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

**Aula T/P: Conjugação bacteriana**

Profa. Elisabete Vicente (bevicent@usp.br)

**TAREFAS -**

****

**DIA 3:**

**HOJE JÁ É O DIA 3 – 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 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 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 3:**

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. Abaixo os RESULATDOS ESTAO COMPLETADOS:**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 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 Brancae e Vermelhas** |
| MacConkey com tetraciclina | Microbiologia: meios de cultura e provas de identificação | Cresc: **+**Cor**: Brancas** | McC | Cresc: **-**Cor**:** | Microbiologia: meios de cultura e provas de identificação | Cresc: **-**Cor**:**  |
| MacConkey com ác. nalidíxico | McC | Cresc: **-**Cor**:**  | <?php the_title(); ?> | Cresc: **+**Cor**: Vermelhas** | <?php the_title(); ?> | 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 com sua análise da Conjugação 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?

**Dia 3 – Continuação:**

**V) Análise dos resultados**

Vamos analisar e discutir por partes os resultados obtidos:

**Etapa 1**: Inicialmente vamos verificar se houve crescimento de cada uma das bactérias participantes da conjugação em cada um dos meios de cultura empregados, e se o crescimento ocorreu, qual foi a cor das colônias crescidas nas placas.

Lembre-se que, no meio ágar MacConkey as colônias das bactérias:

- *Salmonella*, que não fermenta lactose, são brancas;

- *Escherichia coli*, que fermenta lactose, são colônias vermelhas.

Vamos conferir os resultados obtidos apresentados no **QUADRO 1**:

Análise dos resultados das colônias crescidas derivadas da semeadura dos dois isolados bacterianos que participaram da Conjugação:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Meios de cultura | Cultura A*Salmonella typhimurium* MG031 ( *lac*-, tetR ) | Cultura B *Escherichia coli* K12 (*lac*+, nalR) |
| MacConkey sem antibiótico | **Colônias brancas** | Colônias vermelhas |
| MacConkey com tetraciclina | **Colônias brancas** | Sem crescimento |
| MacConkey com ác. nalidíxico | Sem crescimento | Colônias vermelhas |
| MacConkey com tetraciclina e com ácido nalidíxico | Sem crescimento | Sem crescimento |

Discussão:

- A **Cultura A** (*Salmonella*) originou colônias somente em meio solido sem antibiótico, e em meio contendo tetraciclina e originou **colônias brancas**;

- A **Cultura B** (*E. coli*) originou colônias somente em meio solido sem antibiótico, e em meio contendo acido nalidíxico e originou **colônias vermelhas**.

Desta forma, o fenótipo analisado dos dois isolados bacterianos foram confirmados:

1. o cultivo dos dois isolados em meios contendo diferentes antibióticos permitiu a confirmação das informações de resistência a antimicrobianos declarada em seus genótipos;
2. o emprego do meio MacConkey (que é um meio de cultura diferencial) permitiu o acompanhamento de crescimento de colônias do isolado de *E. coli* (colônias vermelhas) e do isolado *Salmonella* (colônias brancas).

Assim, agora estamos prontos para continuar nosso entendimento da Conjugação:

  ****

- Estas bactérias trocaram material genético de resistência a antibióticos, ou seja, a conjugação ocorreu?

- Qual foi a resistência transferida?

- Qual foi a bactéria doadora e qual foi a bactéria receptora?

- Após a conjugação, foi obtida uma nova bactéria recombinante que recebeu a resistência a antibióticos e, portanto, que reuniu as duas resistências a antibióticos?

Então, vamos lá descobrir o que falta. Como fazer para descobrir tudo isto?

**Etapa 2**: Precisamos saber se surgiram bactérias que reuniram a resistência aos dois antibióticos, certo?

Para descobrir isto, vamos agora então agora analisar as colônias crescidas onde foi semeada a mistura de conjugação (Mist. Conj.) nos quatro meios sólidos. Vamos, NOVAMENTE, conferir os resultados obtidos apresentados no **QUADRO 1**:

Análise dos resultados das colônias crescidas derivadas da semeadura da mistura de conjugação (Mist. Conj.):

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Meios de cultura | Cultura A*S. typhimurium* MG031 ( *lac*-, tetR ) | Cultura B *E. coli* K12 (*lac*+ , nalR) | Cultura C ( mist.conj.) |
| MacConkey sem antibiótico |  |  | **Colônias brancas** e Colônias vermelhas |
| MacConkey com tetraciclina |  |  | Colônias vermelhas |
| MacConkey com ác. nalidíxico |  |  | **Colônias brancas** |
| MacConkey com tetraciclina e com ácido nalidíxico |  |  | **Poucas****Colônias vermelhas** |

Discussão: 

- A primeira coisa que chama a atenção é que no meio sólido contendo os dois antibióticos são observadas algumas colônias bacterianas. Ou seja, na Mist. Conj. surgiram bactérias que reuniram a resistência aos dois antibióticos. **No espaço em que a Mist. Conj. foi semeada há colônias bacterianas crescidas que são,** portanto**, NalR e TetR ;**

- As colônias da Mist. Conj. **NalR e** **TetR apresentam coloração vermelha** (são fermentadoras de lactose, ou seja, **são Lac+).** Como **são Lac+, estas colônias são da bactéria *E.* *coli*.**

- A cultura pura da bactéria *E. coli* K12 (Lac+) vimos (na **Etapa 1**) que apresenta resistência a somente ao ácido nalidíxico e é sensível a tetraciclina.

- Então, neste experimento nós obtivemos uma **nova bactéria *E. coli* (Lac+)** que agora é **resistente a dois antibióticos ácido nalidíxico e tetraciclina**. Esta nova bactéria é chamada “**transconjugante** “**. O este novo transconjugante que construímos neste experimento pode ser definido como:** *Escherichia coli* K12 (*lac*+, nalR, **tetR**).

**Etapa 3**: Vamos reunir **todos** os resultados num único Quadro abaixo (**QUADRO 2**). Para isto, vamos, NOVAMENTE, conferir os resultados obtidos apresentados do **QUADRO 1**:

QUADRO 2:: Análise de todos os 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 antibiótico | **Colônias brancas** | Colônias vermelhas | **Colônias brancas** e Colônias vermelhas |
| MacConkey com tetraciclina | **Colônias brancas** | **Sem crescimento** | Colônias vermelhas |
| MacConkey com ác. nalidíxico | **Sem crescimento** | Colônias vermelhas | **Colônias brancas** |
| MacConkey com tetraciclina e comácido nalidíxico | **Sem crescimento** | **Sem crescimento** | **Poucas****Colônias vermelhas** |

**transconjugantes**

**Conclusão**: 

Ocorreu transferência de resistência a tetraciclina da bactéria doadora (*Salmonella typhimurium* MG031, *lac*-, tetr) para a bactéria receptora (*Escherichia coli* K12, *lac*+, nalr), resultando na obtenção de uma **bactéria transconjugante derivada de *E.* *coli* K12, *lac*+, nalr, tetr**.

Como o número de células de bactérias bacterianas transconjugantes é apenas uma pequena porcentagem do total das bactérias que participaram da conjugação, apenas poucas colônias vermelhas foram observadas no meio de cultura Agar MacConkey com os dois antibióticos tetraciclina e ácido nalidíxico.

## 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?

**Responda as questões e depois confira suas respostas com o gabarito na próxima página.** 

## QUESTÕES PARA ESTUDO e confirmação do entendimento – Respostas

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

Para analisar a conjugação bacteriana, empregamos meios seletivos que permitem a diferenciação das duas bactérias que participam do processo. No experimento que foi realizado uma bactéria é *E*. *coli* K12 (resistente ao antibiótico ácido nalidíxico -Nal**R**)) e a outra bactéria é - *Salmonella* *typhimurium* MG031 (resistente ao antibiótico tetraciclina - tetl**R**). Desta forma simplesmente observando qual bactéria cresce na presença de um dos antibióticos empregados neste experimento, identificamos qual é a bactéria que está crescendo.

Você vai perguntar: Por que foi empregado, para a seleção dos transconjugante, o meio **Ágar MacConkey**? Não poderíamos ter empregado qualquer outro meio? A resposta é: O meio Ágar MacConkey é um meio diferencial e seletivo. Neste meio somente crescem bactérias Gram-negativas e as bactérias Gram-negativas que crescem e são fermentadores de lactose como ***E. coli* originam colônias vermelhas** e as bactérias não fermentadoras de lactose, como ***Salmonella*, originam colônias brancas**. (VEJA AULA T/P: Cultivo de bactérias em meio seletivos e diferenciais).

Desta forma, observando a **coloração das colônias** que cresceram no meio **Ágar MacConkey**, independentemente do perfil de resistência a antibiótico apresentado, podemos saber que bactéria está crescendo. Assim, analisando a coloração das colônias das bactérias que reuniram as duas resistências (chamadas **transconjugantes**, no caso colônias vermelhas – *E. coli*) podemos saber que esta foi a bactéria que reuniu os 2 genes de resistência e que, portanto, esta bactéria surgiu em decorrência de ter recebido um plasmídeo de uma bactéria doadora (no caso, a bactéria doadora foi o isolado *Salmonella typhimurium* MG031 ( *lac*- , tetR ).

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

A cor das colônias dos transconjugantes é vermelha, ou seja, é *E. coli.* O genótipo do transconjugante obtido é: **bactéria transconjugante derivada de** ***E.* *coli* K12, *lac*+, nalr**que recebeu um plasmídeo que carrega resistência a tetraciclina. Tudo isto pode ser escrito como***:***

***E.* *coli* K12, *lac*+, nalr, tetr**.

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

Sim, descartaria porque a mutação é um fenômeno que somente ocorre em baixa frequência, aproximadamente 1 evento/10**8** células bacterianas na população. O número de transconjugantes derivados da cultura de ***E.* *coli* K12, *lac*+, nalr** é muito superior.

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

A **conjugação** bacteriana resulta em alta frequência de transferência de genes de resistência a antibióticos em bactérias. Para que a conjugação bacteriana ocorra, simplesmente é necessário o contato entre duas bactérias viáveis. Se uma destas bactérias contiver um plasmídeo conjugativo (bactéria doadora), este poderá ser transferido para uma bactéria receptora. Após o evento da conjugação, ambas estas bactérias (a bactéria doadora, e a bactéria receptora que agora será um transconjugante) conterão o plasmídeo, e, ambas serão capazes de transferir o plasmídeo para uma nova bactéria receptora. Dependendo do tempo que a mistura de bactérias com e sem plasmídeos forem incubadas, todas as bactérias da mistura receberão plasmídeos por conjugação. Assim, a **Conjugação bacteriana** é considerada o principal mecanismo de transferência de resistência a antibióticos que ocorre naturalmente em ambientes hospitalares.