



Doctoral Thesis

Characterization of bacteriophages for the control and detection of *Erwinia Amylovora*

Author(s):

Born, Yannick

Publication Date:

2012

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007554444> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 20518

**CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGES FOR THE CONTROL
AND DETECTION OF *ERWINIA AMYLOVORA***

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

YANNICK RAPHAEL BORN

MSc ETH in Biology

born March 11, 1984

citizen of Niederbipp BE, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin J. Loessner, examiner

Dr. Brion Duffy, co-examiner

2012

Summary

The Gram-negative bacterium *Erwinia amylovora* is the causative agent of fire blight, a devastating plant disease affecting members within the *Rosaceae* family. Since its first observation in 1780, the disease has become a global threat to commercial production of pome fruit (e.g., apple and pear). It causes high economic losses every year due to sanitation labor and the loss of crop. In Switzerland, fire blight was first reported in 1989. Since then, the disease has spread to every canton. In 2007, a severe outbreak caused compensation costs of 30 million CHF. More than 100 hectares (~ 250,000 trees) of orchards and 10,000 old-growth trees had to be cleared. As a consequence, the Swiss Federal Office for Agriculture approved the restricted application of streptomycin to control fire blight in 2008. The permission was renewed in the following years. Application of antibiotics is currently the most reliable control measure. However, extensive use of antibiotics forwarded the development of resistant strains in some countries and alternative control methods are in urgent demand.

The interest in bacteriophage (phage) therapy experienced a comeback in human health, food industry, and agriculture due to the emergence of antibiotic-resistant strains. Phages, the most abundant group of biological entities on earth, are very specific, non-toxic, and self-limiting viruses of bacteria. Virulent phages without the ability to integrate their DNA into the host genome are regarded as promising alternatives to conventional control methods. In this study, phages specific for *E. amylovora* were isolated, characterized, and their potential to control and detect the fire blight pathogen was evaluated.

A diverse set of *E. amylovora* phages was extracted from soil samples of fruit production environments in Switzerland. The isolates could be assigned to 24 groups based on molecular and morphological analyses. They all belong to the families of *Myoviridae* and *Podoviridae* of the order of *Caudovirales*. Their infectivity on a representative collection of *E. amylovora* strains was analyzed. Most phages were found to possess broad host ranges and specificity towards *E. amylovora*. Based on the initial screening, four phages (L1, M7, S6, and Y2) were selected for detailed characterization and genome sequencing. Phages L1 and S6, members of the *Podoviridae*, feature genome sizes of 39.3 kbp and 74.7 kbp, respectively. The myoviruses M7 and Y2 were found to have genomes of 84.7 kbp and 56.6 kbp in size, respectively. The four phages possess genomes with direct terminal repeats of different lengths, which render them unlikely to transduce host DNA. The genomes are organized into function-specific gene clusters, which is typical for tailed-phages. No genes related to lysogeny could be detected, proving that all four phages are strictly lytic. Comparative genomics indicated relationship to other phages of *Enterobacteriaceae*. L1 is T7-like, M7 is closely related to Felix O1, S6 is a N4-like phage,

and Y2 is a relative of Φ EcoM-GJ1. L1, S6, and Y2 were found to be novel among *E. amylovora* phages. M7 shares significant homologies with another phage infecting *E. amylovora*, Φ Ea21-4.

The combination L1/Y2 synergistically prevented growth of the pathogen *in vitro*. DpoL1, a depolymerase encoded by L1, was identified to be responsible for the enhanced efficacy of Y2. Depolymerases degrade extracellular polysaccharides (EPS) of bacteria. It is likely that a certain part of encapsulated cells remains uninfected since the EPS-capsule impedes efficient infection by Y2, unless DpoL1 is added to the growth medium. Consequently, DpoL1 did not add to an increased efficacy of Y2 on an EPS-deletion mutant and on a strain, which innately produces low amounts of EPS. The EPS of *E. amylovora* is composed of amylovoran and levan with the first being a major virulence factor. In fact, DpoL1 was found to cleave the galactose backbone of amylovoran and to be most active at pH 6 and 50°C. The enzyme has a modular architecture. The N-terminal domain mediates attachment to the phage-particle, while the C-terminus exhibits enzymatic function. Antibodies raised against the depolymerase cross-linked the L1 phage particles at their tails either lateral or frontal. Labeling of these antibodies with secondary, gold-conjugated antibodies demonstrated that the depolymerase is located at the tail spikes of L1.

The synergistic effect between the depolymerase enzyme and phage Y2 was combined by molecular engineering of Y2. An N-truncated version of the DpoL1 gene (*dpoL1-C*) was integrated into the genome of Y2, downstream the major capsid gene via homologous recombination. The additional DNA did not cause loss of other sequence information. Y2::*dpoL1-C* produced clear plaques surrounded by a halo indicating enzyme activity. The recombinant phage showed enhanced control efficacy *in vitro* compared to Y2, and mediated significant reduction of *E. amylovora* on detached flowers.

Phage treatment also reduced viable cells on apple flowers in the greenhouse. However, no relief of symptoms could be achieved. This might be attributed to the instability of phage particles. In general, phages applied in the environment can be adversely affected by various factors. UV irradiation is known to be most detrimental. Therefore, phages should be protected for realizing their full beneficial potential. Various readily available, natural, and non-toxic substances were shown to protect *E. amylovora* phages from UV-mediated inactivation. Extracts of carrot, red pepper and beetroot significantly decreased the decay of phage particles, based on their carotenoid and betalaine pigments. The carotenoid astaxanthin, aromatic amino acids, soy peptone, and casein also provided significant UV protection.

In addition to biocontrol, bacteriophages can be used for detection purposes due to their high specificity. The same recombination strategy as for Y2::*dpoL1-C* was applied to construct a bioluminescent reporter phage. A fused luciferase gene (*luxAB*) from *Vibrio*

harveyi was introduced into the genome of Y2. Integration of additional DNA caused no adverse effect on the recombinant phage. Y2::*luxAB* induces the expression of luciferase in infected *E. amylovora* cells, which catalyzes the production of light emission upon the addition of a substrate. The expression of luciferase was highest at 22°C, 50 min post-infection. Interestingly, the light emission could be increased by supplementing the cultures with DpoL1. This supports the findings from the infection experiments and is clear evidence that DpoL1 facilitates the infection of encapsulated cells by Y2. Y2::*luxAB* could directly detect 3.6×10^3 CFU/ml and provides an interesting alternative to conventional detection methods. It is superior to ELISA-based tests with regard to sensitivity, it detects viable cells only in contrast to PCR, and it is much faster than culture-based methods.

Zusammenfassung

Der Feuerbrand ist eine verheerende Pflanzenkrankheit, die vom Gram-negativen Bakterium *Erwinia amylovora* verursacht wird. Die Krankheit betrifft vor allem Rosengewächse (*Rosaceae*) wie zum Beispiel Apfel- oder Birnbäume. Seit dem ersten dokumentierten Auftreten im Jahr 1780 hat sich der Feuerbrand weltweit ausgebreitet. Der Aufwand, um die Krankheit zu kontrollieren, sowie Ernteauffälle verursachen jährlich hohe Kosten. In der Schweiz trat der Feuerbrand erstmals 1989 auf und wurde mittlerweile in jedem Kanton gemeldet. Im Jahr 2007 verursachte ein schwerer Ausbruch Entschädigungskosten in der Höhe von 30 Millionen Schweizer Franken. In Obstanlagen mussten mehr als 100 Hektaren (~ 250'000 Bäume) gerodet, sowie 10'000 Hochstammbäume gefällt werden. Als direkte Folge hat das Schweizer Bundesamt für Landwirtschaft das Antibiotikum Streptomycin für das folgende Jahr mit Auflagen zugelassen. Diese Bewilligung wurde in den vergangenen Jahren jeweils erneuert. Die Antibiotikatherapie ist gegenwärtig die zuverlässigste Kontrollmassnahme. Allerdings haben sich in Ländern, wo Streptomycin grossflächig angewendet wird, resistente Bakterien entwickelt. Zudem fehlt für den Einsatz von Antibiotika in der Landwirtschaft je länger je mehr die Akzeptanz der Konsumenten. Aus diesen Gründen sind alternative Methoden gefragt.

Die Bekämpfung pathogener Keime mit Bakteriophagen (Phagen) stösst in der Medizin, Lebensmittelindustrie und Landwirtschaft wegen Antibiotika-resistenter Bakterien vermehrt auf Interesse. Phagen sind Viren, die Bakterien infizieren. Sie sind die zahlreichsten biologischen Einheiten auf der Erde. Sie sind sehr spezifisch, ungiftig und können sich in der Abwesenheit eines geeigneten Wirtes nicht vermehren. Virulente Phagen, die ihre DNS nicht ins Wirtsgenom integrieren können, sind deshalb eine vielversprechende Alternative zu herkömmlichen Kontrollmethoden. In der vorliegenden Arbeit wurden *E. amylovora* spezifische Phagen isoliert und charakterisiert und es wurde untersucht, ob sie sich für die Kontrolle und den Nachweis des Feuerbranderreger eignen.

Zur Isolierung wurden Bodenproben von Schweizer Obstanlagen verwendet. Molekulare und morphologische Analysen zeigten, dass es sich um 24 unterschiedliche Phagen handelt. Jedes Isolat konnte einer von zwei Familien zugeordnet werden; den *Myoviridae* oder den *Podoviridae*, welche beide zur Ordnung der *Caudovirales* gehören. Es wurde getestet, ob sich die Phagen in Bakterienstämmen aus einer repräsentativen Sammlung vermehren können. Die meisten Stämme wurden von einer Mehrheit der Phagen infiziert. Aufgrund der ersten Charakterisierung wurden vier Phagen (L1, M6, S6 und Y2) ausgewählt und ihre Genome sequenziert. Die Genome der Podoviren L1 und S6 haben eine Grösse von 39.3 kbp bzw. 74.7 kbp, diejenigen der Myoviren M7 und Y2 sind 84.7 kbp bzw. 56.6 kbp gross. Die DNS-Moleküle dieser Phagen haben die gleiche physikalische Struktur. Jeder

Phage besitzt an den Enden seines Genoms identische, repetitive Sequenzen. Dieser Aufbau verhindert, dass die Phagen Wirts-DNS transduzieren können. Die Genome konnten in sogenannte Gencluster eingeteilt werden. Die genetische Information von Proteinen, die im gleichen Stadium der Phagenvermehrung benötigt werden, befindet sich im gleichen Cluster. Dies ist typisch für Phagen der Ordnung *Caudovirales*. Gene, die im Zusammenhang mit Lysogenie stehen, konnten nicht identifiziert werden. Die *E. amylovora* Phagen sind nahe verwandt mit Phagen, die andere *Enterobacteriaceae* infizieren. Konkret wurden Ähnlichkeiten zwischen L1 und T7, M7 und Felix O1, S6 und N4, sowie Y2 und Φ EcoM-GJ1 gefunden. *E. amylovora* spezifische Phagen vom Typ L1, S6 oder Y2 wurden im Gegensatz zu M7 noch nicht beschrieben. M7 ist nahe verwandt mit Φ Ea21-4.

Die Kombination L1/Y2 hemmt das Wachstum von *E. amylovora* synergistisch. DpoL1, eine von L1 kodierte Depolymerase, ist dabei für die erhöhte Aktivität von Y2 verantwortlich. Depolymerasen bauen extrazelluläre Polysaccharide (EPS) von Bakterien ab. Mit grosser Wahrscheinlichkeit schützt die Kapsel einen bestimmten Anteil an Zellen vor der Infektion durch Y2. Diese uninfizierten Zellen können von Y2 nur dann erreicht und infiziert werden, wenn DpoL1 zum Medium gegeben wird. Deshalb ist es nicht erstaunlich, dass dieser synergistische Effekt bei einer EPS-Deletionsmutanten oder einem Stamm, der natürlicherweise wenig EPS produziert, nicht auftrat. EPS von *E. amylovora* besteht aus Amylovoran und Levan, wobei Ersteres ein wichtiger Virulenzfaktor ist. Tatsächlich schneidet DpoL1 im Galaktose Rückgrat von Amylovoran. Die Aktivität ist vom pH-Wert und der Temperatur abhängig, wobei sie am höchsten bei pH 6 und 50°C ist. Das Enzym ist in zwei Domänen aufgeteilt. Mittels dem N-Terminus wird das Protein am Virus befestigt, während die enzymatische Domäne im C-Terminus lokalisiert ist. Gegen die Depolymerase wurden Antikörper hergestellt. Diese koppelten die Phagenpartikel von L1 an der Schwanzstruktur entweder seitlich oder frontal aneinander. Die Antikörper wurden mit Goldmarkierten sekundären Antikörpern sichtbar gemacht. Dabei zeigte sich deutlich, dass die Depolymerase an den Schwanzfortsätzen von L1 lokalisiert ist.

Der synergistische Effekt zwischen dem Enzym und Y2 wurde in einem rekombinanten Phagen kombiniert. Eine am N-Terminus gekürzte Variante des DpoL1 Gens (*dpoL1-C*) wurde in das Genom von Y2 unmittelbar nach dem Kapsid Gen eingebaut. Der rekombinante Phage Y2::*dpoL1-C* produziert klare Plaques, die von einem Hof umgeben sind; ein klares Indiz für die Enzymaktivität. Die Aufnahme zusätzlicher DNS führte zu keinem Verlust anderer DNS-Abschnitte. *In vitro* war die Wirksamkeit von Y2::*dpoL1-C* höher als diejenige von Y2 und er konnte die Anzahl Bakterien auf isolierten Blüten signifikant reduzieren.

Phagenbehandlungen konnten das Wachstum des Feuerbrandregers auch auf Blüten an Apfelbäumen hemmen. Eine Verringerung der Krankheitssymptome konnte jedoch nicht

erreicht werden. Dies ist möglicherweise auf die Instabilität der Phagen zurückzuführen. Im Allgemeinen können Phagen durch verschiedene Faktoren inaktiviert werden. UV-Strahlung ist dabei äusserst problematisch. Daher müssen Phagen, die auf Blättern oder Blüten angewendet werden, mit adäquaten Massnahmen geschützt werden. Verschiedene natürliche und ungiftige Substanzen schützten *E. amylovora* Phagen vor der Zerstörung durch UV-Licht. Extrakte aus Karotten, roter Paprika und roter Bete konnten die Abnahme infektiöser Phagenpartikel verringern; vermutlich aufgrund ihrer Pigmente (Karotinoide und Betalaine). Das Karotinoid Astaxanthin, aromatische Aminosäuren, Pepton aus Soja, sowie Kasein schwächten den durch UV-Licht verursachten Phagenzerfall ebenfalls ab.

Zusätzlich zur Kontrolle können Bakteriophagen auch zum Nachweis von Bakterien eingesetzt werden. Die gleiche Strategie wie für die Konstruktion von Y2::*dpoL1-C* wurde angewendet, um einen biolumineszenten Reporterphagen herzustellen. Dazu wurde das Luciferase Gen (*luxAB*) von *Vibrio harveyi* ins Genom von Y2 verpflanzt. Auch in diesem Fall hatte die Integration zusätzlicher DNS keine nachteiligen Effekte auf den Phagen. Y2::*luxAB* induziert die Expression von Luciferase in infizierten *E. amylovora* Zellen, wodurch nach Zugabe eines Substrats Licht erzeugt wird. Dieses kann gemessen werden und ist ein Indikator für das Vorhandensein von Wirtsbakterien. Die höchste Luciferase Expression wurde bei 22°C, 50 min nach der Infektion gemessen. Interessanterweise konnte die Lichtemission durch die Zugabe von DpoL1 erhöht werden. Dies bestätigt die Resultate der Infektionsexperimente und zeigt deutlich, dass DpoL1 die Infektion bekapselter Zellen durch Y2 vereinfacht. Y2::*luxAB* war in der Lage, 3.6×10^3 KBE/ml nachzuweisen und ist eine vielversprechende Alternative für herkömmliche Detektionsmethoden. Der Ansatz mit dem rekombinanten Phagen ermöglicht den Nachweis geringerer Zellzahlen als ein ELISA Test, weist im Gegensatz zur PCR nur lebende Zellen nach und ist einiges schneller als Methoden, die auf das Wachstum von Kolonien auf einer Agarplatte angewiesen sind.