



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**Isolados bacterianos do besouro-praga *Sphenophorus levis*: potencial
para degradação de poliestireno expandido**

Karen Susana Manjarrez Madera

Dissertação de Mestrado
apresentado ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de São Carlos
como requisito para obter o título de
mestre em Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Flavio Henrique Silva

Co-orientador:

Dr. Célio Dias Santos Júnior

* bolsista (CAPES)- 88887.495790/2020-00

São Carlos - SP

2022

Dedico este trabalho à minha mãe Sandra Madera, ao meu avô Manuel Madera e ao meu parceiro Luis G. Cuadrado pelo apoio incondicional, por me motivarem a lutar pelos meus objetivos e me permitirem crescer como pessoa, por último e não menos importante, a meu filho Lucas que veio para tornar minha vida cheia de amor.

Dedico este trabajo a mi mamá Sandra Madera, a mi abuelo Manuel Madera y a mi pareja Luis G. Cuadrado por el apoyo incondicional, por motivarme a luchar por mis metas y permitirme crecer como persona, por último y no menos importante a mi hijo Lucas que llegó darle un giro a mi vida lleno de mucho amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Primeiramente à Deus por todas suas bençãos.

À minha família pelo suporte, confiança, amor e toda a educação depositada em mim. Agradeço especialmente a minha mamãe Sandra Madera Vargas, meu avô Manuel Madera Lara e irmãos.

Ao meu namorado e companheiro de vida Luis Guillermo Cuadrado Durango pelo amor, confiança e apoio, e ao meu bebê Lucas Cuadrado Manjarrez por me ensinar a ser mãe e sentir o maior amor deste mundo (minha pequena família).

Ao Dr. Célio Dias Santos Júnior por me co-orientar na realização deste projeto, além disso, pela paciência, compreensão e ter disposição para me ajudar em cada etapa do projeto. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Silva, por ter me aceito e me acolhido em seu grupo durante o período de realização deste projeto, apostando em meu trabalho e me orientando com muita paciência, compreensão e confiança, sempre disposto a ajudar em todos os aspectos.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular pelo apoio não só profissional como também pessoal. Agradeço em especial aos alunos de pós-graduação: Iara Macedo, Yan Matuhara, Josilene Menk e Eduardo Souza, pelos laços de amizade e profissionalismo construídos sob um olhar de ajuda e companheirismo, na formação de um grupo de pesquisa forte e produtivo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Resumo

O presente trabalho objetivou a verificação do potencial de cepas bacterianas endossimbiontes isoladas do intestino de larvas do inseto praga *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) para a degradação de poliestireno expandido (EPS) por meio de ferramentas bioinformáticas. O estudo baseou-se nas observações iniciais do consumo ativo de EPS pelas larvas do inseto. Inicialmente, as larvas de *S. levis* foram submetidas a dissecação intestinal para isolamento das cepas mais abundantes e sequenciamento do DNA genômico em triplicatas. A identificação das cepas bacterianas foi feita por meio dos genes de cópia única, marcadores taxonômicos, obtendo-se genomas associados à *Microbacterium hominis*, *Bacillus spp.*, e *Stenotrophomonas maltophilia*. Traços fenotípicos foram preditos a partir da sequência dos genomas com elevada acurácia, uma vez que traços como morfologia e sensibilidade ao oxigênio concordaram com a caracterização bioquímica das cepas. Genes relacionados à degradação do poliestireno foram identificados apenas na cepa *Bacillus spp.* SLBac4, e com esses dados propusemos uma via metabólica de biodegradação do EPS. A cepa *Bacillus spp.* SLBac4 possui quatro enzimas envolvidas na oxidação da cadeia lateral e ruptura direta no anel aromático do estireno, entretanto, a despolimerização inicial do EPS permanece desconhecida. Dentro das quatro enzimas foi caracterizada e comparada a estireno monooxigenase por sua especificidade na etapa inicial da degradação do EPS. Além disso, atualmente, não há estudos sobre enzimas que degradem diretamente o EPS. Nosso estudo fornece as primeiras evidências relacionadas a um possível mecanismo metabólico de biodegradação enzimática de bactérias do intestino de larvas de *S. levis*, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias futuras para biorremediação de poluentes como o EPS.

Palavras-chaves: *Sphenophorus levis*, microbioma intestinal, Biodegradação, Poliestireno expandido, Estireno monooxigenase,

Abstract

The present work aimed to verify the potential of endosymbionts bacterial strains isolated from the intestine of larvae of the insect pest *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) for the degradation of expanded polystyrene (EPS) through the use of bioinformatics tools. The study was based on initial observations of active consumption of EPS by the insect larvae. Initially, *S. levis* larvae were submitted to intestinal dissection for isolation of the most abundant strains and genomic DNA sequencing in triplicates. The identification of bacterial strains was performed using single copy genes, taxonomic markers, obtaining genomes associated with *Microbacterium hominis*, *Bacillus spp.*, and *Stenotrophomonas maltophilia*. Phenotypic traits were predicted from the genome sequence with high accuracy, since traits such as morphology and oxygen sensitivity agreed with the biochemical characterization of the strains. Genes related to polystyrene degradation were identified only in the strain *Bacillus spp.* SLBac4, and with these data we proposed a metabolic pathway for EPS biodegradation. *The Bacillus spp.* SLBac4 has four enzymes involved in side-chain oxidation and direct disruption of the styrene aromatic ring, however, the initial depolymerization of EPS remains unknown. Within the four enzymes, styrene monooxygenase was characterized and compared for its specificity in the initial step of EPS degradation. In addition, currently, there are no studies on enzymes that directly degrade EPS. Our study provides the first evidence related to a possible metabolic mechanism of enzymatic biodegradation of bacteria from the gut of *S. levis* larvae, enabling the development of new future strategies for bioremediation of pollutants such as EPS.

Keywords: *Sphenophorus levis*, gut microbiome, Biodegradation, Expanded polystyrene, Styrene monooxygenase,

Lista de figuras

- Figura 1.** Fluxo de resíduos plásticos no ambiente, suas distribuições e destino. Adaptado de Chae *et al.* (2018). 14
- Figura 2.** Estrutura de um monômero do poliestireno expandido EPS. Adaptado de Mohanan *et al.* (2020). 15
- Figura 3.** Combinação de fatores abióticos e bióticos no processo de biodegradação de plásticos. Adaptado de Wei *et al.* (2017). 16
- Figura 4.** Via de degradação microbiana para a ruptura do esqueleto de carbono de plásticos sintéticos. Adaptado de Montazer *et al.* (2020) e Ru *et al.* (2020). 20
- Figura 5.** Espécies de insetos que podem consumir diferentes tipos de plástico sintético. Adaptado de Ali *et al.* (2021). 22
- Figura 6.** Habitat do inseto bicudo *Sphenophorus levis*. A) Ciclo biológico, e B) extração da larva na planta de cana-de-açúcar. Adaptado de Casteliani *et al.* (2020) e Degaspari *et al.* (1987a). 24
- Figura 7.** Etapas da dissecação intestinal de larvas de *Sphenophorus levis*. **A)** desinfecção externa da larva com etanol 70%, **B)** Incisão da cabeça da larva com auxílio de pinças e **C)** intestino da larva em solução PBS. 30
- Figura 8.** Extratos de DNA das cepas bacterianas isoladas do intestino de *S. levis* MM (Generuler 1kb -Thermo Scientific marcador). 32
- Figura 9.** Cepas abundantes nas placas de crescimento A) microrganismos isolados da microbiota intestinal de *S. levis*: B) SLBac3, C) SLBac4, D) SLBac8, e E) SLBac7. 37
- Figura 10.** Contagem dos isolados cultiváveis (UFC/mL) em relação ao número total das colônias nas placas dos diferentes meios de cultura TSA, LB, PDA. 39
- Figura 11.** Distribuição do comprimento dos contigs das montagens dos genomas das cepas isoladas por percentil (Nx). 41
- Figura 12.** Distribuição do conteúdo de (GC%) pelo número de contigs de cada montagem em relação às cepas bacterianas. A) SLBac3, B) SLBac4, C) SLBac7 e D) SLBac8. 43
- Figura 13.** Fenótipos das cepas bacteriana por meio do *software Traitar* 46
- Figura 14.** Previsão dos fenótipos por meio de traços genômicos das cepas bacteriana. 47

Figura 15. Possível via metabólica de degradação do poliestireno expandido pela cepa bacteriana *Bacillus* spp. SLBac4 baseado em evidências genômicas

50

Figura 16. Alinhamento de múltiplas sequências da enzima estireno monooxigenase de *Bacillus*. sp SLBc4 (03374) como referência frente às diversas bactéria: *Priestia megaterium* número de acesso (244856754.1), *Bacillus* sp. AFS076308 número de acesso (PFN82877.1), e outros filo *Pseudomonas* sp. número de acesso (O50214), *Pseudomonas fluorescens* número de acesso (O06834), *Sphingomonas* sp. número de acesso (A0A5E7ZI74), *Rhodococcus opacus* número de acesso (A0A076JVU4), *Streptomyces rubrolavendulae* número de acesso (A0A1D8G6D9), *Serratia grimesii* número de acesso (A0A7G2JQI8), *Fischerella* sp. número de acesso (A0A0S3TKC2).

56

Lista de tabelas

Tabela 1. Principais grupos bacterianos responsáveis pela biodegradação de plásticos. Adaptado de Matjašič et al. (2021).	17
Tabela 2. Composição das comunidades bacterianas do intestino de <i>S. levis</i> . Adaptado de Rinke et al. (2011b).	26
Tabela 3. Composição da dieta alimentar para larvas de <i>S. levis</i> .	29
Tabela 4. Genes referência utilizados para busca da via de degradação do EPS.	35
Tabela 5. Classificação morfológica das cepas com fenótipo mais recorrente.	38
Tabela 6. Estatísticas de montagem e anotação do genoma das cepas bacterianas.	40
Tabela 7. Confiança dos dados das cepas bacterianas descobertas mediante o programa <code>progenomes_classifier</code>	42

Lista de abreviaturas e siglas

EPS - Poliestireno expandido
PE- Polietileno
PP - Polipropileno
PVC - Cloreto de polivinila
PS - Poliestireno
PU - Poliuretano
PET - Tereftalato de polietileno
GPPS - Poliestireno de uso geral
OPS - Poliestireno orientado
HIPS - Poliestireno de alto impacto
LDPE - Polietileno de baixa densidade
16S rRNA - RNA ribossomal 16s
PBS – Tampão fosfato salino
TSA - Ágar de caseína tríptica de soja
PDA - Ágar Batata-Dextrose
LB - Ágar Luria Bertani
KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
NCBI - National Center for Biotechnology Information
LCFBM - Meio de cultura líquido sem carbono
CFBAM - Meio de ágar livre de carbono
NB - Nutrient broth
% GC - Porcentagem de guanina e citosina
rRNA - RNA ribossômico
tRNA - RNA transportador ou de transferência
mRNA - RNA mensageiro
FAD - Dinucleotídeo de flavina adenina
NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
Pb – pares de bases

SUMÁRIO

Resumo	3
Abstract	4
Lista de figuras	5
Lista de tabelas	7
Lista de abreviaturas e siglas	8
1 Introdução	10
1.1 Plásticos sintéticos	12
1.1.1 Esferovite, Isopor ou Poliestireno expandido (EPS)	13
1.2 Relevância da biodegradação por bactérias	14
1.3 Mecanismo de biodegradação	20
1.4 Interação inseto – microrganismos	22
1.5 <i>Sphenophorus levis</i> : o bicudo da cana	24
1.5.1 Microbiota intestinal de <i>S. levis</i>	26
1.6 Objetivos	28
1.6.1 Geral	28
1.6.2 Específicos	28
1.7 Justificativa	29
2 Materiais e Métodos	30
2.1 Origem das larvas de <i>S. levis</i>	30
2.2 Dissecção intestinal	30
2.3 Cultivos bacterianos	31
2.4 Extração de DNA genômico de isolados bacterianos do intestino de <i>S. levis</i>	32
2.5 Sequenciamento de DNA genômico de isolados bacterianos do intestino de <i>S. levis</i>	33
2.6 Montagem e anotação gênica	34
2.7 Análises de vias metabólicas	35
2.8 Caracterização <i>in silico</i> da enzima estireno monooxigenase	37
2.9 Alinhamento de Sequência e Identificação de Motivos Conservados Estireno Monooxigenase SLBac4	37
3 Resultados e Discussão	38
3.1 Isolamento e identificação das cepas	38
3.2 Sequenciamento e montagem do genoma das cepas bacterianas	40
3.3 Previsões de traços fenotípicos das cepas bacterianas	45
3.4 Via de biodegradação do EPS	48
3.5 Caracterização <i>in silico</i> da enzima estireno monooxigenase de <i>Bacillus sp.</i> SLBac4	53
3.5.1 Propriedades físico-químicas	53
3.5.2 Análise da conservação de sítios do estireno monooxigenase da cepa SLBac4	54
4 Conclusões	56
Referências	60
Anexos	86
Anexo 1	86

1 Introdução

Os plásticos sintéticos constituem aproximadamente 80% de materiais plásticos descartáveis no mundo, sendo constituídos geralmente por polietileno (PE), polipropileno, cloreto de polivinila (PVC), poliestireno (PS), poliuretano (PU) ou tereftalato de polietileno (PET), tornando-se fundamentais para quase todos os aspectos de nossas vidas (Wilkes *et al.*, 2017). Segundo a *Association of Plastics Manufacturers Plastics from Europe*, a produção global de plásticos sintéticos atingiu os 370 milhões de toneladas em 2019 (Plastic-Europe, 2019). Prevê-se que para 2050 sejam produzidos 26 bilhões de toneladas de resíduos de plásticos, e mais da metade será jogada fora em aterros sanitários ou entrará nas ecosferas, através de oceanos e lagos, levando a uma grave poluição ambiental (Ru *et al.*, 2020).

Por outro lado, o poliestireno expandido (EPS) - conhecido popularmente como isopor - é um plástico derivado do petróleo constituído por benzeno e estireno, usado como material de isolamento térmico, proteção de objetos, entre outras aplicações (López Nava *et al.*, 2016; ED Tsochatzis *et al.*, 2021). O EPS possui desvantagens no que tange seu descarte quando deixado a decompor-se no ambiente, por exemplo, pode bloquear o intestino de animais que se alimentam do plástico por acidente, bem como potenciais problemas socioeconômicos (S. Yang *et al.*, 2018). A alta persistência do EPS no meio ambiente deve-se em parte por sua morfologia particular que dificulta a degradação, além de unir-se a corpos mais pesados assentando-se por arraste nos corpos hídricos e solo (Yance *et al.*, 2017).

Os métodos atuais de eliminação de resíduos de EPS são principalmente aterramento, incineração e reciclagem mecânica ou química (Geyer *et al.*, 2017b). Conseqüentemente, é necessário gerar soluções alternativas que reduzam os efeitos ambientais dos poluentes secundários gerados nos processos descritos anteriormente. Assim, a biodegradação é uma das técnicas mais eficientes para o controle da poluição ambiental, mostrando grande potencial devido à importância dos microrganismos degradadores de materiais orgânicos e xenobióticos. Isto deve-se ao fato de que os processos de

autodepuração dos ecossistemas, tende a ser altamente eficiente (Caracciolo *et al.*, 2015).

Os insetos compõem um dos grupos mais diversos de organismos do planeta, presentes em diversos ambientes devido aos simbioses intestinais que desempenham um papel importante na adaptação a várias fontes de alimentos (Shi *et al.*, 2011). Pelo que vários estudos avaliaram a degradação do EPS por insetos como única fonte de alimento e completaram todas as fases de seu ciclo de vida fornecendo um biorecurso para a biodegradação de resíduos plásticos (Peng *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2020). Além disso, em nosso laboratório de biologia molecular da UFSCar se percebeu o consumo ativo do isopor pelo besouro *Sphenophorus levis* gerando um grande interesse. Portanto, é de grande relevância o estudo da microbiota intestinal de insetos com base no exposto, sendo uma opção de estudo viável o inseto *Sphenophorus levis* (Coleóptera, Curculionidae), uma praga da cana-de-açúcar que, em estado larval, apresenta uma crescente importância econômica e agrícola no Brasil (Evangelista *et al.*, 2015). Desse modo, num estudo de Rinke *et al.* (2011b) foi descrita a diversidade da microbiota intestinal das larvas de *S. levis* em campo e laboratório, mediante análises das sequências do gene ribossomal16S (rRNA), mostrando que essa microbiota é predominantemente constituída por microrganismos celulolíticos e, por conseguinte, podem ter também a capacidade para degradar outros compostos complexos como por exemplo, o isopor.

Assim, com o exposto acima, neste trabalho propusemos o isolamento de cepas bacterianas cultiváveis da microbiota intestinal de *S. levis*, uma vez que vários estudos demonstraram que a degradação de EPS no intestino de insetos se dá pelos microorganismos. Dentro dos isolados se escolheram 4 cepas mais abundantes nas placas de crescimento e procedemos com o sequenciamento de seus genomas para a prospecção dos genes responsáveis pela degradação do isopor.

1.1 Plásticos sintéticos

Os plásticos sintéticos são formados por moléculas hidrofóbicas de cadeia longa que, por sua vez, se constituem de unidades moleculares menores repetidas. Assim, os plásticos sintéticos são compostos por ligações carbono-carbono e podem ser caracterizados por sua leveza, resistência, flexibilidade, durabilidade, baixo custo e fácil produção (Alex Sivan, 2011). Além disso, nas últimas décadas, os materiais plásticos são amplamente empregados nos setores de embalagens, transporte, alimentação, têxtil, agrícola, construção civil e indústrias médicas (Hammer *et al.*, 2012; Vatseldutt, 2004)

Por conseguinte, o aumento na demanda global de plásticos acarretou um crescente acúmulo desses materiais, gerando poluição ambiental, por consequência das técnicas convencionalmente aplicadas para seu descarte (aterro e queima), **Fig.1** (Jaiswal *et al.*, 2020). Estima-se que entre 9 e 12% dos resíduos plásticos globais sejam reciclados ou incinerados, enquanto até 70% sejam descartados em aterros ou ambiente natural, o que cria uma necessidade de explorar-se métodos inovadores e menos poluentes (Chia *et al.*, 2020; Geyer *et al.*, 2017a). Além disso, na maioria dos países, especialmente naqueles em desenvolvimento, as deposições em aterro representam o principal método de disposição de resíduos plásticos devido ao seu baixo custo, o que ocupa uma quantidade relativamente grande de terras. Por outro lado, a incineração pode reduzir a demanda de aterros e recuperar energia térmica, mas potencializa os efeitos ambientais ao gerar poluentes secundários como monóxido de carbono, dioxinas e óxidos de nitrogênio (Rahimi *et al.*, 2017).

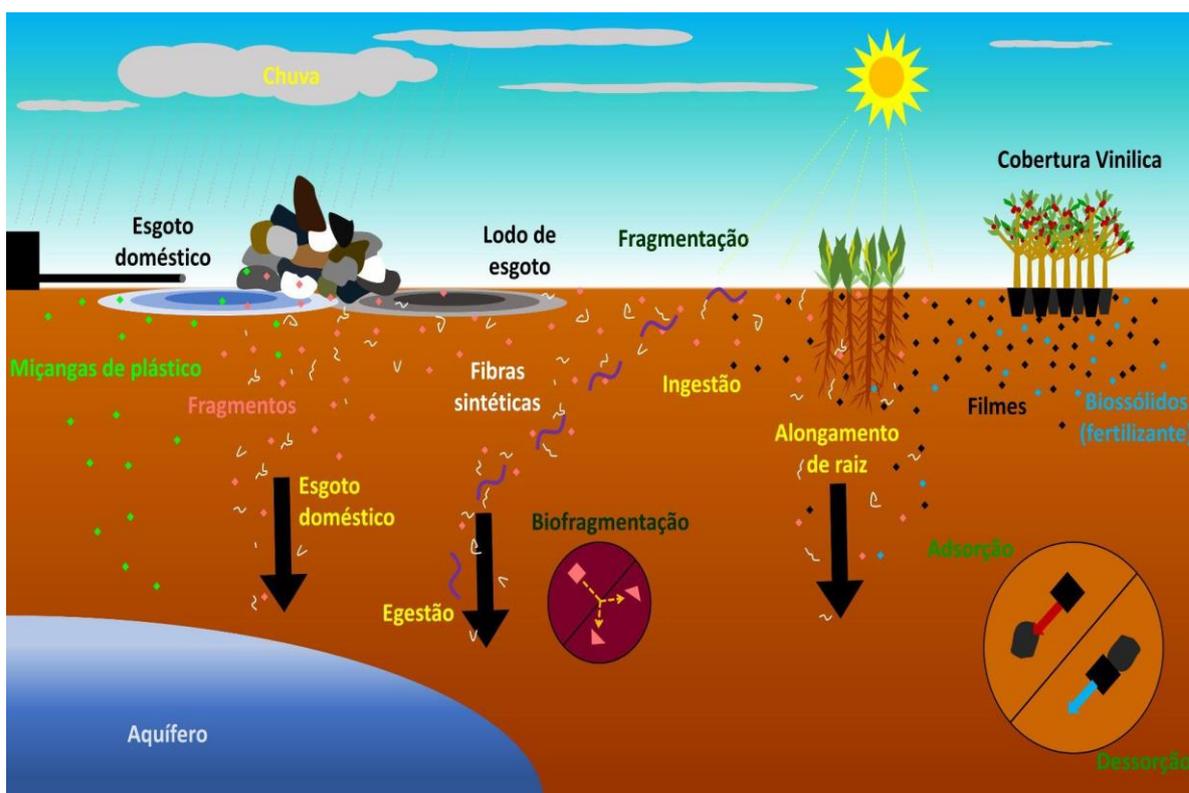


Figura 1. Fluxo de resíduos plásticos no ambiente, suas distribuições e destino. Adaptado de Chae *et al.* (2018).

Nesse contexto, a degradação de plásticos por microrganismos representa um método promissor, que visa uma alta eficiência da conversão de certos plásticos em produtos mais simples em condições amenas por vias aeróbicas e/ou anaeróbicas. Por exemplo, microrganismos que utilizam o plástico como fonte de carbono estrutural e energia, geralmente conseguem despolimeriza-lo, o que permitiria que seus monômeros sejam facilmente degradados no ambiente (Ahmed *et al.*, 2018; Raziya *et al.*, 2016).

1.1.1 Esferovite, Isopor ou Poliestireno expandido (EPS)

O poliestireno (PS) é um termoplástico sintético, que foi reportado pela primeira vez como resíduos na zona eufótica do oceano, ainda na década de 1970, sendo detectado no ambiente até os dias de hoje (Song *et al.*, 2020). Com base em suas diferentes aplicações, o PS foi agrupado como poliestireno de uso geral, poliestireno orientado, poliestireno de alto impacto, espuma de PS e EPS (Ho *et al.*, 2018). Dos tipos de poliestireno, o EPS é a classe de materiais que

apresenta maior crescimento devido às suas diversas aplicações, dentre elas na indústria da construção civil, por ser uma espuma leve, porém rígida e com alta resistência ao impacto (Tafreshi *et al.*, 2020).

O EPS é um polímero de espuma solidificada composto de cadeias de monômeros de estireno, composto por ar (98%) e matéria prima originada do petróleo - 2% (Maharana *et al.*, 2007; Ramli Sulong *et al.*, 2019). Atualmente, o poliestireno contribui com cerca de 6,4% do total de plásticos produzidos (Wang *et al.*, 2021), sendo também altamente recalcitrante, devido à alta massa molecular e estrutura complexa - **Fig. 2**. A recalcitrância dos produtos derivados do EPS leva à problemas ambientais, pois seus resíduos podem permanecer no solo, na água e em aterros por muito tempo (Zhang *et al.*, 2020).

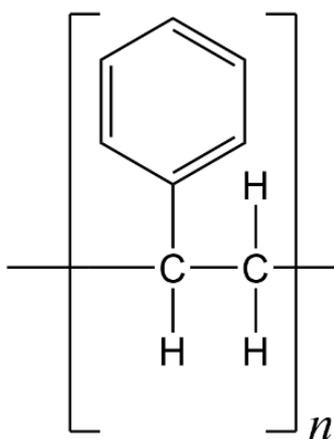


Figura 2. Estrutura de um monômero do poliestireno expandido EPS. Adaptado de Mohanan *et al.* (2020).

1.2 Relevância da biodegradação por bactérias

A degradação de plásticos é uma transformação do polímero original em subunidades menores por meio da quebra de ligações através de processos físicos, químicos ou biológicos, acarretando alterações nas propriedades físico-químicas do plástico. Além disso, a degradação de plásticos é considerada um processo complexo que depende de vários fatores, como disponibilidade de um substrato, características da superfície, morfologia e peso molecular dos polímeros (Harrison *et al.*, 2018). Processos abióticos de degradação incluem: métodos térmicos, degradação baseada em ozônio, foto-oxidação, catálise e

métodos mecanoquímicos, alternativamente a biodegradação ocorre quando a degradação de uma molécula se dá por agentes biológicos (Rodrigues *et al.*, 2010) e se apresenta como uma abordagem econômica e ecológica, **Fig. 3** (Chamas *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2008).

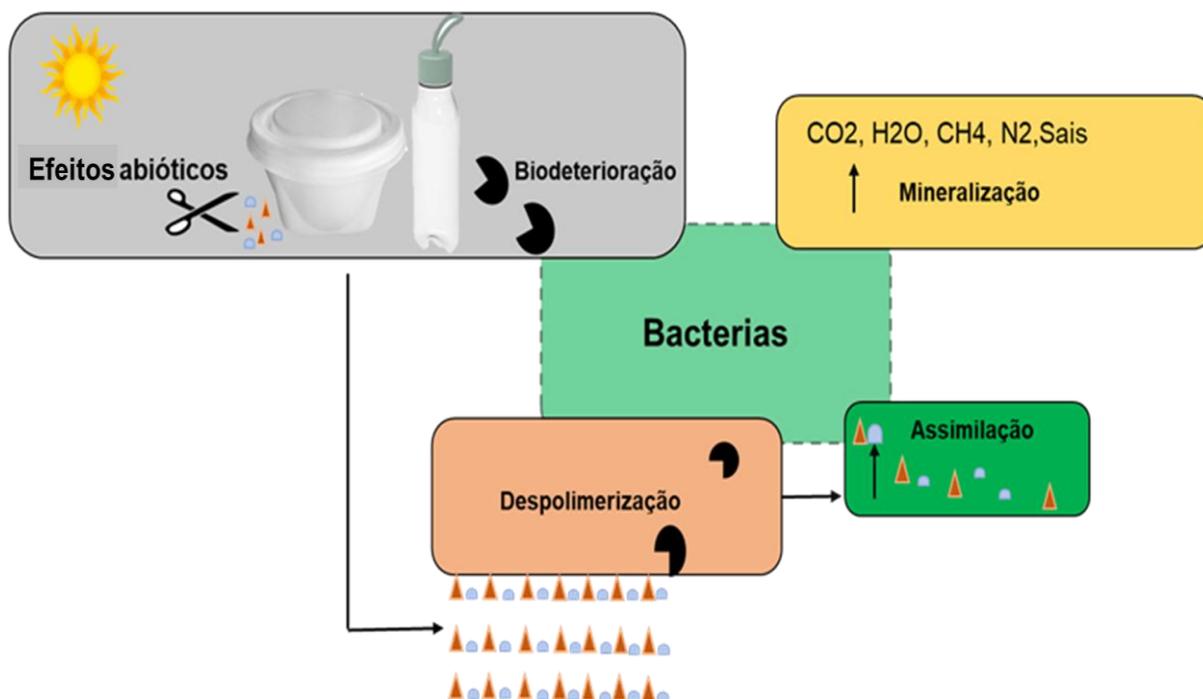


Figura 3. Combinação de fatores abióticos e bióticos no processo de biodegradação de plásticos. Adaptado de Wei *et al.* (2017).

Apesar dos plásticos serem produtos quimicamente sintetizados, já foram identificados mais de 90 microrganismos capazes de metabolizá-los, principalmente em condições *in vitro* (Matjašič *et al.*, 2021). Estes microrganismos conseguem biodegradar plásticos mediante dois tipos de enzimas, as intra- e extracelulares (Bano *et al.*, 2017). Nesse último caso, as bactérias secretam enzimas, por exemplo, as despolimerases extracelulares. Estas convertem o plástico em monômeros, dímeros e oligômeros que podem permear a membrana celular bacteriana e então serem utilizados como fonte de carbono e energia. Dessa forma, a biodegradação envolve a utilização de microrganismos que produzem enzimas para reduzir os plásticos a fontes de alimento para estas espécies (Cunha *et al.*, 2018; Díez-Méndez *et al.*, 2019).

Vários tipos de plásticos sintéticos têm sido objeto de estudos de biodegradação através de microrganismos isolados, **Tabela 1**. Estudos prévios relatam a biodegradação de plásticos, tais como o polietileno, por agentes bacterianos pertencentes a mais de 20 gêneros bacterianos avaliados (Sunil *et al.*, 2020). Em termos bioquímicos, a literatura disponível sobre os processos de biodegradação ainda é incipiente. Polímeros como o polietileno de baixa densidade e o polipropileno foram estudados quanto à sua degradação por consórcios bacterianos formulados a partir de esterco de vaca, resultando em uma redução na massa molecular do plástico de $64,25 \pm 2\%$ e $63,00 \pm 2\%$, respectivamente, com 60 dias de exposição ao consórcio (Skariyachan *et al.*, 2021). Poucas espécies microbianas como *Kluyveromyces* sp., *Bacillus* spp., *Rhodotorula aurantiaca* e *Aureobasidium pullulans*, se mostraram capazes de degradar e colonizar o policloreto de vinila (PVC). Por sua vez, outras espécies têm mostrado alta capacidade de biorremediação de PVC como *Pseudomonas fluorescens* FS1, *Mycobacterium* sp. e a *Coryneform* (Khandare *et al.*, 2021). Por fim, o tereftalato de polietileno (PET) e poliuretano são alvos de hidrolases microbianas, enquanto a despolimerização de polímeros não-hidrolisáveis requer enzimas com alto potencial redox para clivar oxidativamente as ligações carbono-carbono (Peng *et al.*, 2020).

Tabela 1. Principais grupos bacterianos responsáveis pela biodegradação de plásticos.

Adaptado de Matjašič et al. (2021).

Polímero	Filo	Bactérias identificadas capazes da biodegradação de plástico	Referencia
Polietileno de baixa densidade	Proteobacteria	<i>Acinetobacter pittii</i> , <i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Citrobacter</i> <i>Amalonaticus</i> , <i>Delftia tsuruhatensis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Ochrobactrum intermedium</i> , <i>O. oryzae</i> , <i>O. pseudintermedium</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. aeruginosa</i> SKN1 (ID: 9702593), <i>P. citronellolis</i> EMB S027 KF361478, <i>P. putida</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Stenotrophomonas humi</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>S. pavanii</i> CC18, <i>P. stutzeri</i>	(Anwar et al., 2013; Kyaw et al., 2012; Skariyachan et al., 2017) (Anbuselvi et al., 2015; Kyaw et al., 2012)
Polietileno de baixa densidade	Proteobacteria	<i>Enterobacter asburiae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> AKS7, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Stenotrophomonas</i> spp.	(Jeon et al., 2016; Skariyachan et al., 2016)
Polietileno	Actinobactérias	Cepa <i>Rhodococcus ruber</i> C208	(Santo et al., 2013)
Polietileno	Actinobactérias	<i>Arthrobacter</i> spp., Consórcio de: <i>Arthrobacter</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Gordonia</i> e <i>Rhodococcus</i>	(Jin et al., 2017; Puglisi et al., 2019)
Polietileno	Firmicutes	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	(Mukherjee et al., 2017)

Poliétileno	Firmicutes	<i>Bacillus</i> spp., <i>B. gottheilii</i> , <i>B. cereu</i> <i>s</i> , <i>Staphylococcus</i> sp <i>Streptococcus</i> sp.	(Kathiresan, 2003)
Poliétileno	Fusobacteria	<i>Sebaldella termitidis</i>	(Brandon et al., 2018)
Poliestireno	Deinococcus Thermus	<i>Thermus</i> sp.	(Naima et al., 2010)
Poliestireno	Bacteroidetes	<i>Saprospiraceae</i> não classificada	(Brandon et al., 2018)
Poliestireno	Firmicutes, Proteobac teria & Tenericutes	<i>Spiroplasmataceae</i> , <i>Enterococcaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	(Peng et al., 2019)
Poliestireno	Firmicutes	<i>AneuriniBacillus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>B</i> <i>reviBacillus</i> spp., <i>Desulfotomaculum</i> s p., <i>GeoBacillus</i> spp., <i>Proteiniclasticu</i> <i>m</i> sp.	(Mohan et al., 2016; Yang et al., 2015)
Poliestireno	Nitrospirae	<i>Nitrospira defluvii</i>	(Sekhar et al., 2016)
Poliestireno	Proteobacteria	<i>Alcaligenes</i> sp., <i>Citro</i> <i>bactersedlakii</i> , <i>Enter</i> <i>obacter</i> sp., <i>Pseudo</i> <i>monas</i> spp.	(Mohan et al., 2016; Sekhar et al., 2016)
Poliuretano	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	(Stepien et al., 2017)
Poliuretano	Firmicutes	<i>Bacillus</i> spp. AF8	(Shah et al., 2008)
Polipropileno	Actinobactérias	<i>Rhodococcus</i> sp. ce pa 37	(H. S. Auta et al., 2018)
Polipropileno	Firmicutes	<i>Bacillus</i> <i>flexus</i> AB021185, <i>B. flexus</i> FJ948078, <i>B. subtilis</i> GQ241354	(Arkatkar et al., 2009; Arkatkar et al., 2010)
Polipropileno	Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> <i>chlororaphis</i> , <i>P. stutz</i> <i>eri</i> , <i>Vibrio</i> sp.	(Sharma et al., 2004)
Poliétileno tereftalato	Firmicutes	<i>Bacillus</i> <i>gottheilii</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. muralis</i>	(H. Auta et al., 2017; Narciso-Ortiz et al., 2020)
Poliétileno tereftalato	Proteobacteria	<i>Ideonella</i> <i>sakaiensis</i> 201-F6	(Yoshida et al., 2016)
PVC	Actinobactérias	<i>Micrococcus</i> sp. PV C-4	(Patil et al., 2016a)

PVC	Actinobactérias e Firmicutes	Cepa recombinante N-2 (<i>Micrococcus</i> sp. PVC-4 e <i>Bacillus</i> spp. PVA-7)	(Patil et al., 2016a)
PVC	Firmicutes	<i>Bacillus</i> spp.	(Patil et al., 2016b)
PVC	Firmicutes	<i>Bacillus flexus</i>	(Giacomucci et al., 2019)

No caso do PS, há descrição de elevada ação enzimática associada à β -galactosidase, fosfatase ácida, β -glucuronidase, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, leucina arilamidase e fosfatase alcalina na biodegradação por comunidades bacterianas de larvas de *Tenebrio molitor* (Przemieniecki et al., 2020). Por sua vez, pesquisas têm associado a biodegradação de EPS a microrganismos entéricos, uma vez que podem liberar enzimas oxidativas extracelulares que auxiliam a despolimerização de EPS. Entretanto, o exato mecanismo de biodegradação ainda não é conhecido com exatidão (S.-S. Yang et al., 2018). Ainda com relação ao EPS, relatos relacionados a larvas de *Tenebrio molitor* testadas em ensaios de biodegradação ao longo de 60 dias revelaram despolimerização e oxidação do polímero através da comunidade microbiana intestinal do inseto (Peng et al., 2020). Dentre os microrganismos degradadores de EPS encontram-se as bactérias *Exiguobacterium* sp. YT2 e *Rhodococcus ruber*. Estudos prévios sugerem que haja um papel ativo das bactérias degradadoras com base na maior inibição da degradação de EPS pela gentamicina, que inibiu o crescimento de *Exiguobacterium* sp. YT2, reduzindo a taxa de degradação do polímero por larvas de *Tenebrio molitor* (Bae et al., 2021).

1.3 Mecanismo de biodegradação

A degradação dos plásticos começa com a transformação do polímero original em subunidades menores por meio da quebra de ligações através de processos químicos, físicos e biológicos, envolvendo diversos fatores que incluem características como a mobilidade, peso molecular, tipos de grupos funcionais, caráter cristalino, e aditivos presentes nos polímeros (Bahl *et al.*, 2021). Dentro dos processos de degradação se incluem: degradação fotooxidativa, térmica, catalítica, induzida por ozônio e biodegradação, mais estes processos terminam gerando um impacto negativo no meio ambiente em comparação da biodegradação que apresenta uma abordagem mais econômica e uma técnica mais amigável com o meio ambiente devido a que utiliza agentes biológicos. Neste processo de degradação, os microrganismos se aderem à superfície do material, levando à redução do peso molecular, dessa forma, convertem o polímero em seus monômeros e posteriormente os mineralizam (Iram *et al.*, 2019). Uma forma de biodegradação microbiana é a interação enzimática sobre os plásticos, por meio da qual ocorre a hidrólise seguida pelo ataque de enzimas aos constituintes de menor massa molecular liberados, como mono-/oligômeros livres (Mohanani *et al.*, 2020). Algumas das principais enzimas secretadas são principalmente lipases, proteinases do tipo K e desidrogenases (Pathak, 2017). Os principais mecanismos de biodegradação do esqueleto de carbono (-C-C-) dos plásticos estão mostrados na **Fig. 4**.

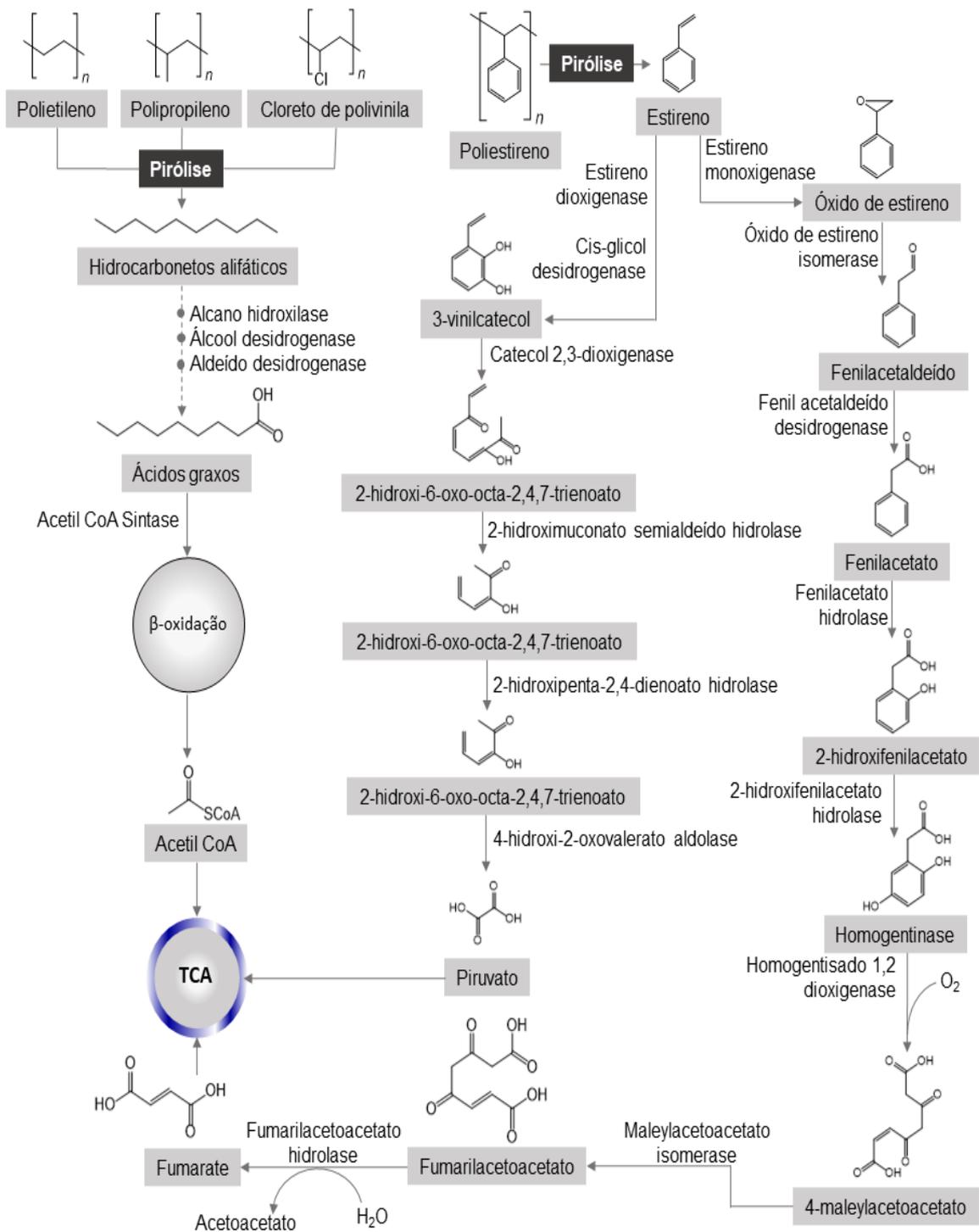


Figura 4. Via de degradação microbiana para a ruptura do esqueleto de carbono de plásticos sintéticos. Adaptado de Montazer et al. (2020) e Ru et al. (2020).

1.4 Interação inseto – microrganismos

A evolução das características ecológicas e/ou hábitos alimentares dos insetos ocorrem em conjunto aos seus microrganismos (Almeida *et al.*, 2017). Assim, uma notável diversidade de microrganismos coexiste por longos prazos, adaptando-se especificamente ao nicho de insetos hospedeiros, tendo participação essencial para os mesmos, o que constitui relações de simbiose (Xie *et al.*, 2019). O consórcio de bactérias degradadoras de polissacarídeos identificado a partir do intestino de um inseto é o responsável pela degradação de compostos vegetais indigeríveis pelo hospedeiro, como celulose, xilano e pectina (Adams *et al.*, 2011; B. Chen *et al.*, 2018). Os microrganismos simbiotes de insetos pragas incluem bactérias, arqueias, fungos e outros eucariotos unicelulares, que ajudam a proteger os insetos hospedeiros contra patógenos e outros parasitas. Estes microrganismos possuem enzimas específicas, toxinas seletivas, ou ocasionam ainda a modificação do sistema imunológico do inseto, e podem ainda ser transmitidos verticalmente (Douglas, 2015; Nasir *et al.*, 2003). Estima-se que até 20% de todos os insetos são obrigatoriamente associados a microrganismos simbióticos, e é provável que essa simbiose seja essencial para seu sucesso evolutivo (Feldhaar *et al.*, 2009). Como exemplo de sucesso, encontra-se a capacidade de resposta alimentar - uma excelente atividade de degradação de xenobióticos, geralmente atribuída aos simbiotes microbianos intestinais (Engel *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). Consequentemente, há um crescente interesse para implementação de microrganismos simbiotes isolados de insetos como ferramentas para a descontaminação e biorremediação, baseados na capacidade do hospedeiro de se alimentar de polímeros sintéticos,

Fig. 5.

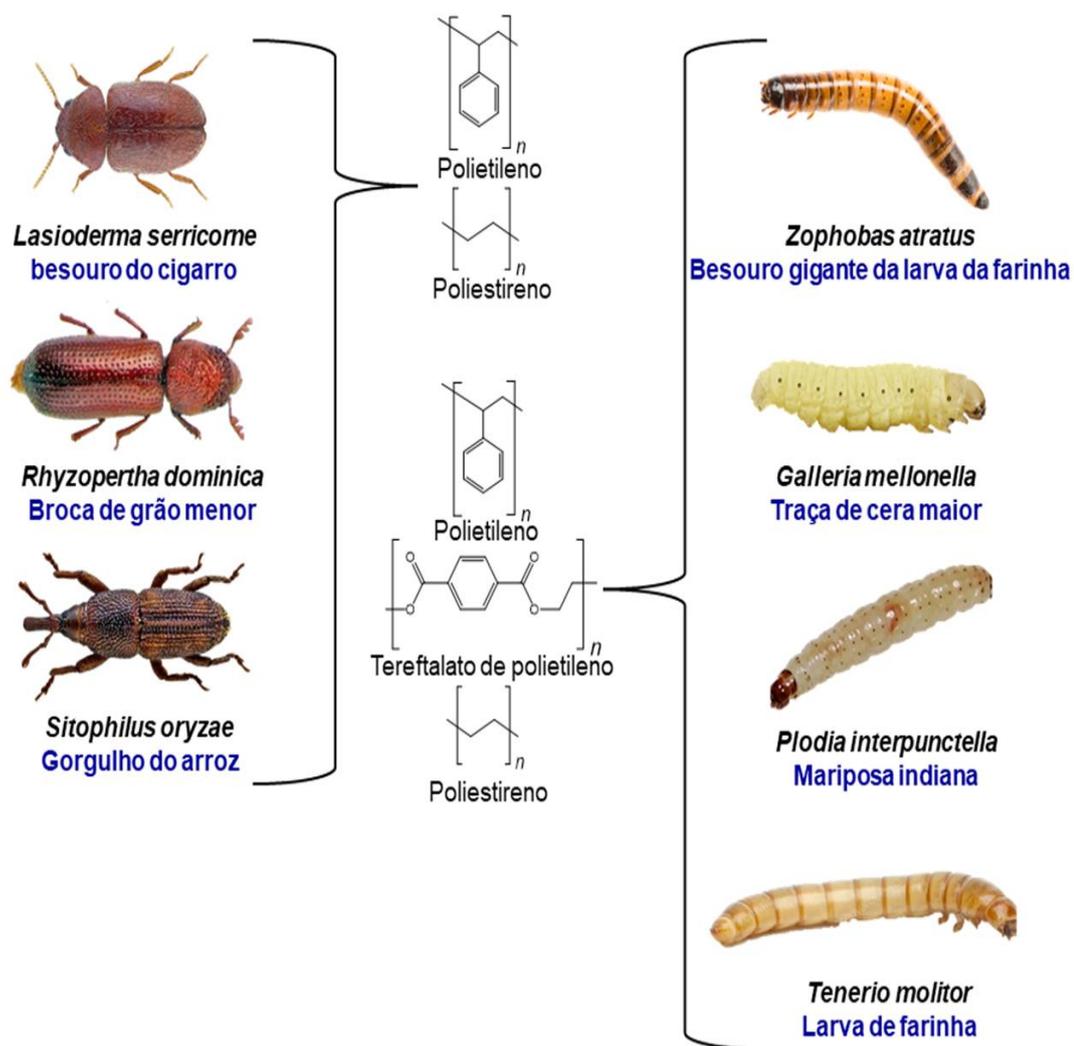


Figura 5. Espécies de insetos que podem consumir diferentes tipos de plástico sintético. Adaptado de Ali et al. (2021).

Os microrganismos simbiotes dos insetos pragas podem ser divididos em quatro categorias, baseadas na localização em que se encontram no corpo do inseto (Rosenblueth *et al.*, 2018), sendo elas:

1. endossimbiontes primários ou essenciais,
2. endossimbiontes facultativos ou secundários,
3. simbiotes intestinais em criptase, e
4. Simbiotes intestinais.

Os endossimbiontes primários têm a capacidade de sintetizar os nutrientes necessários que faltam aos seus hospedeiros, se localizam em células especializadas chamadas bacteriôcitos e têm uma relação mutualística

obrigatória com o seu hospedeiro (Hu *et al.*, 2020). Os endossimbiontes facultativos são conhecidos por aumentar a tolerância de seus hospedeiros ao estresse ambiental, como choques de calor, ou protegê-los contra inimigos naturais, como fungos patogênicos ou vespas parasitas, embora esses simbiontes não sejam essenciais para a sobrevivência do hospedeiro. Muitas vezes, os endossimbiontes facultativos ajudam a entender a ecologia dos insetos, bem como suas áreas de distribuição e interações com outros membros da comunidade (Zytyńska *et al.*, 2019). Os simbiontes intestinais em criptas tem sido descrito em alguns insetos da superfamília Pentatomorpha e são transmitidos verticalmente ou adquiridos do meio ambiente pelos alimentos (Kikuchi *et al.*, 2008). De modo geral, os microrganismos simbiontes intestinais são os responsáveis diretos na degradação de compostos químicos complexos como polímeros sintéticos e/ou biológicos e toxinas, podendo ser transferidos verticalmente da mãe para a prole por contaminação fecal, coprofagia e trofalaxia que leva à inoculação da bactéria intestinal na progênie (Rahman *et al.*, 2015; Salem *et al.*, 2015).

As categorias de simbiontes diferem no fato de terem plasticidade genômica, permitindo que as diferentes espécies possam adquirir novas habilidades à medida do processo de coevolução com os hospedeiros. Em particular, os genomas de simbiontes transmitidos verticalmente normalmente sofrem extensa perda de genes ao longo de sua evolução ao invés de incorporarem novos genes, o que reduz as capacidades metabólicas e gera uma maior dependência desses simbiontes para com o hospedeiro (Hansen *et al.*, 2014).

1.5 *Sphenophorus levis*: o bicudo da cana

A ocorrência de *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), conhecido como gorgulho ou bicudo, está restrita a América do Sul, encontrando-se principalmente no norte da Argentina, Paraguai e Brasil e se desenvolve principalmente na cana-de-açúcar. Este besouro foi descrito como uma praga em 1977 e classificada como uma nova espécie em 1978 (Casteliani *et al.*, 2020; Zarkin *et al.*, 2003). No Brasil, o inseto é considerado uma praga primária da

cana-de-açúcar, devido aos danos causados por sua larva ao destruir a parte subterrânea da base da planta e os caules, **Fig. 6B** (Barreto-Triana *et al.*, 2014). As larvas abrem túneis no rizoma da planta, resultando na morte de até 60% dos perfilhos, perdas na produção de até o 30% e redução da longevidade das plantas (Silva *et al.*, 2021).

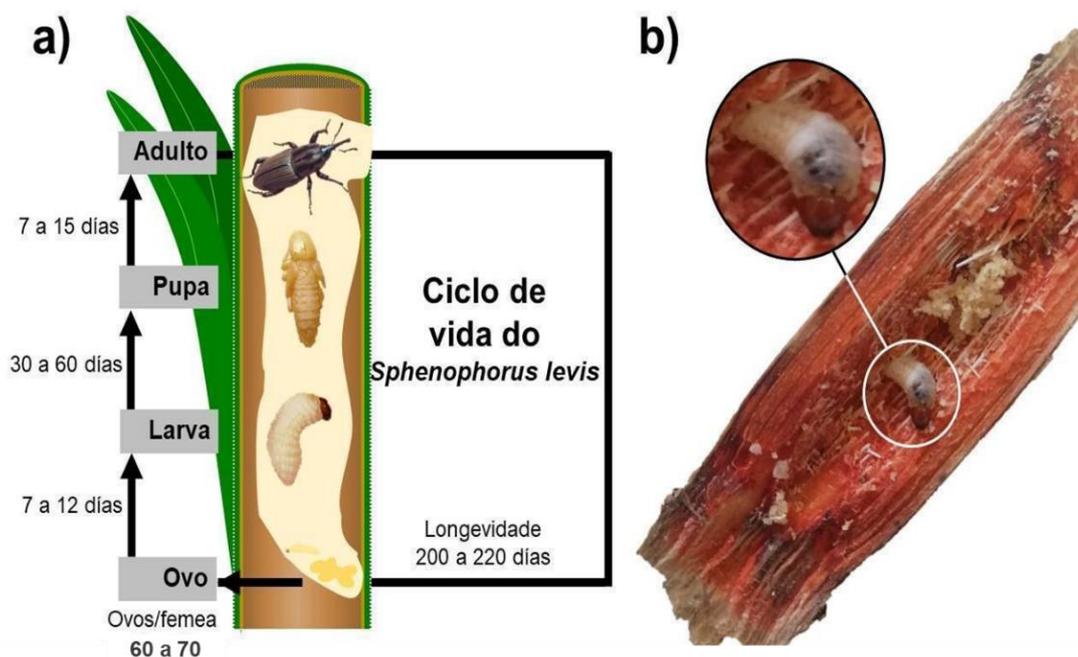


Figura 6. Habitat do inseto bicudo *Sphenophorus levis*. A) Ciclo biológico, e B) extração da larva na planta de cana-de-açúcar. Adaptado de Casteliani *et al.* (2020) e Degaspari *et al.* (1987a).

O ciclo biológico segundo Degaspari *et al.* (1987a) em condições de laboratório de 27 a 30°C e fotoperíodo de 12 h, varia entre 58 e 307 dias, com média de 173,2 dias; no caso das fêmeas pode durar até 249 dias e os machos até 247 dias. Recém-eclodidas, as larvas de *S. levis* têm coloração branco-leitosa, e conforme se desenvolvem mudam até o amarelo, apresentando cabeça castanho-avermelhada com mandíbulas bem desenvolvidas, altamente sensíveis ao calor e à desidratação. Quando próxima à fase de pupa, a larva amplia a galeria de localização, pausando os movimentos e alimentação. Consecutivamente, a larva diminui seu tamanho, transformando-se em pupa. O período pupal tem uma duração média de 5 a 13 dias, com viabilidade de 93,5%,

as pupas de cor branca-leitosa à medida em que se transformam em adultos adquirem a coloração castanha, **Fig. 6a** (Degaspari *et al.*, 1987a; Wadt, 2016).

1.5.1 Microbiota intestinal de *S. levis*

O trato gastrointestinal de insetos pragas como *S. levis* representa uma fonte rica para prospecção biotecnológica de novas linhagens de microrganismos com potencial para degradação de diversos polímeros biológicos e sintéticos. Conseqüentemente, o sequenciamento do gene 16S rRNA tem sido relatado como uma ferramenta indispensável no estudo de comunidades de intestino de insetos (Engel *et al.*, 2013). Sequências do gene do RNA 16S ribossomal (16S rRNA), da subunidade menor do ribossomo bacteriano, são universalmente distribuídas e servem de marcadores taxonômicos, pois contém regiões altamente conservadas em todo o domínio Bactéria e simultaneamente, regiões variáveis que podem ser específicas para um determinado táxon (Salmonová *et al.*, 2017). Embora as tecnologias estejam disponíveis razoavelmente há um longo período, poucos estudos se ocuparam do sequenciamento de genes de 16S rRNA relacionado à identificação de microrganismos intestinais de *S. levis* com interesses biotecnológicos, **Tabela 2.**

Rinke *et al.* (2011b; Milano, 2012) isolaram e identificaram por sequenciamento do gene 16S rRNA bactérias do trato digestivo de *S. levis* com atividade enzimática relacionadas aos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter* e *Serratia*, assim como isolados relacionados à *B. amyloliquefaciens*, envolvidos na degradação de celulose. o que permitiu ter conhecimento prévio sobre a diversidade bacteriana da microbiota intestinal de *S. levis*. Aqueles autores ainda avaliaram a capacidade de degradação de celulose desses microrganismos contribuindo com estudos voltados à degradação da biomassa e resíduos de origem lignocelulolíticos. Assim, estudos sobre as bactérias intestinais deste inseto que são capazes de degradar estruturas complexas podem ser importantes para explorar o potencial de estes microrganismos frente a possíveis poluentes orgânicos.

Tabela 2. Composição das comunidades bacterianas do intestino de *S. levis* criado em laboratório com dieta artificial e outros coletados diretamente do campo. Adaptado de Rinke et al. (2011b).

Filiação filogenética	Identidade	Isolamento
Gama-proteobacteria	<i>Candidatus Nardonella</i>	Laboratório/Campo
Enterobacteriaceae	<i>Buchnera sp</i>	Campo
	<i>Klebsiella sp</i>	Laboratório/Campo
	<i>Citrobacter sp</i>	Laboratório
	<i>Raoultella sp</i>	Campo
	<i>Enterobacter sp</i>	Campo
	<i>Uncultured Enterobacteriaceae</i>	Laboratório
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Laboratório
	<i>Acinetobacter sp</i>	Laboratório/Campo
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter sp</i>	Laboratório/Campo
Burkholderiaceae	<i>Burkholderia sp</i>	Laboratório
Comamonadaceae	<i>Diaphorobacter sp</i>	Laboratório
Methylophilaceae	<i>Methylophilus sp</i>	Laboratório
Caulobacteraceae	<i>Caulobacter sp</i>	Laboratório
Streptococcaceae	<i>Streptococcus sp</i>	Laboratório
	<i>Lactococcus sp</i>	Campo
Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc sp</i>	Campo
Flavobacteriaceae	<i>Uncultured Flavobacteriaceae</i>	Laboratório
Sphingobacteriaceae	<i>Sphingobacterium sp</i>	Campo
Bacillaceae	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Laboratório

1.6 Objetivos

1.6.1 Geral

Considerando a simbiose entre inseto e microrganismos, evidências do consumo de PS por larvas de *S. levis* e os problemas ambientais causados pelo uso de plásticos derivados do petróleo, o presente trabalho objetiva avaliar o potencial genômico de microrganismos simbiotes isolados de larvas do inseto praga *Sphenophorus levis* para biodegradação de EPS.

1.6.2 Específicos

- Isolar microrganismos simbiotes do intestino da larva *S. levis*;
- Identificar os microrganismos mais abundantes nas placas e preservar as cepas puras;
- Sequenciar, montar e anotar os genomas das cepas bacterianas isoladas;
- Avaliar o potencial fenotípico dos isolados por meio de *machine learning*;
- Identificar genes relacionados à biodegradação de polímeros derivados de petróleo, em especial o EPS;
- Montar uma via putativa de biodegradação de EPS e seus derivados.
- Caracterizar *in silico* e identificar os motivos conservados do gene estireno monooxigenase de *Bacillus sp.* SLBac4

1.7 Justificativa

O crescente acúmulo e persistência de resíduos de poliestireno expandido ou isopor nos ecossistemas terrestres e aquáticos tornou-se um grave problema ambiental e social. Dessa forma, surgiu a necessidade de desenvolver abordagens para a eliminação de EPS de uma maneira eficaz e limpa, e assim, mitigar os efeitos causados no meio ambiente e na saúde.

Recentemente, simbiontes microbianos intestinais associados a larvas de *T. molitor* foram mostrados como essenciais para a biodegradação de isopor por esse inseto. Há uma crescente aplicação da biodegradação como uma estratégia promissora, para o tratamento de resíduos de plásticos sintéticos por microrganismos e sua despolimerização enzimática dos plásticos em formas mais simples, tais como monômeros.

Estudos mostram que há uma variedade de microrganismos lignocelulolíticos associados às larvas de *S. levis*. Devido à grande capacidade degradadora dessa microbiota, há uma relevância em avaliar-se o potencial de biodegradação de isopor por bactérias isoladas da microbiota intestinal de larvas *S. levis*, haja visto que além de ser um inseto praga com a capacidade de se alimentar de materiais complexos, suas larvas em laboratório se alimentam ativamente de EPS, o que chamou a atenção de nosso grupo de pesquisa.

2 Materiais e Métodos

2.1 Origem das larvas de *S. levis*

As larvas de *Sphenophorus levis* foram fornecidas através de insumos biológicos Pragas.com (Rua princesa Isabel, 575, Piracicaba- SP). Posteriormente foram conservadas e mantidas até os ensaios de dissecação intestinal com variação de temperatura de 27 a 30°C, com 12h de luz e a dieta alimentar utilizada foi modificada de Degaspari *et al.* (1987b) e é mostrada na **Tabela 3**.

Tabela 3. Composição da dieta alimentar para larvas de *S. levis*.

Ingrediente	Massa* (g)	Proporção** (%)
Caseína	122	25.50
Sais de wesson	35	7.31
Açúcar	76	15.88
Germe de trigo	108	22.57
Bagaço de cana de açúcar	30	6.27
Acetato ascórbico	15	3.13
Wintomylon	2.5	0.52
Caragenato	90	18.81
Solução KOH	35	7.31
Solução B	53	11.08

* A massa total foi diluída em 1100 mL de H₂O, e misturada com 35 mL de KOH 1M e 53 mL de uma solução (70g nipagin e 70 g ácido sórbico em 800 mL de álcool)

** Relação do ingrediente na composição

2.2 Dissecação intestinal

Três larvas foram utilizadas para dissecação do intestino, mantendo em gelo por 10 min e posteriormente as larvas foram submersas em etanol 70% (v/v) por 3 min para desinfecção externa e em seguida imersas em solução de tampão fosfato salino (PBS) 1x como se apresenta na **Fig. 7**.

As cabeças das larvas cortadas foram colocadas à disposição numa placa de Petri contendo PBS 1x e o conteúdo interno (intestino e corpo gorduroso) sendo separados da carcaça com auxílio de pinças e agulhas. Os intestinos totais de cada larva foram removidos e armazenados individualmente em tubo

de 1,5 ml contendo 600 µl de tampão Tris-EDTA 1x e levado ao vórtex por 5 min para auxiliar a remoção da microbiota da parede intestinal.

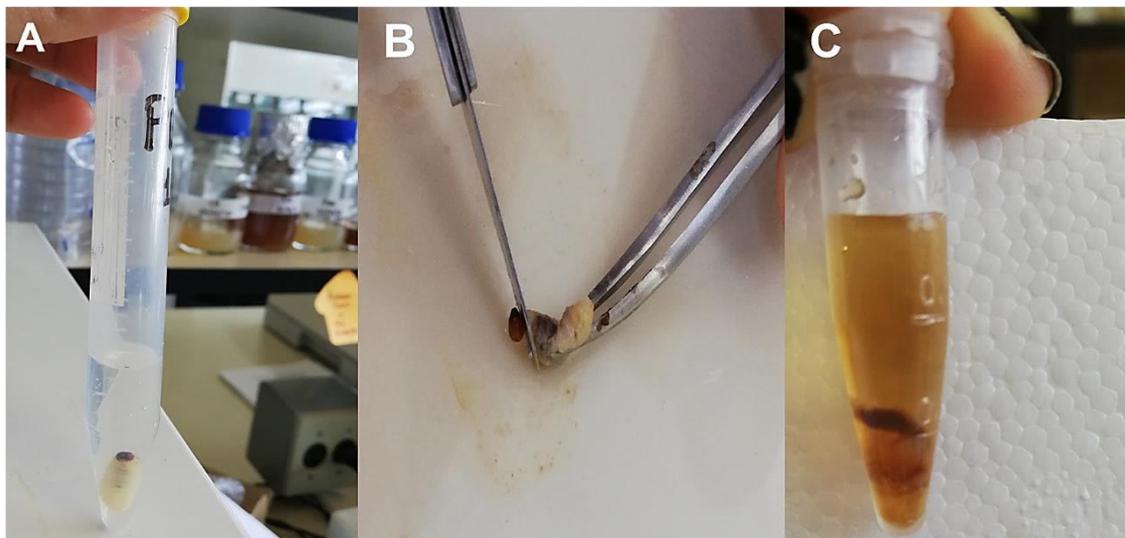


Figura 7. Etapas da dissecação intestinal de larvas de *Sphenophorus levis*. **A)** desinfecção externa da larva com etanol 70%, **B)** Incisão da cabeça da larva com auxílio de pinças e **C)** intestino da larva em solução PBS.

2.3 Cultivos bacterianos

Para os cultivos bacterianos foram utilizados os intestinos inteiros das 4 larvas obtidas. O isolamento dos microrganismos utilizou a metodologia descrita por Rinke *et al.* (2011b). Após da dissecação das larvas descritas no **item 2.1** foram realizadas diluições seriadas de 10^0 a 10^{-8} , adicionando 100 µl da suspensão bacteriana e 900 µl do tampão PBS ajustando um volume final de 1000 µl para cada amostra e plaqueadas em três tipos de meios:

- (i) Ágar de caseína tríptica de soja (TSA, Difco laboratories: 15 g/L caseína pancreática digestiva, 5 g/L papaína de soja, 5 g/L cloreto de sódio, 15 g/L ágar, pH 7,0),
- (ii) Ágar Batata-Dextrose (PDA: 200 g/L extrato de batata, 20 g/L dextrose, 15 g/L ágar, pH 5,0),

- (iii) Ágar Luria Bertani (LB: 10 g/L caseína enzimática, 5 g/L hidrolisado, 10 g/L extrato de levedura, 15 g/L Cloreto de Sódio 15 g/L ágar, pH 7,0).

As placas foram incubadas a 30°C durante 10 dias, sendo observadas diariamente após 10 dias de cultivo. Realizou-se a contagem das colônias dos isolados diretos do estereoscópio e as colônias foram repicadas visando a separação em culturas puras e após o repique individual, as cepas foram preservadas no *freezer* a -80 °C. As 4 cepas bacterianas mais abundantes na contagem das placas tiveram um intervalo de precisão e repetibilidade de 10 a 25 colônias nas placas de 10×10^{-6} , sendo reativadas e utilizadas para o teste da coloração de Gram e isolamento de DNA genômico.

2.4 Extração de DNA genômico de isolados bacterianos do intestino de *S. levis*

As 4 (quatro) cepas dominantes foram repicadas para meio líquido LB a 37°C no Shacker a 125 rpm por 6 dias. Após o crescimento das bactérias em meio líquido, utilizou-se 1,0 ml das culturas puras que foi centrifugado durante 10 minutos a 4°C e 10.000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. O pellet (biomassa) foi utilizado para a extração de DNA mediante o protocolo do kit de preparação de DNA genômico de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas da CELLCO, Biotec do Brasil LTDA (Lt. 1808D11301). O DNA extraído foi analisado em gel de agarose 1% para avaliar a sua qualidade para posterior sequenciamento, como mostrado na **Fig. 8**.

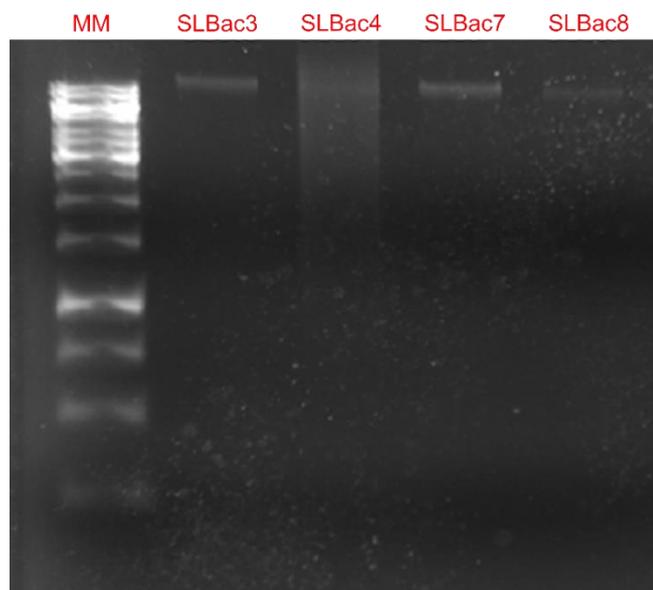


Figura 8. Extratos de DNA das cepas bacterianas isoladas do intestino de *S. levis* MM (Generuler 1kb -Thermo Scientific marcador).

2.5 Sequenciamento de DNA genômico de isolados bacterianos do intestino de *S. levis*

Os DNAs extraídos a partir do cultivo líquido das bactérias foram quantificados mediante eletroforese em gel de agarose 1%. Utilizando 1,0 ng (nanograma) de cada amostra, preparou-se as bibliotecas com o kit *Nextera XT DNA Library Preparation* (Illumina) conforme o seguinte fluxo de trabalho: (i) Tagmentação do DNA genômico, (ii) amplificação das bibliotecas, (iii) limpeza das bibliotecas, (iv) normalização das bibliotecas, e (v) pool de bibliotecas. O sequenciamento foi realizado no laboratório de biologia molecular (LBM) do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (DGE/UFSCar), em um equipamento NextSeq 550 utilizando-se um cartucho de sequenciamento NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 Ciclos), com uma concentração de carregamento de 1.5pM, a qual finalizou com seguintes métricas:

- rendimento: 24.35 Gbp (esperado era 16.25–19.5 Gb para uma corrida com 2 × 76 bp - Mid-Output Kit),
- densidade: 186 a 193 K/mm² (Optimal Raw Cluster Density for NextSeq550: 170-220 K/mm²),
- porcentagem dos reads acima de Q30: 93.87% (> 80% para uma corrida com 2 × 76 bp Mid-Output Kit).

Com base na análise das métricas o rendimento total foi considerado acima do especificado, com a qualidade dos dados gerados sendo excelente.

2.6 Montagem e anotação gênica

A montagem é uma das principais etapas de análise do sequenciamento e também uma etapa crucial para o trabalho. Por tanto as *reads* foram trimadas utilizando o *software Trimmomatic* v.0.40 (Bolger *et al.*, 2014) com as configurações para uma remoção de cliques adaptadores e trimagem suave das regiões de baixa qualidade: ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10:2:True LEADING:3 TRAILING:3 MINLEN:36. A qualidade das *reads* foi inferida com o programa *FastQC* v.0.11.9 antes e após o procedimento de remoção de regiões de baixa qualidade, garantindo que as *reads* tivessem qualidade média por posição maior ou igual a um *Phred score* de 28.

Depois realizou-se uma montagem em conjunto (*co-assembly*) das replicatas de sequenciamento para cada genoma com o *software MEGAHIT* v.1.2.9 (Li *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016) utilizando o modo '*meta-sensitive*' e comprimento mínimo de *contig* de 250pb. Similarmente, realizou-se a montagem com o *software Unicycler* v.0.4.9 (Wick *et al.*, 2017b), seguindo-se as recomendações de Wick *et al.* (2017a) para obtenção de genomas bacterianos completos com o comprimento mínimo de *contigs* de 250pb. Um terceiro programa de montagem de *reads* foi testado, *SKESA-SAUTE* v.2.11.0 (Suvorov *et al.*, 2018; Suvorov *et al.*, 2021) com as configurações em *default*. As três montagens foram reunidas com auxílio do *software MeDuSa* v.1.6 (Bosi *et al.*, 2015), utilizando-se como *draft* de partida cada output dos montadores anteriormente citados e os outros drafts como referência em uma abordagem baseada em gráficos. As três montagens em *scaffold* obtido com o programa

MeDuSa v.1.6 foram avaliados com o auxílio do programa *Quast* 5.0.2 (Gurevich *et al.*, 2013) e o melhor rascunho foi selecionado com base nas estatísticas de N50, L50, comprimento e número de genes completos.

O genoma selecionado foi classificado taxonomicamente dentro da organização de conglomerados de genomas de uma mesma espécie (*spec*) feitos com marcadores genômicos de cópia única (Mende *et al.*, 2020) por meio do programa *progenomes_classifier* (https://github.com/AlessioMilanese/progenomes_classifier) Em seguida, anotou-se os genomas com auxílio do programa *Prokka* v.1.14.5 (Seemann, 2014) utilizando-se a definição taxonômica obtida anteriormente e todos os bancos de proteínas disponíveis no pipeline. As anotações foram complementadas com a predição de fenótipos por meio do uso do *software Trait* v.1.1.2 (Weimann *et al.*, 2016a).

2.7 Análises de vias metabólicas

Uma anotação mais precisa do metabolismo global foi gerada. Os genomas selecionados tiveram suas proteínas reanotadas com base no banco de dados *KEGG* (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) por meio do *software 'Assign KO tool'* (https://www.kegg.jp/kegg/mapper/assign_ko.html), e mais tarde, avaliados através do mapa metabólico produzido pelo programa *'Reconstruct'* (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/reconstruct.html>).

Genes específicos para a degradação de EPS foram buscados no NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/) e PFAM (pfam.xfam.org/) e após a eliminação de redundância foram usados como referência para anotação das principais famílias de interesse mostradas na **Tabela 4**. O banco de dados resultante foi buscado contra os genes preditos nos genomas com o programa *Prodigal* v.2.6.3 (Hyatt *et al.*, 2010), obtidos durante a análise do programa *Prokka* v.1.14.5. Essa busca foi realizada por meio de um alinhamento performado com auxílio do *software* *MMSeqs2* 13-45111 (Steinegger *et al.*, 2017). Proteínas com cobertura maior que 50% e E-value menor que $1e^{-5}$ foram mantidas. O melhor *hit* para cada proteína foi obtido e anotado como tal.

Tabela 4. Genes referência utilizados para busca da via de degradação do EPS.
Anexo1.

Sequência (# de acesso)	# Família (Pfam)	Função	Ref.
O50214	PF17885	Catalisa o primeiro passo para via de degradação aeróbica do estireno por ação enantiosseletiva epoxidação da cadeia lateral do vinil.	(Otto <i>et al.</i> , 2004)
O06836		Catalisa a segunda etapa da via de degradação aeróbica do estireno pela conversão do epoxiestireno ao fenilacetaldeído	(Beltrametti <i>et al.</i> , 1997)
O06837	PF00171	Catalisa o último passo na via de degradação aeróbica do estireno mediando a oxidação do fenilacetaldeído em ácido fenilacético	(Beltrametti <i>et al.</i> , 1997)
Q9Y7G5	PF00067	Catalisa a hidroxilação de fenilacetato para 2-Hidroxifenilacetato na via do homogentisado	(Mingot <i>et al.</i> , 1999)
Q88E47	PF20510	Catalisa a clivagem do anel oxidativo do anel aromático de 2,5-di-hidroxifenilacetato para dar maleilacetoacetato.	(Arias-Barrau <i>et al.</i> , 2004)
P54721	PF00903	Envolvido na meta clivagem do catecol para semialdeído 2-hidroximucônico. Essencial para o crescimento e viabilidade na presença de catecol e provavelmente envolvido na desintoxicação do mesmo.	(Tam <i>et al.</i> , 2006)
P23106	PF00561	Catalisa a conversão de 2-hidroximuconato semialdeído a 2-hidroxipent-2,4-dienoato	

2.8 Caracterização *in silico* da enzima estireno monooxigenase

A sequência da enzima estireno monooxigenase de *Bacillus sp.* da cepa SLBac4 foi analisada quanto às propriedades físico-químicas como pI, índice de instabilidade, índice alifático e GRAVY por meio da ferramenta *ProtParam* (SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Genebra, Suíça) do servidor EXPASy (www.expasy.ch/tools) (Duvaud *et al.*, 2021). A estabilidade da proteína foi prevista a partir do índice de instabilidade, que quando apresenta valores menores que 40 para proteínas estáveis (Mohamad Sobri *et al.*, 2020).

2.9 Alinhamento de Sequência e Identificação de Motivos Conservados Estireno Monooxigenase SLBac4

A sequência da enzima estireno monooxigenase de *Bacillus sp.* da cepa SLBac4 foi comparada com sequências de enzimas estireno-monooxigenases de diferentes bactérias. As sequências referência (Acessos no NCBI: 244856754.1, PFN82877.1, O50214, O06834, A0A5E7ZI74, A0A076JVU4, A0A1D8G6D9, A0A7G2JQI8, A0A0S3TKC2) foram obtidas a partir de buscas com os termos: Styrene monooxigenase, EC1.14.14.11 e Styrene no NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/). Posteriormente, se identificaram as regiões conservadas mediante um alinhamento entre as estireno monooxigenases de várias bactérias utilizando Multalin (CORPET, 1988) o que nos permitiu mostrar sítios conservados da enzima estireno monooxigenase de *Bacillus sp.* SLBac4.

3 Resultados e Discussão

3.1 Isolamento e identificação das cepas

Da microbiota intestinal de *S. levis* se obtiveram 10 isolados, incluindo-se 4 fungos, similar ao descrito por (Rinke *et al.*, 2011). Posteriormente, foram escolhidas 4 isolados bacterianos de acordo a sua morfologia **Tabela 5** e contagem das colônias nas placas (UFC/mL) nos diferentes meios de cultura o que permitiu-nos selecionar as cepas mais abundantes, ou seja, as colônias com os fenótipos mais recorrentes, as quais foram nomeadas como: SLBac3, SLBac4, SLBac7 e SLBac8 **Fig .9**.

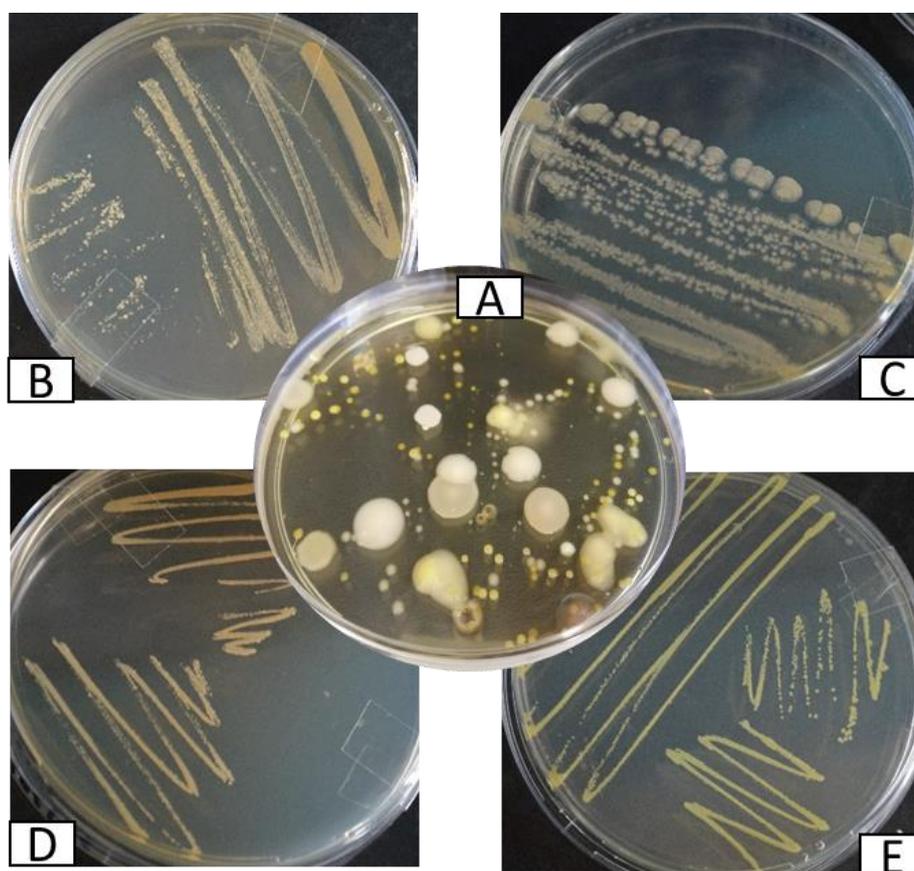


Figura 9. Cepas abundantes nas placas de crescimento A) microrganismos isolados da microbiota intestinal de *S. levis*: B) SLBac3, C) SLBac4, D) SLBac8, e E) SLBac7.

Tabela 5. Classificação morfológica das cepas com fenótipo mais recorrente.

Bactéria	Gram (+/-)	Coloração	Forma da colônia	Elevação da colônia
SLBac3	+	Amarela	Circular	Elevada
SLBac4	+	Branco opaca	Irregular	Elevada
SLBac8	-	Amarelo brilhoso	Circular	Convexo
SLBac7	-	Amarelo	Circular	Elevada

Em relação ao crescimento, as cepas SLBac3, SLBac7 e SLBac8 apresentaram crescimento rápido em meio LB em comparação a cepa SLBac4 que levou mais dias para crescer no mesmo meio de cultivo. No entanto, a velocidade de crescimento de SLBac4 pode estar ligada às necessidades nutricionais deste microrganismo, já que quando cultivado em TSA teve crescimento rápido **Fig.10**.

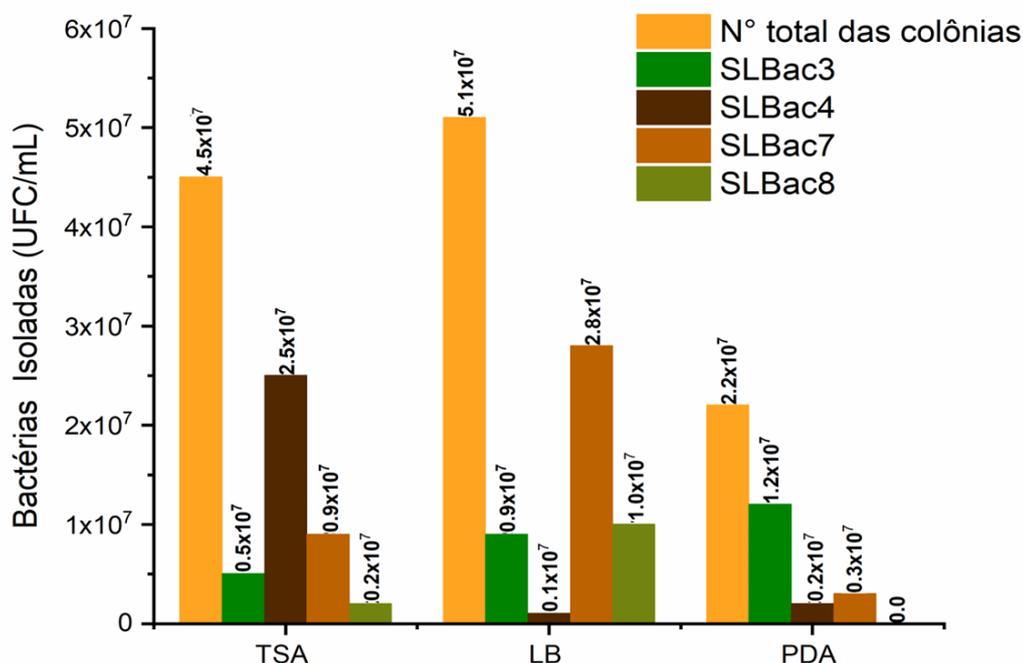


Figura 10. Contagem dos isolados cultiváveis (UFC/mL) em relação ao número total das colônias nas placas dos diferentes meios de cultura TSA, LB, PDA.

Os testes da coloração de Gram mostraram que as cepas SLBac3 e SLBac4 foram positivas e as cepas SLBac7 e SLBac8 foram negativas. Isto permitiu obter uma melhor eficiência e qualidade na extração de DNA genômico das cepas. Devido que as bactérias Gram-negativas têm uma menor quantidade de peptidoglicano, tornando-se mais frágeis e seu processo de extração do DNA genômica é mais simples em comparação com as Gram-positivas que contêm uma espessa camada de peptidoglicano que dificulta a lise da parede, sendo necessário uma extração diferenciada.

3.2 Sequenciamento e montagem do genoma das cepas bacterianas

Realizou-se a montagem das *reads* obtidas no sequenciamento do DNA genômico das cepas isoladas do intestino de larvas de *S. levis* com 3 *softwares* de montagem em *scaffolding*. Para selecionar-se o melhor rascunho do genoma microbiano foi feita uma comparação com auxílio do programa *Quast 5.0.2* (Gurevich *et al.*, 2013), avaliando-se as estatísticas de N50 (o comprimento do contig mais curto para o qual os *contigs* mais longos e iguais cobrem pelo menos 50% do conjunto), L50 (contagem do menor número de *contigs* cuja soma de comprimentos corresponde à metade do tamanho total da montagem), o comprimento total em pares de bases e número de genes completos. As métricas adotadas são comumente utilizadas para se avaliar a qualidade das montagens, dessa forma, quanto maior o valor de N50 e menor o L50, menor será a fragmentação do genoma montado e maior será a sua contiguidade, permitindo obter uma melhor qualidade das previsões obtidas da montagem gerada (Salzberg *et al.*, 2012).

Os resultados conseguidos para as cepas bacterianas SLBac3, SLBac4, SLBac7 e SLBac8 apresentaram valores de N50 e L50 compatíveis com uma boa montagem, **Tabela 6**. O melhor método de montagem foi utilizando-se o *scaffolding* obtido com *MeDuSa* partindo do rascunho obtido com o programa MEGAHIT utilizando-se como referência complementar os rascunhos dos outros programas, mostrando que a abordagem é robusta.

Tabela 6. Estatísticas de montagem e anotação do genoma das cepas bacterianas.

	Pb Seq	N50	L50	Contig	%GC	mRNA	Genes	rRNA	tRNA	Complectude	Contaminação
SLBac3	3.26	134.0	9	46	69.5	3108	3108	2	49	98.93%	0.3
SLBac4	6.02	379.2	5	88	37.44	6388	6388	9	103	98.47%	0.51
SLBac7	4.92	46.6	28	154	66.66	4546	4546	3	73	99.94%	0.07
SLBac8	4.91	48.4	26	148	66.66	4540	4540	2	69	99.08%	0.07

Comparativamente, a melhor montagem foi da cepa SLBac4 por conta do maior N50 como mostrado na **Fig.11**. De modo geral, os genomas apresentaram variações nas coberturas de sequenciamento de 182.1 até 413.9x, sendo valores considerados suficientes para genomas bacterianos (Chun *et al.*, 2014). As informações adquiridas mostraram um comprimento do rascunho dos genomas de 3.26 a 6.02 Mpb o que demonstra montagens de comprimento aceitável para genomas microbianos.

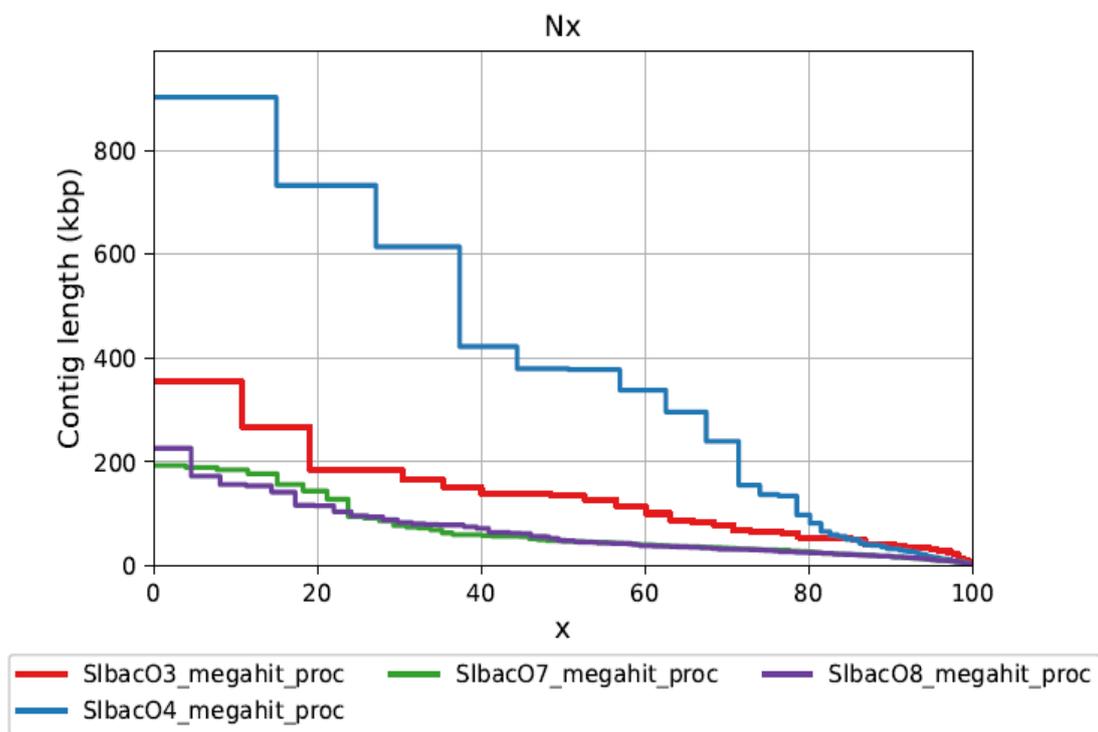


Figura 11. Distribuição do comprimento dos contigs das montagens dos genomas das cepas isoladas por percentil (Nx).

Os genomas das cepas bacterianas foram classificados taxonomicamente por meio do programa *progenomes_classifier* com marcadores espécie-específicos dos conglomerados de genomas (*spec1*), permitindo o acesso direto a genomas, mostrando assim, uma consistência nas anotações e fornecendo uma confiança na anotação de até um 99,9% nas 4 cepas: *Microbacterium hominis* SLBac3, *Bacillus* spp. SLBac4 (como uma nova cepa de *Bacillus* spp.), *Stenotrophomonas maltophila* SLBac7 e 8 - **Tabela 7**.

Tabela 7. Confiança dos dados das cepas bacterianas descobertas mediante o programa *progenomes_classifier*.

Cepas bacterias	# MGs *	Exatidão (%)
<i>Microbacterium hominis</i> SLBac3	35	74
<i>Bacillus</i> spp. SLBac4	40	100
<i>Stenotrophomonas maltophila</i> SLBac7	40	100
<i>Stenotrophomonas maltophila</i> SLBac8	40	100

*MGs (genes marcadores)

Um estudo sobre a microbiota intestinal da larva *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), realizado por Tagliavia et al. (2014), identificou pelo gene 16S rRNA três filos dominantes, uns desses foi Proteobacteria e Firmicutes, aos quais pertencem as cepas SLBac7, SLBac8 e SLBac4. Igualmente, foram encontrados os filos Proteobacteria e Firmicutes no besouro da cana de açúcar (*Sphenophorus levis*) (Rinke et al., 2011a). A subfamília Dryophthorinae, que compreende tanto o gênero *Sphenophorus* como a espécie *R. ferrugineus*, é pouco estudada, sendo *S. levis* o único besouro que conta com a caracterização da microbiota identificada. A espécie *Microbacterium hominis* (cepa SLBac3) não foi identificada anteriormente como sendo membro da microbiota intestinal de *S. levis*.

Musto et al. (2006) explicam que o conteúdo de GC está relacionado à filogenia e às adaptações ecológicas de uma espécie bacteriana que variam de 15 a 75% e as variações nas porcentagens de GC são influenciadas por fatores ambientais, níveis de oxigênio e disponibilidade de nucleotídeos que provocam variações consideráveis no teor de GC. As porcentagens de GC de todas as

cepas mostraram valores similares em torno de 60% com exceção da cepa SLBac4 que tem um baixo teor de GC de 37% **Fig.12**. Isso confirma a identificação da cepa SLBac4 como membro do gênero *Bacillus* que apresenta conteúdo de GC na faixa de 30 a 40 %GC (Douriet-Gámez *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2021). Além da evidente similaridade na classificação morfológica e coloração de Gram das cepas SLBac7 e 8, e sua identificação como cepas da mesma espécie, também há uma grande similaridade entre as suas montagens, tendo-se em vista o comprimento dos *contigs* e conteúdo GC dessas cepas.

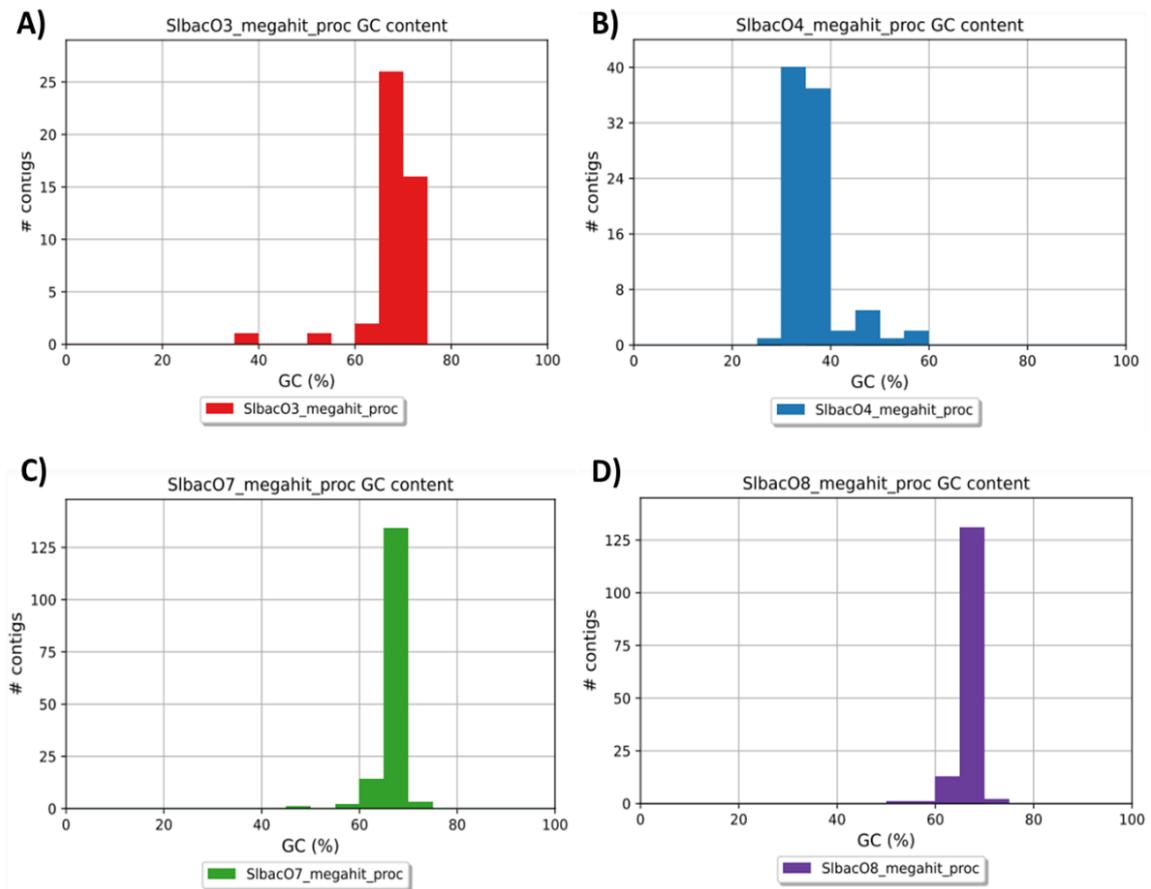


Figura 12. Distribuição do conteúdo de (GC%) pelo número de contigs de cada montagem em relação às cepas bacterianas. A) SLBac3, B) SLBac4, C) SLBac7 e D) SLBac8.

Os 4 genomas montados apresentaram genes de rRNA, cuja identificação via RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier>) mostrou uma confirmação da taxonomia dessas bactérias. A bactéria *Bacillus spp.* SLBac4 apresentou 9 genes de rRNA, o que indica uma redundância típica do gênero. Os genomas montados apresentam de 3108 a 6388 proteínas, alto grau de completude (>97%) e baixo grau de contaminação (<0.07) a partir dos resultados do programa CheckM **Tabela 6**. A cepa *Bacillus spp.* SLBac4 possui 9 genes de rRNA e 6388 proteínas, similarmente a outras espécies de *Bacillus*, como *B. megaterium* que possui 6 genes de rRNA e 5589 proteínas (Shwed *et al.*, 2021). No caso da espécie *Microbacterium hominis* cepa SLBac3 encontrou-se 2 genes de rRNA e 3108 proteínas o que é similar ao encontrado para espécie *Microbacterium laevaniformans* cujo genoma tem 5 genes de rRNA e 2762 proteínas (Brown *et al.*, 2012). Por fim, a espécie *Stenotrophomonas maltophila* cepa SLBac7 e SLBac8 reportaram 2-3 genes de rRNA e 4546-4540 proteínas, mostrando grande similaridade entre outras cepas dessa espécie previamente descritas (Zhang *et al.*, 2021).

As espécies microbianas identificadas podem exercer um importante papel ecológico e podem apresentar um potencial para biorremediação de ambientes contaminados por resíduos químicos, pesticidas, plásticos, petróleo, entre outros. Um excelente exemplo é a espécie Gram-negativa *Stenotrophomonas maltophila*, largamente estudada para a degradação de mononitrofenóis em monossustratos de sistemas co-metabólicos, assim como em outros compostos aromáticos de origem vegetal, obtendo-se bons resultados (Greñ *et al.*, 2010). Em um estudo efetuado por Jabeen *et al.* (2018) avaliou-se quitinases produzidas por *S. maltophila*, mostrando a espécie como um potencial agente para o biocontrole de cupins. Além disso, Morales-Jiménez *et al.* (2012) identificaram, por análise de 16S rRNA, *Stenotrophomonas maltophila* associada ao intestino do besouro *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae: Scolytinae). Essas cepas apresentaram atividades celulolíticas e foram implicadas na fixação de nitrogênio e quebra de celulose, papéis importantes associados ao desenvolvimento e aptidão do inseto, especialmente sob as condições de vida particularmente difíceis desse besouro.

Analogamente, a espécie Gram-positiva *Microbacterium hominis* também foi isolada do intestino de larvas de *Diatraea saccharalis*, onde avaliaram a capacidade de degradação da lignocelulose de maneira eficiente para fins de pré-tratamento de biomassa de cana de açúcar e aplicabilidade no processamento industrial (Dantur et al., 2015). Diep et al. (2013) relatam a espécie *Microbacterium hominis* como solubilizadora de fosfato e potássio em solos, o que permite a produção de biofertilizantes. Por último, o gênero *Bacillus*, ao qual pertence a cepa SLBac4, apresenta diversas espécies produtoras de compostos envolvidos no biocontrole de fitopatógenos e na promoção do crescimento vegetal, o que torna o grupo um candidato potencial na maioria das aplicações agrícolas e biotecnológicas (Miljaković et al., 2020). Os bacilos exibem atividade antagônica pela secreção de metabólitos extracelulares, como antibióticos, hidrolases de parede celular e sideróforos (Salazar et al., 2017). *Bacillus spp.* mostrou destaque na degradação de plásticos (Deepa et al., 2019), com a capacidade de colonizar, modificar e utilizar o polietileno de baixa densidade como única fonte de carbono.

3.3 Previsões de traços fenotípicos das cepas bacterianas

Uma combinação de informações fenotípicas e genômicas é necessária para a correta descrição e classificação das bactérias (Pontes et al., 2007). Previsões de traços fenotípicos por meio de avaliações genômicas podem ser feitas com relativa acurácia utilizando-se *machine learning*. Utilizamos o programa *Traitar v.1.1.2* para prever fenótipos como produção enzimática, crescimento, morfologia, requisitos de oxigênio, produto e proteólise. Foram combinados os algoritmos *phypat* e PGL para criar um *heatmap*, com o fim de destacar as características fenotípicas que foram previstas como presentes e ausentes pelos dois algoritmos para cada cepa bacteriana, **Fig. 13**.

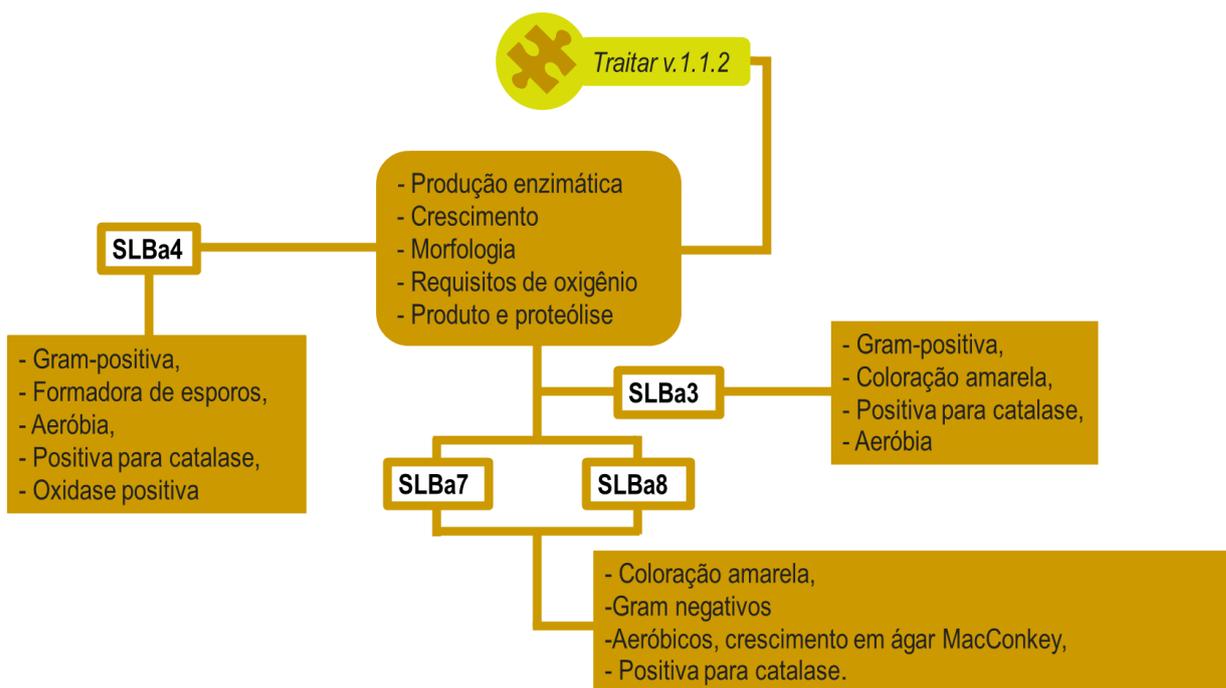
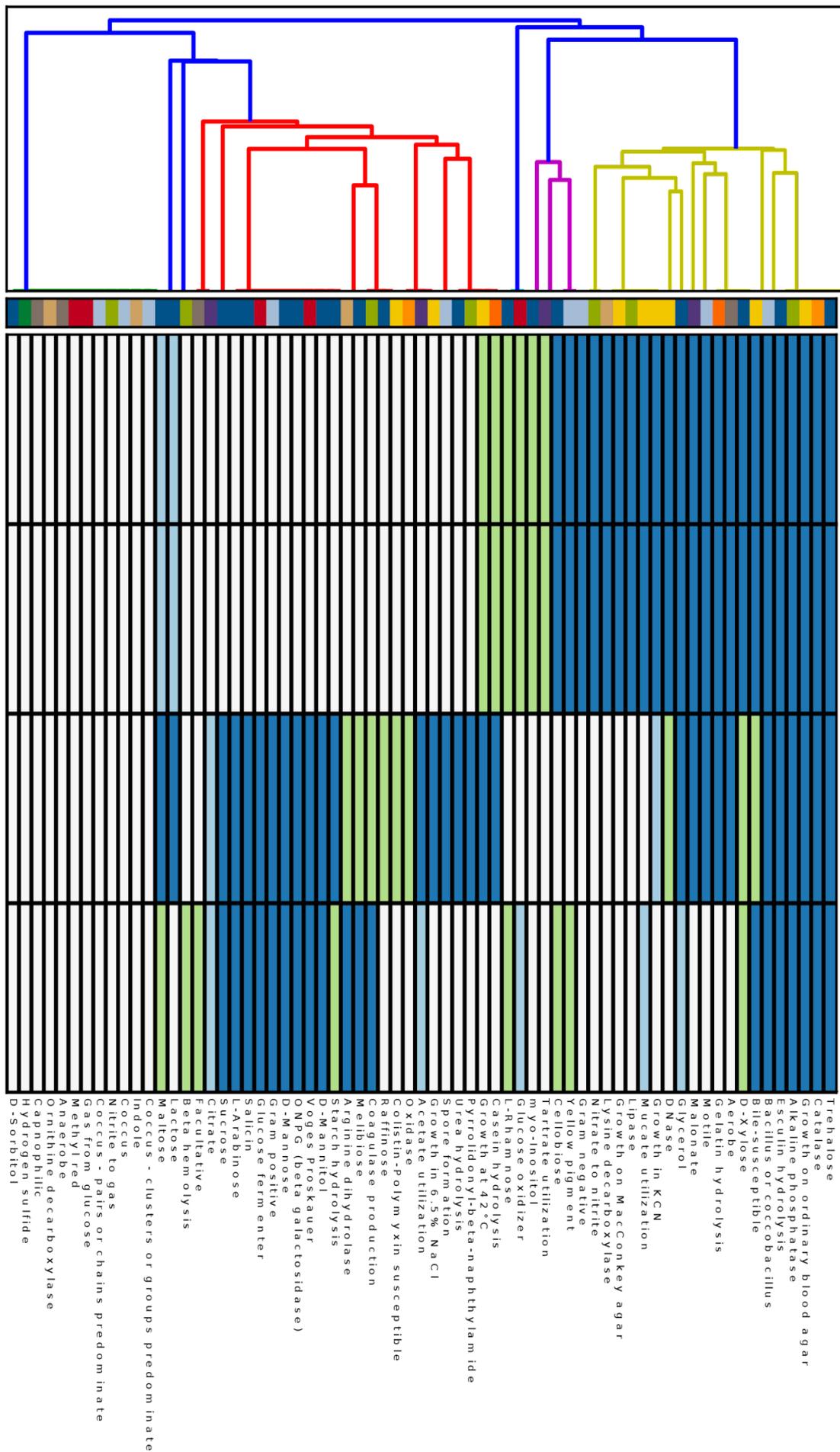


Figura 13. Fenótipos das cepas bacteriana por meio do software *Traitar*.

Um conjunto de traços fenotípicos dos genomas de cepas bacterianas devem reunir características específicas para que possam se desenvolver num ambiente similar ao intestino do gorgulho da cana de açúcar (*S. levis*), como por exemplo a degradação de celulose e outros açúcares presentes nos alimentos de escolha do animal, no caso, o rizoma e a base do caule da cana de açúcar (Cícero *et al.*, 2009; Pavlu *et al.*, 2016). Entre os processos de grande relevância encontra-se a decomposição enzimática de açúcares (sacarose e glucose) e dos polímeros que podem ser formados por eles: celulose, lignina e hemicelulose, os principais constituintes da cana de açúcar. A presença de fenótipos indicadores desses processos pôde ser identificada em todas as cepas isoladas (SIBac3, SIBac4, SIBac7 e SIBac8), que apresentam potencial para crescimento em meios com fonte de carbono única sendo trealose, *D*-xilose, melobiose, *D*-manose, maltose e sacarose **Fig. 14**.



Phenotype colorkey

- Proteolysis
- Product
- Oxygen:Enzyme
- Oxygen
- Morphology
- Growth: Sugar
- Growth: Glucose
- Growth: Carboxylic acid
- Growth: Amino acid
- Growth
- Enzyme

Slbac08

Slbac07

Slbac04

Slbac03

- Trehalose
- Catalase
- Growth on ordinary blood agar
- Alkaline phosphatase
- Esculin hydrolysis
- Bacillus or cocco bacillus
- Bile-susceptible
- D-Xylose
- Aerobe
- Gelatin hydrolysis
- Motile
- Malonate
- Glycerol
- D-Nase
- Growth in KCN
- Mucate utilization
- Lipase
- Growth on MacConkey agar
- Lysine decarboxylase
- Nitrate to nitrite
- Gram negative
- Yellow pigment
- Cellobiose
- Tartrate utilization
- mYo-inositol
- Glucose oxidizer
- L-Rhamnose
- Casein hydrolysis
- Growth at 42°C
- Pyrrilidonyl-beta-naphthylamide
- Urea hydrolysis
- Spore formation
- Growth in 6.5% NaCl
- Acetate utilization
- Oxidase
- Colistin-polymyxin susceptible
- Raffinose
- Coagulase production
- Meliose dihydrolyase
- Starch hydrolysis
- V-Mannitol
- Voges-Proskauer
- ONPG (beta galactosidase)
- D-Mannose
- Gram positive
- Glucose fermenter
- Salicin
- L-Arabinose
- Sucrose
- Citrate
- Facultative
- Beta hemolysis
- Lactose
- Maltose
- Coccus - clusters or groups predominant
- Indole
- Coccus
- Nitrite to gas
- Coccus - pairs or chains predominant
- Gas from glucose
- Methyl red
- Anaerobe
- Ornithine decarboxylase
- Capnophilic
- Hydrogen sulfide
- D-Sorbitol

Figura 14. Previsão dos fenótipos por meio de traços genômicos das cepas bacteriana.

Uma breve descrição da nova cepa bacteriana SLBac4 da espécie *Bacillus spp.* contempla os fenótipos preditos por evidências genômicas: Gram-positiva formadora de esporos, aeróbia, positiva para catalase e oxidase positiva, indicando a degradação de compostos complexos por citocromos. As cepas SLBac8 e SLBac7, mostraram as mesmas características fenotípicas, tais como: crescimento em KCN, coloração amarela, gram negativos, aeróbicos, crescimento em ágar MacConkey, catalase, entre outros. O que reflete com sua identificação taxonômica via marcadores e 16S rDNA, que sugerem ambas como representantes da mesma espécie (*Stenotrophomonas maltophilia*), mas de cepas diferentes.

3.4 Via de biodegradação do EPS

As proteínas envolvidas na biodegradação de EPS de outros microrganismos foram utilizadas como iscas contra as proteínas preditas nos genomas dos isolados bacterianos e apenas aquelas proteínas apresentando alinhamentos significativos ($E\text{-value} < 1e\text{-}5$) e aquelas com uma cobertura maior de 50% foram consideradas ortólogas. Vários genes envolvidos na degradação do poliestireno puderam ser identificados no genoma de *Bacillus spp.* SLBac4, o oposto do observado para os outros isolados que não apresentaram a monooxigenase de estireno, uma etapa fundamental do metabolismo dos monômeros de estireno. Cepas do gênero *Bacillus* já foram avaliadas quanto a capacidade de degradação de poliestireno de alta impacto, onde foram capazes de reduzir o peso da amostra em 23% (p/p) durante 30 dias (Mohan et al., 2016).

A ausência de genes relacionados à decomplexação de EPS concorda com relatos de que *Bacillus spp.* são capazes de crescer em filmes sobre PE e biodegradá-los, após uma etapa abiótica inicial, conseguindo uma diminuição da complexidade da estrutura química entre 10,5%-13,7% (Ibiene et al., 2013). Assim mesmo, outra cepa de *Bacillus spp.* foi capaz de degradar PET de diversas fontes, secretando hidrolases, quitinases, CMCases, proteases, xilanases e lipases que atuam sobre alta temperatura na degradação do plástico, reduzindo seu peso molecular significativamente de 205 para 116,8 kDa (Dang

et al., 2018). Estes últimos resultados, mostram ainda que há a possibilidade de que enzimas com baixa homologia às já descritas atuem nesse processo.

Assim, se propõe que a biodegradação de EPS no intestino de *S. levis* seja realizada de forma bastante específica e dependente da cepa SIBac4. A possível rota de biodegradação de poliestireno pela espécie *Bacillus spp.* SLBac4, baseando-se nos genes específicos presentes em seu genoma, mostra que 4 das 6 reações podem ser realizadas, sugerindo que possa haver complementação metabólica por outros táxons, ou que as etapas faltantes sejam executadas por enzimas com baixa similaridade às já descritas, ou ainda que esses processos possam ter sido substituídos no metabolismo do presente microrganismo por outras etapas a serem ainda descobertas **Fig.15**. Dessa forma, há duas possibilidades para a degradação aeróbica dos monômeros de estireno previamente descomplexados do EPS pela cepa *Bacillus spp.* SLBac4: (i) envolvendo uma oxidação inicial da cadeia lateral do vinil, e (ii) baseada no ataque direto ao núcleo aromático, assim como descrito anteriormente para outras espécies (Tischler, 2015).

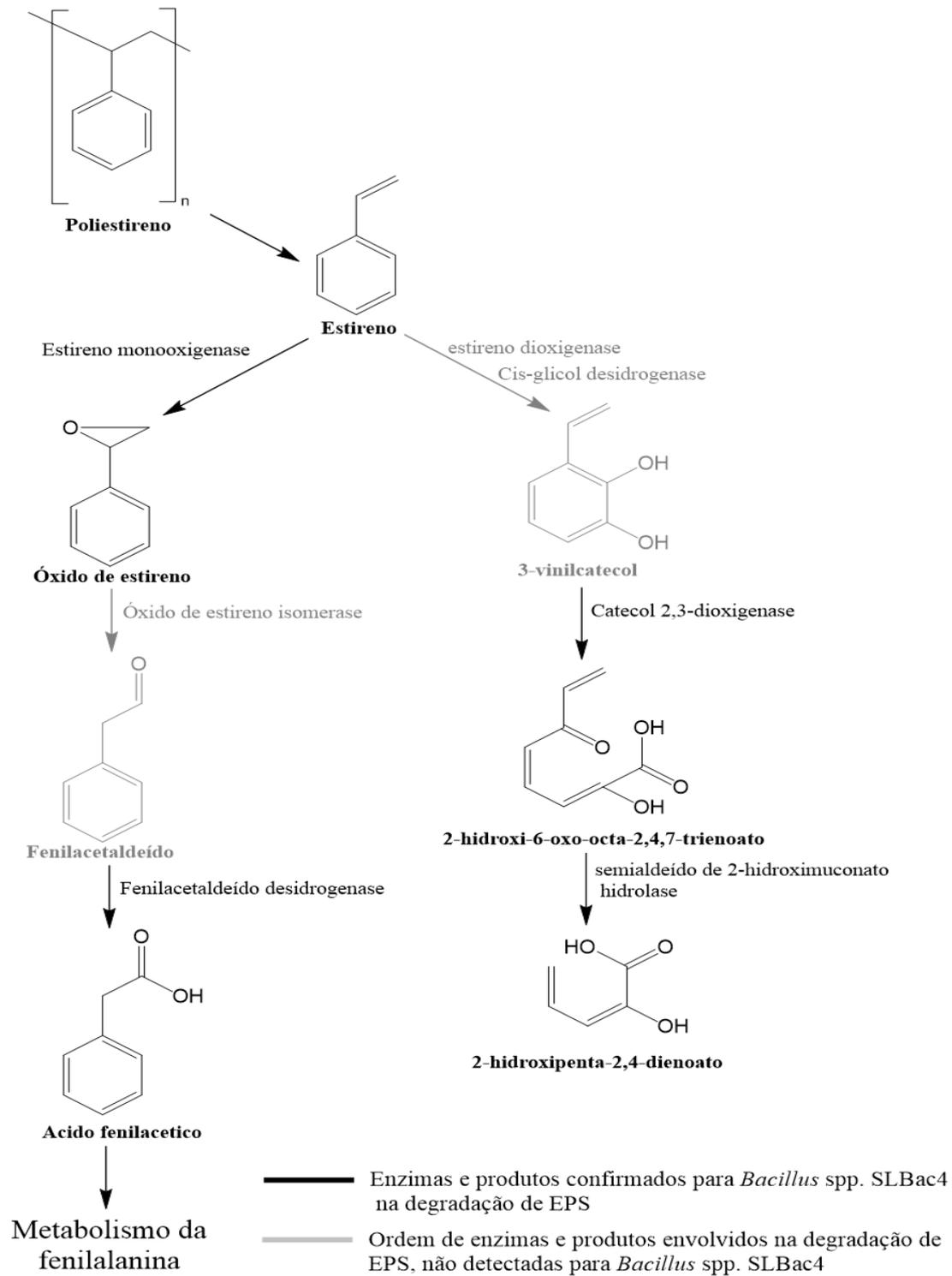


Figura 15. Possível via metabólica de degradação do poliestireno expandido pela cepa bacteriana *Bacillus* spp. SLBac4 baseado em evidências genômicas.

A via superior dos monômeros de estireno tem início com a epoxidação da cadeia lateral do vinil por uma monooxigenase de estireno (*styA*) (EC 1.14.14.11), implicando o oxigênio molecular para originar uma reação de epoxidação do estireno, o que também requer coenzimas, como o dinucleotídeo de adenina e flavina (FAD) para a formação do composto óxido de estireno. Posteriormente, a enzima isomerase de óxido de estireno atua na formação de fenilacetaldeído (Choo *et al.*, 2021; Emmanouil Tsochatzis *et al.*, 2021). Nesta etapa, a rota de degradação sofre uma interrupção para *Bacillus spp.* SLBac4. Entretanto, a presença de enzimas que utilizam fenilacetaldeído como substrato, sugerem a existência da via das enzimas responsáveis pelas etapas subsequentes. A enzima fenilacetaldeído desidrogenase (*styD*) (EC 1.2.1.39), responsável pela conversão do fenilacetaldeído a ácido fenilacético, por estar presente, sugere que a etapa anterior é realizada por uma enzima equivalente com baixa homologia presente no genoma avaliado, ou ainda, que SLBac4 possa utilizar o fenilacetaldeído proveniente de outras fontes para a produção de fenilalanina. A obtenção de ácido fenilacético a partir de estireno é um método recorrentemente verificado nas vias de degradação de diferentes espécies bacterianas (Hartmans, Smits, Van der Werf, Volkering, De Bont, *et al.*, 1989; Mooney *et al.*, 2006; Oelschlägel *et al.*, 2015). O ácido fenilacético, por apresentar alta polaridade e reatividade na interação com outros agentes químicos, é importante para produção de novos compostos que permitam uma melhor assimilação no meio ambiente (Milne *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011). Além disso, acredita-se que a via inferior envolve a transformação de ácido fenilacético em intermediários do ciclo de Krebs (Nogales *et al.*, 2007).

Estudos reportaram uma organização genética da via superior dos monômeros de estireno em várias bactérias (O'Leary *et al.*, 2002), por meio de um operon catabólico de via superior contendo todas as enzimas necessárias para a conversão dos monômeros de estireno em ácido fenilacético. Os genes *styA* e *styB* codificam uma monooxigenase de duas subunidades de estireno, responsável pela transformação de estireno em epoxiestireno, enquanto *styC* é uma isomerase de epoxiestireno que converte óxido de estireno em fenilacetaldeído e na etapa final da via superior, a formação de ácido fenilacético

pela enzima codificada pelo gene *styD* - fenilacetaldeído desidrogenase. Em relação a cepa *Bacillus spp.* SLBac4, não se verificou uma estrutura operônica conservada, sugerindo um arranjo genético diverso dos já descritos e provavelmente dependente de processos regulatórios diferenciados.

Outra possível via de degradação do estireno pela cepa SIBac4 provavelmente se dá por meio da clivagem do anel aromático por meio da incorporação de dois grupos hidroxílicos nas posições 2 e 3 do anel pela ação enzimática do estireno dioxigenase e cis-glicol desidrogenase, que não foram preditas no genoma da cepa *Bacillus spp.* SLBac4. No entanto, as enzimas necessárias para a formação de produtos do fim da via, como o composto 3-vinilcatecol, estão presentes. Considerando os compostos do tipo catecol como os principais intermediários na ação enzimática do estireno dioxigenase e cis-glicol desidrogenase, essa via de degradação de EPS apresenta bastante similaridade com as vias de degradação de benzeno, etilbenzeno e tolueno (Bühler *et al.*, 2004). O caminho depois ramifica-se num precursor de meta-clivagem envolvendo as enzimas catecol 2,3-dioxigenase (*catE*) (EC 1.13.11.2) formando 2-hidroxi-6-oxo-octa-2,4,7-trienoato, que levaria a formação de intermediários centrais como ácido acrílico, acetaldeído e piruvato (Patrauchan *et al.*, 2008). Em seguida, a semialdeído de 2-hidroxi-6-oxo-octa-2,4,7-trienoato hidrolase atua para a produção de 2-hidroxi-6-oxo-octa-2,4,7-trienoato. Destaque-se que vários microrganismos atacam diretamente o anel aromático do estireno como, por exemplo, *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 (Warhurst *et al.*, 1994), *Pseudomonas sp.* Y2 (Utkin *et al.*, 1991), *Xanthobacter* 124X (Hartmans, Smits, Van der Werf, Volkering, & De Bont, 1989) e *Rhodococcus jostii* RHA1 (Patrauchan *et al.*, 2008). No entanto, deve-se mencionar que esta via de biodegradação do estireno descrita é bastante inespecífica para o monômero (Oelschlägel *et al.*, 2018).

3.5 Caracterização *in silico* da enzima estireno monooxigenase de *Bacillus sp. SLBac4*

3.5.1 Propriedades físico-químicas

As proteínas preditas no genoma da cepa SLBac4 isolada da microbiota intestinal de *S. levis*, exibem um potencial para a biodegradação de EPS. Elas permitiram traçar uma possível via de degradação do EPS, destacando-se a enzima estireno monooxigenase, por ativar uma série de reações direcionadas à degradação de EPS por meio da epoxidação da cadeia lateral do vinil. Além da distinção específica de pertencer numa via de degradação do estireno, esta enzima pode ser comumente codificada em um cluster de genes styABC ou styABCD, onde os genes styA e styB codificam uma monooxigenase de duas subunidades de estireno responsável na transformação de estireno em epoxiestireno (O'Leary *et al.*, 2002). Esta enzima tem sido amplamente revisada do ponto de vista biotecnológico pelas aplicações como candidato promissor na biocatálises de subprodutos industriais (Oelschlägel *et al.*, 2018).

Dentre as propriedades do estireno monooxigenase, calculadas pelo programa *ProtParam tool* (Expasy, SIB Swiss Institute of Bioinformatics), estão que a enzima predita no genoma de *Bacillus. sp* SLBc4 tem um peso molecular de 44.64 kDa e um ponto isoelétrico (pI) de 6.15, sugerindo que a estireno monooxigenase seja uma proteína ácida (Barcellos, 2017). Enquanto, o valor do índice de instabilidade apresentado foi de 35.52, predita como uma proteína estável por atingir um valor menor que 40, inclusive termicamente, uma vez que o índice alifático apresentou um valor de 88.02. A hidropatia média (GRAVY) indica a solubilidade das proteínas, e para a estireno monooxigenase da cepa SLBac4 foi de -0.224, considerado de natureza hidrofílica.

3.5.2 Análise da conservação de sítios do estireno monooxigenase da cepa SLBac4

As estireno monooxigenases (EC1.14.14.11) são sistemas de duas enzimas, consistindo numa epoxidase (StyA) e uma redutase de flavina (StyB) que catalisa a epoxidacao dependente de FAD e NADH de estireno (Truong, 2017). Mas também, estão envolvidos na degradação microbiana de compostos aromáticos, dentre deles, a epoxidacao do estireno em oxido de estireno (Heine *et al.*, 2017).

Portanto, para demonstrar que a enzima estireno monooxigenase da cepa SLBac4 está conservada se realizou uma comparação com as sequências de outras bactérias mediante alinhamentos, para assim, identificar os motivos conservados entre as diferente estireno monooxigenases do componente StyA.

Foram alinhadas as sequências das enzimas de *Pseudomonas fluorescens* (29% de identidade), *Pseudomonas sp.* (29% de identidade), *Rhodococcus opacus* (30% de identidade), *Priestia megaterium* (100% de identidade), *Bacillus sp.* AFS076308 (87.6% de identidade), *Sphingomonas sp.* (27.7% de identidade), *Streptomyces rubrolavendulae* (28.6% de identidade), *Serratia grimesii* (27.6% de identidade), e *Fischerella sp.* (20.5% de identidade), que apesar da baixa identidade em relação à enzima de estudo, compartilham propriedades similares entre os aminoácidos visualizados no alinhamento entre as diversas sequências da enzima **Fig.16**; Inferindo em funções conhecidas entre algumas das sequências da enzima, como a epoxidação da cadeia lateral do vinil do estireno, e levando conseqüentemente a diversos estudos relatados para bactérias degradadoras do estireno através da atividade inicial da enzima estireno monooxigenase (Mooney *et al.*, 2006; O'Leary *et al.*, 2002 & Toda *et al.*, 2012).

Além disso, várias investigações funcionais e de identificação de estireno monooxigenases, permitiram a expansão dos substratos para uma variedade de derivados de estireno e análogos de estireno heterocíclico (Park *et al.*, 2006 & Lin *et al.*, 2011).

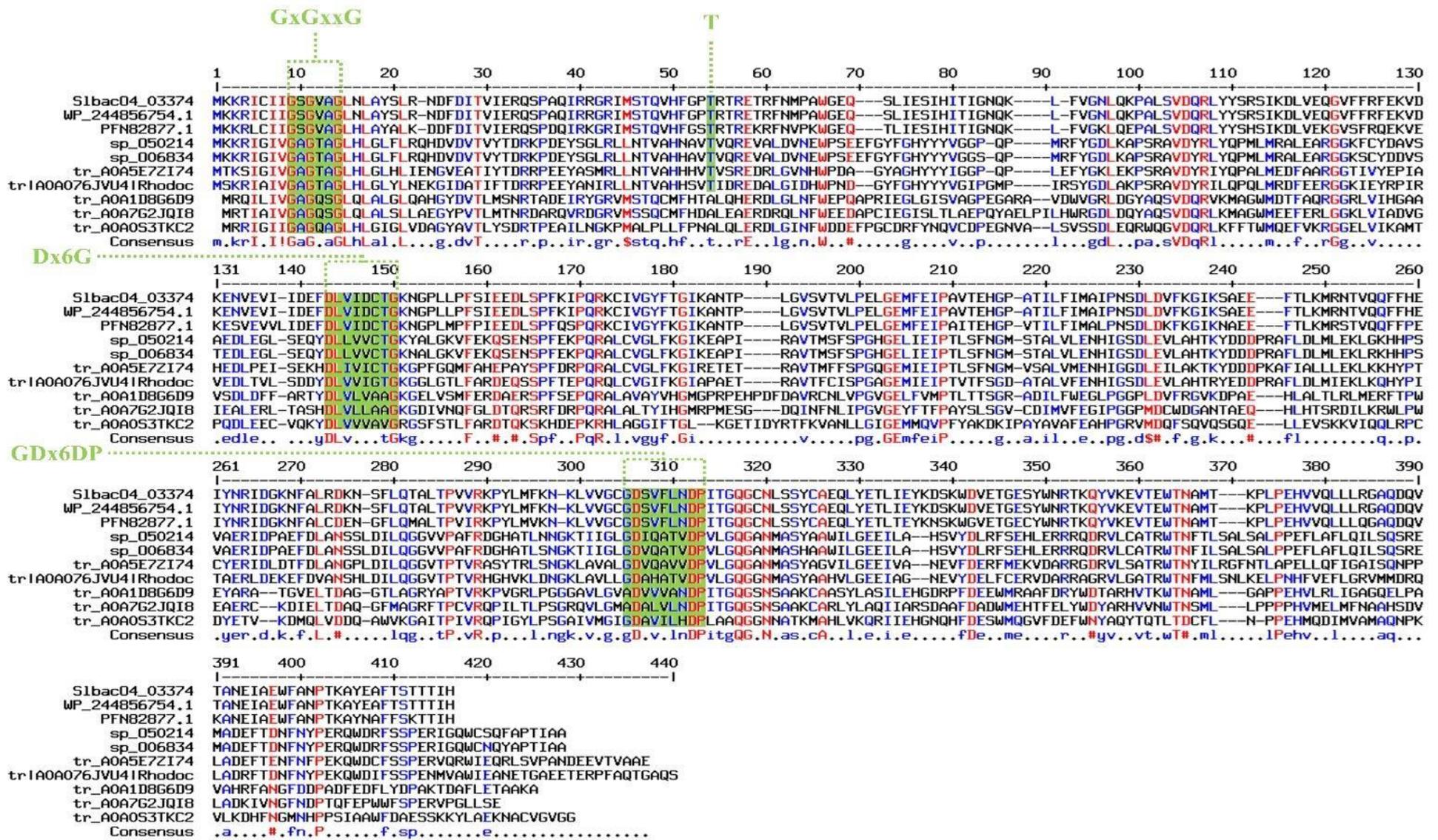


Figura 16. Alinhamento de múltiplas seqüências da enzima estireno monooxigenase de *Bacillus*. sp SLBc4 (O3374) como referência frente às diversas bactéria: *Priestia metaterium* número de acesso (244856754.1), *Bacillus* sp. AFS076308 número de acesso (PFN82877.1), e outros filo *Pseudomonas* sp. número de acesso (O50214), *Pseudomonas* sp. número de acesso (O06834), *Sphingomonas* sp. número de acesso (A0A5E7Z174), *Rhodococcus opacus* número de acesso (A0A076JVU4), *Streptomyces rubrolavendulae* número de acesso (A0A1D8G6D9), *Serratia grimesii* número de acesso (A0A7G2JQI8), *Fischerella* sp. número de acesso (A0A0S3TKC2)

As estireno monooxigenases são flavoproteínas que contém uma dobra de Rossmann (sequência GXGXXG), onde acontecem comumente às ligações dos cofatores FAD e NAD⁺ (Vallon, 2000 & Tischler *et al.*, 2010). Por conseguinte, se evidenciou nos resultados componentes do estireno monooxigenase, incluindo vários motivos conservados de ligação a FAD, dentro deles a GXGXXG (resíduos 9 -14) e DX6G (resíduos 143 -150) do alinhamento da enzima de *Bacillus sp.* SLBc4 entre as sequências das enzimas de outras bactérias, independente do comprimento e das similaridades que estes apresentam **Fig. 16**. A descrição anterior, concorda com estudos previamente realizados por Eppink *et al.* (1997), no qual deduziram a mesma região conservada para várias flavoproteínas baseada na estrutura cristalina *p*-hidroxibenzoato hidroxilase de *Pseudomonas fluorescens*, considerado este um motivo conservado entre os dependentes de FAD e NAD⁺. Do mesmo modo, Toda *et al.* (2012) realizou o alinhamento das sequências de aminoácidos das enzimas de *Rhodococcus sp.* ST-5 e ST-10, onde mostraram semelhanças com outras cepas de *Pseudomonas sp.*, permitindo deste modo identificar vários motivos conservados incluindo a dobra de Rossmann.h

O segundo motivo GDX6DP refere-se ao sítio de ligação ao FAD, nas posições dos resíduos 305 - 313, em que o resíduo Asp está altamente conservado pela ligação O-3' da fração ribose do FAD (Pu *et al.*, 2018). Além disso, as diversas sequências da estireno monooxigenase contém o resíduo Thr47 funcionalmente conservado, pelo que num estudo de Cui *et al.* (2020), foi analisada a estrutura cristalina da estireno monooxigenase de *Pseudomonas sp.* encontrando-se que o resíduo conservado Thr47 localizado na cavidade ativa em ~4 Å do C(4a) catalítico do anel isoaloxazina de FAD tinha uma ligação de hidrogênio com N-5 do anel isoaloxazina, implicando um papel potencial na estabilização de intermediários de reação e na importância da atividade catalítica do componente StyA, ou seja, a catálise da reação de epoxidação do estireno ou derivados do estireno.

Portanto, a estireno monooxigenase pode-se considerar um gene ortólogo no genoma de *Bacillus sp.* da cepa SLBc4 com uma identidade considerável em torno de 30%, apresentando vários sítios conservados em relação das diversas

baterias de comparação analisadas no presente trabalho, inferindo-se uma funcionalidade catalítica análoga às demais para a degradação de estireno.

4 Conclusões

O desenvolvimento do presente trabalho permitiu o isolamento de quatro cepas bacterianas da microbiota intestinal de *S. levis* (Coleoptera: Curculionidae), nomeadas como SLBac3, SLBac4, SLBac8 e SLBac7. Os genomas obtidos para essas cepas foram montados e anotados, o que permitiu avaliar a confiabilidade, a qualidade e mostrar que de modo geral estão completos e livres de contaminação.

O sequenciamento permitiu a identificação das bactérias, mostrando que espécies como *Microbacterium hominis* (SLBac3), *Bacillus spp.* (SLBac4), e *Stenotrophomonas maltophila* (SLBac8 e SLBac7) são abundantes nos intestinos do inseto praga.

Os fenótipos preditos por meio de traços genômicos das cepas bacterianas para caracterização taxonômica mostraram que as cepas isoladas apresentam potencial para degradação de múltiplos açúcares, condizente com as condições ambientais presentes no intestino de *S. levis* e do material do qual se alimenta, no caso a cana de açúcar.

Buscou-se genes específicos para a degradação de EPS, e somente *Bacillus spp.* SLBac4, em comparação das demais cepas bacterianas, apresentou potencial para biodegradação deste polímero. Os genes encontrados foram organizados numa possível via metabólica e mostraram que há dois ortólogos de enzimas envolvidas na oxidação da cadeia lateral no anel aromático do estireno - um estireno monooxigenase e uma fenilacetaldeído desidrogenase. Consecutivamente, encontrou-se mais duas enzimas envolvidas no ataque direto do anel aromático do estireno para degradação do monômero - a catecol 2,3-dioxigenase e uma hidrolase de semialdeído de 2-hidroxiuconato. Os genes encontrados foram organizados numa possível via metabólica e mostraram que há dois ortólogos de enzimas envolvidas na oxidação da cadeia lateral no anel aromático do estireno - um estireno monooxigenase e uma fenilacetaldeído desidrogenase. Consecutivamente, encontrou-se mais duas enzimas envolvidas no ataque direto do anel aromático do estireno para degradação do monômero - a catecol 2,3-dioxigenase e uma hidrolase de semialdeído de 2-hidroxiuconato.

A partir da caracterização *in silico* do estireno monooxigenase da cepa SLBac4, verificamos de que se trata de uma enzima ortóloga (de baixa identidade ~30%) às descritas em outros microrganismos, mantendo sua relativa acidez, estabilidade mediante variações de temperatura e solubilidade. Quando comparamos os motivos encontrados em outras estireno monooxigenases, encontramos uma conservação dos mesmos na enzima presente na cepa SLBac4, incluindo os sítios cruciais para a atividade. Por fim, nosso trabalho é precursor de estudos futuros da degradação de EPS *in vitro* utilizando-se a cepa SLBac4 ou diretamente suas enzimas produzidas de forma recombinante.

Referências

- Adams, A. S., Jordan, M. S., Adams, S. M., Suen, G., Goodwin, L. A., Davenport, K. W., & Raffa, K. F. (2011). Cellulose-degrading bacteria associated with the invasive woodwasp *Sirex noctilio*. *The ISME journal*, 5(8), 1323-1331.
- Ahmed, T., Shahid, M., Azeem, F., Rasul, I., Shah, A. A., Noman, M., & Research, P. (2018). Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environmental Science*, 25(8), 7287-7298.
- Ali, S. S., Elsamahy, T., Al-Tohamy, R., Zhu, D., Mahmoud, Y., Koutra, E., Sun, & J. (2021). Plastic wastes biodegradation: mechanisms, challenges and future prospects. *Science of The Total Environment*, 780, 146590.
- Almeida, L. G. d., Moraes, L. A. B. d., Trigo, J. R., Omoto, C., & Consoli, F. L. (2017). The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. *PloS one*, 12(3), e0174754.
- Anbuselvi, S., & Pandey, V. (2015). A comparative study of LDPE degrading bacteria from polythene dumped garbage. *Int J Pharm Technol*.
- Anwar, M., Negi, H., Zaidi, M., Haider, G., Gupta, S., & Goel, R. (2013). Biodeterioration studies of thermoplastics in nature using indigenous bacterial consortium. *Brazilian Archives of Biology Technology*, 56, 475-484.
- Arias-Barrau, E., Olivera, E. R., Luengo, J. M., Fernández, C., Galán, B., García, J. L., . . . Miñambres, B. (2004). The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology*, 186(15), 5062-5077.

- Arkatkar, A., Arutchelvi, J., Bhaduri, S., Uppara, P. V., & Doble, M. (2009). Degradation of unpretreated and thermally pretreated polypropylene by soil consortia. *International Biodeterioration Biodegradation*, 63(1), 106-111.
- Arkatkar, A., Juwarkar, A. A., Bhaduri, S., Uppara, P. V., & Doble, M. (2010). Growth of *Pseudomonas* and *Bacillus* biofilms on pretreated polypropylene surface. *International Biodeterioration Biodegradation*, 64(6), 530-536.
- Auta, H., Emenike, C., & Fauziah, S. (2017). Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation. *Environmental Pollution*, 231, 1552-1559.
- Auta, H. S., Emenike, C. U., Jayanthi, B., & Fauziah, S. H. (2018). Growth kinetics and biodeterioration of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. isolated from mangrove sediment. *Marine Pollution Bulletin*, 127, 15-21.
- Bae, J., woo Cho, H., Jung, H., Park, J., Yun, S., Ha, S., & Kim, T. J. (2021). Changes in Intestinal Microbiota Due to the Expanded Polystyrene Diet of Mealworms (*Tenebrio molitor*). *Indian Journal of Microbiology*, 61(2), 130-136.
- Bahl, S., Dolma, J., Singh, J. J., & Sehgal, S. (2021). Biodegradation of plastics: A state of the art review. *Materials Today: Proceedings*, 39, 31-34.
- Bano, K., Kuddus, M., R Zaheer, M., Zia, Q., F Khan, M., Gupta, A., & Aliev, G. (2017). Microbial enzymatic degradation of biodegradable plastics. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18(5), 429-440.
- Barreto-Triana, N., dos Santos Dias, C. T., & S Bento, J. M. (2014). Comportamiento reproductivo del picudo de la caña, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) en laboratorio. *Revista Colombiana de Entomología*, 40(2), 265-271.

- Barcellos, M. (2017). Determinação de fenitroton em alvos artificiais de algodão por HPLC-UV e de pesticidas em resíduos sólidos por GC/MS. 189-230.
- Beltrametti, F., Marconi, A. M., Bestetti, G., Colombo, C., Galli, E., Ruzzi, M., & Zennaro, E. (1997). Sequencing and functional analysis of styrene catabolism genes from *Pseudomonas fluorescens* ST. *Applied Environmental Microbiology* 63(6), 2232-2239.
- Biki, S. P., Mahmud, S., Akhter, S., Rahman, M. J., Rix, J. J., Al Bachchu, M. A., & Ahmed, M. (2021). Polyethylene degradation by *Ralstonia* sp. strain SKM2 and *Bacillus* spp. strain SM1 isolated from land fill soil site. *Environmental Technology Innovation* 22, 101495.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. J. B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. 30(15), 2114-2120.
- Bosi, E., Donati, B., Galardini, M., Brunetti, S., Sagot, M.-F., Lió, P., & Fondi, M. J. B. (2015). MeDuSa: a multi-draft-based scaffold. 31(15), 2443-2451.
- Bühler, B., & Schmid, A. (2004). Process implementation aspects for biocatalytic hydrocarbon oxyfunctionalization. *Journal of Biotechnology* 113(1-3), 183-210.
- Buck, F., Vithayathil, A., Bier, M., & Nord, F. (1962). On the mechanism of enzyme action. LXXIII. Studies on trypsin from beef, sheep and pig pancreas. *Archives of biochemistry biophysics*, 97(2), 417-424.
- Brandon, A. M., Gao, S.-H., Tian, R., Ning, D., Yang, S.-S., Zhou, J., Criddle, C. S. (2018). Biodegradation of polyethylene and plastic mixtures in mealworms (larvae of *Tenebrio molitor*) and effects on the gut microbiome. *Environmental science technology*, 52(11), 6526-6533.
- Brown, S. D., Palumbo, A. V., Panikov, N., Ariyawansa, T., Klingeman, D. M., Johnson, C. M., & Epstein, S. S. (2012). Draft genome sequence for *Microbacterium laevaniformans* strain OR221, a bacterium tolerant to metals, nitrate, and low pH. In (Vol. 12): Am Soc Microbiol.

- Caracciolo, A. B., Topp, E., & Grenni, P. (2015). Pharmaceuticals in the environment: biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 106, 25-36.
- Casteliani, A., de Fatima Martins, L., Cardoso, J. F. M., Silva, M. S. O., da Silva, R. S. A., Chacon-Orozco, J. G., & Leite, L. G. (2020). Behavioral aspects of *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), damage to sugarcane and its natural infection by *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Rhabditidae). *Crop Protection*, 137, 105262.
- CORPET, F. (1988). Alinhamento de sequência múltipla com agrupamento hierárquico. *Nucl. Ácidos Res*, 16(22), 10881-10890.
- Chae, Y., & An, Y. J. (2018). Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem: A review. *Environmental pollution* 240, 387-395.
- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., & Engineering. (2020). Degradation rates of plastics in the environment. *ACS Sustainable Chemistry*, 8(9), 3494-3511.
- Chen, B., Yu, T., Xie, S., Du, K., Liang, X., Lan, Y., & Shao, Y. (2018). Comparative shotgun metagenomic data of the silkworm *Bombyx mori* gut microbiome. *Scientific data*, 5(1), 1-10.
- Chen, C., Khaleel, S. S., Huang, H., & Wu, C. H. (2014). Software for pre-processing Illumina next-generation sequencing short read sequences. *Source code for biology medicine*, 9(1), 1-11.
- Chen, W., Hao, H., Hughes, D., Shi, Y., Cui, J., Li, Z. X. J. M., & Design. (2015). Static and dynamic mechanical properties of expanded polystyrene. 69, 170-180.

- Chia, W. Y., Tang, D. Y. Y., Khoo, K. S., Lup, A. N. K., Chew, K. W., & Ecotechnology. (2020). Nature's fight against plastic pollution: Algae for plastic biodegradation and bioplastics production. *Environmental Science*, 100065.
- Choo, J. P., Kammerer, R. A., Li, X., & Li, Z. (2021). High-Level Production of Phenylacetaldehyde using Fusion-Tagged Styrene Oxide Isomerase. *Advanced Synthesis Catalysis* 363(6), 1714-1721.
- Chun, J., & Rainey, F. A. (2014). Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *International journal of systematic evolutionary microbiology* 64(Pt_2), 316-324.
- Cícero, E. A. S., Ferraudo, A. S., & Lemos, M. V. F. (2009). Identification of cry genes from *Bacillus thuringiensis* effective against *Sphenophorus levis*, the sugar-cane borer. *Bragantia*, 68(4), 817-823.
- Cui, C., Guo, C., Lin, H., Ding, Z.-Y., Liu, Y., & Wu, Z.-L. (2020). Functional characterization of an (R)-selective styrene monooxygenase from streptomyces sp. NRRL S-31. *Enzyme Microbial Technology* 132, 109391.
- Cui, C., Guo, C., Lin, H., Ding, Z.-Y., Liu, Y., & Wu, Z.-L. (2020). Functional characterization of an (R)-selective styrene monooxygenase from streptomyces sp. NRRL S-31. *Enzyme Microbial Technology*. 132, 109391.
- Cunha, D., Xavier, R., & de Castro, L. N. (2018). Bacterial colonies as complex adaptive systems. *Natural Computing*, 17(4), 781-798.
- Dang, T. C. H., Nguyen, D. T., Thai, H., Nguyen, T. C., Tran, T. T. H., Le, V. H., & Nguyen, Q. T. (2018). Plastic degradation by thermophilic *Bacillus* spp. BCBT21 isolated from composting agricultural residual in Vietnam. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience Nanotechnology* 9(1), 015014.

- Dantur, K. I., Enrique, R., Welin, B., & Castagnaro, A. P. (2015). Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. *Amb Express*, 5(1), 1-11.
- Deepa, D. (2019). Biodegradation of Low-Density Polyethylene by Selected *Bacillus* spp. *Gazi University Journal of Science*, 32(3), 802-813.
- Degaspari, N., Botelho, P. S. M., de Almeida, L. C., & Castilho, H. J. (1987a). Biologia de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col.: Curculionidae), em dieta artificial a no campo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 22(6), 553-558.
- Degaspari, N., Botelho, P. S. M., de Almeida, L. C., & Castilho, H. J. J. P. A. B. (1987b). Biologia de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col.: Curculionidae), em dieta artificial a no campo. 22(6), 553-558.
- Diep, C. N., & Hieu, T. N. (2013). Phosphate and potassium solubilizing bacteria from weathered materials of denatured rock mountain, Ha Tien, Kiên Giang province Vietnam. *Am J Life Sci*, 1(3), 88-92.
- Díez-Méndez, A., García-Fraile, P., Solano, F., & Rivas, R. J. S. r. (2019). The ant *Lasius niger* is a new source of bacterial enzymes with biotechnological potential for bleaching dye. 9(1), 1-11.
- Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual review of entomology*, 60, 17-34.
- Douriet-Gámez, N. R., Maldonado-Mendoza, I. E., Ibarra-Laclette, E., Blom, J., & Calderón-Vázquez, C. L. (2018). Genomic analysis of *Bacillus* spp. strain B25, a biocontrol agent of maize pathogen *Fusarium verticillioides*. *Current microbiology*, 75(3), 247-255.
- Duarte, I. O. (2021). Montagem e análise do genoma de *Bacillus vallismortis* TIM68: uma bactéria produtora de biossurfactantes.

- Duvaud, S., Gabella, C., Lisacek, F., Stockinger, H., Ioannidis, V., & Durinx, C. (2021). Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic acids research*, *49*(W1), W216-W227.
- Engel, P., & Moran, N. A. J. F. m. r. (2013). The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *37*(5), 699-735.
- Evangelista, D. E., de Paula, F. F. P., Rodrigues, A., & Henrique-Silva, F. (2015). Pectinases from *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae): putative accessory digestive enzymes. *Journal of Insect Science*, *15*(1).
- Feldhaar, H., & Gross, R. (2009). Insects as hosts for mutualistic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, *299*(1), 1-8.
- Gamage, D. G., Gunaratne, A., Periyannan, G. R., & Russell, T. G. (2019). Applicability of instability index for in vitro protein stability prediction. *Protein Peptide Letters*, *26*(5), 339-347.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017a). Producción, uso y destino de todos los plásticos jamás fabricados. *Science Advances*, *3*(7), 1207-1221.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017b). Production, use, and fate of all plastics ever made. *J Science advances*, *3*(7), e1700782.
- Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N., & Fava, F. (2019). Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*. *New biotechnology*, *52*, 35-41.
- Gilliot, P.-A., & Gorochofski, T. E. (2020). Sequencing enabling design and learning in synthetic biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, *58*, 54-62.
- Greń, I., Wojcieszńska, D., Guzik, U., Perkosz, M., & Hupert-Kocurek, K. (2010). Enhanced biotransformation of mononitrophenols by *Stenotrophomonas*

maltophilia KB2 in the presence of aromatic compounds of plant origin. *World Journal of Microbiology Biotechnology* 26(2), 289-295.

Grimsley, G. R., Scholtz, J. M., & Pace, C. N. (2009). A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins. *Protein Science*, 18(1), 247-251.

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075. doi:10.1093/bioinformatics/btt086 %J Bioinformatics

Hammer, J., Kraak, M. H., Parsons, J. R., & toxicology. (2012). Plastics in the marine environment: the dark side of a modern gift. *Reviews of environmental contamination*, 1-44.

Hansen, A. K., & Moran, N. A. (2014). The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Molecular ecology*, 23(6), 1473-1496.

Harrison, J. P., Boardman, C., O'Callaghan, K., Delort, A. M., & Song, J. (2018). Biodegradability standards for carrier bags and plastic films in aquatic environments: a critical review. *Royal Society open science*, 5(5), 171792.

Hartmans, S., Smits, J., Van der Werf, M., Volkering, F., & De Bont, J. (1989). Metabolism of styrene oxide and 2-phenylethanol in the styrene-degrading Xanthobacter strain 124X. *Applied Environmental Microbiology* 55(11), 2850-2855.

Halligan, B. D. (2009). ProMoST: a tool for calculating the pI and molecular mass of phosphorylated and modified proteins on two-dimensional gels. *Phospho-Proteomics*, 283-298.

Hartmans, S., Smits, J., Van der Werf, M., Volkering, F., De Bont, J. J. A., & Microbiology, E. (1989). Metabolism of styrene oxide and 2-phenylethanol in the styrene-degrading Xanthobacter strain 124X. 55(11), 2850-2855.

- Heine, T., Scholtissek, A., Westphal, A. H., van Berkel, W. J., & Tischler, D. (2017). N-terminus determines activity and specificity of styrene monooxygenase reductases. *Biochimica et Biophysica Acta -Proteins Proteomics*, 1865(12), 1770-1780.
- Hirsch, P. R., Mauchline, T. H., & Clark, I. M. (2010). Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology Biochemistry*, 42(6), 878-887.
- Ho, B. T., Roberts, T. K., & Lucas, S. (2018). An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach. *Critical reviews in biotechnology*, 38(2), 308-320.
- Hu, F.-Y., & Tsai, C.-W. (2020). Nutritional Relationship between Bemisia tabaci and Its Primary Endosymbiont, *Portiera aleyrodidarum*, during Host Plant Acclimation. *Insects*, 11(8), 498.
- Huijbers, M. M., Montersino, S., Westphal, A. H., Tischler, D., van Berkel, W. J. J. A. o. b., & biophysics. (2014). Flavin dependent monooxygenases. 544, 2-17.
- Hyatt, D., Chen, G.-L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 119. doi:10.1186/1471-2105-11-119
- Ibiene, A., Stanley, H., & Immanuel, O. (2013). Biodegradation of polyethylene by Bacillus spp. indigenous to the Niger delta mangrove swamp. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 26, 68-78.
- Iram, D., Riaz, R., & Iqbal, R. K. (2019). Usage of potential micro-organisms for degradation of plastics. *Open Journal of Environmental Biology*, 4(1), 007-015.

- Jabeen, F., Hussain, A., Manzoor, M., Younis, T., Rasul, A., & Qazi, J. I. (2018). Potential of bacterial chitinolytic, *Stenotrophomonas maltophilia*, in biological control of termites. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28(1), 1-10.
- Jacques, R. J. S., Silva, K. J. d., Bento, F. M., & Camargo, F. A. d. O. J. C. R. (2010). Bioremediation of a soil contaminated with anthracene under different chemical and physical conditions. *40(2)*, 280-287.
- Jaiswal, S., Sharma, B., Shukla, P., & Innovation. (2020). Integrated approaches in microbial degradation of plastics. *Environmental Technology*, 17, 100567.
- Jeon, H. J., & Kim, M. N. (2016). Isolation of mesophilic bacterium for biodegradation of polypropylene. *International Biodeterioration Biodegradation*, 115, 244-249.
- Jin, C. E., & Kim, M. N. (2017). Change of bacterial community in oil-polluted soil after enrichment cultivation with low-molecular-weight polyethylene. *International Biodeterioration Biodegradation*, 118, 27-33.
- Kathiresan, K. (2003). Polythene and plastics-degrading microbes from the mangrove soil. *Revista de biologia tropical*, 51(3-4), 629-633.
- Khandare, S. D., Chaudhary, D. R., & Jha, B. (2021). Bioremediation of polyvinyl chloride (PVC) films by marine bacteria. *Marine Pollution Bulletin*, 169, 112566.
- Kim, H. R., Lee, H. M., Yu, H. C., Jeon, E., Lee, S., Li, J., & Kim, D.-H. (2020). Biodegradation of polystyrene by *Pseudomonas* sp. isolated from the gut of superworms (larvae of *Zophobas atratus*). *Environmental science technology* 54(11), 6987-6996.

- Kikuchi, Y., Hosokawa, T., & Fukatsu, T. (2008). Diversity of bacterial symbiosis in stinkbugs. In *Microbial ecology research trends* (pp. 39-63): Nova Science Publishers, Inc.
- Kindström, P. (2018). *Working Towards the Heterologous Expression of Styrene Monooxygenases for Styrene Epoxidation and Reaction Cascades*. (Degree Project C in Chemistry), Uppsala Universitet, Suécia,
- Kloepper, J. W., Ryu, C.-M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, *94*(11), 1259-1266.
- Kyaw, B. M., Champakalakshmi, R., Sakharkar, M. K., Lim, C. S., & Sakharkar, K. R. (2012). Biodegradation of low-density polythene (LDPE) by *Pseudomonas* species. *Indian journal of microbiology* *52*(3), 411-419.
- Lautenbach, V., Hosseinpour, S., & Peukert, W. (2021). Isoelectric point of proteins at hydrophobic interfaces. *Frontiers in Chemistry*, 602.
- Lee, E. Y., Jun, Y. S., Cho, K.-S., & Ryu, H. W. (2002). Degradation characteristics of toluene, benzene, ethylbenzene, and xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. *Journal of the Air Waste Management Association* *52*(4), 400-406.
- Lesk, A. (2019). *Introduction to bioinformatics*: Oxford university press.
- Lin, H., Liu, J.-Y., Wang, H.-B., Ahmed, A. A. Q., & Wu, Z.-L. (2011). Biocatalysis as an alternative for the production of chiral epoxides: a comparative review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *72*(3-4), 77-89.
- Lin, H., Tang, D.-F., Ahmed, A. A. Q., Liu, Y., & Wu, Z. L. (2012). Mutations at the putative active cavity of styrene monooxygenase: enhanced activity and reversed enantioselectivity. *Journal of Biotechnology*, *161*(3), 235-241.

- Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K., & Lam, T. W. J. B. (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *31(10)*, 1674-1676.
- Li, D., Luo, R., Liu, C.-M., Leung, C.-M., Ting, H.-F., Sadakane, K., & Lam, T. W. J. M. (2016). MEGAHIT v1. 0: a fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices. *102*, 3-11.
- Li, X.-Q., & Du, D. (2014). Variation, evolution, and correlation analysis of C+ G content and genome or chromosome size in different kingdoms and phyla. *PLoS One*, *9(2)*, e88339.
- López Nava, J., Méndez González, J., Ruelas Chacón, X., & Nájera Luna, J. (2016). Assessment of edible fungi and films bio-based material simulating expanded polystyrene. *Materials and Manufacturing Processes*, *31(8)*, 1085-1090.
- Maharana, T., Negi, Y., Mohanty, B. J. P.-P. T., & Engineering. (2007). Recycling of polystyrene. *46(7)*, 729-736.
- Matjašič, T., Simčič, T., Medvešček, N., Bajt, O., Dreo, T., & Mori, N. (2021). Critical evaluation of biodegradation studies on synthetic plastics through a systematic literature review. *Science of the Total Environment*, *752*, 141959.
- Math, R. K., Kambiranda, D., Yun, H. D., & Ghebreiyessus, Y. (2020). Binding of cloned Cel enzymes on clay minerals related to the pl of the enzymes and database survey of cellulases of soil bacteria for pl. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, *84(2)*, 238-246.
- Mende, D. R., Letunic, I., Maistrenko, O. M., Schmidt, T. S., Milanese, A., Paoli, L., & Sunagawa, S. (2020). proGenomes2: an improved database for accurate and consistent habitat, taxonomic and functional annotations of prokaryotic genomes. *Nucleic acids research*, *48(D1)*, D621-D625.

- Menegazzo, R. R. (2015). *Montagem, anotação e comparação do genoma parcial da bactéria Azoarcus olearius DQS4*. (mestrado), universidade federal do paranà,
- Milano, H. d. S. (2012). Identificação de microrganismos dos tratos digestivos de pragas de cana-de-açúcar com atividade enzimática para degradação de substratos lignocelulósicos e potencial de bioconversão de D-xilose em xilitol. (Mestrado), Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil. (CDU 633.61:579.64)
- Miljaković, D., Marinković, J., & Balešević-Tubić, S. (2020). The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, 8(7), 1037.
- Milne, J. E., Storz, T., Colyer, J. T., Thiel, O. R., Dilmeghani Seran, M., Larsen, R. D., & Murry, J. A. (2011). Iodide-catalyzed reductions: development of a synthesis of phenylacetic acids. *The Journal of organic chemistry*, 76(22), 9519-9524.
- Mingot, J. M., Peñalva, M. A., & Fernández-Cañón, J. M. (1999). Disruption of *phacA*, an *Aspergillus nidulans* gene encoding a novel cytochrome P450 monooxygenase catalyzing phenylacetate 2-hydroxylation, results in penicillin overproduction. *Journal of Biological Chemistry* 274(21), 14545-14550.
- Morales-Jiménez, J., Zúñiga, G., Ramírez-Saad, H. C., & Hernández-Rodríguez, C. (2012). Gut-associated bacteria throughout the life cycle of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* Thomas and Bright (Curculionidae: Scolytinae) and their cellulolytic activities. *Microbial Ecology*, 64(1), 268-278.
- Mohamad Sobri, M. F., Abd-Aziz, S., Abu Bakar, F. D., & Ramli, N. (2020). In-silico characterization of glycosyl hydrolase family 1 β -glucosidase from

Trichoderma asperellum UPM1. *International journal of molecular sciences*

Mohan, A. J., Sekhar, V. C., Bhaskar, T., & Nampoothiri, K. M. J. B. t. (2016). Microbial assisted high impact polystyrene (HIPS) degradation. *213*, 204-207.

Mohanan, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., & Levin, D. B. (2020). Microbial and enzymatic degradation of synthetic plastics. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 2837.

Montazer, Z., Habibi Najafi, M. B., & Levin, D. B. (2020). Challenges with verifying microbial degradation of polyethylene. *Polymers*, *12*(1), 123.

Montersino, S., Tischler, D., Gassner, G. T., van Berkel, W. J. J. A. S., & Catalysis. (2011). Catalytic and structural features of flavoprotein hydroxylases and epoxidases. *353*(13), 2301-2319.

Mooney, A., Ward, P. G., & O'Connor, K. E. (2006). Microbial degradation of styrene: biochemistry, molecular genetics, and perspectives for biotechnological applications. *Applied microbiology biotechnology* *72*(1), 1-10.

Musto, H., Naya, H., Zavala, A., Romero, H., Alvarez-Valín, F., & Bernardi, G. (2006). Genomic GC level, optimal growth temperature, and genome size in prokaryotes. *Biochemical biophysical research communications* *347*(1), 1-3.

Mukherjee, S., RoyChaudhuri, U., & Kundu, P. P. (2017). Anionic surfactant induced oxidation of low-density polyethylene followed by its microbial biodegradation. *International Biodeterioration Biodegradation*, *117*, 255-268.

Naima, A., Safia, A., Bashir, A., & Geoffery, R. (2010). Isolation and identification of polystyrene biodegrading bacteria from soil. *African Journal of Microbiology Research*, *4*(14), 1537-1541.

- Nagarajan, N., & Pop, M. (2013). Sequence assembly demystified. *Nature Reviews Genetics*, 14(3), 157-167.
- Nasir, H., Noda, H. J. A. o. I. B., & America, P. P. i. C. w. t. E. S. o. (2003). Yeast-like symbiotes as a sterol source in anobiid beetles (Coleoptera, Anobiidae): possible metabolic pathways from fungal sterols to 7-dehydrocholesterol. 52(4), 175-182.
- Narciso-Ortiz, L., Coreño-Alonso, A., Mendoza-Olivares, D., Lucho-Constantino, C. A., & Lizardi-Jiménez, M. A. (2020). Baseline for plastic and hydrocarbon pollution of rivers, reefs, and sediment on beaches in Veracruz State, México, and a proposal for bioremediation. *Environmental Science Pollution Research*, 27(18), 23035-23047.
- Nogales, J., Macchi, R., Franchi, F., Barzaghi, D., Fernandez, C., Garcia, J. L., & Diaz, E. (2007). Characterization of the last step of the aerobic phenylacetic acid degradation pathway. *Microbiology*, 153(2), 357-365.
- O'Leary, N. D., O'Connor, K. E., & Dobson, A. D. (2002). Biochemistry, genetics and physiology of microbial styrene degradation. *FEMS microbiology reviews*, 26(4), 403-417.
- Otto, K., Hofstetter, K., Röthlisberger, M., Witholt, B., & Schmid, A. (2004). Biochemical characterization of StyAB from *Pseudomonas* sp. strain VLB120 as a two-component flavin-diffusible monooxygenase. *Journal of bacteriology*, 186(16), 5292-5302.
- Oelschlägel, M., Kaschabek, S. R., Zimmerling, J., Schlömann, M., & Tischler, D. (2015). Co-metabolic formation of substituted phenylacetic acids by styrene-degrading bacteria. *Biotechnology Reports*, 6, 20-26.
- Oelschlägel, M., Zimmerling, J., & Tischler, D. (2018). A review: the styrene metabolizing cascade of side-chain oxygenation as biotechnological basis to gain various valuable compounds. *Frontiers in microbiology*, 9, 490.

- O'Leary, N. D., O'Connor, K. E., & Dobson, A. D. (2002). Biochemistry, genetics and physiology of microbial styrene degradation. *FEMS microbiology reviews*, 26(4), 403-417.
- Oelschlägel, M., Zimmerling, J., & Tischler, D. (2018). A review: the styrene metabolizing cascade of side-chain oxygenation as biotechnological basis to gain various valuable compounds. *Frontiers in microbiology*, 9, 490.
- Park, M.-S., Bae, J.-W., Han, J.-H., Lee, E.-Y., Lee, S. G., & Park, S. H. (2006). Characterization of styrene catabolic genes of *Pseudomonas putida* SN1 and construction of a recombinant *Escherichia coli* containing styrene monooxygenase gene for the production of (S)-styrene oxide. 16(7), 1032-1040.
- Patil, R., & Bagde, U. (2016a). Development of novel bacterial strains for enhanced biodegradation of plastic polymers by protoplast fusion. *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.*, 18(2), 513-523.
- Patil, R., & Bagde, U. (2016b). Development of novel bacterial strains for enhanced biodegradation of plastic polymers by protoplast fusion. *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.*, 18(2), 513-523.
- Pathak, V. M. (2017). Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. *Bioresources Bioprocessing*, 4(1), 1-31.
- Patrauchan, M. A., Florizone, C., Eapen, S., Gómez-Gil, L., Sethuraman, B., Fukuda, M., & Eltis, L. D. (2008). Roles of ring-hydroxylating dioxygenases in styrene and benzene catabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Journal of bacteriology*, 190(1), 37-47.
- Pavlu, F. A., & Molin, J. P. (2016). A sampling plan and spatial distribution for site-specific control of *Sphenophorus levis* in sugarcane. *Acta Scientiarum. Agronomy* 38, 279-287.

- Peng, B.-Y., Chen, Z., Chen, J., Yu, H., Zhou, X., Criddle, C. S., & Zhang, Y. (2020). Biodegradation of polyvinyl chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Environment International*, *145*, 106106.
- Peng, B.-Y., Su, Y., Chen, Z., Chen, J., Zhou, X., Benbow, M. E., & Zhang, Y. (2019). Biodegradation of polystyrene by dark (*Tenebrio obscurus*) and yellow (*Tenebrio molitor*) mealworms (Coleoptera: Tenebrionidae). *Environmental science technology*, *53*(9), 5256-5265.
- Pervez, M. T., Babar, M. E., Nadeem, A., Aslam, M., Awan, A. R., Aslam, N., Waheed, U. (2014). Evaluating the accuracy and efficiency of multiple sequence alignment methods. *Evolutionary Bioinformatics*, *10*, EBO. S19199.
- Plastic-Europe. Os Fatos 2019: Uma Análise dos Dados Europeus de Produção, Demanda e Resíduos de Plásticos (EB/OL). 2019 [cited 2021 25 de agosto]; Available from: <http://www.plasticseurope.org>
- Puglisi, E., Romaniello, F., Galletti, S., Boccaleri, E., Frache, A., & Cocconcelli, P. S. (2019). Selective bacterial colonization processes on polyethylene waste samples in an abandoned landfill site. *Scientific reports*, *9*(1), 1-13.
- Pontes, D. S., Lima-Bittencourt, C. I., Chartone-Souza, E., & Amaral Nascimento, A. M. (2007). Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* *34*(7), 463-473.
- Pu, W., Cui, C., Guo, C., & Wu, Z.-L. (2018). Characterization of two styrene monooxygenases from marine microbes. *Enzyme microbial technology* *112*, 29-34.

- Puglisi, E., Romaniello, F., Galletti, S., Boccaleri, E., Frache, A., & Cocconcelli, P. S. (2019). Selective bacterial colonization processes on polyethylene waste samples in an abandoned landfill site. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- Przemieniecki, S. W., Kosewska, A., Ciesielski, S., & Kosewska, O. (2020). Changes in the gut microbiome and enzymatic profile of *Tenebrio molitor* larvae biodegrading cellulose, polyethylene and polystyrene waste. *Environmental Pollution*, 256, 113265.
- Rahimi, A., & García, J. M. J. N. R. C. (2017). Chemical recycling of waste plastics for new materials production. 1(6), 1-11.
- Rahman, N. A., Parks, D. H., Willner, D. L., Engelbrektson, A. L., Goffredi, S. K., Warnecke, F., & Hugenholtz, P. (2015). A molecular survey of Australian and North American termite genera indicates that vertical inheritance is the primary force shaping termite gut microbiomes. *Microbiome*, 3(1), 1-16.
- Ramli Sulong, N. H., Mustapa, S. A. S., & Abdul Rashid, M. K. J. J. o. A. P. S. (2019). Application of expanded polystyrene (EPS) in buildings and constructions: A review. 136(20), 47529.
- Raziyafathima, M., Praseetha, P., & Rimal Isaac, R. (2016). Microbial degradation of plastic waste: a review. *Pharm Chem Biol Sci*, 4(2), 231-242.
- Reichenberger, E. R., Rosen, G., Hershberg, U., & Hershberg, R. (2015). Prokaryotic Nucleotide Composition Is Shaped by Both Phylogeny and the Environment. *Genome Biology and Evolution*, 7(5), 1380-1389. doi:10.1093/gbe/evv063 %J Genome Biology and Evolution
- Rinke, R., Costa, A., Fonseca, F., Almeida, L., Júnior, I. D., & Henrique-Silva, F. (2011a). Microbial diversity in the larval gut of field and laboratory populations of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis* (Coleoptera, Curculionidae). *Genet Mol Res*, 10(4), 2679-2691.

- Rinke, R., Costa, A., Fonseca, F., Almeida, L., Júnior, I. D., & Henrique-Silva, F. J. G. M. R. (2011b). Microbial diversity in the larval gut of field and laboratory populations of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis* (Coleoptera, Curculionidae). *10*(4), 2679-2691. Rinke, R., Costa, A., Fonseca, F., Almeida, L., Júnior, I. D., & Henrique-Silva, F. (2011). Microbial diversity in the larval gut of field and laboratory populations of the sugarcane weevil *Sphenophorus levis* (Coleoptera, Curculionidae). *Genet Mol Res*, *10*(4), 2679-2691.
- Rodrigues, N., Andrietta, M., Andrietta, S., & Santos, P. J. P. D. (2010). Diclosulam biodegradation by bacteria isolated from soybean cultivated soils. *28*(2), 373-400.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, J., Ramírez-Puebla, S. T., Vera-Ponce de León, A., Rosas-Pérez, T., Bustamante-Brito, R., . . . Martínez-Romero, E. (2018). Endosymbiotic microorganisms of scale insects. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, *21*(1), 53-69.
- Ru, J., Huo, Y., & Yang, Y. (2020). Microbial degradation and valorization of plastic wastes. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 442.
- Salazar, F., Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2017). Characterization of two novel bacteriocin-like substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149 with broad-spectrum antimicrobial activity. *Journal of global antimicrobial resistance*, *11*, 177-182.
- Salem, H., Florez, L., Gerardo, N., & Kaltenpoth, M. (2015). An out-of-body experience: the extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1804), 20142957.
- Salmonová, H., & Bunešová, V. (2017). Methods of studying diversity of bacterial communities: a review. *Scientia agriculturae bohemica*, *48*(3), 154-165.

- Salzberg, S. L., Phillippy, A. M., Zimin, A., Puiu, D., Magoc, T., Koren, S., & Roberts, M. (2012). GAGE: A critical evaluation of genome assemblies and assembly algorithms. *Genome research*, 22(3), 557-567.
- Santo, M., Weitsman, R., & Sivan, A. (2013). The role of the copper-binding enzyme–laccase–in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. *International Biodeterioration Biodegradation*, 84, 204-210.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology advances*, 26(3), 246-265.
- Sharma, A., & Sharma, A. (2004). Degradation assessment of low-density polythene (LDP) and polythene (PP) by an indigenous isolate of *Pseudomonas stutzeri*.
- Shwed, P. S., Crosthwait, J., Weedmark, K., Hoover, E., & Dussault, F. (2021). Complete Genome Sequences of *Priestia megaterium* Type and Clinical Strains Feature Complex Plasmid Arrays. *Microbiology Resource Announcements*, 10(27), e00403-00421.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069.
- Shen, L., Zang, X., Sun, K., Chen, H., Che, X., Sun, Y., & Chen, G. (2021). Complete genome sequencing of *Bacillus* spp. TK-2, analysis of its cold evolution adaptability. *Scientific reports* 11(1), 1-11.
- Shi, W., Ding, S. Y., & Yuan, J. S. J. B. R. (2011). Comparison of insect gut cellulase and xylanase activity across different insect species with distinct food sources. 4(1), 1-10.
- Silva, M. S. O., Cardoso, J. F. M., Ferreira, M. E. P., Baldo, F. B., Silva, R. S. A., Chacon-Orozco, J. G., & Leite, L. G. (2021). An Assessment of

- Steinernema rarum* as a Biocontrol Agent in Sugarcane with Focus on *Sphenophorus levis*, Host-Finding Ability, Compatibility with Vinasse and Field Efficacy. *Agriculture*, 11(6), 500.
- Singh, B., Sharma, N., & stability. (2008). Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer degradation*, 93(3), 561-584.
- Sivan, A. (2011). New perspectives in plastic biodegradation. *Current opinion in biotechnology*, 22(3), 422-426.
- Sivan, A., Szanto, M., & Pavlov, V. (2006). Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. *Applied microbiology biotechnology*, 72(2), 346-352.
- Skariyachan, S., Taskeen, N., Kishore, A. P., Krishna, B. V., & Naidu, G. (2021). Novel consortia of *Enterobacter* and *Pseudomonas* formulated from cow dung exhibited enhanced biodegradation of polyethylene and polypropylene. *Journal of Environmental Management*, 284, 112030.
- Skariyachan, S., Manjunatha, V., Sultana, S., Jois, C., Bai, V., & Vasist, K. S. (2016). Novel bacterial consortia isolated from plastic garbage processing areas demonstrated enhanced degradation for low density polyethylene. *Environmental Science Pollution Research*, 23(18), 18307-18319.
- Skariyachan, S., Setlur, A. S., Naik, S. Y., Naik, A. A., Usharani, M., & Vasist, K. S. (2017). Enhanced biodegradation of low and high-density polyethylene by novel bacterial consortia formulated from plastic-contaminated cow dung under thermophilic conditions. *Environmental Science Pollution Research*, 24(9), 8443-8457.
- Song, Y. K., Hong, S. H., Eo, S., Han, G. M., Shim, W. J., & Technology. (2020). Rapid production of micro-and nanoplastics by fragmentation of expanded polystyrene exposed to sunlight. *Environmental Science*, 54(18), 11191-11200.

- Souvorov, A., Agarwala, R., & Lipman, D. J. J. G. b. (2018). SKESA: strategic k-mer extension for scrupulous assemblies. *19*(1), 1-13.
- Souvorov, A., & Agarwala, R. J. B. b. (2021). SAUTE: sequence assembly using target enrichment. *22*(1), 1-22.
- Steinegger, M., & Söding, J. J. N. b. (2017). MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. *35*(11), 1026-1028.
- Stepien, A. E., Zebrowski, J., Piszczyk, Ł., Boyko, V. V., Riabov, S. V., Dmitrieva, T., Ryszkowska, J. (2017). Assessment of the impact of bacteria *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and yeast *Yarrowia lipolytica* on commercial poly (ether urethanes). *Polymer Testing*, *63*, 484-493.
- Strand, M. R., & Burke, G. R. (2015). Polydnviruses: from discovery to current insights. *Virology*, *479*, 393-402.
- Sunil, G., Yang, Y., Jae-Hyung, A., & Hor-Gil, H. (2020). Biodegradation of polyethylene: a brief review. *Applied Biological Chemistry*, *63*(1).
- Tafreshi, S. M., Siabil, S. A. G., & Dawson, A. (2020). Expanded polystyrene geofoam. In *New Materials in Civil Engineering* (pp. 117-153): Elsevier.
- Tagliavia, M., Messina, E., Manachini, B., Cappello, S., & Quatrini, P. (2014). The gut microbiota of larvae of *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver (Coleoptera: Curculionidae). *BMC microbiology*, *14*(1), 1-11.
- Tam, L. T., Eymann, C., Albrecht, D., Sietmann, R., Schauer, F., Hecker, M., & Antelmann, H. (2006). Differential gene expression in response to phenol and catechol reveals different metabolic activities for the degradation of aromatic compounds in *Bacillus subtilis*. *Environmental microbiology*, *8*(8), 1408-1427.

- Tischler, D., Kermer, R., Gröning, J. A., Kaschabek, S. R., van Berkel, W. J., & Schlömann, M. (2010). StyA1 and StyA2B from *Rhodococcus opacus* 1CP: a multifunctional styrene monooxygenase system. *Journal of bacteriology*, 192(19), 5220-5227.
- Tischler, D. (2015). Pathways for the degradation of styrene. In *Microbial Styrene Degradation* (pp. 7-22): Springer.
- Toda, H., Imae, R., Komio, T., & Itoh, N. (2012). Expression and characterization of styrene monooxygenases of *Rhodococcus* sp. ST-5 and ST-10 for synthesizing enantiopure (S)-epoxides. *Applied microbiology biotechnology*.96(2), 407-418.
- Truong, P. (2017). Significance of active site volume mutations in redefining the catalytic specificity of styrene monooxygenase. (Master), San Francisco State University,
- Tsochatzis, E., Berggreen, I. E., Nørgaard, J. V., Theodoridis, G., & Dalsgaard, T. J. C. (2021). Biodegradation of expanded polystyrene by mealworm larvae under different feeding strategies evaluated by metabolic profiling using GC-TOF-MS. 281, 130840.
- Tsochatzis, E., Berggreen, I. E., Tedeschi, F., Ntrallou, K., Gika, H., & Corredig, M. (2021). Gut Microbiome and Degradation Product Formation during Biodegradation of Expanded Polystyrene by Mealworm Larvae under Different Feeding Strategies. *Molecules*, 26(24), 7568.
- Utkin, I., Yakimov, M., Matveeva, L., Kozlyak, E., Rogozhin, I., Solomon, Z., & Bezborodov. (1991). Degradation of styrene and ethylbenzene by *Pseudomonas* species Y2. *FEMS microbiology letters*, 77(2-3), 237-241.
- Vallon, O. (2000). New sequence motifs in flavoproteins: evidence for common ancestry and tools to predict structure. *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics* 38(1), 95-114.

- Vatseldutt, S. A. (2004). Isolation and characterization of polythene degrading bacteria from polythene dumped garbage. *Biotechnol Lett*, 53, 1181-1189.
- Wadt, L. (2016). *Mofometria, amostragem populacional e reinvestigacao do feromonio de Shenophorus levis (Coleoptera: Curculionidae)*. (Doutorado), Universidad de Sao Paulo, Piracicaba, Brasil.
- Wang, L., Wu, W.-M., Bolan, N. S., Tsang, D. C., Li, Y., Qin, M., & Hou, D. (2021). Environmental fate, toxicity and risk management strategies of nanoplastics in the environment: Current status and future perspectives. *Journal of hazardous materials*, 401, 123415.
- Warhurst, A. M., Clarke, K. F., Hill, R. A., Holt, R. A., & Fewson, C. A. (1994). Metabolism of styrene by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259. *Applied Environmental Microbiology* 60(4), 1137-1145.
- Wei, R., & Zimmermann, W. (2017). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: How far are we? *Microbial Biotechnology*, 10. doi:10.1111/1751-7915.12710
- Weimann, A., Mooren, K., Frank, J., Pope, P. B., Bremges, A., & McHardy, A. C. (2016a). From genomes to phenotypes: Traitar, the microbial trait analyzer. *MSystems*, 1(6), e00101-00116.
- Weimann, A., Mooren, K., Frank, J., Pope, P. B., Bremges, A., & McHardy, A. C. J. M. (2016b). From genomes to phenotypes: Traitar, the microbial trait analyzer. 1(6), e00101-00116.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. J. M. g. (2017a). Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. 3(10).
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. J. P. c. b. (2017b). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. 13(6), e1005595.

- Wilkes, R. A., & Aristilde, L. J. J. o. a. m. (2017). Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. *123*(3), 582-593.
- Xie, S., Lan, Y., Sun, C., & Shao, Y. (2019). Insect microbial symbionts as a novel source for biotechnology. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, *35*(2), 25.
- Yan, Z.-F., Wang, L., Xia, W., Liu, Z.-Z., Gu, L.-T., & Wu, J. (2021). Synergistic biodegradation of poly (ethylene terephthalate) using *Microbacterium oleivorans* and *Thermobifida fusca* cutinase. *Applied Microbiology Biotechnology* 1-10.
- Yance, D., & Albert, P. (2017). *Biodegradación de la Espuma de Poliestireno por la larva del Tenebrio molitor para la producción de Abono, 2017*. (Profesional), Universidad César Vallejo, Lima- Peru.
- Yang, J., Yang, Y., Wu, W.-M., Zhao, J., & Jiang, L. (2014). Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environmental science technology*, *48*(23), 13776-13784.
- Yang, S.-S., Wu, W.-M., Brandon, A. M., Fan, H.-Q., Receveur, J. P., Li, Y., Gao, S.-H. (2018). Ubiquity of polystyrene digestion and biodegradation within yellow mealworms, larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae). *Chemosphere*, *212*, 262-271.
- Yang, S., Brandon, A., Xing, D., Yang, J., Pang, J., Criddle, C., Wu, W. (2018). *Progresses in Polystyrene Biodegradation and Prospects for Solutions to Plastic Waste Pollution*. Paper presented at the IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.
- Yang, Y., Yang, J., Wu, W.-M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Jiang, L. (2015). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating

- mealworms: part 2. Role of gut microorganisms. *Environmental science technology*, 49(20), 12087-12093.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science Advances*, 351(6278), 1196-1199.
- Zarbin, P. H., Arrigoni, E. D. B., Reckziegel, A., Moreira, J. A., Baraldi, P. T., & Vieira, P. C. (2003). Identification of male-specific chiral compound from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. *Journal of chemical ecology*, 29(2), 377-386.
- Zhang, S., Wang, J., Yan, P., Hao, X., Xu, B., Wang, W., & Aurangzeib, M. J. J. o. H. M. (2020). Non-biodegradable microplastics in soils: A brief review and challenge. 124525.
- Zhang, M., Li, L., Pan, H., & Zhou, T. J. G. p. (2021). The complete genome sequence of a bile-isolated *Stenotrophomonas maltophilia* ZT1. 13(1), 1-6.
- Zhu, Y.-J., Zhou, H.-T., Hu, Y.-H., Tang, J.-Y., Su, M.-X., Guo, Y.-J., . . . Liu, B. (2011). Antityrosinase and antimicrobial activities of 2-phenylethanol, 2-phenylacetaldehyde and 2-phenylacetic acid. *Food Chemistry* 124(1), 298-302.
- Zytynska, S. E., Thighiouart, K., & Frago, E. (2019). A meta-analysis on the benefits and costs of hosting secondary endosymbionts in sap-sucking insects. *bioRxiv*, 563031. doi:<https://doi.org/10.1101/563031>.

Anexos

Anexo 1. Sequência dos Genes referência utilizados para busca da via de degradação do EPS.

```
>sp|O50214.1|STYA_PSESP RecName: Full=Styrene monooxygenase StyA;
AltName: Full=Styrene monooxygenase large component
MKKRIGIVGAGTAGLHLGLFLRQHDVDVTVYTRKPDSEYSGRLRLNNTVAHNAVTVQREVALDVNEWPSEE
FGYFGHYIYVGGPQPMRFYGDLDKAPSRVAVDYLRYQPMMLRALEARGGKFCYDAVSAEDLEGLSEQYDLLV
VCTGKYALGKVFEEKQSENSPFEEKPQRALCVGLFKGIKEAPIRAVTMSFSPGHGELIEIPTLSFNGMSTAL
VLENHIGSDLEVLAAHTKYDDDPRAFLDLMLEKLGKHHPSVAERIDPAEFDLANSLLDILQGGVVPAFRDG
HATLNNKGTIIIGLDIQAATVDPVVGQGANMASYAAWILGEEILAHSVYDLRFSEHLERRRQDRVLCATRW
TNFTLSALSALPPEFLAFLQILSQSREMADEFTDNFNYPERQWDRFSSPERIGQWCSQFAPTIAA
```

```
>sp|O06836.1|STYC_PSEFL RecName: Full=Styrene-oxide isomerase
MLHAFERKMGAGHILMIFCTLLFGVGLWMHLVGGFEIIPGYILEFHVPGSPEGWARAHSGPALNGMMVIA
VAFVLPVSLGFADKKPHLLGNIIILDGWANVGFYFFSNFSPNRGLTFGNHFGPGDIFSFALAPAYLFGV
LAMGALAVIGYQALKSVGSRKAVPHATAE
```

```
>sp|O06837.1|STYD_PSEFL RecName: Full=Phenylacetaldehyde
dehydrogenase; Short=PAD
MTRSLTMNSSLPALDGLRLPHQMLIGGQWVNAQSDKTLNVYNPATGDTLTDVDPGDVEDVNAAVESAAAT
LQSDAWRRMPPSARERILLRLADLLEAHGDELARLETLLNNGKLLIYSKMMEVGASAQWLRVMAGWATKLT
GSTLDLSLPLPPDVRSRASTQRVPVGVVAAIIPWNFPLLMAVWKIAPALACGNTTVVLKPAEETPLTALRL
AELAMEAGLPAGALNVVTGRGETAGDALVRHPKVAKVAFTGSTEVGRIIGSACGRSLKAVSLELGGKSPV
IVLADCDPQEAEEGAAAAAIFFNHGQVCTAGSRLYVHESIYEDVIQRLAVIGESIVVGSGLQGVHMGPMV
SKKHHEENVLRHIRNGIEDGADLICGGTEAPCAQGGFFVKPTIFANREKKDIRLLSQEVFGPVLVATPFSDI
AEVVNEANRSVYGLGASIWTDLSAALRINDELEAGTVWVNTNMMVDPNLPFGGFKDSGVGREHGAAAIE
HYTTTTRSLVIAY
```

```
>sp|Q9Y7G5.1|PHACA_EMEND RecName: Full=Phenylacetate 2-hydroxylase
MSLQITIGIAAVAVVYFLIRYFNRTDIPKIKGLPEVPGVPIFGNLIQLGDQHATVAQKWAKKFGPVFQVRM
GNKRUVFANTFDSVRQLWIKDQSALISRPTFHTFHSSVSSSQGFTIGTSPWDESCRKRRAAATALNRPA
TQSYMPIIDLESMSIIRELLRDSANGTMDINPTAYFQRFALNTSLTLNYGIRIEGNVNDRELLREIVDVER
GVSNFRSTSNQWQDYIPLLRIFPKMNREAEFRVRRDKYLYLLDVLKDRIAKGTDKPCITGNILKDPEA
KLNDAEIKSICLTMVSAGLDTVPGNLIMGIAYLASEDGQRIQKRAHDEIMKVYPGDGAWKCLLEEKVPY
VTALVKETLRFWTVIPICLPRENTKDIVWNGAVIPKGTTFMNAAYAADYDETHFTNPHAFEPERYLTASS
DGSSTPHYGYGAGSRMCAGSHLANRELFYVRLITAFTHMPAKRAEDRPILDAIECNAIPTALTTEPKP
FKVGFKPRDPVLRKWIAESEERTKHLN
```

```
>NZ_JAJSPR010000052.1:c19926-18625 Pseudomonas alloputida strain
NMI2441_06 NODE_52_length_47478_cov_65.583, whole genome shotgun
sequence
ATGAACCGGCACACGTCGCCGACCTTCACTACCTGAGTGGCTTCGGCAACGAATTCGCCAGCGAAGCAT
TGCCCGGGCGCTGCTGTTGGGCAGAACTCCCCGAGAAGCCCCGTATGGCCTGTATGCCGAGCTGCT
GTCGGGCACGGCGTTACCATGGCCCGCAGCGAGCTGCGCCGTACCTGGCTGTACCGCATTCGCCCTTCT
GCCTTGCAACCCACGCTTCGAGCGCCTGGCGCGCCAGCCGCTCGGCGGGCCACTGGGTGGCATCAACCCCA
ACCGCTGCGCTGGAGCCCGCAGCCGATTCCTGCTGAACCGACCGATTCATCGAAGGTTGGCTGCCCAT
GGCTGCCAACCGCGGAGCGGAAAAACCGGCTGGCGTGAAGCATCTACATCTACCGCGCCAACCGGTCCATG
```

GAACGGGTGTTCTTCAACGCAGACGGTGAGCTGCTACTGGTGCCGGAACAGGGCCGCCTGCGTATCGCCA
CCGAGCTGGGCGTGATGGAGGTCGAACCGTTGGAAATTGCGGTGATCCCACGTGGCATGAAGTTCCGCGT
CGAACTGCTCGACGGCCAGGCCCGTGGCTACATCGCGGAAAACCACGGTGCGCCGCTGCGTCTGCCGGT
CTGGGCCCCGATCGGCAGCAACGGCCTGGCCAACCCCGCGACTTCCTCACGCCTGTGGCCCACTACGAAG
AAGCCGAAGGCCCGGTGCAACTGGTACAGAAGTTCCTGGGTGAGCACTGGGCCTGCGAGCTGCAGCACTC
GCCACTGGACGTTGTGGCCTGGCATGGCAGCAACGTGCCGTACAAGTATGACCTGCGCCGCTTCAACACC
ATCGGCACGGTCAGCTTCGACCACCCGGACCCCTCGATCTTCACCGTGCTCACCTCGCCAACCAGCGTGC
ATGGCATGGCCAACATGGACTTCGTGATTTTCCCGCCACGCTGGATGGTGGCCGAGAACACCTTCCGTCC
GCCATGGTTCCACCGCAACCTGATGAACGAGTTCATGGGCCTGATCAATGGCGCCTACGACGCCAAGGCC
GAGGGCTTCTGCCGGGTGGTGCCTCGTTGCACGGGGTATGAGTGCCCATGGCCCCGACGCCGAAACCT
GTGAAAAGGCCATTGCCGCTGACCTGGCGCCACACAAGATCGACAACACCATGGCCTTCATGTTTCGAGAC
CAGCCAAGTGTTCGCCCGAGCCTGCAAGCCCTTGAATGCCCGCAATTGCAGGCCGACTACGATAGTTGC
TGGGCGACTTTGCCGAGCACCTTCAACCCGAACCGGAGATAA

>sp|P54721.2|CADE_BACSU RecName: Full=Catechol-2,3-dioxygenase;
AltName: Full=Catechol-induced ring cleavage extradiol dioxygenase
MTSIHEDTHIGYAKLTIRSLERSIQFYCNVIGFQVLKKTDRQAELTADGKRVLILEENPSAVVLPERSV
TGLYHFAILLPDRKELGIALARLIEHGIAIGHGDHAVSEALYLSDPDNGIEMYADRPRSTWQRDREGNY
VMTTTAVDIEGLLEEAGDERKTSLPNDTIIGHIHLHVSDLKEAKAFYTDVLGFDIVGNYAGMSALFVSAG
GYHHHIGLNIWAGRNPAPKPTNASGLDYTVVLPHQEELDLVANRVKHAGYSIEETENSFRVKDPVSGAY
ITFVI