

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ЕСТЕСТВЕННЫЙ
БИОКОНТРОЛЬ ПОПУЛЯЦИЙ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА
AMP1-ПОДОБНЫМИ БАКТЕРИОФАГАМИ В АГРОЭКОСИСТЕМАХ

© 2022 г. А. В. Летаров^{a, b, *}, М. А. Летарова^{a, b}, Н. Лазар Адлер^d, Е. Е. Куликов^a,
М. Клоки^d, А. Ю. Морозов^{c, d}, Э. Е. Галев^d

^aИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

^bБиологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^cИнститут проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, 119071 Россия

^dУниверситет Лестера, Лестер, Великобритания

*e-mail: letarov@gmail.com

Поступила в редакцию 03.11.2021 г.

После доработки 11.11.2021 г.

Принята к публикации 12.11.2021 г.

Возбудитель мелиоидоза, *Burkholderia pseudomallei*, а также близкородственные непатогенные бактерии комплекса видов *B. pseudomallei/thailandensis* встречаются в почвах и водоемах эндемичных по мелиоидозу районов, создавая существенные биологические риски для работников сельского хозяйства соответствующих регионов. Бактериофаги, родственные фагу phiBp-AMP1, являются наиболее распространенной известной группой вирусов *B. pseudomallei/thailandensis*. Взаимодействие этих бактериофагов с их хозяевами может быть ключевым фактором контроля популяции *B. pseudomallei*, определяющим особенности динамики заражения людей мелиоидозом. В этом исследовании показано, что часто используемые гербициды (параquat, атразин, 2,4-Д, аметрин), а также двухлористая медь не оказывают существенного влияния на стабильность и инфекционность фага AMP1, при этом соли железа(II), используемые как удобрения, инактивируют фаг даже в концентрациях порядка 0.1 мМ. Кроме того, концентрация хлорида натрия имеет критическое значение для инфекционности фага AMP1, как в отношении *B. thailandensis*, так и отношении патогена *B. pseudomallei*. При содержании этой соли в растворе менее 3 г/л фаги перестают инфицировать клетки хозяев. Засоленность почв, таким образом, может обуславливать мозаичный характер динамики популяций *B. pseudomallei* в пределах ряда эндемичных регионов, таких как северо-восточный Таиланд.

Ключевые слова: бактериофаги, мелиоидоз, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, биоконтроль бактериальных популяций, гербициды, засоленность почв

DOI: 10.31857/S0026365622020100

Бактериофаги являются наиболее распространенной и многочисленной группой вирусов в биосфере Земли. Они обнаруживаются практически во всех местообитаниях, заселенных микроорганизмами, и могут вносить существенный вклад в суточную смертность бактерий (Летаров, 2020) и оказывать влияние на состав и динамику бактериальных популяций (Weinbauer, 2004; Abedon, Lejeune, 2007). Наиболее подробно взаимоотношения фаговых и бактериальных популяций были исследованы для водных экосистем (Sime-Quando, 2014), однако фаговые сообщества присутствуют и в почве, действуя как естественные регуляторы популяций различных видов и штаммов бактерий (Pratama, van Elsas, 2018; Pratama et al., 2020). Предполагают, что активность поч-

венных бактериофагов способствует поддержанию гомеостаза почвенного микробного сообщества и сохранению здоровья растений и плодородия почв (Pratama et al., 2020). Однако практическое значение микробного населения почв не исчерпывается одним лишь аспектом продуктивности. Многие представители нормального почвенного микробиома могут вызывать инфекции человека и животных (Samaddar et al., 2021), что создает риски экономических потерь в животноводстве и угрозу здоровью людей, в силу своей профессиональной деятельности много контактирующих с почвой. Таким образом, природные фаговые сообщества почв могут рассматриваться и как фактор, влияющий на безопасность жизнедеятельности в агроландшафтах.

Одним из наиболее опасных почвенных микроорганизмов является возбудитель мелиоидоза, *Burkholderia pseudomallei*, который присутствует в почвенных экосистемах эндемичных по мелиоидозу тропических и субтропических районов (Cheng, Currie, 2005; Limmathurotsakul et al., 2010, 2016) и может также обнаруживаться в воде рисовых чеков. Мелиоидоз относят к особо опасным заболеваниям. Лечение от этой инфекции крайне затруднительно в силу природной устойчивости возбудителя ко многим антибиотикам, при этом заболевание часто сопровождается тяжелыми симптомами и нередко приводит к смерти. Заражение *B. pseudomallei* из природных источников обуславливает большинство случаев мелиоидоза, основной группой риска являются фермеры и сельскохозяйственные рабочие.

Недавние исследования обнаружили наличие в почвах северо-восточного (СВ) Таиланда бактериофагов, активных против *B. pseudomallei* (Gatedee et al., 2011; Shan et al., 2014). При этом преобладающей группой природных фаговых изолятов явились вирусы, родственные бактериофагу phiBp-AMP1 (далее AMP1) (Shan et al., 2014). Фаг AMP1 представляет собой подовирус, отдаленно родственный колифагу T7. Помимо *B. pseudomallei* фаг AMP1 инфицирует близкородственный, но при этом не патогенный вид бактерий – *B. thailandensis*, что создает возможность проводить исследования данного вируса без специальных мер биологической безопасности.

В настоящее время не до конца понятно, являются ли AMP1-подобные фаги буркгольдерий вирулентными, или они при определенных условиях способны к лизогении (Shan et al., 2014). Одним из достаточно необычных свойств фага AMP1 и родственных ему вирусов является фенотип холодо-чувствительного роста. При достаточно высокой температуре (35–37°C) данные фаги активно лизируют клетки хозяина и образуют среднего размера прозрачные бляшки на чашках с бактериями, однако Shan и соавт. (Shan et al., 2014) сообщили, что при инфицировании клеток при низкой (25°C) температуре возникают нестабильные лизогенные или псевдолизогенные клоны, погибающие при экспозиции к более высокой температуре из-за индукции литического роста фага. Математическое моделирование с учетом этих данных позволило предположить, что природный фаг-опосредованный биологический контроль водных (Egilmez et al., 2021) и почвенных (Egilmez et al., 2021; Withatanung et al., 2016) популяций *B. pseudomallei* может объяснить особенности существующей сезонной динамики заболеваемости мелиоидозом в СВ Таиланде. Существуют также косвенные экспериментальные подтверждения существования такого биоконтроля со стороны AMP1-подобных бактериофагов (Withatanung et al., 2016). В этой связи представляется интересным проанализировать

воздействие иных факторов, действующих в агро-экосистемах на инфекционность AMP1 и подобных фагов.

В этой работе мы исследовали влияние нескольких распространенных агрохимикатов на инфекционность и стабильность фага AMP1, а также влияние содержания NaCl в среде на размножение этого вируса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы бактерий и бактериофагов и их культивирование. Штамм *Burkholderia thailandensis* E 264, а также штамм фага phiBp-AMP1 были из коллекции лаборатории проф. М. Клоки, Университет Лестера, Великобритания. Культура *B. pseudomallei* K96243 была из коллекции Университета Лестера. Все работы с *B. pseudomallei* проводились в специализированной сертифицированной лаборатории BSL-3 специально подготовленным персоналом.

Для культивирования бактерий и бактериофагов использовали стандартную среду LB (триптон – 10 г; дрожжевой экстракт 5 г; NaCl – 10 г; деионизованная вода – до 1 л). В некоторых экспериментах использовалась среда с другими концентрациями NaCl. Для приготовления чашек к среде перед автоклавированием добавляли 15 г агара на 1 л, для верхнего агара – 6 г агара на 1 л.

Титрование фагов осуществляли стандартным двуслойным методом. Инкубацию чашек проводили при 37°C.

Определение влияния агрохимикатов на рост и стабильность фага AMP1 проводили, добавляя соответствующие соединения (натриевая соль дихлорфеноксиуксусной кислоты (Na-2,4Д), паракуват, глифосат, приобретенные у “Sigma-Aldrich”, США) к агару на чашках (и в верхний, и в нижний слой) до титра 25 мг/мл для органических молекул. Малорастворимые в воде атрозин и аметрин (“Santa Cruz Biotechnology”, США) использовались в концентрации 1/200 от насыщающей. Концентрация CuCl_2 для эксперимента на чашках была 2.5 мМ, так как более высокие концентрации ингибировали рост газона. На чашках с соответствующими добавками проводили титрование исходных суспензий фага. Для определения влияния исследуемых соединений на стабильность фагов, их вносили в физиологический раствор, в который добавляли 0.01 объема лизата бактериофага. Суспензию инкубировали 30 мин, после чего готовили серию дальнейших разведений и производили посев для подсчета бляшек. При наличии выраженного эффекта исследовали действие меньших концентраций соответствующих агентов. Соли железа(II) FeSO_4 и $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ в экспериментах на чашках не использовали, поскольку их окисление кислородом воздуха невозможно проконтро-

лизовать в таких условиях. В экспериментах по инактивации фага использовали стоковые 500 мМ растворы, которые готовили непосредственно перед экспериментом. Растворы использовали в разведении 1 : 200 до 1 : 3200 с шагом в 2 раза (соответственно, концентрация уменьшалась с 2.5 мМ до 156 мкМ).

Исследование влияния солей на рост фага AMP1. Для исследования влияния концентрации NaCl, а также солей искусственного почвенного раствора готовили среды, не содержащие NaCl. При подготовке чашек в них добавляли определенное количество 40% (вес/объем) раствора NaCl для достижения необходимой концентрации соответствующих солей. Использовали искусственный почвенный раствор следующего состава (мМ): NaCl – 5; CaCl₂ – 5; KCl – 1; NH₄Cl – 1; MgCl₂ – 3 (из данного раствора были исключены ионы Mn²⁺, присутствие которых может наблюдаться в почве (Katoh et al., 2004), поскольку эти ионы оказались способны инактивировать фаг). Состав искусственного почвенного раствора был выбран на основании данных о составе растворов почв рисовых чеков (Katoh et al., 2004), так, чтобы концентрация каждого из катионов соответствовала максимальной концентрации, наблюдаемой в течение года.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование воздействия агрохимикатов на рост и стабильность фага AMP1. Для оценки возможного эффекта различных пестицидов на рост фага были приготовлены чашки, засеянные двуслойным методом (по Грация) газонами культуры хозяина *B. thailandensis* E264, в оба слоя которых были добавлены соответствующие реагенты. На этих чашках осуществляли титрование одного и того же лизата бактериофага AMP1 путем нанесения на поверхность верхнего агара капель различных разведений фагового лизата, приготовленных в физиологическом растворе.

После инкубации чашек было обнаружено, что такие вещества как Na-2,4Д, паракват, атразин и глифосат не уменьшают биологический титр бактериофага (рис. 1). В присутствии некоторых соединений (наиболее выраженный эффект такого рода был у глифосата) наблюдалось даже образование бляшек большего размера, что, по-видимому, связано с некоторым угнетением роста бактериального газона и замедлением достижения бактериями стационарной фазы. Так, в присутствии глифосата газон индикаторной культуры выглядел заметно менее плотным, чем в контроле. Такие соединения как аметрин и CuCl₂ незначительно понижали количество бляшек (в пределах одного порядка). С учетом того, что используемые в данном эксперименте концентрации были многократно выше,

чем ожидаемые в условиях практического применения этих веществ их количества в почвенных растворах или в воде рисовых чеков, эффектом исследованных органических пестицидов можно пренебречь. Поставленные с теми же соединениями эксперименты по инактивации фага (инкубация в течение 30 мин при комнатной температуре в физиологическом растворе) не обнаружили никакого инактивирующего эффекта. При использовании хлорида меди(II) в концентрации выше 4 мМ наблюдалась заметная инактивация фага с уменьшением титра на порядок и более. Однако эти концентрации не являются практически релевантными. Эксперименты на чашках с высокими концентрациями CuCl₂ поставить не удалось, так как наблюдалось подавление роста газона индикаторной культуры.

Таким образом, изученные пестициды даже в очень высоких концентрациях не обладают выраженным влиянием ни на рост, ни на стабильность фага. Мы также исследовали влияние на стабильность фага препаратов железа(II), применяемых в качестве удобрений и ядохимикатов. В частности, исследовали сульфат железа(II) (железный купорос (FeSO₄), а также железоаммонийные квасцы (соль Мора ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂)). Поскольку железо(II) быстро окисляется кислородом воздуха, постановка эксперимента на чашках, аналогичного описанному выше, оказалась невозможной. При действии на суспензию фага в физиологическом растворе оба соединения показали сильную вирицидную активность (рис. 2). Так, соль Мора вызывала падение титра фага более, чем на порядок даже при наименьшей испытанной концентрации в 0.16 мМ, а при концентрации 0.6 мМ полностью инактивировала фаг в течение 30 мин. FeSO₄ был еще более активен, вызвав полную инактивацию вируса даже при наименьшей концентрации. Исследование более низких концентраций не производилось, так как это потребовало бы существенного усложнения эксперимента для учета фактора окисления железа(II) даже при сравнительно коротком периоде инкубации. Интересно, что сульфат железа(III) Fe₂(SO₄)₃ не оказывал существенного эффекта на жизнеспособность фага при концентрации 10 мМ (данные не приведены).

Влияние NaCl и солей почвенного раствора на рост фага AMP1. В ходе определения параметров жизненного цикла фага AMP1, существенных для математического моделирования его влияния на популяции хозяев в водной среде (Egilmiz et al., 2018), нами было обнаружено, что адсорбция бактериофага на клетках хозяина в среде LB происходит крайне медленно, что не позволяло количественно измерить константу адсорбции. В то же время в среде, разведенной в 10 раз деионизованной водой, адсорбция происходила более эффек-

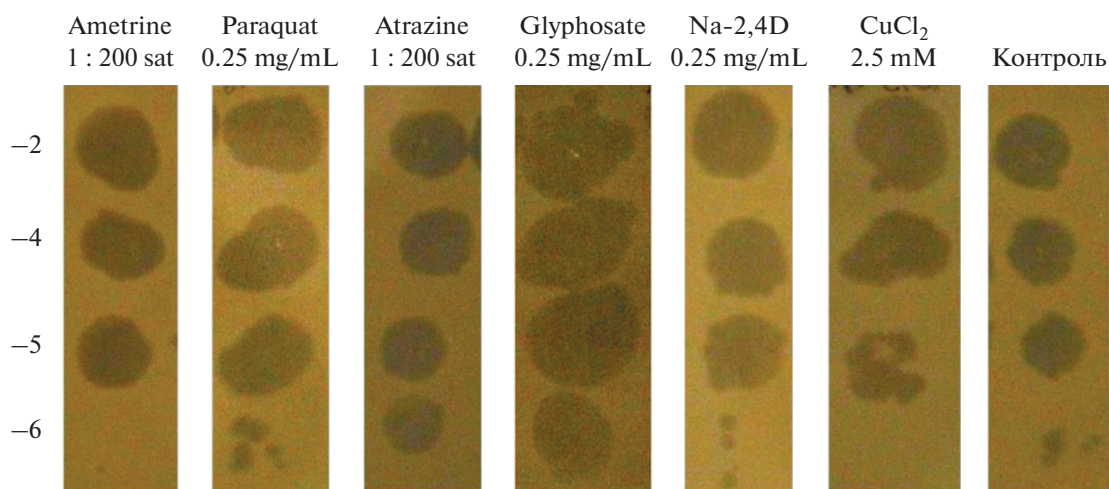


Рис. 1. Влияние пестицидов на рост бактериофага AMP1 на культуре *B. thailandensis*.

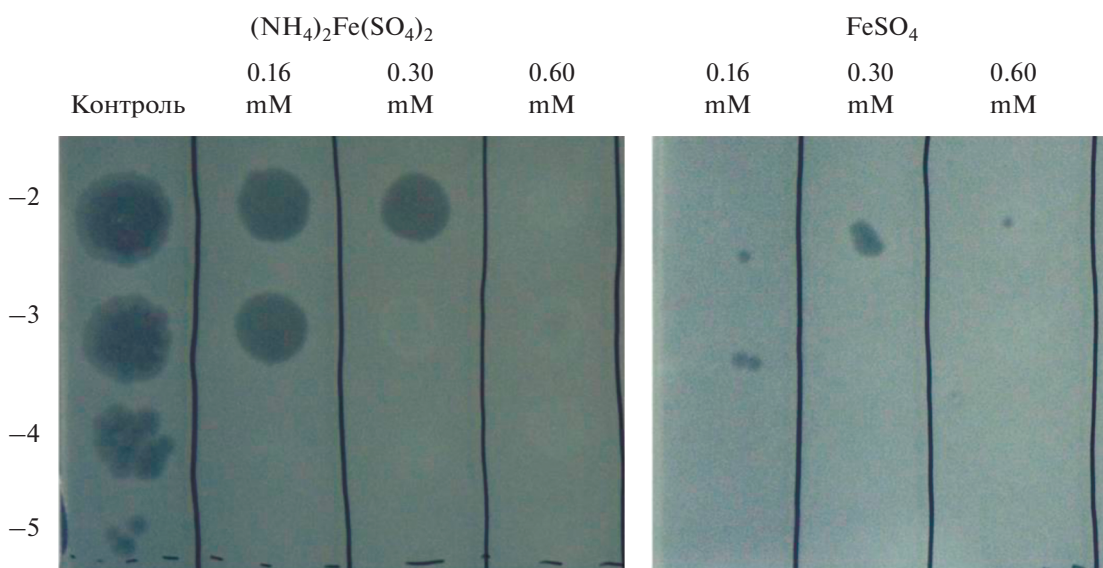


Рис. 2. Инактивация фага AMP1 солями железа(II). Длительность инкубации с реагентом 30 мин.

тивно с константой около 4×10^{-10} мл/мин. В этой связи, с учетом распространенности засоленных почв в СВ Таиланде (Duangurai et al., 2018; Chookietwattana, Yuwa-Amornpitak, 2019) и в других эндемичных по мелиоидозу районах, представлялось интересным исследовать влияние концентрации NaCl на эффективность роста фага AMP1. Для этой цели мы провели титрование лизата бактериофага на чашках с различными концентрациями NaCl (рис. 3а). Было обнаружено, что при низкой концентрации NaCl фаг AMP1 не способен образовывать бляшки, несмотря на то, что газон индикаторной культуры достигает такой же (или даже несколько большей) плотности, что и на стандартной среде LB. Обращает на себя внимание резкий характер зависимости эффектив-

ности посева (ЕОР) фага от концентрации NaCl: при 0.3% соли (51 mM) рост практически отсутствует, при 0.4% NaCl (68 mM) ЕОР снижена более чем на 2 порядка, но уже при 0.6% (102 mM) ЕОР незначительно ниже максимальной, которая достигается при концентрации соли более 0.8% (136 mM). Таким образом, при условиях, когда наблюдается максимальная скорость адсорбции бактериофага (Egilmez et al., 2018), его инфекционность практически полностью подавлена.

Для того, чтобы выяснить, на какой из стадий жизненного цикла происходит подавление инфекции, мы заразили находящуюся в логарифмической фазе роста ($OD_{600} = 0.2$) культуру *B. thailandensis* E264 фагом AMP1 в жидкой среде LB без NaCl.

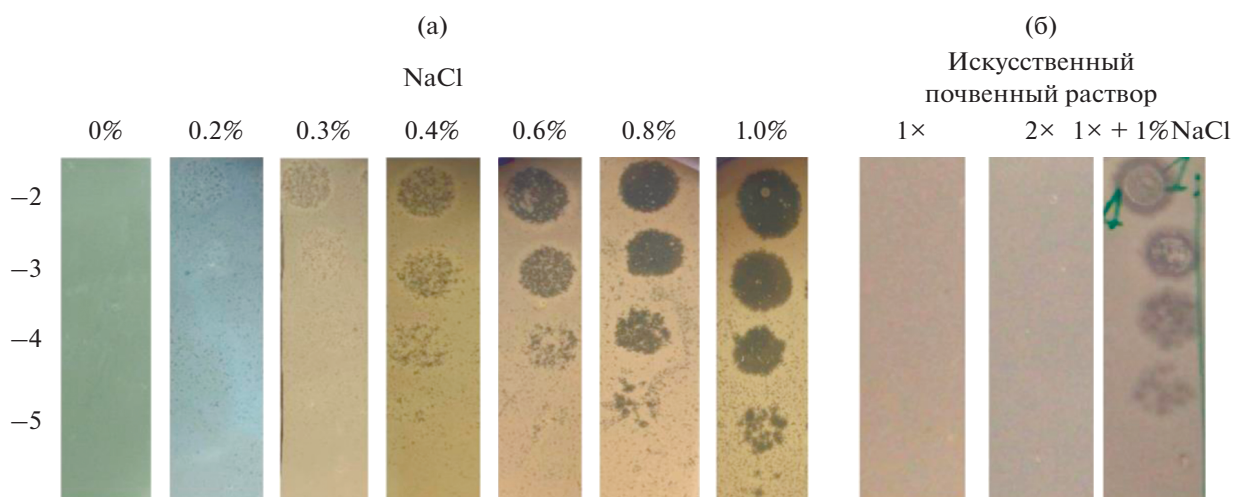


Рис. 3. Влияние солей на инфекционность фага AMP1 в отношении *B. thailandensis*: а – различные концентрации хлорида натрия; б – искусственный почвенный раствор.

Инокуляцию осуществили таким образом, чтобы концентрация фага составила около 10^5 БОЕ/мл. Культуру инкубировали в тех же условиях (37°C при активной аэрации на шейкере), которые использовались для получения лизатов фага. В моменты времени 0, 1, 2, 3, 6 и 18 ч отбирали аликваты по 10 мкл, разводили в 100 раз в той же среде и производили посев для подсчета фага на чашки с использованием стандартных сред на основе LB, содержащих 1% NaCl. В течение инкубации количество БОЕ фага не претерпело существенных изменений, то есть, не наблюдалось ни инактивации, ни размножения вируса. Посевы тех же образцов после удаления клеток центрифугированием не обнаружили существенных различий титра по сравнению с интактными образцами. Таким образом, при низкой концентрации NaCl не происходит необратимой адсорбции фага (повидимому, обратимо адсорбировавшиеся частицы успевают диссоциировать после разведения аликвот).

Для того, чтобы установить, требуется ли для перехода к необратимой инфекции высокая концентрация NaCl или необходима просто достаточная осмолярность среды, мы провели титрование фага на среде, содержащей 4% глицерина вместо NaCl. Образование бляшек в этих условиях было полностью подавлено.

Мы предположили, что в природных условиях иные ионы, присутствующие в почвенном растворе, могут оказывать активирующее действие на инфекционность AMP1-подобных фагов. Для проверки этого предположения мы добавили к бессолевой среде LB смесь солей, имитирующую почвенный раствор. За 1× концентрацию были приняты максимальные концентрации соответствующих ионов, наблюдавшиеся в исследовании

почвенных растворов под пахотным слоем рисовых полей (Katoh et al., 2004). При добавлении к среде солевой смеси 4×, 2× и меньших концентраций образования бляшек не наблюдалось, однако при добавлении к стандартной солевой среде 1% NaCl инфекционность фага полностью восстанавливалась (рис. 3б).

Поскольку зависимость инфекционности фага AMP1 может иметь определяющее значение с точки зрения его влияния на популяции возбудителя мелиоидоза в естественных местообитаниях, мы проверили наличие этого эффекта при инфекции штамма *B. pseudomallei* K96243. Из результатов этого эксперимента (рис. 4) следует, что сходные концентрации NaCl необходимы и для инфекции патогенного микроорганизма, что подтверждает адекватность непатогенной модели *B. thailandensis* для исследования физиологии взаимодействия AMP1-подобных фагов с возбудителем мелиоидоза.

Результаты математического моделирования (Egilmez et al., 2018, 2021) согласуются с ранее высказанными предположениями (Shan et al., 2014), что инфекция *B. pseudomallei* в почве и воде агроландшафтов эндемичных по мелиоидозу районов AMP1-подобными фагами является одним из существенных факторов, определяющих динамику численности возбудителя мелиоидоза в почвах и воде агроэкосистем. В пользу этих предположений также свидетельствует наблюдение, что выделение возбудителя мелиоидоза и его фагов (преимущественно AMP1-подобных) в серии образцов почвы, отобранных на одном поле, антикоррелируют между собой (Withatanung et al., 2016).

В то же время математические модели (Egilmez et al., 2018, 2021) предсказывают, что исход экологических взаимодействий между популяциями

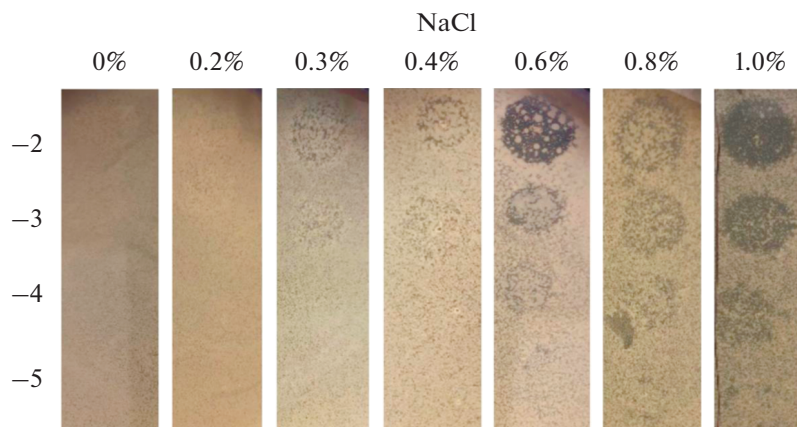


Рис. 4. Влияние концентрации хлорида натрия на инфекционность фага AMP1 в отношении *B. pseudomallei*.

бактерий и бактериофагов может зависеть от достаточно большого набора особенностей среды, таких, как, например, мутность воды рисовых чеков, которая влияет на проникновение УФ радиации в поверхностные слои воды. Действием таких не вполне очевидных “тонких” факторов предположительно можно объяснить наблюдаемые существенные различия в годовой динамике заболеваемости мелиоидозом в районах, весьма схожих между собой по общим физико-географическим и агрономическим характеристикам.

В этой связи обнаружение в числе химических факторов, которые могут присутствовать в агроландшафтах, оказывающих сильное влияние на стабильность и инфекционность AMP1-подобных фагов, представляет существенный интерес как с точки зрения экологии самих этих вирусов, так и с позиций эпидемиологии мелиоидоза. В контексте полученных данных сама по себе высокая распространенность данной группы фагов представляет собой экологическую загадку. В почвах рисовых полей, периодически подвергаемых затоплению, неизбежно образование обширных зон с восстановительными условиями. Так, по данным Katoh и соавт. (Katoh et al., 2004), в составе перколяционной воды пахотного горизонта рисовых полей (Япония) концентрация Fe^{2+} достигала 3.5 мМ. Как следует из наших результатов, значительно меньших концентраций свободных ионов железа(II) достаточно для полной необратимой инактивации бактериофага. Для разрешения данного парадокса необходимо проведение полевых исследований в естественных местообитаниях данных вирусов и их хозяев, например, в СВ Таиланде. При этом необходимо учитывать, в каких именно химических формах преимущественно находится железо(II) в реальных почвенных растворах.

Аналогично, существенное влияние концентрации NaCl на инфекционность фага требует

экологической интерпретации. В СВ Таиланде, где было выделено большинство изолятов AMP1-подобных фагов (Gatedee et al., 2011; Egilmez et al., 2018), засоленность почв широко распространена и носит при этом мозаичный характер (Shrestha, Farshad, 2009). Большая часть почв территории СВ Таиланда не засолены, и для них характерны значения электропроводности почвенных растворов менее 3 дСм/м (Shrestha, Farshad, 2009; Clermont-Dauphin et al., 2010), а часто и менее 0.5 дСм/м (Chookietwattana, Yuwa-Amornpitak, 2019), что приблизительно соответствует эквиваленту 0.3–2 г NaCl на 1 л. Это меньше пороговой концентрации в 3–4 г NaCl на 1 л, которая была необходима для заметной активации перехода к необратимой адсорбции в наших экспериментах. В то же время, на территории СВ Таиланда пятнами присутствуют средне и сильно засоленные почвы со значениями удельной электропроводности 5–15 дСм/м и более, что уже превышает определенную нами пороговую величину концентрации NaCl. Таким образом, степень засоления почв может быть существенным фактором, влияющим на экологию AMP1-подобных фагов, не учтенным в предложенных на данный момент математических моделях (Egilmez et al., 2018, 2021).

Интересно, что скорость обратимой адсорбции бактериофага оказывается значительно выше при низких концентрациях NaCl (Egilmez et al., 2018). Тем не менее, эффективность посева и видимый размер бляшек возрастали в наших опытах вплоть до концентрации NaCl 136–160 мМ (0.8–1%) (рис. 3, 4). По-видимому, в условиях эксперимента *in vitro*, осуществляемого с использованием богатых сред, увеличение способности фага инфицировать клетки при более высоких концентрациях NaCl с лихвой компенсирует потери, связанные с уменьшением константы адсорбции. Однако в природных местообитаниях оптималь-

ное соотношение скорости обратимой адсорбции и эффективности перехода к необратимой адсорбции (а следовательно, оптимальные для размножения фага значения солености среды) могут быть иными.

Следует констатировать, что адаптивное значение обнаруженной чувствительности фага AMP1 к концентрации соли, а также механизмы, обусловившие экологический успех этой группы бактериофагов в настоящее время остаются не ясны и нуждаются в специальном исследовании. Таким образом, представляется интересным провести полевое исследование, сопоставив выделяемость бактериофагов группы AMP1, актуальные значения солености почв, а также кривые зависимости биологических титров полученных фаговых изолятов от концентрации NaCl.

Также наши данные указывают, что применение солей железа(II) в качестве агрохимикатов в эндемичных по мелиоидозу районах может быть сопряжено с риском увеличения популяционных уровней *B. pseudomallei* и, соответственно, рисков инфицирования людей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны Елене Гурко за помощь в экспериментах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 13.2251.21.0090.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У авторов отсутствует конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Летаров А.В. Современные концепции биологии бактериофагов. М.: ДеЛи, 2020. 383 с.
- Abedon S.T., Lejeune J.T. Why bacteriophage encode exotoxins and other virulence factors // *Evol. Bioinform. Online*. 2007. V. 1. P. 97–110.
- Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management // *Clin. Microbiol. Rev.* 2005. V. 18. P. 383–416.
- Chookietwattana K., Yuwa-Amornpitak T. Data on soil properties and halophilic bacterial densities in the Na Si Nuan Secondary Forest at Kantharawichai District, Maha Sarakham, Thailand // *Data Brief*. 2019. V. 27. Art. 104582.

Clermont-Dauphin C., Suwannang N., Grünberger O., Hammecker C., Maeght J.-L. Yield of rice under water and soil salinity risks in farmers' fields in northeast Thailand // *Field Crops Res.* 2010. V. 118. P. 289–296.

Duangurai T., Indrawattana N., Pumirat P. *Burkholderia pseudomallei* adaptation for survival in stressful conditions // *Biomed. Res. Int.* 2018. V. 2018. Art. 3039106.

Egilmez H.I., Morozov A.Y., Clokie M.R.J., Shan J., Letarov A., Galyov E.E. Temperature-dependent virus life-cycle choices may reveal and predict facets of the biology of opportunistic pathogenic bacteria // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. Art. 9642.

Egilmez H.I., Morozov A.Y., Galyov E.E. Modelling the spatiotemporal complexity of interactions between pathogenic bacteria and a phage with a temperature-dependent life cycle switch // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. Art. 4382.

Gatedee J., Kritsiriwuthinan K., Galyov E.E., Shan J., Dubinina E., Intarak N., Clokie M.R., Korbsrisate S. Isolation and characterization of a novel podovirus which infects *Burkholderia pseudomallei* // *Virolog. J.* 2011. V. 8. P. 1–5.

Katoh M., Murase J., Hayashi M., Matsuya K., Kimura M. Nutrient leaching from the plow layer by water percolation and accumulation in the subsoil in an irrigated paddy field // *Soil Sci. Plant Nutrit.* 2004. V. 50. P. 721–729.

Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A., Messina J.P., Pigott D.M., Moyes C.L., Rolim D.B., Bertherat E., Day N.P., Peacock S.J., Hay S.I. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis // *Nat. Microbiol.* 2016. V. 1. Art. 15008.

Limmathurotsakul D., Wongratanacheewin S., Teerawattanasook N., Wongsuvan G., Chaisuksant S., Chetchotisakd P., Chaowagul W., Day N.P., Peacock S.J. Increasing incidence of human melioidosis in Northeast Thailand // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010. V. 82. P. 1113–1117.

Pratama A.A., Terpstra J., de Oliveria A.L.M., Salles J.F. The role of rhizosphere bacteriophages in plant health // *Trends Microbiol.* 2020. V. 28. P. 709–718.

Pratama A.A., van Elsas J.D. The “neglected” soil virome – potential role and impact // *Trends Microbiol.* 2018. V. 26. P. 649–662.

Samaddar S., Karp D.S., Schmidt R., Devarajan N., McGarvey J.A., Pires A.F.A., Scow K. Role of soil in the regulation of human and plant pathogens: soils' contributions to people // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2021. V. 376. Art. 20200179.

Shan J., Korbsrisate S., Withatanung P., Adler N.L., Clokie M.R., Galyov E.E. Temperature dependent bacteriophages of a tropical bacterial pathogen // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. Art. 599.

Shrestha D.P., Farshad A. Mapping salinity hazard: an integrated application of remote sensing and modeling-based techniques // *Remote Sensing of Soil Salinization: Impact on Land Management* / Eds. Zinck J.A., Metternicht G. Boca Raton, FL: CRC Press, 2009. P. 257–272.

Sime-Ngando T. Environmental bacteriophages: viruses of microbes in aquatic ecosystems // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. Art. 355.

Weinbauer M.G. Ecology of prokaryotic viruses // *FEMS Microbiol. Rev.* 2004. V. 28. P. 127–181.

Withatanung P., Chantratita N., Muangsombut V., Saiprom N., Lertmemongkolchai G., Klumpp J., Clokie M.R., Galyov E.E., Korbsrisate S. Analyses of the distribution patterns of *Burk-*

holderia pseudomallei and associated phages in soil samples in Thailand suggest that phage presence reduces the frequency of bacterial isolation // PLoS Negl. Trop. Dis. 2016. V. 10. e0005005.

Effect of Chemical Factors on Natural Biocontrol of the Melioidosis Agent by AMP1-Like Bacteriophages in Agricultural Ecosystems

A. V. Letarov^{1, 2, *}, M. A. Letarova^{1, 2}, N. Lazar Adler⁴, E. E. Kulikov¹, M. Clokie⁴, A. Yu. Morozov^{3, 4}, and E. E. Galyov⁴

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

³Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

⁴University of Leicester, Leicester, United Kingdom

*e-mail: letarov@gmail.com

Received November 3, 2021; revised November 11, 2021; accepted November 12, 2021

Abstract—The causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, as well as closely related nonpathogenic bacteria of the *B. pseudomallei/thailandensis* complex of species, are found in soils and water bodies in melioidosis-endemic areas which results in significant biological risks to agricultural workers in these regions. Bacteriophages related to the phiBp-AMP1 phage are the most common known group of *B. pseudomallei/thailandensis* viruses. The interaction of these bacteriophages with their hosts may be a key factor in the natural control of the *B. pseudomallei* population, which determines the dynamics of melioidosis infection in humans. In this study, we showed that frequently used herbicides (paraquat, atrazine, 2,4-D, ametrine, and copper dichloride) did not significantly affect the stability and infectivity of the AMP1 phage, while iron(II) salts, which are used as fertilizers, inactivated the phage even at concentrations of about 0.1 mM or lower. Moreover, the concentration of sodium chloride was critical for the infectivity of the AMP1 phage, both against *B. thailandensis* and against the pathogen *B. pseudomallei*. When the concentration of this salt in solution was less than 3 g/L, the phages ceased infecting the host cells. Therefore, soil salinity may thus be responsible for the mosaic pattern of *B. pseudomallei* population dynamics within a number of endemic regions, such as northeastern Thailand.

Keywords: bacteriophages, melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, biocontrol of bacterial populations, herbicides, soil salinity