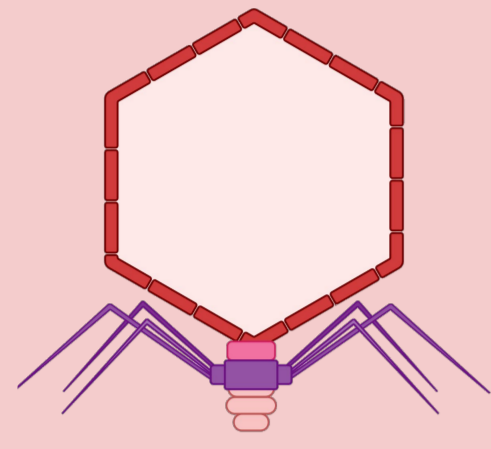


# Automated experimental evolution

Nikola Terzic, Nino Kuchuloria, Zuzanna Kozłowska, Vsevolod Kuksin, Lidiia Zaikina, Rayida Gurbatli, Catalin Rusnac



## Introduction

Experimental evolution is the study of evolutionary processes that can be observed over short timeframes – usually in fast-replicating organisms such as *E.coli* or bacteriophages. Replifactory is a device developed for running automated evolution experiments. We used Replifactory to run two types of experiments and made improvements to different components of the device.

## Methods

We used Replifactory, a DIY device assembled from 3D printed components, electronics and labware. We assembled and calibrated devices and ran two types of experiments: **adaptive bacterial evolution** and **phage lagoon**.

### Antibiotic resistance evolution:

Working principle:

A culture is continuously stirred and its Optical Density (OD) is measured, indicating the population size and growth rate. Pumps connected to the culture vial make automated dilutions, lowering the OD, supplying nutrients and controlling the concentration of a stress-inducing agent, such as an antibiotic. By slowly increasing the antibiotic concentration, the culture is exposed to non-lethal stress levels, creating selective conditions where adaptive mutations accumulate rapidly.

Our experiments compared the speed of adaptation of different genetic backgrounds to different antibiotics. Specifically, we looked at how 3 different strains of *E. coli* adapt to Kanamycin and Tetracycline:

- wild type (WT) - *E.Coli* MG1655
- $\Delta$ tolC (with a deleted gene that codes for an efflux pump essential for resistance to many antibiotics)
- $\Delta$ mutS (with a deleted gene that codes for a DNA repair protein - this strain mutates at a higher rate than WT and  $\Delta$ tolC)

The cultures were controlled by a morbidostat algorithm using the same parameters for each condition. The initial drug dose was 5mM for Tetracycline and 10mM for Kanamycin. Every 2 generations the dose was increased by 30% if the measured doubling time was < 5h.

### Phage lagoon:

Working principle:

Automated bacteriophage evolution can be achieved by maintaining a continuous phage population. Phages grow by infecting bacteria, which act as a limiting resource and apply selection on phages - phages that are more efficient at infecting the particular bacterial strain will replicate faster and dominate the population. However, coculturing also subjects bacteria to selection - a phage-resistant mutant can arise in the bacterial population, taking over the culture and preventing future phage growth. To avoid this, the lagoon has to be diluted at a rate faster than the growth rate of bacteria, but lower than the growth rate of phages.

We set up a modified version of replifactory for this type of culture. To achieve a high dilution rate, the phage lagoon vials have small working volumes (~1mL). A continuous *E.coli* culture acts as phage feed - it grows in a vial maintained in chemostat mode.

## Results

### Antibiotic resistance

The  $\Delta$ tolC strain was more susceptible to both antibiotics than the wildtype and the culture struggled to recover after the addition of the drug. The  $\Delta$ mutS strain was already resistant to Kanamycin so we could not observe adaptive events - the culture growth rate was not affected by increasing drug concentration. However, it was sensitive to tetracycline - when the drug was added growth slowed down, similarly to WT. Over ~3 days it evolved resistance much faster than the WT due to the higher mutation rates.

### Phage lagoon

The setup worked for 7 cycles of 1:1500 dilution followed by phage feeding in 4 lagoon vials. The timeframe was too short to derive meaningful conclusions about the evolution of phages, but with further improvements this setup will enable their continuous cultivation for longer duration, with relatively low medium use.

### Device development:

- User interface
  - New ways of visualizing experimental data in a meaningful way were developed - new plots, GUI widgets and telegram commands.
- Lagoon:
  - To achieve a high dilution coefficient the setup was modified to decrease the dead volume in the lagoon vials down to <1mL.
  - The tubing configuration and software was improved, removing an unnecessary valve operation during phage feeding.
- 3D model:
  - During rotations a spacer was designed to increase the distance between the vials and valves, simplifying tubing installation
- Calibration:
  - An algorithm to calibrate the stirrers automatically was developed - it should decrease OD noise induced by stirring when implemented in the experimental pipeline.

## Discussion

### Antibiotic resistance evolution:

- The antibiotic evolution experiments went without leaks or hardware issues - a marked improvement from SMTB 2019. Improvements can be made in the software speed, calibration process and user interface, but the device performs its main function reliably.

### Phage lagoon:

- Further improvements are necessary to enable long term lagoon experiments. Our experiment stopped after 7 cycles because the bacterial feed got contaminated with phages. This can be limited by software optimizations (slower pumping rates to prevent pressure differentials) or additional hardware developments such as automatic ethanol flushing of the tubing.
- Possible application of phage evolution experiments include phage therapy - such experiments can be used to train phages to *slay* pathogenic bacteria in infections.

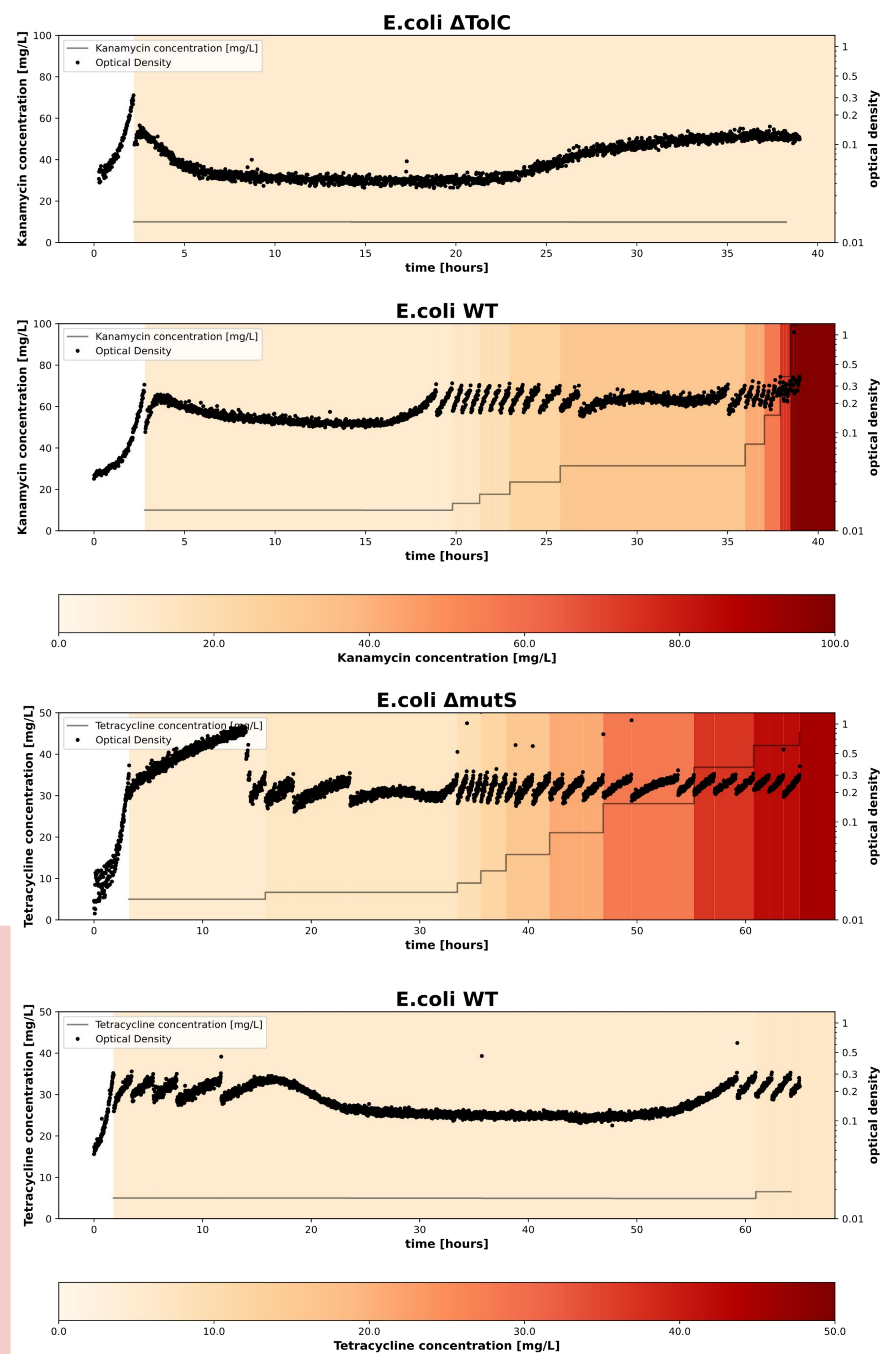


Fig. 1. Antibiotic adaptation experiments a)  $\Delta$ tolC adaptation to Kanamycin b) WT adaptation to Kanamycin c)  $\Delta$ mutS adaptation to Tetracycline d) WT adaptation to Tetracycline.

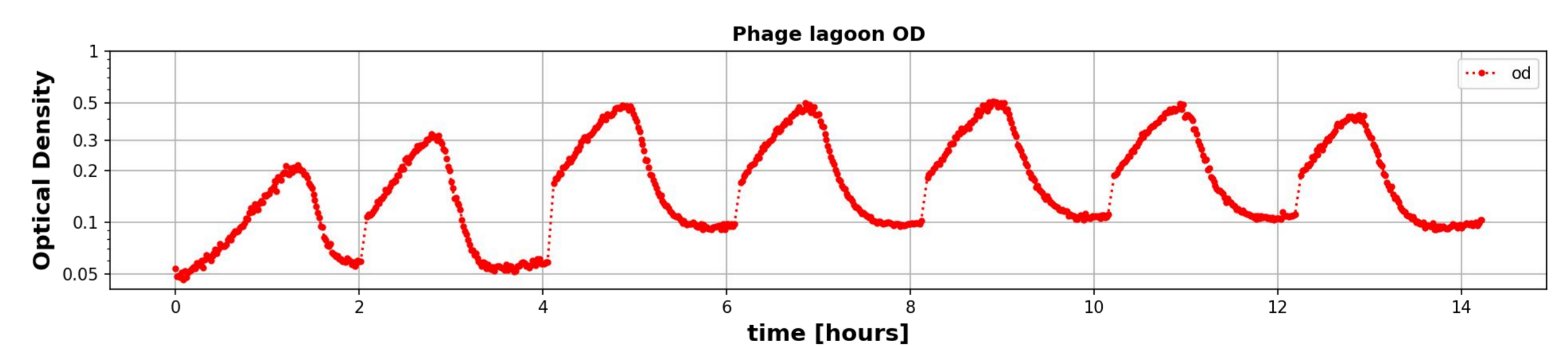
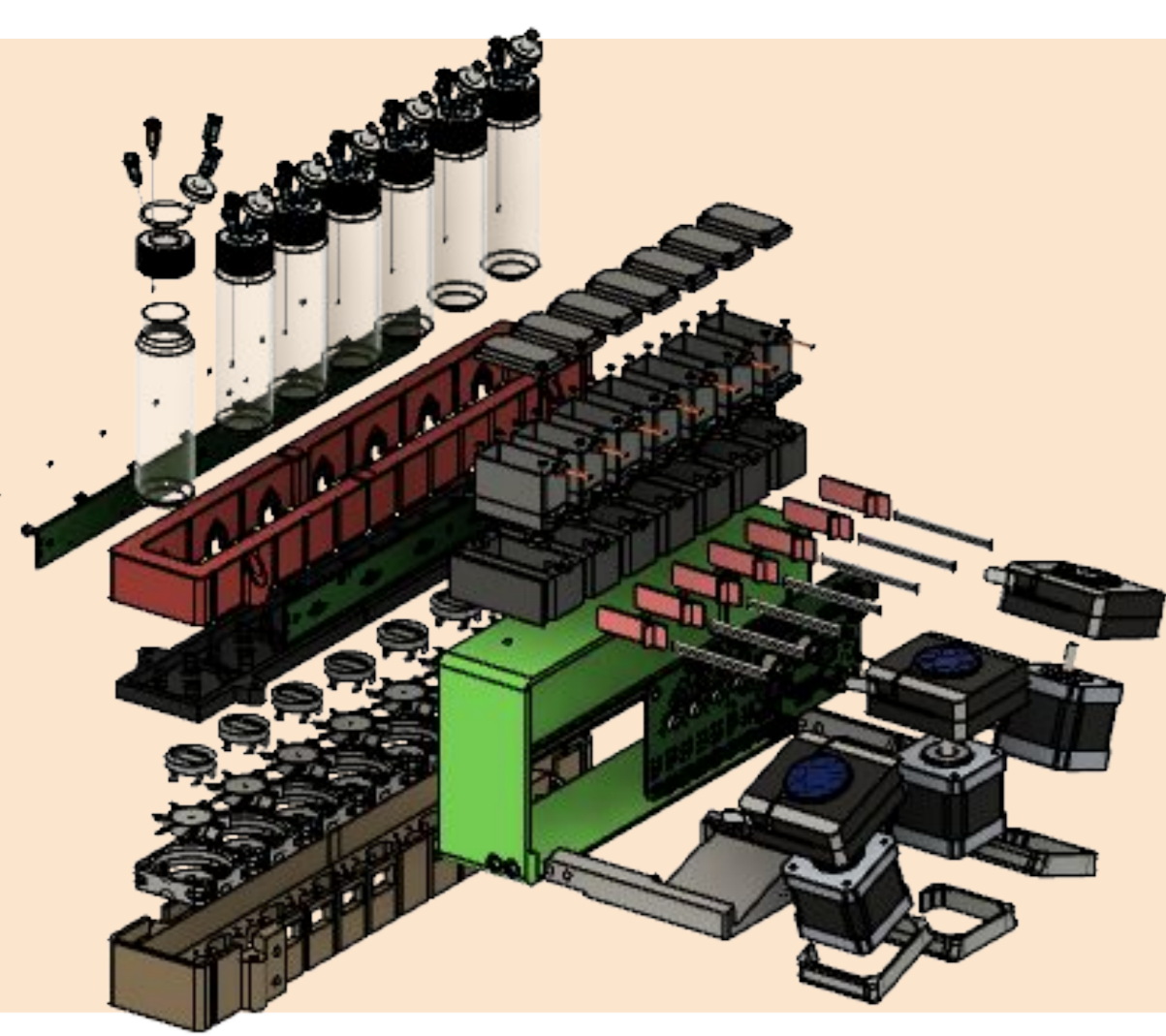


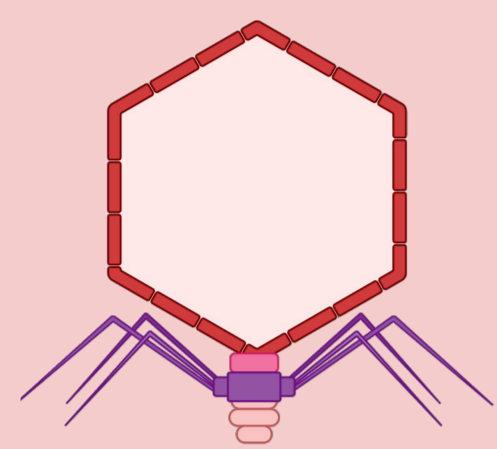
Fig. 2. Phage lagoon experiment - 7 cycles of feeding followed by phage lysis of the bacterial population can be seen on the graph.





# Автоматизированная экспериментальная эволюция

Никола Терзич, Нино Кучолориа, Зузанна Козловска, Всеволод Куксин, Лидия Заикина, Раида Гурбатли, Каталин Руснак



## Введение

## Методы

Мы использовали Replifactory - самодельное устройство собранное из деталей напечатанных на 3D принтере, электроники и лабораторных компонентов. Мы собрали и скалибировали устройства и поставили два типа экспериментов: **адаптивную бактериальную эволюцию и фаговую лагуну.**

### Адаптивная бактериальная эволюция:

Принцип работы:

Устройство перемешивает культуру и периодически измеряет её оптическую плотность (OD), что указывает на размер популяции и скорость роста. Насосы, подключенные к пробирке с культурой, делают автоматические разбавления, снижая OD, подавая питательные вещества и контролируя концентрацию средства вызывающего стресс, например антибиотика. Медленно повышая концентрацию антибиотика, культура подвергается нелетальному стрессу, что создает селективные условия, в которых быстро накапливаются адаптивные мутации.

Наши эксперименты сравнили скорость адаптации различных генотипов к разным антибиотикам. В частности, мы рассмотрели, как 3 различных штамма *E. coli* адаптируются к канамицину и тетрациклину:

- дикий тип (wild type -WT) - *E.Coli* MG1655
- $\Delta toIC$  (с удаленным геном, который кодирует эффлюксный насос, необходимый для устойчивости ко многим антибиотикам)
- $\Delta mutS$  (с удаленным геном, который кодирует белок репарации ДНК - этот штамм мутирует с большей скоростью, чем WT и  $\Delta toIC$ )

Культуры контролировались алгоритмом морбидостата с использованием одних и тех же параметров для каждого условия. Начальная доза препарата составляла 5 мМ для тетрациклина и 10 мМ для канамицина. Каждые 2 поколения доза увеличивалась на 30%, если измеренное время удвоения было < 5 часов.

### Фаговая лагуна:

Принцип работы:

Автоматизированная эволюция бактериофагов может быть достигнута путем поддержания непрерывной популяции фагов. Фаги растут за счёт заражения бактерий, которые действуют как ограничивающий ресурс и производят отбор на фагах - фаги, которые более эффективно заражают конкретного бактериального штамма, будут размножаться быстрее и доминировать в популяции.

Однако, кокультурирование также подвергает бактерии отбору - устойчивый к фагам мутант может возникнуть в бактериальной популяции, захватить культуру и предотвратить рост фагов. Чтобы этого избежать, лагуну нужно разбавлять быстрее, чем скорость роста бактерий, но ниже скорости роста фагов.

Мы настроили модифицированную версию replifactory для этого типа эксперимента. Для достижения высокого коэффициента разбавления фаговой лагуны пробирки имеют небольшие рабочие объемы (~1 мл). Непрерывная культура *E.coli* выступает в качестве фагового корма - она растет в пробирке, поддерживаемой в режиме хемостата.

## Результаты

### Устойчивость к антибиотикам

Штамм  $\Delta toIC$  был более чувствительный к обоим антибиотикам, чем WT, и колония изо всех сил пыталась вырасти после добавления антибиотика. Штамм  $\Delta mutS$  уже был устойчив к канамицину, но первоначально он вел себя аналогично штамму WT после добавления тетрациклина. Позже он развил устойчивость быстрее, чем WT из-за более высокой частоты мутаций.

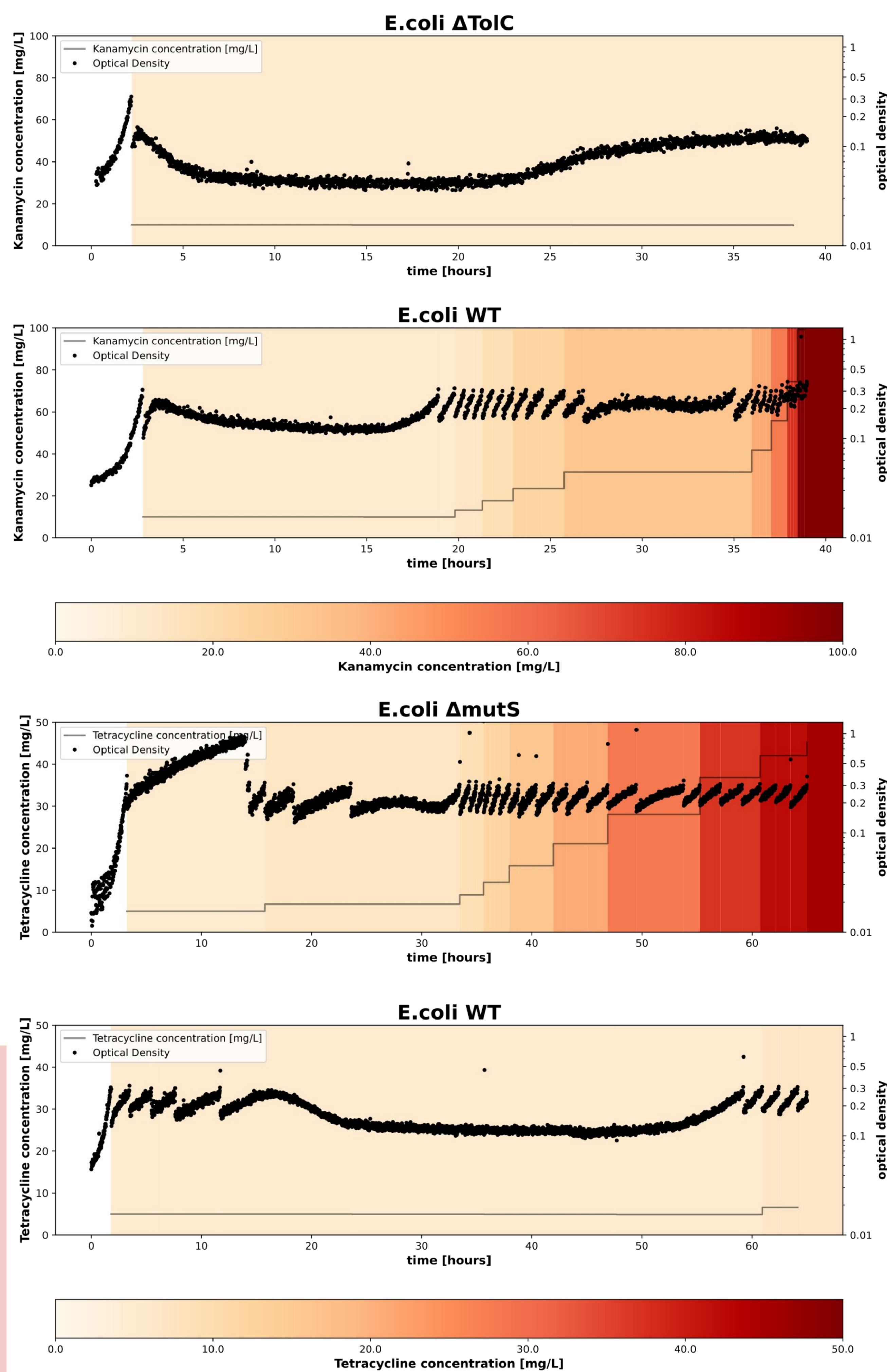
### Фаговая лагуна

Прибор работал на протяжении 7 циклов кормления фагами с последующим разбавлением 1:1500. Временные рамки были слишком малы, чтобы сделать значимые выводы об эволюции фагов, но с дальнейшими улучшениями эта установка позволит непрерывно культивировать фаги в течение более длительного времени при относительно низком среднем использовании.

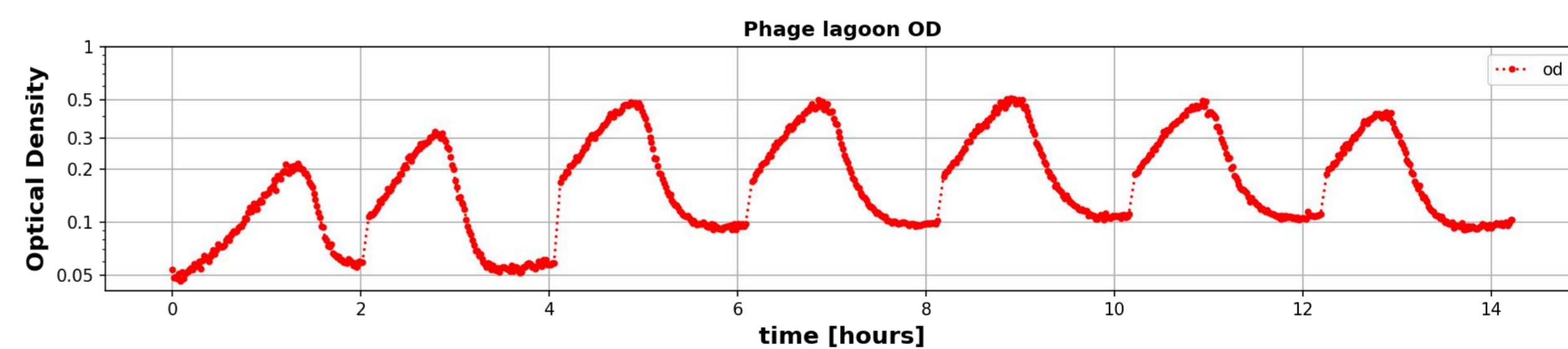
### Разработка прибора:

- Пользовательский интерфейс
  - Были разработаны новые способы осмысленной визуализации экспериментальных данных - новые графики, виджеты для графического интерфейса и telegram-команды.
- Лагуна:
  - Для достижения высокого коэффициента разбавления установка была модифицирована для уменьшения мертвого объема.
  - Конфигурация трубок и программное обеспечение были улучшены, что устранило ненужное применение клапана во время кормления фаговой культуры.
- 3D модель:
  - Во время ротаций была разработана распорка для увеличения расстояния между пробирками и клапанами, что упрощает установку трубок.
- Калибровка:
  - Был разработан алгоритм автоматической калибровки мешалок - он должен уменьшить шум OD, вызванный перемешиванием, при внедрении в экспериментальный трубопровод.

Экспериментальная эволюция - это изучение эволюционных процессов, которые можно наблюдать в течение коротких временных рамок - обычно в быстровоспроизводящихся организмах, таких как *E.coli* или бактериофаги. Replifactory - это устройство, разработанное для проведения автоматизированных экспериментов по эволюции. Мы использовали /Replifactory для запуска двух типов экспериментов и внесли улучшения в различные компоненты устройства.



Фиг. 1. Эксперименты по адаптации к антибиотикам: а) Адаптация  $\Delta toIC$  к канамицину б) Адаптация дикого типа к канамицину в) Адаптация  $\Delta mutS$  к тетрациклину г) Адаптация дикого типа к тетрациклину.



Фиг. 2. Эксперимент с фаговой лагуной - на графике можно увидеть 7 цикла питания с последующим фаговым лизисом бактериальной популяции.

## Дискуссия

- **Эволюция устойчивости к антибиотикам:**
  - Эксперименты по эволюции антибиотиков прошли без утечек или проблем с оборудованием — заметное улучшение по сравнению с SMTB 2019. Улучшения могут быть внесены в скорость программного обеспечения, процесс калибровки и пользовательский интерфейс, но устройство надежно выполняет свою основную функцию.
- **Фаговая лагуна:**
  - Необходимы дальнейшие улучшения, чтобы можно было проводить долгосрочные эксперименты с лагуной. Наш эксперимент остановился после 7 циклов, потому что бактериальный корм был загрязнен фагами. Это может быть ограничено оптимизацией программного обеспечения (более низкая скорость откачки для предотвращения перепадов давления) или дополнительными аппаратными разработками, такими как автоматическая промывка трубок этанолом.
  - Возможное применение экспериментов по эволюции фагов включает фаговую терапию - такие эксперименты можно использовать для "обучения" фагов убивать патогенные бактерии при инфекциях.