JACKELINE PINHEIRO BARROS

ANÁLISE TEMPORAL DO PERFIL DE RpoS EM ISOLADOS DE *Escherichia coli* DO CÓRREGO PIRAJUSSARA

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

SÃO PAULO

2017

JACKELINE PINHEIRO BARROS

ANÁLISE TEMPORAL DO PERFIL DE RpoS EM ISOLADOS DE *Escherichia coli* DO CÓRREGO PIRAJUSSARA

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

Área de concentração: Ecologia e Biologia Molecular Bacteriana

Orientador: Prof. Dr. Beny Spira

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

SÃO PAULO

2017

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)

Pinheiro Barros, Jackeline
Análise Temporal do Perfil de RpoS em Isolados de Escherichia coli do Córrego Pirajussara / Jackeline Pinheiro Barros; orientador Beny Spira. -- São Paulo, 2017.
61 p.

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

1. Escherichia coli. 2. RpoS. 3. RNA polimerase. 4. Estresse ambiental. I. Spira, Beny, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Jackeline Pinheiro Barros

Título da Dissertação: Análise Temporal do Perfil de RpoS em isolados de *Escherichia coli* de Águas Residuárias.

Orientador: Prof. Dr. Beny Spira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou a candidata:

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **685/14** referente ao projeto intitulado: "*Análise do status de RpoS em isolados naturais de Escherichia coli*" sob a responsabilidade de **Jackeline Pinheiro Barros,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 21 de agosto de 2014.

p/

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais, que dedicaram tempo
e amor em todos esses anos, e nunca
deixaram de acreditar no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meu pais Juvercina e Francisco, e a minha irmã Suzeline, por todo carinho, amor e incentivo que recebi de vocês durante todos esses anos.

Ao meu amor Willian, que mais que ninguém esteve do meu lado me apoiando e me consolando quando nos momentos difíceis, obrigada por estar sempre ao meu lado

Ao meu orientador prof. Dr. Beny Spira, por ter me dado essa incrível oportunidade, pela paciência e suporte que tive no meu mestrado, que me fizeram crescer bastante como profissional e pessoa.

Aos meus amigos que ganhei no laboratório 114, Henrique (Rulho), Luiz, Auricélia, Gardênia, Nicolás, Ariel, Raffaele, Cláudia, Vinícius, Taíssa, Gabriela (Gabic), Gabriela (Gaboc), Nicole e Íngrid, pelos inúmeros momentos alegres que tivemos.

À minha amiga Krysna, que sempre quando eu precisava de alguém para desabafar você estava lá.

À Luciana, aluna do professor Taborda, e Priscila, aluna do professor Márcio pela ajuda com meus experimentos.

Aos funcionários e técnicos do ICB que me ajudaram de alguma maneira.

Á FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”
(Albert Einstein)

RESUMO

BARROS, J. P. **Análise temporal do perfil de RpoS em isolados de *Escherichia coli* de águas residuárias**. 2017. 52 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Escherichia coli possui a capacidade de sobreviver em diversos habitats, seja dentro do hospedeiro ou no ambiente externo. Um importante regulador de adaptação da bactéria é a subunidade σS da RNA polimerase, responsável pela transcrição da maioria dos genes associados à fase estacionária e situações de estresse, como escassez de nutrientes, baixo pH, variações de temperatura, exposição à radiação UV e exposição a radicais livres de oxigênio. O gene rpoS possui elevado grau de polimorfismo, adquirindo facilmente mutações nulas ou atenuantes em condições de cultivo no laboratório. Essa variação confere à bactéria fenótipos distintos relativos à competência nutricional e resistência ao estresse. Na natureza, entretanto, alelos rpoS não-funcionais são, aparentemente, menos comuns. Para entender o papel de RpoS em condições extra laboratoriais, este trabalho teve como objetivo realizar uma análise temporal do perfil de rpoS em isolados naturais de *E. coli*, a fim de se correlacionar o status de RpoS com as alterações físico-químicas que ocorrem ao longo do ano em águas residuárias. Foi observado que RpoS é altamente persistente neste tipo de ambiente, sendo prevalente em praticamente todas as amostras, mas podem ser expressas em níveis diferentes, causando em uma grande variação nos fenótipos influenciados por RpoS. Além disso não houve correlação entre os níveis de RpoS e às estações do ano, mostrando que a proteína é altamente conservada e essencial para a sobrevivência em ambientes fora do hospedeiro, como águas residuais.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. RpoS. RNA polimerase. Estresse ambiental.

ABSTRACT

BARROS, J. P. **Temporal analysis of the RpoS profile in *Escherichia coli* isolates from wastewater.** 2017. 52 p. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Escherichia coli has the ability to survive in several habitats, either inside the host or in the external environment. An important regulator of bacterial adaptation is the σS subunit of RNA polymerase, responsible for the transcription of most genes associated with stationary phase and stress situations, such as nutrient scarcity, low pH, temperature variations, exposure to UV radiation and exposure to Free radicals of oxygen. The rpoS gene has a high degree of polymorphism, easily acquiring null or attenuating mutations under culture conditions in the laboratory. This variation confers on the bacterium distinct phenotypes related to nutritional competence and resistance to stress. In nature, however, nonfunctional rpoS alleles are apparently less common. To understand the role of RpoS in extra laboratory conditions, this work aimed to perform a temporal analysis of the profile of rpoS in natural isolates of *E. coli*, in order to correlate the status of RpoS with the physico-chemical changes that occur to the Throughout the year in wastewater. It was observed that RpoS is highly persistent in this type of environment, being prevalent in practically all the samples, but can be expressed in different levels, causing in a great variation in the phenotypes influenced by RpoS. In addition, there was no correlation between RpoS levels and seasons, showing that the protein is highly conserved and essential for survival in environments outside the host, such as wastewater.

Keywords: *Escherichia coli*, RpoS. RNA polymerase. Environmental stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Principais características da regulação para a expressão do gene rpoS e a produção de proteína σS em *E. coli*.....17

Figura 2 – Córrego Pirajussara.....21

Figura 3 – Teste filogenético para *Escherichia coli* feito por Clermont, onde observam-se as bandas esperadas para cada grupo.....24

Figura 4 - Genótipos quadruplex e etapas necessárias para classificar filotipicamente os isolados de *Escherichia coli*.....25

Figura 5. *Western blotting* de RpoS das amostras da primeira coleta.....32

Figura 6 - Classificação filogenética de amostras de *Escherichia coli* da coleta 1.....33

Figura 7 – Ensaios fenotípicos com amostras de *Escherichia coli* da coleta 1.....35

Figura 8: Distribuição de grupos filogenéticos encontrada nas amostras isoladas.....40

Figura 9 - Distribuição de cepas RpoS-negativas em relação aos grupos filogenéticos.....41

Figura 10 - Comparação entre os níveis RpoS e os níveis das características fenotípicas das amostras ambientais de *E. coli*.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados físico-químicos da água coletada do córrego Pirajussara.....28

Tabela 2 – Dados de classificação filogenética, presença de RpoS, ensaios fenotípicos e de crescimento com as amostras primeira coleta.....31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....13

1.1 Escherichia coli.....13

1.2 Fatores sigma da RNA polimerase.....14

1.3 Competição pelos fatores sigma.....16

1.4 Polimorfismo de RpoS.....17

2 OBJETIVOS.....20

3 MATERIAIS E MÉTODOS.....21

3.1 Meios de Cultura.....21

3.2 Coleta de amostras de água do ambiente.....21

3.3 Análises físico-químicas das amostras de água.....22

3.4 Isolamento e Identificação de *E. coli*......22

3.5 Tipagem Multiplex de *E. coli* para classificação filogenética.....23

3.6 Western-blot de RpoS.....25

3.7 Ensaios qualitativos de fosfatase alcalina, acúmulo de glicogênio e catalase.....26

3.8 Crescimento em meio mínimo.....27

4. RESULTADOS.....28

4.1 Análises físico-químicas.....28

4.2 Isolamento e Identificação.....29

4.3 Congelamento.....30

4.4 Análise dos dados por coleta.....30

4.4.1 Western blotting.....32

4.4.2 Classificação Filogenética.....33

4.5 Ensaios fenotípicos relacionados indiretamente com RpoS.....34

5. DISCUSSÃO/COMPILAÇÃO DOS RESULTADOS.....37

5.1 RpoS.....37

5.2 Ensaios filogenéticos.....39

5.3 RpoS x Ensaios fenotípicos.....41

6. CONCLUSÕES.....44

REFERÊNCIAS.....45

ANEXOS.....50

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma proteobactéria γ que pode apresentar-se de diversas formas na natureza, incluindo cepas comensais, patogênicas de animais e humanos ou ambientais (SOMORIN et al., 2016). *Escherichia coli* pode ser classificada em 8 grupos filogenéticos, A, B1, B2, C, D, E, F e Clado I. Essa classificação é baseada em estruturas clonais extensas que a bactéria possui e que apresentam não só diferenças genotípicas e fenotípicas, mas que nos dizem também qual o seu nicho ecológico, história de vida e habilidade de causar doenças. Cepas que causam infecções extra intestinais pertencem principalmente aos grupos B2 e D, enquanto que cepas comensais pertencem, normalmente, aos grupos A e B1. O filogrupo C pertence a um grupo de cepas estritamente relacionadas ao grupo B1, mas com características distintas, o grupo E faz parte de um pequeno grupo de estirpes que antes não tinham um grupo atribuído, do qual a espécie O157:H7 é o membro mais bem conhecido (TENAILLON et al., 2010), e o recém descrito filogrupo F possui características semelhantes às do filogrupo B2. Cepas que são fenotipicamente indistinguíveis de *E. coli*, mas que possuem características genéticas distintas foram designadas como clade crítico (CLERMONT et al., 2000, 2013).

Por muito tempo, *E. coli* tem sido utilizada como indicador universal de contaminação fecal em água potável, para recreação, irrigação, dessedentação de animais, aquicultura, etc. Porém, diversos estudos conseguiram isolar amostras de *E. coli* de vários ambientes, tais como solo, sedimentos e águas de climas temperados (ANDERSON et al., 2005; CHANDRASEKARAN et al., 2015; TYMENSEN et al., 2015, SOMORIN et al., 2016), sugerindo que a bactéria pode não apenas sobreviver, mas

também multiplicar-se nesses ambientes (ZHI et al., 2016). Esse fato coloca em dúvida a validade de *E. coli* como indicadora de contaminação fecal, pois é difícil determinar se a bactéria habita aquele ambiente há pouco tempo ou se sobrevive e replica-se durante longos períodos naquele local.

De fato, *E. coli* é capaz de sobreviver e multiplicar durante longos períodos no ambiente, fora de um hospedeiro, mesmo sendo um habitat moderadamente estressante, como por exemplo, ambientes que normalmente apresentam baixas temperaturas e baixa disponibilidade de nutrientes. Essa capacidade de sobreviver e reproduzir-se em diversos ambientes e hospedeiros é justificada principalmente pela sua diversidade genética, que pode variar em até 20% (ELSAS et al., 2011). As condições particulares de um meio causam a seleção de cepas tolerantes ao estresse ambiental, por meio de mutações em genes-chave. Similarmente, em culturas de laboratório de longo prazo, as bactérias evoluem e adaptam-se às diferentes condições impostas pelo pesquisador (CHIANG et al., 2011).

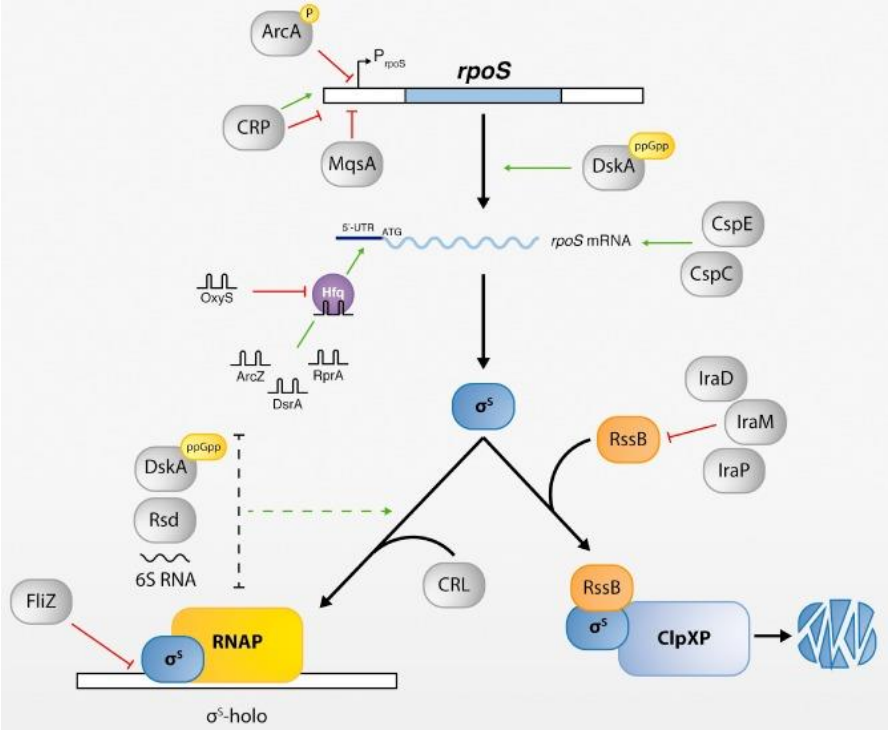
1.2 Fatores sigma da RNA polimerase

Bactérias regulam sua expressão gênica para adaptarem-se a condições ambientais variadas. A nível transcricional, a expressão gênica é catalisada pela enzima RNA polimerase, que é formada por um cerne, composto pelas subunidades α, α’, β, β’ e ω, e uma subunidade σ (sigma) variável, que se liga ao cerne de forma transitória e direciona a transcrição para um conjunto específico de genes. Desta forma, a subunidade σ é responsável pelo reconhecimento do sítio promotor e início da transcrição (HENGGE-ARONIS, 2000; SCHELLHORN, 2014). *Escherichia coli* possui sete fatores σ, sendo cada um responsável por transcrever conjuntos específicos de genes em resposta a condições ambientais diferentes (ISHIHAMA, 2000). O principal fator σ de *E. coli*, chamado também de fator *housekeeping*, é o σ^{70},

também conhecido como σ^D ou RpoD. Ele é particularmente ativo na fase exponencial de crescimento, e é responsável pela transcrição da maioria dos genes, especialmente aqueles associados ao crescimento bacteriano, assimilação de nutrientes e metabolismo, os chamados genes essenciais. O segundo em importância é o fator alternativo σ^{38} ou σ^S, também conhecido como RpoS, que regula a entrada da bactéria na fase estacionária de crescimento e reconhece os promotores de genes envolvidos na resposta geral ao estresse, tais como a inanição prolongada, baixo pH, estresse térmico, exposição à radiação UV e estresse oxidativo (NOTLEY-MCROBB et al., 2002; PAGET; HELMANN, 2003; DONG; SCHELLHORN, 2009a).

A regulação da expressão de *rpoS*, como mostrada na figura 1, ocorre em todos os níveis de expressão gênica, afetando o início de sua transcrição, estabilidade do *mRNA*, tradução, atividade da proteína e degradação (BATTESTI; MAJDALANI; GOTTESMAN, 2011; HENGGE, 2009). Na fase estacionária de crescimento, entretanto, a concentração de RpoS em *E. coli* aumenta principalmente por conta da redução de sua proteólise. A degradação de RpoS é promovida por uma chaperona denominada RssB, que faz ligação com o fator σ^S apresentando-o à protease ClpXP (HENGGE, 2009). A disponibilidade de RssB na célula, por sua vez, é modulada pelas pequenas proteínas anti-adaptadoras IraP (em resposta a escassez de fosfato), IraM (escassez de magnésio) e IraD (ocorrência de dano no DNA), que, em resposta a estresses ambientais, sequestram RssB permitindo o acúmulo de RpoS na célula (BOUGDOUR et al., 2008; BOUGDOUR; GOTTESMAN, 2007; MERRIKH; FERRAZZOLI; LOVETT, 2009).

Figura 1- Principais características da regulação para a expressão do gene rpoS e a produção de proteína σS em *E. coli*.



Fonte: Landini et al, 2013

Legenda - Setas verdes indicam regulação positiva, setas vermelhas indicam regulação negativa e linhas tracejadas indicam regulação indireta.

A expressão de RpoS é sensível a mudanças ambientais e sofre influência de vários fatores regulatórios, como por exemplo (p)ppGpp (guanosina tetra/pentafosfato) e polifosfato, que regulam negativamente a transcrição de RpoS na fase exponencial de crescimento e positivamente na fase estacionária (DONG; SCHELLHORN, 2009a, 2010; BATTESTI et al., 2011).

1.3 Competição dos fatores sigma

Com o aumento da concentração de RpoS na fase estacionária, ocorre um processo de competição entre σ^S e σ^{70} pela ligação ao núcleo da RNA polimerase. Isto ocorre porque a concentração do cernes livres, isto é, não ligada ao DNA, é de aproximadamente 600 a 700 moléculas por equivalente genômico de DNA, enquanto

que a soma das moléculas de todos fatores sigma presentes em *E. coli* atinge pelo menos o dobro desse valor (ISHIHAMA, 2000). A competição entre os fatores sigma causa uma inibição parcial da transcrição de genes transcritos por $E\sigma^{70}$ (holoenzima contendo σ^{70} associado ao núcleo da polimerase), já que o número de núcleos de RNA polimerase disponíveis é um fator limitante para a plena transcrição de seus genes dependentes (FAREWELL; KVINT; NYSTROM, 1998; MAEDA, 2000). O que também influencia essa competitividade é a afinidade com que o fator sigma se liga ao promotor (GRIGOROVA et al., 2006; MAURI; KLUMPP, 2014). Para que RpoS tenha sua afinidade pelo cerne da RNA polimerase aumentada, é necessário um fator de transcrição chamado Crl, que se liga especificamente a RpoS, facilitando a ligação da proteína ao cerne (CAVALIERE; NOREL, 2016). O gene *phoA*, por exemplo, que codifica para a fosfatase alcalina, é transcrito pela RNA polimerase associada a σ^{70} ($E\sigma^{70}$) (TASCHNER; YAGIL; SPIRA, 2004). Por sua vez, o gene *glgS*, envolvido na síntese de glicogênio (SPIRA; FERENCI, 2008), e *katE,* que codifica para a enzima catalase (CHIANG et al., 2011), são transcritos por $E\sigma^{S}$.

1.4 Polimorfismo de RpoS

O gene *rpoS* é altamente polimórfico (IVANOVA et al., 1992; ATLUNG et al., 2002) e essa variação proporciona às bactérias diferentes fenótipos relativos à competência nutricional e resistência ao estresse (NOTLEY-MCROBB et al., 2002). Foram identificadas várias mutações atenuantes em *rpoS*, tanto em isolados naturais de *E. coli* quanto em cepas cultivadas em laboratório. Por exemplo, cepas selvagens de *E. coli* quando mantidas em cultura por longos períodos de tempo tendem a acumular mutações em *rpoS*, adquirindo vantagem competitivas em relação a bactérias de culturas jovens. Este fenótipo foi designado como “Vantagem de Crescimento em Fase Estacionária” ou GASP, do inglês, *growth advantage in*

stationary phase (ZAMBRANO et al., 1993; FINKEL, 2006). Uma alteração comum é a presença de uma mutação âmbar no códon 33 (TAG), enquanto que cepas *rpoS*$^{+}$ possuem Glu (GAG), Tyr (TAT), ou Gln (GAG) na mesma posição. O alelo *rpoS*am confere um fenótipo atenuado em relação à resistência a estresses e à expressão de genes dependentes de σ^{S}, quando comparado ao tipo selvagem (GALBIATI et al., 2014).

Mutantes *rpoS* podem ser selecionados sob limitação de nutrientes, sugerindo que a presença do alelo selvagem de *rpoS* carrega uma desvantagem, caracterizada por uma relação de "*trade-off*" (conflito de escolha) entre a aptidão para a resistência ao estresse e a absorção de nutrientes. (Growth Advantage in Stationary Phase) (Zambrano et al., 1993; Finkel, 2006). Isso ocorre devido a competição entre os fatores sigma mencionada acima. Se por um lado, a presença de RpoS diminui a capacidade de absorção de nutrientes e a expressão de genes de crescimento, a presença de *rpoS* é necessária em condições ambientais que requerem a expressão de genes relacionados à proteção e sobrevivência da bactéria. Isso explica porque a maioria dos isolados naturais de *E. coli* carregam cópias selvagens de *rpoS*. Crescimento em meios com fontes alternativas (pobres) de carbono, tais como succinato e acetato ou com concentrações limitantes de glicose também favorece a seleção de mutações em *rpoS*. A relação de perda e ganho da função de RpoS pode ser um importante mecanismo adaptativo para garantir que *E. coli* sobreviva em ambientes naturais complexos (SPIRA; FERENCI, 2008; DONG; SCHELLHORN, 2009b). Até mesmo a transferência de *E. coli* entre laboratórios pode resultar em mutações em *rpoS*. Foi demonstrado que durante um curto período de incubação em um *stab,* necessário para o envio de cepas bacterianas pelos correios, surge uma quantidade considerável de mutantes *rpoS* (FERENCI et al., 2011; SPIRA et al., 2011).

Até recentemente, a maioria dos trabalhos que estudaram a diversidade de *rpoS,* reportaram aproximadamente 20-40% de alelos de rpoS nulos ou atenuados em populações ambientais de *E. coli* ou *Salmonella* (FERENCI et al., 2011; BHAGWAT et al., 2005; ROBBE-SAULE et al., 2003). Porém, estudos recentes revelaram que a perda da função de RpoS é uma ocorrência mais rara (CHIANG et al., 2011; SNYDER et al., 2012; BLEIBTREU et al., 2014). Nesses estudos a proporção de mutantes *rpoS* nulos variou de 0,3 a 2% do total de cepas examinadas. Ao contrário das publicações mais antigas, nesses trabalhos, foi dada especial atenção à coleta e preservação das bactérias, evitando que as mesmas fossem armazenadas em condições que induzam o surgimento e a prevalência de mutantes *rpoS*. Todavia, nenhuma dessas avaliações levou em consideração a diversidade dos níveis de RpoS. Ou seja, mesmo que a grande maioria dos isolados de *E. coli* apresente genótipo *rpoS*$^{+}$, ainda pode haver uma acentuada variação nos níveis de expressão intrínseca da proteína, conforme demonstrado em relação as cepas da coleção ECOR (Ferenci et al., 2011). Além do mais, mesmo se a proporção real de mutantes nulos de *rpoS* for de "apenas" 0,3-2%, ainda assim é um índice muito maior do que o esperado para mutações espontâneas em *E. coli* (aproximadamente 10^{-6}/gene/geração), evidenciando um processo ativo de seleção natural para a perda de *rpoS* no ambiente.

2 OBJETIVOS

Nas condições de laboratório, cepas de *E. coli* tendem facilmente a acumular mutações em *rpoS*, seja atenuando ou eliminando a sua expressão. Entretanto, na natureza a presença de alelos selvagens de *rpoS* é, aparentemente, mais comum do que a sua ausência. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a distribuição de alelos de *rpoS* em isolados naturais de *E. coli* durante as estações do ano, analisar o perfil da proteína e a sua abundância, com o intuito de determinar a sua importância na natureza.

Alguns trabalhos analisaram o perfil de isolados ambientais em relação à presença de *rpoS*. Porém, nenhum deles foi realizado em água residuárias, nem tampouco foi realizada uma análise sistemática da dinâmica temporal de *rpoS* e de seu nível celular.

Objetivamos também encontrar uma relação entre as condições físico-quimicas do habitat de *E. coli* na hora da coleta e a presença de RpoS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios de Cultura

10Meio LB (MILLER, 1992): 10 g de Triptona, 5 g de Extrato de Levedura e 10 g de NaCl; dissolvido em 1 litro de H_2O. Meio rico utilizado para cultivo de Escherichia coli.

Meio TGP/TSP ágar: 0,468% (m/v) NaCl, 0,15% (m/v) KCl, 0,108% (m/v) NH_4Cl, 1,452% (m/v) Tris-base, 0,02% (m/v) $MgCl_2.6\ H_2O$, 0,035% (m/v) Na_2SO_4, 0,2 ml $CaCl_2$ (1 M), 0,2 ml $FeCl_3$ (0,01 M), 0,2 ml $ZnCl_2$ (0,01 M), 75 ml HCl (12 M), 0,1 ml KH_2PO_4 (1 M); pH 7,5. A esta solução é adicionada 0,2% de uma fonte de carbono (glicose ou succinato), e 15g/L de ágar.

3.2 Coleta de amostras de água do ambiente

Foram realizadas 12 coletas mensais de água do córrego Pirajussara (23°33'53.31"S; 46°42'49.86"W) durante 1 ano. Este córrego vem carregado de grande quantidade de dejetos de esgoto doméstico, sendo uma fonte rica de coliformes fecais (figura 2).

Figura 2: Córrego Pirajussara, local onde foram realizadas as coletas mensais de água.

Fonte: Elaborada pela autora.

As coletas foram realizadas com o auxílio de frasco de vidro tipo shott de 1L, sem adição de preservantes, suspensa por um barbante a fim de alcançar a superfície da água. Após o término da coleta, os frascos foram higienizados externamente com álcool 70% e transportados no mesmo recipiente, a temperatura ambiente, até o laboratório, para imediatamente prosseguir com o isolamento de microrganismos.

O intervalo entre as coletas foi de 30 dias, geralmente no dia 15 de cada mês, tendo início em 15 de outubro de 2014, e término em 15 de setembro de 2015.

3.3 Análises físico-químicas das amostras de água

Durante a coleta foram examinados os seguintes aspectos físicos e químicos da água: temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido. Para a medição de oxigênio dissolvido utilizou-se kits prontos (marca Chemetrics) compostos por ampolas contendo Rhodazina D (para análise entre 0 e 1 mg/L de oxigênio dissolvido) ou índigo carmina (detecta acima de 1 mg/L de oxigênio dissolvido). A quantificação dos resultados é feita visualmente através de comparadores colorimétricos. As amostras de água foram levadas para o laboratório para medição da turbidez em espectrofotômetro (DO_{600}) (Hongve e Åkesson, 1998), e para iniciar o isolamento e identificação de *Escherichia coli*.

3.4 Isolamento e Identificação de *E. coli*

As amostras do córrego foram diluídas 100 e 1000 vezes em solução de NaCl 0,9% estéril, alíquotas de 100 uL foram plaqueadas no meio semi-seletivo e diferencial MacConkey, e incubadas a 30 ºC por 24 horas. No dia seguinte, aproximadamente 100 colônias que apresentaram coloração vermelha (fermentadoras de lactose) foram re-isoladas também em meio MacConkey a fim de garantir a pureza das cepas, e submetidas a testes bioquímicos, inoculando os isolados nos meios semissólidos

EPM, Mili e citrato. Aquelas colônias que apresentaram o padrão esperado para *E. coli* (produção de indol positiva, metabolização de citrato negativa, produção de urease negativa e produção de gás sulfídrico negativa) foram cultivadas em meio LB ágar a 30 ºC para obtenção de estoque e congeladas a -80 ºC em solução aquosa 15% de glicerol.

3.5 Tipagem Multiplex de *E. coli* para classificação filogenética

Após serem triados bioquimicamente como pertencentes à espécie *Escherichia coli*, os isolados foram classificados em grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F e Clado I) através de ensaio de PCR multiplex, descrito em Clermont *et al* 2013. Foi utilizado 1 µl de suspensão de uma colônia fresca em água deionizada como molde. Para cada reação foram adicionados 25 µl do Master Mix de PCR GoTaq (Promega) e 1 µl de cada um dos seguintes iniciadores específicos:

ChuA.1b - 5′-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3′

ChuA.2 - 5′-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3′

YjaA.1b - 5′-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-3′

YjaA.2b - 5′-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3′

TspE4C2.1b - 5′-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3′

TspE4C2.2b - 5′-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC-3′

AceK.f - 5′-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3′

ArpA1.r - 5′-TCTCCCCATACCGTACGCTA-3′

A reação foi feita de acordo com as seguintes etapas: desnaturação durante 4 min a 94 °C, 30 ciclos de 5 segundos a 94 °C e 20 seg a 57 °C (grupo E) ou 59 °C

(quadruplex e grupo C), e uma etapa de extensão final de 5 min a 72 °C. O produto da reação foi separado em gel de agarose 1,8% e as bandas obtidas comparadas a do padrão. A classificação baseia-se na verificação da presença de um ou mais genes e na combinação dos mesmos. A figura 1 mostra a combinação de bandas esperadas para cada grupo filogenético. Os grupos A e C apresentam bandas tanto do gene *arpA*, quanto *yjaA*, assim como os grupos D e E apresentam ambos os genes *arpA*, *chuA* e o fragmento TspE4.C2, sendo necessária a diferenciação dos grupos através de um novo PCR utilizando os pares de genes ArpAgpE.f e ArpAgpE.r (grupo E) e *trpAgpC.1* e *trpAgpC.2* (grupo C) (LESCAT et al, 2012).

ArpAgpE.f – 5'-GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC-3'

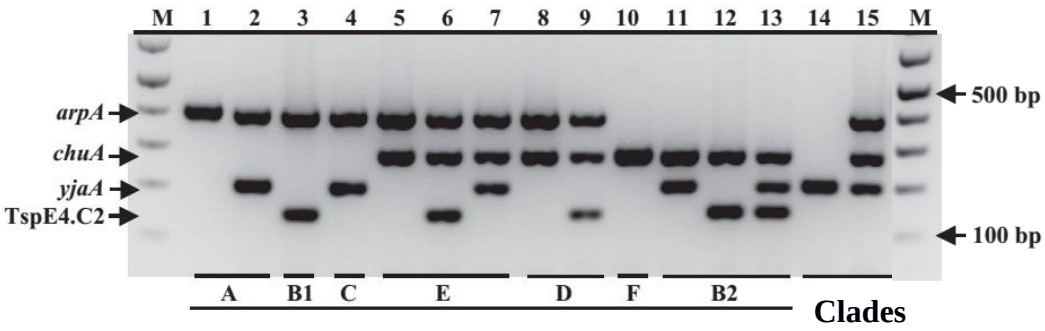
ArpAgpE.r – 5'-GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAC-3'

trpAgpC.1 – 5'-AGTTTTATGCCCAGTGCGAG-3'

trpAgpC.2 – 5'-TCTGCGCCGGTCACGCCC-3'

Amostras classificadas como "desconhecidas" devem ser analisadas para confirmar se pertencem à espécie *Escherichia coli*.

Figura 3- Teste filogenético para *Escherichia coli* feito por Clermont, onde observam-se as bandas esperadas para cada grupo.



Fonte: Clermont, 2013

Figura 4 - Genótipos quadruplex e etapas necessárias para classificar filotipicamente os isolados de *Escherichia coli*

Quadruplex genotype					
arpA (400 bp)	*chuA* (288 bp)	*yjaA* (211 bp)	TspE4.C2 (152 bp)	Phylo-group	Next step
+	–	–	–	A	
+	–	–	+	B1	
–	+	–	–	F	
–	+	+	–	B2	
–	+	+	+	B2	
–	+	–	+	B2	Could be confirmed by testing *ibeA* gene[a]
+	–	+	–	A or C	Screen using C-specific primers. If C+ then C, else A
+	+	–	–	D or E	Screen using E-specific primers. If E+ then E, else D
+	+	–	+	D or E	Screen using E-specific primers. If E+ then E, else D
+	+	+	–	E or clade I	Screen using E-specific primers. If E– then clade I, confirm using cryptic clade primers[b]
–	–	+	–	Clade I or II	Confirm using cryptic clade primers[b]
–	(476)[c]	–	–	Clade III, IV or V	Confirm using cryptic clade primers[b]
–	–	–	+	Unknown	Perform MLST
–	–	+	+	Unknown	Perform MLST
+	–	+	+	Unknown	Perform MLST
+	+	+	+	Unknown	Perform MLST
–	–	–	–	Unknown	Confirm *Escherichia* identification using *uidA* or *gadA*/*B*[d], if positive screen using cryptic clade primers[b] and/or perform MLST

Fonte – Clermont, 2013

3.6 *Western-blot* de RpoS

Bactérias foram cultivadas *overnight* em meio LB a 37 °C. No dia seguinte, a turbidez das culturas foi medida em espectrofotômetro (DO_{600}). O volume de cultura correspondente a 1 unidade de DO_{600} foi centrifugado a 10000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em tampão de lise de proteína (0.5 M Tris-HCl, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0,01% bromophenol blue) e fervido por 5 minutos. A suspensão foi centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos para sedimentação dos debris bacterianos. As proteínas contidas no lisado de células foram então separadas em gel de 10% de acrilamida. Foi utilizado o marcador Precision Plus Protein™ Prestained Dual Color (Bio-Rad) como padrão de peso molecular, e como controles duas cepas de MG1655, sendo uma selvagem e a outra *knockout* em *rpoS*. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas a uma membrana de nitrocelulose por meio de um electroblotter (BioRad).

A membrana foi bloqueada com leite desnatado 1% em PBS-T, e então submetida a ensaio de imunodetecção com o soro anti-RpoS monoclonal (Neoclone) diluído 1000 vezes, seguido de incubação com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à peroxidase. Para detecção do complexo, foi utilizado o kit de detecção Clarity (Bio-Rad) conforme recomendado pelo fabricante. A membrana foi exposta a filmes de raios-X por diversos períodos de tempo até obter revelação satisfatória.

3.7 Ensaios qualitativos de fosfatase alcalina, acúmulo de glicogênio e catalase

O nível de RpoS foi indireta e qualitativamente avaliado através da atividade da enzima fosfatase alcalina (inibida por RpoS), acúmulo de glicogênio e produção de catalase (ambos estimulados por RpoS), conforme descrito (SPIRA E FERENCI, 2008). Culturas de bactérias foram incubadas overnight a 37 °C. Os inóculos foram então diluídos para uma concentração de 10^6 bactérias, e um volume de 2 uL dessa suspensão foi aplicado sobre placas de petri com meio mínimo TGP ágar suplementado com X-P (substrato da fosfatase alcalina). As placas foram incubadas *overnight* a 37 ºC. No dia seguinte, a variação da tonalidade da coloração azul observada nos *patches* (crescimento bacteriano presente no local da placa de ágar em que foi inoculada a suspensão bacteriana) foi avaliada. Quanto maior o nível de RpoS, mais fraca a coloração azul. Para a análise de acúmulo de glicogênio, *patches* de bactérias cultivadas em placas de LB, conforme descrito acima, foram armazenados a 4 ºC por 24 h e então inundados com uma solução de iodo (20 g de iodeto de potássio, 10 g de cristais de iodo dissolvidos em 1 l de água e 250 ml de EtOH). A intensidade da coloração marrom varia diretamente com o nível de RpoS nas células. O nível de produção de catalase foi avaliado pela aplicação de solução

de peróxido de hidrogênio 100% sobre as culturas semeadas em placa, e observação de produção de gás pelas colônias.

3.8 Crescimento em meio mínimo

O crescimento de *E. coli* em diferentes fontes de carbono é indiretamente influenciado pelo nível de RpoS (SPIRA et. al. 2008). Nesse contexto, a bactéria foi avaliada quanto à capacidade de multiplicar-se em meios onde a única fonte de carbono fosse glicose ou succinato, através de cultivo de patches dos isolados a partir de uma cultura bacteriana crescida tubo overnight a 37 °C em placas de petri contendo meio TGP ou TSP (substituição de glicose 20% por succinato 20% como fonte de carbono) ágar, incubados *overnight* a 37 °C por 12 e 24 horas respectivamente. A densidade dos *patches* foi observada. Foram utilizados como controles cepas de MG1655 WT (RpoS positiva), MG1655 delta rpoS (*rpoS* negativa) e delta *rssB* (promove acúmulo de RpoS).

4. RESULTADOS

4.1 Análise físico-química da água do córrego

Conforme apresentado na tabela 1, a água do córrego apresentou temperatura média de 20 °C no período da manhã, a faixa de flutuação da temperatura foi de 5 °C (mínima de 18 e máxima de 23°C). Naturalmente, durante o verão as temperaturas foram mais altas do que durante os meses de inverno. O pH da água manteve-se alcalino durante o ano todo. Neste caso a variação máxima foi 1,4 logs (40 vezes), de 7,03 em junho de 2015 a 8,44 dois meses depois. A concentração de oxigênio dissolvido disponível foi muito baixa, com valores abaixo de 1 mg/L durante quase todo o período. Esse resultado era esperado, visto que águas residuárias estão em constante processo de eutrofização, tendo o oxigênio dissolvido na água rapidamente consumido. A única exceção foi o mês de junho de 2015, no qual a concentração de O_2 medida foi de 5 mg/L. Os valores de turbidez (DO_{600}) indicam a presença de matéria orgânica, consequentemente de nutrientes absorvíveis, no local. A coleta 9, particularmente, apresentou um alto valor de densidade óptica, provavelmente devido a coleta ter sido realizada em um dia chuvoso, antecedido por 2 semanas sem precipitação, o que pode ter resultado em movimentação de uma grande quantidade de sólidos que estavam sedimentados no fundo. O excesso de chuvas pode também haver contribuído para o aumento da concentração de O_2 nesse mês.

Tabela 1. Dados físico-químicos da água retirada do córrego Pirajussara

N° da coleta	Data	Temperatura	pH	O.D (mg/l)	DO_{600}
1	15/10/2014	22 °C	7,5	0,6 - 0,8	0,14
2	17/11/2014	19 °C	7,71	0,6 - 0,8	0,142

3	15/12/2014	21 °C	7,73	0,6 - 0,8	0,134
4	15/01/2015	20 °C	7,56	0,6 - 0,8	0,105
5	16/02/2015	23 °C	7,4	0,8 - 1	0,07
6	16/03/2015	22 °C	7,33	0,6 - 0,8	0,107
7	15/04/2015	21 °C	7,21	0,8 - 1	0,160
8	15/05/2015	18 °C	7,72	0,8-1	0,110
9	15/06/2015	18 °C	7,03	5	1,150
10	15/07/2015	19 °C	8,04	1 - 2	0,180
11	15/08/2015	21 °C	8,44	0,4 - 0,6	0,220
12	15/09/2015	20 °C	7,79	0,6 - 0,8	0,175

O.D. representa a concentração de oxigênio dissolvido na amostra de água

4.2 Isolamento e Identificação de *E. coli*

A partir do cultivo prévio das amostras de água em meio MacConkey, foram isoladas, de forma aleatória, colônias Lac positivas e prosseguiu-se com a identificação bioquímica. Foram consideradas como pertencentes à espécie *Escherichia coli,* as bactérias que apresentassem os seguintes fenótipos: hidrólise de ureia negativa, descarboxilação do aminoácido lisina negativa, desaminação do triptofano negativa, produção de ácido sulfídrico negativa, teste positivo para indol e ausência de crescimento em meio citrato . Em média, cerca de 35% dos isolados Lac^+ foram identificados como pertencentes à espécie *Escherichia coli*, o que é uma frequência significativamente alta, pois num ambiente eutrofizado como um córrego de águas residuais, espera-se uma variedade extremamente alta de espécies

bacterianas, que competem pela sobrevivência a esse ambiente (BHATIA et al., 2017; CHAGAS et al., 2011).

4.3 Congelamento

Após a identificação bioquímica, as colônias dos isolados de *E. coli* foram diretamente congeladas a -80 °C na presença de glicerol, sem passar por um processo de cultivo em cultura líquida. Isso foi feito para minimizar a possibilidade de seleção de mutantes *rpoS* durante o crescimento dessas cepas.

O objetivo inicial era isolar 360 amostras, 30 a cada mês. Porém, algumas cepas não sobreviveram ao congelamento, restando 349 amostras isoladas no total. Como *rpoS* está fortemente associada à resistência bacteriana contra alterações bruscas de temperatura, algumas das cepas perdidas poderiam ser eventualmente *rpoS*-negativas. Os dados obtidos com estas amostras antes de serem congeladas não foram incluídos nos resultados.

4.4 Análise detalhada da coleta 1

Na tabela 2, trago como exemplo ilustrativo todos os dados obtidos para a coleta de nº 1. As tabelas de todas as demais coletas encontram-se reproduzidas no Anexo I.

As amostras isoladas foram identificadas numericamente. Em algumas coletas, há amostras faltando, pois como já mencionado, algumas cepas morreram durante o congelamento. Foram realizados os seguintes ensaios: classificação filogenética, avaliação de presença e nível de RpoS, acúmulo de glicogênio, atividade da enzima catalase, atividade da enzima fosfatase alcalina, crescimento em meio mínimo contendo glicose como fonte única de carbono e crescimento em meio mínimo contendo succinato como fonte de carbono. Os resultados dos ensaios foram

qualitativamente avaliados, sendo que a cada um deles eles foi aplicada uma nota relativa: de '-' a '+++++', onde '+++++' representa o nível máximo de expressão de RpoS, atividade enzimática ou crescimento, e '-' representa a ausência de RpoS ou de crescimento ou os níveis mínimos de atividade enzimática.

Tabela 2 – Dados de classificação filogenética, presença de RpoS, ensaios fenotípicos e de crescimento com as amostras primeira coleta

Amostra	Grupo filogenético	RpoS[1]	Catalase[2]	Glicogênio[3]	FA[4]	Glicose[5]	Succinato[6]
1	Desconhecido	++++	+	+++	-	+++++	++++
3	A	++++	+	++++	+++	++++	++
6	B2	+++++	+	+++	++++	++++	+++
7	E	+++++	+	++++	-	++++	++++
8	C	+++++	+	++	+++	+++++	++++
9	A	++++	+	+++	++	+++++	+++
10	B1	+++++	+	+++	+	++++	++++
11	C	++++	+	++	+++	+++++	+
12	B1	+++	+	+++	++++	+++++	++
13	B2	+++++	+	++	+++++	+++++	-
14	B1	+++	+	++	+++	+++++	++++
15	C	+++++	+	++	+++	+++++	-
16	B1	++++	+	+++	+++	++++	-
17	B2	+++++	+	++	-	+++	+++
18	D	+++++	+	++	++++	++++	+++
19	Desconhecido	+++	-	++++	+	+++	+++
20	E	++++	+	++	+++	+++++	+++
21	C	++++	+	++++	++	+++++	++++
22	B1	+++++	+	++	++	+++++	-
23	C	++++	+	++	++	++++	+
24	F	+++++	+	+++	++	+++++	++++
25	C	+++	+	+++	+++	++++	-
26	F	+++	+	++	++++	+++++	++++
27	C	++++	+	++++	++	+++++	++++
28	Desconhecido	+++++	-	+++	++	+	-
29	C	+++	+	++++	-	+++++	++++
30	Desconhecido	++	+	+++++	+++	++	+++
MG 1655[7]		++++	+	+++++	+++	++++	+++
MG 1655 Δ*rpoS*[7]		-	-	+	+++	++++	++++
MG1655 Δ*rssB*			+	+++++	-	++++	-

[1] Determinado por *western-blotting*

[2] Atividade de catalase, avaliada através da efervescência de colônias de bactérias inundadas com peróxido de hidrogênio

[3] Acúmulo de glicogênio, medido pela intensidade da coloração marrom de *patches* de bactérias corados com iodo

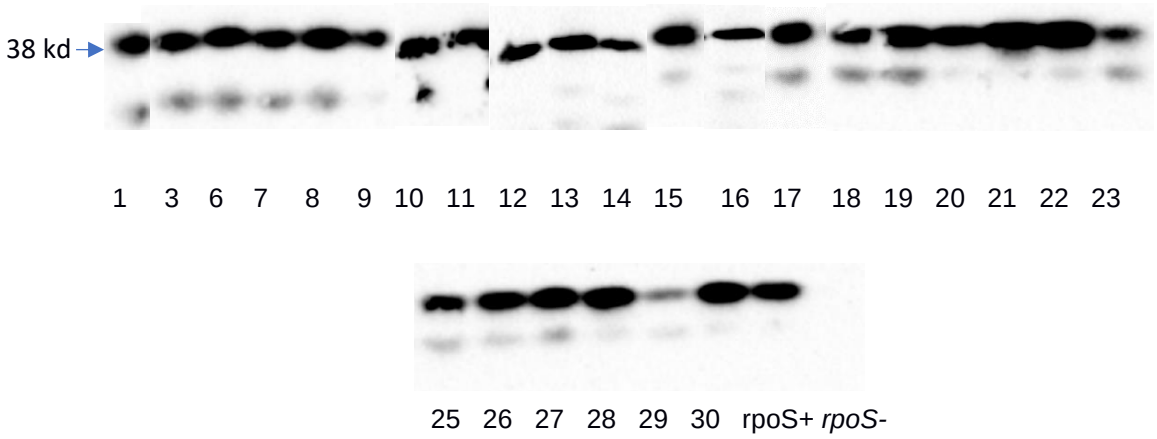
[4] Atividade de fosfatase alcalina, avaliada em patches de bactérias cultivados na presença de X-P

[5] Crescimento em meio mínimo com glicose como fonte de carbono
[6] Crescimento em meio mínimo com succinato como fonte de carbono
[7] Cepa selvagem de *E. coli* K-12 e seus mutantes *rpoS* nulo e *rssB* (produz altos níveis de RpoS), usados como controle em todos os ensaios

4.4.1 *Western blotting* de RpoS

A primeira característica apresentada é a expressão de RpoS detectada pelo ensaio de *western blotting*. Na figura 2 podemos visualizar bandas de diferentes intensidades, que correspondem a diferentes níveis da proteína, e para essas diferenças foram dadas notas relativas de 0 a 5, onde 0 não há expressão de RpoS, e 5 há expressão alta da proteína naquela coleta. O tamanho das bandas de RpoS observadas foi de aproximadamente 38 kDa. Foram observadas também bandas de menor massa, resultantes da degradação da proteína ou de reação cruzada com proteínas inespecíficas. Nesse exemplo, apenas uma amostra exibiu expressão fraca de RpoS (++), e as demais variaram entre média e alta expressão (++ a +++++).

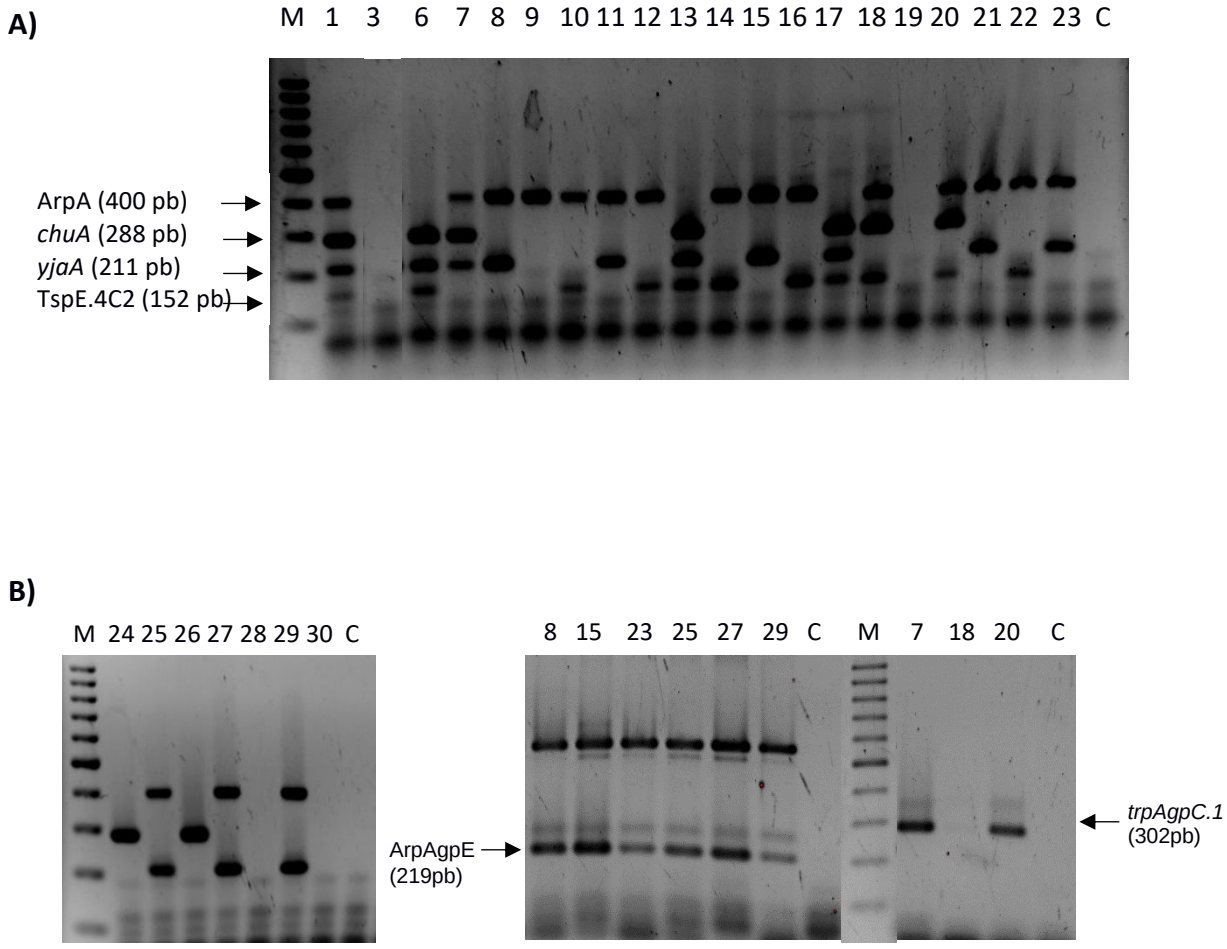
Figura 5. *Western blotting* de RpoS das amostras da coleta 1, onde observa-se variação na intensidade das bandas



4.4.2 Classificação Filogenética

A classificação filogenética foi realizada de acordo com Clermont 2013, conforme detalhado na seção 3.5 dos Métodos. Esse método consiste de um PCR multiplex com 4 pares de iniciadores. A figura 3 mostra a foto do gel das amostras da coleta 1. As figuras 3A e 3B apresentam uma tipagem multiplex típica; a figura 3C mostra a tipagem confirmatória para os grupos C, D e E. Nesta coleta, foram encontradas cepas pertencentes a todos os grupos filogenéticos, exceto o clado críptico I, com predominância dos grupos relacionados a espécies comensais (A, B1 e C). 00000000000000000000000000000000

Figura 6- Classificação filogenética por tipagem multiplex de amostras da coleta 1



Legenda – A e B) PCR quadruplex onde pode-se classificar cada bactéria a partir da presença ou ausência de 4 bandas diferentes correspondentes a cada par de gene. B) Amostras da coleta 1 que apresentaram resultado A ou C (à esquerda do marcador de peso molecular) e D ou E(à direita) e passaram por um novo PCR simplex utilizando primers específicos, onde a presença/ausência do gene determinou sua classificação. M – marcador de peso molecular; C – controle da reação (sem DNA).

A análise dos dados de filogenia com os de nível de RpoS não permite estabelecer uma correlação entre eles. Ou seja, os diferentes níveis de RpoS estão representados em todas os grupos filogenéticos nesta coleta.

4.5 Ensaios fenotípicos relacionados indiretamente com RpoS

Os isolados foram analisados quanto às suas características fenotípicas: produção de fosfatase alcalina, acúmulo de glicogênio e produção de catalase e capacidade de crescimento em meio mínimo utilizando glicose ou succinato como fonte única de carbono.

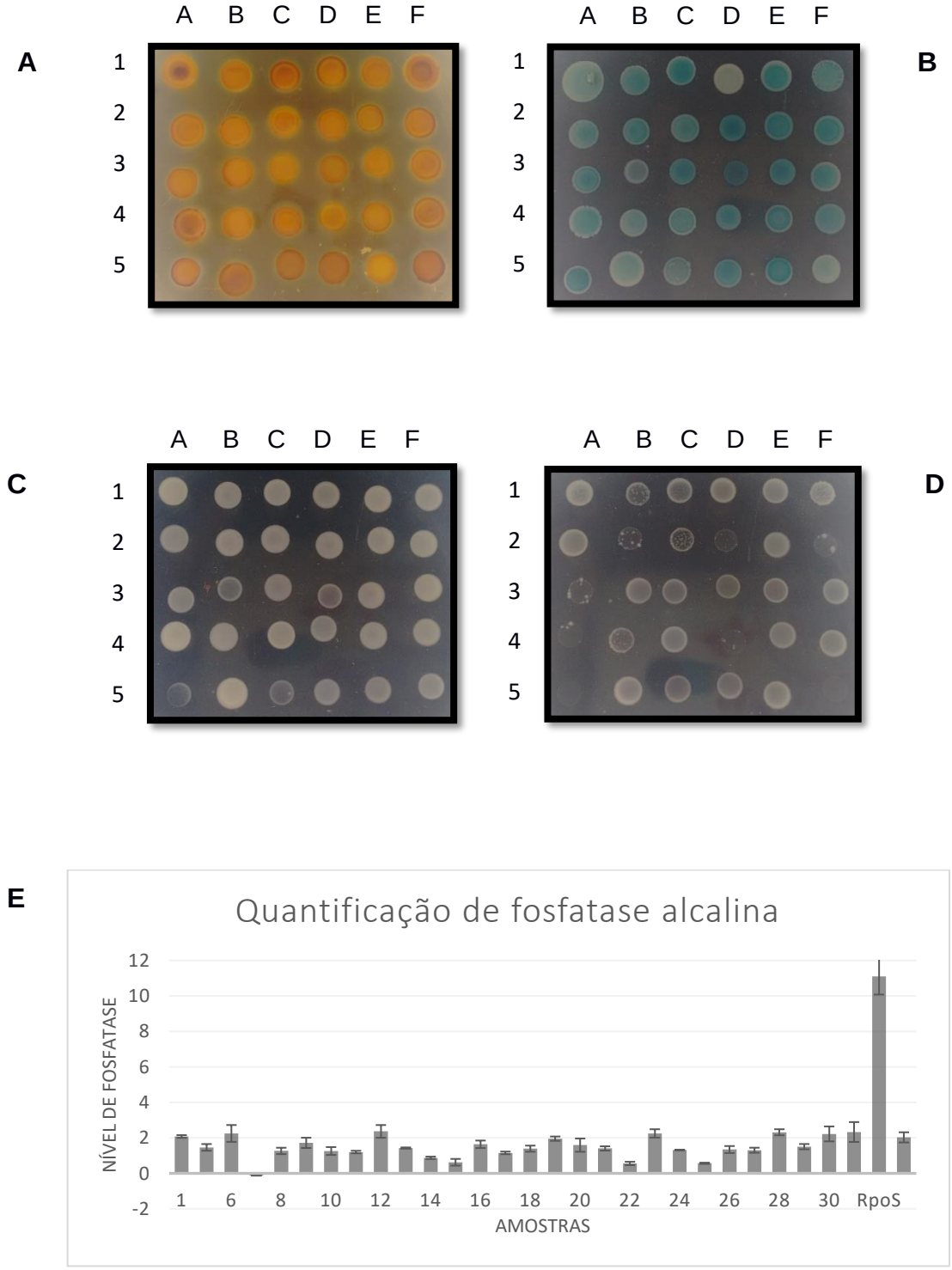
Utilizando novamente os dados da coleta número 1, observamos as variações tanto de coloração quanto de crescimento que ocorreram entre os fenótipos. As três amostras no canto inferior direito correspondem a MG1655 selvagem, mutante Δ*rpoS* e mutante Δr*ssB*, da esquerda para a direita. Os demais *patches* representam as amostras dos isolados. Em relação às cepas controle, podemos observar que a coloração do glicogênio foi mais intensa no mutante *rssB*, seguido da cepa selvagem e bem menos intensa no mutante *rpoS*. Já no ensaio de FA, o contrário pode ser observado, o mutante *rpoS* apresentou coloração mais intensa que a cepa selvagem e esta, mais do que o mutante *rssB*. O mutante *rpoS* cresceu mais fortemente na placa de TSP (succinato com fonte de C) do que a cepa selvagem. Já o mutante rssB praticamente não cresceu nesse meio. Os patches em TGP (glicose como fonte de C), não diferenciam entre os diferentes níveis de RpoS, mas servem para determinar a auxotroficidade dos isolados. Portanto se algum isolado não crescer bem em TSP,

devemos observar a placa de TGP para determinar se esta falha não é devida a alguma auxotrofia da cepa.

A análise dos fenótipos dos isolados não apresentou uma correlação perfeita com os níveis de RpoS, assim como observado com as cepas controle. Por exemplo, a cepa B5 apresentou coloração marrom intensa (alto glicogênio), coloração azul fraca (baixa FA) e crescimento razoável em TSP. Esses fenótipos estão razoavelmente de acordo, pois indicam uma cepa com alto RpoS. Já a cepa A5 apresentou menor intensidade de coloração de glicogênio, FA mais intensa e cresceu muito pouco em TSP. Os fenótipos de coloração de glicogênio e FA indicam que este isolado produz menos RpoS que a cepa B5, mas o fraco crescimento em TSP sugere um alto nível de RpoS. Porém, o patch dessa cepa em TGP também é fraco, indicando algum problema de crescimento em meio mínimo, não relacionado à RpoS. Como último exemplo, a cepa D1 mostrou glicogênio relativamente alto, nenhuma FA e bom crescimento em TSP. A baixa FA deveria vir acompanhada de fraco crescimento em TSP, porém, nesse caso, é mais provável que o baixo nível de FA seja decorrente de uma mutação no gene *phoA*, que codifica para a FA, ou em outro gene, que regula a sua expressão. Em resumo, os testes fenotípicos que indicam indiretamente o nível e atividade de RpoS funcionam muito bem com cepas isogênicas, conforme observado em relação a MG1655 e seus mutantes *rpoS* e *rssB* mas em coleções de bactérias que não compartilham a mesma carga genética, há vários fatores, independentes de RpoS, que podem interferir no perfil fenotípico da bactéria.

A compilação dos resultados de todos os ensaios fenotípicos será apresentada na próxima seção.

Figura 7 – Ensaios fenotípicos com os isolados da coleta 1



Legenda: A- Acúmulo de glicogênio; B – Fosfatase alcalina; C – Crescimento em meio contendo glicose; D – Crescimento em meio contendo succinato; E – Ensaio quantitativo de produção de fosfatase alcalina em meio com carência de fosfato. Os três últimos *patches* correspondem a cepa selvagem MG1655, seu mutante *rpoS* e seu mutante *rssB*. As cepas mutantes no gene rssB, expressam RpoS em maior quantidade.

5 COMPILAÇÃO DOS RESULTADOS/ DISCUSSÃO

5.1 RpoS

Um total de 355 isolados de *E. coli* foram examinados neste projeto. Destes, 15 não apresentaram bandas referentes a RpoS nos ensaios de *western-blotting*. Porém, algumas das cepas RpoS-negativas de acordo com o imunoblot apresentaram fenótipos RpoS$^+$, por exemplo, o isolado número 8 da coleta 5 mostrou atividade de catalase, acúmulo de glicogênio relativamente alto e baixo crescimento em meio com succinato. Os imunoblots destas amostras foram repetidos, de forma que não há dúvida de que estes isolados não produzem uma proteína RpoS reconhecível nessas condições. Eliminando essas cepas “problemáticas”, há um total de 8 Cepas RpoS negativas, o que corresponde a 2% da população. Portanto, é possível concluir que a presença de RpoS em amostras de águas residuárias é prevalente, o que sugere que, ao contrário do que ocorre em condições de laboratório, onde a perda de *rpoS* é disseminada, esta proteína desempenha um importante papel na aptidão de *E. coli* no ambiente.

Neste trabalho, todos os isolados *rpoS*$^+$ apresentaram proteínas de aproximadamente 38 kDa. Por outro lado, foram observados níveis de expressão de RpoS diferenciados entre cepas originadas a partir de uma mesma coleta. Porém, os imunoblots foram realizados apenas uma vez para cada cepa, portanto, não é possível afirmar ainda se essa variação é real. Nos últimos meses, foram realizadas diversas tentativas no sentido de padronizar um ensaio de ELISA para RpoS, que foram concluídos com sucesso, porém, o ensaio ainda não foi aplicado com as amostras ambientais.

Estudos que buscaram avaliar a frequência de mutações *rpoS* em isolados naturais mostraram, por vezes, conclusões divergentes. Segundo Bhagwat et al*,* de 82 amostras de *E. coli* patogênicas isoladas de pacientes, 24% delas não apresentaram RpoS funcional (BHAGWAT et al., 2005). Ferenci et al avaliou a produção de RpoS em 31 estirpes naturais, e destas quase 30% não produziam a proteína (FERENCI et al., 2011). Por outro lado, Chiang et al encontrou apenas 6 amostras RpoS-negativas dentre 2040 isolados ambientais (CHIANG et al., 2011), e Somorin et al identificou apenas 2% de suas amostras solo-persistentes como RpoS negativas, além de confirmar que as cepas RpoS positivas possuíam a ORF de *rpoS* intacta e a proteína ativa (SOMORIN et al., 2016). Outro estudo recente mostrou que a perda da função de RpoS é rara em isolados ambientais (BLEIBTREU et al., 2014).

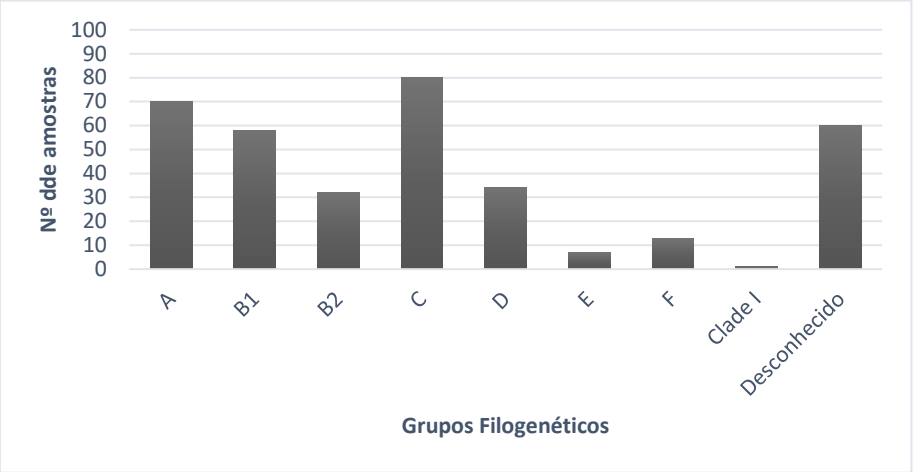
É importante destacar que a forma como a perda de RpoS é avaliada difere entre os estudos, principalmente em três fatores: Primeiramente, a forma como o status de RpoS foi medido, pois alguns estudos foram feitos apenas com base em medições fenotípicas (WHITE et al., 2011), onde a contagem de cepas RpoS-negativas foi feita com base em mutações em outros genes responsáveis pelo fenótipo observado. Por outro lado, falsos RpoS-positivos, ocorrem porque cepas distintas possuem redes regulatórias que diferem de tal maneira que acabam por mascarar a ausência de RpoS (BHAGWAT *et al*., 2005, 2006; ROBBE-SAULE; ALGORTA; ROUILHAC, 2003). *Western blotting* é uma forma mais direta para avaliar a presença e medir a concentração de RpoS na célula. No entanto, cepas que produzem uma proteína não funcional (porém de tamanho e intensidade equivalente à de uma proteína selvagem) podem ser caracterizadas como RpoS-positivas, conforme mostrado em Spira et al. 2011. Outra variável é a própria diversidade de *E. coli* encontrada em uma variedade de ambientes, seja dentro ou fora do hospedeiro. Como

o impacto da mutação varia entre as diferentes linhagens os estudos podem chegar a diferentes conclusões sobre a frequência de alelos nulos de *rpoS*. Portanto, a análise do polimorfismo do perfil de RpoS deve levar em conta aspectos diretos (detecção da proteína e sequenciamento do gene) e indiretos (ensaios fenotípicos).

5.2 Ensaios filogenéticos

A análise filogenética dos isolados de *E. coli* mostrou que foram identificados isolados naturais pertencentes a todos os grupos filogenéticos, o que reflete a grande heterogeneidade de filogrupos existentes, além de sugerir a coexistência de cepas comensais (pertencentes aos grupos A, B1 e C) e patogênicas no local da coleta (pertencentes aos grupos B2, D, E e F). A Figura 6 mostra que houve uma predominância de amostras comensais em praticamente todas as coletas, representando quase 60% do total de amostras, contra apenas 25%, que pertencem a filogrupos que são caracterizados pela presença de cepas potencialmente patogênicas. É preciso salientar, entretanto, que não foi realizada uma busca extensiva de fatores de virulência nessas cepas. Um número limitado de cepas (30) foi testado em relação à presença do gene *eae*, havendo em todos os casos, resultados negativos.

Figura 8: Distribuição de grupos filogenéticos encontrada nas amostras isoladas.



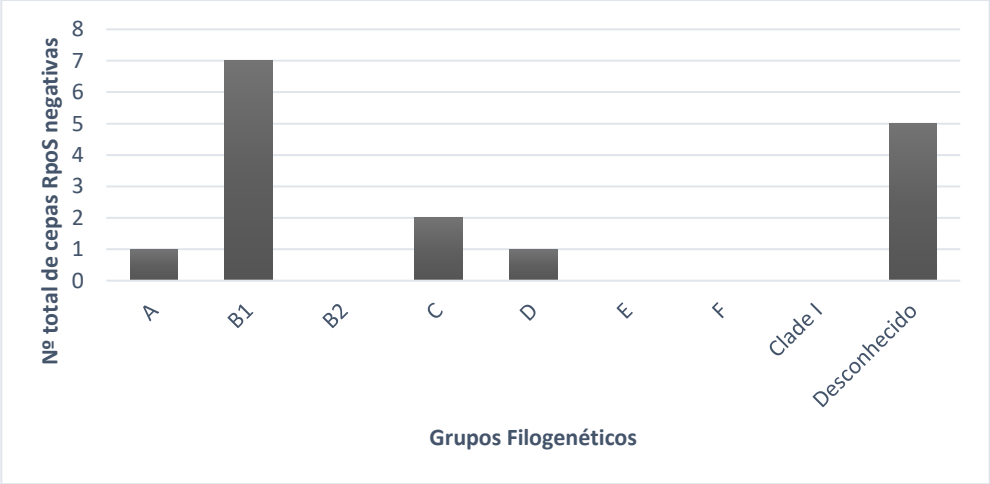
Quase 20% das amostras não se enquadraram em nenhum grupo, e foram denominadas “Desconhecidas”. Estas podem ser tantos comensais como patogênicas, ou, menos provável, pertencer a outra espécie bacteriana. Para confirmar a sua classificação seria necessário testar para a presença dos genes uidA ou gadA/B (MCDANIELS et al. 1996).

Analisando as amostras sazonalmente, não houve correlação significativa na distribuição dos grupos filogenéticos com os meses do ano. Ou seja, os diversos filogrupos encontram-se mais ou menos equitativamente distribuídos nas amostras mensais. Observou-se, porém, que na coleta do mês de julho, das 7 amostras classificadas como B1, seis não apresentaram bandas correspondentes a RpoS nos ensaios de *blotting.* Esse dado pode sugerir que cepas pertencentes a esse grupo têm maior tendência a perder RpoS. É interessante notar que a cepa laboratorial K-12, que tem forte tendência a perder RpoS, pertence ao filogrupo A, que é próximo a B1. De fato, nessa coleção de cepas, foram detectadas RpoS-negativas apenas nos filogrupos A, B1, C, D e 'Desconhecido' (Figura 7). Sendo que os filogrupos A, B1 e C que são formados majoritariamente por cepas comensais, possuíam 10 das 11 cepas

RpoS-negativas pertencentes a filogrupos definidos (excluído o grupo dos Desconhecidos). Portanto, é possível que cepas pertencentes aos filogrupos B2, D, E e F (potencialmente patogênicas) sejam mais dependentes de RpoS do que cepas de outros filogrupos. De fato, na coleção de cepas de *E. coli* NILS, formada principalmente por cepas patogênicas intestinais, foi observado que *rpoS* se encontra sob uma forte pressão seletiva purificadora, com uma relação Ka/Ks substancialmente menor que 1 (BLEIBTREU et al., 2014).

Um outro fator que pode haver contribuído para a relativa baixa variação nos índices de RpoS é o fato de que as coletas foram realizadas em um ano atípico, visto que foi um ano de baixa precipitação de chuvas e predominância de temperaturas altas.

Figura 9 - Distribuição de cepas RpoS-negativas em relação aos grupos filogenéticos.

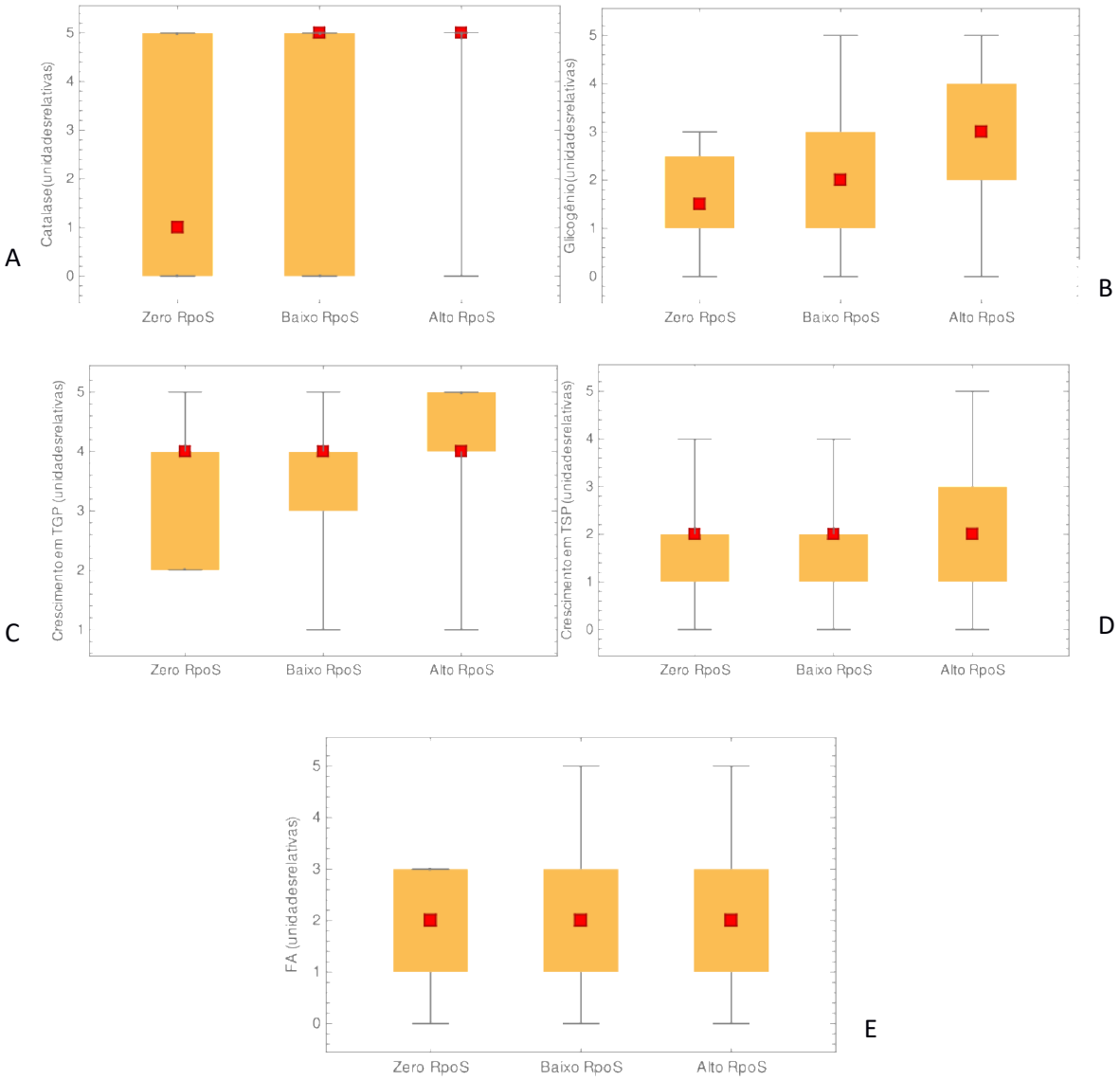


5.3 RpoS x Ensaios fenotípicos

A partir dos dados obtidos com todas as coletas, cada fenótipo analisado foi correlacionado com os níveis de RpoS obtidos nos ensaios de *blotting*. Para facilitar a

análise e limitar o subjetivismo da classificação da intensidade das bandas, os níveis de RpoS foram delimitados em 3 pontos: zero RpoS ('-' na coluna RpoS nas tabelas das análises das coletas), pouco RpoS ('+' na coluna RpoS) e alto RpoS ('++' a '+++++' na coluna RpoS). As correlações foram ilustradas em gráficos de barra do tipo *boxplot* (fig.5). O fenótipo que apresentou a melhor correlação com o nível de RpoS foi o de atividade da enzima catalase, onde mais de 80% das amostras com alto nível de RpoS também apresentaram alto nível da enzima (mediana = 5). As amostras com baixo ou zero RpoS mostraram uma variação maior, mas com mediana = 1.

Figura 10 - Comparação entre os níveis RpoS e os níveis das características fenotípicas das amostras ambientais de *E. coli*.



Legenda: A) Catalase; B) Acúmulo de glicogênio; C) Crescimento em TGP; D) Crescimento em TSP; E) Fosfatase alcalina

O acúmulo de glicogênio é outra característica fenotípica de *Escherichia coli* que possui relação direta com o nível de RpoS (HENGGE-ARONIS; FISCHER, 1992). É possível observar uma correlação positiva, porém dispersa, entre os níveis de RpoS e glicogênio. A mediana das cepas RpoS-zero, RpoS baixo e RpoS alto foi de, respectivamente, 1,5, 2 e 3. A correlação positiva, porém, imperfeita, é provavelmente devido a fatores não-relacionados a RpoS, como, por exemplo, algum defeito na síntese de glicogênio causado por mutação em algum gene relacionado a essa via metabólica, alguma alteração na sequência promotora do gene *glgS*.

Os demais testes fenotípicos – atividade de FA, crescimento em TSP e crescimento em TGP não apresentaram correlação, negativa ou positiva, com o nível de RpoS. Era de se esperar que RpoS correlacionasse de forma inversa com a FA e o crescimento em succinato, pois ambos os fenótipos são coordenados por genes fortemente dependentes de sigma-70. Essa falta de correlação pode ser explicada por diversos fatores. Por exemplo, no caso da FA, uma baixa atividade pode ser devido a mutações no sistema de dois-componentes PhoB/PhoR que controla a expressão da FA. Por outro lado, uma forte atividade da enzima pode indicar uma mutação no operon *pst*, que codifica para o repressor da expressão de *phoA*.

É preciso frisar que as medições qualitativas são imperfeitas, principalmente em se tratando de isolados naturais geneticamente heterogêneos. Para dar mais precisão aos dados obtidos nas análises fenotípicas, estes deverão ser quantificados densitometricamente e novamente confrontados com os resultados dos *blots* de RpoS.

6 Conclusões

Com os resultados obtidos pode-se concluir que há uma grande diversidade de cepas de *Escherichia coli* em águas residuárias, apresentando amostras pertencentes a todos os grupos filogenéticos. Porém, espécies comensais apresentaram maior predominância no local;

Pode-se concluir também que a presença de RpoS em isolados naturais de *E coli* é essencial para a sua sobrevivência, pois a bactéria necessita resistir aos diversos estresses sofridos a todo momento no ambiente.

A distribuição de RpoS não sofreu influência do clima, sugerindo que a escolha entre manter ou perder a proteína não depende de fatores de estresse relacionados à mudança de estação.

Os fenótipos de *Escherichia coli* foram muito diversificados, mostrando que a capacidade e a forma de sobreviver a ambientes estressantes são diferentes em cada cepa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ANDERSON, K. L. et al. Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3041–3048, 2005.

ATLUNG, T.; NIELSEN, H. V; HANSEN, F. G. Characterisation of the allelic variation in the rpoS gene in thirteen K12 and six other non-pathogenic *Escherichia coli* strains. **Molecular genetics and genomics : MGG**, v. 266, n. 5, p. 873–81, jan. 2002.

BATTESTI, A.; MAJDALANI, N.; GOTTESMAN, S. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. **Annual review of microbiology**, v. 65, p. 189–213, 2011.

BHAGWAT, A. A. et al. Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains Based on Acid Resistance Phenotypes. v. 73, n. 8, p. 4993–5003, 2005.

BHAGWAT, A. A. et al. Functional heterogeneity of RpoS in stress tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4978–4986, 2006.

BHATIA, A. et al. Effect of intermittent aeration on microbial diversity in an intermittently aerated IFAS reactor treating municipal wastewater : A field study. J**ournal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering**, v. 4529, n. January, p. 0–9, 2017.

BLEIBTREU, A. et al. The rpoS Gene Is Predominantly Inactivated during Laboratory Storage and Undergoes Source-Sink Evolution in Escherichia coli Species. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 24, p. 4276–4284, 2014.

BOUGDOUR, A. et al. Multiple pathways for regulation of σS (RpoS) stability in Escherichia coli via the action of multiple anti-adaptors. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 298–313, 2008.

BOUGDOUR, A.; GOTTESMAN, S. ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 31, p. 12896–901, 2007.

CAVALIERE, P.; NOREL, F. Recent advances in the characterization of Crl, the

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS**. NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

unconventional activator of the stress sigma factor σS/RpoS. **Biomolecular Concepts**, v. 7, n. 3, p. 197–204, 2016.

CHAGAS, T. P. G. et al. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 572–581, 2011.

CHANDRASEKARAN, R. et al. Geographic isolation of *Escherichia coli* genotypes in sediments and water of the Seven Mile Creek - A constructed riverine watershed. **Science of the Total Environment**, v. 538, p. 78–85, 2015.

CHIANG, S. M. et al. Phenotypic diversity caused by differential RpoS activity among environmental Escherichia coli isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 22, p. 7915–7923, 2011.

CLERMONT, O. et al. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–4558, 2000.

CLERMONT, O. et al. The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, 2013.

DONG, T.; SCHELLHORN, H. E. Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic Escherichia coli O157:H7 strain EDL933. **BMC genomics**, v. 10, p. 349, 2009a.

DONG, T.; SCHELLHORN, H. E. Control of RpoS in global gene expression of Escherichia coli in minimal media. **Molecular genetics and genomics : MGG**, v. 281, n. 1, p. 19–33, jan. 2009b.

FERENCI, T. et al. The constancy of global regulation across a species: the concentrations of ppGpp and RpoS are strain-specific in Escherichia coli. **BMC microbiology**, v. 11, n. 1, p. 62, 2011.

FINKEL, S. E. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 113–20, fev. 2006.

GALBIATI, H. F.; TASCHNER, N. P.; SPIRA, B. The effect of the rpoSam allele on gene expression and stress resistance in Escherichia coli. **Archives of Microbiology**,

v. 196, n. 8, p. 589–600, 2014.

GRIGOROVA, I. L. et al. Insights into transcriptional regulation and sigma competition from an equilibrium model of RNA polymerase binding to DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 14, p. 5332–5337, 2006.

HENGGE-ARONIS, R. A role for the sigma S subunit of RNA polymerase in the regulation of bacterial virulence. **Adv Exp Med Biol**, v. 485, p. 85–93, 2000.

HENGGE-ARONIS, R.; FISCHER, D. Identification and molecular analysis of glgS, a novel growth-phase-regulated and rpoS-dependent gene involved in glycogen synthesis in Escherichia coli. **Molecular microbiology**, v. 6, n. 14, p. 1877–86, 1992.

HENGGE, R. Proteolysis of sigmaS (RpoS) and the general stress response in Escherichia coli. **Research in microbiology**, v. 160, n. 9, p. 667–76, nov. 2009.

ISHIHAMA, A. Functional modulation of Escherichia coli RNA polymerase. **Annual review of microbiology**, v. 54, p. 499–518, 28 jan. 2000.

IVANOVA, A. et al. DNA base sequence variability in katF (putative sigma factor) gene of Escherichia coli. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 20, p. 5479–80, 25 out. 1992.

LESCAT, M., et al. Commensal Escherichia coli strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host- dependant population structure. **Environmental Microbiology Reports,** v. 5, n. 1, p. 49-57, 2012.

MAEDA, H.; FUJITA, N.; ISHIHAMA, A. Competition among seven Escherichia coli sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 18, p. 3497–3503, 2000.

MAURI, M.; KLUMPP, S. A Model for Sigma Factor Competition in Bacterial Cells. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 10, p. 29–34, 2014.

MCDANIELS, A.E., et al. Confirmational identification of Escherichia coli, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, p. 3350–3354,1996.

MERRIKH, H.; FERRAZZOLI, A. E.; LOVETT, S. T. Growth phase and (p)ppGpp

control of IraD, a regulator of RpoS stability, in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 24, p. 7436–7446, 2009.

NOTLEY-MCROBB, L.; KING, T.; FERENCI, T. rpoS Mutations and Loss of General Stress Resistance in Escherichia coli Populations as a Consequence of Conflict between Competing Stress Responses rpoS Mutations and Loss of General Stress Resistance in Escherichia coli Populations as a Consequence of C. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 3, p. 806–811, 2002.

PAGET, M.; HELMANN, J. The sigma70 family of sigma factors. **Genome Biology**, v. 4, n. 1, p. 203, 2003.

ROBBE-SAULE, V.; ALGORTA, G.; ROUILHAC, I. Characterization of the RpoS Status of Clinical Isolates of Salmonella enterica. v. 69, n. 8, p. 4352–4358, 2003.

SCHELLHORN, H. E. Elucidating the function of the RpoS regulon. **Future microbiology**, v. 9, p. 497–507, 2014.

SOMORIN, Y. et al. The general stress response is conserved in long-term soil-persistent strains of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, n. May, p. AEM.01175-16, 2016.

SPIRA, B.; FERENCI, T. Alkaline phosphatase as a reporter of ??s levels and rpoS polymorphisms in different *E. coli* strains. **Archives of Microbiology**, v. 189, n. 1, p. 43–47, 2008.

SNYDER, E; GORDON, D. M.; STOEBEL, D. M. *Escherichia coli* lacking RpoS are rare in natural populations of non-pathogens. **G3 (Bethesda)**. v. 2, n. 11, p. 1341-1344. 2012.

TASCHNER, N. P.; YAGIL, E.; SPIRA, B. A differential effect of ??s on the expression of the PHO regulon genes of Escherichia coli. **Microbiology**, v. 150, n. 9, p. 2985–2992, 2004.

TENAILLON, O. et al. The population genetics of commensal Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1740–1534 (Electronic), p. 207–217, 2010.

TYMENSEN, L. D. et al. Comparative accessory gene fingerprinting of surface water Escherichia coli reveals genetically diverse naturalized population. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 263–277, 2015.

VAN ELSAS, J. D. et al. Survival of Escherichia coli in the environment: fundamental and public health aspects. **The ISME journal**, v. 5, n. 2, p. 173–183, 2011.

WHITE, A. P. et al. Intergenic sequence comparison of Escherichia coli isolates reveals lifestyle adaptations but not host specificity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 21, p. 7620–7632, 2011.

ZAMBRANO, M. M. et al. Microbial competition: Escherichia coli mutants that take over stationary phase cultures. **Science (New York, N.Y.)**, v. 259, n. 5102, p. 1757–1760, 1993.

ZHI, S. et al. Evidence of Naturalized Stress-Tolerant Strains of *Escherichia coli* in Municipal Wastewater Treatment Plants. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 18, p. 5505–5518, 2016.

ANEXOS

Tabelas 1 a 12: Dados de classificação filogenética e análise de níveis de RpoS, crescimento e ensaios fenotípicos

COLETA 1

Amostra	Grupo filogenético	RpoS	Catalase	Glicogênio	XP	Glicose	Succinato
1	Desconhecido	++++	+	+++	-	+++++	++++
3	A	++++	+	++++	+++	++++	++
6	B2	+++++	+	+++	++++	++++	+++
7	E	+++++	+	+++	-	++++	++++
8	C	+++++	+	++	+++	+++++	++++
9	A	++++	+	+++	++	+++++	+++
10	B1	+++++	+	+++	+	++++	++++
11	C	++++	+	++	+++	+++++	+
12	B1	+++	+	+++	++++	+++++	++
13	B2	+++++	+	++	+++++	+++++	-
14	B1	+++	+	++	+++	+++++	++++
15	C	+++++	+	++	+++	+++++	-
16	B1	++++	+	+++	+++	++++	-
17	B2	+++++	+	++	-	+++	+++
18	D	+++++	+	++	++++	++++	+++
19	Desconhecido	+++	-	++++	+	+++	+++
20	E	++++	+	++	+++	+++++	+++
21	C	++++	+	++++	++	+++++	++++
22	B1	+++++	+	++	++	+++++	-
23	C	++++	+	++	++	++++	+
24	F	+++++	+	+++	++	+++++	++++
25	C	+++	+	+++	+++	++++	-
26	F	+++	+	++	++++	+++++	++++
27	C	++++	+	++++	++	+++++	++++
28	Desconhecido	+++++	-	+++	++	+	-
29	C	+++	+	++++	-	+++++	++++
30	Desconhecido	++	+	+++++	+++	++	+++
MG 1655 WT		++++	+	+++++	+++	++++	+++
MG 1655 Δ*rpoS*		-	-	+	+++	++++	++++
MG1655 Δ*rssB*			+	+++++	-	++++	-

COLETA 2

Amostra	Grupo filogenético	RpoS	Glicogênio	XP	Catalase	Glicose	Succinato
1	Desconhecido	+	++	bc	-	-	+
2	A	++++	++++	++	+	++++	+
3	F	+++	+++	++	+	++++	+
4	E	+	++++	++++	+	++++	+
5	A	+++++	++++	++	+	++++	+
6	Desconhecido	+++++	++	++++	-	-	-
7	A	++++	+++	++	+	++++	+
8	C	++	++	++	+	+++++	+
10	C	+++	+	+++	+	+++	-
11	A	++++	++	++	+	+++	-
12	A	++	+	+++	+	++++	-
13	C	++++	+	+	+	+++++	+
14	F	++	+++++	++	+	++++	+
15	B1	+++	++	+++	+	+++	-
16	D	++	+++	+++	+	+++	-
17	B2	++	+++	bc	+	-	-
18	F	++++	+++++	+++	+	-	-
19	B1	+++	++	++++	+	++++	+
20	A	++++	++	++	+	+++++	+
21	B2	++++	++++	bc	+	-	-
22	C	+++	++	+++	+	++++	-
23	D	++++	++	++++	+	++++	-
25	Desconhecido	++	+++	+	+	++++	-
26	F	+++	++	++++	+	+++++	+
27	C	+++	+++	++++	+	++++	+
28	C	+++	++++	++++	+	++	-
29	C	+++++	+	bc	+	+++	-
30	A	+++	+	+	+	+++	-
31	C	++	++	++++	+	++++	+
32	C	+++	+	++	+	+++++	++
33	C	++	+++	++	+	+++++	+
MG1655 WT	-	++++	+++++	+++	+	+++	+
MG1655 Δ*rpoS*	-	-	++	++++	-	+++	+
MG1655 Δ*rssB*	-	++++	++	+++	+	+++	+

Bc – baixo crescimento. Não foi possível avaliar o nível de fosfatase alcalina através deste ensaio.

COLETA 3

Amostra	Grupo filogenético	RpoS	Catalase	Glicogênio	XP	Glicose	Succinato
1	Desconhecido	+++	+	++	+	+++++	+++++
2	C	+++	+	+++	-	+++++	-
3	B1	+++	+	+	+++++	++++	-
4	F	+++	+	++++	-	+++++	-
5	B1	++++	+	+	++	++++	-
6	A	+	+	+++	++	++++	+
7	B1	+	+	++	++	++++	-
8	A	+	+	+	-	+++	++
9	B2	++	+	-	-	+++++	++++
10	B1	++	+	++	+++	++++	-
11	Clade I	+++++	+	++	-	+++++	-
12	B1	+	+	+++	-	-	-
14	B1	+++++	+	+++	++++	++++	-
15	A	+	+	+	-	+++++	+++
17	D	++	+	+	-	+++	-
18	B1	++++	+	-	+	+++++	-
20	Desconhecido	+++	+	+++	+++++	+++	-
22	B1	+++	+	+++	+	++++	-
23	A	-	+/-	-	-	++++	+++
24	B1	++++	+	+	++	++++	-
26	A	++++	+	+	++	+++	-
27	B1	+++++	+/-	-	++	+++++	++++
28	Desconhecido	+++	+/-	-	-	-	-
30	D	+++	+	+++	-	++++	+
31	C	++++	+	++++	+	++++	+
32	B1	++++	+	++++	++	+++++	-
33	B2	+++	+	+	++	+++	+
34	B1	+++	+	+++	++	++++	++
35	B1	++	+	+++	++	+++++	-
MG1655 WT	NR	++++	+	+++++	+++	++++	++
MG1655 Δ*rpoS*	NR	-	-	-	++++	++++	++++
MG1655 Δ*rssB*	NR		+	+++++	++	++++	-

COLETA 4

Amostra	Grupo filogenético	RpoS	Catalase	Glicogênio	XP	Glicose	Succinato
1	B2	++	-	+	-	++++	+
2	C	+++	+	++	+	+++++	-
3	C	++++	+	++++	++	+++	++
4	B2	++	+	+++	+++	+++	-
5	B1	++	+	+++	+	+++++	+++
6	C	+++	+	++++	++	++++	++++
7	Desconhecido	+	-	+	-	+++	-
8	C	+	+	+	++++	+++++	++++
10	F	+++	-	++	++++	++++	++++
11	Desconhecido	+++	-	+	+++++	++	-
13	Desconhecido	++	+	+++	-	+	+
14	A	+++	-	+	-	+++++	+++
16	Desconhecido	++	-	++	-	++	-
17	Desconhecido	+++	+	++	-	++	-
18	Desconhecido	+++	-	+++	+++	+++	-
19	Desconhecido	++++	-	+++	++	++++	++++
20	Desconhecido	+++	-	++++	-	+++	-
21	C	+++	-	+++	+	+++++	++++
22	C	++++	-	+++	-	+++++	++++
23	B1	+++	-	+++	+++	+++++	+
24	Desconhecido	++	-	+	-	+	-
25	Desconhecido	++++	-	+++	++	++++	++++
MG1655 WT	NR	++++	+	++++	++	++++	+
MG1655 Δ*rpoS*	NR	-	-	+	+++	++++	++++
MG1655 Δ*rssB*	NR		+	+++	++	++++	++++

COLETA 5

Amostra	Grupo filogenético	RpoS	Catalase	Glicogênio	XP	Glicose	Succinato
1	F	+++	+	+	-	++++	-
2	C	+++	+	++++	++	+++	-
3	B1	+++	+	+++	++	++++	++
4	D	+++	+	++	++	++++	+++
5	Desconhecido	-	-	+	++	++++	-
6	A	++++	+	+++	++	++++	-
7	B1	+++	+	+++++	-	+	-
8	Desconhecido	-	+	+++	+	++++	++
9	C	++++	+	++++	++	+++	-
10	E	++++	+	+++	++	++++	-
11	C	++++	+	+++	-	++++	-
12	D	+++	+	+	-	++++	+++
13	Desconhecido	+	+/-	++++	+++++	+++	-
14	Desconhecido	+	-	++++	-	+++	-
15	Desconhecido	+	-	+	-	+	-
17	A	+++	+	+	-	++++	+++
18	Desconhecido	+++	+	+++	-	++	+
22	C	++	+	++	+	++++	+
23	C	+++	+	++	++	++++	-
24	Desconhecido	++++	+	+++	-	+++	-
25	C	++	+	+++	++	++++	++
28	B1	-	+	++	++	++++	+
30	C	+++	+	++	++	++++	-
31	A	+	+	+	+	++++	+++
32	A	++	+	+	+	++++	+++
33	B1	+++	+	++	+	++++	+
34	B1	+	+	+++	+++	++++	++
36	C	++	+	++	++	++++	0
37	A	+	+	+	++	+++++	++
38	A	+	+	+	+	++++	++
MG1655 WT	NR	++++	+	+++	-	++++	0
MG1655 Δ*rpoS*	NR	-	-	++	++	++++	+
MG1655 Δ*rssB*	NR		+	++++	++	++++	0

COLETA 6

Amostra	Grupo filogenético	RpoS	Catalase	Glicogênio	XP	Glicose	Succinato
1	A	+++	+	+	+++	+++++	+++
2	A	++++	+	+	+++	+++++	+++
3	F	+++	-	++++	+++	+++++	+++
4	C	+++	+	++	+++	+++++	++++
5	B1	++	+	+	++++	+++++	+++
6	A	++	+	++	+	+++++	+++++
7	Desconhecido	+	-	-	bc	+	++
8	C	+++	+	++	-	+++++	+
9	C	+++	+	++	+++	++++	+
10	C	++++	+	+	+++	+++++	+++
11	D	+++	+	+++	++	+++	++++
12	A	+	+	++++	+	+++++	+
13	Desconhecido	+	-	+	-	+	-
14	Desconhecido	+++	-	-	bc	++	++
15	C	++++	+	++	-	++++	+
16	B2	++	+	++	++++	+++	+
17	C	+++	+	++	+	++++	++
18	C	++++	+	++	+	++++	+
19	C	+++	+	++	+++	+++++	+++++
20	Desconhecido	+	-	+	bc	+	++
21	D	++	+	+	++	+++++	++
22	Desconhecido	+	+/-	+++++	-	+	-
23	A	+++	+	++++	-	++	++++
24	C	+++	+	+	+	+++++	+
25	B1	+++	+	+	++	+++++	-
26	C	++	+	++	-	+++++	+
27	B1	++	+	++	-	+++++	+++++
28	C	+	+	+	+++++	++++	-
29	A	+++	+	++	+	++++	+++++
30	Desconhecido	-	+/-	+++	+	++++	++++
MG1655	NR	++++	+	+++++	-	+++	-
MG1655 Δ*rpoS*	NR	-	-	-	+++	+++	++
MG1655 Δ*rssB*	NR	NR	+	+++++	-	++	+

Legenda: bc – baixo crescimento

COLETA 7

Amostra	Grupo filogenético	RpoS	Catalase	Glicogênio	XP	Glicose	Succinato
1	A	+++	+	++++	+++	++++	+++
2	B1	++	+	++++	+++	++++	++++
3	C	++++	+	++++	+++	++++	++++
4	A	++++	+/-	++++	-	++++	+
5	D	+++	+/-	++++	++++	++++	+
6	C	++++	+	+++	++	++++	+++++
7	C	++	+	+++	++	++++	++++
8	B1	++	+/-	++++	++++	++++	++++
9	B1	++++	+	++++	++++	++++	+++
10	D	+++	+	++++	++++	++++	+
11	B2	++	+/-	++++	+++	++++	+
12	D	++	+/-	++++	+++	++++	+++
13	B2	+	+	++++	+++	++++	+
14	B1	++++	+	+++	++++	++++	+
15	A	++++	+/-	++++	++++	++++	+++
16	D	+	-	+++	+++	++++	++++
17	B1	++	+	++++	+++	++++	+
18	C	+	+	++++	+++	++++	++++
19	C	++	+	++++	+++	+++++	+++++
20	A	+++	+	++	-	+++	++++
21	A	+++	+/-	+++	+++++	+++	+++
22	B2	+	+/-	+++	-	+++++	++
23	B1	++	+/-	+++	-	+++	+++
24	B2	++	+	+++	++	++++	++++
25	B2	+++	+	+++	+	++++	+++++
26	B1	+++	+	++	++++	++++	++++
28	D	+++	+	+++	+++	++++	++++
29	D	++	+	+++	++	++++	++++
30	D	+++	+	+++	++	++++	++++
31	B1	++	+	++	++	+++++	+++
32	C	+	-	++	++	+++++	++++
33	B1	++	+	++	++++	+++	++++
MC4100 WT	NR	++++	+	++++	+	++	++++
MG1622 Δ*rpoS*	NR	-	-	+	+++	++	++
MG1622 Δ*rssB*	NR	+++	+	++++	-	++	++++

COLETA 8

Amostra	Classificação	RpoS	Catalase	Glicogênio	XP	Glicose	Succinato
1	B2	+	+++	+++	+++	+/-	++
2	C	++++	+++	++++	++	++++	++
3	Desconhecido	+	+++	+++	++++	++++	++
6	B2	+	+++	+++	+	+	++
7	Desconhecido	+	-	+	-	-	-
8	Desconhecido	+++++	+++	++	+++	++++	+++
9	A	++	+++	++	++	+++	+
10	A	++	+++	+++	-	+++	++
11	A	++	+++	+	+++++	++++	+/-
12	D	++	+++	++	+++	++++	+++
13	A	+	-	++++	++	+++	+
14	A	++	+++	-	++++	++	++
15	C	+	+++	+++	+	++++	++
16	C	++	+++	+	+	++++	++
17	A	+	+++	++	++	+++	+++
19	D	++++	+++	++	+++	+++	++
20	C	++++	+++	++++	+++	++++	++
21	A	++++	+++	++	+++	+++	+++
22	C	+++++	+++	++++	+++	+++	+
23	D	+++++	+++	+	++	+++	+++
24	F	+++++	+++	++++	++++	+++	++
28	Desconhecido	++++	-	+	++	-	-
29	E	++	+++	+++	-	++++	++
30	E	++	+++	++++	+++++	++++	++
31	C	+	+++	+	++++	+++	+
32	B1	++++	+++	++	++	+++	+++
33	C	++++	+++	-	++++	++++	+++
MG1655 WT	NT	++	+++	++++	++	-	++
MG1655 Δ*rpoS*	NT	-	-	+	++++	-	++
MG1655 Δ*rssB*	NT	NT	+++	+++++	+	-	+

COLETA 9

Amostra	Classificação	RpoS	Catalase	Glicogênio	XP	Glicose	Succinato
1	Desconhecido	-	+	+++	-	-	-
2	Desconhecido	++	-	++++	-	-	-
3	B2	++	+	+++	+++	++++	+
4	A	+++++	+	+++++	-	+++	+
5	A	+++++	+	+++++	++	++++	-
6	F	+++++	+	++++	+++	++++	-
7	Desconhecido	-	+/-	++	-	+++	+
8	B2	++++	+	+++	-	-	-
9	B2	++++	+	+++	+	+++++	-
10	D	+++++	+	++++	+	++++	+++
11	B2	+++++	+/-	++++	+++	++++	+
12	A	+++++	+	+++++	+	++++	++
13	B1	+++++	+	+	-	++++	-
14	C	+++++	+	+	+++++	++++	+
15	B2	+++++	+	+++	+	++++	-
16	B1	+++++	+	++++	+	+++++	-
17	B1	+++	+	++++	+	++++	-
18	C	++++	+	+++++	+	++++	-
19	B1	++	+	++++	-	+++++	-
20	A	++++	+	+	++	++++	-
21	A	++++	++	+	++	++++	+++
22	C	+++++	++	+	-	++++	+++
23	A	+++++	++	+++	+	+++	-
24	B1	+++++	+++	++++	+	++++	+
25	A	+++++	++++	+++	-	-	-
26	D	++++	++	+++	-	++++	+++
27	A	+++++	+++	+++	++	+	-
28	A	++++	+++	+++	-	+++++	+++
29	A	++	+++	++	-	+++++	+
30	E	+++++	+++++	+++++	++++	++++	-
MG1655 WT	-	++++	++++	++++	++	+++	-
MG1622 Δ*rpoS*	-	-	-	+	-	++++	-
MG1622 Δ*rssB*	-	NR	++++	+++	+++	+++	++

COLETA 10

Amostra	Grupo filogenético	RpoS	Catalase	Glicogênio	XP	Glicose	Succinato
1	A	++	+	++	+++	+++++	+
2	D	+++++	+	+++	+++	++++	+
4	Desconhecido	++++	+	+++++	++	++++	+
5	B2	++++	+	+++	++	+++	+
6	D	++++	+	++	+++	+++++	+++
7	Desconhecido	++++	+	+++	-	+++	+
8	D	-	+	++	+++	+++++	+++
9	B1	+++++	+	++	++++	++++	++
10	B1	+++	+	++	++++	+++	+
11	Desconhecido	++++	+	+++	-	+++++	+
13	B1	+++++	+	++	+++++	+++	+++
14	B1	+++	+	++	++	++++	+
15	Desconhecido	+	+	+	++	++	++
16	C	-	+	++	++	++++	+
17	C	+++	+	+++	+++	+++	+
18	Desconhecido	++++	+/-	sc	+	++++	++
19	C	+	+	+	++	++++	+
20	C	++++	+	+	+++	++++	+
21	Desconhecido	++	+	++++	+	++	+
22	Desconhecido	+	+	+++++	+++	++	++
23	B1	-	-	+	+++	++	+
25	B1	-	-	+	+++	++	++
26	B1	-	-	+	+++	++	++
27	B1	-	-	+	+++	++	++
28	B1	-	-	+	+++	++	++
29	A	++	+	+++	-	+++++	++
30	B1	-	+	+++	+++	+++++	++
MG1655 WT		++++	+	+++	+++	++	++
MG1655 Δ*rpoS*		-	-	+	++++	++	+++
MG1655 Δ*rssB*		NR	+	++++	++	+++	+

Legenda: sc – sem crescimento

COLETA 11

Amostra	Grupo filogenético	RpoS	Catalase	Glicogênio	XP	Glicose	Succinato
1	B2	+++	+	+++	+	+++++	++
2	A	++++	+	++++	-	++++	++
3	B1	+++++	+	++	-	+++++	+++
5	C	+++	+	+++++	-	++++	++
6	A	+++++	+	+++++	-	++++	++
7	A	++++	+	+	+	+++++	++
8	B2	++++	+	+++	++	+++++	+
9	Desconhecido	+++++	-	++++	-	++	-
10	A	++++	+	++++	-	+++	+
11	A	++++	+	++++	-	+++++	+++
12	D	+++++	+	++++	+	+++++	+++
13	B2	++++	+	++++	-	+++++	++
14	B1	+++	+	+++	+	+++++	++
15	B1	++++	+	++++	-	-	+++
16	B2	++	+	+++	-	++++	+
17	A	+++++	+	+++	-	+++	+
18	Desconhecido	++++	-	++++	-	-	-
19	Desconhecido	+++++	+	+	++	+++++	+++
20	D	++++	+	++++	+++	+++++	++
21	A	++++	+	++++	-	+++++	+++
22	D	+++	+	+++	++++	++++	++
23	B2	+++++	+	+++	++++	+++	+
24	C	++++	+	++++	-	+++++	+++
25	C	++++	+	+++	-	++++	+
26	C	++++	+	++++	-	+++++	++++
27	Desconhecido	+++++	+	++++	-	-	++
28	Desconhecido	++++	+	++++	-	+++	++
29	B2	++++	+/-	+++	-	+++	+
30	C	+++	+	+++	-	+++++	++
31	D	+++	+	+++	+	++++	++++
32	Desconhecido	+++++	-	+++	-	-	-
MG1655 WT		+++++	+	++++	-	+++++	++
MG1655 Δ*rpoS*		-	-	++	-	++++	++
MG1655 Δ*RssB*			+	++++	-	++++	-

COLETA 12

Amostra	Grupo filogenético	RpoS	Catalase	Glicogênio	XP	Glicose	Succinato
1	D	+++	+	+	++	+++++	+++
2	A	++++	+	++++	+++	+++++	++
3	A	+++++	+	++++	-	++++	+
4	Desconhecido	+++++	-	+++	-	-	-
5	D	++	+	++++	++	+++++	++
6	C	-	+	+	+	++++	++
7	Desconhecido	+++++	+/-	++	-	+	-
8	Desconhecido	+++++	-	++++	+++++	++	+
9	D	+++++	+	-	+	+++++	++++
10	C	+++++	+	+	+	+++++	+++
11	Desconhecido	+++	+/-	+++	-	++	-
12	B2	++++	+	+	+	++++	+++
13	F	++	+	+++++	+	+++++	+
14	A	++++	+	+	+	+++	++++
15	A	++++	+	++	-	+++	++
16	A	++++	+	++	++++	+++++	+++
17	C	+++++	+	+++	+	++++	+++
18	D	+++++	+	+++	+	+++++	+
19	B2	+++	+	++++	-	-	+++
20	C	+++	+	++++	+	+++++	++++
21	D	++	+	+	-	++++	+++
22	D	+++	+	+	-	+++++	+++
23	A	++	+	+	+	++++	++
24	C	+++++	+	+++	+	++++	+++
25	B2	+++++	+	+++	+	++++	++
26	A	++	+	-	+	++++	++
27	A	+++	+	-	+	+++++	++
28	Desconhecido	+++++	+/-	++	++++++	+	-
29	A	+++++	+	++	+	++++	++
30	C	+++++	+	+	+	+++++	+++
31	A	+++++	+	+	+++	+++++	+++
32	A	+++	+	++	+	++++	++
MG1655 WT	NR	++++	+	++++	+	++++	++
MG1655 Δ*rpoS*	NR	-	-	+	++	+++	++
MG1655 Δ*rssB*	NR	NR	+	++++	+	+++	-