The Journal of Applied Science **Vol. 17 No. 2: Y-Z [2018]**
วารสารวิทยาศาสตร์ประยุกต์ doi: 10.14416/j.appsci.2018.07.001
ISSN 1513-7805 (Printed in Thailand) ISSN 2586-9663 (Online)

Research Article

การคัดเลือกและบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอตเบื้องต้นจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง

Preliminary screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from cassava starch wastewater

ประดินันท์ เอี่ยมสะอาด[1]*

Pradinunt Eiamsa-ard[1]*

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา อ.พระนครศรีอยุธยา จ.พระนครศรีอยุธยา 13000

[1]Faculty of Science and Technology, Phranakorn Si Ayutthaya Rajabhat University, Phranakorn Si Ayutthaya 13000

***E-mail**: pradinunt@gmail.com

Received: 18/10/2017; Accepted: 11/07/2018

บทคัดย่อ

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates, PHAs) เป็นสารกลุ่มพอลิเมอร์ทางชีวภาพที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากคุณสมบัติในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพและมีคุณลักษณะใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ที่ใช้กันในปัจจุบัน จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ PHAs เบื้องต้นจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังโดยการใช้เทคนิคการย้อมเซลล์ด้วยสี Sudan Black B (SBB) พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 10 ไอโซเลต และจากการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA ร่วมกับการศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับวิวัฒนาการ พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มีความหลากหลายและจำแนกเป็น 3 สกุล ประกอบด้วย *Bacillus*, *Enterobacter* และ *Sporosarcina* นอกจากนี้ยังพบว่าผลการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียไอโซเลต KR_M9 ที่มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Sporosarcina luteola* ซึ่งยังไม่เคยพบรายงานเกี่ยวกับการผลิต PHAs มาก่อน ดังนั้นการศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์ PHAs ของแบคทีเรียไอโซเลต KR_M9 ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพจึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต, น้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง, Sudan Black B

Abstract

Nowadays, Polyhydroxyalkanoates (PHAs) the group of biopolymer has been intensively interested since they possess biodegradable efficiency as well as highly similar characteristic to petrochemical plastic. In this study, ten PHAs producing bacteria were screened from cassava starch wastewater using Sudan black B (SBB) dying technique. Only 10 isolates were subsequently identified through the 16S rDNA sequencing analysis followed by phylogenetic relationship evaluation. The results revealed that they were successfully located into three bacterial genera including *Bacillus*, *Enterobacter*, and *Sporosarcina*. Interestingly, the molecular identification profile of KR_M9 was typically related to the strain *Sporosarcina luteola,* which has not been reported concerning to PHAs accumulation. Hence, it could be classified as the novel PHAs producing bacteria with attention to the further quanlitative and quantitative analysis of PHAs production.

Keywords: polyhydroxyalkanoates, cassava starch wastewater, Sudan Black B

บทนำ

พอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates, PHAs) เป็นสารประเภทพอลิเอสเทอร์ทางชีวภาพที่สังเคราะห์และสะสมภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญในสภาวะจำกัดสารอาหาร (Madison & Huisman, 1999; Shang et al., 2003) ส่วนใหญ่พบมากในรูปของเม็ดแกรนูล (PHA granule) สะสมภายในเซลล์แบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Cupriavidus necator* (Verlinden et al., 2011), *Alcaligenes latus* (Wang et al., 2013) และ *Pseudomonas oleovorans* (Ashby et al., 2002) โดยทั่วไป PHAs สามารถจัดจำแนกเป็น 3 กลุ่มขึ้นอยู่กับความยาวของมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ ดังเช่น กลุ่มแรก short chain length PHAs (scl-PHAs) ประกอบด้วย PHAs ที่มีความยาว C3-C5 กลุ่มที่สอง คือ medium chain length PHAs (mcl-PHAs) ประกอบด้วยคาร์บอนตั้งแต่ C6-C16 และกลุ่มสุดท้าย ได้แก่ long chain length PHAs (lcl-PHAs) เป็นกลุ่มของ PHA ที่มีความยาวของมอนอเมอร์มากกว่า 16 คาร์บอนอะตอม ซึ่งความแตกต่างของจำนวนคาร์บอนในโครงสร้างเกิดจากสารตั้งต้นรวมทั้งชนิดของจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์ PHAs (Anderson & Dawes, 1990; Rehm, 2007)

ปัจจุบัน PHAs เป็นผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถใช้ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์โดยเฉพาะในงานเกี่ยวกับบรรจุภัณฑ์และวัสดุชีวภาพอื่นๆ (Khanna & Srivastava, 2005; Chanprateep, 2010) นอกจากคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับพลาสติกสังเคราะห์ทางปิโตรเคมีแล้วนั้น สิ่งสำคัญที่ทำให้ PHAs ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากได้แก่ คุณสมบัติในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ รวมทั้งศักยภาพของการใช้วัสดุเหลือทิ้งหลายชนิดในการผลิต PHAs ได้ เช่น การผลิต PHAs จากกลีเซอรอลซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจาก

กระบวนการผลิตไบโอดีเซล (Moita et al., 2014) ทั้งนี้คุณลักษณะของ PHAs ที่ผลิตขึ้นและการนำไปประยุกต์ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ เช่น ในอดีตการสังเคราะห์พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (polyhydroxybutyrate, PHB) ในรูปของ P(3HB) ไม่นิยมนำไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิได้ต่ำและเปราะแตกง่าย (Lee, 1996) แต่ในปัจจุบันการพัฒนากระบวนการสังเคราะห์ PHB ให้อยู่ในรูปของ P(4HB) ทำให้สามารถใช้ประโยชน์ PHB ในงานทางการแพทย์ได้ เช่น การผลิตลิ้นหัวใจเทียม (Dohmen & Konertz, 2009)

เนื่องด้วยสภาวการณ์ปัจจุบัน ปัญหาการขาดแคลนทรัพยากรรวมทั้งการสะสมขยะพลาสติกที่สังเคราะห์ด้วยปิโตรเคมีทวีความรุนแรงมากขึ้น การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพลาสติกชีวภาพจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ โดยงานวิจัยนี้ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าสามารถผลิต PHAs จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังเพื่อศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรีย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังในพื้นที่จังหวัดระยอง เพื่อศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHA ได้ โดยการทำการจือจางตัวอย่างเป็นลำดับส่วน (serial dilution) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mineral salt medium [MSM; ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร): $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 6.7; NaCl 10; KH_2PO_4 1.5; NH_4Cl 0.1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2; $CaCl_2$ 0.01 และ ferrous ammonium citrate 0.06] และ trace elements 1 มิลลิลิตร [ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร): $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.13; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02; $(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0.06 และ H_3BO_3 0.06] จากนั้นถ่ายน้ำตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนอาหาร MSM agar ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร ด้วยวิธีการเกลี่ยเชื้อ (spread plate technique) แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง (หรือจนกระทั่งสังเกตเห็นโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ) (ปรับปรุงจาก Berlanga et al., 2006) คัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงจนได้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อศึกษาความสามารถในการสะสม PHA ในลำดับต่อไป

2. การศึกษาการสะสม PHA เบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

การศึกษาความสามารถในการสร้าง PHA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังด้วยการใช้เทคนิคการย้อมสีเซลล์ด้วย Sudan Black B (SBB) ทำโดยการเตรียมสารละลาย Sudan Black B (Sigma, St. Louis, MO) เข้มข้น 3% w/v ในสารละลายเอทานอล 70% สำหรับย้อมสีเซลล์แบคทีเรียเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกด้วย xylene (Sigma, St. Louis, MO) แล้วจึงย้อมเซลล์อีกครั้งด้วย safranin O (Sigma, St. Louis, MO) เข้มข้น 5% w/v เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วศึกษาความสามารถในการสะสม PHAs ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CX23, Japan) โดยพบว่าไอโซเลตที่คาดว่าสามารถผลิต PHAs ได้จะสังเกตเห็น

การติดสีของ PHA granule ภายในเซลล์ (ปรับปรุงจาก Wei et al., 2011) เก็บรักษาแบคทีเรียไอโซเลตที่ย้อมติดสี SBB ในอาหารวุ้นเอียง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการศึกษาในลำดับต่อไป

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA

ศึกษาข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลตที่คาดว่าสามารถสะสม PHAs ในอาหารเหลว MSM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงเก็บเซลล์เพื่อนำมาสกัด DNA ด้วยชุดสกัดทางการค้า (Geneaid, Taiwan) จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rDNA ด้วย ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F: 5' AGAGTTTGA TCMTGGCTCAG 3' และ 1492R: 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3' (Lane, 1991) และ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA) แล้วส่งตัวอย่างดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Macrogen Inc, Korea)

4. การบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียด้วยและการศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับวิวัฒนาการ

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA ของแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลตกับฐานข้อมูล GenBank (national center for biotechnology information server, NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLASTn algorithm เพื่อบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรีย จากนั้นศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยการสร้างแผนภูมิลำดับวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม PHYLIP (version 3.695) และโปรแกรมการสร้างแผนภูมิลำดับวิวัฒนาการ TREEVIEW (version 0.5.0)

ผลการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs เบื้องต้นจากน้ำทิ้งโรงงานแป้งมันสำปะหลัง

การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสะสม PHAs จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังในจังหวัดระยอง ด้วยการคัดแยกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM และการย้อมเซลล์ด้วยสี Sudan Black B พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้จำนวนทั้งสิ้น 10 ไอโซเลตที่สะสม PHA ภายในเซลล์โดยสังเกตจากการติดสีย้อม SBB ได้แก่ ไอโซเลต KR_M4, KR_M5, KR_M6, KR_M8, KR_M9, KR_M10, KR_P1, KR_P5, KR_P7 และ KR_P10 ลักษณะเซลล์แบคทีเรียที่ติดสีย้อม SBB แสดงตัวอย่างในรูปที่ 1

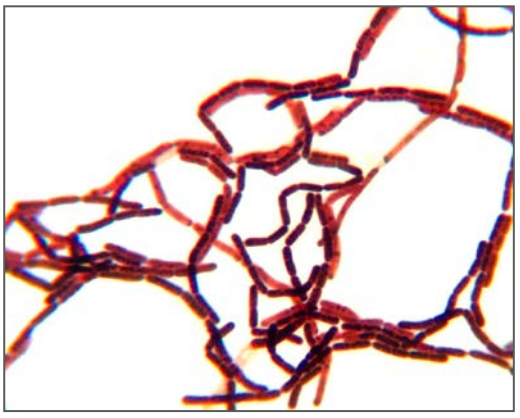
2. การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียและศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับวิวัฒนาการ

การศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA ของแบคทีเรียที่สามารถสะสม PHAs ภายในเซลล์จำนวน 10 ไอโซเลต สามารถจัดจำแนกได้เป็น 3 สกุล ได้แก่ *Bacillus*, *Enterobacter* และ *Sporosarcina* ผลการจัดจำแนกแสดงในตารางที่ 1 โดยผลจากการเปรียบเทียบสายพันธุ์แบคทีเรียพบว่าไอโซเลต KR_M9 ที่มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Sporosarcina luteola* เป็นไอโซเลตที่น่าสนใจศึกษาเกี่ยวกับการผลิต PHAs เป็นอย่างมาก เนื่องจากยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับการผลิต PHAs มาก่อน นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบสายพันธุ์ของไอโซเลต KR_M8 และ KR_M6 พบว่ามีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Enterobacter aerogenes* และ *E. cloacae*

 doi: 10.14416/j.appsci.2018.07.001

ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มีรายงานเกี่ยวกับการผลิต PHAs แต่ยังพบไม่มากนัก ในขณะที่แบคทีเรียที่แยกได้ในครั้งนี้ส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* ประกอบด้วยไอโซเลต KR_M5, KR_P5 และ KR_P7 ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Bacillus* sp. ในขณะที่ไอโซเลต KR_M4, KR_M10, KR_P1 และ KR_P10 แสดงความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus megaterium* ซึ่งจัดเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีรายงานเกี่ยวกับการผลิต PHAs (López et al., 2012)

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต โดยการสร้างแผนภูมิลำดับวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) (รูปที่ 2) ในการอธิบายความสัมพันธ์ของกลุ่มแบคทีเรียที่สังเคราะห์ PHAs ที่แยกจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง กลุ่มของแบคทีเรียที่แยกได้จะมีความใกล้เคียงกันในระดับสกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอโซเลตที่จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* และจะเห็นความห่างของลำดับวิวัฒนาการมากขึ้นในสกุลของแบคทีเรียที่ต่าง ๆ กัน ซึ่งในแผนภูมิแสดงลำดับวิวัฒนาการจะเห็นความสัมพันธ์เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ *Bacillus*, *Enterobacter* และ *Sporosarcina* ตามลำดับ



รูปที่ 1. เซลล์แบคทีเรียไอโซเลต KR_P1 ที่ย้อมติดสี SBB เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

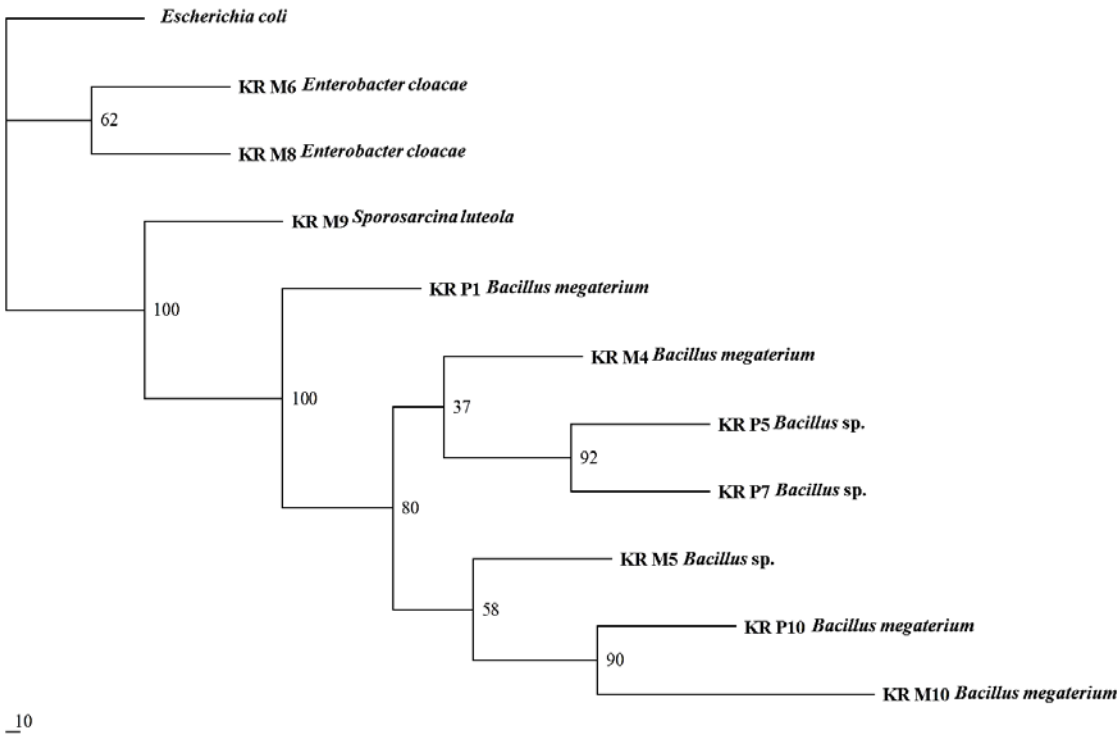
การคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลังเพื่อหาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้วิธีการย้อมเซลล์ด้วยสี Sudan Black B พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งสิ้นจำนวน 10 ไอโซเลต และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้สามารถจัดจำแนกได้ 3 สกุล โดยส่วนมากจัดอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* ตามด้วย *Enterobacter* และ *Sporosarcina* ตามลำดับ เป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งเกี่ยวกับผลการเปรียบเทียบสายพันธุ์ของไอโซเลต KR_M9 ที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Sporosarcina luteola* เนื่องจากยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับการสังเคราะห์ PHAs มาก่อน และยังเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่เพิ่งมีรายงาน

เป็นครั้งแรกโดย Tominaga et al. (2009) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในครั้งนี้ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานประสิทธิภาพในการผลิต PHAs ดังเช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ *Enterobacter cloacae* ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณรากถั่วลิสง สามารถสะสม PHAs ได้สูงถึง 94% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Samrot et al., 2011) ในขณะที่แบคทีเรียที่แยกได้ในครั้งนี้ส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* ได้แก่ *Bacillus* sp. และ *Bacillus megaterium* ซึ่งพบมีรายงานวิจัยเป็นจำนวนมากเกี่ยวกับการศึกษาการผลิต PHAs จากแบคทีเรียในสกุลนี้ (Wu et al., 2001; Ali & Jamil, 2016; Bikar et al., 2017)

ตารางที่ 1. การบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 16S rDNA

ลำดับที่	ไอโซเลต	สายพันธุ์แบคทีเรีย	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity)
1	KR_P1	*Bacillus megaterium*	99
2	KR_P5	*Bacillus* sp.	99
3	KR_P7	*Bacillus* sp.	100
4	KR_P10	*Bacillus megaterium*	99
5	KR_M4	*Bacillus megaterium*	99
6	KR_M5	*Bacillus* sp.	100
7	KR_M6	*Enterobacter cloacae*	99
8	KR_M8	*Enterobacter aerogenes*	99
9	KR_M9	*Sporosarcina luteola*	99
10	KR_M10	*Bacillus megaterium*	100

จากผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าการแยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่สามารถผลิต PHAs ได้ยังคงมีความจำเป็นเพื่อหาแหล่งผลิต PHAs ให้มีความหลากหลายและตอบสนองต่อความต้องการในปัจจุบัน แต่อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่คาดว่ามีความสามารถในการผลิต PHAs สายพันธุ์ที่ยังไม่พบการรายงานเกี่ยวกับการผลิต PHAs มาก่อน ดังเช่น สายพันธุ์ *Sporosarcina luteola* แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิต PHAs ของแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพยังคงเป็นประเด็นที่น่าสนใจ เพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต



รูปที่ 2. แผนภูมิลำดับวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่สามารถผลิต PHAs ได้ จำนวน 10 ไอโซเลต

เอกสารอ้างอิง

Ali, I. & Jamil, N. (2016). Biosynthesis and characterization of poly3-hydroxyalkanote (PHA) from newly isolated bacterium *Bacillus* sp. AZR-1. *Iranian Journal of Science and Technology, 42*, 371-378. https://doi.org/10.1007/s40995-016-0132-6

Anderson, A. J. & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, *54*(4), 450-472.

Ashby, R. D., Solaiman, D. K. & Foglia, T. A. (2002). The synthesis of short- and medium-chain length poly(hydroxyalkanoates) mixtures from glucose or alkanoic acid grown *Pseudomonas oleovorans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *28*(3), 147-153. doi: 10.1038/sj/jim/7000231

Baikar, V., Rane, A. & Deopurkar, R. (2017). Characterization of polyhydroxyalkanoate produced by *Bacillus megaterium* VB89 isolated from Nisargruna biogas plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *183*, 241-253. https://doi.org/10.1007/s12010-017-2441-4

Berlanga, M., Montero, M. T., Hernández-Borrell, J. & Guerrero, R. (2006). Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. *International Microbiology*, *9*, 95-102.

Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *10*(6), 621-32. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014

Dohmen, P. M. & Konertz, W. (2009). Tissue-engineered heart valve scaffolds. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *15*(6), 362-367.

Khanna, S. & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, *40*, 607-619. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* pp. 115-175. New York: John Wiley & Sons.

Lee, S. Y. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, *14*(11), 431-438. https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10061-5

López, J. A., Naranjo, J. M., Higuita, J. C., Cubitto, M. A., Cardona, C. A. & Villar, M. A. (2012). Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *17*(2), 250-258. https://doi.org/ 10.1007//s12257-011-0448-1

Madison, L. L. & Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *63*(1), 21-53.

Moita, R., Freches, A. & Lemos, P. C. (2014). Crude glycerol as feedstock for polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. *Water Research*, 58, 9-20. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.066

Rehm, B. K. (2007). Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles. *Current Issues in Molecular Biology*, *9*, 41-62.

Samrot, A. V., Avinesh, R. B., Sukeetha, S. D. & Senthilkumar, P. (2011). Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Enterobacter cloacae* SU-1 during growth with two different carbon sources in batch culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *163*, 195-203. https://doi.org/10.1007/s12010-010-9028-7

Shang, L., Jiang, M. & Chang, H. N. (2003). Poly(3-hydroxy-butyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentration. *Biotechnology Letters*, *25*(17), 1415-1419.

Tominaga, T., An, S.-Y., Oyaizu, H. & Yokota, A. (2009). *Sporosarcina luteola* sp. nov. isolated from soy sauce production equipment in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *55*(3), 217-223. https://doi.org/10.2323/jgam.55.217

Verlinden, R. A., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., Piotrowska-Seget, Z. & Radecka, I. K. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express*, *11*(1), 1-8. https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-11

Wang, B., Sharma-Shivappa, R. R., Olson, J. W. & Khan, S. A. (2013). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using sugarbeet juice. *Industrial Crops and Products*, *43*, 802-811. http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.011

Wei, Y.-H., Chen, W.-C., Huang, C.-K., Wu, H.-S., Sun, Y.-M., Lo, C.-W. & Janarthanan, O.-M. (2011). Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(1), 252-265. http://doi.org/10.3390/ijms12010252

Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K. P. & Chen, G. -Q. (2001). Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *80*(2), 111-118.