

IRSTI: 68.03.07

A.E. YELUBAYEVA<sup>1</sup>, A.E. MOLZHIGITOVA<sup>1</sup>, D.A. TLEUBEKOVA<sup>1</sup>,  
A.Z. ZHANUZAK<sup>1</sup>, Z.Z. TURLYBAYEVA<sup>1</sup>, F.S. DZHALILOV<sup>2</sup>, E.T. ISMAILOVA<sup>1</sup>,  
O.N. SHEMSHURA<sup>1</sup>, Zh.B. SULEIMENOVA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

<sup>2</sup>Russian State Agrarian University named after K. A. Timiryazev, Moscow, Russia

\*e-mail: msyban@mail.ru

## BACTERIOPHAGES AND THEIR ROLE IN CONTROL OF FIRE BLIGHT

doi:10.53729/MV-AS.2024.02.05

### Abstract

Fire blight is an economically important disease of fruit crops caused by *Erwinia amylovora*. The main advantage of bacteriophages over the other means is that they are obligate parasites of bacteria and a natural component of ecosystems, and therefore they can be used to prevent and control the development of disease at all stages of plant development. In recent years, leading laboratories around the world have been studying the possibility of using bacteriophages for controlling fire blight plant diseases. This review summarizes data on bacteriophages and their role in plant protection.

**Keywords:** fire blight, bacteriophages, *Erwinia amylovora*, control measures.

Fire blight is an economically important disease of fruit crops caused by the bacterium *Erwinia amylovora*. Fire blight found in major apple and pears growing regions around the world. *E. amylovora*, a member of *Enterobacteriaceae* family, is a gram-negative, non-spore-forming bacterium and a facultative anaerobe [1-5]. Despite all the phylogenetic instability of representatives of the genus *Erwinia*, *E. amylovora* is a very stable species. The optimal growth temperature for *E. amylovora* is from 25 to 27°C, but at the same time the pathogen is able to grow at temperatures from 5 to 37°C [6]. The pathogenicity of *E. amylovora* is determined by five factors: exopolysaccharides secreted by the bacterium, a cluster of hypersensitivity and pathogenicity genes, a cluster of genes strictly specific to this disease, and the ability to develop in the environment [7, 8]. Unlike closely related *Pectobacterium* species, *E. amylovora* does not degrade the cell wall of host plant, since it does not produce pectin-degrading and cellulolytic enzymes.

Currently, about 129 plant species from 37 genera of the *Rosaceae* family are known to be susceptible to damage by this bacterium. The disease causes especially serious damage to pear and apple trees. Thus, in the USA, losses caused by this disease reach 100 million dollars a year. In Kazakhstan, bacterial blight was first registered in the early 2000s, but its range is expanding from year to year. Over the past 7 years, the area infected by this disease has increased 40 times.

In different years, the disease exhibition varies and depends on factors such as temperature, relative air humidity, the presence of insect vectors, plants condition (mechanical damage, physiological characteristics, etc.), as well as presence of pathogenic bacteria. Modern methods of fire blight management involve the use of complex measures aimed at reducing the amount of pathogen in gardens and preventing the spread of the disease - agricultural practices, the use of chemical agents (copper-containing compounds), antibiotics, antagonistic microorganisms, and genetic engineering methods to increase resistance of host plants, and to eliminate various virulence factors of the pathogen [8-14]. The success of using chemical agents depends on the possibility of ensuring their direct contact with phytopathogen cells, which is feasible at the epiphytic stage of the disease [15]. In addition, despite modifications to the method of delivering a chemical agent to a plant to control fire blight (injection into the tree trunk), the literature describes lower effectiveness of stem injections of streptomycin compared to the form of spray [16].

All of the above methods help to reduce the amount of pathogen, but each of them has significant drawbacks. Thus, when using copper-containing preparations, there is a danger of accumulation of copper ions in plants and soil, which inhibit the development of not only pathogenic, but also other beneficial microorganisms, and also have phytotoxicity [15]. Resistance to antibiotics often appears due to its prolonged use and generally supports the growth of resistant bacterial isolates [17]. When using biological products, the effectiveness of antagonist bacteria is lower than when using antibiotics [18]. The use of transgenic organisms can cause harmful changes in the ecosystem and in the humans and animals body. As an alternative to antibiotics, bacteria, fungi, viruses, as well as various natural bactericides produced by these organisms are used to combat bacterial blight of fruit crops.

Bacteriophages have unique properties to prevent fire blight infection, offering a number of advantages over chemical agents when used to control bacterial diseases. The advantages of bacteriophages include natural origin, specificity of action, presence in the environment before the elimination of host bacteria, and the ability to self-replicate [19, 20]. Bacteriophages have been found to be effective in controlling certain phytopathogens, such as *Erwinia* spp., which causes bacterial soft rot [21] and fire blight of apple and pear trees [22], *Xanthomonas* spp., which causes bacterial spot of tomato [23, 24], peach [25, 26], geranium [27], citrus [28], walnut blight [29], onion leaf blight [30] and citrus canker [28], *Ralstonia solanacearum* (Smith), causing bacterial wilt tobacco [31] and *Streptomyces scabies*, which causes potato scab [32].

Bacteriophages (phages) form a group of specific bacterial viruses that infect bacteria for their replication and virion synthesis and, according to the results of recent research, are the most common living creatures on the planet [33]. In 1915, Frederick Twort described the destruction of purulent *Staphylococcus* by a filterable agent. Independently of Twort, in 1917 Felix d'Herelle reported the discovery of particles that killed bacteria and called them "bacteriophages." It consists of three main parts that are assembled independently and then joined together to produce a mature phage. There is a large, multi-protein icosahedral capsid that encapsulates the viral DNA genome. This capsid is coupled via a neck region to a long and narrow tail part, surrounded by a protein sheath. It ends with a baseplate with attached long and short tail fibers, which are responsible for the recognition of specific receptors on the host cell and for binding to the cellular membranes [34].

Sometimes there are bacteriophages without tails. They are usually round or thread-like in shape. The main advantage of using bacteriophages compared to antibiotics is that they cannot cause dysbacteriosis, since they only infect the host bacterium [35]. Once inoculated with phages, the plant's natural microbiome contains a full spectrum of beneficial microorganisms. The specificity of phage infection is mainly determined by the interaction of phages with host bacteria and is carried out mainly through the adsorption of the virion on the surface of the host cells [36] and the development of phage defense mechanisms [37].

### **Classification of bacteriophages**

Bacteriophages are divided into groups according to the morphology of the virion - by the presence or absence of a tail, its structure, by the presence of a protein capsid of the phospholipid shell and by the nucleic acid. According to the International Committee on Taxonomy of Viruses, a unified classification of bacteriophages has been adopted [38].

According to the result of the infection, there are virulent, moderate, and phages with a continuous development cycle. Virulent phages are phages that cause lysis of the host bacterial cells with the subsequent release of daughter phages. The mechanism of infection of a bacterial cell by a virulent bacteriophage: in strictly defined places on the outer membrane of the bacterium, the phage attaches with a process to the bacterial cell and, releasing a complex of enzymes, dissolves cell wall. After this, the content of the phage head pass into the cell through the process channel. Small, spherical phages enter bacteria without tells. Under the influence of the phage nucleic acid, bacterial proteins, DNA and RNA, nucleic acid and phage proteins are synthesized.

Some of these proteins are enzymes, and the other part forms the shell of a mature bacteriophage particle (Table).

Table - Classification of phages

Taxonomic unit	Nucleic acid size
Order <i>Caudovirales</i>	ds DNA (L), without shell
Family	
<i>Myoviridae</i>	without shell, with linear double-stranded DNA, with contracting tail
<i>Siphoviridae</i>	without a shell, with linear double-stranded DNA, with a long non-contractile tail
<i>Podoviridae</i>	without a shell, with linear double-stranded DNA, with a long non-contractile tail
<i>Microviridae</i>	without shell, with circular single-stranded DNA, isometric
<i>Corticoviridae</i>	without shell, with circular single-stranded DNA, isometric
<i>Tectiviridae</i>	without shell, with linear double-stranded DNA, isometric
<i>Leviviridae</i>	without shell, with linear single-stranded RNA, isometric
<i>Cystoviridae</i>	coated, segmented double-stranded RNA, spherical
<i>Inoviridae</i>	without shell, with circular single-stranded DNA, filamentous
<i>Plasmaviridae</i>	coated, circular double-stranded DNA, pleiomorphic

Bacteriophages do not in all cases cause rapid death of the bacterial cells. Many of them are able to integrate into the bacterial genome and not kill the host cell for some time. Such phages are called lysogenic, or temperate. Temperate phages in the life cycle can develop in two directions: being involved in the lytic cycle or turning into a prophage with further development along the lysogenic path. Temperate phages, integrating into the bacterial genome, can accelerate the evolution of their hosts during infection and increase their pathogenicity by inserting new genes or damaging existing ones.

When host cell is infected with phages with a continuous development cycle, phages start form and release. The phage is released through specific pores in the cell, and during release, its maturation occurs - the nucleic acid is covered with a protein coat [39, 40]. In addition to the listed three groups of bacteriophages, there are phages that enter into pseudolysogenic relationships with host cell, and as a result temporary coexistence of virulent bacteriophages and bacteria is observed.

During evolution, bacteriophages have developed effective mechanisms for infecting bacterial cells. Thus, bacteriophages produce proteins that take part in the lysis of host bacteria. Bacteriophage proteins can be divided into two main groups: those that destroy cell membranes (peptidoglycan, cell membrane, bacterial capsule) and those that disrupt bacterial DNA replication, transcription, protein synthesis, and cell division [41]. The possibility of using proteins is currently being considered in phage therapy. The polysaccharide layer that surrounds the bacterium is overcome by phages with proteins (enzymes). Depolymerases can be present as freely diffusing proteins or as components of phage particles. When phages penetrate into a bacterial cell, the peptidoglycan shell of bacteria is destroyed under peptidoglycan-lyzing enzymes (lysozyme-like muramidases, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases, esterase and peptidase). Peptidoglycan-lyzing enzymes of bacteriophages are capable of lysing only those species or subspecies of bacteria that produce the enzymes, i.e. they are highly specific.

Currently, many different mechanisms have been described that allow bacterial cells to eliminate phage infection, which include regulation, mutation and masking of phage receptors [42], DNA restriction and modification (RM) [43], a CRISPR/Cas-based immune response system [44, 45] and the “abortive infection system” (AIS). “Abortive infection” systems represent the programmed death of cells (or their transfer to a dormant state) during infection, which leads to a stop in the spread of phage within bacterial population [46].

### The use of bacteriophages in fire blight control

In plant protection, bacteriophages of phytopathogenic bacteria were initially considered only as a diagnostic tool for the identification and differentiation of *E. amylovora* isolated from plants of the *Rosaceae* family, as well as for determining phage-bacterium interactions [47]. The use of phage particles against fire blight disease was first described in 1973 [48, 49]. Since then, different models have been developed to study the virulence of *E. amylovora* and its interaction with phages. For experiments, unripe fruits, flowers, and stems are usually used. Fruit segments are inoculated with a phages suspension, applied with a pipette to the cut surface. This model is the most suitable for studying the interaction of *E. amylovora* and phages in fruits. Inhibition of *E. amylovora* is measured by assessing the size and appearance of necrotic spots and by assessing the development of disease symptoms. Müller et al. tested 4 different phages using this method. It was found that phages phiEa1h and phiEa100 reduced the number of pathogens by 40%, while phiEa104 and phiEa116 revealed 90% symptom reduction % [50]. Akremi et al. found that an association consisting of four filamentous phages significantly reduced the symptoms of pear disease development [51].

When conducting experiments on flowers, inoculating with the recombinant phage Y2::dpoL1-C (102 CFU/ml) caused a decrease in the final number of bacterial cells by approximately 2% [52]. To prevent colonization of the pathogen in flowers, inoculation with phages must be carried out before the disease spreads. Treatment of flowers is usually carried out by spraying. In this case, time and dosage are important to increase the effectiveness of the treatment. It remains unclear how long phages remain viable after spraying entire trees. Because phages are immobile, they arise randomly and infect host bacteria by passive diffusion. In this regard, to effectively control the disease, it is necessary to carry out large-scale treatment with phages, since the flower must be covered with them uniformly and densely. If the treatment area is too small, *E. amylovora* will not become infected with phages.

Another way to study the effectiveness of bacteriophages on fire blight was demonstrated by Sabri et al. The authors injected *E. amylovora* into the stem of pear plants followed by the injection of phage ET-IT22 at the same site. After 40 days post inoculation the treated plants remained as asymptomatic as the streptomycin control [53]. Nagy et al. applied phages phiEa104 and H5K to the roots of apple seedlings and demonstrated that infective virions could be re-isolated from the stem above ground level thereby reducing symptoms of fire blight significantly [54]. It seems that these phages are efficiently translocated through the plant's tissue (from the root and further along the trunk to different organs of the tree). The ability of *E. amylovora* bacteriophages to move in upward and downward directions suggests the prospects of using bacteriophages for endogenous control of the pathogen.

The most conclusive way to demonstrate the efficacy of phages in agriculture are greenhouse or field trials. Phages should be used to prevent an infection during the blossom period rather than curing infected trees when the bacteria have already spread into the xylem.

There are a number of problems that may hinder the widespread use of phage therapy in the control of plant pathogens. The activity of phages and, consequently, their effectiveness as biological control agents is significantly influenced by the pH of the environment. Thus, it was found that phages of the gram-positive bacterium *Listeria monocytogenes* on the surface of apple pieces with a pH of 4.37 were unstable, while on the surface of a melon, where the pH was 5.77, the phages successfully lysed the pathogen [55]. In addition to pH, temperature also affects both the survival of phages and their ability to lyse bacterial cells.

One of the main advantages of using phages is that they are natural components of ecosystems, since wherever there are bacteria, their bacteriophages are also present [56]. An important property of phages is their ability to self-reproduce [57]. In addition, most phages are highly specific organisms that infect only certain bacteria and do not affect others, including beneficial microorganisms. This makes it possible to use them with other bacterial antagonists to enhance the fight against pathogens.

Thus, phages, as antibacterial agents, have a number of properties that make them compelling alternatives to chemical antibiotics. Currently, laboratories around the world are investigating the possibility of using phage therapy in the fight against fire blight of fruits. Good therapeutic phages should have a high potential to reach and then kill bacteria in combination with a low potential to otherwise negatively modify the environments to which they are applied. The non-toxicity of phages towards eukaryotes allows them to be used where chemical methods of combating bacteria are contraindicated. Preparations based on bacteriophages are quite simple to produce without serious economic costs. They can be stored for a long time and used using standard equipment. In addition, the advantage of phage therapy is that they selectively target and destroy certain bacteria without harming the host organism, and drugs based on bacteriophages are quite simple to produce. Bacteriophages are capable to suppress and control pathogenic bacterial populations within farms and can be used in combination with other methods to prevent the spread of this bacteriosis.

### Funding

The research was carried out with the financial support of the Scientific Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (IRN BR8574022).

### References:

- 1 Rosselo M., Pefialver J., Llop P., Gorris M.T., Chartie, R., Garcia F., Monton C., Cambra M., Lopez M.M. Identification of an *Erwinia* sp. from Different *Erwinia amylovora* and Responsible for Necrosis on Pear Blossoms. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2006, 28: 30-41 (<http://dx.doi.org/10.1080/07060660609507268>)
- 2 Drenova N.V., Isin M.M., Dzhamurzina A.A., Zharmukhamedova G.A., Aitkulov A.K. Bacterial fire blight in the Republic of Kazakhstan. *Plant Health: Research and Practice*, 2013, 3: 44–48
- 3 Vrancken K., Holtappels M., Schoofs H., Deckers T., Valcke R. Pathogenicity and Infection Strategies of the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora* in *Rosaceae*: State of the Art. *Microbiology*, 2013, 159: 823-832 (<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.064881-0>)
- 4 Schroth M.N., Thomson S.V., Hildebrand D.C., Moller W.J. Epidemiology and Control of Fire Blight. *Annual Review of Phytopathology*, 1974, 12: 389-412 (<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.12.090174.002133>)
- 5 Malnoy M., Martens S., Norelli J.L., Barny M.A., Sundin G.W., Smits T.H., Duffy B. Fire blight: applied genomic insights of the pathogen and host. *Annual Review of Phytopathology*, 2012, 50: 475-494 (DOI: 10.1146/annurev-phyto-081211-172931)
- 6 Braun P.C. Epidemiology of fire blight of floricanne fruiting red raspberry caused by *Erwinia amylovora*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2006, 28(1): P. 95-99 (<https://doi.org/10.1080/07060660609507275>)
- 7 Piqué N., Miñana-Galbis D., Merino S., and Tomás J.M. Virulence Factors of *Erwinia amylovora*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(6): 12836–12854 (doi: 10.3390/ijms160612836)
- 8 Johnson K.B., Stockwell V.O. Management of fire blight: A case study in microbial ecology. *Annual Review of Phytopathology*, 1998, 36: 227–248 (doi: 10.1146/annurev.phyto.36.1.227)
- 9 Norelli J.L., Jones A.L., Aldwinckle H.S. Fire blight management in the twenty-first century: Using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Disease*, 2003, 87: 756–765 (doi: 10.1094/PDIS.2003.87.7.756)
- 10 Stockwell V.O., Duffy B. Use of antibiotics in plant agriculture. *Review of Science and Technology*, 2012, 31: 199–210 (doi: 10.20506/rst.31.1.2104)
- 11 Bastas K. K. Management of *Erwinia amylovora* by Potential Bio-Pesticides *in vitro* and *in vivo* Conditions. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 2020, 8(sp1): 38–45 (<https://doi.org/10.24925/turjaf.v8isp1.38-45.3933>)
- 12 Paulin J.P., Lachaud G. Comparison of the Efficiency of Some Chemicals in Preventing Fire Blight Blossom Infections. *Acta Horticulturae*, 1984, 151: 209-214 (<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.1984.151.27>)
- 13 Ordax M. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 3482-3488

(DOI: 10.1128/AEM.72.5.3482-3488.2006)

14 Fried A., Schell E., Moltmann E., Wensing A. Control of fire blight in Baden-Württemberg at the end of the streptomycin era. *Acta horticulturae*, 2013, 1056: 55-56 (DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.5)

15 Ryu D.K., Adhikari M., Choi D.H., Jun K.J., Kim D.H., Kim C.R., Kang M.K., Park D.H. Copper-Based Compounds against *Erwinia amylovora*: Response Parameter Analysis and Suppression of Fire Blight in Apple. *Plant Pathology Journal*, 2023, 39(1): 52-61 (doi: 10.5423/PPJ.OA.07.2022.0100)

16 Parcey M., Gayder S., Morley-Senkler V., Bakkeren G., Ramón Úrbez-Torres J., Ali S., Castle A.J., Svircev A.M. Comparative genomic analysis of *Erwinia amylovora* reveals novel insights in phylogenetic arrangement, plasmid diversity, and streptomycin resistance. *Genomics*, 2020, 112(5): 3762-3772 (<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.04.001>)

17 Rekanovic E., Milijasevic S., Filajdic N., Gavrilovic V. Efficacy of antibiotics and copper compounds in erwinia amylovora control in serbia. *Acta Horti*, 2008, 800: 875-878 (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.800.118>)

18 Zengerer V., Schmid M., Bieri M., Müller D. C., Remus-Emsermann M. N. P., Ahrens C. H. *Pseudomonas orientalis* F9: a potent antagonist against phytopathogens with phytotoxic effect in the apple flower. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 145 (DOI: 10.3389/fmicb.2018.00145)

19 Gill J.J., Svircev A.M., Smith R., Castle A.J. Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Applied Environmental Microbiology*, 2003, 69(4): 2133-8 (doi: 10.1128/AEM.69.4.2133-2138.2003)

20 Kim S.G., Lee S.B., Giri S.S., Kim H.J., Kim S.W., Kwon J., Park J., Roh E., Park S.C. Characterization of Novel *Erwinia amylovora* Jumbo Bacteriophages from Eneladusvirus Genus. *Viruses*, 2020, 3012(12): 1373 (doi: 10.3390/v12121373)

21 Balogh B., Jones J.B., Iriarte F.B., Momol M.T. Phage therapy for plant disease control. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2010, 11: 48-57 (<http://dx.doi.org/10.2174/138920110790725302>)

22 Ravensdale M., Blom T.J., Gracia-Garza J.A., Svircev A.M., Smith R.J., Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora subsp carotovora*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2007, 29: 121-130 (<http://dx.doi.org/10.1080/07060660709507448>)

23 Balogh B., Jones J.B., Momol M.T., Olson S.M., Obradovic A., Jackson L.E. Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Disease*, 2003, 87: 949-954 (DOI: 10.1094/PDIS.2003.87.8.949)

24 Flaherty J.E., Jones J.B., Harbaugh B.K., Somodi G.C., Jackson L.E. Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with H-mutant bacteriophages. *Horticultural Science*, 2000, 35: 882-884 (DOI: 10.21273/HORTSCI.35.5.882)

25 Civerolo E.L., Kiel H.L. Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. *Phytopathology*, 1969, 59: 1966-1967 (<https://www.scienceopen.com/document?vid=aed17f75-1161-4ac8-a1e0-ea7defff8c41&sort=3>)

26 Saccardi A., Gambin E., Zaccardelli M., Barone G., Mazzucchi U. *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* control trials with phage treatments on peaches in the orchard. *Phytopathologia Mediterranea*, 1993, 32: 206-210 (<https://www.jstor.org/stable/42685898>)

27 Flaherty J.E., Harbaugh B.K., Jones J.B., Somodi G.C., Jackson L.E. H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium. *Horticultural Science*, 2001, 36: 98-100 (<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.36.1.98>)

28 Balogh B., Canteros B.I., Stall R.E., Jones J.B. Control of citrus cancer and citrus bacterial spot with bacteriophages. *Plant Disease*, 2008, 92: 1048-1052 (DOI: 10.1094/PDIS-92-7-1048)

29 McNeil D.L., Romero S., Kandula J., Stark C., Stewart A., Larsen S. Bacteriophages: a potential biocontrol agent against walnut blight (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*). *N. Z. Plant Protect-SE.*, 2001, 54: 220-224 (DOI: <https://doi.org/10.30843/nzpp.2001.54.3743>)

30 Lang J.M., Gent D.H., Schwartz H.F. Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with bacteriophages and a plant activator. *Plant Disease*, 2007, 91: 871-878 (DOI: 10.1094/PDIS-91-7-0871)

31 Tanaka H., Negishi H., Maeda H. Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. *Japanese Journal of Phytopathology*, 1990, 56: 243-246 (<https://doi.org/10.3186/jjphytopath.56.243>)

- 32 McKenna F., El-Tarabily K.A., Hardy G.E.S.T., Dell B. Novel *in vivo* use of a polyvalent *Streptomyces* phage to disinfect *Streptomyces* scabies-infected seed potatoes. *Plant Pathology*, 2001, 50: 666-675 (DOI: 10.1046/j.1365-3059.2001.00648.x)
- 33 Besarab N.V., Letarova M.A., Babenko V.V., Belalov I.S., Golomidova A.K., Kulikov E.E., Lagonenko A.L., Evtushenkov A.N., Letarov A.V. The metastable associations of bacteriophages and *Erwinia amylovora*. *Archives Microbiology*, 2023, 205(5): 214 (doi: 10.1007/s00203-023-03550-8)
- 34 Yap M.L., Rossmann M.G. Structure and function of bacteriophage T4. *Future Microbiology*, 2014, 9: 1319–1327 (doi: 10.2217/fmb.14.91)
- 35 Federici S., Kviatcovsky D., Valdés-Mas R., Elinav E. Microbiome-phage interactions in inflammatory bowel disease. *Clinical Microbiology and Infection*, 2023, 29(6): 682-688 (<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.08.027>)
- 36 Mouroso T.J., Awe A., Guo W., Batra H., Ganesh H., Wu X., Zhu J. Understanding bacteriophage tail Fiber Interaction with host surface receptor: the key “Blueprint” for reprogramming phage host range. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23: 12146 (doi: 10.3390/ijms232012146)
- 37 Pfeifer E., Sousa J.M., Touchon M., Rocha E.P. When bacteria are phage playgrounds: interactions between viruses, cells, and mobile genetic elements. *Current Opinion in Microbiology*, 2022, 70: 102230 (DOI: 10.1016/j.mib.2022.102230)
- 38 International Committee on Taxonomy of Viruses (<http://ictvonline.org/virustaxonomy.asp>)
- 39 Sabri M., El Handi K., Valentini F., De Stradis A., Achbani E.H., Benkirane R., Resch G., Elbeaino T. Identification and Characterization of *Erwinia* Phage IT22: A New Bacteriophage-Based Biocontrol against *Erwinia amylovora*. *Viruses*, 2022, 14(11): 2455 (doi: 10.3390/v14112455)
- 40 Blakely G.W. Smarter than the average phage. *Molecular Microbiology*, 2004, 54 (4): 851-854 (10.1111/j.1365-2958.2004.04330.x)
- 41 Federici S., Kviatcovsky D., Valdés-Mas R., Elinav E. Microbiome-phage interactions in inflammatory bowel disease. *Clinical Microbiology and Infection*, 2023, 29(6): 682-688 (<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.08.027>)
- 42 Harvey H., Bondy-Denomy J., Marquis H., Sztanko K.M., Davidson A.R., Burrows L.L. *Pseudomonas aeruginosa* defends against phages through type IV pilus glycosylation. *Nature Microbiology*, 2017, 3: 47–52 (DOI: 10.1038/s41564-017-0061-y)
- 43 Tock M.R., Dryden D.T. The biology of restriction and anti-restriction. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8: 466–472 (DOI: 10.1016/j.mib.2005.06.003)
- 44 Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315: 1709–1712 (<https://pure.psu.edu/en/publications/crispr-provides-acquired-resistance-against-viruses-in-prokaryote>)
- 45 Dupuis M-È., Villion M., Magadán A.H., Moineau S. CRISPR-Cas and restriction–modification systems are compatible and increase phage resistance. *Nature Communications*, 2013, 4: 2087 (<https://www.nature.com/articles/ncomms3087>)
- 46 Dy R.L., Richter C., Salmond G.P.C., Fineran P.C. Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections. *Annual Review of Virology*, 2014, 1: 307–331 (DOI: 10.1146/annurev-virology-031413-085500)
- 47 Vrancken K., Holtappels M., Schoofs H., Deckers T., Valcke R. Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in *Rosaceae*: state of the art. *Microbiology (Reading)*, 2013, 159: 823-832 (doi: 10.1099/mic.0.064881-0. Epub 2013)
- 48 Erskine J.M. Characteristics of *Erwinia amylovora* bacteriophage and its possible role in the epidemiology of fire blight. *Canadian Journal of Microbiology*, 1973, 19: 837–845 (DOI: 10.1139/m73-134)
- 49 Ritchie D.F., Klos E.J. Isolation of *Erwinia amylovora* bacteriophage from aerial parts of apple trees. *Phytopathology*, 1977, 67:101–104 (DOI:10.1094/PHYTO-67-101)
- 50 Müller I. et al. Molecular and physiological properties of bacteriophages from North America and Germany affecting the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbial Biotechnology*, 2011b, 4(6): 735–745 (DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00272.x)
- 51 Akremi I., Holtappels D., Brabra W., Jliidi M., Hadj Ibrahim A., Ali B. et al First report of filamentous phages isolated from tunisian orchards to control *Erwinia amylovora*. *Microorganisms*, 2020, 8: 1762 (DOI: 10.3390/microorganisms8111762)
- 52 Born Y., Fieseler L., Thöny V., Leimer N., Duffy B., Loessner M.J. Engineering of bacteriophages Y2::dpoL1-C and Y2::luxAB for efficient control and rapid detection of the fire blight

pathogen, *Erwinia amylovora*. *Applied Environmental Microbiology*, 2017, 83: e00341-17 (doi: 10.1128/AEM.00341-17)

53 Sabri M., El Handi K., Valentini F., De Stradis A., Achbani E.H., Benkirane R. et al. Identification and characterization of *Erwinia* phage IT22: a new bacteriophage-based biocontrol against *Erwinia amylovora*. *Viruses*, 2022, 14: 2455 (doi: 10.3390/v14112455)

54 Nagy J.K., Schwarczinger I., Künstler A., Pogány M., Király L. Penetration and translocation of *Erwinia amylovora*-specific bacteriophages in apple - a possibility of enhanced control of fire blight. *European Journal of Plant Pathology*, 2015, 142: 815–827 (DOI: 10.1007/s10658-015-0654-3)

55 Leverentz B. et al. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 4519-4526 (doi: 10.1128/AEM.69.8.4519-4526.2003)

56 Frampton R.A., Pitman A.R., Fineran P.C. Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *International Journal of Microbiology*, 2012, 2012: 326452 doi: 10.1155/2012/326452)

57 Jones J. B. et al. Bacteriophages for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 2007, 45: 245-262 (doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094411)

А.Е. ЕЛУБАЕВА<sup>1</sup>, А.Е. МОЛЖИГИТОВА<sup>1</sup>, Д.А. ТЛЕУБЕКОВА<sup>1</sup>, А.Ж. ЖАНУЗАК<sup>1</sup>,  
З.Ж. ТУРЛЫБАЕВА<sup>1</sup>, Ф.С. ДЖАЛИЛОВ<sup>2</sup>, Э.Т. ИСМАИЛОВА<sup>1</sup>, О.Н. ШЕМШУРА<sup>1</sup>,  
Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Микробиология және вирусология ғылыми – өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

<sup>2</sup>К.А. Тимирязев атындағы Ресей мемлекеттік аграрлық университеті, Мәскеу, Ресей

\*e-mail: msyban@mail.ru

## БАКТЕРИОФАГТАР ЖӘНЕ ОЛАРДЫҢ БАКТЕРИЯЛЫҚ КҮЙІКПЕН КҮРЕСУДЕГІ РӨЛІ

### Түйін

Бактериялық күйікке қарсы биологиялық бақылаудың бір түрі – бактериофагтар болып табылады, олар ауру қоздырғышы *Erwinia amylovora* бактериясының жасушаларын лизиске ұшыратады. Бактериофагтардың басқа бақылау құралдарынан басты артықшылығы - олар бактериялардың міндетті паразиттері және экожүйелердің табиғи құрамдас бөлігі болып табылады, сондықтан оларды өсімдіктердің дамуының барлық кезеңдерінде аурудың дамуын болдырмау және тежеу үшін пайдалануға болады. Соңғы жылдары әлемнің жетекші зертханаларында жеміс дақылдарының бактериялық күйік қоздырғышымен күресуде бактериофагтарды қолдану мүмкіндігі зерттелуде. Бұл шолуда бактериофагтар және олардың өсімдіктерді қорғаудағы рөлі туралы деректер жинақталған.

**Кілтті сөздер:** бактериялық күйік, бактериофагтар, *Erwinia amylovora*, бақылау шаралары.



МРНТИ: 68.03.07

А.Е. ЕЛУБАЕВА<sup>1</sup>, А.Е. МОЛЖИГИТОВА<sup>1</sup>, Д.А. ТЛЕУБЕКОВА<sup>1</sup>, А.Ж. ЖАНУЗАК<sup>1</sup>,  
З.Ж. ТУРЛЫБАЕВА<sup>1</sup>, Ф.С. ДЖАЛИЛОВ<sup>2</sup>, Э.Т. ИСМАИЛОВА<sup>1</sup>, О.Н. ШЕМШУРА<sup>1</sup>,  
Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

<sup>2</sup>Российский Государственный Аграрный Университет имени К.А. Тимирязева, Москва,  
Россия

\*e-mail: msyban@mail.ru

## БАКТЕРИОФАГИ И ИХ РОЛЬ В БОРЬБЕ С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ОЖОГОМ

doi:10.53729/MV-AS.2024.02.05

### Аннотация

Одним из средств биологической борьбы с бактериальным ожогом являются бактериофаги, лизирующие клетки бактерии *Erwinia amylovora* – возбудителя данного заболевания. Главное преимущество бактериофагов перед другими средствами борьбы состоит в том, что они являются облигатными паразитами бактерий и естественным компонентом экосистем, в связи с чем их можно использовать для профилактики и сдерживания развития болезни на всех стадиях развития растения. В последние годы в ведущих лабораториях мира изучается возможность применения бактериофагов в борьбе с возбудителем ожога плодовых культур. В настоящем обзоре обобщены данные о бактериофагах и их роли в защите растений.

**Ключевые слова:** бактериальный ожог, бактериофаги, *Erwinia amylovora*, меры борьбы.

Бактериальный ожог – экономически важное заболевание плодовых культур, вызываемое бактерией *Erwinia amylovora*. Возбудитель присутствует в большинстве регионов мира, где выращиваются яблони и груши. *E. amylovora*, представитель семейства *Enterobacteriaceae*, является грамтрицательной, неспорообразующей бактерией, факультативный анаэроб [1-5]. Несмотря на всю филогенетическую нестабильность представителей рода *Erwinia* *E. amylovora* сама по себе является очень стабильным видом. Оптимальная температура роста *E. amylovora* - от 25 до 27°C, но в тоже время патоген способен расти при температуре от 5 до 37°C [6]. Патогенность *E. amylovora* обусловлена пятью факторами: экзополисахаридами, выделяемыми бактерией, кластером генов гиперчувствительности и патогенности, кластером генов, строго специфичных к данному заболеванию и способностью развиваться в окружающей среде [7, 8]. В отличие от близкородственных видов *Pectobacterium*, *E. amylovora* не разлагает клеточную стенку растения-хозяина, так как она не продуцирует пектинразрушающие и целлюлолитические ферменты.

В настоящее время известно около 129 видов растений из 37 родов семейства *Rosaceae*, чувствительных к поражению этой бактерией. Особенно серьезный ущерб болезнь наносит насаждениям айвы, груши, яблони. Так, в США потери, причиненные этой болезнью, достигают 100 миллионов долларов в год. В Казахстане бактериальный ожог впервые был зарегистрирован в начале 2000-х годов, но его ареал из года в год расширяется. За последние 7 лет площади садов, зараженные данной болезнью, выросли в 40 раз.

В разные годы проявление болезни бывает различным и зависит от таких факторов как температура, относительная влажность воздуха, наличие насекомых-переносчиков, общее состояние растений (механические повреждения, физиологические особенности и т.д.), а также наличие патогенных бактерий в насаждениях. Современные методы борьбы с бактериальным ожогом заключаются в применении комплексных мероприятий, направленных на уменьшение количества возбудителя в садовых насаждениях и предотвращении распространения болезни (агротехнические приемы), использование химических агентов (медьсодержащие соединения), антибиотиков, использование

антагонистических микроорганизмов, применение методов генной инженерии как для повышения устойчивости растений-хозяев, так и для устранения различных факторов вирулентности патогена [8-14]. Успех применения химических препаратов против данного заболевания зависит от возможности обеспечения непосредственного контакта их с клетками фитопатогена, что осуществимо на эпифитной стадии развития болезни [15]. Однако, несмотря на различные способы обработки химическими препаратами (инъекции в ствол дерева, распыление), стволовые инъекции антибиотика имеют низкую эффективность по сравнению с применением антибиотика в виде спрея [16].

Все вышеперечисленные методы способствуют снижению количества патогена, однако у каждого из них имеются существенные недостатки. Так, при использовании медьсодержащих препаратов существует опасность накопления в растениях и в почве ионов меди, которые ингибируют развитие не только патогенных, но и других микроорганизмов, а также обладают фитотоксичностью [15]. При применении антибиотиков появляются устойчивые к ним штаммы, и препарат теряет свою эффективность [17]. При использовании же биопрепаратов эффективность бактерий-антагонистов ниже, чем при использовании антибиотиков [18]. Применение трансгенных организмов способно вызвать пагубные изменения в экосистеме и в организме человека и животных. В качестве альтернативы антибиотикам для борьбы с бактериальным ожогом плодовых культур применяют бактерии, грибы, вирусы, а также различные естественные бактериофаги, которые продуцируют эти организмы.

Бактериофаги обладают уникальными свойствами предотвращения заражения бактериальным ожогом, обладая рядом преимуществ по сравнению с химическими препаратами. К преимуществам бактериофагов относятся природное происхождение, специфичность действия, способность к саморепликации [19, 20]. Установлено, что бактериофаги эффективны для борьбы с некоторыми фитопатогенными бактериями, такими как *Erwinia spp.*, которые вызывают бактериальную мягкую гниль [21] и бактериальный ожог яблони и груши [22], *Xanthomonas spp.*, которые вызывают бактериальную пятнистость томата [23, 24], персика [25, 26], герани [27], цитрусовых [28], фитофтороз грецкого ореха [29], фитофтороз листьев лука [30] и рак цитрусовых [28], *Ralstonia solanacearum* (Smith), вызывающей бактериальное увядание табака [31] и *Streptomyces scabies*, вызывающей паршу картофеля [32].

Бактериофаги (фаги) образуют группу специфических бактериальных вирусов, которые заражают бактерии для своей репликации и синтеза вириона и, согласно результатам последних исследований, являются наиболее распространенными живыми существами на планете [33]. В 1915 году Туорт Фредерик описал поражение гнойного стафилококка фильтрующимся агентом. Независимо от Туорта, в 1917 году Феликс д'Эррель (Felix d'Herelle) сообщил об открытии частиц, убивающих бактерии и назвал их «бактериофагами». Бактериофаг представляет собой геном, записанный в виде ДНК или РНК, который упакован в белковую капсулу, иногда покрытую фосфолипидной оболочкой и часто снабженную отростком (хвостом). Отросток бактериофага представляет собой полую трубку, окруженную чехлом, который у некоторых фагов способен сокращаться. На конце отростка есть базальная пластинка, за счет которой происходит узнавание клетки-хозяина, прикрепление к ней вируса, сокращение хвостового чехла и инвазия нуклеиновой кислоты вируса в бактериальную клетку [34].

Иногда встречаются бактериофаги, у которых хвост отсутствует. Они, как правило, округлой или нитевидной формы. Основное преимущество использования бактериофагов по сравнению с антибиотиками заключается в том, что они не могут вызвать дисбактериоз, поскольку заражают только бактерий-хозяев [35]. После инокуляции фагами, естественный микробиом растения содержит полный спектр полезных микроорганизмов. Специфика фаговой инфекции в основном обусловлена взаимодействием фагов с бактериями-хозяевами и осуществляется главным образом путем адсорбции вириона на поверхности клетки-хозяина [36] и развитием механизмов фаговой защиты [37].

### Классификация бактериофагов

Бактериофаги делятся на группы по морфологии вириона – по наличию или отсутствию хвоста, его структуре, по наличию белкового капсида фосфолипидной оболочки и по нуклеиновой кислоте, в виде которой записан геном фага. Согласно International Committee on Taxonomy of Viruses принята единая классификация бактериофагов [38].

По результату инфицирования бывают вирулентные (истинные), умеренные и фаги с непрерывным циклом развития. Вирулентные фаги – это фаги, под действием которых происходит лизис клетки бактерии-хозяина с последующим освобождением дочерних фагов. Описан механизм инфицирования бактериальной клетки вирулентным бактериофагом: в строго определенном месте на внешней мембране бактерии фаг прикрепляется хвостовым отростком к бактериальной клетке и, выделяя комплекс ферментов, растворяет клеточную стенку. После этого, содержимое головки фага через канал отростка переходит внутрь клетки. Мелкие же сферические фаги попадают в бактерии без участия отростка. Под влиянием нуклеиновой кислоты фага прекращается синтез бактериальных белков, ДНК и РНК, и начинается синтез нуклеиновой кислоты и фаговых белков. Часть этих белков - ферменты, другая часть образует оболочку зрелой частицы бактериофага (таблица).

Таблица - Классификация фаговых частиц

Таксономическая единица	Нуклеиновая кислота, размер
Порядок <i>Caudovirales</i>	dsДНК (L), без оболочки
Семейство	
<i>Myoviridae</i>	без оболочки, с линейной двухцепочечной ДНК, с сокращающимся хвостом
<i>Siphoviridae</i>	без оболочки, с линейной двухцепочечной ДНК, с длинным несокращающимся хвостом
<i>Podoviridae</i>	без оболочки, с линейной двухцепочечной ДНК, с коротким хвостом
<i>Microviridae</i>	без оболочки, с кольцевой одноцепочечной ДНК, изометрические
<i>Corticoviridae</i>	без оболочки, с кольцевой двухцепочечной ДНК, изометрические
<i>Tectiviridae</i>	без оболочки, с линейной двухцепочечной ДНК, изометрические
<i>Leviviridae</i>	без оболочки, с линейной одноцепочечной РНК, изометрические
<i>Cystoviridae</i>	покрыты оболочкой, с сегментированной двухцепочечной РНК, сферические
<i>Inoviridae</i>	без оболочки, с кольцевой одноцепочечной ДНК, нитевидные
<i>Plasmaviridae</i>	покрыты оболочкой, с кольцевой двухцепочечной ДНК, плейоморфные

Бактериофаги далеко не во всех случаях вызывают быструю гибель бактериальной клетки. Многие из них способны встраиваться в геном бактерии и некоторое время не поражать клетку-хозяина. Такие фаги называют лизогенными, или умеренными. Умеренные фаги в жизненном цикле могут развиваться по двум направлениям: вовлекаться в литический цикл или превращаться в профаг с дальнейшим развитием по лизогенному пути. Умеренные фаги, встраиваясь в геном бактерий, могут за счет вставки новых генов или повреждения уже имеющихся, ускорять эволюцию своих хозяев в ходе заражения и увеличивать их патогенность.

При заражении клетки-хозяина фагами с непрерывным циклом развития в ней постоянно образуются и выделяются фаги. Фаг освобождается через специфические поры в клетке, причем в ходе освобождения происходит его созревание – нуклеиновая кислота покрывается белковой оболочкой [39, 40]. Кроме перечисленных трех групп бактериофагов известны фаги, вступающие в псевдолизогенные отношения с клеткой, при которых наблюдается временное сосуществование вирулентных бактериофагов и чувствительных к ним бактерий.

В ходе эволюции у бактериофагов выработались эффективные механизмы инфицирования бактериальных клеток. Так, бактериофаги вырабатывают белки, которые принимают участие в лизисе бактерий-хозяев. Протеины бактериофагов можно разделить на две основные группы - разрушающие клеточные покровы (пептидогликан, клеточную мембрану, бактериальную капсулу) и нарушающие репликацию бактериальной ДНК, транскрипцию, синтез белков и деление клетки [41]. В фаготерапии в настоящее время рассматривается возможность использования протеинов. Полисахаридный слой, которым окружена бактерия, фаги преодолевают при помощи энзимов, обладающих определенной ферментативной активностью. Демполимеразы могут находиться в виде свободно диффундирующих белков или как компонент фаговых частиц. При проникновении фагов внутрь бактериальной клетки пептидогликановая оболочка бактерий разрушается под действием пептидогликан-лизирующих ферментов (лизоцимподобные мурамидазы, N – ацетилмурамоил-L-аланин-амидазы, эстеразы и пептидазы). Пептидогликан-лизирующие ферменты бактериофагов способны лизировать только те виды или подвиды бактерий, против которых направлены фаги, т. е. они являются высокоспецифичными.

В настоящее время описано множество разнообразных механизмов, которые позволяют бактериальной клетке устранять фаговую инфекцию, которые включают регуляцию, мутацию и маскирование фаговых рецепторов [42], рестрикцию и модификацию ДНК (RM) [43], систему иммунного ответа на основе CRISPR/Cas [44, 45] и «абортивную систему» (AIS). Системы «абортивной инфекции» представляют собой запрограммированную гибель клеток (или перевод их в состояние покоя) при заражении, что приводит к остановке распространения фага внутри бактериальной популяции [46].

### **Использование бактериофагов в борьбе с бактериальным ожогом**

В защите растений бактериофаги фитопатогенных бактерий первоначально рассматривались лишь как диагностическое средство для идентификации и дифференциации изолятов *E. amylovora*, выделенных из растений семейства *Rosaceae*, а также для определения взаимодействия фаг-бактерия [47]. Впервые использование фаговых частиц в борьбе с бактериальным ожогом было описано в 1973 году [48, 49]. С тех пор были созданы разные модели изучения вирулентности *E. amylovora* и ее взаимодействие с фагами. Для экспериментов обычно используются незрелые плоды, цветки и стебли. Фруктовые дольки инокулируют суспензией с фагами, нанося пипеткой на поверхность среза. Эта модель является наиболее приемлемой для изучения взаимодействия *E. amylovora* и фагов в плодах. Ингибирование *E. amylovora* измеряется путем оценки размера и внешнего вида некротических пятен, а также путем оценки развития симптомов болезни. Мюллер и др. протестировал 4 разных фага данным методом. Было установлено, что фаги phiEa1h и phiEa100 снижают количество возбудителя всего на 40%, тогда как при обработке фагами phiEa104 и phiEa100 phiEa116 проявление симптомов уменьшается на 90% [50]. Акреми и др. выявили, что ассоциация, состоящая из четырех нитчатых фагов, значительно уменьшает симптомы развития болезни груши [51].

При проведении экспериментов на цветках, инокулирование их рекомбинантным фагом Y2::dpoL1- C (102 КОЕ/мл) вызывало уменьшение конечного числа бактериальных клеток примерно на 2% [52]. Чтобы предотвратить колонизацию возбудителя в цветках инокуляцию фагами нужно проводить до распространения болезни. Обработку цветков обычно проводят распылением. При этом время и дозировка имеют важное значение для

повышения эффективности обработки. Остается непонятным как долго фаги остаются жизнеспособными после распыления целых деревьев. Поскольку фаги неподвижны, они возникают случайным образом и поражают бактерий-хозяев путем пассивной диффузии. В связи с этим, для эффективного контроля болезни необходимо проводить масштабную обработку фагами, поскольку цветок должен быть покрыт ими однородно и плотно. Если площадь обработки слишком маленькая, *E. amylovora* не заражается фагами.

Еще один способ изучения эффективности бактериофагов при бактериальном ожоге был продемонстрирован Sabri и др. Авторы вводили *E. amylovora* в стебель растений груши с последующим введением путем инъекции фага ET-IT22 в то же место. После 40 дней после инокуляции обработанные растения оставались без изменения [53]. Nagy et al. обработали фагами phiEa104 и H5K корни яблони, после чего инфекционные вирионы были повторно выделены из ствола дерева. Было выявлено значительное уменьшение симптомов бактериального ожога [54]. По-видимому, фаги эффективно распространяются по тканям растения (от корня и далее по стволу к разным органам дерева). Способность перемещения бактериофагов *E. amylovora* в восходящем и нисходящем направлениях позволяет предположить перспективность использования бактериофагов для эндогенного контроля патогена.

Самым убедительным способом демонстрации эффективности фагов в сельском хозяйстве являются это тепличные или полевые испытания. В целом, фаги следует использовать для предотвращения инфекции в период цветения, а не для лечения зараженных деревьев, когда бактерии уже распространились в ксилеме.

Существует ряд проблем, которые могут препятствовать широкому применению фаготерапии в борьбе с патогенами растений. На активность фагов а, следовательно, на их эффективность как агентов биологической борьбы, существенное влияние оказывает рН среды. Так, установлено, что фаги грамположительной бактерии *Listeria monocytogenes* на поверхности кусочков яблок с рН 4,37 были нестабильны, в то время как на поверхности дыни, где рН была 5,77, фаги успешно лизировали патоген [55]. Кроме рН, температура также оказывает влияние как на выживаемость фагов, так и на их способность лизировать клетки бактерий.

Одним из главных достоинств использования фагов состоит в том, что они являются естественными компонентами экосистем, так как везде, где есть бактерии, присутствуют и их бактериофаги [56]. Важным свойством фагов является их способность самовоспроизводиться [57]. Кроме того, большинство фагов являются высокоспецифичными организмами, поражающими только определенные бактерии и не наносят ущерб другим, в том числе, полезным микроорганизмам. Это дает возможность использовать их с другими бактериальными антагонистами для усиления борьбы с возбудителями болезней.

Таким образом, одним из элементов системы защиты садов от бактериального ожога плодовых культур может быть фаготерапия – использование бактериофагов, способных лизировать клетки бактерий. В настоящее время в лабораториях мира исследуется возможность применения фаготерапии в борьбе с бактериальным ожогом плодовых. Нетоксичность фагов в отношении эукариот позволяет применять их там, где противопоказаны химические методы борьбы с бактериями. Препараты на основе бактериофагов достаточно просто производить без серьезных экономических затрат. Их можно долго хранить и применять с использованием стандартного оборудования. Кроме того, преимуществом фаготерапии заключается в том, что фаги действуют только на бактерий хозяев и не представляют опасности для других организмов, а препараты на основе бактериофагов достаточно просто производить в промышленных масштабах. Бактериофаги способны сдерживать проявление бактериального ожога плодовых культур и могут применяться в комплексе с другими мероприятиями по предотвращению распространения данного заболевания.

## Финансирование

Данное исследование финансировалось Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (ИРН BR8574022).

## Литература:

- 1 Rosselo M., Pefialver J., Llop P., Gorris M.T., Chartie, R., Garcia F., Monton C., Cambra M., Lopez M.M. Identification of an *Erwinia* sp. from Different *Erwinia amylovora* and Responsible for Necrosis on Pear Blossoms. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2006, 28: 30-41 (<http://dx.doi.org/10.1080/07060660609507268>)
- 2 Drenova N.V., Isin M.M., Dzhamurzina A.A., Zharmukhamedova G.A., Aitkulov A.K. Bacterial fire blight in the Republic of Kazakhstan. *Plant Health: Research and Practice*, 2013, 3: 44–48
- 3 Vrancken K., Holtappels M., Schoofs H., Deckers T., Valcke R. Pathogenicity and Infection Strategies of the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora* in *Rosaceae*: State of the Art. *Microbiology*, 2013, 159: 823-832 (<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.064881-0>)
- 4 Schroth M.N., Thomson S.V., Hildebrand D.C., Moller W.J. Epidemiology and Control of Fire Blight. *Annual Review of Phytopathology*, 1974, 12: 389-412 (<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.12.090174.002133>)
- 5 Malnoy M., Martens S., Norelli J.L., Barny M.A., Sundin G.W., Smits T.H., Duffy B. Fire blight: applied genomic insights of the pathogen and host. *Annual Review of Phytopathology*, 2012, 50: 475-494 (DOI: 10.1146/annurev-phyto-081211-172931)
- 6 Braun P.C. Epidemiology of fire blight of floricanne fruiting red raspberry caused by *Erwinia amylovora*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2006, 28(1): P. 95-99 (<https://doi.org/10.1080/07060660609507275>)
- 7 Piqué N., Miñana-Galbis D., Merino S., and Tomás J.M. Virulence Factors of *Erwinia amylovora*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(6): 12836–12854 (doi: 10.3390/ijms160612836)
- 8 Johnson K.B., Stockwell V.O. Management of fire blight: A case study in microbial ecology. *Annual Review of Phytopathology*, 1998, 36: 227–248 (doi: 10.1146/annurev.phyto.36.1.227)
- 9 Norelli J.L., Jones A.L., Aldwinckle H.S. Fire blight management in the twenty-first century: Using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Disease*, 2003, 87: 756–765 (doi: 10.1094/PDIS.2003.87.7.756)
- 10 Stockwell V.O., Duffy B. Use of antibiotics in plant agriculture. *Review of Science and Technology*, 2012, 31: 199–210 (doi: 10.20506/rst.31.1.2104)
- 11 Bastas K. K. Management of *Erwinia amylovora* by Potential Bio-Pesticides *in vitro* and *in vivo* Conditions. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 2020, 8(sp1): 38–45 (<https://doi.org/10.24925/turjaf.v8isp1.38-45.3933>)
- 12 Paulin J.P., Lachaud G. Comparison of the Efficiency of Some Chemicals in Preventing Fire Blight Blossom Infections. *Acta Horticulturae*, 1984, 151: 209-214 (<http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.1984.151.27>)
- 13 Ordax M. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 3482-3488 (DOI: 10.1128/AEM.72.5.3482-3488.2006)
- 14 Fried A., Schell E., Moltmann E., Wensing A. Control of fire blight in Baden-Württemberg at the end of the streptomycin era. *Acta horticulturae*, 2013, 1056: 55-56 (DOI: 10.17660/ActaHortic.2014.1056.5)
- 15 Ryu D.K., Adhikari M., Choi D.H., Jun K.J., Kim D.H., Kim C.R., Kang M.K., Park D.H. Copper-Based Compounds against *Erwinia amylovora*: Response Parameter Analysis and Suppression of Fire Blight in Apple. *Plant Pathology Journal*, 2023, 39(1): 52-61 (doi: 10.5423/PPJ.OA.07.2022.0100)
- 16 Parcey M., Gayder S., Morley-Senkler V., Bakkeren G., Ramón Úrbez-Torres J., Ali S., Castle A.J., Svircev A.M. Comparative genomic analysis of *Erwinia amylovora* reveals novel insights in phylogenetic arrangement, plasmid diversity, and streptomycin resistance. *Genomics*, 2020, 112(5): 3762-3772 (<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.04.001>)
- 17 Rekanovic E., Miliasevic S., Filajdic N., Gavrilovic V. Efficacy of antibiotics and copper compounds in *erwinia amylovora* control in serbia. *Acta Hortic*, 2008, 800: 875-878 (<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.800.118>)
- 18 Zengerer V., Schmid M., Bieri M., Müller D. C., Remus-Emsermann M. N. P., Ahrens C. H. *Pseudomonas orientalis* F9: a potent antagonist against phytopathogens with phytotoxic effect in the apple flower. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 145 (DOI: 10.3389/fmicb.2018.00145)
- 19 Gill J.J., Svircev A.M., Smith R., Castle A.J. Bacteriophages of *Erwinia amylovora*. *Applied Environmental Microbiology*, 2003, 69(4): 2133-8 (doi: 10.1128/AEM.69.4.2133-2138.2003)

- 20 Kim S.G., Lee S.B., Giri S.S., Kim H.J., Kim S.W., Kwon J., Park J., Roh E., Park S.C. Characterization of Novel *Erwinia amylovora* Jumbo Bacteriophages from Eneladusvirus Genus. *Viruses*, 2020, 3012(12): 1373 (doi: 10.3390/v12121373)
- 21 Balogh B., Jones J.B., Iriarte F.B., Momol M.T. Phage therapy for plant disease control. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2010, 11: 48–57 (<http://dx.doi.org/10.2174/138920110790725302>)
- 22 Ravensdale M., Blom T.J., Gracia-Garza J.A., Svircev A.M., Smith R.J., Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora subsp carotovora*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2007, 29: 121–130 (<http://dx.doi.org/10.1080/07060660709507448>)
- 23 Balogh B., Jones J.B., Momol M.T., Olson S.M., Obradovic A., Jackson L.E. Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Disease*, 2003, 87: 949–954 (DOI: 10.1094/PDIS.2003.87.8.949)
- 24 Flaherty J.E., Jones J.B., Harbaugh B.K., Somodi G.C., Jackson L.E. Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with H-mutant bacteriophages. *Horticultural Science*, 2000, 35: 882–884 (DOI: 10.21273/HORTSCI.35.5.882)
- 25 Civerolo E.L., Kiel H.L. Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. *Phytopathology*, 1969, 59: 1966–1967 (<https://www.scienceopen.com/document?vid=aed17f75-1161-4ac8-a1e0-ea7defff8c41&sort=3>)
- 26 Saccardi A., Gambin E., Zaccardelli M., Barone G., Mazzucchi U. *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* control trials with phage treatments on peaches in the orchard. *Phytopathologia Mediterranea*, 1993, 32: 206–210 (<https://www.jstor.org/stable/42685898>)
- 27 Flaherty J.E., Harbaugh B.K., Jones J.B., Somodi G.C., Jackson L.E. H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium. *Horticultural Science*, 2001, 36: 98–100 (<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.36.1.98>)
- 28 Balogh B., Canteros B.I., Stall R.E., Jones J.B. Control of citrus cancer and citrus bacterial spot with bacteriophages. *Plant Disease*, 2008, 92: 1048–1052 (DOI: 10.1094/PDIS-92-7-1048)
- 29 McNeil D.L., Romero S., Kandula J., Stark C., Stewart A., Larsen S. Bacteriophages: a potential biocontrol agent against walnut blight (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*). *N. Z. Plant Protect-SE.*, 2001, 54: 220–224 (DOI: <https://doi.org/10.30843/nzpp.2001.54.3743>)
- 30 Lang J.M., Gent D.H., Schwartz H.F. Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with bacteriophages and a plant activator. *Plant Disease*, 2007, 91: 871–878 (DOI: 10.1094/PDIS-91-7-0871)
- 31 Tanaka H., Negishi H., Maeda H. Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. *Japanese Journal of Phytopathology*, 1990, 56: 243–246 (<https://doi.org/10.3186/jjphytopath.56.243>)
- 32 McKenna F., El-Tarabily K.A., Hardy G.E.S.T., Dell B. Novel *in vivo* use of a polyvalent *Streptomyces* phage to disinfest *Streptomyces* scabies-infected seed potatoes. *Plant Pathology*, 2001, 50: 666–675 (DOI: 10.1046/j.1365-3059.2001.00648.x)
- 33 Besarab N.V., Letarova M.A., Babenko V.V., Belalov I.S., Golomidova A.K., Kulikov E.E., Lagonenko A.L., Evtushenkov A.N., Letarov A.V. The metastable associations of bacteriophages and *Erwinia amylovora*. *Archives Microbiology*, 2023, 205(5): 214 (doi: 10.1007/s00203-023-03550-8)
- 34 Schnabel E.L., Fernando W.G.D., Meyer M.P., Jones A.L., Jackson L.E. Bacteriophage of *Erwinia amylovora* and their potential for biocontrol. *Acta Horticulturae*, 1999, 489: 649–654 (10.17660/ActaHortic.1999.489.116)
- 35 Federici S., Kviatcovsky D., Valdés-Mas R., Elinav E. Microbiome-phage interactions in inflammatory bowel disease. *Clinical Microbiology and Infection*, 2023, 29(6): 682–688 (<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.08.027>)
- 36 Mourosi T.J., Awe A., Guo W., Batra H., Ganesh H., Wu X., Zhu J. Understanding bacteriophage tail Fiber Interaction with host surface receptor: the key “Blueprint” for reprogramming phage host range. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23: 12146 (doi: 10.3390/ijms232012146)
- 37 Pfeifer E., Sousa J.M., Touchon M., Rocha E.P. When bacteria are phage playgrounds: interactions between viruses, cells, and mobile genetic elements. *Current Opinion in Microbiology*, 2022, 70: 102230 (DOI: 10.1016/j.mib.2022.102230)
- 38 International Committee on Taxonomy of Viruses (<http://ictvonline.org/virustaxonomy.asp>)
- 39 Sabri M., El Handi K., Valentini F., De Stradis A., Achbani E.H., Benkirane R., Resch G., Elbeaino T. Identification and Characterization of *Erwinia* Phage IT22: A New Bacteriophage-Based Biocontrol against *Erwinia amylovora*. *Viruses*, 2022, 14(11): 2455 (doi: 10.3390/v14112455)
- 40 Blakely G.W. Smarter than the average phage. *Molecular Microbiology*, 2004, 54 (4): 851–854 (10.1111/j.1365-2958.2004.04330.x.)

- 41 Federici S., Kviatcovsky D., Valdés-Mas R., Elinav E. Microbiome-phage interactions in inflammatory bowel disease. *Clinical Microbiology and Infection*, 2023, 29(6): 682-688 (<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.08.027>)
- 42 Harvey H., Bondy-Denomy J., Marquis H., Sztanko K.M., Davidson A.R., Burrows L.L. *Pseudomonas aeruginosa* defends against phages through type IV pilus glycosylation. *Nature Microbiology*, 2017, 3: 47–52 (DOI: 10.1038/s41564-017-0061-y)
- 43 Tock M.R., Dryden D.T. The biology of restriction and anti-restriction. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8: 466–472 (DOI: 10.1016/j.mib.2005.06.003)
- 44 Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315: 1709–1712 (<https://pure.psu.edu/en/publications/crispr-provides-acquired-resistance-against-viruses-in-prokaryote>)
- 45 Dupuis M-È., Villion M., Magadán A.H., Moineau S. CRISPR-Cas and restriction–modification systems are compatible and increase phage resistance. *Nature Communications*, 2013, 4: 2087 (<https://www.nature.com/articles/ncomms3087>)
- 46 Dy R.L., Richter C., Salmond G.P.C., Fineran P.C. Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections. *Annual Review of Virology*, 2014, 1: 307–331 (DOI: 10.1146/annurev-virology-031413-085500)
- 47 Vrancken K., Holtappels M., Schoofs H., Deckers T., Valcke R. Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in *Rosaceae*: state of the art. *Microbiology (Reading)*, 2013, 159: 823-832 (doi: 10.1099/mic.0.064881-0. Epub 2013)
- 48 Erskine J.M. Characteristics of *Erwinia amylovora* bacteriophage and its possible role in the epidemiology of fire blight. *Canadian Journal of Microbiology*, 1973, 19: 837–845 (DOI: 10.1139/m73-134)
- 49 Ritchie D.F., Klos E.J. Isolation of *Erwinia amylovora* bacteriophage from aerial parts of apple trees. *Phytopathology*, 1977, 67:101–104 (DOI:10.1094/PHYTO-67-101)
- 50 Müller I. et al. Molecular and physiological properties of bacteriophages from North America and Germany affecting the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbial Biotechnology*, 2011b, 4(6): 735–745 (DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00272.x)
- 51 Akremi I., Holtappels D., Brabra W., Jlidi M., Hadj Ibrahim A., Ali B. et al First report of filamentous phages isolated from tunisian orchards to control *Erwinia amylovora*. *Microorganisms*, 2020, 8: 1762 (DOI: 10.3390/microorganisms8111762)
- 52 Born Y., Fieseler L., Thöny V., Leimer N., Duffy B., Loessner M.J. Engineering of bacteriophages Y2::dpoL1-C and Y2::luxAB for efficient control and rapid detection of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Applied Environmental Microbiology*, 2017, 83: e00341-17 (doi: 10.1128/AEM.00341-17)
- 53 Sabri M., El Handi K., Valentini F., De Stradis A., Achbani E.H., Benkirane R. et al. Identification and characterization of *Erwinia* phage IT22: a new bacteriophage-based biocontrol against *Erwinia amylovora*. *Viruses*, 2022, 14: 2455 (doi: 10.3390/v14112455)
- 54 Nagy J.K., Schwarczinger I., Künstler A., Pogány M., Király L. Penetration and translocation of *Erwinia amylovora*-specific bacteriophages in apple - a possibility of enhanced control of fire blight. *European Journal of Plant Pathology*, 2015, 142: 815–827 (DOI: 10.1007/s10658-015-0654-3)
- 55 Leverentz B. et al. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(8): 4519-4526 (doi: 10.1128/AEM.69.8.4519-4526.2003)
- 56 Frampton R.A., Pitman A.R., Fineran P.C. Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *International Journal of Microbiology*, 2012, 2012: 326452 doi: 10.1155/2012/326452)
- 57 Jones J. B. et al. Bacteriophages for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 2007, 45: 245-262 (doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094411)