**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**

**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 plasmídeo conjugativo (elemento extra cromossômico).

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

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

 Após a descoberta do **fator F**, outros plasmídeos conjugativos foram descobertos, como é o caso dos **fatores** ou **plasmídeos R**. Esses plasmídeos contêm marcadores para resistência à drogas antibacterianas e não reintegram normalmente no cromossomo bacteriano. Alguns plasmídeos 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 plasmídeo 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 4,0 ml 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 1,0 ml 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, por 16 horas.

**Dia 2:**

**IV) Resultados**

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

**No Lab analisando as placas semeadas. Acrescente abaixo as FOTOS de suas Placas:**

|  |  |
| --- | --- |
| **MacConkey** sem antibióticos | **MacConkey + Nal** |
|  **MacConkey + Tc**  | **MacConkey Nal + Tet**  |

**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:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Meios de cultura | Cultura A*S. typhimurium* MG031 ( *lac*-, tetr ) | Cultura B *E. coli* K12 (*lac*+, nalr) | Cultura C ( mist.conj.) |
| MacConkey sem antibióticos |  | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_ |  | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_ |  | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_ |
| MacConkey com tetraciclina |  | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_ |  | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_ |  | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_**:**  |
| MacConkey com ác. nalidíxico |  | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_ |  | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_ |  | Cresc: **-**Cor**:**  |
| MacConkey com tetraciclina e comácido nalidíxico |  | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_ |  | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_ |  | Cresc:**\_\_\_**Cor**:** \_\_\_\_\_\_\_\_ |

 Ok. Após completar o Quadro acima, elabore sua análise relativamente ao ocorrido nesta Conjugação bacteriana 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 do fenômeno observado neste experimento para o problema da resistência bacteriana em hospitais e no ambiente?

**Dia 3:**

**V) Análises, Relatório Final, Discussão e Respostas do Questionário.**