

LUÍSA ANDREA VILLANUEVA DA FONSECA

**Efeito da densidade populacional sobre a frequência de
mutantes**

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
2022

Efeito da densidade populacional sobre a frequência de mutantes

Fósforo é um elemento essencial para vários processos celulares, geralmente assimilado na forma de fosfato inorgânico (Pi). A concentração de Pi no ambiente é variável, levando os micro-organismos a se adaptarem para melhor captar, metabolizar e utilizar este nutriente. Em *E. coli*, mais de 40 genes formam o regulon PHO, o principal sistema responsável pela captação de Pi. Estes são regulados pela concentração extracelular de Pi, percebida pelo transportador PstSCAB-PhoU. Mutações em qualquer um dos genes deste transportador levam a expressão constitutiva do regulon. Bactérias contendo mutações PHO-constitutivas (MPCs) são inibidas na presença de bactérias selvagens em meio contendo glicerol-2-fosfato (G2P) como fonte de carbono devido à competição pelo glicerol oriundo da quebra do G2P numa "tragédia dos comuns"; assim, a frequência de MPCs depende da concentração de bactérias no meio seletivo. Portanto, este trabalho tem dois objetivos: identificar e caracterizar possíveis efeitos da densidade sobre a frequência de mutantes (FM) em dois sistemas mutacionais (*phn*⁺ e *lac*^c) e verificar a existência de MPCs dentre isolados naturais de *E. coli* e *in silico*. Para isto, diferentes densidades celulares foram semeadas sobre placas de meio mínimo seletivo contendo a limitação nutricional adequada e a FM foi avaliada após 96 h de incubação. Ambos os sistemas estudados apresentaram aumento da FM de forma inversamente relacionada a densidade bacteriana na placa. A FM quando 5×10^7 bactérias selvagens *phn*⁺ são plaqueadas é 13 x maior do que a de 10^9 - e para mutantes *lac*^c, esta diferença chega a 23 x entre as concentrações 10^6 e 10^8 . A adição de bactérias removedoras elimina a relação inversamente proporcional vista nas placas não tratadas. Contudo, o número de removedoras na placa pode exercer alguma inibição sobre o surgimento de mutantes, como observado em MPCs; desta forma, as removedoras foram inoculadas sobre membranas de celulose, incubadas por 48 h e removidas antes do semeio das bactérias selvagens. O tratamento com membranas reduz as FMs em relação às placas não tratadas (reduções de até 86% no sistema *phn* e 69% em *lac*) porém ainda existe variação na frequência de mutantes em relação a densidade - 8,7 x para *lac*^c e 3,3 x para *phn*⁺. Todavia, foi identificado um crescimento residual em placas tratadas com membranas semeadas com menos células. Foi ainda observado que isolados *phn*⁺ derivados de MG1655 tem seu crescimento inibido na presença de removedoras a 44°C e que *lsrK* pode interferir na diminuição da FM em mutantes *lac*^c. A triagem de MPCs em isolados naturais de amostras de água do córrego Pirajuçara resultou em 16 potenciais MPCs - alguns contendo deleções e inserções em genes do operon *pst*. *In silico*, foi identificado um mutante *pstB*⁻ dentre 2303 genomas de *E. coli* disponíveis no GenBank. Estes resultados sugerem que para a identificação mais precisa de variações na frequência de mutantes, deve se analisar densidades onde não haja crescimento residual na placa; e que MPCs podem estar presentes na natureza em ambientes onde, em teoria, não há seleção para estas mutações.

Palavras-chave: Microbiologia. *Escherichia coli*. Genética bacteriana. Regulon PHO. Frequência de mutantes.

Effect of population density on mutant frequency

Phosphorus is an essential element to several cellular processes, usually assimilated in the form of inorganic phosphate (Pi). Pi environmental concentration can vary, driving microorganisms to adapt in a way to better acquire, metabolize and utilize this nutrient. In *E. coli* more than 40 genes make up the PHO regulon, the main system responsible for Pi acquisition. These are regulated by Pi extracellular availability, sensed by the PstSCAB-PhoU transporter. Mutations in any of the transporter genes lead to constitutive expression of the regulon. Bacteria carrying PHO-constitutive mutations (PCM) are inhibited in the presence of wild-type bacteria in media containing glycerol-2-phosphate (G2P) as carbon source, due to competition for glycerol released after G2P breakdown in a 'tragedy of the commons', therefore PCM frequency depends on the concentration of bacteria plated onto the selective media. Hence, this work has two goals: to identify and characterize possible effects of density over the mutant frequency (MF) in two mutational systems (*phn*⁺ and *lac*^c) and to verify the existence of PHO-constitutive mutations among *E. coli* natural isolates and *in silico*. To do so, different cellular densities were plated onto minimal selective media plates with the appropriate nutrient limitation and mutant frequency was evaluated after 96 h of incubation. Both systems presented an increase in MF inversely associated to the bacterial density on the plate. MF when 5×10^7 wild type *phn* bacteria are plated is 13 x larger than when 10^9 are - and for *lac*^c mutants, this difference is 23 x between 10^6 and 10^8 concentrations. The addition of scavenger cells ceases the inverse relation seen on untreated plates. However, the number of scavengers on the plate may impose some kind of inhibition on the mutants' growth, as observed in PCMs; thus, scavenger cells were inoculated on top of cellulose membranes, incubated for 48 h and removed before wild-type plating. Membrane treatment reduces MFs when compared to untreated plates (86% reductions in the *phn* system and 69% in *lac*). However, a background growth was identified in membrane treated plates with lower cell densities. In addition, *phn*⁺ derivatives of MG1655 are inhibited in the presence of scavenger cells when incubated at 44°C and *lsrK* might be involved in the MF reduction observed in *lac*^c mutants. The scan for PCMs on natural isolates from Pirajuçara stream water resulted in 16 potential PCMs – some carrying deletions or insertions in *pst* operon genes. *In silico*, a *pstB* mutant was identified among 2303 *E. coli* genomes available in GenBank. These results suggest that for precise identification of mutant frequency variations, it is necessary to analyze densities where there is no residual growth in the plate; and that PCMs can be present in nature in environments where, in theory, there is no selection for these mutations.

Keywords: Microbiology. *Escherichia coli*. Bacterial genetics. PHO regulon. Mutant frequency.