

Chamada Pública 09/2017 – Biodiversidade do Paraná (Fundação Araucária & Fundação Grupo Boticário)

ANEXO I - ROTEIRO DESCRITIVO DA PROPOSTA

1. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO

Protocolo n.º:	
Título:	Biodiversidade de microorganismos na região Lagamar do Paraná
Área(s) do Conhecimento:	Ciências Biológicas – Microbiologia, Ecologia, Biodiversidade
Instituição Proponente/Campus:	Universidade Federal do Paraná, Setor Litoral
Breve Histórico da Instituição Responsável:	A criação da UFPR Litoral teve início em 2004, quando foi autorizada a criação do Campus Litoral da UFPR, sendo que as atividades começaram no segundo semestre de 2005. Em 2007, o Campus tornou-se Setor. As atividades de pesquisa do Setor Litoral ganharam força com a implantação em 2014 do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Territorial Sustentável (PPGDTS) que tem como objetivo conciliar preservação da natureza, diversidade cultural, políticas públicas e desenvolvimento territorial. O proponente tem formação na área molecular tendo trabalhado como professor no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR de 2008 a 2015. Em 2015, o proponente foi removido para o setor litoral da UFPR em Matinhos onde iniciou atividades de pesquisa implantando um laboratório de química e microbiologia ambiental com estudos voltados para biodiversidade de microorganismos e impactos ambientais na região Lagamar no Litoral do Paraná. Estas pesquisas agregam a linha temática Ecologia e Biodiversidade do PPGDTS do Setor Litoral - UFPR.
Forma de contribuição da Instituição Responsável:	O UFPR dispõe de espaço físico, transporte, equipamento de laboratório, pessoal técnico e alguns reagentes necessários para o desenvolvimento desta proposta
Coordenador:	Luciano Fernandes Huergo
Curriculo Lattes do Coordenador:	http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4760025T2

1

2. LINHA TEMÁTICA (ATENÇÃO: SELECIONAR APENAS UMA OPÇÃO):

	a) <u>Unidades de Conservação de Proteção Integral (continentais e marinhas) e RPPNs: criação e ampliação de UCs e execução de seus Planos de Manejo</u>
	b) <u>Espécies Ameaçadas: execução de Planos de Ação Nacionais (PAN), ações emergenciais para proteção e definição de status de ameaça de espécies nativas</u>
x	c) <u>Ambientes Marinhos: estudos, proteção e redução das pressões sobre a biodiversidade marinha</u>

3. INDICADORES

Adotaremos nos próximos anos, 7 indicadores visando auxiliar no monitoramento dos impactos dos projetos apoiados. Por favor, selecione um ou mais indicadores que serão trabalhados/contemplados em seu projeto. Caso não haja nenhum indicador relacionado, não é obrigatório seu preenchimento, porém destacamos que projetos que auxiliem atingir as metas relacionadas a estes indicadores serão prioridade para as instituições.

3.1 Unidade de Conservação

	Criação / Ampliação de Unidades de Conservação de Proteção Integral e RPPN
	Execução de ações prioritárias de Planos de Manejo de Unidades de Conservação
	Normativas para conservação de ambientes continentais

3.2 Espécies

	Ação emergencial Planos de Ação Nacional
	Ações previstas nos Planos de Ação Nacionais (PAN) para a conservação de espécies ameaçadas
	Estudos para definição de status de ameaça de espécies

3.3 Geração de Conhecimento

x	Resultados não se enquadram em nenhum dos indicadores
---	---

4. LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA PESQUISA

Caso pertinente, envie arquivos anexos como mapas, fotos, documentos no formato PDF, via SigAraucária.

4.1 Biomas

Bioma Principal:	Cerrado	Marinho	x	Mata Atlântica	
Bioma(s) Secundário(s):	Cerrado	x	Marinho	x	Mata Atlântica

4.2. Unidades de Conservação

APA de Guaratuba – PR, Parque Estadual Boguaçu e Baía de Guaratuba
--

4.3 Detalhes adicionais

Baía de Guaratuba, região Lagamar

5. SÍNTESE/RESUMO

Os microorganismos formam a base das cadeias tróficas, catalisando reações fundamentais nos ciclos biogeoquímicos de virtualmente todos os nutrientes incluindo Carbono, Fósforo e Nitrogênio. Assim, a conservação das comunidades microbianas é imprescindível para a conservação de organismos superiores. Estima-se que menos de 1% das espécies de microorganismos sejam conhecidas e catalogadas pela humanidade. Portanto, os microorganismos constituem um reservatório de material genético ainda pouco explorado com grande potencial para novas aplicações biotecnológicas. Uma maior compreensão da dinâmica e composição das comunidades microbianas pode servir de base para criação de mecanismos de controle ambiental através da seleção de espécies bioindicadoras auxiliando em ações de conservação. Outra vertente é a aplicação de microorganismos como biorremediadores, consumidores de poluentes em casos de acidentes ambientais.

Esta proposta tem como principal meta catalogar a biodiversidade de microorganismos cultiváveis e não cultiváveis presentes no Ecossistema Manguezal da APA de Guaratuba e Parques Estadual Boguaçu fornecendo auxílio a um projeto que já se encontra em andamento. Serão aplicadas técnicas moleculares de última geração incluindo sequenciamento massivo de DNA do gene 16S através da plataforma Illumina e espectrometria de massas de célula intacta a fim de catalogar e compreender a dinâmica da biodiversidade microbiana da região Lagamar do Litoral do Paraná.

Este projeto irá fornecer um inventário das comunidades microbianas habitantes do ecossistema Manguezal na Baía de Guaratuba e indicar como as variáveis pH, salinidade, granulometria do substrato e concentração de microelementos afetam a composição de microorganismos do Mangue. Serão comparados os perfis de comunidades microbianas em áreas preservadas e de forte pressão antrópica a fim de determinar os efeitos de contaminação com esgoto doméstico na composição do microbioma do mangue. Espera-se isolar pelo menos 20 novas espécies bacterianas que serão catalogadas em nível molecular. Pelo menos 2 espécies novas de microorganismos terão seu genoma sequenciado. Os dados obtidos poderão auxiliar no desenvolvimento de métodos moleculares / microbiológicos capazes de atuar como bioindicadores de poluição / contaminação ambiental. Além disso, esta proposta irá contribuir para formação de recursos humanos qualificados e para o estabelecimento de um laboratório de referência em estudos moleculares de biodiversidade na região do Litoral do Paraná.

6. OBJETIVOS

Catalogar a biodiversidade de microorganismos cultiváveis e não cultiváveis presentes no Ecossistema Manguezal da APA de Guaratuba e compreender como a contaminação com esgoto doméstico afeta a comunidade de microorganismos do mangue

Específicos

1. Isolar DNA total do Mangue de dois pontos da Baía de Guaratuba e seqüenciar o gene 16S utilizando a plataforma Illumina. (Serão incluídas áreas preservadas e com contaminação de esgoto doméstico para comparação)
2. Caracterizar a composição físico-química de cada amostra como granulometria, pH, salinidade, conteúdo de matéria orgânica, teor de micro elementos
3. Identificar as espécies de microorganismos presentes em cada local amostrado através de análises de bioinformática no programa QUIIME e realizar análises multivariadas a fim de identificar correlações entre parâmetros físico-químicos do mangue e espécies presentes.
4. Isolar bactérias aeróbicas heterotróficas de cada ambiente através de diluições seriadas em meio rico e classificar filogeneticamente os isolados através da obtenção de dados de espectrometria de massas de célula intacta e clusterização de dados
5. Seqüenciar o gene 16S dos isolados mais distantes filogeneticamente e classificar os organismos com base em bancos de dados públicos
6. Sequenciar e anotar o genoma de pelo menos dois isolados com maior potencial de aplicação biotecnológica

7. JUSTIFICATIVA

O Litoral do Paraná alberga um dos maiores trechos preservado de Mata Atlântica no Brasil. Esta região possui diversas Unidades de Conservação que contribuem para a preservação do bioma Mata Atlântica o qual é considerado como um “hot spot” da biodiversidade pela UNESCO. Na região Lagamar, o ecossistema manguezal está localizado na transição entre o ambiente terrestre e marinho formando um ambiente de alta produtividade primária berçário para o desenvolvimento de diversas espécies de vertebrados marinhos e terrestres. Apesar da enorme importância dos microorganismos para a manutenção de todos os ciclos biogeoquímicos que sustentam as demais formas de vida, dados sobre a biodiversidade microbiana permanecem escassos, em particular, não há relatos de trabalhos descrevendo as comunidades microbianas que habitam ecossistemas manguezais no litoral do Paraná.

A grande maioria dos microorganismos ainda não é conhecida pelo Homem devido à dificuldade em cultivar algumas espécies de bactérias nos meios de cultura mais comumente utilizados. Este grupo de microorganismos, denominados de “não cultiváveis” representam 99% das espécies de procariotos presentes na natureza e constitui um *pool* genético com grande potencial de aplicações biotecnológicas. O conhecimento da biodiversidade microbiana dos vários ecossistemas brasileiros é urgente. A Convenção da Diversidade Biológica reconhece a deficiência geral de informação e conhecimento da diversidade biológica global e da necessidade imperiosa de desenvolver capacitação científica e técnica para permitir o entendimento básico da biodiversidade. O Brasil, como um dos signatários, concordou em mobilizar esforços no sentido de identificar os componentes da sua biodiversidade necessários para sua conservação e uso sustentável. Apenas recentemente esforços amostrais mundiais, como o do projeto “Earth Microbiome Project” <http://www.earthmicrobiome.org/>, e nacionais, como o do “Brazilian Microbiome Project” <http://www.brmicrobiome.org/>, foram iniciados a fim de catalogar a diversidade microbiana no planeta. Além do interesse conservacionista e ecológico, estes projetos podem auxiliar no acesso ao *pool* genético de microorganismos não cultiváveis.

Como os microorganismos apresentam uma grande variedade de vias metabólicas e capacidades de produzir metabólitos secundários únicos, este *pool* genético pode ser utilizado para uma ampla gama de aplicações biotecnológicas com na produção de novos antibióticos e fármacos, enzimas de aplicações industriais e aplicações em processos de biorremediação. Trabalhos recentes

publicados na prestigiosa revista *Nature* mostram que dentre estes microorganismos “não cultiváveis” presentes no solo e no ambiente marinho existem bactérias capazes de produzir novos antibióticos e compostos bioativos com grande potencial de aplicação farmacêutica (Wilson *et al.*, 2014; Ling *et al.*, 2015). O ecossistema manguezal é um nicho de particular interesse para estudos de biodiversidade microbológica e bioprospecção devido as suas características peculiares como variações de salinidade e disponibilidade de oxigênio.

Esta proposta também irá contribuir para formação de recursos humanos qualificados e para o estabelecimento de um laboratório de referência em estudos moleculares de biodiversidade na região do Litoral do Paraná.

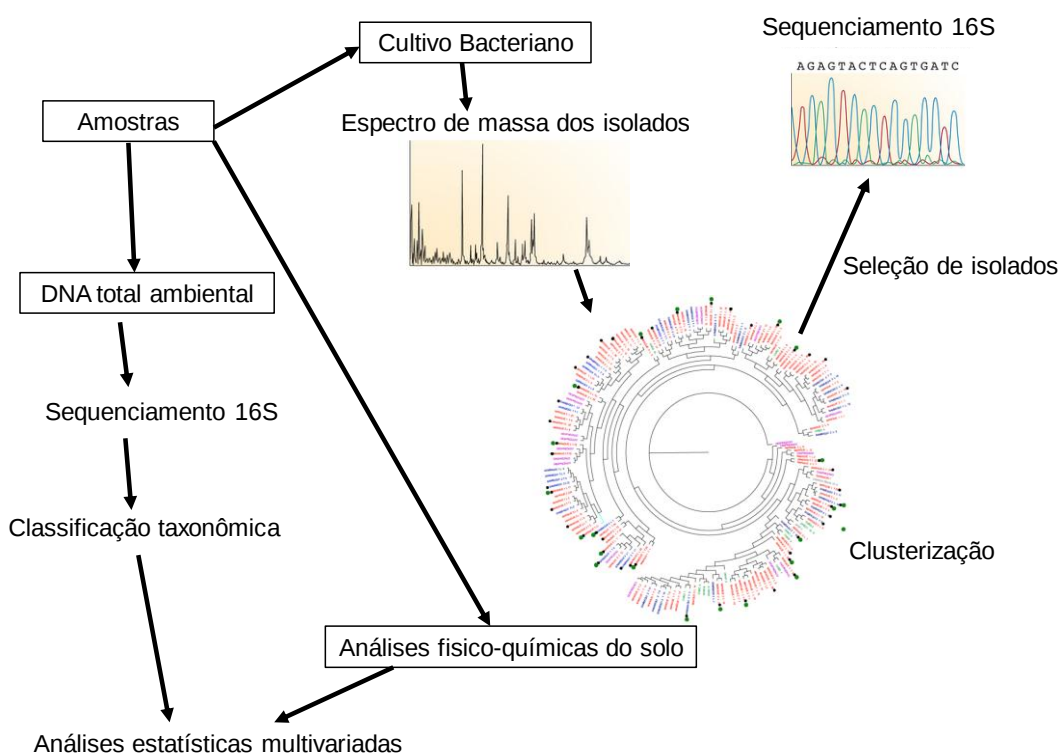
8. METODOLOGIA

Desenho do experimento e coleta

O estudo proposto na Baía de Guaratuba (APA de Guaratuba e Parque Estadual Boguaçu) visa determinar a diversidade e a estrutura das comunidades bacterianas presentes no mangue e correlacioná-las através de análises multivariadas com os atributos físico-químico do solo e com a presença de contaminação por esgoto doméstico. Inicialmente serão coletadas amostras de água nas margens do Rio Boguaçu na Baía de Guaratuba, no entorno do Bairro Mirim e nas proximidades da Ilha do Casqueiro. As amostras de água serão avaliadas quanto à contaminação por esgoto através da determinação da presença de *Escherichia coli* utilizando o método do número mais provável NMP através do Kit Colilert da Idexx. Desta forma será possível estabelecer as porções do manguezal ao longo do Rio Boguaçu que estão sujeitas a contaminação por esgoto doméstico e quais estão livres de contaminação.

Definidas áreas não impactadas e impactadas serão realizadas coletas do lodo de mangue em uma altura de 0 a 15 cm de profundidade utilizando canos PVC esterilizados de 25 cm de diâmetro. As coletas serão realizadas na maré baixa na área sujeita a variação de marés. Serão coletas 3 amostras de cada área sendo cada amostra composta de 3 subamostras de cerca de 200g cada. As subamostras serão misturadas até homogeneidade em um saco plástico estéril.

O material coletado será submetido a análises físico-química de solo, isolamento de DNA total e cultivo de microorganismos como descrito nos próximos itens de acordo com o fluxograma experimental descrito abaixo:



Análise físico-química do substrato

Serão realizadas análises padrão de solo como carbono; nitrogênio; cálcio; magnésio; potássio; sódio; fósforo; pH; alumínio; enxofre; relação C/N; capacidade de troca de cátions (CTC); soma de bases (S); saturação em bases (V%); saturação em alumínio (m%); fracionamento da matéria orgânica. Serão realizadas análises de textura (porcentagem de areia muito grossa, grossa, média, fina e muito fina; silte e argila). As análises serão realizadas através de metodologia padrão de análises de solo no laboratório de análise de solos no Setor de Ciências Agrárias da UFPR. Outros elementos específicos serão determinados utilizando espectrometria de absorção atômica em chama no setor Litoral UFPR como descrito em protocolos da agência de proteção ambiental dos Estados Unidos EPA disponíveis *online* (método 7000B) <https://www.epa.gov/hw-sw846/sw-846-test-method-7000b-flame-atomic-absorption-spectrophotometry>.

Análise total da biodiversidade de microorganismos

A extração do DNA total do solo será realizada utilizando-se o kit “Power Soil DNA Kit” da MOBIO Laboratories, Inc. seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Os primers 515F e 806R contendo sequência adaptadoras para o sistema de sequenciamento Illumina e barcodes para identificação das amostras serão utilizados para a amplificação da região V4 do gene 16S rRNA conforme descrito por Caporaso e colaboradores (2012). As PCRs serão realizadas em triplicatas, posteriormente misturadas e purificadas. Uma amostra composta, combinando proporções equimolares dos produtos de PCR, será submetida para o sequenciamento no sistema Illumina MiSeq (Caporaso *et al.*, 2012) no setor de Ciências Biológicas da UFPR como descrito (Etto *et al.*, 2012).

A análise de qualidade das sequências, a separação das sequências por barcode, o agrupamento em unidades taxonômicas (OTUs), a classificação taxonômica das sequências e as análises de alfa e beta diversidade, serão realizadas pelo programa QIIME (Kuczynski *et al.*, 2012; Caporaso *et al.*, 2012). Análises de diversidade complementares serão também realizadas pelo programa R (R Development Core Team) usando os pacotes BiodiversityR e Vegan.

Cultivo de microorganismos e classificação taxonômica

As amostras de substratos serão submetidas a diluições seriadas em solução salina. As diluições serão plaqueadas em pelo menos dois meios de cultivo rico em nutrientes como LA e triptona Agar contendo ciclohexamida para inibir crescimento de fungos. As culturas serão incubadas a 30°C de 3 a 10 dias até o aparecimento de colônias. As colônias serão coletadas com palitos estéreis e colocadas sobre uma placa de MALDI e submetidas à análise de espectrometria de massas tipo MALDI-TOF célula intacta como descrito (Stets *et al.*, 2013).

O espectro de massas de cada célula serve como uma impressão digital de cada espécie e a comparação do perfil dos espectros entre os isolados infere a correlação filogenética entre os organismos (Stets *et al.*, 2013). Os espectros obtidos serão submetidos à clusterização a fim de gerar uma árvore filogenética agrupando organismos com maior parentesco evolutivo. Um representante de cada ramo principal da árvore será escolhido para extração do DNA total, amplificação por PCR e sequenciamento do gene 16S através do método de Sanger utilizando o sequenciado ABI 3500. As sequências serão submetidas a comparações com bancos de dados públicos (RPD e NCBI) a fim de se obter uma classificação taxonômica.

Possíveis aplicações biotecnológicas dos novos isolados como produção de antibióticos dos novos isolados será avaliada através da capacidade destes organismos em inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis* através da técnica de co-cultivo em placa. Capacidade de produção de enzimas de interesse biotecnológico com celulasas, lipases e proteases, serão realizadas através do cultivo em meio sólido Agar contendo celulose, trioleína e leite em pó. A formação de halos de hidrólise será monitorada por visualização direta ou através da utilização do corante vermelho congo para atividade de degradação de celulose.

Sequenciamento e anotação genômica

Dois isolados de maior interesse biotecnológico (de acordo com os ensaios de produção de antibióticos e enzimas descritos acima) terão seu genoma sequenciado. O DNA total será extraído com kits comerciais e submetidos à sequenciamento massivo utilizando a plataforma Illumina em um sequenciador MiSeq usando o método de sequência emparelhada (2x250 pb) seguindo recomendações do fabricante. A qualidade das leituras será avaliada usando o pacote FastQC. Os genomas serão montados utilizando os programas SPAdes e FGAP. A anotação de proteínas será realizada utilizando a plataforma RAFTS3 utilizando *pipelines* de bioinformática já estabelecidos em nosso grupo (Leao *et al.*, 2017).

9. RESULTADOS ESPERADOS

Com este projeto será possível determinar quais são os grupos taxonômicos predominantes de procariotos que habitam os manguezais da APA de Guaratuba. Como conhecimento dos táxons microbianos presentes será possível inferir quais as principais vias metabólicas de ciclagem de nutrientes presentes em cada ambiente. Com a comparação entre as áreas impactadas e não impactadas permitirá compreender como a contaminação por esgoto doméstico afeta as comunidades microbianas no ecossistema manguezal permitindo um melhor direcionamento em ações conservacionistas futuras.

As análises dos microorganismos cultiváveis permitirão estabelecer se há alguma espécie de fácil cultivo e reprodução que possa atuar como um indicador de contaminação ambiental. Além disso, serão isoladas bactérias de novas espécies ainda não descritas que podem apresentar potencial de aplicações biotecnológicas como, por exemplo, produtoras de novos antibióticos ainda não descritos. O aspecto biotecnológico do projeto também é de especial interesse uma vez que a vida microbiana do mangue é bastante diversa e ainda muito pouco estudada.

O projeto visa à formação de um grupo de pesquisa multidisciplinar envolvendo especialista em conservação (Marcos), pesquisadores de renome internacional na área de sequenciamento de DNA e genomas (Fabio e Emanuel), especialistas em bioinformática (Leo e Emerson) e especialistas em solos (Marcos e Gilson) além de estudantes de graduação e pós-graduação de diferentes áreas de formação. Além disso, o projeto irá vincular um programa de pós-graduação já bem estabelecido (Bioquímica UFPR - Nota 6 na CAPES) com um programa emergente (PPGDS UFPR, Litoral). Esta proposta conjunta irá promover a produção científica do programa de pós-graduação em Matinhos auxiliando na abertura futura da modalidade doutorado.

O projeto permitirá a formação de recursos humanos com capacidade de realizar análises moleculares de biodiversidade de última geração empregando técnicas de sequenciamento de DNA em larga escala, espectrometria de massas e análises de bioinformática. Este projeto também permitirá a consolidação de um laboratório de referência de estudos moleculares em biodiversidade em uma região circundada por extrema biodiversidade (Setor Litoral UFPR – Matinhos) e carente de recursos humanos especializado em pesquisa de ponta.

10. AUTORIZAÇÃO AMBIENTAL

Serve para informar o tipo e especificações, validade, e em nome de quem esta a autorização ambiental e/ou protocolo de solicitação da sua proposta. A Fundação Araucária e a Fundação Grupo Boticário se reservam ao direito de considerar a proposta inelegível caso não sejam apresentadas, quando cabíveis, as autorizações ambientais pertinentes, ou os protocolos de suas solicitações junto aos órgãos competentes.

11. PLANO DE INFORMAÇÃO/ DIVULGAÇÃO

Os resultados da pesquisa são reportados em eventos e congressos e publicações em revistas científicas internacionais de alto impacto. Além disso, as informações obtidas na pesquisa serão comunicadas para estudantes de graduação e ensino médio em feiras de ciências e exposições regularmente organizadas pela equipe envolvida no projeto através do programa de divulgação científica da UFPR, labmóvel <http://www.labmovel.ufpr.br/>

12. ESPÉCIES AMEAÇADAS

Não se aplica

13. HISTÓRICOS E INTERFACES DO PROJETO COM OUTRAS INICIATIVAS

Esta proposta irá iniciar uma ação de catalogação da biodiversidade microbiana na região do litoral do Paraná. Inicialmente o ecossistema manguezal será objeto de estudo. Em ações futuras outros ecossistemas do bioma Mata Atlântica serão estudados.

14. PLANO DE TRABALHO

Descrever o(s) objetivo(s) específico(s), a(s) meta(s) e elementos que compõem o projeto (conforme tabela abaixo), contemplando a descrição, unidade de medida e quantidade, além das etapas/fases, ações em que se pode dividir a execução de uma meta, indicando o período de realização e valor previsto para a mesma. Não existe limitação para a quantidade de metas, no entanto, cada meta deve conter pelo menos uma etapa/fase.

META nº:1	Objetivo específico	Isolar DNA total do Mangue de dois pontos da Baía de Guaratuba e sequenciar o gene 16S utilizando a plataforma Illumina. (Serão incluídas áreas preservadas e com contaminação de esgoto doméstico para comparação)			
	Descrição da meta	Identificar áreas impactadas e não impactadas no rio Boguaçu			
	Unidade de medida/ indicadores	Análise de coliformes e <i>E. coli</i>		Quantidade	4
	Etapas/Fase nº	1	Descrição da Etapa/Fase	Análise da qualidade da água ao longo de pelos menos 4 pontos do Rio	
	Período de realização	Início: 01/03/2018 / Término: 01/07/2018		Valor Previsto	R\$ 1.000,00

META nº:2	Objetivo específico	Isolar DNA total do Mangue de dois pontos da Baía de Guaratuba e sequenciar o gene 16S utilizando a plataforma Illumina. (Serão incluídas áreas preservadas e com contaminação de esgoto doméstico para comparação)			
	Descrição da meta	Isolar o DNA total e sequenciar gene 16S			
	Unidade de medida/ indicadores	DNA extraído de pontos amostrais e sequenciado		Quantidade	6
	Etapas/Fase nº	1	Descrição da Etapa/Fase	O DNA total será extraído e sequenciado	
	Período de realização	Início: 01/07/2018 / Término: 01/07/2019		Valor Previsto	R\$ 25.000,00

META nº:3	Objetivo específico	Caracterizar a composição físico-química de cada amostra como granulometria, pH, salinidade, conteúdo de matéria orgânica, teor de micro elementos			
	Descrição da meta	Análise físico química de solo			
	Unidade de medida/ indicadores	Determinar composição do solo		Quantidade	6
	Etapas/Fase nº	1	Descrição da Etapa/Fase	Serão determinadas a composições física e química do solo de mangue em 6 pontos amostrais	
	Período de realização	Início: 01/03/2018 / Término: 01/07/2018		Valor Previsto	R\$ 2.000,00

META nº:4	Objetivo específico	Identificar as espécies de microorganismos presentes em cada local amostrado através de análises de bioinformática no programa QUIIME e realizar análises multivariadas a fim de identificar correlações entre parâmetros físico-químicos do mangue e espécies presentes.			
-----------	---------------------	---	--	--	--

	Descrição da meta	Análises de biodiversidade			
	Unidade de medida/ indicadores	Determinação da biodiversidade microbiana nas amostras		Quantidade	6
	Etapas/Fase nº	1	Descrição da Etapa/Fase	Serão determinadas a composição da comunidade microbiana em cada amostra e comparada com a composição físico – química do substrato através de análises multivariadas	
	Período de realização	Início: 01/03/2019 / Término: 01/12/2019		Valor Previsto	R\$ 5.000,00

META nº:5	Objetivo específico	Isolar bactérias aeróbicas heterotróficas de cada ambiente através de diluições seriadas em meio rico e classificar filogeneticamente os isolados através da obtenção de dados de espectrometria de massas de célula intacta e clusterização de dados			
	Descrição da meta	Análises de biodiversidade de organismos cultiváveis			
	Unidade de medida/ indicadores	Determinação da biodiversidade microbiana nas amostras de organismos cultiváveis		Quantidade	6
	Etapas/Fase nº	1	Descrição da Etapa/Fase	Bactérias heterotróficas serão isoladas e clusterizadas por parentesco filogenético através de espectrometria de massas	
	Período de realização	Início: 01/03/2019 / Término: 31/01/2020		Valor Previsto	R\$ 15.000,00

META nº:6	Objetivo específico	Sequenciar o gene 16S dos isolados mais distantes filogeneticamente e classificar os organismos com base em bancos de dados públicos			
	Descrição da meta	Identificação de isolados			
	Unidade de medida/ indicadores	Determinação da taxonômica de bactérias cultivadas		Quantidade	20
	Etapas/Fase nº	1	Descrição da Etapa/Fase	Pelos menos 20 isolados serão identificados taxonomicamente através de análise de sequenciamento de gene 16S	
	Período de realização	Início: 01/03/2018 / Término: 31/01/2020		Valor Previsto	R\$ 15.000,00

META nº:7	Objetivo específico	Sequenciar o gene 16S dos isolados mais distantes filogeneticamente e classificar os organismos com base em bancos de dados públicos			
	Descrição da meta	Determinar potencial de aplicação biotecnológica dos isolados			
	Unidade de medida/ indicadores	Testes de atividades de produção de compostos de interesse biotecnológico		Quantidade	5
	Etapas/Fase nº	1	Descrição da Etapa/Fase	Os isolados mais distintos filogeneticamente serão avaliados quanto a produção de antibióticos e enzimas de interesse comercial	
	Período de realização	Início: 01/03/2018 / Término: 31/01/2020		Valor Previsto	R\$ 15.000,00

META nº:8	Objetivo específico	Sequenciar e anotar o genoma de pelo menos dois isolados com maior potencial de aplicação biotecnológica			
	Descrição da meta	Sequenciamento genômico			

Unidade de medida/ indicadores		Determinar e anotar a sequência de genomas	Quantidade	2
Etapa/Fase nº	1	Descrição da Etapa/Fase	O genoma de dois isolados serão sequenciados e anotados	
Período de realização	Início: 01/03/2018 / Término: 31/01/2020		Valor Previsto	R\$ 15.000,00

15. INFRAESTRUTURA DISPONÍVEL

Esta proposta prevê uma colaboração extensiva com e já bem consolidada entre o Setor Litoral da UFPR e o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. As análises moleculares de sequenciamento de DNA através do método de Sanger e de última geração bem como a aquisição de dados de espectrometria de massas serão realizadas no laboratório em Curitiba. As coletas de material e processamento das amostras serão realizadas nas instalações do UFPR Litoral em matinhos. Os equipamentos já disponíveis para realizar o projeto estão listados abaixo. Também dispomos de grande parte do material de consumo e reagentes que serão necessários para execução do projeto. As fases iniciais deste projeto já estão em andamento e sendo financiados por outras fontes de recurso.

Equipamentos disponíveis no laboratório de Fixação de Nitrogênio do departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba:

Sequenciador automático de DNA ABI 3500
Sequenciador de DNA alta capacidade Illumina Miseq
Bioanalyzer
Nanodrop
Computador de alta capacidade servidor Sun
Espectrômetro de massas MALDI-TOF

Equipamentos disponíveis no laboratório do Setor Litoral – Matinhos Universidade Federal do Paraná:

Capela de fluxo laminar
Destilador de água
Máquina de gelo
Centrífuga de bancada
Termociclador
Espectrofotômetro
Sistemas Eletroforese de DNA
Balança analítica digital
pHmetro e agitador magnético
Micropipetas para 0,5 - 10µl, 5-40 µl, 40-200µl, 200 - 1000µl
Agitador tipo Vortex
Microcentrífuga (12.000 a 15.000 rpm)
Geladeira
Freezer -20°C

16. ORÇAMENTO DETALHADO

Contendo a especificação detalhada, a justificativa dos itens financeiros solicitados, a quantidade e o valor de cada item.

Rubrica	Quantidade	Valor unitário R\$	Total R\$
Capital, Incubadora tipo shaker.	1	38.000,00	38.000,00

A incubadora do tipo shaker será necessária para cultivo de microorganismos isolados em meio líquido sob condições aeróbicas. O equipamento será importando e o valor apresentado já engloba as despesas com importação			
Capital, Computador de alto desempenho. O computador de alta capacidade será necessário para as análises de bioinformática de biodiversidade, montagem e anotações de genomas.	1	5.000,00	5.000,00
Custeio, Diárias. As diárias serão necessárias para deslocamento e reuniões entre as equipes de Curitiba e Matinhos e realização de coletas.	6	230,00	920,00
Custeio Kits de extração e purificação de DNA	4	1.000,00 (preço médio)	4.000,00
Reagentes químicos diversos, sais, solventes, etc	14	1.000,00 (preço médio)	14.000,00
Kits para sequenciamento de DNA	5	4.000,00 (preço médio)	20.000,00
Enzimas de restrição e modificação de DNA	18	500,00 (preço médio)	9.000,00
Oligonucleotídeos e DNA sintético	10	1.000,00 (preço médio)	10.000,00

17. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N. *et al.* (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* **6**: 1621-1624.
- Etto, R.M., Cruz, L.M., Jesus, E.C., Galvão, C.W., Galvão, F., Souza, E.M. *et al.* (2012) Prokaryotic communities of acidic peatlands from the southern Brazilian Atlantic Forest. *Braz J Microbiol* **43**: 661-674.
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W.A., Gonzalez, A., Caporaso, J.G., and Knight, R. (2012) Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Curr Protoc Microbiol* **Chapter 1**: Unit.
- Leao, A.C., Weiss, V.A., Vicente, V.A., Costa, F., Bombassaro, A., Raittz, R.T. *et al.* (2017) Genome Sequence of Type Strain *Fonsecaea multimorphosa* CBS 980.96T, a Causal Agent of Feline Cerebral Phaeohyphomycosis. *Genome Announc* **5**.
- Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P. *et al.* (2015) A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **517**: 455-459.
- Stets, M.I., Pinto, A.S., Jr., Huergo, L.F., de Souza, E.M., Guimaraes, V.F., Alves, A.C. *et al.* (2013) Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. *J Biotechnol* **165**: 167-174.
- Wilson, M.C., Mori, T., Ruckert, C., Uria, A.R., Helf, M.J., Takada, K. *et al.* (2014) An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature* **506**: 58-62.

18 .TERMO DE COMPROMISSO

<i>Declaro expressamente conhecer e concordar, para todos os efeitos legais, com as normas para concessão de auxílio pela FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA.</i>
Coordenador da proposta Nome e assinatura

<i>Declaro que a presente proposta está desacordo com os objetivos científicos e tecnológicos desta Instituição.</i>
Responsável pela instituição ou representante Nome, assinatura e carimbo

_____, _____ de _____ de 2017.