**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Aula T/P: Conjugação bacteriana**

Profa. Elisabete Vicente (bevicent@usp.br)

**TAREFAS -**



**DIA 1:**

1) Complete o Quadro da pág. 4;

2) Responda Questões da pág. 4;

3) Confira a Análise e as Respostas na Próxima **Aula T/P - DIA 2 (Conclusão) – OK**

**HOJE JÁ É O DIA 2 – Então, abaixo está a descrição completa desta Prática**

**Sempre em letras coloridas estão os Resultados, Discussão, Comentários e Respostas. CONFIRA!**

**I) Introdução**

A conjugação bacteriana é processo “sexual" de transferência de genes de uma bactéria doadora para outra receptora. Este processo foi descoberto por Lederberg e Tatum em 1946. Para que uma linhagem bacteriana seja doadora ela deve conter um plasmídio conjugativo (elemento extracromossômico).

O processo de conjugação foi descoberto em *E. coli*  K12, e o elemento extracromossômico responsável foi chamado de **fator F (de fertilidade)** ou **plasmídio F**. Há dois tipos de plasmídios conjugativos: os plasmídios auto-transmissíveis e os mobilizáveis. Esse plasmídio pode estar ou não integrado ao cromossomo bacteriano. No primeiro caso, a linhagem bacteriana é chamada de **Hfr** (grande freqüência de recombinação) e, no segundo caso, de **F+**.

 A célula **F+**, após contato com células **F-**, transfere para esta última, em alta freqüência, uma réplica do plasmídio F, tornando-a F+. Por outro lado, a linhagem Hfr (alta freqüência de transferência), cujo fator F está integrado, transfere seqüencialmente marcadores localizados no cromossomo, sendo o **fator F** raramente transferido.

 Após a descoberta do **fator F**, outros plasmídios conjugativos foram descobertos, como é o caso dos **fatores** ou **plasmídios R**. Esses plasmídios contêm marcadores para resistência à drogas antibacterianas e não reintegram normalmente no cromossomo bacteriano. Alguns plasmídios não promovem conjugação, mas podem ser mobilizados por outros conjugativos.

 Neste experimento será utilizada como doadora uma linhagem portadora de plasmídeo R.

**Assista o Vídeo**: Conjugação bacteriana: <https://vimeo.com/garlandscience30308032/review/137509524/109c2e9655>

Ref.Biologia Molecular da Célula, 6ª ed. J. Alberts, Raff M. Lewis, Roberts Walter, 2017, Artmed

**II) Objetivo**

Demonstrar a transferência genética da resistência bacteriana à tetraciclina através da conjugação entre uma bactéria doadora (linhagem de *Salmonella typhimurium* MG031 lac-, tetr) e uma bactéria receptora (linhagem de *Escherichia coli* K12 lac+, nalr). Este experimento permite demonstrar como ocorre a disseminação de resistência a antibióticos entre bactérias de relevância clínica. Ou seja, permite demonstrar como podemos, experimentalmente, acompanhar o mecanismo de transferência de genes por conjugação bacteriana.

**III) Material**

1. Linhagens:

1.1 Doadora: Linhagem de *Salmonella typhimurium* MG031 ( *lac*- , tetR ). Hospeda um plasmídio que carrega o marcador que confere resistência a Tetraciclina (TcR ).

1.2 Receptora: Linhagem de *Escherichia coli* K12 (*lac*+ , nalR). O fenótipo de resistência ao ácido Nalidíxico (NalR ) deve-se a uma mutação cromossomal.

2. Antibióticos

2.1 Ácido Nalidíxico (Nal) usar a concentração de 50g/ml

2.2 Tetraciclina (Tet) usar a concentração de 25 g/ml

**III) Procedimento**

Dia anterior:

1. Fazer os pré-inóculos das linhagens doadoras e receptoras em 4,0ml de meio TSB mais antibióticos. Incubar à temperatura de 37C por uma noite.

Dia 1:

1. Lavar as culturas com salina para remover os antibióticos. Ressuspender as células em TSB;
2. Com alça de platina, semear as culturas de K12 e MG031 em cada um dos espaços destinados em meio sólido ágar Mac Conkey contendo os diversos antibióticos (conforme indicado abaixo):

 K12 MG K12 MG K12 MG K12 MG

 Mist. Conj. Mist. Conj. Mist. Conj. Mist. Conj.

 Meios: MC MC+Tc MC+Nal MC+Tc+Nal

3. Em um tubo de ensaio contendo 1,0ml de TSB, adicionar as seguintes culturas:

* 1,0 ml da linhagem *S. typhimurium* MG031 (doadora) e
* 1,0 ml da linhagem *E. coli* K12 (receptora)

4. Agitar bem e incubar por 1 hora sem agitação à temperatura de 37C;

5. Semear a mistura de conjugação (Mist. Conj.) em meio sólido Mac Conkey contendo os diversos antibióticos (conforme a figura acima);

6. Incubar em estufa à temperatura de 37C por 16-24 horas (durante uma noite).

**Dia 2:**

**IV) Resultados**

1. Analise se colônias se houve colônias bacterianas que cresceram em cada um dos meios de cultura e, quando cresceram, qual foi a cor das colônias:

**Suponha que você está no Lab analisando as placas semeadas. Veja detalhes no próximo QUADRO:**

|  |  |
| --- | --- |
| **MacConkey** sem antibióticosMist. Conj.*Salmonella**E. coli* | **MacConkey + Nal***Salmonella*Mist. Conj.*E. coli* |
|  **MacConkey + Tc** Mist. Conj.*Salmonella**E. coli* | **MacConkey Nal + Tet** *E. coli*Mist. Conj.*Salmonella* |

**Dia 2 Continuação:**

1. Observe os resultados e complete o Quadro abaixo indicando:

**Colônias Crescidas: +/-** e Cor das colônias: **brancas/vermelhas**:

Quadro: Anotação dos resultados obtidos – **Aqui estão mostrados detalhes de cada um dos espaços de todas as placas. Siga os exemplos COMPLETE com suas análises:**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Meios de cultura | Cultura A*S. typhimurium* MG031 ( *lac*-, tetr ) | Cultura B *E. coli* K12 (*lac*+, nalr) | Cultura C ( mist.conj.) |
| MacConkey sem antibióticos | Microbiologia: meios de cultura e provas de identificação | Cresc: **+**Cor**: Brancas** | <?php the_title(); ?> | Cresc: **+**Cor**: Vermelhas** | MacConkeyAgar | Cresc: **+**Cor**: mistura de Brancas e vermelhas** |
| MacConkey com tetraciclina | Microbiologia: meios de cultura e provas de identificação | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_ | McC | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_ | McC | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_**:**  |
| MacConkey com ác. nalidíxico | McC | Cresc: **-**Cor**:**  | <?php the_title(); ?> | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_ | McC | Cresc: **-**Cor**:**  |
| MacConkey com tetraciclina e comácido nalidíxico | McC | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_ | McC | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_ | <?php the_title(); ?> | Cresc: **+**de poucas colônias Cor**: Vermelhas** |

 Ok. Compele o Quadro acima com suas análises e Responda as Questões abaixo.

***QUESTÕES PARA ESTUDO e confirmação do entendimento***

1. Por que as duas bactérias utilizadas precisam expressar algum tipo de resistência para que o experimento possa ser realizado?

2. Qual é a bactéria doadora neste experimento? Por quê?

3. Você descartaria a possibilidade de que uma das linhagens tenha sofrido uma mutação espontânea que a tornasse resistente ao segundo antibiótico? Por quê?

4. Quais as possíveis repercussões deste fenômeno observado neste experimento para o problema da resistência bacteriana em hospitais e no ambiente?