у двох модифікаціях міді(II). Перша модифікація містила катіон Cu^{2+} , хелатований трьохзаміщеним цитратом натрію. У другій модифікації середовища мідь вносили у вигляді сульфату CuSO_4 без додавання хелаторів.

Розчини міді у концентрації 63,546 г/л (1 моль/л) готували розчиненням $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ у дистильованій воді. Для приготування 100 мл розчину цитрату міді 24,96 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ розчиняли у 50 мл дистильованої води. Після цього додавали 12,7 г сухого трьохзаміщеного натрію цитрату та перемішували до повного розчинення. Розчин мав $\text{pH} = 3,4$, і тому його нейтралізували за допомогою Na_2CO_3 до $\text{pH} = 7,0$. Отриманий розчин вносили у колбу Мора об'ємом 100 мл та доводили об'єм до мітки дистильованою водою. Для приготування розчину сульфату міді 24,96 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ розчиняли у 50 мл дистильованої води, вносили у колбу Мора (100 мл) та доводили об'єм до мітки дистильованою водою. Розчин мав $\text{pH} = 3,2$. Розчини стерилізували кип'ятінням на водяній бані протягом 30 хв у герметично закритих флаконах.

В агаризованому середовищі створювали концентраційний градієнт Cu(II) . Для першого варіанта експерименту (нехелатований Cu^{2+}) градієнт створювали із кроком 100 мг/л – від 100 до 600 мг/л. У другому варіанті (цитрат Cu^{2+}) градієнт становив 100...11000 мг/л Cu^{2+} . У чашки вносили по 25,0 мл середовища, що містило цитрат та сульфат міді(II), а також контрольне середовище без міді та витримували протягом 2 діб за кімнатної температури для переві-

рки стерильності та підсушування. Для посіву мікроорганізмів готували десятикратні розведення зразка, з яких 0,1 мл суспензії мікроорганізмів (10^{-2}) вносили на поверхню агару та розтирали шпателем. У якості контролю використовували середовище без міді. Мікроорганізми культивували за 30 °С протягом 14 діб. Кількість мікроорганізмів перераховували на їх вміст в 1 г абсолютно сухого ґрунту [11].

Здатність мікроорганізмів взаємодіяти зі сполуками токсичної міді(II) визначали за допомогою якісної реакції з H_2S . Колонії, що накопичували Cu(II) , забарвлювалися в чорний колір внаслідок утворення сульфідів міді: $\text{Cu}^{2+} + \text{S}^{2-} = \text{CuS}$ [12]. У якості тестового мікроорганізму для перевірки токсичності селективного середовища, що містило Cu^{2+} , використовували штамп *Escherichia coli* УКМ В-926. Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакетів прикладної програми Microsoft Excel ($P < 0,05$).

Результати та обговорення

Загальноприйнятною є думка про те, що важкі метали-окисники токсичні і пригнічують ріст мікроорганізмів [9, 13], оскільки утворені ними окисно-відновні системи характеризуються високими значеннями редокс-потенціалу (Eh) [10]. Раніше нами було показано [10], що якщо редокс-потенціал системи, утвореної металом-окисником та його відновленою формою, знаходиться в межах термодинамічної стійкості води ($Eh = -414...+814$ мВ) і його токсична дія визначається величиною Eh , то допустиме існування мікроорганізмів, стійких до металу-окисника в дуже високих концентраціях, в ряді випадків до величин порядку 1 моль/л (рис. 1).

Оскільки значення редокс-потенціалу цитратного та сульфатного 1 моль/л розчинів міді(II) становили +380 та +580 мВ відповідно, то цілком очікуваним для нас виявилася можливість життєдіяльності мікроорганізмів у присутності токсичної Cu^{2+} у надвисоких концентраціях (рис. 2). Перед постановкою експерименту нами було експериментально встановлено, що хелатування Cu^{2+} цитратом не супроводжується істотним зменшенням токсичності цього катіона. Так, колекційний штамп *Escherichia coli* УКМ В-926, який не є стійким до сполук металів, не ріс за концентрації 200 мг/л Cu^{2+} у хелатованій цитратом формі. Вперше показано, що в екологічно-чистому, незабрудненому металами чорноземному ґрунті України наявні мікрооргані-

ми, які стійкі до токсичної міді(II) у надвисоких концентраціях – до 10000 мг/л Cu^{2+} , що хелатована цитратом.

На перший погляд, існування мікроорганізмів за таких надвисоких концентрацій міді суперечить загальноприйнятому уявленню про бактеріостатичні та навіть бактерицидні властивості Cu^{2+} у концентраційному діапазоні 20...100 мг/л [8, 9]. Проте з отриманих нами даних видно, що збільшення концентрації Cu^{2+} призводить до вкрай негативних наслідків (рис. 2).

Кількість мікроорганізмів за концентрацій, що не перевищують навіть 2000 мг/л Cu^{2+} ,

катастрофічно зменшується. Таким чином, нами ще раз експериментально підтверджено загальнобіологічну закономірність щодо токсичної дії міді на мікроорганізми. Проте принципово новим є те, що кількість мікроорганізмів, які виростили за високих концентрацій міді (2000...6000 Cu^{2+} мг/л), становила сотні тисяч клітин у грамі ґрунту. Так, за 2000 мг/л Cu^{2+} значення $0,42 \times 10^6$ КУО/г, і навіть за 8000 мг/л кількість мікроорганізмів залишалася дуже високою, $0,19 \times 10^6$ КУО/г. Нарешті принципово новим є той факт, що за надвисокої концентрації Cu^{2+} чорноземний ґрунт містив тисячі життєздатних мікроорганізмів ($7,6 \times 10^2$ КУО/г) (рис. 2).

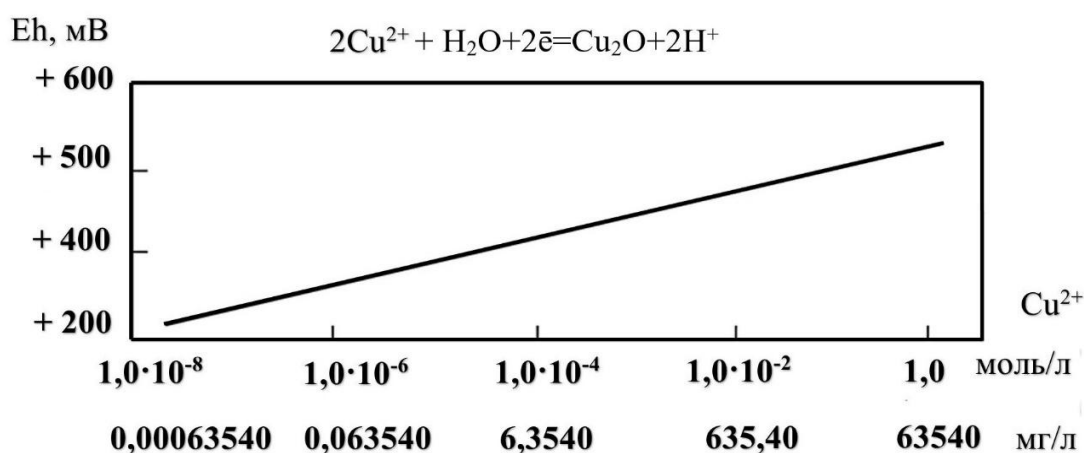


Рис. 1. Залежність величини редокс-потенціалу Cu^{2+} (Eh, мВ) від його концентрації у воді (моль/л і мг/л) у реакціях відновлення [10].

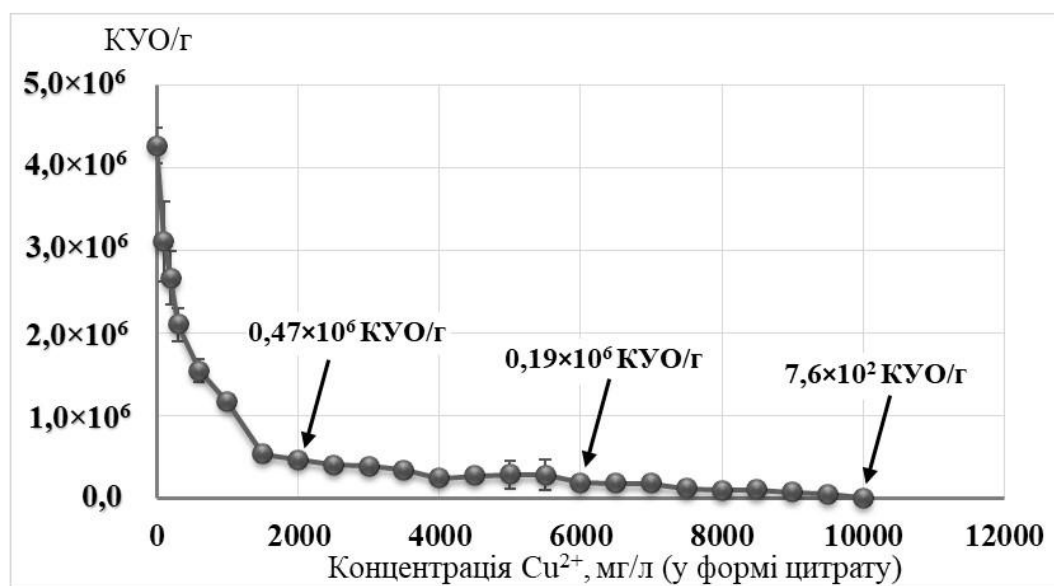


Рис. 2. Стійкість чорноземного мікробного угруповання до хелатованої цитратом токсичної міді(II).

Значно меншу стійкість до Cu^{2+} проявляють мікроорганізми, якщо мідь присутня у вигляді нехелатованого катіону Cu^{2+} . Так, якщо МДК для хелатованої форми міді становило 10000 мг/л Cu^{2+} , то для нехелатованої сполуки (CuSO_4) МДК дорівнювало 500 мг/л Cu^{2+} (рис. 3), тобто стійкість мікроорганізмів до міді зменшувалася у 20 разів. Звідси випливає, що утворення комплексних сполук із мікробними екзометаболітами (органічними кислотами) може слугувати захисним механізмом, що підвищує стійкість мікроорганізмів до токсичного катіона Cu^{2+} . Необхідно підкреслити, що загально-біологічна закономірність щодо негативної дії міді підтверджується також і у варіанті з нехелатованим Cu^{2+} : за концентрації 200 мг/л кількість мікроорганізмів зменшується у 8 разів. Проте навіть за 500 мг/л Cu^{2+} кількість мікроорганізмів становила $3,8 \times 10^2$ КУО/г.

Залежність кількості життєздатних мікроорганізмів від концентрації міді описується гіперболічною кривою, на «правому плечі» якої показано існування надстійких мідь-резистентних мікроорганізмів (рис. 2). Ефект «правого плеча» гіперболи підтверджено як на прикладі катіону Cu^{2+} , так і на прикладі цитрату Cu^{2+} .

Виділені нами мікроорганізми не тільки стійкі до міді у надвисоких концентраціях, але і

здатні вилучати її з водних розчинів завдяки накопиченню Cu^{2+} у мікробній біомасі. Підтвердженням тому є розроблений нами сірководневий тест [12]. Суть його полягає у забарвленні сполук Cu^{2+} у темно-коричневий колір внаслідок утворення сульфідів міді $\text{CuS} \downarrow$.

Сьогодні відсутні мікробні технології, що забезпечують ефективне очищення промислових стічних вод від міді у концентраційному діапазоні 100 – 400 мг/л Cu^{2+} [13–15]. Максимальну стійкість до міді показано на прикладі штаму *Pseudomonas* spp, що резистентний до 300 мг/л $\text{Cu}(\text{II})$ [2] та трьох штамів, ізольованих із «металовмісної» річки Могпог, стійких до 15...390 мг/л Cu^{2+} [16]. Звідси очевидно, що для очищення стічних вод, що містять мідь у значно більших концентраціях, є перспективними виділені нами штами.

Отримані закономірності є підґрунтям для розробки новітніх біотехнологій очищення промислових стічних вод від Cu^{2+} . З огляду на те, що хелатування міді призводить до підвищення стійкості мікроорганізмів до міді, до очисної споруди разом із мікроорганізмами доцільно вносити полімерні органічні сполуки (крохмаль, целюлозу тощо), які метаболізуються мікроорганізмами з утворенням широкого спектра органічних кислот – хелаторів міді.

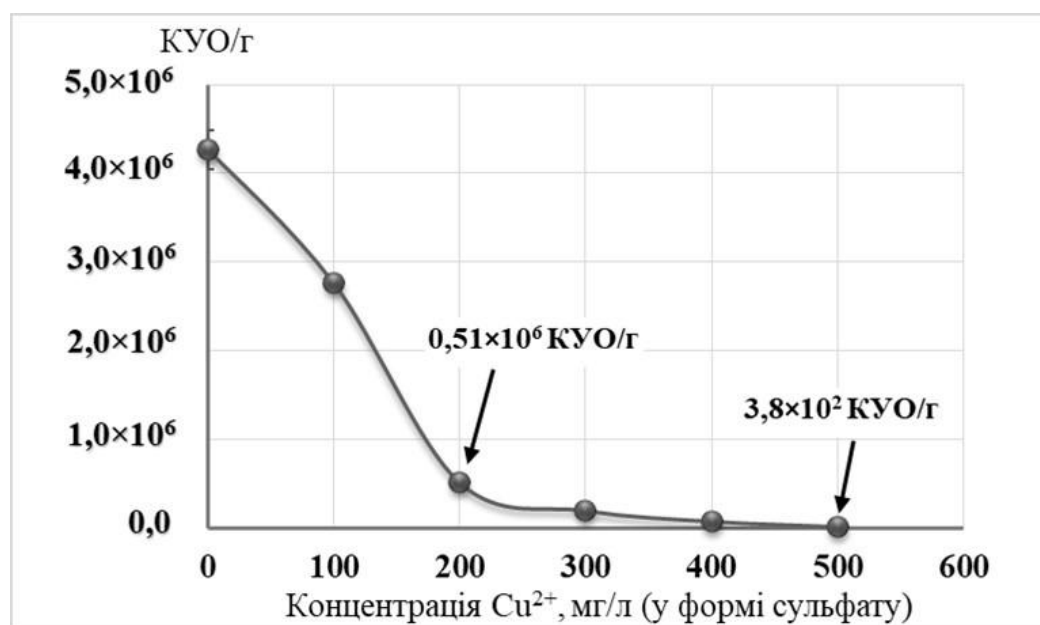


Рис. 3. Стійкість чорноземного мікробного угруповання до токсичної міді(II) у сульфатній формі.

Висновки

Доведено, що в чорноземному ґрунті України розповсюджені мідь-резистентні мікроорганізми, стійкі до токсичної міді(II) у надвисоких концентраціях – 10000 мг/л (цитратна форма) та 500 мг/л (водний розчин CuSO_4). Встановлено, що хелатування цитратом призводить до підвищення стійкості мікроорганізмів до сполук токсичної міді(II) у 20 разів. Визначено, що у природних екосистемах може існувати зникаюче мала кількість мікроорганізмів, що

стійкі до токсичної міді у надвисоких концентраціях. Залежність кількості мікроорганізмів від концентрації міді описується гіперболічною кривою, оскільки з підвищенням її вмісту у середовищі зменшувалася кількість мікроорганізмів. Запропонований методологічний підхід дозволяє виділити мідь-резистентні мікроорганізми з природних екосистем для створення новітніх біотехнологій очищення промислових стічних вод від розчинних сполук міді у надвисоких концентраціях.

Література

1. Заварзин Г.А. Развитие микробных сообществ в истории Земли. Проблемы доантропогенной эволюции биосферы. М.: Наука, 1993. С. 212–222.
2. Rajbanshi A. Study on heavy metal resistant bacteria in guheswori sewage treatment plant. *Our nature*. 2008. Vol. 6. P. 52–57. doi: 10.3126/on.v6i1.1655.
3. Altimira F., Yáñez C., Bravo G., González M., Rojas L.A., Seeger M. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiology*. 2012. Vol. 12, No. 193. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-193>.
4. Xie X., Fu J., Wang H., Liu J. Heavy metal resistance by two bacteria strains isolated from a copper mine tailing in China. *African Journal of Biotechnology*. 2010. Vol. 9, No. 26. P. 4056–4066.
5. Kunito T., Saeki K., Oyaizu H., Matsumoto S. Influences of copper forms on the toxicity to microorganisms in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1999. Vol. 44. P. 174–181. doi: 10.1006/eesa.1999.1820.
6. Weissman Z., Berdicevsky I., Cavari B.Z., Kornitzer D. The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P type ATPase. *PNAS*. 2000. Vol. 97, No. 7. P. 3520–3525.
7. Fogel S., Welch J. W. Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1982. Vol. 79. P. 5342–5346.
8. Samanovic M.I., Ding C., Thiele D.J., Darwin K.H. Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal. *Cell Host & Microbe*. 2012. Vol. 11, No. 2. P. 106–115. doi: 10.1016/j.chom.2012.01.009.
9. Borkow G., Gabbay J. Copper as a biocidal tool. *Current Medicinal Chemistry*. 2005. Vol. 12, No. 18. P. 2163–2175.
10. Таширев А.Б., Галинкер Э.В., Андреюк Е.И. Термодинамическое прогнозирование редокс-взаимодействия микроорганизмов с металлами-окислителями (Hg^{2+} , CrO_4^{2-} и Cu^{2+}). *Доп. НАН України*. 2008. № 4. С. 166–172.
11. Detection and Enumeration of Bacteria in Swabs and other Environmental Samples. Public Health England. 2017. *National Infection Service, Food, Water and Environmental Microbiology Standard Method*. FNES4 (E1). Version 4.
12. Tashyrev. O.B., Prekrasna Ie.P., Tashyreva G.O., Bielikova O.Iu. Resistance of microbial communities from Ecuador ecosystems to representative toxic metals – CrO_4^{2-} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} . *Мікробіологічний журнал*. 2015. Vol. 77, No. 4. С. 46–61.
13. Ochoa-Herrera V., León G., Banihani Q., Field J. A., Sierra-Alvarez R. Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems. *Sci Total Environ*. 2011. Vol. 412–413. P. 380–385. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.072>.
14. Gyawali R., Ibrahim S.A., Hasfa S.H.A., Smqadri S.Q., Haik Y. Antimicrobial activity of copper alone and in combination with lactic acid against *Escherichia coli* o157:h7 in laboratory medium and on the surface of lettuce and tomatoes. *Journal of pathogens*. 2011. Vol. 2011. P. 1–9. doi: 10.4061/2011/650968.
15. Cabrera G., Pérez R., Gómez J.M., Ábalos A., Cantero D. Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains. *Journal Hazard Mater*. 2006. Vol. 135, No. 1–3. P. 40–46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.11.058>.
16. Parungao M.M., Tacata P.S., Tanayan C.R.G., Trinidad L.C. Biosorption of copper, cadmium and lead by copper-resistant bacteria isolated from Mogpog river, Marinduque, Philippine. *Journal of Science*. 2007. Vol. 136, No. 2. P. 155–165.

References

1. Zavarzyn H.A. Development of microbial communities in the history of the Earth. Problems of the pre-anthropogenic evolution of the biosphere. М.: Nauka, 1993. P. 212–222.
2. Rajbanshi A. Study on heavy metal resistant bacteria in guheswori sewage treatment plant. *Our nature*. 2008. Vol. 6. P. 52–57. doi: 10.3126/on.v6i1.1655.
3. Altimira F., Yáñez C., Bravo G., González M., Rojas L.A., Seeger M. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiology*. 2012. Vol. 12, No. 193. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-193>.
4. Xie X., Fu J., Wang H., Liu J. Heavy metal resistance by two bacteria strains isolated from a copper mine tailing in China. *African Journal of Biotechnology*. 2010. Vol. 9, No. 26. P. 4056–4066.

5. Kunito T., Saeki K., Oyaizu H., Matsumoto S. Influences of copper forms on the toxicity to microorganisms in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1999. Vol. 44. P. 174–181. doi: 10.1006/eesa.1999.1820.
6. Weissman Z., Berdicevsky I., Cavari B.Z., Kornitzer D. The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P type ATPase. *PNAS*. 2000. Vol. 97, No. 7. P. 3520–3525.
7. Fogel S., Welch J. W. Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1982. Vol. 79. P. 5342–5346.
8. Samanovic M.I., Ding C., Thiele D.J., Darwin K.H. Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal. *Cell Host & Microbe*. 2012. Vol. 11, No. 2. P. 106–115. doi: 10.1016/j.chom.2012.01.009.
9. Borkow G., Gabbay J. Copper as a biocidal tool. *Current Medicinal Chemistry*. 2005. Vol. 12, No. 18. P. 2163–2175.
10. Tashyrev O.B., Halynker E.V., Andreiuk E.Y. Thermodynamic prognosis of redox interaction of microorganisms with oxidizing metals (Hg^{2+} , CrO_4^{2-} and Cu^{2+}). *Rep. of the NAS of Ukraine*. 2008. No. 4. P. 166–172.
11. Detection and Enumeration of Bacteria in Swabs and other Environmental Samples. Public Health England. 2017. *National Infection Service, Food, Water and Environmental Microbiology Standard Method*. FNES4 (E1). Version 4.
12. Tashyrev O.B., Prekrasna Ie.P., Tashyreva G.O., Bielikova O.Iu. Resistance of microbial communities from Ecuador ecosystems to representative toxic metals – CrO_4^{2-} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} . *Мікробіологічний журнал*. 2015. Vol. 77, No. 4. С. 46–61.
13. Ochoa-Herrera V., León G., Banihani Q., Field J. A., Sierra-Alvarez R. Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems. *Sci Total Environ*. 2011. Vol. 412–413. P. 380–385. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.072>.
14. Gyawali R., Ibrahim S.A., Hasfa S.H.A., Smqadri S.Q., Haik Y. Antimicrobial activity of copper alone and in combination with lactic acid against *Escherichia coli* o157:h7 in laboratory medium and on the surface of lettuce and tomatoes. *Journal of pathogens*. 2011. Vol. 2011. P. 1–9. doi: 10.4061/2011/650968.
15. Cabrera G., Pérez R., Gómez J.M., Ábalos A., Cantero D. Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains. *Journal Hazard Mater*. 2006. Vol. 135, No. 1–3. P. 40–46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.11.058>.
16. Parungao M.M., Tacata P.S., Tanayan C.R.G., Trinidad L.C. Biosorption of copper, cadmium and lead by copper-resistant bacteria isolated from Mogpog river, Marinduque. Philippines. *Journal of Science*. 2007. Vol. 136, No. 2. P. 155–165.

HAVRYLIUK O.A., GOVORUKHA V.M., TASHYREV O.B.

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str.,154, e-mail: gav_olesya@ukr.net

THE RESISTANCE OF CHERNOZEM SOIL MICROORGANISMS TO SOLUBLE COPPER COMPOUNDS

Aim. Determination of resistance of Ukrainian chernozem soil microorganisms to the influence of toxic copper(II).

Methods. Content of copper-resistant microorganisms in chernozem was determined by counting colonies on a solid nutrient medium containing Cu(II). Resistance of microorganisms was determined by cultivation in the medium with concentration gradient of Cu^{2+} . **Results.** Microorganisms resistant to toxic copper(II) by ultrahigh concentrations were shown to be present in chernozem soil. Microorganisms grew in the medium containing up to 500 mg/l Cu^{2+} (CuSO_4 solution) and up to 10000 mg/l Cu^{2+} (in complex with citrate). Chelation of copper(II) with citrate was found to lead to increase of microbial resistance in 20 times. It was determined that a vanishingly small number of microorganisms resistant to toxic copper by ultrahigh concentrations can exist in a natural ecosystem. The number of viable microorganisms decreases with the increase in the content of Cu^{2+} that is described by the hyperbolic curve. **Conclusions.** The proposed methodological approach not only allows to isolate copper-resistant microorganisms from natural ecosystems of all geographic zones of the globe, but also avoid complex genetic transformations in order to obtain perspective genetically modified strains for further application in biotechnologies for purification of industrial wastewater.

Keywords: copper-resistant microorganisms, chernozem soil of Ukraine, diversified microbial community, environmental biotechnologies.