

Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxicanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar

Molecular Identification of Polyhydroxyalkanoate-Producing Bacteria Isolated from Dairy and Sugarcane Residues

Ana Carolina Cardona Echavarría¹; Amanda Lucía Mora Martínez² y Mauricio Marín Montoya³

Resumen. Los polihidroxicanoatos (PHAs) son bioplásticos termoestables sintetizados por algunas bacterias, que los acumulan como reservas de carbono en forma de inclusiones citoplasmáticas. Estos compuestos se constituyen en una opción para la sustitución de polímeros sintéticos no biodegradables. En este trabajo se evaluó la presencia de bacterias productoras de PHAs en lactosueros derivados de la producción de quesos, y en melaza, cachaza y bagazo de caña de azúcar. El aislamiento bacteriano se realizó en medio mínimo de sales suplementado con glucosa al 2% y 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de rojo Nilo (0,1%). Las colonias que presentaron fluorescencia a 340 nm en este medio, se evaluaron nuevamente mediante microscopía de fluorescencia con azul Nilo. Aquellas cepas que resultaron positivas para ambas pruebas fueron consideradas como potenciales productoras de PHAs e identificadas por secuenciación de la región 16S del ADN ribosomal. Seguidamente se evaluó, en algunas de éstas, la presencia del gen *phaC* mediante PCR con cebadores específicos. Se detectaron 38 cepas productoras de PHAs, representando 18 morfotipos bacterianos. Fueron identificadas en los sustratos de lactosuero cepas pertenecientes a los géneros **Lactococcus**, **Klebsiella**, **Pseudomonas**, **Enterobacter** y **Enterococcus**; mientras que en los subproductos de caña de azúcar se encontraron cepas de los géneros **Bacillus**, **Enterobacter**, **Pantoea**, **Klebsiella** y **Gluconobacter**. El gen *phaC* se detectó por PCR en 16 bacterias que presentaron los arreglos genéticos I y IV. Este trabajo abre la posibilidad de emplear las bacterias obtenidas en procesos alternativos, ambientalmente sostenibles y generadores de valor agregado, para la disposición final de subproductos y residuos agroindustriales.

Palabras clave: ADNr 16S, bagazo, lactosuero, melaza, PCR, *phaC*.

Abstract. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are thermostable bioplastics produced by bacteria and stored as inclusion bodies to serve as a reserve carbon source. These compounds are a good alternative to non-biodegradable synthetic plastics. In this work, the presence of PHAs-producing bacteria in whey, sugar-cane molasses, cachaza and bagasse was investigated. Bacteria were isolated using a minimal medium supplemented with 2% glucose and 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ Nile red (0.1%). Colonies exhibiting fluorescence at 340 nm were further analyzed by fluorescence microscopy with Nile blue. When positive for both tests, bacterial isolates were classified as PHAs producers and their 16S rDNA sequenced. For selected isolates, the presence of the *phaC* gene was confirmed by PCR. A total of 38 strains, grouped into 18 different morphotypes, were identified as PHA producers. Bacteria belonging to **Lactococcus**, **Klebsiella**, **Pseudomonas**, **Enterobacter** and **Enterococcus** genera were isolated from whey and **Bacillus**, **Enterobacter**, **Pantoea**, **Klebsiella** and **Gluconobacter** from sugar cane residues. The *phaC* gene was detected by PCR in 16 bacteria with type I and IV arrangements. This work opens up the possibility of using the isolated bacteria as an environmentally sustainable alternative for the disposal of agro-industrial residues as well as an additional income source.

Key words: 16S rDNA, bagasse, molasses, PCR, *phaC*, whey.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros biodegradables sintetizados por bacterias que los acumulan en forma de inclusiones citoplasmáticas cuando crecen en sustratos ricos en fuentes de carbono y con desbalances de nitrógeno, fósforo y/o azufre (Reddy *et al.*, 2003). Los PHAs fueron descubiertos a principios del siglo pasado en la bacteria *Bacillus megaterium* y a la fecha, se han reportado en más de 300 especies bacterianas (Keshavarz y Roy, 2010).

Los PHAs se clasifican, dependiendo del número de carbonos presentes en cada monómero, en PHAs de cadena corta (scl, short-chain-length) con 3-5 átomos de carbono, como el Poli-3-hidroxicanoato ([P(3HV)]) y el Poli-3-hidroxi-butirato ([P(3HB)]); PHAs de cadena media (mcl, medium-chain-length) con 6 a 14 carbonos, como el copolímero poli-3-(HB-co-HV); y PHAs de cadena mixta (PHAMCM), que combinan los dos anteriores, como el Poli (3HB-co-3HV-co-3HHx) (Stubbe y Tian, 2003). Dependiendo del número de

Ingeniera Biológica. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín - Facultad de Ciencias - Laboratorio de Biología Celular y Molecular. A.A. 3840, Medellín, Colombia. <accardone@unal.edu.co>

Profesora Asociada. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín - Facultad de Ciencias - Laboratorio de Procesos Ambientales. A.A. 3840, Medellín, Colombia. <almora@unal.edu.co>

Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín - Facultad de Ciencias - Laboratorio de Biología Celular y Molecular. A.A. 3840, Medellín, Colombia. <mamarinm@unal.edu.co>

Recibido: Mayo 2 de 2013; aceptado: Julio 30 de 2013.

carbonos, los PHAs presentan diferentes niveles de cristalinidad y elasticidad, siendo dichas propiedades clave para sus aplicaciones en los campos industriales, farmacéuticos, médicos y agrícolas (Ciesielski *et al.*, 2006). El PHB y el Poli 3(HB-co-HV) son los PHAs de mayor utilización comercial (Stubbe y Tian, 2003).

La síntesis de PHAs bacterianos requiere de la enzima polihidroxicanoato sintasa, codificada por el gen phaC. Dicho gen y otros involucrados en el metabolismo de biosíntesis de estas moléculas, están organizados en operones, siendo hasta ahora identificados cuatro arreglos básicos (Stubbe y Tian, 2003, Lau y Sudesh, 2012). El primer arreglo (Sintasas tipo I) está representado por la bacteria *Cupriavidus necator* (antes *Ralstonia eutropha*) y se caracteriza por presentar un operón phaCAB que incluye los genes PHA sintasa (phaC), β -cetotiolasa (phaA) y acetoacetil-CoA reductasa (phaB). Las sintasas PHA tipo II, representadas por *Pseudomonas aeruginosa*, contienen dos genes sintasas (phaC1 y phaC2) separados por el gen phaZ, cuyo producto enzimático actúa en la despolimerización de éstos compuestos (Solaiman *et al.*, 2000). Las sintasas PHA tipos I y II comprenden enzimas que consisten de un solo tipo de subunidad (PhaC) con masas moleculares entre 61 y 68 kDa. En el tercer sistema (tipo III), la enzima PHA sintasa consiste de dos subunidades codificadas por los genes phaE y phaC, siendo propio de bacterias de los géneros *Chromatium*, *Synechocystis* y *Thyocystis* (Rehm y Steinbuchel, 1999). Finalmente, el cuarto arreglo (tipo IV) es típico de bacterias del género *Bacillus*, que presentan una PHA sintasa conformada por dos subunidades, phaC y phaR y codificadas por el operón phaRBC (McCool y Cannon, 2001).

Debido a su naturaleza lipídica, la detección y aislamiento de bacterias productoras de PHAs se fundamenta en la utilización de colorantes lipofílicos como el negro Sudán (Schlegel *et al.*, 1970), el azul Nilo (Ostle y Holt, 1982) y su oxazona fluorescente, rojo Nilo (Spiekermann *et al.*, 1999). En los últimos años, su utilización para detectar bacterias productoras de PHAs es acompañada de pruebas moleculares confirmatorias basadas en PCR que detectan la presencia de uno o varios de los genes de biosíntesis de PHAs (Solaiman *et al.*, 2000; Ciesielski *et al.*, 2006).

En Colombia, el sector agropecuario ha sido uno de los principales motores del desarrollo

económico, con aportes del 9% del PIB, 21% de las exportaciones y 19% del empleo total del país (Proexport, 2011a); siendo dos de las principales actividades agroindustriales, la obtención de azúcar a partir de caña (*Saccharum officinarum* L.) y la producción de leche y derivados lácteos. Estas dos agroindustrias se caracterizan por generar una gran cantidad de subproductos y residuos en sus procesos de transformación. En el caso de la caña, se estima que por cada tonelada cosechada se producen 330 kg de bagazo, 30-50 kg de cachaza y 800 L de vinaza (Basanta *et al.*, 2007). El lactosuero por su parte, es la sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche en la elaboración de queso y representa cerca del 90% del total de la leche utilizada en el proceso de producción de quesos y otros derivados lácteos (Londoño *et al.*, 2008). A pesar de que el lactosuero se usa en forma líquida (ca. 10%), en polvo (30%), o como lactosa y otros subproductos en la industria de alimentos y de concentrados de animales (15%), cerca del 45% se desecha como aguas residuales o directamente al suelo, lo que representa serios problemas de contaminación ambiental (Parra, 2009).

Debido a los altos volúmenes de subproductos que generan las agroindustrias de la caña de azúcar y de lácteos en el país, es posible su utilización alternativa como sustrato para la producción microbiana de PHAs. En este estudio se evaluó la presencia de bacterias productoras de PHAs en melaza, bagazo y cachaza de caña de azúcar, así como en lactosueros bovinos y caprinos, a partir de pruebas de preselección con tinción lipídica y de la confirmación por PCR, de la presencia del gen phaC en un subgrupo de las bacterias aisladas. Los microorganismos que resultaron positivos para la producción de PHAs, fueron identificados molecularmente mediante secuenciación del ADNr 16S.

MATERIALES Y MÉTODOS

Subproductos agroindustriales. Las bacterias fueron aisladas a partir de subproductos de la agroindustria de la caña de azúcar y de la producción de derivados lácteos. En el primer caso se utilizaron dos muestras de melaza de caña: una del Ingenio Incauca (Miranda, Cauca), y la otra, de una fuente comercializada en el municipio de Sopetrán (Antioquia). Además, una muestra de bagazo y una de cachaza de caña, del ingenio Incauca (Miranda, Cauca).

Los subproductos lácteos estuvieron representados por tres muestras de lactosuero, dos de estas se generaron, por separado, durante la producción de quesos de leche bovina (raza Holstein), en la Estación Agraria de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín "Paysandú" (Santa Elena, Medellín, Antioquia) y en la vereda San José del municipio de Santa Rosa de Osos (Antioquia); y la otra, durante la elaboración de queso caprino (raza Mestiza) en un aprisco del municipio de Sopetrán (Antioquia).

Aislamiento y detección de bacterias productoras de PHAs. A partir de cada una de las siete muestras obtenidas, se realizó un procedimiento de dilución seriada, siguiendo la metodología de Capuccino y Sherman (2007), sembrando 100 μL de las diluciones 1×10^{-3} , 1×10^{-5} y 1×10^{-7} , por esparcimiento con asa de vidrio, sobre cajas Petri con medio mínimo de sales minerales (MMS), pH 7,0, suplementado con 2% de glucosa, 0,2% de extracto de levadura y 1 mL L^{-1} (0,1% en acetona) del colorante rojo Nilo (Spiekermann *et al.*, 1999). Las cajas Petri fueron incubadas bajo condiciones aeróbicas, a temperatura ambiente, por 72 h y las colonias resultantes, expuestas a un transiluminador ultravioleta a 340 nm, para seleccionar aquellas que presentarán fluorescencia. Dichas colonias fueron transferidas individualmente a cajas Petri con MMS y rojo Nilo, para reconfirmar su fluorescencia.

Las cepas que resultaron nuevamente positivas, fueron transferidas a medio agar nutritivo (AN), y evaluadas bajo tinción con el colorante azul Nilo, siguiendo la metodología de Ostle y Holt (1982) y utilizando un microscopio de fluorescencia Axiolab-Zeiss® (Alemania) a una longitud de onda de 450 nm y aumento de 1.000X. Las bacterias que presentaron fluorescencia rojo-naranja, indicativa de la producción de PHAs, se sometieron al proceso de tinción de Gram (Capuccino y Sherman, 2007), como base de selección del método de extracción de ADN, preservándose cada una de éstas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ en crioviales con glicerol al 30%.

Identificación molecular de bacterias. Las bacterias seleccionadas en las pruebas de tinción, fueron cultivadas durante 24 h en medio líquido Luria Bertani (LB), a 150 rpm y $30\text{ }^\circ\text{C}$. Los cultivos fueron centrifugados a 4.000 rpm por 3 min, para obtener precipitados celulares y dar inicio a la extracción de ADN. Para las bacterias Gram negativas, se

utilizaron 500 μL del buffer de extracción SDS (NaCl 10 mM, EDTA 25 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y 100 μL de SDS 20%); mientras que, en aquellas Gram positivas se realizó un pre-tratamiento con 50 μL de lisozima (10 mg mL^{-1}) a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min, seguida por la adición del buffer de extracción de SDS. La integridad del ADN obtenido fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X y 3 μL de bromuro de etidio (10 mg mL^{-1}), visualizándose bajo luz ultravioleta con el sistema digital Bio Doc Analyze (Biometra®, Alemania).

Identificación molecular de bacterias. Los aislamientos bacterianos fueron identificados a partir de secuenciación de regiones 16S del ADNr. Para esto, se amplificaron mediante PCR cerca de 1.440 pb de este gen, con los cebadores PA (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y PC5B (5' TACCTGTACGACTT 3') (Kuske *et al.*, 1997). Las condiciones de PCR y la secuenciación fueron similares a las reportadas por Sánchez *et al.* (2012). Las secuencias obtenidas con cada cebador, fueron editadas mediante el programa Bioedit 6.0.6. (Hall, 1999), construyéndose secuencias consenso y confirmándose su identidad por comparación con las bases de datos moleculares, mediante BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). En adición, se obtuvieron del GenBank secuencias 16S del ADNr de bacterias relacionadas taxonómicamente con los microorganismos putativamente identificados mediante el BLASTN, realizándose un alineamiento con Clustal W (Hall, 1999) y construyéndose árboles filogenéticos por los métodos de Neighbor-Joining (NJ) y Máxima verosimilitud (ML), con 1000 iteraciones para determinar los valores de bootstrap. Las distancias genéticas se calcularon por el método de Kimura 2-parámetros, utilizándose el programa Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

Detección del gen phaC. Para evaluar mediante PCR la presencia del gen phaC, se seleccionó al menos una cepa de cada género identificado por secuenciación del ADNr 16S, utilizándose cebadores dirigidos a los arreglos genéticos tipo I, II y IV (Tabla 1). No se evaluó la presencia del arreglo tipo III, por cuanto las bacterias que lo contienen generalmente habitan ambientes extremos y requieren medios selectivos para su aislamiento (Reddy *et al.*, 2003). Con fines confirmatorios, se seleccionaron al menos dos amplicones por cada tipo de arreglo detectado, para proceder a su secuenciación directa, tal como se indicó anteriormente.

Tabla 1. Cebadores utilizados para amplificar el gen *phaC* en las bacterias productoras de PHAs.

Cebadores	Secuencia	Tamaño	T° unión	Referencia
B1F B1R	5' AACTCCTGGGCTTGAAGACA 3' 5' TCGCAATATGATCACGGCTA 3'	600 pb	60 °C	Shamala <i>et al.</i> (2003)
I-179L I-179R	5' ACAGATCAACAAGTTCTACATCTTCGAC 3' 5' GGTGTTGTCGTTGTTCCAGTAGAGGATGTC3'	540 pb	54 °C	Solaiman <i>et al.</i> (2000)
G-D G1-R G-2R	5' GTGCCGCCSYRSATCAACAAGT 3' 5' GTTCCAGWACAGSAKRTCGAA 3' 5' GTAGTTCCASAYCAGGTCGTT 3'	551 pb (491 pb)	50-55 °C	Revelo <i>et al.</i> (2007)
phaCf1 phaCR4	5' ATCAACAARTWCTACRTCYTSGACCT 3' 5' AGGTAGTTGTYGACSMMRTAGKTCCA 3'	496 pb	50 °C	Sheu <i>et al.</i> (2000)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y detección de bacterias productoras de PHAs.

En este estudio se detectaron, mediante doble tinción con rojo Nilo en medio MMS suplementado con 2% de glucosa, 49 cepas bacterianas productoras de PHAs, que fueron agrupadas en 22 morfotipos por sus características en medio AN (Tabla 2); siendo el sustrato de cachaza de caña, el que presentó el mayor número de aislamientos y morfotipos bacterianos (8 aislamientos/5 morfotipos), seguido por la melaza del Ingenio Incauca (8/4) y Sopetrán (7/4) y el lactosuero de la Estación Agraria Paysandú (8/3). Los sustratos

que presentaron menor número de morfotipos productores de PHAs fueron el lactosuero caprino (3 aislamientos y 2 morfotipos) y el bagazo de caña, pues a pesar de presentar ocho aislamientos, éstos sólo representaban dos morfotipos bacterianos (Tabla 2). Treinta y ocho de estas cepas, distribuidas en 18 morfotipos, fueron reconfirmadas como productoras de PHAs con la prueba de tinción con azul Nilo. Las colonias de dichos aislamientos emitieron fluorescencia rojo-naranja cuando fueron expuestas a una longitud de onda de 450 nm, siendo evidentes las diferencias en sus patrones de acumulación de PHAs (Figura 1).

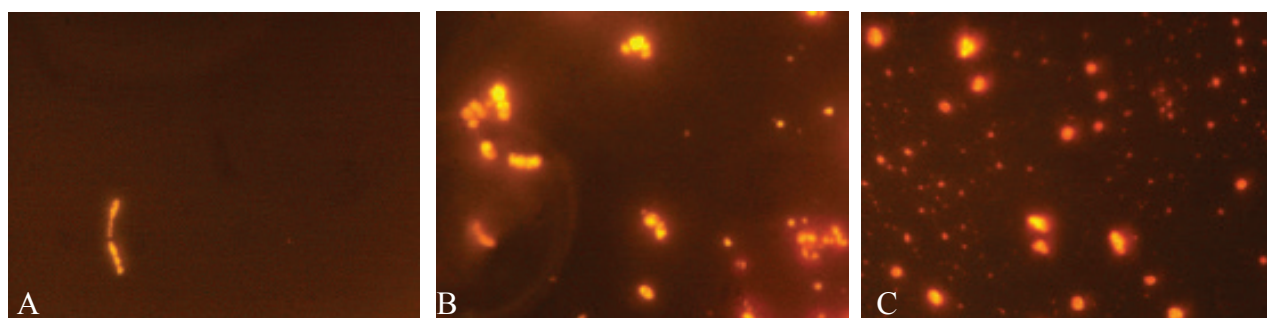


Figura 1. Microscopía de fluorescencia a 450 nm para células bacterianas teñidas con azul Nilo, cultivadas en MMS y aisladas a partir de subproductos agroindustriales. Cepa 28-bagazo -1.000 X (A); Cepa 19-lactosuero 1.000 X (B) y Cepa 15-lactosuero - 1000 X (C).

Estos resultados indican que ambos tipos de sustratos evaluados, presentan una alta diversidad de flora bacteriana con capacidad de síntesis de PHAs, lo que puede deberse a sus altos contenidos de carbono y bajos niveles de nitrógeno (residuos de caña de azúcar

o de fósforo (lactosueros). Trabajos previos realizados por De Lima *et al.* (1999) habían identificado los suelos de cultivo y los derivados de la caña de azúcar como nichos ecológicos óptimos para el aislamiento de bacterias productoras de PHAs, dado sus altos

desbalances de C: N. Esta situación fue confirmada en Colombia por Moreno *et al.* (2007), quienes realizaron un proceso de aislamiento de bacterias productoras de PHAs, en la rizosfera de caña de azúcar cultivada en diferentes departamentos, y encontraron que al menos 291 de 440 aislamientos evaluados, podían acumular estos biopolímeros a partir de alguna de las tres fuentes de azúcar evaluadas (glucosa, fructosa y sacarosa). En forma similar, Naheed *et al.*

(2012) aislaron de diversos residuos agroindustriales, bacterias del género *Enterobacter* con capacidad de acumular PHB en un 57% de su peso celular seco, utilizando como medio de fermentación melaza de caña de azúcar suplementada con 0,2% de sulfato de amonio. En el presente trabajo, se logró la obtención de un amplio número de morfotipos bacterianos a partir de subproductos de caña de azúcar, obteniéndose tanto bacterias Gram negativas, como Gram positivas; aunque

Tabla 2. Resultados de evaluaciones de producción de PHAs e identificación molecular de bacterias aisladas en este estudio.

Morfotipos	Prueba positiva con rojo Nilo*	Prueba positiva con Azul Nilo	Secuencias 16S	Secuencias phaC	Identificación molecular**	Tipo de gen phaC***
Melaza de Caña (Sopetrán)						
Morfotipo 1	2	2	2	2	<i>Pantoea</i> sp.	II
Morfotipo 2	1	1	1	1	<i>Bacillus megaterium</i>	IV
Morfotipo 3	2	2	1	-	Complejo <i>Bacillus subtilis</i>	-
Morfotipo 4	2	2	-	-	NI	-
Melaza de Caña (Incauca)						
Morfotipo 5	4	4	4	-	<i>Leuconostoc</i> sp.	-
Morfotipo 6	1	1	1	-	<i>Gluconobacter</i> sp.	-
Morfotipo 7	2	2	2	-	<i>Acinetobacter</i> sp.	-
Morfotipo 8	1	-	-	-	NI	-
Lactosuero bovino (Estación Agraria Paysandú)						
Morfotipo 9	6	6	3	2	<i>Lactococcus lactis</i>	IV
Morfotipo 10	1	1	1	-	<i>Klebsiella</i> sp.	-
Morfotipo 11	1	-	-	-	NI	-
Lactosuero bovino (Santa Rosa de Osos)						
Morfotipo 12	2	-	-	-	NI	-
Morfotipo 13	5	5	5	2	<i>Klebsiella</i> sp. y <i>Enterobacter</i> sp.	II
Lactosuero caprino (Sopetrán)						
Morfotipo 14	2	-	-	-	NI	-
Morfotipo 15	1	1	1	-	<i>Pseudomonas</i> sp.	-
Bagazo de Caña (Ingenio Incauca)						
Morfotipo 16	6	5	5	3	<i>Bacillus megaterium</i>	IV
Morfotipo 17	2	2	2	1	<i>Bacillus megaterium</i>	IV
Cachaza de Caña (Ingenio Incauca)						
Morfotipo 18	2	-	-	-	NI	-
Morfotipo 19	2	2	-	-	<i>Enterobacter</i> sp.	-
Morfotipo 20	2	-	-	-	NI	-
Morfotipo 21	1	1	1	-	<i>Enterobacter</i> sp.	-
Morfotipo 22	1	1	1	-	Complejo <i>Bacillus cereus</i>	-

* Número de cepas evaluadas de cada morfotipo.

** Identificación molecular con base en análisis filogenético de secuencias 16S del ADNr.

*** Bacterias representativas de cada tipo de arreglo genético de biosíntesis de PHAs. Tipo I: *Cupriavidus necator*; Tipo II: *Pseudomonas* sp.; Tipo III: *Chromatium vinosum*; Tipo IV: *Bacillus megaterium*.

fue evidente que los sustratos de bagazo y cachaza de caña de azúcar favorecieron el aislamiento de estas últimas, destacándose el alto número de morfotipos identificados como *Bacillus megaterium* (Tabla 2).

Con respecto a los lactosueros resultantes de la agroindustria de producción de quesos, se han realizado diferentes evaluaciones biotecnológicas que incluyen el uso de lactosa, su principal carbohidrato, como fuente de bioetanol, vinagre y de diferentes aditivos alimenticios (Koller *et al.*, 2012). Young *et al.* (1994) reportaron por primera vez, la posibilidad de usar lactosueros como fuente de carbono para la síntesis de PHAs, utilizando la bacteria *Pseudomonas cepacia* (antes *Burkholderia cepacia*). Dicha bacteria demostró la capacidad de acumular a partir de lactosa, hasta 56% de PHB en peso seco celular, lo que representaba una eficiencia de conversión de 5 g L⁻¹ de lactosuero. Posteriormente, Ahn *et al.* (2000, 2001) propusieron la utilización de cepas genéticamente modificadas de *Escherichia coli* con el operón de biosíntesis de PHAs de *Alcaligenes latus*, para la síntesis de bioplásticos a partir de lactosueros, alcanzando hasta 4 g/L/h de PHAs en procesos fermentativos por lotes y con altas concentraciones de lactosa (hasta 280 g L⁻¹). Estos reportes coinciden con los resultados encontrados en este estudio, en los que fue posible la identificación de bacterias especialmente Gram negativas a partir de los sustratos de lactosueros bovinos y caprinos, destacándose en este sustrato la presencia de un morfotipo representante del género *Pseudomonas*, cuyos miembros son ampliamente utilizados a nivel biotecnológico para la síntesis y acumulación de PHAs (Reddy *et al.*, 2003; Keshavarz y Roy, 2010).

Identificación molecular de bacterias. Las amplificaciones por PCR con los cebadores PA y PC5B permitieron obtener amplicones de 1.440 pb (Figura 2) en las 27 bacterias seleccionadas para su identificación, que incluían al menos un representante de cada morfotipo (Tabla 2). El análisis por BLASTN indicó que diez de las cepas pertenecen al género *Bacillus*, tres a los géneros *Lactococcus*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, dos a *Pantoea*; mientras que se identificó un representante en los géneros *Enterococcus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Leuconostoc*, *Gluconobacter* y *Acinetobacter*. Además, de una bacteria sólo determinada a nivel de la familia (Enterobacteriaceae). Estos resultados de BLASTN corresponden a un alineamiento local que conduce a identificaciones genéricas y putativas, pues dependen de la validez taxonómica de las accesiones depositadas en las bases de datos moleculares. Por lo tanto, para tener mayor confiabilidad en la identificación, se realizó un análisis filogenético con secuencias de referencia que presentan respaldo en la literatura científica (Patel, 2001; Janda y Abbott, 2007). Los dendrogramas resultantes presentaron topologías similares con ambos algoritmos (NJ y ML), lo que ofrece un soporte adicional a las inferencias taxonómicas realizadas. Por lo anterior, sólo se presenta el dendrograma de ML (Figura 3).

El análisis filogenético incluyó además de 27 secuencias obtenidas en este estudio, 55 secuencias representativas de diferentes especies y como grupo externo (outgroup) se utilizó una secuencia de *Deinococcus* sp. (Accesión KC49323). El dendrograma resultante presentó dos clados principales que separaron las bacterias Gram negativas (I) de las Gram positivas (II). El primer clado se subdividió a

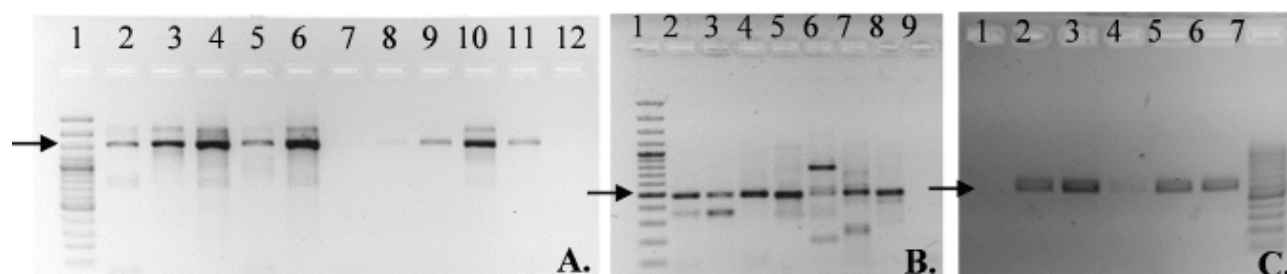


Figura 2. Amplicones obtenidos mediante PCR con cebadores específicos para la región: 16S del ADNr (1440 pb) (A); phaC de bacterias con arreglo tipo II del operón de biosíntesis de PHAs (491 pb) (B) y phaC de bacterias con arreglo tipo IV del operón de biosíntesis de PHAs (590 pb) (C). Líneas A-1, B-1 y C-7: marcador de peso molecular 100 pb plus (Fermentas). Líneas A-12, B-9 y C-1: controles negativos. Las flechas indican los fragmentos del tamaño esperado.

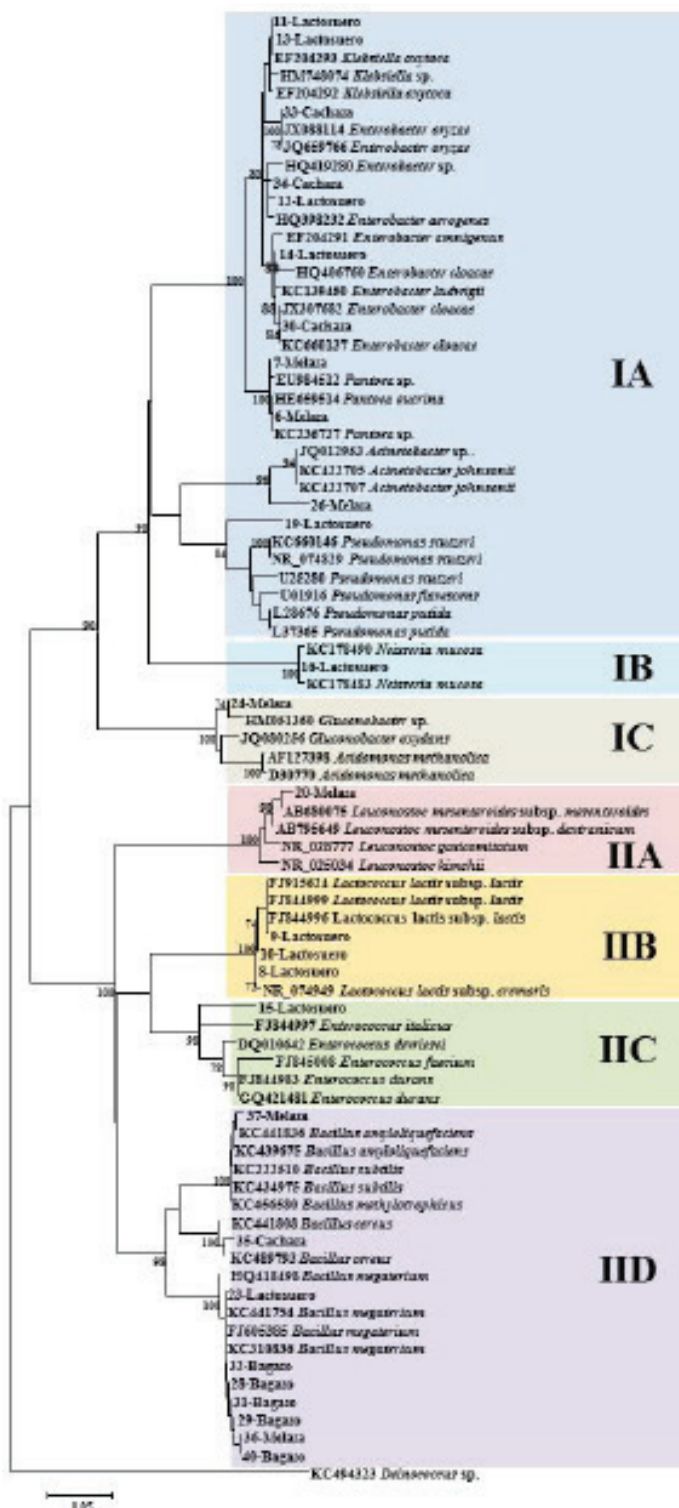


Figura 3. Árbol filogenético generado mediante el algoritmo ML, con base en secuencias 16S del ADNr de bacterias aisladas en Colombia a partir de subproductos de la caña de azúcar y lactosueros bovino y caprino. Los valores de bootstrap se indican sobre las ramas.

su vez en tres subclados soportados por valores de bootstrap de 100%, que diferenciaron las Gamma (IA), Beta (IB) y Alfa (IC) proteobacterias, siendo el subclado IA el que incluyó mayor número (11) de bacterias Gram negativas obtenidas de todos los subproductos, con excepción de bagazo de caña. Este subclado, dividió a su vez las bacterias productoras de PHAs entre las familias Enterobacteriaceae, Moraxellaceae y Pseudomonadaceae, siendo identificadas a nivel genérico las cepas 11-lactosuero y 13-lactosuero (*Klebsiella* sp.), 34-cachaza, 12-lactosuero y 14-lactosuero (*Enterobacter* sp.), 6-melaza (*Pantoea* sp.), 26-melaza (*Acinetobacter* sp.) y 19-suero (*Pseudomonas* sp.); mientras que fue posible inferir la identificación a nivel de especie en este subclado IA, de los aislamientos 33-cachaza (*Enterobacter oryzae*) y 30-cachaza (*Enterobacter cloacae*). Lo anterior, fue, además, soportado por la matriz de identidad genética, en donde dichos aislamientos compartieron valores de 98 y 100%, con cepas de referencia de ambas especies (matriz no mostrada).

El subclado IB alojó a la cepa 16-lactosuero en conjunto con dos secuencias de referencia de *Neisseria mucosa*; sin embargo, al compartir niveles de identidad de 87%, no fue posible identificar dicha bacteria a nivel de especie. Por su parte el subclado IC, agrupó la cepa 24-melaza con acetobacterias del género *Gluconobacter*, aunque sólo compartió con estas 81% de identidad.

Por otra parte, el clado II representando las bacterias Gram positivas, presentó cuatro subclados con soportes de bootstrap superiores al 98%. El subclado IIA incluyó al aislamiento 20-melaza con diferentes especies del género *Leuconostoc*, mientras que el IIB presentó tres cepas obtenidas de lactosuero (8, 9 y 10) en conjunto con diferentes secuencias de *Lactococcus lactis*, subsp. *lactis* y subsp. *cremoris*. El subclado IIC representa el género *Enterococcus* e incluyó el aislamiento 15-lactosuero. Finalmente, el subclado IID agrupó todas las especies del género *Bacillus*, que se subdividieron en tres grupos soportados por valores bootstrap de 100% y que representan los complejos de especies *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. megaterium*; siendo las cepas 37-melaza y 35-cachaza, representantes de los dos primeros complejos; mientras que siete cepas se identificaron como *B. megaterium*, lo cual se soportó, adicionalmente, por altos niveles en la matriz de identidad (>99%) con cepas de referencia de dicha especie (matriz no mostrada).

De las bacterias identificadas en este trabajo, ya se habían mencionado en la literatura como productoras

de PHAs miembros de los géneros *Enterobacter* (Naheed *et al.*, 2012), *Klebsiella* (Zhang *et al.*, 1994); *Pantoeae* (Gasser *et al.*, 2009), *Acinetobacter* (Reddy *et al.*, 2003), *Pseudomonas* (Reddy *et al.*, 2003), *Neisseria* (Kalia *et al.*, 2007), *Lactococcus* (Tanaka *et al.*, 1995) y *Bacillus* (Reddy *et al.*, 2003); mientras que, hasta donde se conoce, dichos reportes no se han realizado para especies de los géneros *Leuconostoc*, *Gluconobacter* y *Enterococcus*, por lo que el estudio de dicha característica en las cepas aquí aisladas e identificadas, resultará prioritario en el futuro próximo. Para esto será necesario realizar procesos fermentativos con diferentes fuentes de carbono y condiciones operacionales, además de detectar, clonar y secuenciar los genes responsables de la biosíntesis de PHAs en dichas bacterias, de tal manera que se evalúe el tipo de su operón.

A nivel mundial, las bacterias Gram negativas productoras de PHAs más recurrentemente aisladas y utilizadas corresponden a las especies *C. necator*, *A. latus*, *P. oleovorans*, *P. putida*, *E. coli* recombinante y *Azotobacter vinelandii*; siendo *C. necator* la más empleada por su capacidad de acumular grandes cantidades de PHB, en un porcentaje cercano al 80% del peso seco celular, a partir de medios simples con fuentes de carbono económicas (Reddy *et al.*, 2003; Keshavarz y Roy, 2010). Para el caso de las bacterias Gram positivas, *B. megaterium* es la bacteria más registrada como productora de PHAs (Reddy *et al.*, 2003; Shamala *et al.*, 2003). Esta bacteria ha sido aislada de una gran variedad de sustratos y desechos agroindustriales, así como utilizada en procesos fermentativos con diferentes fuentes de carbono, siendo posible a partir de la manipulación de las condiciones de crecimiento, reducir su esporulación y por tanto, inducir la acumulación de altas cantidades de bioplásticos (López *et al.*, 2012). En Colombia se han adelantado diferentes estudios tendientes a detectar la presencia de bacterias productoras de PHAs a partir de diferentes sustratos y residuos de procesos agroindustriales (Moreno *et al.*, 2007; Revelo *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2012). Recientemente, éstos últimos autores aislaron a partir de suelos contaminados con residuos del beneficio de fique (*Furcraea bedinghausii*) en el municipio de Guarne (Antioquia), cuatro cepas con potencial para producir PHAs, siendo identificadas como *B. megaterium* (dos cepas), *B. mycoides* y *Gordonia* sp. El gen PhaC fue detectado en los dos aislamientos de *B. megaterium* y mediante cromatografía de gases con detector selectivo de masas, fue posible develar al polihidroxibutirato (PHB) como el principal biopolímero

acumulado en dichas bacterias. Ya que en el presente estudio, también se identificaron varias cepas de *B. megaterium*, su utilización en pruebas posteriores que evalúen diferentes sustratos y desechos agroindustriales como fuentes de síntesis de PHAs, resultará altamente promisorio para su posible escalado industrial en Colombia, más aún cuando existen reportes recientes de la posibilidad de aumentar la eficiencia en la producción de PHAs por parte de cepas de esta especie (hasta 65% de PHB), mediante el control de la concentración de amonio (0,2-0,4 g L⁻¹) en sistemas de fermentación por lotes (Sabra y Aboud-Zeid, 2008).

Por otra parte, en el presente estudio, los lactosueros de origen bovino y caprino se caracterizaron por mostrar la mayor diversidad de morfotipos bacterianos productores de PHAs, seguramente como resultado de su riqueza nutricional, siendo identificadas en estos sustratos las bacterias *Lactococcus lactis*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. y *Pseudomonas* sp. La utilización de dichas bacterias representa un potencial importante para Colombia, que ha logrado establecerse como

el cuarto productor de lácteos en América Latina, con cerca de 6500 millones de litros/año (Proexport, 2011b). Diferentes trabajos han confirmado la utilidad de bacterias para transformar lactosueros en PHAs, incluyendo *E. coli*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Azotobacter* spp., *Lactobacillus* spp., *C. necator*, *Haloferax mediterranei* y *P. hydrogenovora* (Koller et al., 2012). En adición, existen informes sobre el mejoramiento en la eficiencia de síntesis de PHAs a partir de este sustrato y que pueden ser evaluados con las cepas obtenidas en el presente estudio. En este sentido, Ahn et al. (2000) registraron concentraciones finales de 92,6 g L⁻¹ de PHB y altas productividades en su síntesis (2,57 g/L/h), a partir de lactosuero sometido a fermentación Fed Batch con la bacteria recombinante *E. coli* CGSC 4401, transformada con los genes de la biosíntesis de PHAs de *A. latus*. Durante el proceso los autores, estratégicamente, disminuyeron la concentración de oxígeno disuelto en el medio (DOC) por etapas, del 40% al 30% y luego al 15%. Cada vez que el DOC se redujo durante la fase activa síntesis de PHB, la tasa de síntesis de PHB aumentó de forma pronunciada.

Tabla 3. Similitud de secuencias del gen phaC de las bacterias aisladas a partir de subproductos de caña de azúcar y lactosueros en Colombia, con respecto a la base de datos del GenBank. En adición al porcentaje de identidad, se presentan los valores e de la comparación.

Aislamiento	Similitud en GenBank	Número Accesoión	Gen	Identidad	Valor e
6-Melaza	<i>Pseudomonas entomophila</i>	CT573326	poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase 1	92%	0,0
7-Melaza	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	AY232443	PhaC (phaC) genes	92%	0,0
14-Lactosuero	<i>Pseudomonas entomophila</i>	CT573326	poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase 1	92%	9e ⁻¹⁷⁷
16-Lactosuero	<i>Paracoccus</i> sp.	HM026759	poly(3-hydroxyalkanoate) synthase	81%	1e ⁻¹⁰⁴
9-Lactosuero	<i>Bacillus megaterium</i>	JQ755810	polyhydroxyalkanoate synthase (phaC)	99%	0,0
10-Lactosuero	<i>Bacillus megaterium</i>	JQ755810	polyhydroxyalkanoate synthase (phaC)	100%	0,0
15-Lactosuero	<i>Bacillus megaterium</i>	JQ755810	polyhydroxyalkanoate synthase (phaC)	100%	0,0
23-Lactosuero	<i>Bacillus megaterium</i>	JQ755810	polyhydroxyalkanoate synthase (phaC)	97%	0,0
28-Bagazo	<i>Bacillus megaterium</i>	JQ755810	polyhydroxyalkanoate synthase (phaC)	100%	0,0
29-Bagazo	<i>Bacillus</i> sp.	FJ436021	PhaC gene	98%	0,0
31-Bagazo	<i>Bacillus</i> sp.	FJ436021	PhaC gene	98%	0,0
32-Bagazo	<i>Bacillus megaterium</i>	JQ755810	polyhydroxyalkanoate synthase (phaC)	97%	0,0
36-Melaza	<i>Bacillus megaterium</i>	JQ755810	polyhydroxyalkanoate synthase (phaC)	100%	0,0

Detección del gen *phaC*. La identificación molecular de las bacterias bajo estudio, sirvió de base para realizar la selección de los cebadores más apropiados para la detección del gen *phaC*, siendo posible su confirmación en un subgrupo de siete de las cepas (Tabla 2) mediante la PCR anidada que utiliza los cebadores GD/G1R/G2R, y que generó amplicones de 491 pb (Figura 2). Adicionalmente, la utilización de los cebadores B1F/R dirigidos a amplificar una porción del gen *phaC* del tipo IV, permitió la obtención de amplicones de 590 pb en nueve cepas identificadas molecularmente como *B. megaterium*. La naturaleza de dichos amplicones fue confirmada mediante secuenciación directa en dos cepas, representando los morfotipos 1 y 13 y conteniendo el arreglo genético de biosíntesis de PHAs tipo II, y en cuatro cepas de los morfotipos 2, 9, 16 y 17, que presentaron el operón tipo IV; obteniéndose, con excepción de la cepa 16-lactosuero, valores de identidad en GenBank superiores al 92% con respecto al gen *phaC* de bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus* sp., respectivamente (Tabla 3). La cepa 16-lactosuero, identificada como asociada filogenéticamente al género *Neisseria*, fue la excepción al presentar tan sólo un 82% de identidad con el gen *phaC* de la bacteria *Paracoccus* sp. (Accesión HM26759), lo cual no permite su ubicación en uno de los cuatro tipos de operones de biosíntesis de PHAs.

Este estudio abre la posibilidad de realizar un amplio rango de investigaciones y aplicaciones futuras, para la evaluación de sustratos y condiciones fermentativas, utilizando las bacterias aisladas e identificadas a partir de residuos de la caña de azúcar y lactosueros en Colombia. De gran interés resultará evaluar, no sólo su capacidad para metabolizar los mismos residuos a partir de los cuales fueron aisladas, sino también, otros subproductos y desechos agroindustriales producidos en Colombia y otros países tropicales, como aquellos generados en el procesamiento de palma de aceite, pulpa de frutas y de concentrados de animales.

CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de 38 cepas bacterianas que presentan potencial como productoras de PHAs, siendo identificadas 27 cepas, a nivel de género o especie, mediante secuenciación de regiones 16S del ADNr. Los lactosueros de bovinos y caprinos fueron los que presentaron mayor diversidad de bacterias, con miembros de los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Bacillus*;

mientras que, en los residuos de caña de azúcar se destacó el aislamiento repetido de *B. megaterium*.

Fue posible la detección del gen *phaC*, mediante PCR específica en aislamientos seleccionados que presentaron tinción positiva de PHAs con rojo y azul Nilo. Las secuencias obtenidas confirmaron los altos niveles de identidad de dicho gen, con respecto a la región correspondiente en los operones de biosíntesis de PHAs de los tipos II y IV depositados en las bases de datos moleculares.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto DIME 20101007214. Se agradece a Catalina Pineda Molina del Laboratorio de Cultivo Tisular del CES, por su asistencia con las observaciones de microscopía de fluorescencia y al Ingenio Incauca por proveer los subproductos de la caña de azúcar.

BIBLIOGRAFÍA

Ahn, W.S., S.J. Park and S.Y. Lee. 2000. Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8): 3624-3627.

Ahn, W.S., S.J. Park and S.Y. Lee. 2001. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnological Letters* 23(3): 235-240.

Basanta, R., M.A. García, J.E. Cervantes, H. Mata y G. Bustos. 2007. Sostenibilidad del reciclaje de residuos de la agroindustria azucarera: una revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 5(4):293-305.

Capuccino, J. and N. Sherman. 2007. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Benjamin Cummings, New York. 544 p.

Ciesielski, S., A. Cydzik-Kwiatkowska, T. Pokoj and E. Klimiuk. 2006. Molecular detection and diversity of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates-producing bacteria enriched from activated sludge. *Journal of Applied Microbiology* 101(1): 190-199.

De Lima, T.C.S., B.M. Grisi and M. Bonato. 1999. Bacteria isolated from sugarcane agro ecosystem: their potential production of polyhydroxyalkanoates

- and resistance to antibiotics. *Revista de Microbiología* 30(1): 241-224.
- Franco, M., D. Gómez, N. Castro y M. Rendón. 2009. Polihidroxicanoatos en actinomicetos nativos de suelos colombianos. *Revista Peruana de Biología* 16(1): 115-118.
- Gasser, I., H. Muller and G. Berg. 2009. Ecology and characterization of polyhydroxyalkanoate producing microorganisms on and in plants. *FEMS Microbiology Ecology* 70(1): 142-150.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Janda, J.M. and L.S. Abbott. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial Identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* 45(9): 2761-2764.
- Kalia, V., S. Lal and S. Cheema. 2007. Insight in to the phylogeny of polyhydroxyalkanoate biosynthesis: Horizontal gene transfer. *Gene* 389(1): 19-26.
- Keshavarz, T. and P. Roy. 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology* 13(3): 321-326.
- Koller, M., A. Salerno, A. Muhr, A. Reiterer, E. Chiellini, S. Casella, P. Horvat and G. Braunegg. 2012. Chapter 2: Whey lactose as a raw material for microbial production of biodegradable polyester. pp. 19-60. In: Saleh, H. (ed.). *Polyesters*. InTech, China. 420 p.
- Kuske, C.R., S.M. Bams and J.D. Busch. 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid Southwestern United States that are present in many geographic regions. *Applied Environmental Microbiology* 63(9): 3614-3621.
- Lau, N. and K. Sudesh. 2012. Revelation of the ability of *Burkholderia* sp. USM (JCM 15050) PHA synthase to polymerize 4-hydroxybutyrate monomer. *AMB Express* 2(41): 2-9.
- Londoño, M., J. Sepúlveda, A. Hernández y J. Parra. 2008. Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín* 61(1): 4409-4421.
- López, J.A., J.M. Naranjo, J.C. Higueta, M.A. Cubitto, C.A. Cardona and M.A. Villar. 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.
- McCool, G. and M. Cannon. 2001. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* 183(14): 4235-4243.
- Moreno, N., I. Gutiérrez, D. Malagón, V. Grosso, D. Revelo, D. Suárez, J. González, F. Aristizábal, A. Espinosa and D. Montoya. 2007. Bioprospecting and characterization of poly- β -hydroxyalkanoate (PHAs) producing bacteria isolated from Colombian sugarcane producing areas. *African Journal of Biotechnology* 6(13): 1536-1543.
- Naheed N., N. Jamil, S. Hasnain and G. Abbas. 2012. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in *Enterobacter* sp. SEL2 and *Enterobacteriaceae Bacterium* sp. PFW1 using sugar cane molasses as media. *African Journal of Biotechnology* 11(16): 3321-3332.
- Ostle, A.G. and J.G. Holt. 1982. Nile Blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyric acid. *Applied and Environmental Microbiology* 44(1): 238-241.
- Parra, R.A., 2009. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 62(1): 4967-4982.
- Patel, J.B. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis* 6(4): 313-321.
- PROEXPORT. 2011a. Sector Agroindustrial Colombiano, <http://www.proexport.com.co>; consulta: febrero 2013.
- PROEXPORT. 2011b. Sector lácteo en Colombia. En: http://www.botschaft-kolumbien.de/descargas_proexport/berlin_2011/espanol/inversion/agroindustria/perfil_lacteo.pdf. 18 p.; consulta: abril 2013.
- Reddy, C.S.K., R. Ghai, R. Rashmi and V.C. Kalia. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* 87(2): 137-146.

- Rehm, B.H. and A. Steinbuchel. 1999. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 25(1): 3-19.
- Revelo, D., M.V. Grosso, N. Moreno and D. Montoya. 2007. A most effective method for selecting a broad range of short and medium chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. *Electronic Journal of Biotechnology* 10(3): 348-357.
- Sabra, W. and D.M. Aboud-Zeid. 2008. Improving feeding strategies for maximizing polyhydroxybutyrate yield by *Bacillus megaterium*. *Research Journal of Microbiology* 3(5): 308-318.
- Sánchez, S., M. Marín, A. Mora y M. Yepes. 2012. Identificación de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14(2): 89-100.
- Schlegel, H.G., R. Lafferty and I. Kraussl. 1970. The isolation of mutants not accumulating poly-beta-hydroxybutyric acid. *Archives of Microbiology* 71(3): 283-294.
- Shamala, T.R., A. Chandrashekar, S.V.N. Vijayendra and L. Kshama. 2003. Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Applied Microbiology* 94(3): 369-374.
- Sheu, D.S., Y.T. Wang and C.Y. Lee. 2000. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology* 146(8): 2019-2025.
- Solaiman, D.K., R.D. Ashby and T.A. Foglia. 2000. Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53(6): 690-694.
- Spiekermann, P., B.H. Rehm, R. Kalscheuer, D. Baumeister and A. Steinbuchel. 1999. A sensitive, viable-colony staining method using Nile Red for direct screening of bacteria that accumulate poly-hydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology* 171(2): 73-80.
- Stubbe, J. and J. Tian. 2003. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase. *Natural Products Reports* 20(5): 445-457.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.
- Tanaka, K., K. Katamune and A. Ishizaki. 1995. Fermentative production of poly(β -hydroxybutyric acid) from xylose via L-lactate by a two-stage culture method employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*. *Canadian Journal of Microbiology* 41(13): 257-261.
- Young, F.K., R. James, K. Sheldon and W. May. 1994. Microbial Production of poly- β -hydroxybutyric acid from d-xylose and lactose by *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology* 60(11): 4195-4198.
- Zhang, H., V. Obias, K. Gonyer and D. Dennis. 1994. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 60(4): 1198-1205.