УДК 579.873:579.26:622.02 https://doi.org/10.7124/FEEO.v39.1827

РОМАН І. І.
СТАСИК О. Г.
СТРИЖ О. А.
ХАЙНУС Ю. Б.
ФЕДОРЕНКО В. О.
ГРОМИКО О. М.✉

Львівський національний університет імені Івана Франка,
Україна, 79000, м. Львів, вул. Університетська, 1
✉ *oleksandr.gromyko@lnu.edu.ua*

АЦИДОФІЛЬНІ АКТИНОМІЦЕТИ ВІДВАЛІВ ШАХТИ «ВІЗЕЙСЬКА»: ВИДІЛЕННЯ ТА КОМПЛЕКСНА ХАРАКТЕРИСТИКА

Мета. Метою цієї роботи було дослідити культурально-морфологічні, фізіолого-біохімічні властивості та ферментативну активність ацидотолерантних штамів актиноміцетів Viz 22-4 і Viz 22-5, виділених із відвалів шахти «Візейська», а також провести їхній філогенетичний аналіз. ***Методи.*** Ізоляти отримували на модифікованому середовищі R2A. Ріст за різних значень pH аналізували на середовищі Беннета, морфологію – на середовищах ISP1-ISP6. Гідролітичну активність визначали стандартними методами, а філогенетичне положення – за послідовністю гена 16S рРНК. ***Результати.*** У ході роботи ми встановили, що обидва штами є ацидотолерантними (ріст при pH ≥ 4,0), проте суттєво різняться за фенотипом. Штам Viz 22-5 утворює рясний повітряний міцелій та виявляє казеїнолітичну активність при pH 4,0. Штам Viz 22-4 росте повільніше, переважно формуючи субстратний міцелій, і не виявляє гідролітичних властивостей щодо казеїну, пектину, крохмалю та метилцелюлози. Згідно з філогенетичним аналізом, ізоляти належать до родів *Nocardia* (Viz 22-4) та *Amycolatopsis* (Viz 22-5). ***Висновки.*** Виділені ізоляти актиноміцетів афілійовані до родів *Nocardia* та *Amycolatopsis* та характеризуються значною функціональною неоднорідністю. Характеристики досліджених мікроорганізмів, розширює сучасні уявлення про таксономічне біорізноманіття так званих «рідкісних» актиноміцетів у мікробіомах гірничодобувних відвалів, підкреслюючи їхню здатність до виживання та метаболічної активності в антропогенно змінених екосистемах.

Ключові слова: актиноміцети, ацидотолерантність, ферментативна активність, філогенетичний аналіз, *Nocardia, Amycolatopsis*.

Актиноміцети (тип *Actinomycetota*) – це група грампозитивних, переважно міцеліальних бактерій, що відіграють ключову роль у функціонуванні наземних екосистем. Традиційно відомі як продуценти вторинних метаболітів, більшість представників цього типу є нейтрофілами або факультативними алкаліфілами. Однак особливий науковий інтерес становлять ацидофільні та ацидотолерантні групи, адаптовані до екстремально низьких значень pH (3,5–6,5). Такі мікроорганізми є невід'ємною частиною мікробіоценозів лісових ґрунтів, сфагнових торфовищ та антропогенно змінених ландшафтів, зокрема зон кислотного дренажу шахт.

Екологічна пластичність актиноміцетів у кислих середовищах зумовлена специфічними механізмами адаптації. Ацидофільні форми характеризуються облігатною потребою в низькому pH для оптимального росту, тоді як ацидотолерантні (нейтротолерантні) штами зберігають життєздатність у кислому середовищі, хоча їхній фізіологічний оптимум зміщений до нейтральних значень. Здатність цих бактерій синтезувати стабільні при низькому pH ферменти (целюлази, хітинази) та антимікробні сполуки робить їх критично важливими агентами деструкції органічної

© 2026 Роман І. І., Стасик О. Г., Стриж О. А., Хайнус Ю. Б., Федоренко В. О. Громико О. М. This work is licensed under CC BY 4.0. To view a copy of this license, visit https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

речовини та біоремедіації в умовах стресових екосистем.

З таксономічної точки зору, ацидофільні актиноміцети представлені доволі великим різноманіттям родів, однак найбільшу кількість ацидофілів містять роди *Streptomyces*, *Nocardia* та *Streptacidiphilus*. Сучасні методи геномного профілювання вказують на значний біотехнологічний потенціал останніх. Зокрема, у геномах представників *Streptacidiphilus* ідентифіковано численні кластери генів біосинтезу, що відповідають за продукцію унікальних вторинних метаболітів, таких як макротетроліди. За різноманіттям певних біосинтетичних кластерів вони можуть перевершувати класичних продуцентів антибіотиків, в тому числі представників родів *Streptomyces* та *Kitasatospora*. Окрім того, наявність розширеного арсеналу генів біодеградації органічних полімерів підкреслює перспективність їх використання у фіторемедіаційних технологіях.

Незважаючи на глобальний інтерес до екстремофільних мікроорганізмів, питання біорізноманіття ацидофільних актиноміцетів у специфічних біотопах України залишається недостатньо вивченим. Наявні вітчизняні дослідження здебільшого фокусуються на загальних характеристиках бактеріоценозів техногенних субстратів, водночас системний аналіз таксономічного складу та метаболічного профілю актиноміцетів «кислих» екосистем практично відсутній. Враховуючи їхню здатність до мобілізації фосфору та синтезу антимікробних агентів, такі штами є перспективними біостимуляторами для відновлення техногенно порушених територій.

Метою цієї роботи було комплексне вивчення ростових, фізіолого-біохімічних та ферментативних властивостей нових ізолятів актиноміцетів Viz 22-4 та Viz 22-5, виділених з відвалів шахти «Візейська» (Львівська обл.).

Матеріали і методи

Для виділення актиноміцетів готували серію десяткових розведень суспензії зразка породи, відібраного з відвалів шахти Візейська (Сілець, Львівська область), та висівали на модифіковане середовище R2A (Reasoner and Geldreich, 1985), додатково збагачене целюлозою та крохмалем (по 0,5 г/л), при pH 5,5. Культивування здійснювали за температури 28°C впродовж двох тижнів. Ріст бактерій оцінювали візуально, а колонії з типовою для актиноміцетів формою росту відсівали на середовище Бенетта (Jones, 1949) (pH 5,5).

Чутливість до pH в діапазоні 3,5–7,0 досліджували на агаризованому середовищі Беннета. Для вивчення морфологічних і культуральних особливостей (синтез пігменту та оцінка характеристик повітряного/субстратного міцелію) ізоляти вирощували на середовищах ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, ISP6 (Shirling and Gottlieb, 1966) протягом 7–21 доби за температури повітря 28 °C. Утворення меланоїдних пігментів аналізували на середовищі ISP6. Здатність виділених штамів проявляти амілолітичну, пектинолітичну, целюлолітичну та казеїнолітичну активності визначали за методикою, наведеною в (Williams et al.,1983), за pH в діапазоні 3,0–4,0.

Для проведення філогенетичного аналізу ізоляти культивували на агаризованому середовищі Беннета при 28 °C протягом 7 діб, після чого здійснювали виділення хромосомної ДНК методом висолювання відповідно до стандартного протоколу (Guimaraes, 2018). Отриману ДНК використовували для ампліфікації та подальшого секвенування гена 16S рРНК із застосуванням праймерів 8F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') та 1510R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за стандартними протоколами. Отримані ампліфіковані фрагменти очищали, використовуючи QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Нідерланди), та секвенували за методом Сенджера в ТОВ «Експлоджен» (Україна). Аналіз генетичної спорідненості здійснювали з використанням бази даних NCBI BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Філогенетичне дерево, побудоване методом максимальної правдоподібності (ML), отримували в програмному пакеті MEGA 12 (Kumar et al., 2024).

Результати та обговорення

Відвали шахти «Візейська» є типовим техногенним елементом ландшафту Львівсько-Волинського вугільного басейну, сформованим унаслідок складування породи під час видобутку вугілля. Вони характеризуються специфічними фізико-хімічними умовами та є унікальними екологічними нішами для мікроорганізмів, здатних виживати в екстремальних умовах. Ключовим фактором формування мікробних угруповань є закислення субстрату внаслідок окиснення сульфідних мінералів, що зумовлює низький pH і високий вміст важких металів. У таких умовах виживають лише адаптовані мікроорганізми, зокрема хемолітоавтотрофи (*Acidithiobacillus*,

Leptospirillum), ацидофільні актиноміцети, а також стійкі форми бацил і мікроскопічних грибів.

Шляхом селективного культивування на модифікованому середовищі R2A (pH 5,5) із антропогенно порушених субстратів шахти «Візейська» було виділено два штами актиноміцетів, промарковані як Viz 22-4 та Viz 22-5. Оцінка росту ізолятів на середовищі Бенетта в широкому діапазоні кислотності (pH 3,5–7,0) дозволила ідентифікувати їх як ацидотолерантні форми. Встановлено, що досліджувані штами зберігають здатність до активного росту при значеннях pH ≥ 4,0. Швидше всього ці штами розвинули еволюційне пристосування через існування в умовах кислих техногенних субстратів.

Аналіз ростових ознак і пігментації дає змогу попередньо ідентифікувати та диференціювати ізоляти актиноміцетів. Оцінка особливостей росту на різних середовищах також характеризує їхній адаптаційний потенціал і доповнює результати фізіолого-біохімічних досліджень. Ми оцінювали культуральні властивості ізолятів Viz 22-4 та Viz 22-5 за допомогою вирощування на стандартних середовищах серії ISP (ISP1-ISP6). Зокрема, ми встановили, що досліджувані штами здатні до росту на всіх використаних ростових субстратах (рис. 1), що, у свою чергу, свідчить про їхню широку метаболічну адаптивність та невибагливість до складу поживного середовища.

Проте аналіз макроморфології колоній виявив суттєві відмінності між ізолятами за інтенсивністю росту та здатністю до спороутворення. Ізолят Viz 22-4 характеризувався помірним або слабким ростом на більшості середовищ. Повітряний міцелій білуватого кольору формувався переважно на середовищах ISP3, ISP4 та ISP5, тоді як на ISP1 та ISP6 спостерігався лише бідний субстратний ріст. На середовищі ISP2 штам утворював виражений субстратний міцелій світло-коричневого відтінку при практичній відсутності повітряного. Водночас ізолят Viz 22-5 демонстрував значно вищі темпи росту порівняно з Viz 22-4. На середовищах ISP2, ISP3, ISP4 та ISP5 штам формував рясний, густий повітряний міцелій білого кольору, що рівномірно вкривав поверхню штриха. Слабке спороутворення зафіксовано лише на середовищі ISP6, що є типовим для багатьох представників порядку *Actinomycetales* через специфіку мінерального складу цього субстрату та високу концентрацію складників середовища.

Визначення гідролітичної активності щодо крохмалю, пектину, целюлози та білків є ключовим етапом характеристики метаболічного потенціалу досліджуваних штамів. Спектр синтезованих екзоферментів слугує додатковою ознакою для ідентифікації актиноміцетів та відображає їхню роль у деструкції органічних речовин. Ми встановили, що ізолят Viz 22-4 не виявляв жодної з перелічених вище ферментативних активностей при вирощуванні на середовищах з pH 3,0–4,0, тоді як для ізоляту Viz 22-5 була притаманна здатність гідролізувати казеїн молока (рис. 2) при pH 4,0. В ділянці середовища, де росла культура актиноміцета з'являлося прозоре гало, що вказувало на те, що клітини секретували гідролітичний фермент, здатний розщеплювати казеїн.

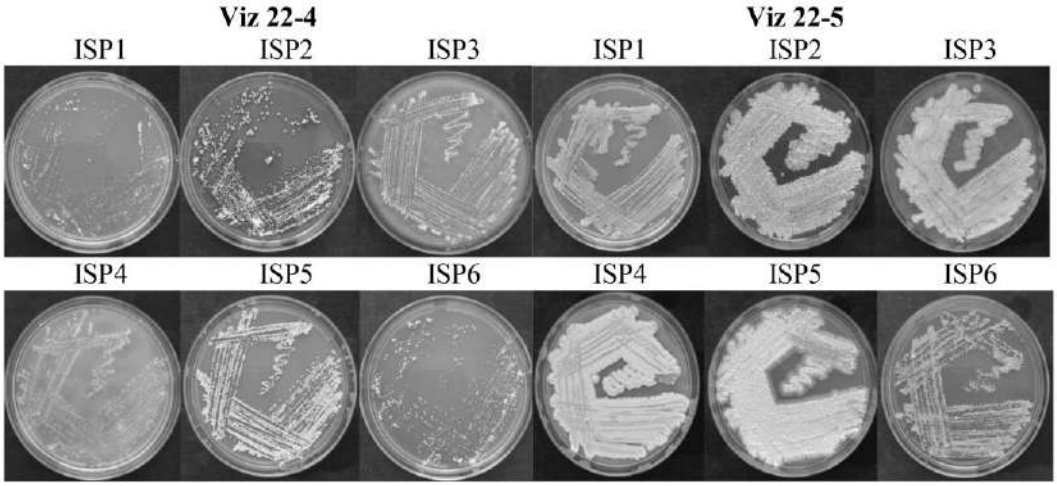


Рис. 1. Культуральні властивості ізолятів Viz 22-4 та Viz 22-5 при вирощуванні на середовищах ISP1-ISP6.

Проте слід зазначити, що окрім прозорої ділянки, безпосередньо біля клітин ізоляту Viz 22-5 утворювалося біле непрозоре гало, що може бути зумовлене локальними змінами pH і повторною преципітацією казеїну в зоні інтенсивного росту.

Дослідження ферментативного профілю підтвердило функціональні відмінності ізолятів, що корелюють із їхньою морфологією. Обмежений спектр гідролітичної активності при pH 3,0–4,0 свідчить про певну спеціалізацію ферментних систем в умовах кислотного стресу. Результати доповнюють характеристику ацидотолерантних актиноміцетів шахтних відвалів і визначають потенціал їх застосування як продуцентів кислотостійких протеаз.

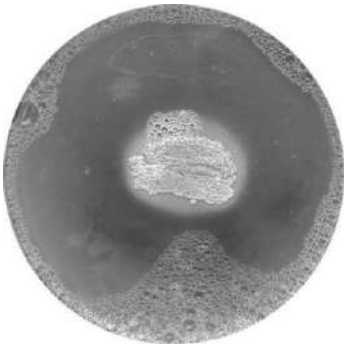


Рис. 2. Казеїнолітична активність ізоляту Viz 22-5 при вирощуванні на середовищі з 1,5% знежиреного молока.

Порівняльний аналіз послідовностей гена 16S рРНК дав змогу встановити таксономічну належність досліджуваних ізолятів актиноміцетів. Штам Viz 22-4 класифіковано як представника роду *Nocardia*, тоді як штам Viz 22-5 віднесено до роду *Amycolatopsis*. На основі філогенетичного дерева (рис. 3), штам Viz 22-4 формує спільну кладу з *Nocardia concava*.

Відомо, що клінічні ізоляти *N. concava* описують як опортуністичні патогени та збудники легеневих нокардіозів (Hirayama et al., 2016). З огляду на таку філогенетичну спорідненість, пряма екстраполяція екологічних чи біотехнологічних властивостей на штам Viz 22-4 є мало інформативною. У свою чергу, штам Viz 22-5 на філогенетичному дереві утворює спільний кластер із видом *Amycolatopsis echigonensis* (рис. 3). Типовий штам цього виду був первинно ізольований із вулканічного ґрунту (Ding et al., 2007; Ghasemi et al., 2026). Однак, серед актиноміцетів обох родів зустрічаються штами з ремедіаційними властивостями, що робить ці штами перспективними для подальших досліджень.

Висновки

Природні ізоляти актиноміцетів із териконів шахти «Візейська» ідентифіковано шляхом молекулярно-філогенетичного аналізу до родів *Nocardia* (Viz 22-4) та *Amycolatopsis* (Viz 22-5). Встановлено, що штами Viz 22-4 та Viz 22-5 є ацидотолерантними (ріст при pH ≥ 4,0) та суттєво різняться за морфологією на середовищах ISP. Viz 22-5 демонструє високу швидкий ріст і рясне спороутворення (секція *Albus*), тоді як Viz 22-4 характеризується сповільненим ростом із домінуванням субстратного міцелію. Для штаму

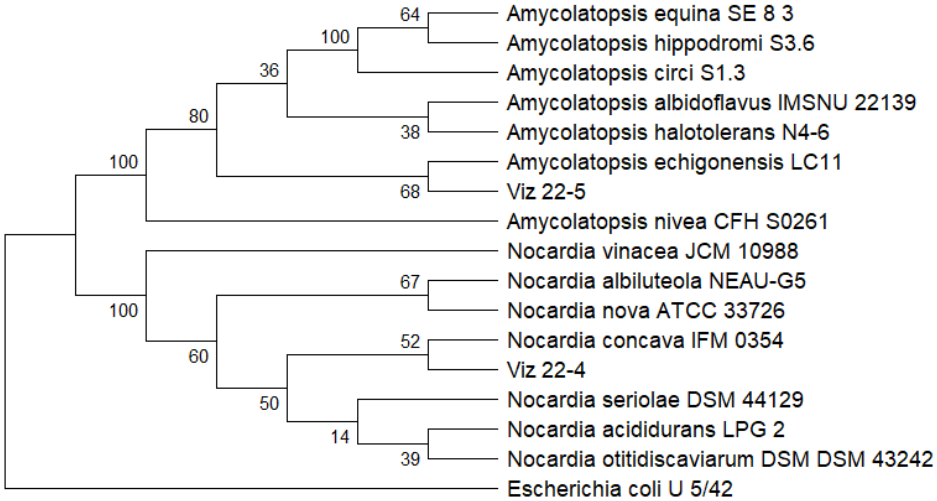


Рис. 3. Дендрограма філогенетичної спорідненості ізолятів актиноміцетів із породних відвалів шахти «Візейська», побудована на основі послідовностей гена 16S рРНК. Реконструкцію філогенії проведено в MEGA 12 методом приєднання сусідів (NJ). Достовірність топології гілок оцінено за допомогою бутстреп-аналізу (1000 повторів). Коренем дерева слугує послідовність гена 16S рРНК *Escherichia coli*.

Viz 22-5 властива казеїнолітична активність при pH 4,0, що робить його перспективним для біотехнології та біоремедіації. Виявлення актиноміцетів рідкісних родів розширює розуміння структурної організації мікробних угруповань у специфічних екосистемах гірничодобувних відвалів.

Інформація про фінансову підтримку, подяки: Це дослідження виконане в рамках проєкту «Мікробіом техноземів як основа для розроблення інноваційних підходів до відновлення мілітарно пошкоджених ґрунтів» (тема Бг-18Ф, № державної реєстрації 0125U001621),МОН України.

Конфлікт інтересів: автор Громико О. М. є членом редакційної колегії збірника наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів». Інші автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

References

1. Ding L., Hirose T., Yokota A. *Amycolatopsis echigonensis* sp. nov. and *Amycolatopsis niigatensis* sp. nov., novel actinomycetes isolated from a filtration substrate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007. Vol. 57 (8). P. 1747–1751. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64791-0.
2. Ghasemi A., Abtahi S.A., Jafarinia M., Azadi D. Enzyme-mediated synergistic bioremediation of PAH and heavy metal co-contaminated soil using nocardia species and *Helianthus annuus*. *Scientific Reports*. 2026. Vol. 16 (1). P. e8786. https://doi.org/10.1038/s41598-026-38230-2.
3. Hirayama T., Takazono T., Horai Y., Tashiro M., Saijo T., Kosai K., Morinaga Y., Kurihara S., Nakamura S., Imamura Y., Miyazaki T., Tsukamoto M., Izumikawa K., Yanagihara K., Kawakami A., Kohno S. Pulmonary nocardiosis caused by *Nocardia concava* with a literature review. *Internal medicine* (Tokyo, Japan). 2016. Vol. 55 (9). P. 1213–1217. https://doi.org/10.2169/internalmedicine.55.6228.
4. Jones K. L. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *Journal of Bacteriology*. 1949. Vol. 57 (2). P. 141–145. https://doi.org/10.1128/jb.57.2.141-145.1949.
5. Kumar S., Stecher G., Suleski M., Sanderford M., Sharma S., Tamura K. MEGA12: Molecular evolutionary genetic analysis version 12 for adaptive and Green computing. *Molecular Biology and Evolution*. 2024. Vol. 41 (12). P. 1–9. https://doi.org/10.1093/molbev/msae263.
6. Reasoner D. J., Geldreich E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*. 1985. Vol. 49 (1). P. 1–7. https://doi.org/10.1128/aem.49.1.1-7.1985.
7. Shirling E. B., Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International journal of systematic bacteriology*. 1966. Vol. 16 (3). P. 313–340. https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313.
8. Williams S. T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E. M., Sneath P. H., Sackin M. J. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Journal of General Microbiology*. 1983. Vol. 129 (6). P. 1743–1813. https://doi.org/10.1099/00221287-129-6-1743.

ROMAN I. I., STASYK O. G., STRYZH O. A., KHAYNUS YU. B., FEDORENKO V. O., GROMYKO O. M.
Ivan Franko National University of Lviv,
Ukraine, 79000, Lviv, Universytetska str., 1

ACIDOPHILIC ACTINOMYCETES OF THE «VIZEYSKA» MINE DUMPS: ISOLATION AND COMPREHENSIVE CHARACTERIZATION

***Aim*.** The purpose of this study was to investigate the cultural, morphological, physiological, and biochemical properties, as well as the enzymatic activity of the acidotolerant actinomycete isolates Viz 22-4 and Viz 22-5, obtained from the «Vizeiska» mine dumps, and to perform their phylogenetic analysis. ***Methods*.** The isolates were cultured on modified R2A medium. Growth at various pH levels was analyzed using Bennett's medium, while morphological characteristics were evaluated on ISP1-ISP6 media. Hydrolytic activity was determined by standard methods, and the phylogenetic position was established based on 16S rRNA gene sequencing. ***Results*.** It was established that both strains are acidotolerant (growing at pH $\geq$ 4.0) but differ significantly in their phenotype. Strain Viz 22-5 produces abundant aerial mycelium and exhibits caseinolytic activity at pH 4.0. Strain Viz 22-4 grows more slowly, predominantly forming substrate mycelium, and shows no hydrolytic activity towards casein, pectin, starch, or methylcellulose. According to phylogenetic analysis, the isolates belong to the genera *Nocardia* (Viz 22-4) and *Amycolatopsis* (Viz 22-5). ***Conclusions*.** The isolated actinomycetes exhibit substantial functional heterogeneity and, based on phylogenetic results, were identified as members of the genera *Nocardia* and *Amycolatopsis*. The discovery of these microorganisms in the extreme conditions of mine dumps expands current understanding regarding the taxonomic biodiversity of so-called «rare» actinomycetes within mine dump microbiomes, highlighting their capacity for survival and metabolic activity in anthropogenically altered ecosystems.

Keywords: actinomycetes, acidotolerance, enzymatic activity, phylogenetic analysis, *Nocardia*, *Amycolatopsis*.

Надходження статті: 8 червня 2026 р.
Прийняття до друку після рецензування: 30 липня 2026 р.
Публікація: 30 листопада 2026 р.