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

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 σ S 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 σ S 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

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 σ^S 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 dos 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 competitiva 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.

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. **Journal 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 σ^S (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

unconventional activator of the stress sigma factor σ^S /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. Confirmation 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.

SHELLHORN, 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 σ^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.; STOEDEL, 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 σ^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.