Original article

Production of bioplastics by bacilli isolated from the landfill of waste and sewage in Golestan province

Lotfvarzi A[1], Taleb Houseini S[1], Bagheri Hashem Abad A[1], Pordeli HR[2], Yolmeh F[2], Ahani Azari A[2]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

***Corresponding author:** E-mail: AminLotfvarzii@gmail.com

Received:10/7/2021 Accepted:10/21/2021

Abstract

Millions of tons of plastics are produced annually in the world, which are very durable and take hundreds of years to decompose on their own. Bioplastics are a special type of plastic that is produced from sources of vegetable oils, starches, cellulose or bacterial derivatives and is very different from ordinary plastics in this regard, which will be a good alternative to plastics in the future. 70 samples were collected from waste recycling site, cultured and purified on nutrient agar and these samples were stained with blue indigo staining method to detect polyhydroxy butyrate (PHB) generating isolates And cultured for 2 days at 37 ° C in Minimal Broth Davis medium. After placing the samples on the slide and staining according to the intensity of the color that was created, it was used to produce bioplastics. The results of this study showed that the microorganism Bacillus cereus produces abundant poly-3-hydroxybutyrate in both environments (wastewater and soil), which is used to produce bioplastics on both laboratory and industrial scales. According to the results, the production of bioplastics is possible through bacilli isolated from bacterial isolates.

Keywords: Bioplastic, Polyhydroxy butyrate, Polyhydroxy Alkanoate, *Bacillus*

مقاله تحقیقی

تولید بیو پلاستیک توسط باسیلوس های ایزوله شده از خاک محل دفن زباله و فاضلاب استان گلستان

امین لطف ورزی*[1،]، سید طالب حسینی[1] ، علی باقری هاشم آباد[1] ،حمید رضا پردلی[2]،فرهاد یلمه[2]،آنیا آهنی آذری[2]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قائمشهر، دانشگاه ازاد اسلامی، قائم شهر، ایران
۲. گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه ، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

***مسئول مکاتبات:** ادرس الکترونیکی : AminLotfvarzii@gmail.com

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد گرگان، دانشگاه ازاد اسلامی ، گرگان ، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۱۵ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۷/۲۹

چکیده

در دنیا سالانه میلیون ها تن پلاستیک تولید می شود که بسیار بادوام هستند و صدها سال طول می کشد تا به خودی خود تجزیه شوند. بیوپلاستیک ها نوع خاصی از پلاستیک هستند که از منابع روغن های گیاهی، نشاسته، سلولز یا مشتقات باکتریایی تولید شده و از این نظر با پلاستیک های عادی بسیار متفاوت است، که در آینده جایگزین خوبی برای انواع پلاستیک ها خواهد بود. ۷۰ نمونه از محل بازیافت زباله ها جمع آوری شد ، کشت و خالص سازی روی نوترینت آگار انجام شد و این نمونه ها با روش رنگ آمیزی نیل آبی جهت تشخیص ایزوله های مولد پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) رنگ امیزی شدند و به مدت ۲روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محیط کشت Minimal Broth Davis کشت داده شد. پس از قرار دادن نمونه ها بر روی لام و رنگ آمیزی با توجه به شدت رنگی که ایجاد شده است برای تولید بیوپلاستیک استفاده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که میکروارگانیسم *باسیلوس سرئوس*، پلی- ۳ هیدروکسی بوتیرات فراوانی در هر دو محیط (فاضلاب و خاک) تولید می کند که برای تولید بیوپلاستیک، هم در مقیاس آزمایشگاهی هم در مقیاس صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. طبق نتایج بدست آمده، تولید بیوپلاستیک ها از طریق *باسیلوس های* جداشده از ایزوله های باکتریایی، امکان پذیر است.

واژه های کلیدی: بیوپلاستیک، پلی هیدروکسی بوتیرات، پلی هیدروکسی آلکانوات، *باسیلوس*

مقدمه

زندگی مدرن علاوه بر رفاهی که برای انسان به همراه دارد گاه ضررهای جبران ناپذیری را نصیب او می کند. کیسه های پلاستیکی و ظروف یکبار مصرف نیز در این مورد مصداق دارند. بر اساس تحقیقات انجام شده تنها در ایران سالانه بیش از ۳ میلیون تن پلاستیک تولید می شود. بیشتر این پلاستیک ها نیز بادوام هستند و صدها سال طول می-کشد تا به خودی خود تجزیه و نابود شوند. امروزه پلاستیک‌ها به عنوان یک ماده سنتزی و مصنوعی نقش بسیار مهمی در تولیدات صنایع مختلف ایفاء می‌کنند. کاربردهای وسیع و تولیدات روزافزون پلاستیک ها سبب مشکلات عمده از نظر زیست محیطی گردیده به طوری که پلاستیک ها به عنوان یکی از عمده ترین آلاینده های محیط زیست از طرف سازمان جهانی محیط زیست معرفی

شده اند. واژه زیست تخریب پذیر به معنی موادی است که به سادگی توسط فعالیت موجودات زنده به زیر واحدهای سازنده خود تجزیه شده و بنابراین درمحیط باقی نمی مانند (۱). بیوپلاستیک ها دسته ای ازپلاستیک ها هستند که همه یا بخشی از وزن آنها از منابع تجدیدپذیر مانند روغن های گیاهی، نشاسته، سلولز یا مشتقات باکتریایی تولید شده است و از این نظر با پلاستیک های عادی که بر پایه‌ی منابع هیدروکربنی فسیلی مانند نفت و گاز هستند، متفاوت می-باشد. در دهه اخیر دانشمندان و محققین، موادی پیشنهاد نمودند که زیست تخریب بوده و انواع آن عبارتند از پلی استرهای آلیفاتیک[1] که شامل پلی هیدروکسی آلکانوات[2] (PHAS) مانند پلی- ۳ هیدروکسی بوتیرات[3] (PHB)، پلی هیدروکسی والدات[4] (PHV) و پلی هیدروکسی هگزانوات[5] (PHH)، پلی لاکتیک اسید[6] (PLA)، پلی بوتلین ساکسینات[7] (PBS) و پلی کاپرو لاکتون[8] (PLC)، پلی انهایدرایدها[9]، پلی وینیل الکل[10] (PVA) ، استرهای سلولز، ترکیبات نشاسته و استفاده از مواد افزودنی اکسید کننده در پلاستیک های آلیفاتیک می باشد. PHA ها عموما از زیرواحد بتا هیدروکسی آلکانوات و به واسطه مسیری ساده با سه آنزیم از استیل کوآنزیم A ساخته شده و معروف ترین آنها پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) می‌باشد (۲). پلی- ۳- هیدروکسی بوتیرات برای اولین بار توسط لمویگن در سال ۱۹۲۶ در انستیتو پاستور در فرانسه شناسایی شد. پلی- ۳- هیدروکسی بوتیرات (PHB) به وسیله اتصال مونومرهای بتا هیدروکسی بوتیرات توسط پیوندهای استری تشکیل می‌شود (۴،۳). بیشتر انواع باکتری ها از جمله *Bacillus* sp. ، *Pseudomonas* sp. ، *Cupriavidus* sp. و *Aeromonas* sp. جهت تولید موثر PHB در صنعت مورد بررسی قرار گرفتند (۸-۵). چندین گونه باکتریایی مثل *Actinobacillus*، *Azotobacter*، *Agrobacterium*، *Rhodobacter* و *Sphaerotilius* برای توانایی‌شان جهت تبدیل ضایعات آلی به PHB باکتریایی تحت نظر هستند. جهت تولید صنعتی PHB، برخی گونه‌های باکتریایی مثل *Cupriavidus* sp.، *Aeromonas* sp. ، *Pseudomonas* sp. ، *Bacillus* sp. بطور گسترده مورد استفاده قرار گرفتند (۹-۵). یکی از انتقادهایی که به رواج پلاستیک‌های بر پایه‌ی نشاسته در جهان می‌شود، رقابت آن‌ها با صنایع غذایی برای نشاسته است که می‌تواند باعث افزایش قسمت مواد خوراکی پایه و ایجاد فشار بر مردم مناطق فقیر جهان شود (۱۰). تولید و مصرف پلاستیک در سراسر جهان در حال افزایش است (۱۱). ظروف و بسته بندی های پلاستیکی که معمولا پلاستیک های یک بار مصرف هستند، نه تنها با ورود به اقیانوس ها باعث مشکلات متعددی می شوند (۱۶-۱۱)، بلکه باعث اشغال سایت های دفن زباله و باعث تغییرات اقلیمی از طریق انتشار CO_2 در هنگام سوزاندن زباله و باعث مصرف منابع فسیلی و تاثیر گذاری بر محیط زیست و چرخه زندگی موجودات می شود (۱۹-۱۷). هزینه تولید بیوپلاستیک ها در مقیاس بالا بسیار هزینه بر است، این هزینه حدود ۱/۳ الی ۴ یورو برای هر کیلوگرم است (۲۸). بلکه از آنجایی که تولید بیوپلاستیک ها در مقیاس بالا در صنعت بسیار هزینه بر است، این عمل بطور گسترده مورد استفاده قرار نمی گیرد. بطور حتم تولید بیوپلاستیک ها منجر به کاهش در انتشار دی اکسید کربن در مقایسه با پلاستیک های سنتی می شود. در نتیجه پلاستیک های قابل تجزیه، دوستدار طبیعت هستند و در آینده جایگزین خوبی برای انواع پلاستیک ها خواهند بود (۲۸).

مواد و روش ها

نمونه برداری و جداسازی باکتری ها از زباله های آلی

۴۰ نمونه از خاک و ۳۰ نمونه از فاضلاب از محل دفن زباله در شهر گرگان تهیه گردید. پس از جمع آوری، نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شدند. به دنبال آن کشت سطحی بر روی محیط نوترینت آگار انجام شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. وقتی که رشد باکتری به میزان مناسبی رسید یک لوپ، از باکتری برداشته

[1] Aliphatic polyesters
[2] Polyhydroxy alkanoate
[3] Poly -3 hydroxybutyrate
[4] Polyhydroxy waldate
[5] Polyhydroxy hexanoate
[6] Polylactic acid
[7] Polybutylene saxinate
[8] Polycapro lactone
[9] Poly anhydrides
[10] Polyvinyl alcohol

شد و کشت خطی بر روی نوترینت آگار جهت بدست آوردن تک کلنی انجام شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد.

بررسی ایزوله ها از نظر تولید PHB

باکتری های جدا شده روی محیط نوترینت آگار به منظور تولید و بررسی PHB کشت داده شد.برای تشخیص ایزوله‌های باکتریایی بدست آمده از فاضلاب و خاک و استفاده از آنها برای تولید بیو پلاستیک، از رنگ آمیزی نیل آبی استفاده شد. ایزوله‌های باکتریایی به مدت ۲ تا ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت Minimal Broth Davis (شرکت مرک آلمان)کشت داده شد. یک لوپ باکتری از هر یک از کشت ها برداشته و بر روی لام شفاف و استریل، تثبیت حرارتی شد و با نیل آبی رنگ‌آمیزی شد. این نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق رنگ شدند و لام‌ها شستشو شدند. سپس لام‌های حاوی نمونه‌ها به مدت چند دقیقه در محیط خشک شدند و با میکروسکوپ فلوئورسنس در طول موج ۴۹۰ نانومتر مشاهده شدند. ایزوله‌های تولید کننده پلاستیک رنگ زرد-نارنجی را ایجاد می‌کنند و با توجه به شدت رنگی که ایجاد می‌کنند برای تولید بیوپلاستیک استفاده می‌شوند.

شناسایی ایزوله‌های مولد PHB

برای این منظور تست‌های مختلفی انجام شد مثل رنگ امیزی گرم (جهت پی بردن به گرم مثبت یا منفی بودن باکتری)، عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی(جهت پی بردن به مورفولوژی باکتری)، تست‌های بیوشیمیایی مختلف مانند تحرک، استفاده از سیترات، هیدرولیز ژلاتین، تست کاتالاز و هیدرولیز نشاسته (جهت شناسایی و تشخیص جنس و گونه باکتری ها) مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج بیوپلاستیک

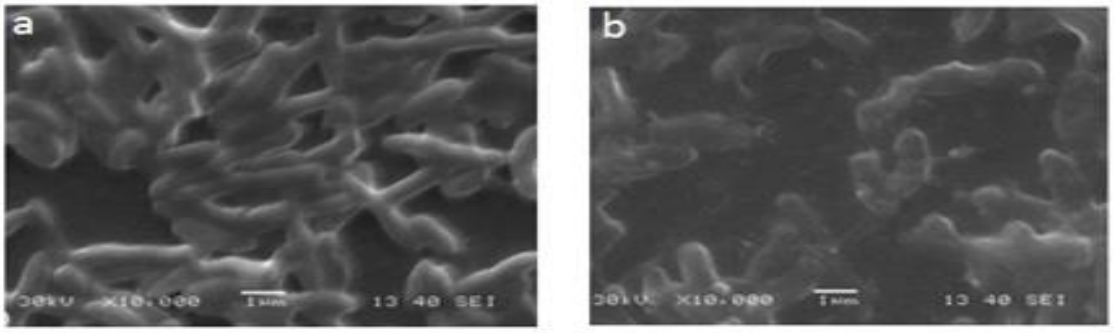
ایزوله های انتخاب شده در محیط کشت Minimal Broth Davis ، به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۱۵۰ دور بر دقیقه شیکر روتاری، کشت داده شد. پس از این مدت، استخراج بیوپلاستیک به روش سدیم هیپوکلریت کلروفرم انجام شد. ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت Minimal Broth Davis گرفته شد. در g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد. ماده رسوب کرده در ۲/۵ میلی‌لیتر سدیم هیپوکلریت ۴ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر کلروفرم داغ، به منظور هضم، حل شده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. این سوسپانسیون در g ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز پایینی حاوی پلاستیک با کلروفرم جمع آوری و استخراج با کلروفرم داغ ادامه وبا مخلوط اتانول و استون (۱:۱) رسوب داده شد. این رسوب در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد جهت بدست آوردن کریستال های بی‌رنگ پلاستیک خشک می‌شود (۲۱،۲۰).

نتایج

شناسایی ایزوله های باکتریایی از منابع خاک و فاضلاب

بطور کلی ۱۷ ایزوله (۱۰ ایزوله از خاک و ۷ ایزوله از فاضلاب) از ۷۰ نمونه (۴۰ نمونه خاک و ۳۰ نمونه از فاضلاب) جدا و بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند و تست های بیوشیمیایی مختلفی جهت شناسایی ایزوله های تولید کننده PHB جدا شده از خاک و فاضلاب صورت پذیرفت که شامل رنگ امیزی گرم، تست کاتالاز، تست حرکت، تست سیترات، هیدولیز نشاسته و هیدرولیز ژلاتین بودند که نتایج تست های انجام شده مثبت بود.

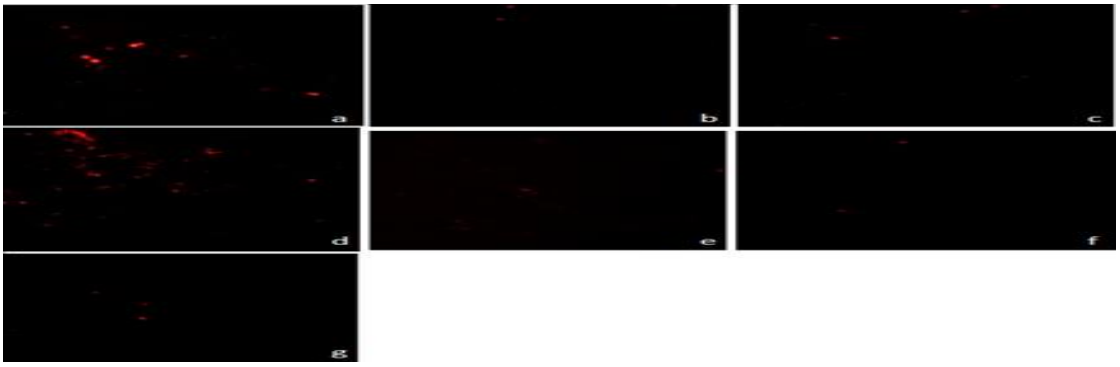
عکس‌برداری میکروسکوپ الکترونی دو ایزوله وکشت داده شده بر محیط Luria broth(LB) میله‌ای بودن باکتری-های جدا شده را تایید نمودند (شکل ۱).



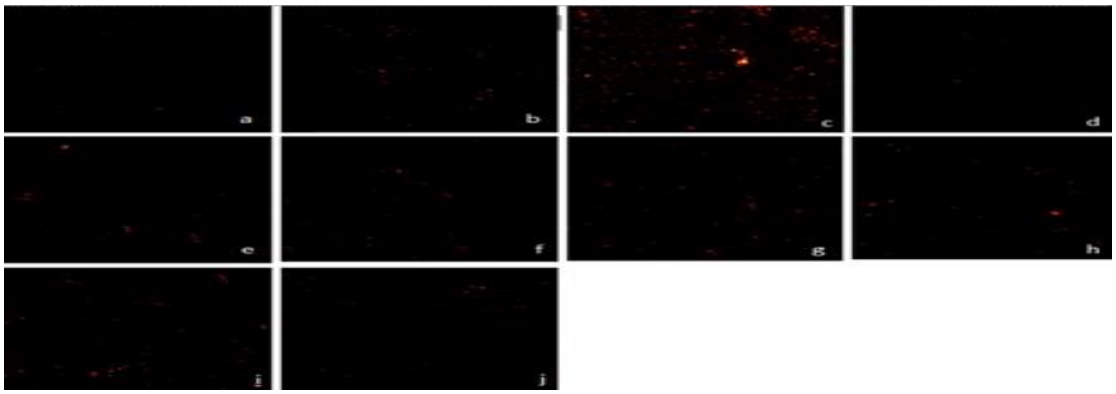
شکل ۱ - تصاویر میکروسکوپ الکترونی ایزوله های تولید کننده PHB جداشده از فاضلاب (شکل a) ، خاک (شکل b).

میزان تولید PHB توسط ایزوله های باکتریایی

ایزوله‌های باکتریایی از منابع فاضلابی و خاکی جهت تولیدPHB با استفاده از روش رنگ آمیزی نیل آبی غربال گری شدند به طوری که زیر میکروسکوپ فلوئورسنس، کلنی های تولید کننده PHB، به رنگ نارنجی روشن ظاهر شدند. به ترتیب ایزوله‌های d و a در میان ایزوله‌های جداشده از فاضلاب ،مقدار PHB بیشتری را از سایر ایزوله‌ها تحت میکروسکوپ فلوئورسنت تولید کرده بودند (شکل ۲) و همچنین ایزوله C در میان ایزوله‌های جدا شده از خاک، توانایی تولید PHB بیشتری را داشتند (شکل ۳).



شکل ۲ - تصاویر میکروسکوپ فلوئورسنسی باکتری های تولید کننده PHB ایزوله شده از فاضلاب.



شکل ۳ - تصاویر میکروسکوپ فلوئورسنسی باکتری های تولید کننده PHB ایزوله شده از خاک.

استخراج PHB تولیدشده

PHB استخراج شده به روش هیپوکلوریت کلروفروم از ایزوله‌های d فاضلاب و c خاک (که در میان ایزوله‌های خود میزانPHB بیشتری تولید نمودند) در شکل زیر نشان داده شده است (شکل ۴).

شکل ۴ : کریستال های PHB استخراج شده از باکتری های ایزوله شده از خاک (a)، فاضلاب (b).

بحث

با مقایسه توانایی تولید PHB بین ایزوله های جدا شده از فاضلاب و خاک مشخص شد که باکتری های جدا شده از فاضلاب توانایی بیشتری را در تولید PHB داشتند. satio وهمکاران ، Comamonas acidovorans DS-17 را از لجن فعال جداسازی نمودند و یافتند که این باکتری کوپلیمرهای ۳- هیدروکسی بوتیرات و ۴-هیدروکسی بوتیرات را تحت دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و شرایط رشد محدودشده تولید می‌کند که پژوهش satio وهمکاران با تحقیق حاضر مطابقت داشت و تایید کننده ان است (۶).

در پژوهش Hori و همکاران ، Hikmet و همکاران ، Rohini و همکاران ، Mohapatra و همکاران گزارش شد که بسیاری از نژادهای باکتری‌های *باسیلوس* به خصوص *باسیلوس سرئوس* دارای پتانسیل بالایی از تجمع PHB درون سیتوپلاسم خود تحت شرایط محدود غذایی در سطوح ۹۶-۹۷ درصد از وزن خشک سلولی هستند (۲۵-۲۲). طبق نتایج حاصل از این تحقیق، *باسیلوس سرئوس* بیشترین میزان تولید PHB را داشتند که با تحقیق حاضر مطابقت دارد.

Rohini و همکاران نشان دادند که تولید و شناسایی PHB را از *باسیلوس تورینجینسیس* بررسی و گزارش نمودند که بیشترین میزان زیست‌توده خشک (۳/۹ تا ۴/۱ گرم بر لیتر) در حضور ۱ درصد گلیسرول و کمترین میزان زیست-توده خشک (۱/۲۸ گرم بر لیتر) در حضور ۱ درصد اسید لاکتیک اندازه‌گیری شده است. علاوه بر این، نشان دادند که بیشترین میزان PHB در حضور گلیسرول مشاهده شده است و از سوی دیگر در حضور استیک اسید و اتانول PHB تولید نشده است (۲۵) ولی در پژوهش حاضر برای استخراج PHB از روش سدیم هیپوکلریت کلروفرم استفاده گردید.

Nair و همکاران ، Sangkharak و همکاران نشان دادند که بسیاری از عوامل موثر بر تولید PHB توسط ایزوله های زیست محیطی وجود دارد که شامل مواد مغذی مانند کربن، نیتروژن، اسیدهای آمینه و یون‌های فلزی هستند که در میان آن‌ها، منبع کربن محدودکننده‌ترین عامل تولید PHB است و از این رو بهینه‌سازی شرایط تولید PHB اهمیت بالایی دارد (۲۷،۲۶).

Bhagowati و همکاران تولید، بهینه سازی و شناسایی پلاستیک زیست‌تخریب‌پذیر PHB را از *باسیلوس* بررسی و گزارش نمودند که *باسیلوس سرئوس* جدا شده از خاک بیشترین پتانسیل تولید PHB را با مقدار ۲۲/۱ و ۴۰ درصد به ترتیب پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت دارد و پس از آن *باسیلوس* جدا شده از دریا این پتانسیل را با مقدار ۵ و ۳۳ درصد به ترتیب پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داده است. علاوه‌بر این گزارش نمودند که مالتوز به عنوان مهمترین منبع کربن برای تولید این پلاستیک زیست‌تخریب‌پذیر است (۲۸). با توجه به پژوهش حاضر و با استناد به تحقیق Bhagowati ، *باسیلوس سرئوس* بیشترین پتانسیل برای تولید PHB را دارد و از این رو با مطالعه حاضر همخوانی دارد.

نتیجه گیری

پژوهش حاضر نشان داد که *باسیلوس های* تولید کننده PHB، به خصوص *باسیلوس سرئوس* به مقدار زیادی در هر دو محیط فاضلاب و خاک وجود دارند که این می تواند به دلیل فراوان بودن مواد غذایی در فاضلاب و خاک و مقاومت

زیاد این باکتری در این دو محیط باشند .*باسیلوس سرئوس* بیشترین پتانسیل برای تولید پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) در دو مقیاس ازمایشگاهی و صنعتی در بین ایزوله-های جدا شده از دو محیط خاک و فاضلاب را دارد و در نتیجه می توانیم از این باکتری برای تولید پلاستیک های زیستی استفاده کنیم.

تقدیر و تشکر

نتایج این مقاله مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه ازاد اسلامی واحد گرگان است.

منابع مورد استفاده

1. Frisch, K. C., Saunders, J. H., 1972 Plastic Foams Part I. Marcel Dekker, Inc., NewYork.13(10):630-630 .
2. Kale, G., Kijchavengkul, T., Auras, R., Rubino, M., Selke, S.E., Singh, S.P., 2007. Compostability of bioplastic packaging materials: an overview. Macromolecular Bioscience *7*(3): 255-277.
3. Schubert, P., Steinbuchel A., Schlegel, H.G., 1988. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* Genes for Synthesis of Poly-3-Hydroxybutyric Acid (PHB) and Synthesis of PHB in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 170(12): 5837-5847.
4. Lemoigne, M., 1926. Products de deshydation et de polymerisation de l'acide β-oxybutyrique. Bulletin de la Societe Chimie Biologique. 8(5): 770-782.
5. Doi, Y. Kasuya, K., Kobayashi, Shima, Y. Shimamura, E., G., Shiotani, T., 1994. Physical properties and biodegradability of microbial poly (3 hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). Macromolecules, 27(3):878-880.
6. Saito, Y., Doi, Y. , 1994. Microbial synthesis and properties of poly (3 hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in Comamonas acidovorans. International journal of biological macromolecules, 16(2): 99 -104.
7. Abe, H., Doi, Y., Eya, H. , and Fukushima, T., 1994. Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by Pseudomonas sp.,International Journal of Biological Macromolecules.,16(3):115-119.
8. Füchtenbusch, B., Steinbüchel, A. Wullbrandt, D., 2000. Production of polyhydroxyalkanoic acids by Ralstonia eutropha and Pseudomonas oleovorans from oil remaining from biotechnological rhamnose production.Applied microbiology and biotechnology, 53(2): 167-172.
9. Doi., Y., Numata, K., 2012. Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates by a novel facultatively anaerobic Vibrio sp. Under marine condition. Marine Biotechnology. 14(3): 323-331.
10. Knooren, N. & Van Soest, J. J. G., 1997. Influence of glycerol and water content on the structure and properties of extruded starch plastic sheets during aging. Journal of Applied Polymer Science, 64(7): 1411-1422.
11. Geyer,R., Jambeck,.J.R., Law.K.L.,2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. Sci. Adv. 3(7): 1700-1782.
12. Connan,M., Dilley,B.J. , Ryan,P.G. , Ronconi,R.A.,2019. Rapid increase in Asian bottles in the South Atlantic Ocean indicates major debris inputs from ships. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 116(42): 20892–20897.
13. Kawecki, D., Nowack,.B., 2019. Polymer-specific modeling of the environmental emissions of seven commodity plastics as macro- and microplastics. Environ. Sci. Technol. 53(16): 9664–9676 .
14. Xanthos.D, Walker.T.R.,2017. International policies to reduce plastic marine pollution from single-use plastics (plastic bags and microbeads): A review. Mar. Pollut. Bull. 118(1-2): 17–26 .
15. Jambeck, J.R. et al.,2015. Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean. Science. 347(6223): 768–771.
16. Cózar, A. et al.,2014. Plastic debris in the open ocean. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111(28): 10239–10244 .
17. Azapagic, A. , Gallego-Schmid, A., Mendoza, .J.M.F.,2019. Environmental impacts of takeaway food containers. J. Clean. Prod. 211(2): 417–427 .
18. Auras,R. , Madival,S. , Narayan,R. Singh,S.P., 2009. Assessment of the environmental profile of PLA, PET and PS clamshell containers using LCA methodology. J. Clean. Prod. 17(13):1183–1194 .
19. Molina-Besch, K, Wikström, F , Williams, H., 2019. The environmental impact of packaging in food supply chains—does life cycle assessment of food provide the full picture? Int. J. Life Cycle Assess. 24(3): 37–50 .

20. Chang, Y., Hahn, S., Kim, B., Chang, H .,1994. Optimization of Microbial Poly (3-hydroxybutyrate) Recovery Using Dispersions of Sodium Hypochlorite Solution and Chloroform. Biotechnol. Bioeng. 44(2): 256-261.
21. Law, JH., Slepecky, RA .,1961. Assay of poly-β-hydroxybutyric acid. J. Bacteriol. 82(1): 33-36.
22. Hori, K., Kaneko, M., Tanji, Y., Unno, H. , Xing, X. H.,2002 .Construction of self-disruptive Bacillus megaterium in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. Applied microbiology and biotechnology,59(2-3): 211-216.
23. Hikmet, K., Belma, A., Nazime, M., Yavuz, B., Zehra, NK., 2003. Production of PHB and differentiation of putative mutant strains by SDS-PAGE of total cell protein. Afr. J. Biotechnol.2(4):47–149.
24. Mohapatra, S., Samantaray, D. P., and Samantaray, S. M., 2014. Phylogenetic heterogeneity of the rhizospheric soil bacterial isolates producing PHAs revealed by comparative analysis of 16s-rRNA. International Journal of Current Microbiology and Applied Science, 3(5): 680-690.
25. Rohini, D., Phadnis, S., and Rawal, S. K., 2006. Synthesis and characterization of poly- beta-hydroxybutyrate from Bacillus thuringiensis R 1. Indian journal of biotechnology, 5(3): 276-283.
26. Nair, S. S., Ganjewala, D. , Reddy, H., 2008. Screening and characterization of biopolymers polyhydroxy butyrate producing bacteria. 7(5): 13-17.
27. Sangkharak, K.,Prasertsan, P., 2008. Nutrient optimization for production of polyhydroxybutyrate from halotolerant photosynthetic bacteria cultivated under aerobic-dark condition. Electronic Journal of Biotechnology, 11(3): 83-94.
28. Bhagowati, P., Dash, H. R., and Das, S. , Pradhan, S.,2015. Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by Bacillus spp. Bioscience, biotechnology, and biochemistry.,79(9): 1454-1463.