



SECCION ARTICULO ORIGINALES
REVISTA CENTRO DE ESTUDIOS EN SALUD
Año 5 Vol 1 No. 6 (Pags. 5 -12)

CARACTERIZACION DE POLI-(HIDROXIBUTIRATO - CO-HIDROXIVALERATO) SINTETIZADO POR UNA CEPA SILVESTRE DE *Bacillus mycoides*, FLB2 Pablo Fernández Izquierdo¹, Fedra L. Ortiz Benavides², Jairo Edmundo España³

Recibido Noviembre 7 - 04

Enviado para evaluación Febrero 11 - 05

Aceptado Marzo 26 - 05

RESUMEN

Los polihidroxicanoatos (PHAs) bacterianos son poliésteres de reserva intracelular que además de presentar características físicas y químicas similares a los plásticos derivados del petróleo, son biodegradables; por esta razón, los PHAs, son candidatos ideales para sustituir a los plásticos sintéticos. Para el aislamiento de bacterias productoras de Polihidroxicanoatos (PHA) se utilizaron muestras del suelo de varias zonas del Departamento de Nariño, Colombia. El tamizaje cualitativo de las cepas con capacidad de síntesis del biopolímero fue realizado por la técnica del Nilo Rojo. La cepa FLB2 identificada como *Bacillus mycoides* presentó los valores más altos de productividad (300 mg/l) y rendimiento (Y_p/s 0.2), el análisis de la muestra del plástico realizado por CG-masas estableció que el PHA producido por la cepa FLB2 corresponde al copolímero poli (β -HB- co- HV).

PALABRAS CLAVES: Bioplástico, polihidroxicanoatos, copolímero, poli-(hidroxibutirato-co-hidroxicanoato), *Bacillus mycoides*

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are biodegradable polymers produced by many bacteria as carbon and energy reserves, these polymers have similar characteristics than petrochemical derived plastics. In consequence, PHAs can substitute the synthetic plastics. To isolate PHA-producing-bacteria,

¹ Candidato a PhD en Microbiología. Profesor Asistente Departamento de Biología Facultad Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad de Nariño. Pasto- Colombia email pfernandez@udenar.edu.co

² Lic Biología, Msc Didáctica de la Biología. Profesora Dpto de biología. E-mail ortizfb@latinmail.com

³ Zootecnista. Esp. Pedagogía. Docente Hora Cátedra Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Universidad de Nariño. Pasto. email castorlisto@yahoo.es

several soil samples were collected of different zones of Department of Nariño, Colombia, The qualitative selection of the strains with capacity of synthesis of the biopolymer was evaluated by the technique of the Red Nile. A bacterial strain of *Bacillus mycoides* presented the highest values in productivity (300 mg/l) and yield (Yp/s 0.2). The GC analysis of the sample of the plastic produced by this strain established that the PHA corresponds to the copolymer Poly (HB - co - HV)

KEY WORDS: Bioplastics, Polyhydroxyalkanoates (PHAs), copolymer, *Bacillus mycoides*.

INTRODUCCION

En años recientes se esta realizando una gran inversión en la investigación de organismos vivos productores de nuevos materiales alternativos, tales como bioplásticos y lubricantes, las razones que justifican este esfuerzo están en dependencia de la necesidad de obtener polímeros novedosos que posean propiedades físicas inusuales predeterminadas y que no se pueden sintetizar por vía química, la obligación de buscar materiales menos dañinos al medio ambiente, como también, disminuir la utilización de recursos no renovables, sobre todo de combustibles fósiles. Actualmente, los polímeros naturales más utilizados son las mezclas de almidón, los ácidos polilácticos y los polihidroxialcanoatos (PHAs) ⁽¹⁾.

Los PHAs son materiales intracelulares de reserva energética y carbono bioacumulados por algunas bacterias bajo determinadas condiciones de crecimiento desbalanceado ^(2,3,4,5,6). Varias cepas bacterianas de *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* y recombinantes de *Escherichia coli* portadora de genes heterólogos implicados en la biosíntesis de PHA, se han empleado en la producción eficiente, de Poli-β hidroxibutirato P(3HB), el poliéster más abundante de la familia de los PHAs. ^(7, 8).

PHAs presentan propiedades físico químicas similares a los plásticos de origen petroquímico, pero a diferencia de estos son de carácter biodegradable,⁽⁹⁾. Existen PHAs de diferentes puntos de fusión, cristalización, flexibilidad, resistencia a la tracción, biocompatibilidad y velocidad de biodegradación ⁽¹⁰⁾, por lo cual, los PHAs tienen diversas aplicaciones, por ejemplo en el área médica, la biocompatibilidad del copolímero Poli-(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

P(HB-HV) junto con su degradación hidrolítica lenta hacen de este poliéster un material con potencial en cirugía reconstructiva, ya que el producto de degradación del PHA, el D(-)-3-hidroxibutirato ha sido encontrado en una cantidad relativamente grande en el plasma de la sangre humana ⁽¹¹⁾. Por consiguiente, se puede asegurar que el PHA implantado en tejidos de mamíferos no será tóxico, de manera que puede usarse en: la fabricación de hilos quirúrgicos para suturas, vendajes para heridas, reemplazos de hueso y placas, matriz para el crecimiento y sanado de huesos, reemplazos del vaso. En el área farmacéutica, los PHAs pueden usarse como matriz biodegradable para la dosificación de drogas de liberación controlada dentro del cuerpo. ^(12, 13, 14,15)

Las propiedades de estos polímeros son tan amplias que pueden sustituir casi cualquier material conocido ⁽¹⁶⁾, inclusive, se han empleado como fuente de carbono en la desnitrificación de agua potable. ^(17, 18, 19) Como se puede apreciar, los PHAs son un producto de gran valor comercial, sin embargo, resulta más barato producir polímeros de origen petroquímico que PHAs. ⁽²⁰⁾

Para solventar este problema económico, es necesario buscar nuevas bacterias capaces de crecer en sustratos baratos y cuyo rendimiento en la acumulación del polímero sea aceptable, así como también, mejorar los procesos de fermentación y extracción del PHAs, al igual que profundizar en el conocimiento de los mecanismos de regulación de síntesis de este material y los genes que conservan la información de las enzimas que participan en la síntesis del PHAs, con el objetivo de emplear microorganismos recombinantes que faciliten la producción a gran escala.

Por todo lo anteriormente expuesto, en este trabajo se trazaron como objetivos: la selección de bacterias silvestres con capacidad para acumular PHAs y la caracterización del PHA producido por una cepa silvestre de *Bacillus spp.*

MATERIALES Y METODOS

Medios de cultivo y tamizaje cualitativo

Varias muestras de suelo de diferentes municipios del Departamento de Nariño fueron empleadas para aislar bacterias bioacumuladoras de PHA. La composición del medio de cultivo base (MB), empleado para el aislamiento fue: Glucosa 5 g, Peptona bacteriológica 2,5 g/l, extracto de levadura 2,5 g/l, agar 1,2 g/l, 1 ml de las suspensiones de suelo se inocularon en cajas petri con medio suplementado con Rojo nilo al 0,1% en una proporción de 1 µl por ml de medio de cultivo, las cajas se incubaron a 30°C y se observaron a las 48 horas en transiluminador de luz UV a una $\lambda = 340$ nm, las colonias con emisión de fluorescencia naranja se consideraron como positivas para la síntesis de PHA, las cuales también fueron evaluadas por la técnica de tinción de Sudan negro.

(21) Al final, se eligieron 12 aislados que resultaron positivos en las dos pruebas cualitativas.

Selección de cepas productoras de PHA

Las colonias que resultaron positivas en las pruebas de Rojo nilo y Sudan negro se sembraron por triplicado en erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 100 ml de caldo MB, se incubaron a 30 grados centígrados, con agitación constante a 120 r.p.m. Durante 24 horas se recolectaron muestras de 1 ml en microtubos de 1,5 ml, se centrifugaron a 8.000 r.p.m. y lavaron con agua destilada, durante 5 minutos. Los botones celulares se procesaron por el método de Slepecky, (22) para ello las muestras se resuspendieron en hipoclorito de sodio con 5% de cloro libre y EDTA 10 mM, se incubaron a 30 °C durante 1.5 horas, se centrifugaron y lavaron con agua destilada. El sedimento recuperado se resuspendió en 200 µl de acetona, se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 200 µl de alcohol, se centrifugó nuevamente desechándose el sobrenadante. Las muestras secadas se resuspendieron en 1ml de una

solución de H_2SO_4 al 80% y se calentaron a Baño de María a 90 °C, durante 30 minutos. Se determinó la absorbancia de la solución a 214 nm mediante el espectrofotómetro Cole palmer.

A través de un análisis de regresión se estableció la correspondencia entre absorbancia y diferentes concentraciones de PHB-co-PHV comercial, encontrándose que la ecuación que describe esta relación es: $Y = 7,4017x + 0,065$ con $R^2 = 0,9857$.

Caracterización del polímero sintetizado por la cepa FLB2

Se realizó una fermentación en erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 100 ml de caldo, el volumen total fue centrifugado a 8000 rpm. recuperándose el polímero de las células como se describió anteriormente, pero sin digerir con H_2SO_4 .

Para establecer los grupos químico funcionales del polímero, 2 mg de muestra fueron diluidos en 1 ml de cloroformo y analizados con espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.

Por otra parte, para caracterizar el polímero **por Cromatografía de Gases**, se mezcló 1 mg de muestra, 1 ml de cloroformo y 1 ml de metanol: ácido sulfúrico (8515, v/v), la mezcla fue calentada a 90°C durante dos horas, luego fue enfriada rápidamente y 1 ml de NaCl al 0,1% fue adicionado, se separó la fase orgánica de la acuosa y se deshidrató con sulfato de sodio anhidro, 0.5 µl de fase orgánica fue inyectada en el cromatógrafo de gases (GC -QP5000 Shimadzu) equipado con una columna capilar de sílica fundida MDN-S de 30 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 um de espesor de película. El inyector y el detector de temperaturas de flama ionizante fue configurado a 250°C. El programa de temperatura fue de 60°C durante 2 minutos incrementándose 6°C por minuto hasta el máximo de temperatura de 220°C se utilizó el modo de inyección splitt con una razón de 23:2.

Los tiempos de retención de los monómeros metilados del PHA sintetizado por la cepa fueron comparados con patrones de Hidroxibutirato de metilo y del copolímero (3HB-co-3HV 80:20).

RESULTADOS Y DISCUSION

Hay numerosos agentes lipofílicos específicos para teñir material de acumulación intracelular, entre estos, algunos colorantes pueden conferir fluorescencia característica. (23, 24) Estos reactivos se utilizan en cajas petri para la selección de colonias que exhiben una característica determinada entre un gran numero de cepas o clones que no la presentan.

Las cajas petri con medio de cultivo suplementado con Nilo rojo se irradiaron con UV, en ellas se aprecian ciertas colonias con diferentes grado de fluorescencia naranja o rojiza (figura 1), al observar al microscopio las células teñidas con Sudan negro en algunas células se observan gránulos oscuros de diferentes dimensiones (Fig. 2). Entre los aislados bacterianos seleccionados por las pruebas cualitativas se destaca

la cepa FLB2 con una producción promedio de 0,31 g/l. El nivel de producción de PHAs de las 12 cepas seleccionadas se indica en la figura No 3.

Se considera que los colorantes de mayor especificidad por PHA son Nilo Rojo y Nilo Azul, pero para su aplicación por lo general las colonias se observan bajo microscopia de luz ultravioleta después de un periodo de incubación en un medio de cultivo suplementado con estos colorantes o se inunda la caja petri con altas concentraciones del colorante, (25) en esta investigación se utilizó bajas concentraciones de Nilo rojo, el cual permitió un buen nivel de fluorescencia en las muestras y fue posible observar variaciones en la intensidad de la fluorescencia de los aislados estudiados. (Fig.1).



FIGURA 1: Fluorescencia de las colonias de la cepa FBL2 en un medio de cultivo suplementado con Rojo Nilo e irradiado con luz ultravioleta.



FIGURA 2: Bacilos de la cepa FBL2 en fase exponencial del crecimiento con gránulos de PHA teñidos con Sudan Negro.

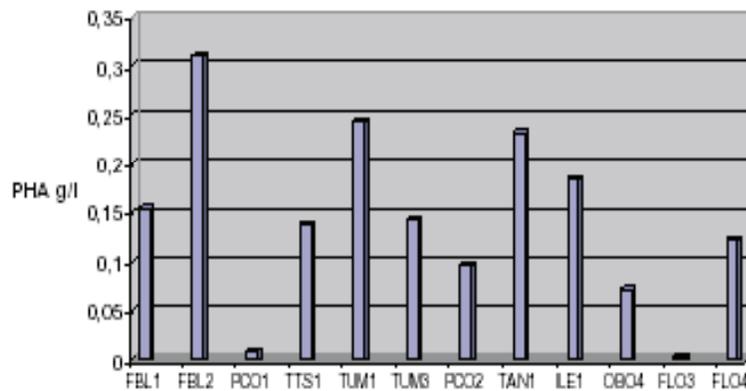


FIGURA 3: Producción de PHAs después de 24 horas de cultivo de bacterias aisladas de suelos del Departamento de Nariño

Identificación de la cepa FLB2

La bacteria seleccionada forma elementos filamentosos que se ramifican formando rizos, de color blanco que se adhieren al agar, pero con repiques continuos esta característica no es tan notoria y los filamentos forman cordones gruesos con una superficie suave y opaca.

Bajo la lente del microscopio se observan bacilos Gram positivos, de bordes redondeados que establecen agrupaciones en empalizada o cadenas, en las tinciones bacteriales de cultivos superiores a 10 días de edad se observan endosporas elípticas de posición central, esta es una característica del género *Bacillus*, el cual agrupa a un elevado número de bacterias Gram positivas con forma de bastón.

En el género *Bacillus*, como en otros, es bien conocido que la morfología de la colonia bacterial o morfotipo y la espora son criterios taxonómicos importantes para la identificación de microorganismos. (26, 27, 28)

El crecimiento de la cepa FLB2 se presenta entre 20°C y 30°C, siendo el óptimo de 25°C, crece lentamente a 35°C. Se requiere de nitrógeno orgánico para el aumento poblacional. La cepa en estudio es

oxidasa negativa y oxida varias fuentes de carbono (Tabla 1).

Entre las especies del género *Bacillus* productoras de Polihidroxibutirato (PHB) se ha reportado a *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. circulans*, *B. brevis* y *B. licheniformis*, al igual que *B. mycoides*. (29, 30, 31, 32). Sin embargo, la cepa FLB2 a diferencia de las anteriores especies de *Bacillus*, produce un copolímero conformado por unidades monoméricas de hidroxibutirato e hidroxivalerato.

Caracterización del polímero

La espectroscopia infrarroja con transformación de Fourier es una técnica química de rutina utilizada para el estudio de la estructura molecular, pero también se ha aplicado para la evolución de poblaciones bacterianas intactas, el espectro obtenido de esta manera refleja la composición bioquímica total de las células. En este tipo de análisis químico simultaneo, las bandas observadas en el espectro reflejan los compuestos celulares que se encuentran en mayor concentración, tales como, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos. (33,34)

Control	-	Manosa	+	Salicina	+	Gentibiosa	-
Glicerol	+	Sorbosa	-	Cellobiosa	+	D Turanosa	-
Erythritol	+	Rhamnosa	-	Maltosa	+	D Lyxosa	-
D Arabinosa	-	Dulcitol	-	Lactosa	+	D Tagatosa	-
L Arabinosa	+	Inositol	-	Melibiosa	-	D Fucosa	-
Ribosa	+	Manitol	-	Sacarosa	+	L Fucosa	-
D Xylosa	-	Sorbitol	-	Trehalosa	+	D Arabitel	-
L xylosa	-	Metil D manosido	+	Inulina	-	L Arabitel	-
Adonitol	-	Metil D Glucosido	+	Melezitosa	-	Gluconato	-
Metil-D Xylosida	-	N Acetil Glucosamina	+	Rafinosa	-	2 Cetogluconato	-
Galactosa	-	Amigdalina	+	Almidón	+	5 Cetogluconato	-
Glucosa	+	Arbutina	+	Glicógeno	+	Oxidasa	-
Fructosa	+	Esculina	+	Xylitol	-		

Nota: Los resultados fueron obtenidos en panel Api 50

TABLA 1. Patrón de oxidación de azúcares por la cepa FLB2.

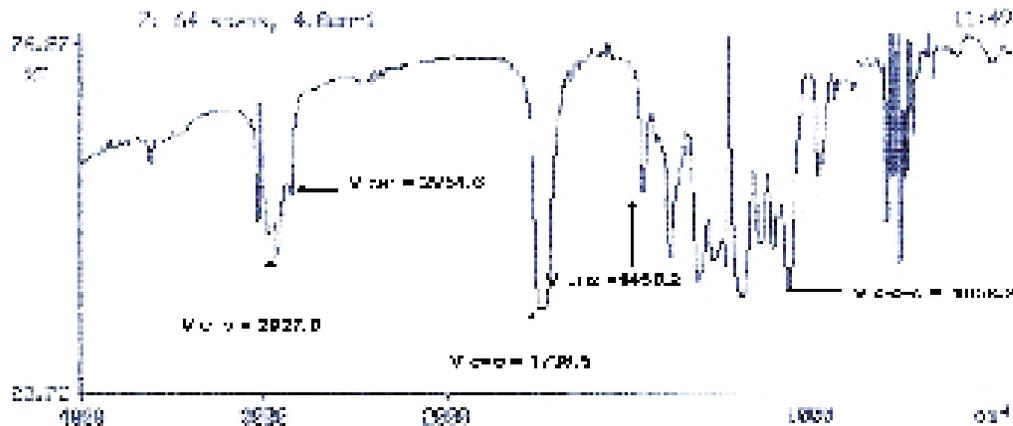


FIGURA 4. Espectrograma infrarrojo del PHA de la cepa FLB2 en el cual se aprecia bandas características del grupos funcionales, $V_{C=O} = 1708 \text{ cm}^{-1}$, C-O-C de $V_{C-O-C} = 1053, 1177 \text{ y } 1295 \text{ cm}^{-1}$

En el espectro de la muestra (Fig 4) no se observan bandas de los grupos N- H, C = N, P = O que son grupos funcionales aportados por proteínas, proteínas fosforiladas, lípidos y ácidos nucleicos, por lo cual se descarta la presencia de estas macromoléculas en la muestra analizada. Por otra parte, se aprecian bandas características del carbono carbonílico de $V_{C=O} = 1736.5 \text{ cm}^{-1}$ y del grupo C-O-C de $V_{C-O-C} = 1053, 1177 \text{ y } 1295 \text{ cm}^{-1}$, así como otras CH_2 y CH_3 , $V_{CH_2, CH_3} = 1458.2$, que se identifican con grupos asociados a la cadena alifática. Estas bandas son semejantes a las reportadas para PHB producido por otros microorganismos ⁽³⁵⁾.

Análisis de cromatografía de gases

Bajo las condiciones empleadas, el ester de metilo del ácido hidroxibutírico presentó un tiempo de retención de 3.966 minutos, los derivados metilados del copolímero comercial formaron dos picos, con tiempos de retención de 3.933 y 6.000 minutos respectivamente. Por lo cual el segundo pico corresponde al ester de metilo del ácido hidroxivalérico. El PHA de la cepa FLB2 presentó dos picos con tiempos de retención de 3.99 y 6.00 respectivamente. Los derivados metilados de la muestra generaron dos picos que coinciden con los tiempos de retención de los monómeros metilados de 3-HB y 3-HV, (figuras 5a, 5b, 5c).

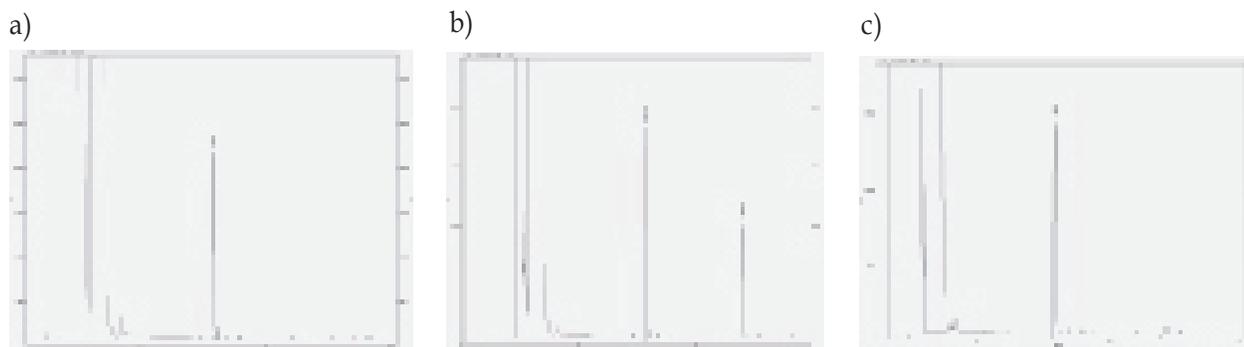


FIGURA 5. Cromatogramas de los esteres de metilo en (a) del ácido Hidroxibutírico; en (b) de un copolímero comercial 3HB-3HV (80:20), el segundo pico corresponde al éster de metilo del 3 Hidroxivalerato; en (c) esteres de metilo del PHA de la cepa FLB2, se observan dos picos con tiempos de retención similares al 3HB y 3HV.

De los 12 aislados bacterianos únicamente la cepa FLB2 alcanzó valores de acumulación del polímero superior a 300 mg PHA por litro de medio de cultivo. De acuerdo con estos valores se puede considerar que esta cepa presenta potencial industrial puesto que la producción de PHA es elevada teniendo en cuenta que el medio de cultivo empleado para la producción de este bioplástico no está optimizado.

Con los resultados obtenidos con las técnicas cualitativas para la detección de PHAs, el análisis del espectro de infrarrojo y los obtenidos por cromatografía de gases, es posible afirmar que la cepa FLB2 tiene la capacidad de sintetizar el polímero Poli-(3-Hidroxibutirato-co-3Hidroxivalerato).

Por otra parte, de acuerdo con las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, se puede afirmar que la cepa FLB2 es similar a *Bacillus mycoides*.

Pero a diferencia de *B. mycoides* FLB2 puede sintetizar Polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato como metabolito secundario el cual lo utiliza como reserva energética y fuente de carbono. Este es un aspecto importante a destacar, pues el copolímero P(3HB-co-3HV) exhibe propiedades físicas diferentes a PHB debido a que el grado de cristalinidad y el punto de fusión son menores. Esto se traduce en una menor rigidez, mayor flexibilidad y mayor resistencia, aspectos que lo hacen más interesante para la aplicación comercial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lindsay, K.F. (1992): "Truly degradable resins are now truly commercial". *Modern Plastics* 69, 62-64.
- Anderson, A. J., and E. A. Dawes. (1990): Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54:450-472
- Doi, Y. (1990): *Microbial polyesters*. VCH, New York, N.Y
- Lee, S. Y. (1996): Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* 49:1-14.
- Poirier, Y., C. Nawrath, and C. Somerville. (1995): Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Bio/Technology* 13:142-150
- Steinbüchel, A., and B. Fuchtenbusch. (1998): Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol.* 16:419-427
- Lee, S. Y. (1996): Op cit Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* 49:1-14.
- Lee, S. Y. (1996): Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnology* . 14:431-438
- Bergersen, F. J. y Turner, G. L. (1992): "Supply of O₂ regulates O₂ demand during utilization of reserves of poly-β-hydroxybutyrate in N₂-fixing soybeans bacteroids." *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 249: 143-148.
- Lee, S.Y. (1996): Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology Bioengineering.* 49: 1-14.
- Lee, S. Y. (1996): Op cit Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnology* . 14:431-438
- Lee, S.Y. (1996): Op cit Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology Bioengineering.* 49: 1-14.
- Holmes, PA. (1988): Biologically produced PHA polymers and copolymers. In: *Developments in crystalline polymers*, Bassett DC (ed), Elsevier, London 2: pp. 1-65.
- Storey, F. R. (1991): Synthesis and fabrication of completely absorbable composites for biomaterials; En biomateriales. Tockton Press, Inc., New York. 123-214
- San Román, J. y P. Guillén. (1992): Biomateriales poliméricos compuestos para aplicaciones quirúrgicas: composites para cirugía ortopédica y remodelación ósea; *Rev. de Plásticos Modernos.* 438: 674-688
- Duvernoy, O y cols. (1995): A biodegradable patch used as a pericardial substitute after cardiac surgery: 6- and 24- month evaluation with CT; *Thorac Cardiovasc. Surg.* 43(5): 271-274
- Hocking, J. (1992): The classification, preparation and utility of degradable polymers; *Rev. Macromol. Chem. Phys.* 32(1): 34-35
- Finkelstein, R. A. y cols., (1997): Colonial opacity variations among the *Cholerae* vibrios; *Microbiology*, 143: 23-34
- Biedermann, J.; Owen, A. J.; Schlse, K. T.; Gassner,

- F. y Sussmuth, R. (1997): Interaction between poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate and a denitrifying *Pseudomonas* strain. *Can. J. Microbiol.* 43(6): 561-568
19. Biehler, M. J. (1989): A first practical use of specially constructed starter cultures in a new biotechnological nitrate elimination process for drinking water with degradable biopolymers as adhesion material; *EnDECHEMA Biotechnology Conferences* (eds. D. Behrens y A. J. Driesel), 3(B): 997-1002
 20. Lindsay, K.F. (1992): Op cit "Truly degradable resins are now truly commercial". *Modern Plastics* 69,62-64
 21. Locquin Marcel, Langeron Maurice. 1985. *Manual de microscopía*. Labor S.A. pg. 215.
 22. Slepecky, J. (1960): A rapid spectrophotometric assay of alpha and beta unsaturated acid and betahydroxyacids. *Anal. Chem.* 32: 1697-1699.
 23. Lemoigne, M. (1926): Produits de deshidration et de polimerization de 1 acide β -oxibutiric; *Bull Soc. Chem. Biol, París*, 8: 7770-7782
 24. Page, W. J. Y Ch. J. Tenove. (1996): Quantitation of poly-b- hydroxybutyrate by fluorescence of Bacteria and granules stained with Nile Blue A; *Biotech. Tech.* 10(4): 215-220
 25. Kranz, R. G.; K. K. Gabbert y M. T. Madigan (1997): Positive Selection Systems for Discovery of Novel Polyester. *Biosynthesis Genes Based on Fatty Acid Detoxification*; *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(8): 3010-3013
 26. Shapiro JA: The significance of bacterial colony patterns. (1995): *BioEssays*, 17:597-607.
 27. Rudner R, Martsinkevich O, Leung W, Jarvis ED. (1998): Classification and genetic characterization of pattern forming *Bacilli*. *Molecular Microbiology*, 27:687-703
 28. Holt, J.G. (1984): *Bergeys of systematic bacteriology*. Vol. II Willians and Wilkins, pg 1104-1137
 29. Dunlop, W., and A. W. Robards. (1973): Ultrastructural study of poly--hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 114:1271-1280
 30. Griebel, R., Z. Smith, and M. Merrick. (1968): Metabolism of poly-hydroxybutyrate. Purification, composition, and properties of native poly-hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry* 7:3676-3681
 31. Shamala, T. R. A. Chandrashekar S.V.N. Vijayendra L. Kshama. (2002): **Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus spp.* using the polymerase chain reaction (PCR)**. *Journal of Applied Microbiology* Volume 94: Issue 3:369-374
 32. Borah B, Thakur PS, Nigam JN. (2002): The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *J Appl Microbiol.* 92(4):776-83.
 33. Curk, M. C., F. Peladan, and J. C. Hubert. (1994): Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 123:241-248
 34. Goodacre, R., E. M. Timmins, P. J. Rooney, J. J. Rowland, and D. B. Kell. (1996): Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *FEMS Microbiol. Lett.* 140:233-239
 35. Weiqun, S.; K. Teng y E. Meighen. (1995): Detection of poly (-3-hydroxybutyrate) granules by electron microscopy of *Vibrio harveyi* stained with malachite green; *Can. J. Microbiol*, 41(Suppl. 1): 131-137