

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 579.26

doi: 10.26907/2542-064X.2022.3.457-474

## БАКТЕРИАЛЬНОЕ СООБЩЕСТВО РАССОЛОВ, ИЗВЛЕКАЕМЫХ ПРИ ПОДЗЕМНОМ РАСТВОРЕНИИ КАЛИЙНО-МАГНИЕВЫХ СОЛЕЙ ЯКШИНСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ (РЕСПУБЛИКА КОМИ)

А.А. Пьянкова<sup>1</sup>, Е.Г. Плотникова<sup>1</sup>, С.Н. Шанина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФИЦ УрО РАН, г. Пермь, 614081, Россия

<sup>2</sup>Институт геологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар, 167982, Россия

### Аннотация

Впервые приведены данные о разнообразии бактерий в нижнепермской породе Верхнепечорского соленосного бассейна. Из рассолов, извлеченных в ходе подземного растворения карналлитовых пород опытно-промышленной скважины Якшинского месторождения калийно-магниевых солей (Республика Коми, Россия), выделены галофильные и галотолерантные бактерии классов *Gammaproteobacteria* (представленного родами *Halomonas*, *Marinobacter*, *Idiomarina*) и *Actinomycetia* (из рода *Dietzia*). Анализ генов 16S рРНК, клонированных из тотальной ДНК флотируемой части нерастворимых остатков рассолов, позволил установить наличие в исследованных образцах бактерий классов *Gammaproteobacteria* (близкородственных родам *Idiomarina*, *Marinimicrobium*, *Marinobacter*, *Methylophaga*, *Pseudidiomarina*), *Betaproteobacteria* (сходных с представителями родов *Achromobacter*, *Methylotenera*), а также *Alphaproteobacteria* и *Flavobacteriia* (близкородственных родам *Sulfitobacter* и *Salegentibacter* соответственно). Несколько выявленных филотипов (клоны 113YS, 8YS, 150YS и 157YS) имели низкий уровень сходства с ближайшими типовыми штаммами родов *Methylophaga* (*M. nitratireducenticrescens* JAM1<sup>T</sup>, 96.86%), *Salegentibacter* (*S. salarius* ISL-6<sup>T</sup>, 98.58%) и *Methylotenera* (*M. versatilis* 301<sup>T</sup>, 98.05% и 98.19%), что указывает на присутствие в изученных рассолах новых, ранее не описанных таксонов бактерий. Полученные результаты определяют вектор и закладывают основы дальнейших исследований филогенетического и функционального разнообразия микроорганизмов соленосной толщи Якшинского месторождения.

**Ключевые слова:** месторождение калийно-магниевых солей, галофильные бактерии, гены 16S рРНК, клонирование, секвенирование

### Введение

Экосистемы, характеризующиеся высокой степенью засоленности на различных уровнях, широко распространены по всему миру. Их функционирование во многом определяется особенностями структурной организации, для понимания которой важно учитывать состав и разнообразие населяющих их сообществ микроорганизмов в зависимости от значений минерализации. Имеющиеся на настоящий момент данные, полученные с использованием культуральных и молекулярных (культурально-независимых) методов, показывают широкое разнообразие

микроорганизмов в морях, соленых озерах, гиперсоленых источниках, солнечных солеварнях, солончаках и соляных шахтах [1–4]. Стоит отметить, что значительное число исследований по этому вопросу сосредоточены на анализе микробных сообществ водных экосистем [5, 6], в то время как микроорганизмы гиперсоленых почв, грунтов туннелей соляных шахт и соляных отложений изучены в меньшей степени [7, 8]. Для последних, например, из подземных соляных отложений пермско-триасового возраста, сформировавшихся при осаждении галита и других минералов около 280–240 млн лет назад, были выделены галофильные микроорганизмы и ряд изолятов описан в качестве новых таксонов [9, 10]. Кроме того, при анализе клональных библиотек генов 16S рРНК и результатов высокопроизводительного секвенирования в [1, 11, 12] было установлено высокое таксономическое разнообразие бактерий и галоархей в соляных отложениях. Изучению микробных сообществ таких гиперсоленых экотопов с использованием разных подходов посвящены лишь единичные работы [13, 14].

Особый интерес представляют микроорганизмы из экстремально засоленных мест обитания, так как они способны к синтезу метаболитов, внеклеточных ферментов, осмопротекторных соединений, биополимеров (экзополисахаридов и полигидроксиалканоатов) и биосурфактантов, которые имеют важное значение в различных отраслях промышленности [15]. Выделены и охарактеризованы также галофильные бактерии, разлагающие органические загрязнители окружающей среды (нефть и продукты ее переработки, алифатические и ароматические углеводороды). Такие бактерии перспективны для разработки биотехнологий очистки загрязненных почв с высоким уровнем засоления [16].

Цель настоящей работы – исследование бактериального сообщества рассолов, извлеченных в ходе подземного растворения карналлитовых пород из опытно-промышленной скважины Якшинского месторождения солей (Республика Коми).

## 1. Материалы и методы

**1.1. Характеристика района исследований.** Якшинское месторождение калийно-магниевых солей имеет площадь около 200 км<sup>2</sup> и расположено в западной части Верхнепечорского соленосного бассейна (Троицко-Печорский район Республики Коми). Его соленосные отложения относятся к кунгурскому ярусу нижней перми (иреньский горизонт). В разрезе данная соляная толща подразделяется на три зоны: подстилающая каменная соль, калийно-магниевые соли (карналлит, сильвинит) и покровная каменная соль [17]. В настоящее время в районе месторождения ведутся опытно-промышленные работы по извлечению калийно-магниевых солей методом подземного растворения. При этом способе добычи в скважину на необходимую глубину закачивается предварительно подогретый (до 45 °С) растворитель соляных пород. В качестве растворителя используется пригодная для питья вода пожегского терригенного горизонта Якшинского месторождения подземных вод [18]. Полученные концентрированные рассолы извлекают на поверхность для дальнейшей переработки. Ранее было установлено, что органическое вещество данных солей представлено несколькими формами нахождения, в том числе включениями с захваченными бактериями [19], а при изучении минеральной составляющей нерастворимого остатка карналлитовых пород обнаружены неидентифицированные скрученные нитевидные образования, содержащие

до 15% азота и 3% серы [20]. Микробиологические исследования наземных и подземных экотопов на территории Якшинского месторождения калийно-магниевых солей ранее не проводились.

**1.2. Пробоотбор и пробоподготовка.** В качестве материала для исследований были взяты два образца рассолов с хлопьевидными образованиями красно-коричневого цвета, представляющими собой флотат нерастворимого остатка карналлитовых пород. Образцы были отобраны из скважины № 31 Якшинского месторождения (координаты производственной площадки: 1) 61°44'05" с. ш., 56°36'17" в. д.; 2) 61°44'05" с. ш., 56°36'42" в. д.; 3) 61°44'16" с. ш., 56°36'42" в. д.; 4) 61°44'16" с. ш.; 56°36'18" в. д.) в ходе подземного растворения карналлитов на начальном этапе проведения опытно-промышленных работ по извлечению калийно-магниевых солей методом подземного выщелачивания в августе 2019 г. (образец № 3) и в июле 2020 г. (образец № 4). Растворение солей в скважине осуществлялось на глубинах 412.6–416.0 м, где указанный интервал образован переслаиванием пластов карналлитовой породы и каменной соли. В работе также были проведены исследования воды из гидрогеологической скважины № 30Г/1 (61°44'15,5" с. ш., 56°36'31,0" в. д.), используемой для подземного растворения солей (образец № 2).

Образцы рассолов и воды отбирали на выходе из скважин (без контакта с воздушной средой) в стерильные пластиковые бутылки, которые плотно закрывали крышками с фиксирующим кольцом, после чего хранили при температуре около +4 °С.

Анализ катионного состава рассолов из скважины № 31 и воды гидрогеологической скважины проводили методом ICP-MS на масс-спектрометре с индуктивно-связанной плазмой Agilent 7700x (Agilent Technologies, США). При масс-спектрометрическом определении элементов в рассолах использовали метод прямого разбавления для уменьшения загрузки системы ввода и интерфейса солями.

Концентрацию сухого остатка рассола и воды определяли методом гравиметрии. Для этого фарфоровую лабораторную посуду предварительно высушивали до постоянного веса при 150 °С. Отобранную воду или рассол выпаривали до постоянной массы. Вместе с внесением последней части водной пробы добавляли 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Выпаренный сухой остаток высушивали до постоянной массы при 150 °С. Величину сухого составляющего вычисляли по отношению разности массы чашки с сухим содержимым и веса пустой чашки и добавленного Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> к объему взятой пробы воды.

Удельную электрическую проводимость измеряли кондуктометрическим методом с помощью рН-метра Professional Meter PP-20 (Sartorius, Германия).

На момент отбора проб рассол имел рН 7.14 и температуру 28 °С. Количество сухого остатка в нем составляло 109.3 г/дм<sup>3</sup>, значение удельной электрической проводимости – 297.175 мСм/см. В его состав входили преимущественно растворенные соли натрия, калия и магния (Na<sup>+</sup> 47000 мг/л, K<sup>+</sup> 6600 мг/л, Mg<sup>2+</sup> 2300 мг/л).

Вода из гидрогеологической скважины была по своим показателям пригодной для питьевого водоснабжения [21]. Значения сухого остатка и удельной электрической проводимости составляли 0.19 г/дм<sup>3</sup> и 0.73 мСм/см соответ-

ственно. Вода содержала  $\text{Na}^+$  (23 мг/л),  $\text{K}^+$  (1.5 мг/л),  $\text{Mg}^{2+}$  (13 мг/л). Концентрация хлоридов не превышала 350 мг/л, сульфатов – 500 мг/л [18].

**1.3. Выделение ДНК, ПЦР-амплификация и клонирование генов 16S рРНК.** Тотальную ДНК образцов выделяли с использованием набора реактивов Fast DNA spin kit for soil (MP Biomedicals, Франция). С этой целью из рассолов (образцы № 3 и № 4) брали по 250 мг флотатов карналлитов. Концентрацию выделенной ДНК определяли на приборе Qubit™ Fluorometer (Invitrogen, США) с набором реактивов Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, США).

Амплификацию фрагментов генов 16S рРНК с матрицы полученной суммарной ДНК флотатов проводили с помощью универсальных бактериальных праймеров 27F и 1492R [22]. Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле при напряжении 10 В/см, окрашивали раствором бромистого этидия (5 мкг/мл) и фотографировали в УФ-свете в системе геледокументирования Gel Doc™ XR (Bio-Rad Laboratories, США).

Полученные ПЦР-фрагменты генов 16S рРНК клонировали в клетках *E. coli* JM109 с применением набора реактивов Thermo Scientific InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США). С ДНК-матрицы отобранных рекомбинантных клонов амплифицировали фрагменты генов 16S рРНК с праймерами 27F и 1492R [22]. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов клонированных генов (ПДРФ-анализ) осуществляли с использованием эндонуклеазы рестрикции *HhaI* (Fermentas, Литва).

**1.4. Секвенирование и анализ генов 16S рРНК.** Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов генов 16S рРНК определяли с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям производителя. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали в программах Sequence Scanner v 2.0 и MEGA 6.0 [23]. Поиск гомологичных последовательностей проводили в международных базах данных EzBioCloud [24] и GenBank [25]. Филогенетическое дерево строили методом ближайших соседей (neighbor joining) в программе MEGA 6.0. Статистическую достоверность ветвления (bootstrap-анализ) оценивали на основе 1000 альтернативных деревьев. Длина анализируемых фрагментов генов 16S рРНК составляла 833–964 п.н. Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов генов 16S рРНК размещены в базе данных GenBank под номерами MW047025–MW047046.

**1.5. Выделение чистых культур микроорганизмов.** Чистые культуры микроорганизмов из образцов рассолов и из воды гидрогеологической скважины выделяли методом прямого посева на агаризованную богатую среду Раймонда (БСР), содержащую триптон (5 г/л), дрожжевой экстракт (2.5 г/л), а также NaCl (30 или 100 г/л) и агар (15 г/л) [26]. Культивирование осуществляли в термостате при 28 °С. Для дальнейшего исследования отбирали бактерии, отличающиеся по морфологии колоний при росте на БСР (30 г/л NaCl).

Морфофизиологические признаки и численность выделенных бактерий изучали по общепринятым методикам [27]. Рост бактерий при различной солености

среды оценивали путем культивирования в термостате при 28 °С в течение 7 сут на агаризованной БСР без добавления хлорида натрия и в присутствии NaCl (г/л): 30, 50, 70, 100, 150, 200.

**1.6. Идентификация изолированных бактерий.** ДНК из чистых культур бактерий выделяли общепринятым методом [28]. Бактерии идентифицировали при амплификации гена 16S рРНК с использованием праймеров 27F и 1492R [22], определении и анализе нуклеотидных последовательностей амплифицированных генов (описание см. выше). Поиск гомологичных последовательностей проводили в базе данных EzBioCloud [24]. Нуклеотидные последовательности фрагментов генов 16S рРНК чистых культур бактерий размещены в базе данных GenBank под номерами MW077870–MW077886.

## 2. Результаты

**2.1. Аэробные бактерии, выделенные из рассола.** Бактерии выделяли методом прямого высева на агаризованную БСР, содержащую 30 и 100 г/л NaCl, из образцов рассола с нерастворимым остатком калийно-магниевых солей. Численность культивируемых бактерий в рассоле не превышала  $10^3$  клеток/мл. Всего было получено и отобрано для дальнейшего изучения 10 бактериальных культур, которые отличались по морфологии колоний при росте на агаризованной БСР (табл. 1).

Идентификация изолятов путем секвенирования и анализа фрагментов генов 16S рРНК, показала, что выделенные бактериальные штаммы являлись представителями классов *Gamma*proteobacteria (из родов *Idiomarina*, *Halomonas*, *Marinobacter*) и *Actinomycetia* (из рода *Dietzia*) (табл. 1). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в исследуемых рассолах присутствовали бактерии, наиболее филогенетически близкие типовому штамму *Idiomarina ramblicola* R22<sup>T</sup>, изолированному из гиперсоленой воды в Испании [29]. Кроме того, были обнаружены галофильные бактерии семейства *Halomonodaceae*, близкородственные нескольким видам рода *Halomonas*: *H. sulfidaeris*, *H. alkaliantarctica*, *H. venusta*, *H. alkaliphila* и *H. glaciei* (табл. 1).

Из образца № 3 также изолирована галофильная бактерия, имеющая 100%-ное сходство (по гену 16S рРНК) с типовым штаммом вида *Marinobacter guineae* [30]. Штамм *M. guineae* МЗВ<sup>T</sup> из морских отложений Антарктики является психротолерантным организмом, способным к росту в присутствии 10–150 г/л NaCl и при температуре 4–42 °С. Выделенный нами штамм *Marinobacter* sp. УМ15 демонстрирует рост при аналогичных условиях.

Два бактериальных штамма из образцов рассола оказались близкородственными представителям рода *Dietzia* (табл. 1). Штамм УМ18 имел 100%-ное сходство по гену 16S рРНК с психрофильным штаммом *Dietzia psychralcaliphila* ПЛА-1<sup>T</sup> (JCM 10987<sup>T</sup>), изолированным из сточных вод рыбоперерабатывающего предприятия в Японии и способным эффективно расти на ароматическом субстрате – бензойной кислоте [31].

Табл. 1

Идентификация изолированных бактерий на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК

Штамм, образец	Типовой штамм ближайшего вида (номер в GenBank)	Сходство, %
Рассол с флотиремым нерастворимым остатком		
<i>Gammaproteobacteria</i> (семейство <i>Idiomarinaceae</i> )		
YM7, № 3	<i>Idiomarina ramblicola</i> R22 <sup>T</sup> (PIQC01000012)	99.27
YM13, № 4	<i>Idiomarina ramblicola</i> R22 <sup>T</sup> (PIQC01000012)	99.35
<i>Gammaproteobacteria</i> (семейство <i>Halomonadaceae</i> )		
YM8, № 3	<i>Halomonas sulfidaeris</i> ATCC BAA-803 <sup>T</sup> (AF212204)	99.56
YM11*, № 3	<i>Halomonas alkaliantarctica</i> CRSS <sup>T</sup> (AJ564880)	99.56
YM12*, № 3	<i>Halomonas venusta</i> DSM 4743 <sup>T</sup> (AJ306894)	99.35
	<i>Halomonas alkaliphila</i> 18bAG <sup>T</sup> (AJ640133)	
YM14, № 4	<i>Halomonas alkaliantarctica</i> CRSS <sup>T</sup> (AJ564880)	100
YM17*, № 4	<i>Halomonas glaciei</i> DD 39 <sup>T</sup> (AJ431369)	99.89
<i>Gammaproteobacteria</i> (семейство <i>Alteromonadaceae</i> )		
YM15, № 4	<i>Marinobacter guineae</i> M3B <sup>T</sup> (AM503093)	100
<i>Actinomycetia</i> (семейство <i>Dietziaceae</i> )		
YM18, № 3	<i>Dietzia psychralcaliphila</i> JCM 10987 <sup>T</sup> (AB159036)	100
YM9, № 3	<i>Dietzia maris</i> DSM 43672 <sup>T</sup> (X79290)	99.89
	<i>Dietzia kunjomensis</i> subsp. <i>kunjomensis</i> DSM 44907 <sup>T</sup> (RAQB01000007)	
Гидрогеологическая скважина		
<i>Actinomycetia</i> (семейство <i>Propionibacteriaceae</i> )		
VS19, № 2	<i>Naumannella halotolerans</i> WS4616 <sup>T</sup> (FR832425)	94.71
<i>Actinomycetia</i> (семейство <i>Mycobacteriaceae</i> )		
VS21, № 2	<i>Mycolicibacterium frederiksbergense</i> DSM 44346 <sup>T</sup> (AJ276274)	100
<i>Actinomycetia</i> (семейство <i>Gordoniaceae</i> )		
VS23, № 2	<i>Williamsia muralis</i> DSM 44343 <sup>T</sup> (RBKV01000001)	100

Большинство штаммов выделены на агаризованной БСР с содержанием 30 г/л NaCl.

\* Штаммы выделены на агаризованной БСР с содержанием 100 г/л NaCl.

Большинство изолятов, представителей класса *Gammaproteobacteria*, сохраняли способность к росту на БСР при содержании NaCl 150 г/л, демонстрируя оптимальный рост в пределах солевой амплитуды 30–50 г/л. Несколько штаммов семейства *Halomonadaceae* (штаммы *Halomonas* spp. YM11, YM12, YM17) были выделены на среде, содержащей 100 г/л NaCl, без соли их рост останавливался. Штаммы рода *Dietzia* росли при концентрации NaCl в среде культивирования до 70 г/л с оптимальным ростом в аналогичном предыдущему диапазоне NaCl – от 30 до 50 г/л.

В образце воды из гидрогеологической скважины количество культивируемых бактерий составило менее 10<sup>2</sup> клеток/мл. Полученные единичные чистые культуры из образца воды были идентифицированы на основе гена 16S рРНК как представители филума *Actinobacteria* (семейство *Propionibacteriaceae*, род *Naumannella*; семейство *Mycobacteriaceae*, род *Mycolicibacterium*; семейство *Gordoniaceae*, род *Williamsia*) (табл. 1). Все штаммы были выделены на среде

с содержанием 30 г/л NaCl, но не 100 г/л, и демонстрировали рост на БСР без соли и при содержании соли до 70 г/л.

**2.2. Филогенетическое разнообразие бактериального сообщества рассола.** Состав бактериального сообщества флотируемой части нерастворимого остатка рассолов установлен путем клонирования фрагментов генов 16S рРНК, амплифицированных с матрицы тотальной ДНК флотата. В результате клонирования в клетках *E. coli* получено 153 рекомбинантных клон, содержащих фрагменты генов 16S рРНК. Для выявления сходства и различий между клонированными фрагментами был проведен ПДРФ-анализ с использованием эндонуклеазы рестрикции *HhaI*, результаты которого показали, что рестриционный профиль клонированных участков ДНК отличался размером и числом рестриционных фрагментов (данные не приводятся). Всего на основании ПДРФ-анализа было выделено 22 геномогруппы (22 фило типа) клонированных фрагментов генов 16S рРНК. Определена доля клонированных фрагментов генов 16S рРНК всех геномогрупп, идентифицированных с помощью ПДРФ-анализа. Для представителей каждой группы расшифрованы нуклеотидные последовательности и проведен сравнительный анализ с генами 16S рРНК типовых штаммов ближайших видов бактерий [24] и гомологичными последовательностями из базы данных GenBank [25]. На рис. 1 представлена дендрограмма сходства клонированных фрагментов генов 16S рРНК.

Филогенетический анализ клонов показал, что в образцах нерастворимого осадка, извлеченного вместе с рассолом, присутствовали бактерии филумов *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*, доля которых составляла 83% и 17% от общего количества клонов соответственно. Доминирующее положение среди представителей филума *Proteobacteria* занимали бактерии класса *Gamma proteobacteria* (90.55% от всех клонов филума), из них 54.78% клонов были наиболее близки бактериям семейства *Idiomarinaceae* – представителям родов *Idiomarina* и *Pseudidiomarina* (рис. 2).

Близкородственные бактерии рода *Idiomarina* были выявлены в гиперсолевых местообитаниях, в том числе в осадках гиперсолевых озер, глубоких скважинах, соляных пещерах (рис. 1). Клонированные последовательности гена 16S рРНК (клон 120YS) имели 100% сходство с таковой типового галофильного штамма *Pseudidiomarina gelatinasegens* R04H25<sup>T</sup>, выделенного из осадка залива Терра Нова в Антарктиде, а также с последовательностями культивируемых и «некультивируемых» бактерий рода *Pseudidiomarina* из морских экосистем (рис. 1). В образцах рассола также отмечено значительное количество бактерий рода *Marinobacter* (семейство *Alteromonadaceae*) – 42.61% от всех клонов класса *Gamma proteobacteria* (рис. 2, б). Остальные доли фило типов класса *Gamma proteobacteria* (1.74% и 0.87%) оказались представлены бактериями семейства *Piscirickettsiaceae* и рода *Marinimicrobium* (семейство *Cellvibrionaceae*) соответственно (рис. 2, б). Фило типы семейства *Piscirickettsiaceae* имели невысокое сходство с бактериями рода *Methylophaga* (96.86%-ное сходство с типовым штаммом вида *M. nitratreducenticrescens*) и некультивируемыми бактериями морских местообитаний (рис. 1).

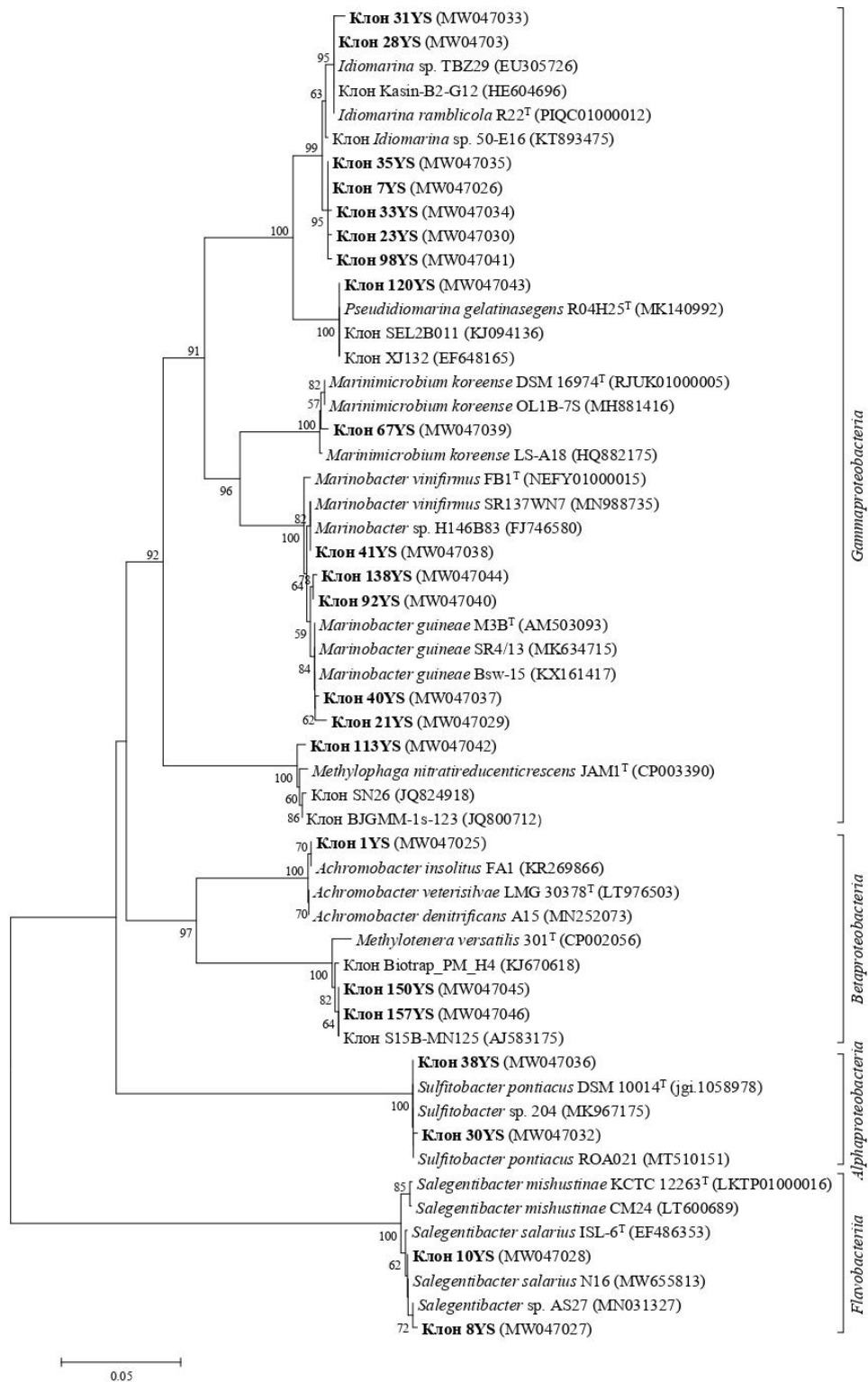


Рис. 1. Положение исследуемых клонов на филогенетическом дереве, построенном на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК. В скобках указаны номера в базе данных GenBank



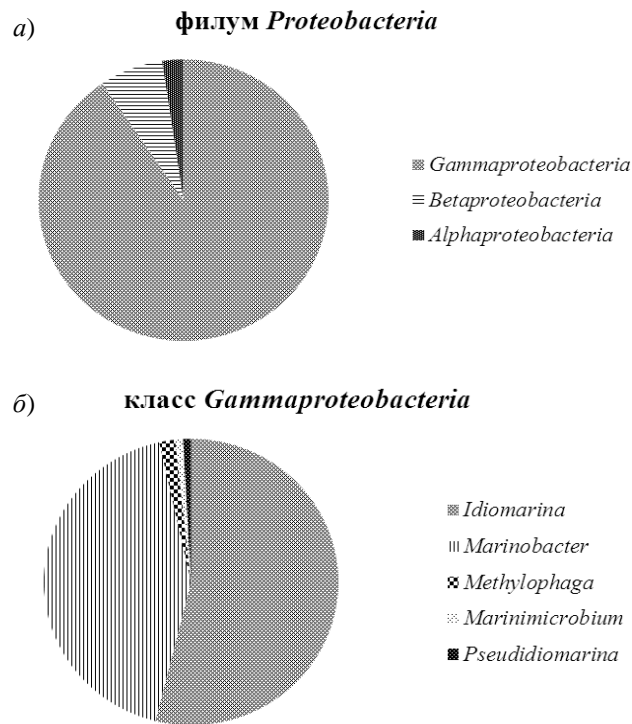


Рис. 2. Таксономическая структура представителей филума *Proteobacteria* (а) и класса *Gamma*proteobacteria (б) в образцах флотированного осадка рассола из скважины Якшинского месторождения

В ходе анализа генов 16S рРНК обнаружено, что исследуемые образцы содержали бактерии класса *Beta*proteobacteria (7.09% от всех клонов филума *Proteobacteria*), близкородственные бактериям рода *Methylophaga* (семейство *Methylophilaceae*) и рода *Achromobacter* (семейство *Alcaligenaceae*). Доля этих фило типов составила 88.89% и 11.11% (от общего количества клонов класса *Beta*proteobacteria) соответственно. Филотипы *Beta*proteobacteria имели наибольшее сходство с бактериями из грунтовых вод, стоков, осадков и почв, загрязненных тяжелыми металлами, ароматическими углеводородами, нефтью (рис. 1). Представители семейства *Methylophilaceae* (клоны 150YS, 157YS) филогенетически близки (на уровне 99.89–99.55%) с некультивируемыми бактериями и имеют невысокое сходство по гену 16S рРНК (около 98%) с *Methylophaga versatilis* 301<sup>T</sup> (рис. 1).

Кроме того, в образцах рассола зарегистрированы представители класса *Alpha*proteobacteria (близкородственные бактериям семейства *Rhodobacteraceae*) в незначительном количестве – 2.36% от общего числа клонов филума *Proteobacteria* (рис. 2, а). Их фило типы (клоны 30YS, 38YS) наиболее близки бактериям рода *Sulfitobacter* из морских вод и отложений (рис. 1).

Представители филума *Bacteroidetes* демонстрировали наибольшее сходство с бактериями рода *Salegentibacter* (семейство *Flavobacteriaceae*, класс *Flavobacteriia*) (рис. 1). Клоны 8YS и 10YS располагались ближе всего (уровень сходства 98.58 и 99.77% соответственно) к типовому штамму вида *Salegentibacter salarii*

из морской солнечной солеварни в Корее (рис. 1). Филотипы *Bacteroidetes* аналогично проявляли наибольшее родство с другими представителями рода *Salegentibacter*, выделенными из различных морских экосистем, в том числе морских отложений, солеварен, гидротермальных источников (рис. 1). Бактерии рода *Salegentibacter* также были получены из древних соляных отложений в Китае [32].

### 3. Обсуждение

Впервые изучено разнообразие бактерий в залежах солей Якшинского месторождения Верхнепечорского соленосного бассейна (Республика Коми, Россия). Сочетанное применение культуральных и молекулярных методов (клонирования и анализа гена 16S рРНК) показало, что в микробном сообществе рассолов, образовавшихся в ходе растворения карналлитовой породы соленосной толщи, доминируют галофильные бактерии, типичные представители морских местообитаний (табл. 1, рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют о преобладании гамма-протеобактерий рода *Idiomarina*, которые были выделены нами в чистую культуру и выявлены молекулярно-генетическими методами. Следует отметить, что представители рода *Idiomarina*, в основном из морских сред обитания, также были обнаружены в наземных/подземных экосистемах (солнечных солеварнях, рассолах, соляных шахтах), в том числе в районе солеразработок Верхнекамского месторождения (Верхнекамского соленосного бассейна) [33] и в древних соляных отложениях в провинции Юньнань Китая [32]. Поскольку соленосная толща Верхнепечорского бассейна сформировалась около 280 млн лет назад [17], нельзя исключать вероятность того, что бактерии рода *Idiomarina* в исследуемых нами образцах являются представителями древней микрофлоры.

В образцах рассола идентифицированы и другие галофильные микроорганизмы – бактерии рода *Marinobacter* класса *Gammaproteobacteria*, которые были выделены в чистую культуру (табл. 1), а также выявлены молекулярными методами (рис. 1). Из рассола были изолированы единичные колонии грамотрицательных бактерий, относящихся к галофильным бактериям рода *Halomonas* (класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Halomonadaceae*), близкородственных нескольким видам (табл. 1). Галомонады – типичные обитатели морей, засоленных водоемов, наземных и подземных экосистем [2]. Представители рода *Halomonas* также были получены из древних отложений солей в разных географически удаленных районах [8, 26, 32]. Примечательно, что галофильные бактерии, в связи с их адаптационным потенциалом к выживанию и росту в условиях высокой солености среды, вызывают все больший интерес как биотехнологические агенты, в том числе как продуценты осмопротекторных соединений, а также гидролитических, протеолитических ферментов [34]. Дальнейшее изучение метаболического потенциала изолированных галофильных бактерий является перспективным направлением будущих исследований.

Данные о разнообразии культивируемых бактерий рассола были дополнены результатами, полученными молекулярными методами. При клонировании генов 16S рРНК из тотальной ДНК нерастворимой части рассола выявлены бактерии двух филумов: *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*. Кроме гаммапротеобактерий рода *Idiomarina* и рода *Marinobacter*, представители которых выделены в чистую культуру, были обнаружены филотипы, близкородственные галотолерантным

бактериям рода *Marinimicrobium* (семейство *Cellvibrionaceae*), ранее регистрировавшимся в морях, морских солнечных солеварнях, соляных пещерах (рис. 1). Обращает на себя внимание присутствие в соляной толще метилотрофных бактерий, близкородственных представителям семейства *Piscirickettsiaceae*, имеющим невысокое сходство (96.86%) с типовым штаммом вида *Methylophaga nitratireducentirescens*, и метилотрофов класса *Betaproteobacteria*, близкородственных бактериям семейства *Methylophilaceae* (рис. 1). Известно, что представители вышеперечисленных семейств являются основными участниками круговорота C1-соединений в окружающей среде [35, 36]. Исследование биоразнообразия, особенностей экофизиологии и метаболизма аэробных метилотрофов имеет большое значение в связи с перспективностью их использования в биотехнологических целях [37].

В образцах рассола обнаружены и другие типичные представители морских экосистем рода *Sulfitobacter* (класс *Alphaproteobacteria*, филум *Proteobacteria*) и рода *Salegentibacter* (класс *Flavobacteria*, филум *Bacteroidetes*) (рис. 1). Известно, что сульфитобактерии принимают активное участие в круговороте органической серы в морских экосистемах [38]. Бактерии рода *Salegentibacter* в породах солей найдены впервые. В то же время имеются сведения о бактериях, близкородственных представителям рода *Salegentibacter*, из древних соляных отложений [32].

Таким образом, в результате наших исследований было показано, что в нижнепермских соленосных отложениях Якшинского месторождения присутствуют галофильные и галотолерантные бактерии различных таксонов, представители которых в основном являются типичными обитателями морских экосистем. Кроме того, полученные данные указывают на наличие в рассолах месторождения «некультивируемых» бактерий, которые могут представлять новые таксоны. Изучение разнообразия микроорганизмов в соляной толще месторождения планируется продолжить.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность ООО «Полярноуралгеология» за предоставленные образцы, а также ЦКП ИГ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН за исследование химического состава рассолов и нерастворимого остатка карналлита.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы: 121112500044-9.

#### Литература

1. Payler S.J., Biddle J.F., Sherwood Lollar B., Fox-Powell M.G., Edwards T., Ngwenya B.T., Paling S.M., Cockell C.S. An ionic limit to life in the deep subsurface // *Front. Microbiol.* – 2019. – V. 10. – Art. 426, P. 1–15. – doi: 10.3389/fmicb.2019.00426.
2. Ventosa A., de la Haba R.R., Sánchez-Porro C., Thane Papke R. Microbial diversity of hypersaline environments: A metagenomic approach // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2015. – V. 25. – P. 80–87. – doi: 10.1016/j.mib.2015.05.002.
3. Çınar S., Mutlu M.B. Comparative analysis of prokaryotic diversity in solar salterns in eastern Anatolia (Turkey) // *Extremophiles.* – 2016. – V. 20. – P. 589–601. – doi: 10.1007/s00792-016-0845-7.

4. Han R., Zhang X., Liu J., Long Q.F., Chen L., Liu D.L., Zhu D. Microbial community structure and diversity within hypersaline Keke salt lake environments // *Can. J. Microbiol.* – 2017. – V. 63, No 11. – P. 895–908. – doi: 10.1139/cjm-2016-0773.
5. Oren A. *Halophilic Microorganisms and Their Environments (Cellular Origin and Life in Extreme Habitats)*. – N. Y., Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Acad. Publ., 2002. – 575 p.
6. Ramos-Barbero M.D., Martínez J.M., Almansa C., Rodríguez N., Villamor J., Gomariz M., Escudero C., dC Rubin S., Antón J., Martínez-García M., Amils R. Prokaryotic and viral community structure in the singular chaotropic salt lake Salar de Uyuni // *Environ. Microbiol.* – 2019. – V. 21, No 6. – P. 2029–2042. – doi: 10.1111/1462-2920.14549.
7. Caton I.R., Schneegurt M.A. Culture-independent analysis of the soil bacterial assemblage at the Great Salt Plains of Oklahoma // *J. Basic Microbiol.* – 2012. – V. 52, No 1. – P. 16–26. – doi: 10.1002/jobm.201100175.
8. Megaw J., Kelly S.A., Thompson T.P., Skvortsov T., Gilmore B.F. Profiling the microbial community of a Triassic halite deposit in Northern Ireland: An environment with significant potential for biodiscovery // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2019. – V. 366, No 22. – Art. fnz242, P. 1–11. – doi: 10.1093/femsle/fnz242.
9. Gruber C., Legat A., Pfaffenhuemer M., Radax C., Weidler G., Busse H.-J., Stan-Lotter H. *Halobacterium noricense* sp. nov., an archaeal isolate from a bore core of an alpine Permian salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emended description of *H. salinarum* // *Extremophiles*. – 2004. – V. 8. – P. 431–439. – doi: 10.1007/s00792-004-0403-6.
10. Jaakkola S.T., Ravantti J.J., Oksanen H.M., Bamford D.H. Buried alive: Microbes from ancient halite // *Trends Microbiol.* – 2016. – V. 24, No 2. – P. 148–160. – doi: 10.1016/j.tim.2015.12.002.
11. Radax C., Gruber C., Stan-Lotter H. Novel haloarchaeal 16S rRNA gene sequences from Alpine Permo-Triassic rock salt // *Extremophiles*. – 2001. – V. 5, No 4. – P. 221–228. – doi: 10.1007/s007920100192.
12. Fish S.A., Shepherd T.J., McGenity T.J., Grant W.D. Recovery of 16S ribosomal RNA gene fragments from ancient halite // *Nature*. – 2002. – V. 417. – P. 432–436. – doi: 10.1038/417432a.
13. Chen S., Xu Y., Helfant L. Geographical isolation, buried depth, and physicochemical traits drive the variation of species diversity and prokaryotic community in three typical hypersaline environments // *Microorganisms*. – 2020. – V. 8, No 1. – Art. 120, P. 1–14. – doi: 10.3390/microorganisms8010120.
14. Cycil L.M., DasSarma S., Pecher W., McDonald R., AbdulSalam M., Hasan F. Metagenomic insights into the diversity of halophilic microorganisms indigenous to the Karak salt mine, Pakistan // *Front. Microbiol.* – 2020. – V. 11. – Art. 1567, P. 1–14. – doi: 10.3389/fmicb.2020.01567.
15. Yin J., Chen J.-Ch., Wu Q., Chen G.-Q. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology // *Biotechnol. Adv.* – 2015. – V. 33, No 7. – P. 1433–1442. – doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.008.
16. Edbeib M.F., Wahab R.A., Huyop F. Halophiles: Biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – V. 32. – Art. 135, P. 1–23. – doi: 10.1007/s11274-016-2081-9.
17. Иванов А.А., Воронова М.Л. Галогенные формации (минеральный состав, типы и условия образования, методы поисков и разведки месторождений минеральных солей). – М.: Недра, 1972. – 328 с.

18. Липицкая В.Ф., Тихомиров Н.С. Разведка подземных вод для организации технологического водоснабжения опытно-промышленных работ на Якшинском месторождении минеральных (калийно-магниевых) солей (по состоянию на 01.02.2016 г.). Лицензия СЫК 02512 ТЭ. Договор № ВД-ОТЧ. ТКЗ № 16-16/ПК: Геол. отчёт. – Сыктывкар, 2016. – 239 с.
19. Шанина С.Н., Галамай А.Р., Игнатович О.О., Бурдельная Н.С., Валяева О.В. Органическое вещество соляной толщи южной части Якшинского месторождения калийно-магниевых солей // Геохимия. – 2018. – № 7. – С. 693–708. – doi: 10.1134/S0016752518070117.
20. Шанина С.Н., Игнатович О.О., Тропников Е.М., Шуйский А.С. Нитевидные микроорганизмы(?) в рассолах калийно-магниевых солей Якшинского месторождения // Современные проблемы теоретической, экспериментальной и прикладной минералогии (Юшкинские чтения – 2020): Материалы Рос. конф. с междунар. участием. – Сыктывкар, 2020. – С. 155–156.
21. СанПиН 2.1.4.1074-01. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению безопасности систем горячего водоснабжения. – М., 2002. – 103 с.
22. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics / Ed. by E. Stackebrandt, M. Goodfellow. – N. Y.: John Wiley & Sons, 1991. – P. 115–175.
23. Molecular Evolutionary Genetics Analysis. – URL: <http://www.megasoftware.net>, свободный.
24. EzBioCloud Database. – URL: <http://www.ezbiocloud.net>.
25. The National Center for Biotechnology Information. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, свободный.
26. Корсакова Е.С., Ананьина Л.Н., Назаров А.В., Бачурин Б.А., Плотникова Е.Г. Разнообразие бактерий семейства *Halomonadaceae* района разработок Верхнекамского месторождения солей // Микробиология. – 2013. – Т. 82, № 2. – С. 247–250. – doi: 10.7868/S0026365613020079.
27. Методы общей бактериологии: в 3 т. / Под ред. Ф. Герхардта и др.; пер. с англ. – М.: Мир, 1983–1984.
28. Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. / Ed. by F.M. Ausbel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl – N. Y.: John Wiley & Sons, 1995. – xxxii + 700 p.
29. Martínez-Cánovas M.J., Béjar V., Martínez-Checa F., Páez R., Quesada E. *Idiomarina fontislapidosi* sp. nov. and *Idiomarina ramblicola* sp. nov., isolated from inland hypersaline habitats in Spain // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – V. 54, Pt. 5. – P. 1793–1797. – doi: 10.1099/ijs.0.63172-0.
30. Montes M.J., Bozal N., Mercadé E. *Marinobacter guineae* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium from an Antarctic environment // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – V. 58, Pt. 6. – P. 1346–1349. – doi: 10.1099/ijs.0.65298-0.
31. Yumoto I., Nakamura A., Iwata H., Kojima K., Kusumoto K., Nodasaka Y., Matsuyama H. *Dietzia psychrocaliphila* sp. nov., a novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2002. – V. 52, Pt. 1. – P. 85–90. – doi: 10.1099/00207713-52-1-85.
32. Chen Y.-g., Li H.-m., Li Q.-y., Chen W., Cui X.-l. Phylogenetic diversity of culturable bacteria in the ancient salt deposits of the Yipinglang Salt Mine, P. R. China // Wei Sheng Wu Xue Bao. – 2007. – V. 47, No 4. – P. 571–577.

33. Корсакова Е.С. Культивируемые аэробные бактерии из района промышленных разработок Верхнекамского месторождения солей: Автореферат дис. ... канд. биол. наук. – Пермь, 2014. – 27 с.
34. Kumar S., Karan R., Kapoor S., Singh S.P., Khare S.K. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes // Braz. J. Microbiol. – 2012. – V. 43, No 4. – P. 1595–1603. – doi: 10.1590/S1517-838220120004000044.
35. Boden R. Emended description of the genus *Methylophaga* Janvier et al. 1985 // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2012. – V. 62, Pt. 7. – P. 1644–1646. – doi: 10.1099/ijs.0.033639-0.
36. Doronina N., Kaparullina E., Trotsenko Y. The family *Methylophilaceae* // The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria / Ed. by E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thompson. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. – P. 869–880. – doi: 10.1007/978-3-642-30197-1\_243.
37. Троценко Ю.А., Торгонская М.Л. Аэробные метилотрофы – перспективные объекты современной биотехнологии // Журн. Сиб. фед. ун-та. Биология. – 2012. – Т. 5, № 3. – С. 243–279.
38. Sorokin D.Y. *Sulfitobacter pontiacus* gen. nov., sp. nov. – a new heterotrophic bacterium from the Black Sea, specialized on sulfite oxidation // Microbiology. – 1995. – V. 64, No 3. – P. 295–305.

Поступила в редакцию  
05.04.2022

---

**Пьянкова Анна Александровна**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии, соискатель

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН  
ул. Голева, д. 13, г. Пермь, 614081, Россия  
E-mail: [annpjankva@mail.ru](mailto:annpjankva@mail.ru)

**Плотникова Елена Генриховна**, доктор биологических наук, заведующая лабораторией микробиологии техногенных экосистем

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН  
ул. Голева, д. 13, г. Пермь, 614081, Россия  
E-mail: [peg@iegm.ru](mailto:peg@iegm.ru)

**Шанина Светлана Николаевна**, кандидат геолого-минералогических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной минералогии

Институт геологии имени академика Н.П. Юшкина Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ Коми НЦ УрО РАН  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [shanina@geo.komisc.ru](mailto:shanina@geo.komisc.ru)

## ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2022.3.457-474

**Bacterial Community of the Brines Extracted  
during the Underground Dissolution of Potassium-Magnesium Salts  
of the Yakshinskoe Deposit (Komi Republic, Russia)**A.A. Pyankova<sup>a\*</sup>, E.G. Plotnikova<sup>a\*\*</sup>, S.N. Shanina<sup>b\*\*\*</sup><sup>a</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences,  
Perm, 614081 Russia*<sup>b</sup>*Institute of Geology, FRC Komi Scientific Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences,  
Syktyvkar, 167982 Russia*

E-mail: \*peg@iegm.ru, \*\*annpjankva@mail.ru, \*\*\*shanina@geo.komisc.ru

Received April 5, 2022

**Abstract**

This article provides the first description of the bacterial diversity in the Permian rock of the Upper Pechora salt basin. Halophilic and halotolerant bacteria of the classes *Gammaproteobacteria* (from the genera *Halomonas*, *Marinobacter*, and *Idiomarina*) and *Actinomycetia* (from the genus *Dietzia*) were isolated from the brines extracted during the underground dissolution of carnallite rocks in the pilot well of the Yakshinskoe deposit (Komi Republic, Russia) of potassium-magnesium salts. The analysis of 16S rRNA gene sequences cloned from the total DNA of the floatable part of the insoluble brine residues revealed the following bacterial classes: *Gammaproteobacteria* (closely related to the genera *Idiomarina*, *Marinimicrobium*, *Marinobacter*, *Methylophaga*, and *Pseudidiomarina*), *Betaproteobacteria* (phenologically similar to the genera *Achromobacter* and *Methylotenera*), as well as *Alphaproteobacteria* and *Flavobacteriia* (related to the genera *Sulfitobacter* and *Salagentibacter*, respectively). Several identified phylotypes (clones 113YS, 8YS, 150YS, and 157YS) had a low level of similarity with the closest type strains of the genera *Methylophaga* (*M. nitratireducenticrescens* JAM1<sup>T</sup>, 96.86%), *Salagentibacter* (*S. salarius* ISL-6<sup>T</sup>, 98.58%), and *Methylotenera* (*M. versatilis* 301<sup>T</sup>, 98.05% and 98.19%). This indicates that the brine samples contained new, previously undescribed, bacterial taxa. The results obtained define and shape the future prospects for studying the phylogenetic and functional diversity of microorganisms in the salt strata of the Yakshinskoe deposit.

**Keywords:** potassium-magnesium salt deposit, halophilic bacteria, 16S rRNA genes, cloning, sequencing

**Acknowledgements.** The samples were kindly provided by the Polyarnouralgeologiya Company. The chemical composition of the brines and the insoluble residue of carnallite was determined with the help of the Institute of Geology, FRC Komi Scientific Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences.

The study was performed as part of state assignment no. 121112500044-9.

**Figure Captions**

Fig. 1. Phylogenetic tree of the studied clones based on the comparative analysis of 16S rRNA gene sequences. GenBank accession numbers are given in brackets.

Fig. 2. Taxonomic structure of the phylum *Proteobacteria* (a) and the class *Gammaproteobacteria* (b) in the floatable part of the brine residue sampled from the salt well of the Yakshinskoe deposit.

## References

1. Payler S.J., Biddle J.F., Sherwood Lollar B., Fox-Powell M.G., Edwards T., Ngwenya B.T., Paling S.M., Cockell C.S. An ionic limit to life in the deep subsurface. *Front. Microbiol.*, 2019, vol. 10, art. 426, pp. 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2019.00426.
2. Ventosa A., de la Haba R.R., Sánchez-Porro C., Thane Papke R. Microbial diversity of hypersaline environments: A metagenomic approach. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2015, vol. 25, pp. 80–87. doi: 10.1016/j.mib.2015.05.002.
3. Çınar S., Mutlu M.B. Comparative analysis of prokaryotic diversity in solar salterns in eastern Anatolia (Turkey). *Extremophiles*, 2016, vol. 20, pp. 589–601. doi: 10.1007/s00792-016-0845-7.
4. Han R., Zhang X., Liu J., Long Q.F., Chen L., Liu D.L., Zhu D. Microbial community structure and diversity within hypersaline Keke salt lake environments. *Can. J. Microbiol.*, 2017, vol. 63, no. 11, pp. 895–908. doi: 10.1139/cjm-2016-0773.
5. Oren A. *Halophilic Microorganisms and Their Environments (Cellular Origin and Life in Extreme Habitats)*. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, Kluwer Acad. Publ., 2002. 575 p.
6. Ramos-Barbero M.D., Martínez J.M., Almansa C., Rodríguez N., Villamor J., Gomariz M., Escudero C., dC Rubin S., Antón J., Martínez-García M., Amils R. Prokaryotic and viral community structure in the singular chaotrophic salt lake Salar de Uyuni. *Environ. Microbiol.*, 2019, vol. 21, no. 6, pp. 2029–2042. doi: 10.1111/1462-2920.14549.
7. Caton I.R., Schneegurt M.A. Culture-independent analysis of the soil bacterial assemblage at the Great Salt Plains of Oklahoma. *J. Basic Microbiol.*, 2012, vol. 52, no. 1, pp. 16–26. doi: 10.1002/jobm.201100175.
8. Megaw J., Kelly S.A., Thompson T.P., Skvortsov T., Gilmore B.F. Profiling the microbial community of a Triassic halite deposit in Northern Ireland: An environment with significant potential for biodiscovery. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2019, vol. 366, no. 22, art. fnz242, pp. 1–11. doi: 10.1093/femsle/fnz242.
9. Gruber C., Legat A., Pfaffenhuemer M., Radax C., Weidler G., Busse H.-J., Stan-Lotter H. *Halobacterium noricense* sp. nov., an archaeal isolate from a bore core of an alpine Permian salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emended description of *H. salinarum*. *Extremophiles*, 2004, vol. 8, pp. 431–439. doi: 10.1007/s00792-004-0403-6.
10. Jaakkola S.T., Ravantti J.J., Oksanen H.M., Bamford D.H. Buried alive: Microbes from ancient halite. *Trends Microbiol.*, 2016, vol. 24, no. 2, pp. 148–160. doi: 10.1016/j.tim.2015.12.002.
11. Radax C., Gruber C., Stan-Lotter H. Novel haloarchaeal 16S rRNA gene sequences from Alpine Permian-Triassic rock salt. *Extremophiles*, 2001, vol. 5, no. 12, pp. 221–228. doi: 10.1007/s007920100192.
12. Fish S.A., Shepherd T.J., McGenity T.J., Grant W.D. Recovery of 16S ribosomal RNA gene fragments from ancient halite. *Nature*, 2002, vol. 417, pp. 432–436. doi: 10.1038/417432a.
13. Chen S., Xu Y., Helfant L. Geographical isolation, buried depth, and physicochemical traits drive the variation of species diversity and prokaryotic community in three typical hypersaline environments. *Microorganisms*, 2020, vol. 8, no. 1, art. 120, pp. 1–14. doi: 10.3390/microorganisms8010120.
14. Cycil L.M., DasSarma S., Pecher W., McDonald R., AbdulSalam M., Hasan F. Metagenomic insights into the diversity of halophilic microorganisms indigenous to the Karak salt mine, Pakistan. *Front. Microbiol.*, 2020, vol. 11, art. 1567, pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2020.01567.
15. Yin J., Chen J.-Ch., Wu Q., Chen G.-Q. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnol. Adv.*, 2015, vol. 33, no. 7, pp. 1433–1442. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.008.
16. Edbeib M.F., Wahab R.A., Huyop F. Halophiles: Biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, vol. 32, art. 135, pp. 1–23. doi: 10.1007/s11274-016-2081-9.
17. Ivanov A.A., Voronova M.L. *Galogennye formatsii (mineral'nyi sostav, tipy i usloviya obrazovaniya, metody poiskov i razvedki mestorozhdenii mineral'nykh solei [Halogen Formations (Mineral Composition, Types and Conditions of Formation, Prospecting and Exploration of Mineral Salt Deposits)]*. Moscow, Nedra, 1972. 328 p. (In Russian)



18. Lapitskaya V.F., Tikhomirov N.S. Exploration of groundwater for process water supply of pilot work at the Yakshinskoe deposit of mineral (potassium-magnesium) salts (as of February 1, 2016). License SYK 02512 TE. Agreement no. VD-OTCh. TRC no. 16-16/RK. Exploration Report. Syktyvkar, 2016. 239 p. (In Russian)
19. Shanina S.N., Galamay A.R., Ignatovich O.O., Burdelnaya N.S., Valyaeva O.V. Organic matter of the salt sequence in the southern part of the Yakshinskoe potassium-magnesium salt deposit. *Geochem. Int.*, 2018, vol. 56, no. 7, pp. 719–734. doi: 10.1134/S0016702918070108.
20. Shanina S.N., Ignatovich O.O., Tropnikov E.M., Shuiskii A.S. Filamentous microorganisms (?) in the brines of potassium-magnesium salts of the Yakshinskoe deposit. *Sovremennye problemy teoreticheskoi, eksperimental'noi i prikladnoi mineralogii (Yushkinskie chteniya – 2020): materialy rossiiskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem* [Modern Problems of Theoretical, Experimental, and Applied Mineralogy (Yushkin Lectures – 2020): Proc. Russ. Conf. Int. Participation]. Syktyvkar, 2020, pp. 155–156. (In Russian)
21. Sanitary Rules and Norms 2.1.4.1074-01. Drinking water. Hygienic requirements for water quality of centralized drinking water supply systems. Quality control. Hygienic requirements for ensuring the safety of hot water supply systems. Moscow, 2002. 103 p. (In Russian)
22. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (Eds.) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. New York, John Wiley & Sons, 1991, pp. 115–175.
23. Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Available at: <http://www.megasoftware.net>.
24. EzBioCloud Database. Available at: <http://www.ezbiocloud.net>.
25. The National Center for Biotechnology Information. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
26. Korsakova E.S., Anan'ina L.N., Nazarov A.V., Bachurin B.A., Plotnikova E.G., Diversity of bacteria of the family *Halomonadaceae* at the mining area of the Verkhnekamsk salt deposit. *Microbiology*, 2013, vol. 82, no. 2, pp. 249–252. doi: 10.1134/S0026261713020070.
27. *Metody obshchei bakteriologii* [Manual of Methods for General Bacteriology]. Gerhardt Ph. et al. (Eds.). Vol. 1–3. Moscow, Mir, 1983–1984. (In Russian)
28. Ausbel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (Eds.) *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*. New York, John Wiley & Sons, 1995. xxxii + 700 p.
29. Martínez-Cánovas M.J., Béjar V., Martínez-Checa F., Páez R., Quesada E. *Idiomarina fontislapidosi* sp. nov. and *Idiomarina ramblicola* sp. nov., isolated from inland hypersaline habitats in Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, vol. 54, pt. 5, pp. 1793–1797. doi: 10.1099/ijs.0.63172-0.
30. Montes M.J., Bozal N., Mercadé E. *Marinobacter guineae* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium from an Antarctic environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2008, vol. 58, pt. 6, pp. 1346–1349. doi: 10.1099/ijs.0.65298-0.
31. Yumoto I., Nakamura A., Iwata H., Kojima K., Kusumoto K., Nodasaka Y., Matsuyama H. *Dietzia psychralcaliphila* sp. nov., a novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, vol. 52, pt. 1, pp. 85–90. doi: 10.1099/00207713-52-1-85.
32. Chen Y.-g., Li H.-m., Li Q.-y., Chen W., Cui X.-l. Phylogenetic diversity of culturable bacteria in the ancient salt deposits of the Yipinglang Salt Mine, P. R. China. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2007, vol. 47, no. 4, pp. 571–577.
33. Korsakova E.S. Cultivated aerobic bacteria from the area of industrial development of the Upper Kama salt deposit. *Extended Abstract of Cand. Biol. Sci. Diss.* Perm, 2014. 27 p. (In Russian)
34. Kumar S., Karan R., Kapoor S., Singh S.P., Khare S.K. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Braz. J. Microbiol.*, 2012, vol. 43, no. 4, pp. 1595–1603. doi: 10.1590/S1517-838220120004000044.
35. Boden R. Emended description of the genus *Methylophaga* Janvier et al. 1985. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2012, vol. 62, pt. 7, pp. 1644–1646. doi: 10.1099/ijs.0.033639-0.
36. Doronina N., Kaparullina E., Trotsenko Y. The family *Methylophilaceae*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (Eds.) *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Berlin, Heidelberg, Springer, 2014, pp. 869–880. doi: 10.1007/978-3-642-30197-1\_243.
37. Trotsenko Yu.A., Torgonskaya M.L. Aerobic methylotrophs as promising objects of modern biotechnology. *Zh. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 2012, vol. 5, no. 3, pp. 243–279. (In Russian)

38. Sorokin D.Y. *Sulfitobacter pontiacus* gen. nov., sp. nov. – a new heterotrophic bacterium from the black sea, specialized on sulfite oxidation. *Microbiology*, 1995, vol. 64, no. 3, pp. 295–305.

**Для цитирования:** Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г., Шанина С.Н. Бактериальное сообщество рассолов, извлекаемых при подземном растворении калийно-магниевых солей Якшинского месторождения (Республика Коми) // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2022. – Т. 164, кн. 3. – С. 457–474. – doi: 10.26907/2542-064X.2022.3.457-474.

**For citation:** Pyankova A.A., Plotnikova E.G., Shanina S.N. Bacterial community of the brines extracted during the underground dissolution of potassium-magnesium salts of the Yakshinskoe deposit (Komi Republic, Russia). *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2022, vol. 164, no. 3, pp. 457–474. doi: 10.26907/2542-064X.2022.3.457-474. (In Russian)