

Tuanny Fernanda Pereira Paggi

Mutações PHO-constitutivas em *Escherichia coli*: frequência e competição em meio seletivo não-estruturado

São Paulo

2024

Tuanny Fernanda Pereira Paggi

**Mutações PHO-constitutivas em *Escherichia coli*:
frequência e competição em meio seletivo
não-estruturado**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para Obtenção de Título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Microbiologia

Versão Corrigida

Orientador: Beny Spira

São Paulo
2024

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pereira Paggi, Tuanny Fernanda

Mutações PHO-constitutivas em *Escherichia coli*:
frequência e competição em meio seletivo não-
estruturado / Tuanny Fernanda Pereira Paggi;
orientador Beny Spira. -- São Paulo, 2022.

45 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Escherichia coli*. 2. Regulon PHO. 3. Fosfato.
4. Quimiostato. 5. Glicerol-2-fosfatp. I. Spira,
Beny, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Tuanny Fernanda Pereira Paggi

Título da Dissertação: Mutações PHO-constitutivas em *Escherichia coli*: frequência e competição em meio seletivo não-estruturado.

Orientador: Prof. Dr. Beny Spira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a)

Aprovado Reprovado

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone(11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO **1045/2019 - ERRATA**

Certificamos que o Protocolo CEP - ICB nº **1045/2019**, referente ao projeto intitulado: **"Mutações PHO constitutivas em Escherichia coli: frequência e competição em meio seletivo não-estruturado"**, sob a responsabilidade do(a) aluno(a) **"Tuanny Fernanda Pereira Paggi"**, e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **"Beny Spira"**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 19 de Julho de 2022.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

Este trabalho é dedicado ao meu marido Danilo, que acreditou em mim e que sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e difíceis.

“Às vezes a ideia mais simples faz a maior diferença”.
(A Corrente do Bem)

Agradecimentos

À minha mãe Tânia Moreira Serutti, pelo carinho e suporte em todos os momentos. Mesmo não entendendo o motivo da escolha de um mestrado em uma cidade longe da família, sempre me apoiou e fez de tudo para que meus sonhos se tornassem realidade.

Às minhas irmãs Thais e Tanielly por tornarem minha vida melhor e mais leve apesar da distância. Estiveram ao meu lado sempre que precisei e foram o motivo de querer me tornar uma pessoa melhor sempre.

Ao meu marido Danilo Paggi, por estar sempre ao meu lado, incluindo os momentos difíceis, por todo o carinho e compreensão durante todo o mestrado. Minha vida é melhor por sua causa!

Ao meu orientador Dr. Beny Spira, pela oportunidade de trabalhar com pesquisa em seu laboratório. Agradeço muito toda paciência e compreensão que teve comigo, ensinamentos deixados e conversas no laboratório. Você é um grande exemplo para mim como pesquisador, professor e pessoa.

Às meninas do laboratório, Cláudia e Luísa, pelas conversas sobre os experimentos, sobre a vida e qualquer outra coisa que eu precisasse. Quero levar a amizade de vocês pra vida. Gabic, Taissa, Nicole e Ynes por me ajudarem sempre que precisei e pela troca de conhecimentos e ajuda com os experimentos.

Ao financiamento concedido pela CAPES que permitiu que eu pudesse realizar este trabalho.

Resumo

PAGGI, T. F. P. **Mutações PHO-constitutivas em *Escherichia coli*: frequência e competição em meio seletivo não-estruturado.** 2024. 60f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Fósforo é um elemento essencial para a vida de todos os seres vivos, incluindo as bactérias. A bactéria *Escherichia coli* contém o regulon PHO, que controla a expressão de diversos genes necessários para a captação de fosfato (Pi) do ambiente. Esses genes são expressos apenas quando o Pi do meio é limitante. O processo de percepção de Pi e controle dos genes do regulon PHO é regulado pelo sistema de dois componentes PhoB-PhoR junto com o transportador de fosfato PstSCAB e a proteína PhoU. Mutações nulas em PstSCAB ou em PhoU causam a constitutividade dos genes do regulon PHO. Esses mutantes, conhecidos como PHO-constitutivos podem ser isolados em meio de cultura contendo a molécula glicerol-2-fosfato (G2P) como única fonte de carbono. Isto ocorre porque estes mutantes expressam altas concentrações da proteína periplasmática fosfatase alcalina, pertencente ao regulon PHO, que é então capaz de hidrolisar quantidades suficientes de G2P possibilitando a liberação de glicerol que pode ser utilizado pela bactéria como fonte de carbono. Porém, boa parte do glicerol formado escapa o periplasma e é direcionado para as bactérias selvagens vizinhas, gerando uma competição entre bactérias mutantes e selvagens, resultando em um cenário onde nem a selvagem, nem o mutante conseguem crescer por falta de carbono. Os experimentos presentes neste trabalho têm como objetivo estudar a competição gerada em meio de cultura líquido contendo G2P como única fonte de carbono, tanto em quimiostato quanto em culturas em batelada, o efeito da temperatura no surgimento de mutantes PHO-constitutivos e o efeito da proteína ClpP sobre a frequência de mutantes PHO-constitutivos.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Regulon PHO. Fosfato. Quimiostato. Glicerol-2-fosfato.

Abstract

PAGGI, T. F. P. **PHO-constitutive mutations in *Escherichia coli*: Frequency and competition in selective non-structured medium.** 2024. 60p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Phosphorous is an essential element for all living beings, including bacteria. The bacteria *Escherichia coli* carries the PHO regulon, which controls the expression of most genes required to take up phosphate (Pi) from the environment. These genes are expressed when phosphorous is limiting. Pi sensing and PHO genes expression are regulated by the two-component system PhoB-PhoR, by the PstSCAB phosphate transporter and the PhoU protein. Null mutations in PstSCAB or PhoU result the constitutive expression of the PHO regulon genes. PHO-constitutive mutants can be selected in media containing glycerol-2-phosphate (G2P) as a sole carbon source. The mechanism of selection is based on the fact that these mutants express high concentrations of the periplasmic protein alkaline phosphatase, a member of PHO regulon, which hydrolyses sufficient amounts of G2P enabling the release of glycerol that can be utilized as a carbon source. However, a large amount of glycerol leaks out and is captured by the neighbouring wild type bacteria, creating a competition between them, and leading to a scenario where neither the mutant nor the wild type are able to grow due to the lack of carbon. This study aims to analyse the competition between PHO-constitutive mutants and wild-type cells in liquid medium containing G2P as a sole carbon source, both in chemostat and in batch cultures, the effect of temperature on the emergence of PHO-constitutive mutants and the effect of the ClpP protein on the frequency of PHO-constitutive mutants.

Keywords: *Escherichia coli*. PHO regulon. Phosphate. Chemostat. Glycerol-2-phosphate.

Lista de ilustrações

- Figura 1 – **Principais proteínas envolvidas na captação de fosfato e regulação da transcrição dos genes do regulon PHO de *Escherichia coli*.** PhoE é a porina responsável por permitir a entrada de compostos fosfatados e fosfato no periplasma. FA, fosfatase alcalina. PstS é a proteína periplasmática que se liga ao fosfato levando-o para o canal de transporte formado por PstC e PstA. PstB é uma ATPase que fornece energia para o transporte de Pi. PhoR, quinase sensora e PhoB, proteína reguladora de resposta, formam o sistema de dois componentes responsável por pela ativação do regulon PHO. Figura criada com auxílio do website BioRender.com. 27
- Figura 2 – **Colônias de mutantes PHO-constitutivos de *Escherichia coli* em placa contendo G2P como única fonte de carbono e o substrato cromogênico da FA, X-P.** 28
- Figura 3 – **Tragédia dos comuns e formação de *clusters* em placas de Petri.** As células em cinza representam a cepa selvagem, as azuis, mutantes PHO-constitutivos e os pontos vermelhos, moléculas de glicerol produzidas por MPCs. (a) Uma única célula MPC produzindo glicerol, que pode ser capturado e utilizado por outras células ao redor. (b) Formação de *clusters* de MPCs, produtores de glicerol, que resultam na formação de colônias. Figura criada com auxílio do website BioRender.com. Adaptado de (NEVES et al., 2020). 29
- Figura 4 – **Modelo do complexo formado pelas proteínas ClpX e ClpP para degradação de proteínas.** ClpX reconhece e se liga ao marcador de degradação da proteína alvo (tag) e inicia o desdobramento do substrato que, em seguida, é transferido para a proteína ClpP onde é quebrado, liberando pequenos fragmentos peptídicos. Figura criada com auxílio do website BioRender.com. Adaptado de (BAKER; SAUER, 2012). 31

- Figura 5 – **Surgimento de mutantes PHO-constitutivos oriundos de culturas de MG1655 crescidas *overnight* em diferentes temperaturas e incubadas a 37°C durante 30 dias.** Cinco culturas de MG1655 foram cultivadas em diferentes temperaturas e semeadas em placas de TG2PP e incubadas a 37°C. O surgimento de colônias azuis nas placas foi acompanhado a cada 24 h durante 30 dias consecutivos. Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 5 culturas independentes. 40
- Figura 6 – **Surgimento de mutantes PHO-constitutivos oriundos de culturas de MG1655 crescidas *overnight* a 37°C e incubadas em diferentes temperaturas em placas de TG2PP.** Cinco culturas de MG1655 foram cultivadas a 37°C e incubadas em diferentes temperaturas. O surgimento de colônias azuis foi acompanhado a cada 24 h durante 30 dias consecutivos. Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 5 culturas independentes. 41
- Figura 7 – **Competição em batelada entre a cepa selvagem MG1655 e o mutante MG1655 Δpst em meio TG2PP.** Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 3 culturas independentes. (a) Número de células (bactérias/ml) de cada uma das cepas cultivadas individualmente. Competições entre MG1655 e o mutante Δpst com as seguintes quantidades iniciais: (b) 10^7 MG1655 \times 10^6 Δpst ; (c) 10^7 MG1655 \times 10^7 Δpst ; (d) 10^6 MG1655 \times 10^7 Δpst . 42
- Figura 8 – **Comparativo do crescimento de MG1655 e MG1655 Δpst em meio mínimo com Tris ou HEPES.** Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 3 culturas independentes. (a) Bactérias das cepas MG1655 e MG1655 Δpst cultivadas separadamente em meio TG2PP; (b) Bactérias das cepas MG1655 e MG1655 Δpst cultivadas separadamente em meio HG2PP. 43
- Figura 9 – **Competição em diferentes proporções entre a cepa selvagem MG1655 e o mutante MG1655 Δpst em meio HG2PP.** Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 3 culturas independentes. Alíquotas de cada cultura foram retiradas a cada 24 horas para medição de UFC durante 7 dias. 45

Figura 10 – Comparação do crescimento de Δpst nas competições em batelada com diferentes proporções da cepa MG1655. Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 3 culturas independentes. Alíquotas de cada cultura foram retiradas a cada 24 horas para medição de UFC durante 7 dias.	46
Figura 11 – Competição entre MG1655 e MG1655 Δpst em meio HG2PP por 42 dias. Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 3 culturas independentes. Alíquotas de cada cultura foram retiradas a cada 7 dias para medição de UFC de cada uma das cepas. (a) Cultura de MG1655 apenas; (b) Competição em batelada entre MG1655 e o mutante Δpst . As quantidades iniciais de MG1655 e do mutante Δpst foram 10^7 e 100 bactérias/ml, respectivamente.	48
Figura 12 – Competição entre MG1655 e MG1655 Δpst no quimios-tato. Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 3 experimentos independentes. As culturas foram acompanhadas durante 15 dias consecutivos	49
Figura 13 – Frequência de mutantes nas cepas MG1655 e MG1655 $\Delta clpP$ em diferentes sistemas. Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 9 culturas independentes. O surgimento de colônias foi acompanhado a cada 24 h durante pelo menos 10 dias. (a) Número de mutantes a cada 10^9 bactérias semeadas em placas contendo Rifampicina; (b) Número de mutantes a cada 10^7 bactérias semeadas em placas de HG2PP; (c) Número de mutantes a cada 10^7 bactérias semeadas em placas de TPgalP.	50

Lista de tabelas

Tabela 1 – Bactérias utilizadas neste trabalho.	35
Tabela 2 – Competições entre a cepa selvagem MG1655 e o mutante Δpst em meio HG2PP. As tabelas mostram as médias do número de células de ambas as cepas no início da competição (tempo 0) e ao final do experimento (7 dias). D_7/D_0 corresponde a razão entre o número final e inicial de bactérias de cada cepa. .	47

Lista de abreviaturas e siglas

ATP	adenosina trifosfato
DHAP	fosfato de di-hidroxiacetona
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidade óptica
FA	fosfatase alcalina
G2P	glicerol-2-fosfato
G3P	glicerol-3-fosfato
HG2PP	caldo HEPES, glicerol-2-fosfato e fosfato de potássio
HGP	caldo HEPES, glicose e fosfato de potássio
K	capacidade de carregamento
LB	caldo lisogênico
MPC	mutante PHO-constitutivo
P	fósforo
Pgal	fenil- β -D-galactosídeo
Pi	fosfato inorgânico
RNA	ácido ribonucleico
TG2PP	caldo Tris, glicerol-2-fosfato e fosfato de potássio
TGP	caldo Tris, glicose e fosfato de potássio
TPgalP	caldo Tris, fenil- β -D-galactosídeo e fosfato de potássio
UFC	unidade formadora de colônia
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
X-P	5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato

Sumário

	Sumário	23
1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Captção de Pi e regulção dos genes envolvidos	26
1.2	G2P e os mutantes PHO-constitutivos	28
1.3	Mutantes PHO-constitutivos no <i>background clpP</i>	30
2	OBJETIVOS	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Meios de Cultura	35
3.2	Bactrias utilizadas	35
3.3	Obtenção de mutantes PHO-constitutivos em diferentes temperaturas de incubação	36
3.4	Ensaio de competio em batelada	36
3.5	Ensaio de competio no quimiostato	37
3.6	Freqncia de mutantes <i>lacI</i>	37
3.7	Freqncia de mutantes resistentes a rifampicina	37
4	RESULTADOS	39
4.1	Efeito da temperatura de incubação sobre a freqncia de surgimento de mutantes PHO-constitutivos	39
4.2	Competio em batelada entre MG1655 e Δpst em meio TG2PP	41
4.3	Comparao de crescimento das clulas nos meios HG2PP e TG2PP	43
4.4	Competio em batelada entre MG1655 e Δpst em meio HG2PP	44
4.5	Competio entre MG1655 e Δpst no Quimiostato	48
4.6	Freqncia de mutantes na cepa $\Delta clpP$	49
5	DISCUSSÃO	51
5.1	Efeito da temperatura no surgimento de mutantes PHO-constitutivos	51
5.2	Competio entre MG1655 e Δpst em culturas em batelada e no quimiostato	51
5.3	Competio entre MG1655 e Δpst no quimiostato	53
5.4	Freqncia de mutantes no <i>background clpP</i>	54

6	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	57

1 Introdução

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, com formato de bastão, pertencente a família *Enterobacteriaceae* dentro da classe *Gammaproteobacteria* (JANG et al., 2017). É um dos organismos-modelo mais bem estudados e caracterizados, sendo encontrada no intestino de humanos e de outros vertebrados, como parte da microbiota natural de seu hospedeiro, vivendo de forma comensal. A maioria das cepas de *E. coli* não causa nenhum dano ao seu hospedeiro, mas algumas são capazes de causar doenças intestinais e extraintestinais (MADIGAN et al., 2016; TENAILLON et al., 2010; GOMES et al., 2016).

Embora *E. coli* seja conhecida por estar presente no intestino de seus hospedeiros, sendo inclusive utilizada como indicador fecal, alguns estudos mostram que esta bactéria também é capaz de sobreviver no ambiente por longos períodos de tempo, podendo ser encontrada no solo, areia e água (SOMORIN et al., 2016; ISHII et al., 2006), o que coloca em dúvida a sua utilização como indicador de contaminação por fezes no ambiente, já que seria difícil determinar se a ela estaria presente naquele ambiente por um curto período de tempo ou se foi capaz de permanecer e se reproduzir por longos períodos nessas condições (BRENNAN et al., 2010; JANG et al., 2017).

E. coli tem uma grande capacidade de sobreviver em condições adversas, como ambientes com baixa concentração de nutrientes, utilizando estratégias distintas para se adaptar rapidamente e sobreviver ao novo meio (CHEKABAB et al., 2013; ORRUÑO; KABERDIN; ARANA, 2017). Ela carrega diversos genes, que em condições ótimas não são ativamente reprimidos, mas quando o ambiente possui baixa concentração de nutrientes, proteínas de ligação de alta afinidade e diferentes vias metabólicas são desreprimidas. Um exemplo dessa regulação ocorre durante a escassez de Pi no meio, condição essa que desreprime a expressão de genes responsáveis pela captação deste nutriente. Outro exemplo seria por meio da utilização de fatores sigma alternativos, como no caso de RpoS, que em condições de estresse, como carência de nutrientes, altas temperaturas ou baixo pH, direciona a transcrição para determinados conjuntos de genes que ajudarão a sobrevivência da célula em condições adversas (ELSAS et al., 2011). Outra maneira de adaptação em diferentes ambientes é através de mutações em sequências regulatórias, ou pela aquisição de genes funcionais através da transferência horizontal de genes (ZHI et al., 2016).

1.1 Captação de Pi e regulação dos genes envolvidos

Fósforo (P) é um macronutriente requerido por todas as células para a produção de ácidos nucleicos, fosfolipídios, armazenamento de energia na forma de ATP e muitas outras moléculas de importância biológica. Na natureza, é encontrado na forma de fosfatos orgânicos e inorgânicos. A maioria dos micro-organismos utiliza fosfato inorgânico (Pi ou PO_4^{2-}) como principal fonte de fósforo também podendo utilizar organofosfatos e fosfonatos (MADIGAN et al., 2010).

A bactéria *Escherichia coli* habita ambientes com concentrações variadas de fósforo, alguns contêm excesso de Pi e muitos outros com baixa concentração deste nutriente. Dada a importância do Pi para o crescimento bacteriano, *E. coli* possui mais de um mecanismo de captação deste nutriente. O transporte de Pi pode ser realizado através do sistema Pit, expresso constitutivamente que transporta íons metálicos como Mg^{2+} em conjunto com Pi (JACKSON et al., 2008), ou pelo sistema Pst, que possui alta afinidade por Pi. Quando a concentração de Pi é baixa, o transporte é realizado majoritariamente através do sistema Pst. Este é um transportador do tipo ABC (*ATP-binding cassette*), formado por cinco proteínas diferentes e codificado por um operon de mesmo nome (WANNER, 1993; ROSENBERG; GERDES; CHEGWIDDEN, 1977).

O sistema Pst é codificado pelos genes *pstS*, *pstC*, *pstA* e *pstB* e *phoU*. PstS é uma proteína de ligação ao fosfato localizada no espaço periplasmático, as proteínas PstA e PstC formam o canal transmembrana do sistema de transporte de Pi, a proteína PstB energiza o transporte por meio de consumo de ATP e a proteína PhoU, que não participa do transporte, mas está envolvida na transdução de sinal e aparentemente interage com as proteínas PstB e PhoR (VUPPADA et al., 2018; BRAIBANT et al., 1996).

A expressão dos genes de *pst* é controlada pelo regulon PHO. A ativação do regulon PHO acontece em resposta à uma concentração menor que $4 \mu\text{M}$ no periplasma. Quando isto acontece o sistema de dois componentes PhoB-PhoR, onde PhoR é a quinase sensora e PhoB é a proteína reguladora de resposta, que se liga na região promotora dos genes do regulon PHO. A proteína PhoR atua tanto como ativadora (função quinase) e como repressora de PhoB (função fosfatase), de acordo com a concentração de Pi no meio (CARMANY; HOLLINGSWORTH; MCCLEARY, 2003). Uma vez fosforilada, PhoB fosforilada se liga a regiões promotoras específicas dos genes do regulon PHO, conhecidas como PHO-boxes, recrutando assim a RNA polimerase e ativando a expressão dos genes de PHO.

O sistema Pst também atua na repressão do regulon PHO em condições de excesso de Pi no meio extracelular, ou seja, uma concentração maior do que $4 \mu\text{M}$.

Nestas condições o sistema Pst ativa a função fosfatase de PhoR, que desfosforila PhoB, cessando a transcrição dos genes do regulon PHO. Mutações em qualquer um dos cinco genes do operon *pst* ou algumas mutações em *phoR* resultam na constitutividade do regulon, independentemente da concentração extracelular de Pi. Estes mutantes são conhecidos como mutantes PHO-constitutivos (MPC) (NEVES et al., 2015; SPIRA et al., 2010).

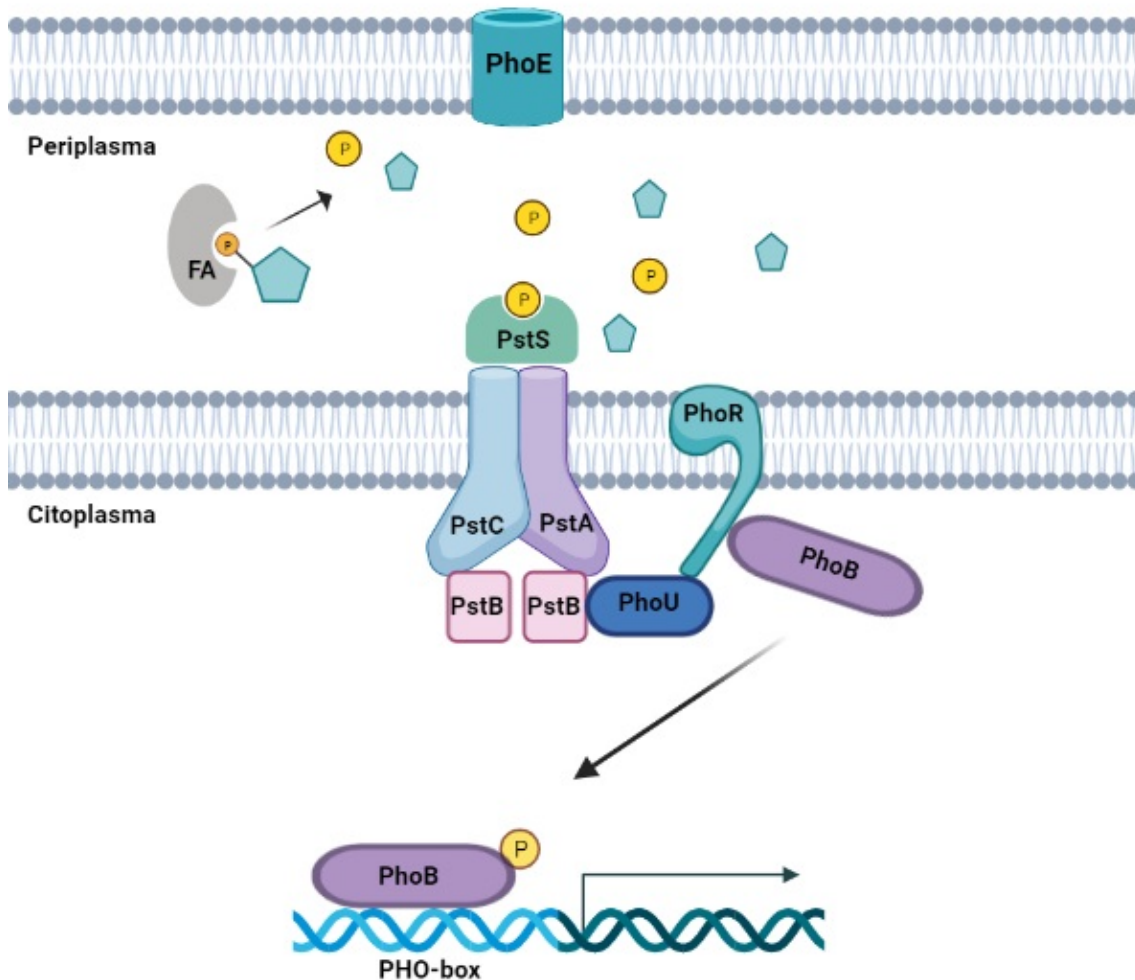


Figura 1 – Principais proteínas envolvidas na captação de fosfato e regulação da transcrição dos genes do regulon PHO de *Escherichia coli*. PhoE é a porina responsável por permitir a entrada de compostos fosfatados e fosfato no periplasma. FA, fosfatase alcalina. PstS é a proteína periplasmática que se liga ao fosfato levando-o para o canal de transporte formado por PstC e PstA. PstB é uma ATPase que fornece energia para o transporte de Pi. PhoR, quinase sensora e PhoB, proteína reguladora de resposta, formam o sistema de dois componentes responsável por pela ativação do regulon PHO. Figura criada com auxílio do website BioRender.com.

1.2 G2P e os mutantes PHO-constitutivos

Glicerol-2-fosfato (G2P) é uma molécula que poderia servir, em princípio, como fonte de fósforo e de carbono para *E. coli*. Entretanto, *E. coli* não é capaz de crescer com G2P como única fonte de carbono. Isto ocorre, porque, para ser incorporado pela bactéria, G2P tem que ser primeiro clivado no periplasma, originando glicerol suficiente para a bactéria poder utilizá-lo como fonte de carbono e energia. Porém, o excesso de Pi no meio reprime a expressão da fosfatase alcalina (FA), que é a enzima responsável pela clivagem de G2P, originando glicerol+fosfato. Uma vez que a expressão de FA se encontra reprimida pelo excesso de Pi, há uma forte pressão seletiva sobre o operon *pst*, de forma que sejam selecionados mutantes que desreprimam o regulon PHO, e expressem quantidades suficientes de FA.

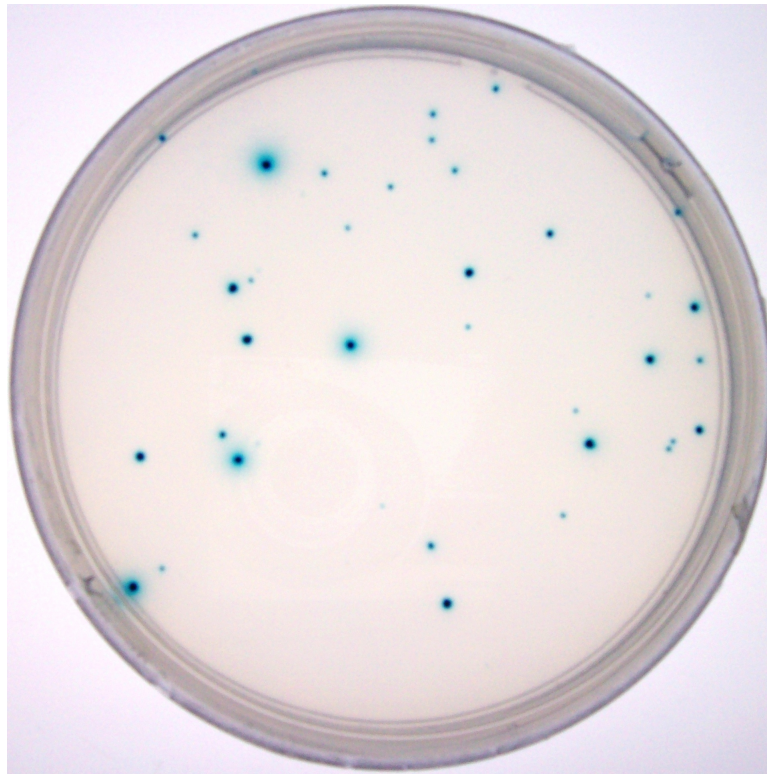


Figura 2 – Colônias de mutantes PHO-constitutivos de *Escherichia coli* em placa contendo G2P como única fonte de carbono e o substrato cromogênico da FA, X-P.

Conforme mencionado, mutações no operon *pst*, resultam na expressão constitutiva da FA, permitindo o crescimento da bactéria com G2P como fonte de carbono (TORRIANI; ROTHMAN, 1961). Cálculos da taxa de mutação em *E. coli* preveem o surgimento de 500-5.000 mutantes por 10^9 bactérias. Porém, quando 10^9 bactérias são semeadas no meio seletivo, apenas ~ 100 colônias são observadas. Além disso, os primeiros mutantes PHO-constitutivos surgem apenas após três dias de incubação

e com o passar do tempo mais colônias mutantes seguem aparecendo na placa de meio seletivo. Entretanto, uma vez isoladas, as colônias crescem em menos de 48h. Esta contradição ocorre devido à inibição do crescimento dos mutantes quando na presença de uma alta densidade populacional na placa. Neste caso, o glicerol gerado no periplasma do MPC a partir da hidrólise de G2P escapa e é captado por bactérias selvagens ao redor. Porém, a concentração de glicerol é insuficiente para permitir o crescimento do mutante e das bactérias selvagens, levando à "tragédia dos comuns" (NEVES et al., 2020). Os poucos MPCs que conseguem formar colônias na placa de meio seletivo são fruto de *clusters* de bactérias MPC, que se formam estocasticamente (NEVES et al., 2020).

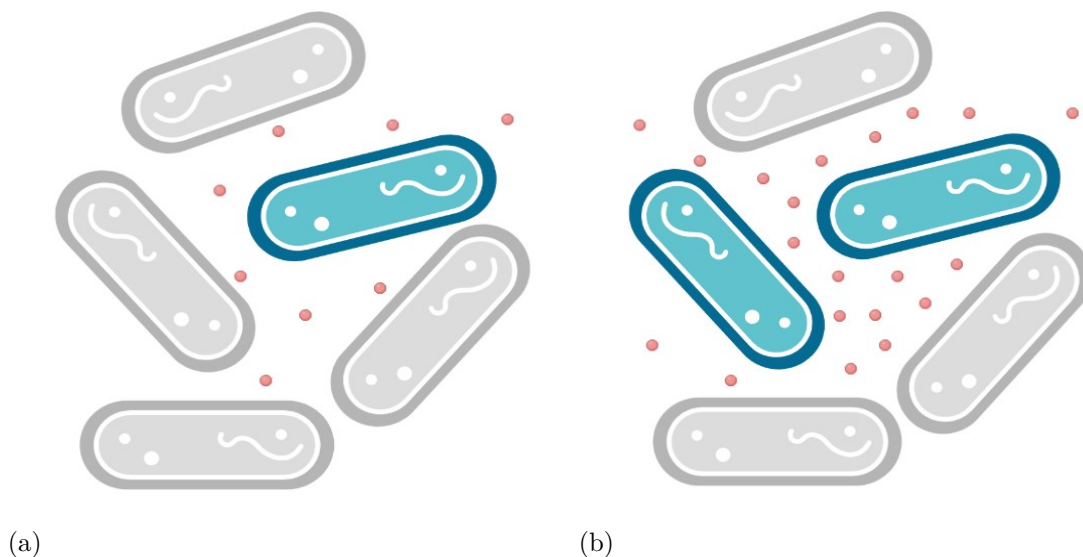


Figura 3 – **Tragédia dos comuns e formação de *clusters* em placas de Petri.** As células em cinza representam a cepa selvagem, as azuis, mutantes *PHO*-constitutivos e os pontos vermelhos, moléculas de glicerol produzidas por MPCs. (a) Uma única célula MPC produzindo glicerol, que pode ser capturado e utilizado por outras células ao redor. (b) Formação de *clusters* de MPCs, produtores de glicerol, que resultam na formação de colônias. Figura criada com auxílio do website BioRender.com. Adaptado de (NEVES et al., 2020).

Populações microbianas exibem comportamento cooperativo, secretando no meio exopolissacarídeos, que compõem o biofilme, ou enzimas. Essas substâncias secretadas são chamadas de bens públicos, sendo muito vantajosas para a população e ao mesmo tempo custoso para o indivíduo que o produz. Alguns indivíduos trapaceiros apenas se beneficiam dos bens públicos, mas não dividem os custos de sua produção e assim, passam a ter vantagem de crescimento quando comparado ao indivíduo cooperador. O trapaceiro pode, eventualmente, dominar a população, antes formada apenas por

cooperadores, e os bens públicos acabam se tornando escassos, levando a extinção tanto de cooperadores quanto trapaceiros. Esse cenário é conhecido como a "tragédia dos comuns" (SCHUSTER et al., 2017).

Outros organismos além de *E. coli* apresentam este mesmo comportamento de cooperação

1.3 Mutantes PHO-constitutivos no *background clpP*

A seleção de MPCs é determinada pela expressão constitutiva da FA, que realiza a hidrólise de G2P, liberando glicerol em quantidade suficiente para promover o crescimento bacteriano adequado. No entanto, o glicerol livre pode difundir-se pelo periplasma das células constitutivas, sendo capturado por diversas bactérias selvagens circundantes, diminuindo assim a concentração de glicerol disponível para o crescimento dos MPCs. Experimentos prévios conduzidos em nosso laboratório revelaram que a inativação de genes associados à captação e metabolismo do glicerol na cepa inibidora não conseguiu reduzir ou inibir a formação de MPCs. Outros genes também foram testados e apenas a cepa $\Delta clpP$ teve o mesmo efeito, apesar deste gene não estar aparentemente relacionado com a captação e utilização de glicerol pela bactéria. Outro fenômeno observado por (NEVES et al., 2020) em $\Delta clpP$ é que a frequência de mutantes PHO-constitutivos formados por esta cepa é menor do que a de mutantes na cepa selvagem.

ClpP é uma peptidase responsável por reciclar proteínas na célula. Junto com ClpX ou ClpA, forma um complexo onde ClpP degrada a proteína e ClpX ou ClpA reconhecem sequências peptídicas chamadas de marcadores de degradação ou degrons, desdobram a estrutura terciária das proteínas e, em seguida, transferem a proteína desdobrada para ClpP (Figura 4) (KANG et al., 2021; BAKER; SAUER, 2012). Em *E. coli* mais de 60 proteínas foram identificadas como alvos de ClpP, incluindo proteínas relacionadas ao metabolismo e produção de energia, divisão celular, reparo de DNA, dentre outros (FLYNN et al., 2003).

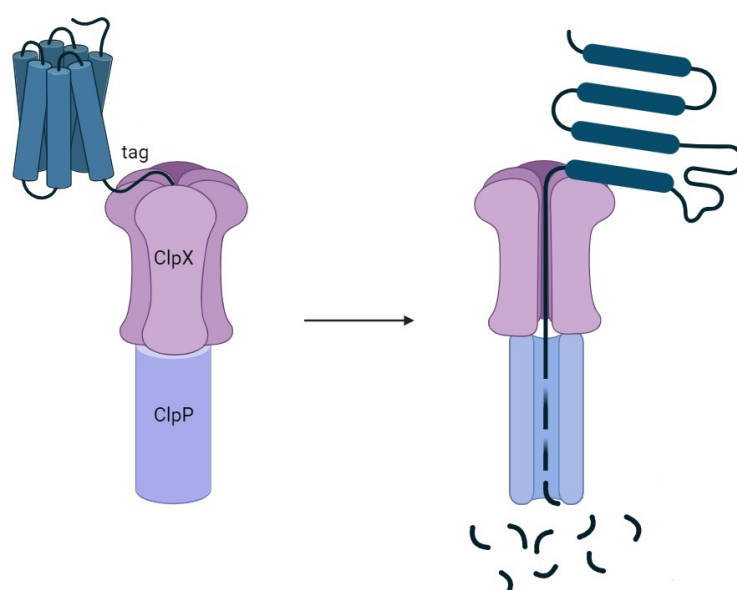


Figura 4 – Modelo do complexo formado pelas proteínas ClpX e ClpP para degradação de proteínas. ClpX reconhece e se liga ao marcador de degradação da proteína alvo (tag) e inicia o desdobramento do substrato que, em seguida, é transferido para a proteína ClpP onde é quebrado, liberando pequenos fragmentos peptídicos. Figura criada com auxílio do website BioRender.com. Adaptado de (BAKER; SAUER, 2012).

2 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo:

- Investigar o efeito da temperatura sobre o surgimento das mutações PHO-constitutivas.
- Investigar o fenômeno da "tragédia dos comuns" na presença de G2P por meio de ensaios de competição em:
 - Culturas em batelada
 - Culturas contínuas (quimiostato)
- Determinar o efeito de ClpP sobre a frequência e crescimento de mutantes PHO-constitutivos e em outros sistemas de mutação.

3 Materiais e Métodos

3.1 Meios de Cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura:

- Meio Lysogeny Broth (LB): 1% (m/v) extrato de triptona, 0,5% (m/v) extrato de levedura, 1% (m/v) NaCl; pH 7,4. O meio L-ágar é igual ao meio LB acrescido de 1,5% de ágar bacteriológico (m/v).
- Meios definidos TGP, TG2PP, HGP, HG2PP, TPgalP: 0,468% (m/v) NaCl, 0,15% (m/v) KCl, 0,108% (m/v) NH₄Cl, 1,452% (m/v) Tris-base, 0,02% (m/v) MgCl₂ · 6H₂O, 0,035% (m/v) Na₂SO₄, 0,2 ml CaCl₂ (1 M), 0,2 ml FeCl₃ (0,01 M), 0,2 ml ZnCl₂ (0,01 M), 7,5 ml HCl (12 M); pH 7,5. A esta solução salina é acrescentado 0,2% de uma fonte de carbono (glicose ou G2P) ou 75 µg/ml de Pgal e 1 mM de KH₂PO₄. O meio HGP é idêntico ao meio TGP, com a exceção de que são adicionados 2,86% (m/v) do tampão HEPES, ao invés de Tris. Os meios TGP e HGP contém glicose como fonte de C; TG2PP e HG2PP contém G2P como fonte de C e TPgalP contém Pgal (fenil-β-D-galactosídeo).

3.2 Bactérias utilizadas

As cepas de bactérias utilizadas neste estudo estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – **Bactérias utilizadas neste trabalho.**

Linhagem	Genótipo	Fonte
MG1655	<i>E. coli</i> K-12 selvagem	Coleção do laboratório
RI1467	MG1655 Δ <i>pstSCAB-phoU</i> ::Cm	Coleção do laboratório
RI1469	MG1655 Δ <i>pstSCAB-phoU</i>	Coleção do laboratório
RI1510	MG1655 Δ <i>lacZ</i> ::Km	Coleção do laboratório
RI102	MG1655 Δ <i>clpP</i> ::Km	Coleção do laboratório

3.3 Obtenção de mutantes PHO-constitutivos em diferentes temperaturas de incubação

Bactérias cultivadas durante a noite em meio TGP nas temperaturas de 15°C, 25°C, 37°C ou 45°C, foram lavadas 3 vezes e $\sim 10^9$ bactérias foram semeadas em meio TG2PP (G2P como única fonte de carbono). As placas foram incubadas à 37°C e o surgimento de colônias azuis (PHO-constitutivas) foi acompanhado por 30 dias. Para a visualização das colônias constitutivas, foi adicionado ao meio 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do substrato de FA X-P (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato). Estes ensaios foram realizados com pelo menos 5 réplicas independentes. Nos experimentos que tinham como objetivo verificar o efeito da temperatura após o plaqueamento, as bactérias foram cultivadas *overnight* a 37°C e as placas semeadas com $\sim 10^9$ bactérias foram incubadas nas temperaturas de 15°C, 25°C, 37°C ou 45°C.

3.4 Ensaios de competição em batelada

As cepas MG1655 e MG1655 $\Delta\text{pst}::\text{Cm}$ foram cultivadas durante a noite em meio TGP a 37°C. No dia seguinte, $\sim 10^8$ bactérias da cepa MG1655 foram inoculadas em um tubo contendo 10 ml de meio de cultura TG2PP junto com diferentes concentrações da cepa MG1655 $\Delta\text{pst}::\text{Cm}$. 100 μl de cada cultura foram retirados e plaqueados em placas de meio L-ágar suplementado com X-P ou em L-ágar suplementado com X-P e cloranfenicol para a obtenção do ponto 0 hora. As co-culturas foram incubadas a 37°C e a cada 24 horas, alíquotas de 100 μl da co-cultura foram retiradas para medir a turbidez (DO_{600}). Outros 100 μl da cultura foram retirados e diluídos em solução salina, plaqueados em meio L-ágar contendo X-P ou placas de meio L-ágar contendo X-P e cloranfenicol para a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de cada uma das bactérias competidoras. O experimento foi conduzido por 72 horas, sendo uma amostra de cada cultura retirada a cada 24 horas de incubação, conforme descrito acima. As competições foram feitas em triplicata.

Os experimentos realizados em meio HG2PP foram conduzidos por 7 dias, sendo que amostras foram retiradas a cada 24 horas. Na competição de 42 dias em meio HG2PP, amostras foram retiradas a cada 7 dias.

3.5 Ensaios de competição no quimiostato

As cepas MG1655 $\Delta lacZ::Km$ e MG1655 $\Delta pst::Cm$ foram cultivadas em meio HGP *overnight* a 37°C. No dia seguinte, $\sim 10^7$ células/ml da cepa MG1655 $\Delta lacZ$ foram misturadas com $\sim 10^4$ células/ml da cepa MG1655 Δpst em 70 ml de meio HG2PP (contendo 0,1% de G2P). A cultura foi mantida no quimiostato a 37°C a uma taxa de diluição de 0,1 h⁻¹ ou 0,5 h⁻¹. Aproximadamente 1 ml do volume da cultura foi retirado a cada 24 horas, diluído em solução salina e plaqueado em placas de LB com X-P e cloranfenicol ou canamicina para a contagem do número de células de cada cepa presente na competição. O experimento foi conduzido por 15 dias e três experimentos independentes foram realizados.

3.6 Frequência de mutantes *lacI*

Bactérias da cepa MG1655 $\Delta lacZ$ foram cultivadas durante a noite em meio TGP a 37°C. No outro dia, foram lavadas 3 vezes com solução salina e 10^9 bactérias foram semeadas em meio TPgalP (Pgal como única fonte de carbono) e as placas foram incubadas à 37°C por 48 horas. Após, bactérias selvagens e mutantes $\Delta clpP$ foram cultivados por um *overnight* em meio TGP. No outro dia, foram lavadas 3 vezes com solução salina e 10^7 bactérias foram plaqueadas nas placas de TPgalP contendo bactérias $\Delta lacZ$ previamente semeadas. Para a visualização das colônias constitutivas, foi adicionado ao meio 40 $\mu\text{g/ml}$ do substrato da enzima β -galactosidase X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo). O surgimento de mutantes *lacI* (colônias azuis) foi acompanhado por 10 dias. Estes ensaios foram realizados com pelo menos 9 réplicas independentes.

3.7 Frequência de mutantes resistentes a rifampicina

Bactérias das cepas MG1655 $\Delta clpP$ e MG1655 foram cultivadas durante a noite em meio TGP a 37°C. No outro dia, foram lavadas 3 vezes com solução salina e 10^9 bactérias foram semeadas em placas contendo meio HGP e rifampicina. Em seguida, as placas foram incubadas à 37°C. O surgimento de mutantes resistentes a rifampicina foi acompanhado por 10 dias. Este ensaio foi realizado com 9 réplicas independentes.

4 Resultados

4.1 Efeito da temperatura de incubação sobre a frequência de surgimento de mutantes PHO-constitutivos

Há evidências de que a temperatura influencia a taxa de mutação em diversas espécies de seres vivos (CHU et al., 2018; LINDGREN, 1972; MULLER, 1928). Para avaliar o efeito da temperatura sobre a frequência de surgimento de mutantes PHO-constitutivos, foram conduzidos dois experimentos. O primeiro testou o efeito que a temperatura exerce durante o surgimento dos mutantes no meio não-seletivo, ou seja, na pré-cultura (*overnight*), antes do plaqueamento no meio seletivo. O segundo experimento buscou avaliar o efeito da temperatura sobre a frequência de mutantes PHO-constitutivos durante a incubação das placas de meio seletivo semeadas com as bactérias. Neste caso, assumimos que as diferentes temperaturas poderiam afetar a difusão de glicerol, originado pela hidrólise de G2P, na placa e, dessa forma, favorecer, ou não, o surgimento de colônias mutantes.

No primeiro experimento, bactérias foram inoculadas em meio TGP líquido e incubadas *overnight* nas temperaturas de 15°C, 25°C, 37°C ou 45°C. No dia seguinte, aproximadamente 10^9 bactérias foram inoculadas em placas de TG2PP. As placas foram incubadas à 37°C e o aparecimento das colônias foi acompanhado durante 30 dias. O acúmulo de mutantes PHO-constitutivos durante os 30 dias de incubação é mostrado na Figura 5. Ao final dos 30 dias de incubação, não foi registrada diferença significativa entre as placas que foram incubadas a 25°C, 37°C e 45°C. Por outro lado, as bactérias incubadas a 15°C mostraram uma menor frequência de mutantes em relação as placas incubadas a 25°C, 37°C e 45°C (p-value=0,001648, p-value=0,049365 e p-value=0,004591 respectivamente) em média 36,5% menor do que as das outras culturas. Este resultado indica que em temperaturas mais baixas há menor formação de mutantes, conforme relatado em (CHU et al., 2018).

Para testar a influência da temperatura de incubação das placas de meio seletivo sobre a frequência de mutantes, bactérias foram cultivadas *overnight* em meio líquido TGP a 37°C. No outro dia, $\sim 10^9$ bactérias foram plaqueadas em placas de TG2PP e incubadas nas temperaturas de 15°C, 25°C, 37°C ou 45°C. A Figura 6 mostra o número de colônias mutantes observadas durante os 30 dias do experimento. Não houve diferença entre as amostras incubadas a 25°C e a 37°C (p-value=0,210) ao final dos 30 dias de incubação. Entretanto, a cinética de surgimento de colônias

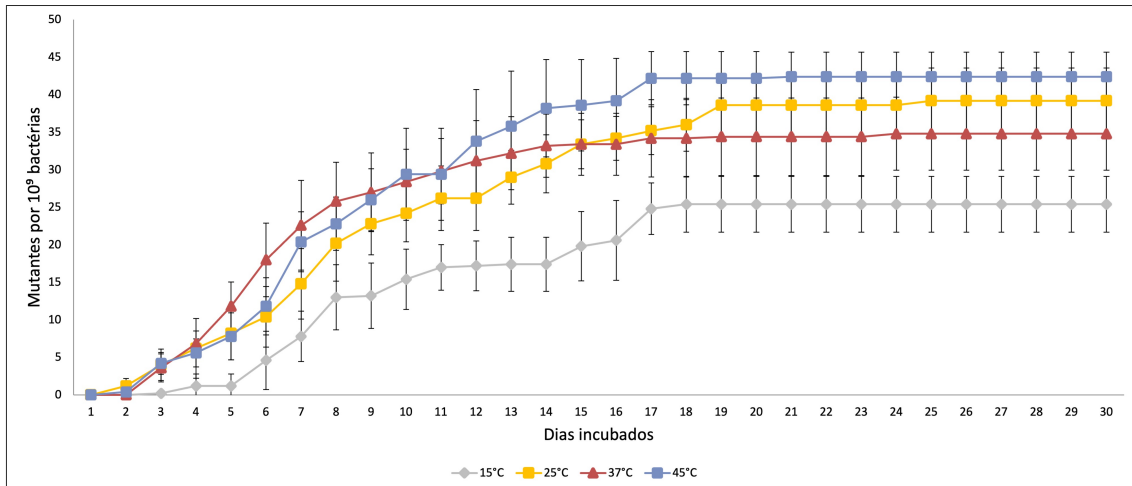


Figura 5 – Surgimento de mutantes PHO-constitutivos oriundos de culturas de MG1655 crescidas *overnight* em diferentes temperaturas e incubadas a 37°C durante 30 dias. Cinco culturas de MG1655 foram cultivadas em diferentes temperaturas e semeadas em placas de TG2PP e incubadas a 37°C. O surgimento de colônias azuis nas placas foi acompanhado a cada 24 h durante 30 dias consecutivos. Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 5 culturas independentes.

mutantes foi mais acelerada a 37°C do que a 25°C. Essa diferença pode ser explicada pela maior taxa de crescimento a 37°C, que é a temperatura ótima de crescimento de *E. coli*. Não houve crescimento de colônias nas placas que ficaram incubadas a 15°C, apesar de *E. coli* ser capaz de crescer à essa temperatura. Um fator que pode haver contribuído para a ausência de colônias nas placas poderia ser a baixa difusão do glicerol a 15°C. As placas que ficaram a 45°C tiveram poucas colônias provavelmente pelo ressecamento das placas após alguns dias dentro da estufa.

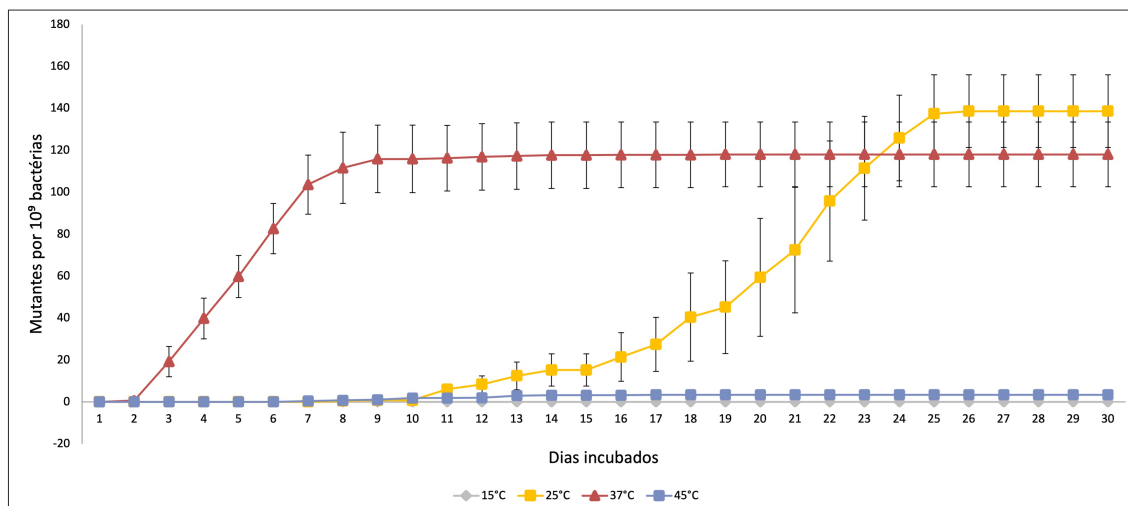


Figura 6 – Surgimento de mutantes PHO-constitutivos oriundos de culturas de MG1655 crescidas *overnight* a 37°C e incubadas em diferentes temperaturas em placas de TG2PP. Cinco culturas de MG1655 foram cultivadas a 37°C e incubadas em diferentes temperaturas. O surgimento de colônias azuis foi acompanhado a cada 24 h durante 30 dias consecutivos. Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 5 culturas independentes.

4.2 Competição em batelada entre MG1655 e Δpst em meio TG2PP

Quando um grande número de uma cultura de bactérias selvagens é semeado em placas de TG2PP, a frequência de colônias mutantes emergentes é muito menor do que a esperada (NEVES et al., 2020). Este fenômeno é devido à inibição causada pela competição por glicerol entre bactérias mutantes e selvagens. Apenas o mutante PHO-constitutivo é capaz de quebrar a molécula de G2P para formar glicerol+fosfato e como essa quebra acontece no periplasma celular, o glicerol facilmente atravessa a membrana e chega até outras células vizinhas, que são, em sua maioria, bactérias selvagens. Por isso, nem o mutante nem a cepa selvagem conseguem crescer, devido ao fato de que não há carbono suficiente para todos, levando à Tragédia dos Comuns (NEVES et al., 2020). Para verificar se esse fenômeno também acontece em um meio não-estruturado (meio líquido) e para quantificar o fenômeno, um experimento de competição entre as cepas MG1655 e o mutante Δpst em meio TG2PP foi conduzido.

Uma colônia de cada cepa foi inoculada separadamente em meio TGP e as culturas foram incubadas *overnight* a 37°C. No dia seguinte, três experimentos de competição foram realizados com diferentes proporções de cada cepa em 10 ml de meio de cultura TG2PP. A primeira continha 10^7 bact./ml da cepa selvagem e 10^6 bact./ml do mutante (MG 90% - 10%), a segunda competição tinha 10^7 bact./ml de

cada uma das cepas (MG 50% - pst50%), e a terceira com 10^7 bact./ml do mutante e 10^6 de MG1655 (MG 10% - pst90%). Culturas nas quais cada uma das cepas foi inoculada separadamente foram adicionadas como controle. 100 μ l de cada cultura foram coletados após 24, 48 e 72 horas, diluídos em solução salina e plaqueados em meio L-ágar suplementado com X-P para acompanhamento da proporção de cada cepa na competição. Na presença de X-P, as colônias da cepa MG1655 são brancas, ao passo que as colônias do mutante Δpst são azuis.

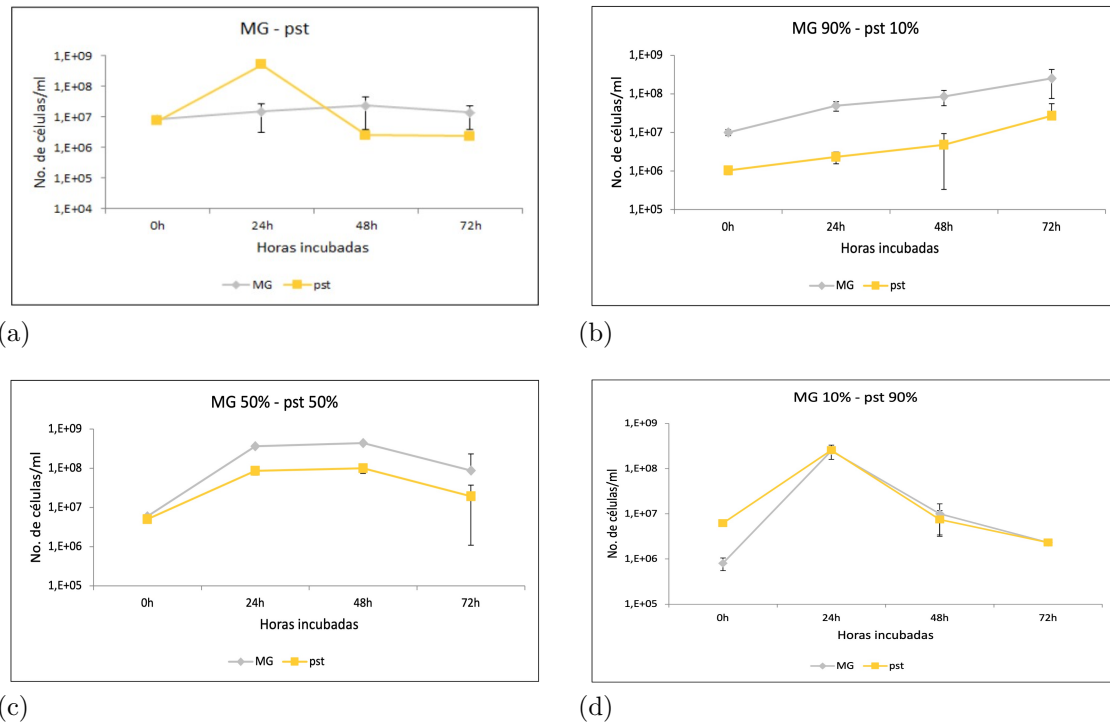


Figura 7 – **Competição em batelada entre a cepa selvagem MG1655 e o mutante MG1655 Δpst em meio TG2PP.** Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 3 culturas independentes. (a) Número de células (bactérias/ml) de cada uma das cepas cultivadas individualmente. Competições entre MG1655 e o mutante Δpst com as seguintes quantidades iniciais: (b) 10^7 MG1655 \times 10^6 Δpst ; (c) 10^7 MG1655 \times 10^7 Δpst ; (d) 10^6 MG1655 \times 10^7 Δpst .

Os resultados de cada competição são apresentados na Figura 7. É possível observar que quando cultivada isoladamente, a cepa MG1655 praticamente não cresce. Isso é esperado, uma vez que esta bactéria não produz altas quantidades de FA, necessárias para a hidrólise de G2P. Já o mutante Δpst cresceu de $7,4 \times 10^6$ bactérias/ml até $5,1 \times 10^8$ bactérias/ml, um aumento de 69 vezes (6 gerações) em 24 h! Porém, a quantidade de bactérias viáveis caiu para $2,5 \times 10^6$ /ml após 48 h, mantendo-se nesta concentração até o final do experimento, às 72 h. De fato, com a exceção da competição 90% MG1655 - 10% Δpst , o número de bactérias na cultura

diminuiu após 24 ou 48 horas de incubação. É possível que o tampão Tris, que é um pouco tóxico para as células (IRVIN; MACALISTER; COSTERTON, 1981), tenha sido responsável por essa diminuição de viabilidade do mutante Δpst . Não obstante, independentemente do problema da viabilidade, é possível notar que a cepa selvagem acompanha o crescimento do mutante Δpst quando em co-cultura, provavelmente porque se aproveita do glicerol liberado pelo mutante.

4.3 Comparação de crescimento das células nos meios HG2PP e TG2PP

Para testar a hipótese de que o tampão Tris estaria prejudicando a viabilidade das bactérias, a cepa selvagem e o mutante Δpst foram cultivados *overnight* em meio TGP. No dia seguinte, 10^7 bactérias/ml de cada cepa foram inoculadas em meio TG2PP ou HG2PP (HEPES como tampão, ao invés de Tris). O crescimento de cada cepa foi acompanhado durante 72 horas e a cada 24 horas alíquotas da cultura foram retiradas, diluída e plaqueadas em L-ágar suplementado com X-P para acompanhamento da proporção de cada cepa na competição. O crescimento de cada cultura pode ser observado na Figura 8.

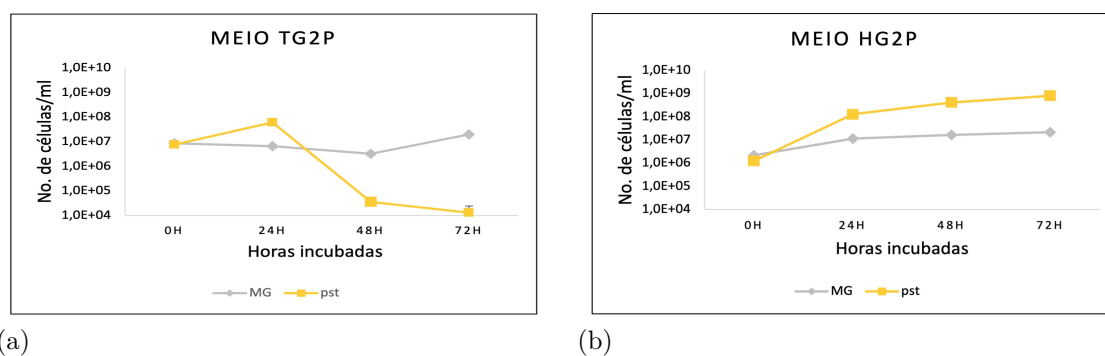


Figura 8 – **Comparativo do crescimento de MG1655 e MG1655 Δpst em meio mínimo com Tris ou HEPES.** Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 3 culturas independentes. (a) Bactérias das cepas MG1655 e MG1655 Δpst cultivadas separadamente em meio TG2PP; (b) Bactérias das cepas MG1655 e MG1655 Δpst cultivadas separadamente em meio HG2PP.

As bactérias cultivadas em meio TG2PP apresentaram o mesmo padrão observado na Figura 8, ou seja, MG1655 não cresceu e o mutante Δpst cresceu até as 24 h e depois disso a densidade populacional foi fortemente reduzida. Já no meio HG2PP, não houve perda de viabilidade em nenhum momento, o que sugere que o tampão

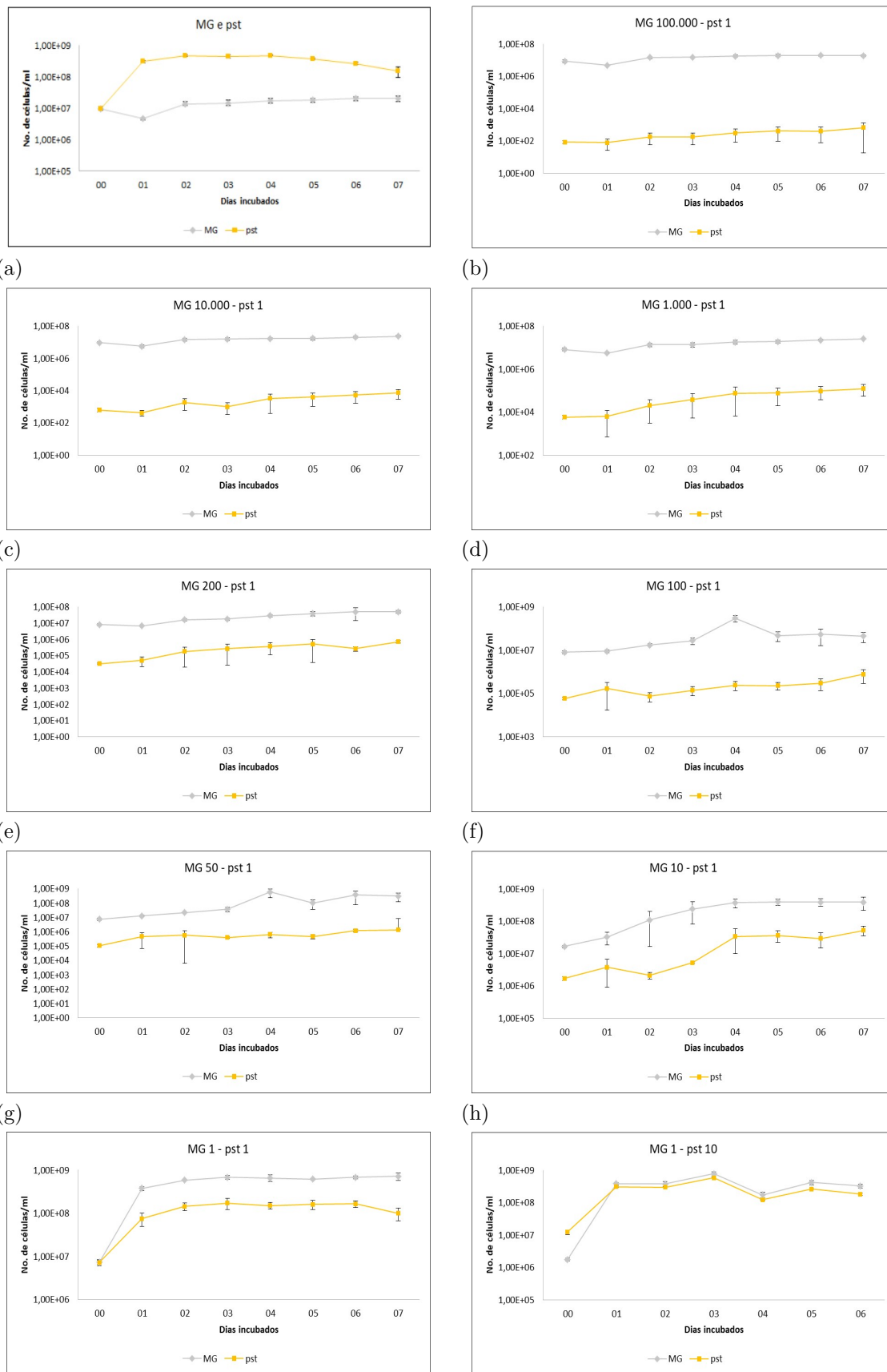
Tris foi o agente responsável pela perda de viabilidade após as 24 h. Para evitar este efeito indesejado, todos os experimentos seguintes foram feitos utilizando HEPES como tampão.

4.4 Competição em batelada entre MG1655 e Δpst em meio HG2PP

Para testar as condições necessárias para simular a Tragédia dos Comuns em um ambiente não-estruturado (meio líquido), as cepas MG1655 e MG1655 Δpst foram misturadas em diferentes proporções em 10 ml de meio HG2PP. O número de células de cada uma das cepas foi acompanhada durante 7 dias, sendo que a cada 24 horas alíquotas foram retiradas, diluídas e, em seguida, as diluições foram plaqueadas em meio L-ágar contendo X-P ou L-ágar contendo X-P e cloranfenicol para contagem e identificação das colônias de cada cepa. O progresso das competições é mostrado na Figura 9 e na Tabela 2.

Podemos observar nas culturas individuais que a cepa selvagem dobrou de tamanho nos 7 dias de incubação em meio HG2PP, crescimento esse possível graças a presença de traços de C no meio e de uma pequena capacidade de metabolizar G2P. Por outro lado, a população do mutante Δpst cresceu 15 vezes, indo de 10^7 a $1,5 \times 10^8$ bactérias/ml, concentração próxima a da capacidade de carregamento (K) do meio, que é de $\sim 5 \times 10^8$ /ml (NEVES et al., 2020). Em realidade, a densidade de bactérias Δpst chegou a $4,9 \times 10^8$ /ml no dia 4, mas diminuiu nos dias seguintes. Já nas co-culturas, o crescimento do mutante Δpst foi limitado pela presença da cepa selvagem (Figura 10), chegando próxima a K somente nas proporções de selvagens:mutantes de 1:10 e 1:1. As proporções de selvagens:mutantes que permitiram o maior crescimento bacteriano foram as de 50:1, 10:1, 1:1 e 1:10. Em todas as co-culturas, a cepa selvagem se aproveitou da mutante para crescer, mas nestas proporções houve um equilíbrio entre as duas populações, que atingiram concentrações similares. Nas co-culturas em que havia 1000 ou mais bactérias selvagens para cada mutante, houve muito pouca proliferação celular, de ambas as cepas, situação que pode ser caracterizada como uma "quase tragédia dos comuns".

A Tragédia dos Comuns prevê que duas populações em forte competição por um recurso nutricional finito se extinguem em consequência da carência do recurso que não é suficiente nem à uma, nem à outra população. Para verificar se a extinção das bactérias poderia ser observada a longo prazo, foi conduzido um experimento de competição por 6 semanas (Figura 11). Foram inoculadas 100 bactérias Δpst e 10^7 bactérias selvagens, em meio HG2PP (proporção de 1:100.000). Amostras foram



(i) (j) Figura 9 – Competição em diferentes proporções entre a cepa selvagem MG1655 e o mutante MG1655 Δpst em meio HG2PP. Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 3 culturas independentes. Alíquotas de cada cultura foram retiradas a cada 24 horas para medição de UFC durante 7 dias.

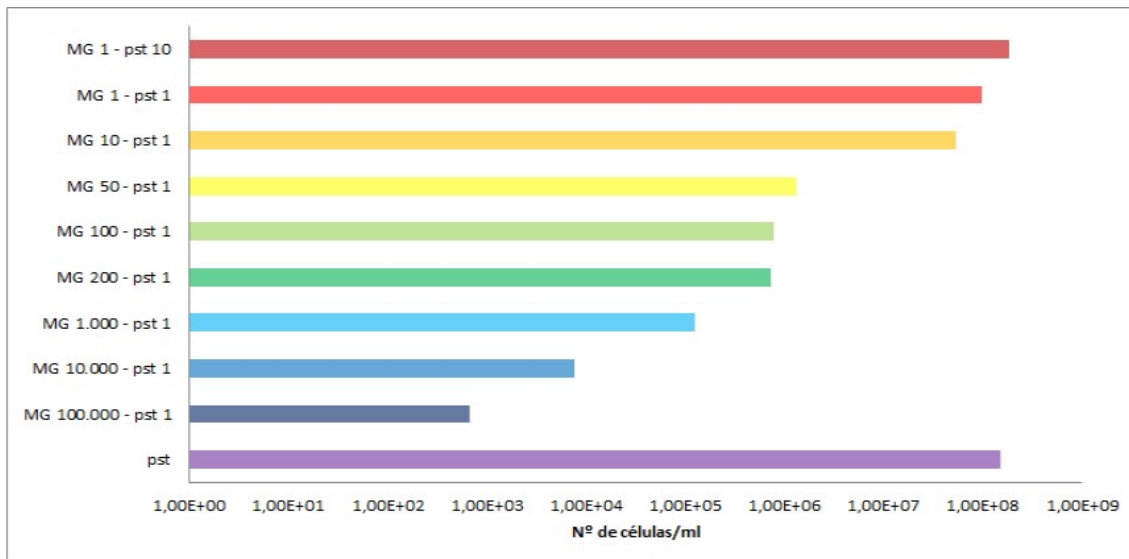


Figura 10 – **Comparação do crescimento de Δpst nas competições em batelada com diferentes proporções da cepa MG1655.** Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 3 culturas independentes. Alíquotas de cada cultura foram retiradas a cada 24 horas para medição de UFC durante 7 dias.

retiradas uma vez por semana para a contagem de UFC. Em paralelo, como controle 10^7 bactérias selvagens foram inoculadas sem bactérias Δpst em meio HG2PP.

Normalmente, reagentes químicos utilizados no laboratório possuem certo grau de impurezas que seriam consideradas aceitáveis, pois é praticamente impossível obtermos uma substância 100% pura. No caso de G2P, há uma quantidade de glicerol-3-fosfato (G3P), como contaminante, presente em quantidade inferior a 2%. Porém, o último lote de G2P adquirido pelo laboratório apresentou uma quantidade de 4% de G3P que permitiu o crescimento da cepa selvagem até quantidades de $\sim 10^7$ bactérias por ml em meio TG2PP ou HG2PP. Por este motivo, a cepa MG1655, que não deveria crescer em meio contendo apenas G2P como fonte de carbono, sem a presença do mutante Δpst conseguiu se replicar, e desta forma, houve o surgimento de mutantes PHO-constitutivos espontâneos que possibilitaram o tanto o crescimento da cepa selvagem quanto do próprio mutante. Na Figura 11a é possível observar que após o 7º dia de cultivo, apenas quando há um grande número de mutantes PHO-constitutivo, há um aumento significativo no número de células selvagens, mostrando mais uma vez que MG1655 é capaz de utilizar o glicerol quebrado pelo mutante.

A Figura 11b mostra a competição entre a cepa selvagem MG1655 e o mutante Δpst . Assim como na cultura contendo apenas a bactérias selvagem, após alguns dias de competição houve a formação de mutantes PHO-constitutivos espontâneos

Tabela 2 – **Competições entre a cepa selvagem MG1655 e o mutante Δpst em meio HG2PP.** As tabelas mostram as médias do número de células de ambas as cepas no início da competição (tempo 0) e ao final do experimento (7 dias). D_7/D_0 corresponde a razão entre o número final e inicial de bactérias de cada cepa.

Culturas individuais			MG 100.000 - pst 1		
	MG1655	MG1655 Δpst		MG1655	MG1655 Δpst
Dia 0	$9,63 \times 10^6$	$9,80 \times 10^6$	Dia 0	$8,87 \times 10^6$	$8,80 \times 10^1$
Dia 7	$2,04 \times 10^7$	$1,50 \times 10^8$	Dia 7	$1,95 \times 10^7$	$6,81 \times 10^2$
D_7/D_0	2,12	15,31	D_7/D_0	2,20	7,74
MG 10.000 - pst 1			MG 1.000 - pst 1		
	MG1655	MG1655 Δpst		MG1655	MG1655 Δpst
Dia 0	$9,70 \times 10^6$	$6,37 \times 10^2$	Dia 0	$8,33 \times 10^6$	$6,02 \times 10^3$
Dia 7	$2,41 \times 10^7$	$7,68 \times 10^3$	Dia 7	$2,56 \times 10^7$	$1,25 \times 10^5$
D_7/D_0	2,49	12,06	D_7/D_0	3,07	20,72
MG 200 - pst 1			MG 100 - pst 1		
	MG1655	MG1655 Δpst		MG1655	MG1655 Δpst
Dia 0	$8,25 \times 10^6$	$3,23 \times 10^4$	Dia 0	$8,13 \times 10^6$	$5,98 \times 10^4$
Dia 7	$5,18 \times 10^7$	$7,31 \times 10^5$	Dia 7	$4,50 \times 10^7$	$7,88 \times 10^5$
D_7/D_0	6,28	22,62	D_7/D_0	5,53	13,18
MG 50 - pst 1			MG 10 - pst 1		
	MG1655	MG1655 Δpst		MG1655	MG1655 Δpst
Dia 0	$7,52 \times 10^6$	$1,08 \times 10^5$	Dia 0	$1,69 \times 10^7$	$1,73 \times 10^6$
Dia 7	$3,10 \times 10^8$	$1,34 \times 10^7$	Dia 7	$3,98 \times 10^8$	$5,37 \times 10^7$
D_7/D_0	41,24	124,23	D_7/D_0	23,60	30,96
MG 1 - pst 1			MG 1 - pst 10		
	MG1655	MG1655 Δpst		MG1655	MG1655 Δpst
Dia 0	$7,30 \times 10^6$	$7,23 \times 10^6$	Dia 0	$1,78 \times 10^6$	$1,26 \times 10^7$
Dia 7	$7,13 \times 10^8$	$9,93 \times 10^7$	Dia 7	$4,53 \times 10^8$	$3,04 \times 10^8$
D_7/D_0	97,72	13,73	D_7/D_0	253,76	24,15

que apesar de inicialmente estarem em menor número que Δpst , no 7º dia atingiram uma densidade celular maior. Também é possível observar que a partir do 14º e 21º dia de competição há uma queda no número tanto das células selvagens quanto das

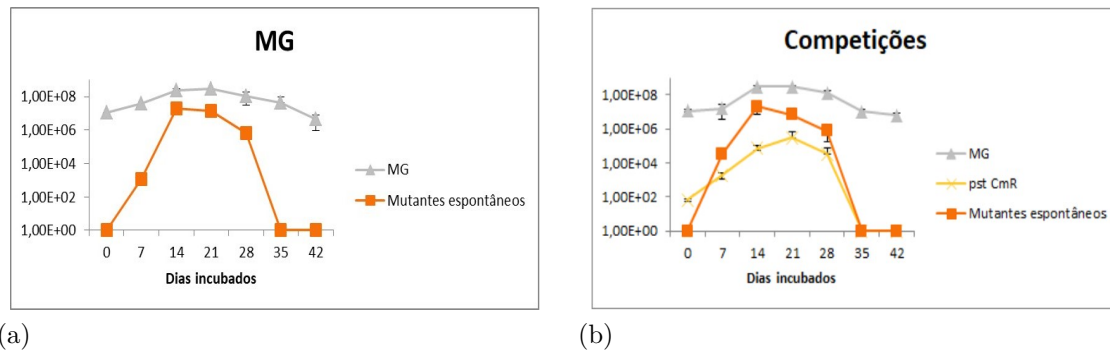


Figura 11 – **Competição entre MG1655 e MG1655 Δpst em meio HG2PP por 42 dias.** Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 3 culturas independentes. Alíquotas de cada cultura foram retiradas a cada 7 dias para medição de UFC de cada uma das cepas. (a) Cultura de MG1655 apenas; (b) Competição em batelada entre MG1655 e o mutante Δpst . As quantidades iniciais de MG1655 e do mutante Δpst foram 10^7 e 100 bactérias/ml, respectivamente.

mutantes e após o 28^o dia, apenas a cepa selvagem permanece viável.

4.5 Competição entre MG1655 e Δpst no Quimiostato

Em uma cultura aberta, como no quimiostato, bactérias que não se reproduzem ou se reproduzem de forma mais lenta que a taxa de diluição da cultura, podem sofrer *wash-out*, ou seja, serem eliminadas do sistema. Portanto, o cultivo no quimiostato é uma ótima oportunidade para testar a Tragédia dos Comuns de mutantes PHO-constitutivos e bactérias selvagens. MG1655 e MG1655 Δpst foram inoculados em meio HG2PP na proporção 10^7 células/ml da cepa selvagem e 10^4 da cepa mutante e o frasco de cultura foi conectado ao quimiostato, que foi rodado a uma taxa de diluição de $0,5 \text{ h}^{-1}$. A competição teve duração de 15 dias. Alíquotas de 1 ml foram retiradas a cada 24 horas, diluídas e plaqueadas em placas de L-ágar com X-P ou L-ágar com X-P e cloranfenicol para a contagem e identificação das bactérias presentes na cultura. A Figura 12 mostra o progresso da competição. O número de bactérias selvagens manteve-se mais ou menos estável durante todo o experimento. Por outro lado, a população de mutantes Δpst caiu fortemente nos 2 primeiros dias e em seguida foi se recuperando lentamente, mas sem nunca retornar aos níveis iniciais.

Após 14 dias, houve o surgimento de colônias azuis (PHO-constitutivas) que não eram resistentes ao antibiótico cloranfenicol, provavelmente mutantes derivados da cepa selvagem. Após o terceiro dia de experimento, há um certo equilíbrio entre as quantidades das duas cepas e a Tragédia dos Comuns não ocorre.

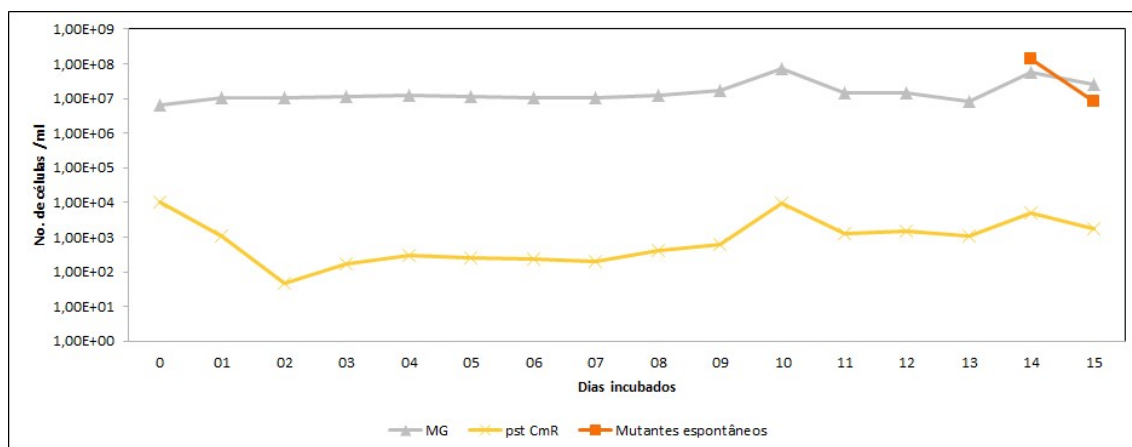


Figura 12 – **Competição entre MG1655 e MG1655 Δpst no quimiostato.** Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 3 experimentos independentes. As culturas foram acompanhadas durante 15 dias consecutivos

4.6 Frequência de mutantes na cepa $\Delta clpP$

Resultados preliminares obtidos em nosso laboratório mostraram que o mutante $\Delta clpP$ apresenta uma frequência de mutantes PHO-constitutivos aproximadamente três vezes menor do que a cepa MG1655 selvagem. ClpP é uma protease intracelular que atua na degradação de proteínas em conjunto com ClpX, ClpA ou de forma independente (FLYNN et al., 2003). Uma das proteínas degradadas por ClpXP que poderiam ser responsáveis por este efeito é a proteína MutL. Em *Caulobacter crescentus* foi demonstrado que ClpXP é responsável por sua degradação (BHAT et al., 2013). MutL é uma proteína que participa do reparo de DNA, contendo bases mal pareadas, direcionado por metilação. Sabendo-se que um aumento na quantidade de MutL pode levar a diminuição na taxa de mutação (GALÁN et al., 2007), esta seria uma possível explicação para a diminuição na frequência de mutantes PHO-constitutivos.

Para verificar se o efeito de $\Delta clpP$ na diminuição da formação de mutantes PHO-constitutivos é um fenômeno geral, outros dois sistemas mutacionais foram utilizados. O primeiro teste foi feito através da observação da frequência de mutantes *rpoB* em placas contendo o antibiótico rifampicina (Figura 13a). Ao final de 10 dias não foram observadas diferenças significativas na frequência de mutantes entre as cepas selvagens e *clpP* (p-value=0,6263), diferente do resultado observado na frequência de mutantes PHO-constitutivos mostrado na Figura 13b (p-value=0,003428).

O segundo teste foi feito através da observação da frequência de mutantes *lacI* em placas contendo Pgal como única fonte de carbono (Figura 13c). Ao final de 10 dias não foram observadas diferenças significativas na frequência de mutantes

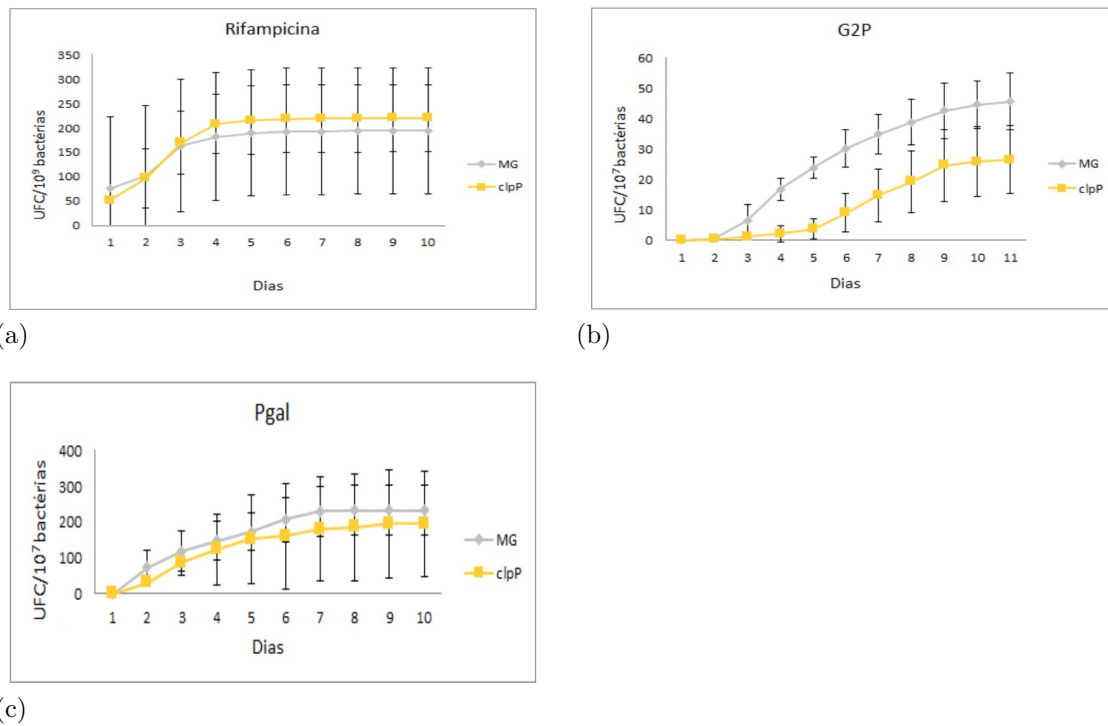


Figura 13 – **Frequência de mutantes nas cepas MG1655 e MG1655 $\Delta clpP$ em diferentes sistemas.** Cada ponto representa a média (\pm desvio padrão) de 9 culturas independentes. O surgimento de colônias foi acompanhado a cada 24 h durante pelo menos 10 dias. (a) Número de mutantes a cada 10^9 bactérias semeadas em placas contendo Rifampicina; (b) Número de mutantes a cada 10^7 bactérias semeadas em placas de HG2PP; (c) Número de mutantes a cada 10^7 bactérias semeadas em placas de TPgalP.

entre as cepas selvagens e $clpP$ (p-value=0,5067) indicando que o provável fenômeno responsável pela diminuição do número de mutantes PHO-constitutivos em placas contendo HG2PP não seria o acúmulo da proteína MutL.

5 Discussão

5.1 Efeito da temperatura no surgimento de mutantes PHO-constitutivos

Resultados preliminares obtidos no laboratório mostraram que a competição das bactérias por glicerol obtido a partir da hidrólise de G2P está na base do modelo que explica a baixa frequência de mutantes PHO-constitutivos e o seu surgimento tardio na placa de seleção. O glicerol produzido pelos mutantes PHO-constitutivos difunde para o espaço extracelular onde é captado pelas bactérias vizinhas, que não são PHO-constitutivas.

Apesar da difusão de moléculas no meio e através das membranas celulares depender da temperatura, não houve diferença na quantidade de mutantes obtidos nas placas incubadas nas temperaturas de 25°C e 37°C. Porém, foi observada uma clara diferença na cinética de surgimento das colônias mutantes na placa, que foi muito mais lenta a 25°C. Essa demora pode ser explicada em parte pelo crescimento mais lento de *E. coli* a 25°C, mas também pela menor difusão de nutrientes na placa, que é um ambiente estruturado. A hipótese original previa que a 25°C surgiriam mais mutantes PHO-constitutivos, pois a difusão de glicerol para o meio extracelular seria retardada, mas não foi isso que aconteceu. As placas incubadas à 45°C apresentaram poucas colônias provavelmente por perderem água presente no meio de cultura de forma muito rápida, impedindo o crescimento das células. Um dos motivos para a ausência de colônias nas placas incubadas a 15°C poderia ser a baixa difusão do glicerol a essa temperatura.

Não houve diferença significativa na frequência de mutantes que cresceram em diferentes temperaturas antes do plaqueamento, exceto os que cresceram à 15°C. Do mesmo modo, o trabalho de Chu (CHU et al., 2018) mostra uma diminuição no surgimento de mutantes em temperaturas mais baixas.

5.2 Competição entre MG1655 e Δpst em culturas em batelada e no quimiostato

O meio mínimo mais utilizado em nosso laboratório, tanto para o isolamento de mutantes PHO-constitutivos quanto para experimentos de competição contém o

tampão Tris como um dos componentes. O tampão Tris amplamente utilizado em meios de cultura é conhecido por interagir com a membrana externa de bactérias gram-negativas (VOSS, 1967), aumentando sua permeabilidade. Foi reportado que mutações no operon *pst* também podem causar alterações na membrana externa, causando um aumento na sua permeabilidade (LAMARCHE; HAREL, 2010). A ação conjunta do tampão Tris e alterações na membrana dos mutantes podem ser os causadores da perda de viabilidade das bactérias. Quando o tampão do meio de cultura foi substituído por HEPES, este efeito não foi observado.

No trabalho realizado por Neves (NEVES et al., 2020), para cada mutante PHO-constitutivo (cooperador) haveria aproximadamente 20.000 competidores, incapazes de quebrar G2P (trapaceiro), que por consumirem glicerol, mas não ajudarem na sua produção, estariam inibindo o aparecimento de colônias, levando, assim, à Tragédia dos Comuns. Surpreendentemente, diferente do que acontece em meio de cultura estruturado, a tragédia dos comuns não ocorreu em meio de cultura líquido, mesmo quando há uma diferença de 100.000 células selvagens para 1 célula mutante ou quando há a formação de um mutante PHO-constitutivo espontâneo tanto em tubos contendo apenas a cepa selvagens quanto nos tubos contendo as duas cepas competidoras MG1655 e MG1655 Δpst . O crescimento da cepa selvagem, as custas da produção de glicerol pelo mutante, pode ser observada tanto nas competições quanto no tubo contendo inicialmente apenas MG1655 e quanto maior o número de células selvagens, mais o mutante demora para crescer. O pico crescimento ocorre no 14º dia de incubação e a partir do 21º dia podemos observar uma perda na viabilidade das células, principalmente no mutante. Esta queda no número de UFCs é característica da fase de declínio das bactérias onde aproximadamente 99% das células morrem devido a estressores como falta de nutrientes e acúmulo de metabólitos (OSBORNE et al., 2021). Estes metabólitos podem estar tanto misturados no meio de cultura quanto acumulados na forma de gases, na parte superior do tubo de cultivo. Osborne em seu trabalho (OSBORNE et al., 2021) mostrou que ao adicionar-se um material que adsorvesse estes metabólitos voláteis, era possível postergar a fase de declínio. Algumas destas substâncias que se acumulam e podem causar dano na célula são amônia, indol e álcoois (AUDRAIN et al., 2015). Estes dois últimos podem desestabilizar as membranas e causar sua ruptura (LIU; QURESHI, 2009). Como o mutante Δpst pode conter alterações em sua membrana que alteram a sua permeabilidade, somadas as possíveis alterações causadas por metabólitos acumulados durante os dias de cultivo, é provável que após os 28 dias de cultivo, estas células perderam a viabilidade não formando colônias quando semeadas em placas de LB para contagem.

Logo após a fase de declínio, inicia-se a fase estacionária de longa duração. Uma das características desta fase é o surgimento de células mais resistentes que sobrevivem a fase de declínio (PLETNEV et al., 2015).

Bactérias que são incubadas por vários dias, em culturas em batelada, acabam sofrendo alterações genéticas que geram vantagens de crescimento em fase estacionária (growth advantage in stationary phase - GASP). Estas células, quando transferidas para um novo tubo contendo maior quantidade células com apenas um dia de cultura, após um certo tempo de competição irão ultrapassar o número de células jovens, podendo até levá-las a extinção. Esta vantagem é conferida pelo aumento na habilidade de utilizar aminoácidos como fonte de carbono e aumento na aptidão durante a fase estacionária (FINKEL, 2006; GAGLIARDI et al., 2016). É provável que as células da cepa selvagem que permaneceram na cultura possuem o fenótipo GASP.

5.3 Competição entre MG1655 e Δpst no quimiostato

Alguns modelos matemáticos sugerem que a Tragédia dos Comuns pode acontecer no quimiostato quando o microrganismo "trapaceiro" está em maior quantidade do que o "cooperador" (SCHUSTER et al., 2017; LEENHEER; SCHUSTER; SMITH, 2019). Por outro lado, trabalhos como o de Gore (GORE; YOUK; OUDENAARDEN, 2009) mostram que é possível a coexistência de cooperador e trapaceiro. Neste caso, uma pequena quantidade do nutriente produzido é capturada pela célula produtora, permitindo o seu crescimento e aumento do número de células cooperadoras na cultura, mesmo existindo trapaceiros que ficam com a maior parte do nutriente produzido. A coexistência entre trapaceiro e cooperador pode ser explicada pelo fenômeno chamado de "Snowdrift game". Esse modelo é comumente explicado por um exemplo hipotético onde duas pessoas que estão dirigindo seus carros ficam presas em um monte de neve e cada uma precisa decidir se sai do conforto de seu carro para tirar a neve e voltar para casa ou se permanece no carro e espera o outro motorista tirar toda a neve. Neste caso, o custo por tirar a neve sozinho é menor do que esperar que a neve derreta para conseguir ir para casa (DOEBELI; HAUERT, 2005). Em outro trabalho, Hauert (HAUERT; HOLMES; DOEBELI, 2006) mostra que em alguns casos é possível haver um equilíbrio entre trapaceiro e cooperador através de um sistema de *feedback*. No caso, quando a população é grande, os trapaceiros são favorecidos, a aptidão média da cultura se torna baixa e a densidade populacional diminui, ao passo que, se a população é pequena, há o favorecimento da cooperação levando a uma alta aptidão média e um aumento na

densidade populacional. Desta maneira, diferentemente do que acontece no trabalho de Neves (NEVES et al., 2020), a Tragédia dos Comuns não ocorreria em cultura líquida neste sistema, pois o ambiente favoreceria a permanência dos cooperadores e a cultura entraria em equilíbrio, coexistindo tanto as bactérias selvagens quanto os mutantes.

5.4 Frequência de mutantes no *background clpP*

Experimentos anteriores feitos em nosso laboratório mostraram que mutantes que não conseguem utilizar glicerol como fonte de carbono não são capazes de inibir o crescimento de mutantes PHO-constitutivos em placas contendo G2P como única fonte de carbono. Além destes, o mutante $\Delta clpP$, apesar de não ter aparente relação com a captação ou utilização de glicerol, também não é capaz de inibir o crescimento de PHO-constitutivos. Outra observação é a menor frequência de mutantes PHO-constitutivos em $\Delta clpP$ em relação a cepa selvagem MG1655, chegando a ser duas vezes menor em uma população de 10^7 bactérias. Apesar de MutL causar uma redução na taxa de mutação quando aumentada na célula (GALÁN et al., 2007) e provavelmente estar acumulada em um mutante *clpP*, este efeito não foi observado em testes realizados para medir frequência de mutantes.

Em um trabalho destinado a identificar proteínas degradadas por ClpXP, Flynn e colaboradores mostraram que a proteína GlpD é capturada por este sistema de degradação (FLYNN et al., 2003). GlpD é uma glicerol-3-fosfato-desidrogenase associada a membrana interna da célula (AUSTIN; LARSON, 1991) responsável por transformar G3P em fosfato de di-hidroxiacetona (DHAP) na cadeia respiratória. Deste modo, um acúmulo da proteína GlpD poderia levar a altas concentrações de DHAP resultando na formação de metilglioxal, através da enzima MgsA, que é um composto altamente reativo, conhecido por ser tóxico para a célula em altas concentrações (ACKERMAN; COZZARELLI; EPSTEIN, 1974)(FREEDBERG; KISTLER; LIN, 1971). Sendo assim, mutantes PHO-constitutivos não seriam inibidos por mutantes *clpP* devido a baixa quantidade de células competidoras na placa e o mutante $\Delta clpP$ teria uma frequência de mutantes menor por ter menos células sobreviventes semeadas em placas de G2P capazes de formar colônias PHO-constitutivas.

6 Conclusão

Para compreendermos de forma completa como funciona e dinâmica entre mutantes PHO-constitutivos e a cepa selvagem é importante entendermos a influência de agentes físicos e químicos presentes, como por exemplo os componentes do meio de cultura, se o meio é estruturado ou não-estruturado, também como influência da temperatura e mutações que podem contribuir para uma maior ou menor frequência de mutantes.

A partir dos resultados apresentados neste trabalho é possível concluir que temperaturas de pré-cultivo próximas a 37°C como 25°C e 45°C não influenciam a frequência de mutantes. No entanto, temperatura mais baixas como 15°C podem gerar menor número de mutantes PHO-constitutivos.

Em relação a temperatura durante a incubação das placas na estufa, ela não influenciou a frequência de mutantes a 25°C em comparação as placas incubadas a 37°C, mas a dinâmica de crescimento dos mutantes na placa foi mais lenta.

Em culturas líquidas de TG2PP, durante longos períodos de cultivo, o tampão Tris pode atrapalhar a permanência de mutantes PHO-constitutivos na cultura causando sua perda de viabilidade.

Diferente do que acontece em meio de cultura estruturado, a tragédia dos comuns não ocorre em meio de cultura líquido. Neste caso, há um equilíbrio entre a bactéria selvagem e a mutante que permite a coexistência entre as duas cepas.

O efeito de $\Delta clpP$ na frequência de mutantes PHO-constitutivos não acontece em outros sistemas mutacionais como no surgimento de mutantes resistentes a rifampicina e mutantes Lac-constitutivos.

Referências

- ACKERMAN, R. S.; COZZARELLI, N. R.; EPSTEIN, W. Accumulation of toxic concentrations of methylglyoxal by wild-type escherichia coli k-12. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 119, n. 2, p. 357–362, 1974.
- AUDRAIN, B. et al. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiology reviews*, Oxford University Press, v. 39, n. 2, p. 222–233, 2015.
- AUSTIN, D.; LARSON, T. J. Nucleotide sequence of the glpd gene encoding aerobic sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase of escherichia coli k-12. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 173, n. 1, p. 101–107, 1991.
- BAKER, T. A.; SAUER, R. T. Clpxp, an atp-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, Elsevier, v. 1823, n. 1, p. 15–28, 2012.
- BHAT, N. H. et al. Identification of clpp substrates in caulobacter crescentus reveals a role for regulated proteolysis in bacterial development. *Molecular microbiology*, Wiley Online Library, v. 88, n. 6, p. 1083–1092, 2013.
- BRAIBANT, M. et al. Identification of a second mycobacterium tuberculosis gene cluster encoding proteins of an abc phosphate transporter. *FEBS letters*, Wiley Online Library, v. 394, n. 2, p. 206–212, 1996.
- BRENNAN, F. P. et al. Long-term persistence and leaching of escherichia coli in temperate maritime soils. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 76, n. 5, p. 1449–1455, 2010.
- CARMANY, D. O.; HOLLINGSWORTH, K.; MCCLEARY, W. R. Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of phor. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 185, n. 3, p. 1112–1115, 2003.
- CHEKABAB, S. M. et al. The ecological habitat and transmission of escherichia coli o157:h7. *FEMS microbiology letters*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 341, n. 1, p. 1–12, 2013.
- CHU, X.-L. et al. Temperature responses of mutation rate and mutational spectrum in an escherichia coli strain and the correlation with metabolic rate. *BMC evolutionary biology*, BioMed Central, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2018.
- DOEBELI, M.; HAUERT, C. Models of cooperation based on the prisoner's dilemma and the snowdrift game. *Ecology letters*, Wiley Online Library, v. 8, n. 7, p. 748–766, 2005.
- ELSAS, J. D. V. et al. Survival of escherichia coli in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME journal*, Nature Publishing Group, v. 5, n. 2, p. 173–183, 2011.

- FINKEL, S. E. Long-term survival during stationary phase: evolution and the gasp phenotype. *Nature Reviews Microbiology*, Nature Publishing Group, v. 4, n. 2, p. 113–120, 2006.
- FLYNN, J. M. et al. Proteomic discovery of cellular substrates of the clpx protease reveals five classes of clpx-recognition signals. *Molecular cell*, Elsevier, v. 11, n. 3, p. 671–683, 2003.
- FREEDBERG, W.; KISTLER, W.; LIN, E. Lethal synthesis of methylglyoxal by escherichia coli during unregulated glycerol metabolism. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 108, n. 1, p. 137–144, 1971.
- GAGLIARDI, A. et al. Proteomics analysis of a long-term survival strain of escherichia coli k-12 exhibiting a growth advantage in stationary-phase (gasp) phenotype. *Proteomics*, Wiley Online Library, v. 16, n. 6, p. 963–972, 2016.
- GALÁN, J.-C. et al. Mutation rate is reduced by increased dosage of mutL gene in escherichia coli k-12. *FEMS microbiology letters*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 275, n. 2, p. 263–269, 2007.
- GOMES, T. A. et al. Diarrheagenic escherichia coli. *brazilian journal of microbiology*, SciELO Brasil, v. 47, p. 3–30, 2016.
- GORE, J.; YOUK, H.; OUDENAARDEN, A. V. Snowdrift game dynamics and facultative cheating in yeast. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 459, n. 7244, p. 253–256, 2009.
- HAUERT, C.; HOLMES, M.; DOEBELI, M. Evolutionary games and population dynamics: maintenance of cooperation in public goods games. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, The Royal Society London, v. 273, n. 1600, p. 2565–2571, 2006.
- IRVIN, R.; MACALISTER, T.; COSTERTON, J. Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer modification of escherichia coli outer membrane permeability. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 145, n. 3, p. 1397–1403, 1981.
- ISHII, S. et al. Presence and growth of naturalized escherichia coli in temperate soils from lake superior watersheds. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 72, n. 1, p. 612–621, 2006.
- JACKSON, R. J. et al. Expression of the pita phosphate/metal transporter of escherichia coli is responsive to zinc and inorganic phosphate levels. *FEMS microbiology letters*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 289, n. 2, p. 219–224, 2008.
- JANG, J. et al. Environmental escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *Journal of applied microbiology*, Wiley Online Library, v. 123, n. 3, p. 570–581, 2017.
- KANG, Z.-H. et al. Progress and prospect of single-molecular clpx atpase researching system—a mini-review. *Gene*, Elsevier, v. 774, p. 145420, 2021.

- LAMARCHE, M. G.; HAREL, J. Membrane homeostasis requires intact pst in extraintestinal pathogenic escherichia coli. *Current microbiology*, Springer, v. 60, n. 5, p. 356–359, 2010.
- LEENHEER, P. D.; SCHUSTER, M.; SMITH, H. Strong cooperation or tragedy of the commons in the chemostat. *Mathematical Biosciences and Engineering*, Arizona State University, v. 16, n. 1, p. 139–149, 2019.
- LINDGREN, D. The temperature influence on the spontaneous mutation rate: II. investigation by the aid of waxy mutants. *Hereditas*, Wiley Online Library, v. 70, n. 2, p. 179–184, 1972.
- LIU, S.; QURESHI, N. How microbes tolerate ethanol and butanol. *New biotechnology*, Elsevier, v. 26, n. 3-4, p. 117–121, 2009.
- MADIGAN, M. T. et al. *Microbiologia de Brock*. [S.l.]: 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MADIGAN, M. T. et al. *Microbiologia de Brock*. [S.l.]: 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MULLER, H. J. The measurement of gene mutation rate in drosophila, its high variability, and its dependence upon temperature. *Genetics*, Oxford University Press, v. 13, n. 4, p. 279, 1928.
- NEVES, H. I. et al. Competition for nutritional resources masks the true frequency of bacterial mutants. *BMC biology*, BioMed Central, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2020.
- NEVES, H. I. et al. Ugp and pita participate in the selection of pho-constitutive mutants. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 197, n. 8, p. 1378–1385, 2015.
- ORRUÑO, M.; KABERDIN, V.; ARANA, I. Survival strategies of escherichia coli and vibrio spp.: contribution of the viable but nonculturable phenotype to their stress-resistance and persistence in adverse environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Springer, v. 33, p. 1–7, 2017.
- OSBORNE, M. G. et al. Removal of toxic volatile compounds in batch culture prolongs stationary phase and delays death of escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 87, n. 24, p. e01860–21, 2021.
- PLETNEV, P. et al. Survival guide: Escherichia coli in the stationary phase. *Acta Naturae*, v. 7, n. 4 (27), p. 22–33, 2015.
- ROSENBERG, H.; GERDES, R.; CHEGWIDDEN, K. Two systems for the uptake of phosphate in escherichia coli. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 131, n. 2, p. 505–511, 1977.
- SCHUSTER, M. et al. Tragedy of the commons in the chemostat. *PloS one*, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 12, n. 12, p. e0186119, 2017.

- SOMORIN, Y. et al. The general stress response is conserved in long-term soil-persistent strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 82, n. 15, p. 4628–4640, 2016.
- SPIRA, B. et al. Alternative promoters in the *pst* operon of *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics*, Springer, v. 284, p. 489–498, 2010.
- TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, Nature Publishing Group, v. 8, n. 3, p. 207–217, 2010.
- TORRIANI, A.; ROTHMAN, F. Mutants of *Escherichia coli* constitutive for alkaline phosphatase. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 81, n. 5, p. 835–836, 1961.
- VOSS, J. Effects of organic cations on the gram-negative cell wall and their bactericidal activity with ethylenediaminetetra-acetate and surface active agents. *Microbiology*, Microbiology Society, v. 48, n. 3, p. 391–400, 1967.
- VUPPADA, R. K. et al. Phosphate signaling through alternate conformations of the *pst* phosphate transporter. *BMC microbiology*, BioMed Central, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2018.
- WANNER, B. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *Journal of cellular biochemistry*, Wiley Online Library, v. 51, n. 1, p. 47–54, 1993.
- ZHI, S. et al. Evidence of naturalized stress-tolerant strains of *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 82, n. 18, p. 5505–5518, 2016.