

# 利用食品工厂活性污泥发酵生产 PHB 的培养基配方研究(一)

黄晓钰<sup>1</sup>, 陈 然<sup>2</sup>, 余海虎<sup>3</sup>

(1. 华南农业大学食品科学系; 广东 广州 510642; 2. 华南农业大学高等教育研究室, 广东 广州 510642;

3. 香港理工大学应用生物与化学科技学系, 香港九龙)

**摘要:** 采用  $L_9(3^4)$  正交表, 设定 C、N、P 三因素三水平的 9 种不同配方, 对广州四明燕塘乳业公司污水处理站的活性污泥进行生长培养基筛选, 根据细胞的总增重率对培养基配方进行了直观分析和方差分析并绘制出细胞的生长曲线。结果表明, 活性污泥的最佳生长培养基配方为葡萄糖  $8 \text{ g} \cdot 1000\text{mL}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 0.75 \text{ g} \cdot 1000\text{mL}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 0.75 \text{ g} \cdot 1000\text{mL}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ; 经过 12 h 的培养, 活性污泥的生长基本达到平衡。

**关键词:** 活性污泥; 生长培养基; 筛选

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-0267(2001)05-

## Production of Biodegradable Plastics by Fermentation of Active Sludge from Food Plant (I)

HUANG Xiao-yu<sup>1</sup>, CHEN Ran<sup>2</sup>, Peter H. F. Yu<sup>3</sup>

(1. Department of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642 China;

2. Higher Agri - Education Research Section, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642 China ;

3. Department of Applied Biology & Chemical Technology, Hong Kong Polytechnic University, Kowloon, HongKong China)

**Abstract:** In present article, the media for growth of active sludge in wastewater treatment plant of Guangzhou Siming Yantang Dairy Corporation were selected through  $L_9(3^4)$  table of orthogonal arrays by designing nine different prescriptions with 3 elements, i. e. C, N, and P, at 3 levels. The growth curves of the cells were drawn according to the variation of the cell weight. The results showed that, the optimum culture medium for growth gained through various analysis consisted of: glucose  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 0.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 0.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. It has been found through the growth curves that after 12 hours of culture, the growth of the active sludge generally reached at balance.

**Keywords:** active sludge; media for growth; selection

自 1909 年 Leo H. Bakeland 首次制得酚醛树脂而使塑料正式面世以来, 由于它轻巧耐用, 容易加工, 被越来越广泛地应用于国民经济的各个部门, 但同时也给环境带来了越来越严重的污染<sup>[1]</sup>。目前对塑料废弃物采取的向海洋倾倒法、掩埋法、焚烧法和再生利用法等均不能从根本上解决塑料的污染问题<sup>[2]</sup>, 因此开发和生产可降解塑料成为当今世界关注的焦点。

可降解塑料按降解机理的不同分为光降解塑料、生物降解塑料和光-生物双降解塑料三种<sup>[3]</sup>, 研究得较为深入的是生物降解塑料, 其中尤以微生物发酵合成的完全生物降解塑料最为理想。这是一种广泛存在

于微生物细胞中并作为其营养和能量的储存物质而参与细胞代谢的天然产物——聚羟基脂肪酸酯 (Poly-hydroxyalkanoates, PHAs)<sup>[4]</sup>, 故可以被微生物所消化利用, 最后生成  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ , 在整个生产和使用的过程中对环境几乎不造成任何污染。在已发现的 40 余种 PHA 中, 较为常见的是聚 3-羟基丁酸酯 (Poly-3-hydroxybutyrate, PHB), 1925 年由法国的 M. Lemoigne 在 *Bacillus megatherium* 中首次发现, 在 60 年代末, 英国帝国化学工业公司首次通过 *Methylophilus methylotrophus* 发酵生产出 PHB<sup>[5]</sup>。这种物质不但具有完全的生物降解性, 而且完全无毒, 还具有生物相容性, 用于医药时可被生物体完全吸收, 更具有热塑加工性, 可以作为一般塑料使用, 是理想的环保高分子材料。

目前对 PHB 研究得较多的英国和奥地利等国家

收稿日期: 2000-11-24

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目

作者简介: 黄晓钰, 59 岁, 女, 华南农业大学食品科学系教授, 主要研究食品营养与分析。

已开发出产品并投入市场,但由于昂贵的生产成本使其应用受到很大限制,主要原因一是采用了 PHB 产量较高的纯菌种,不但培养和发酵的条件苛刻,而且设备本身的运行和维持要求也很严格;二是采用酶法提取 PHB,用后的酶液无法回收再利用。自然界 90% 以上的细菌在特定的培养条件下都能生产 PHB,只是产量高低不同<sup>[5]</sup>。食品工厂污水处理站的活性污泥中含有丰富的微生物,处理污水一定时间之后,都需要取出一定量的以保证污水处理的效率,这部分污泥经干燥、研磨等步骤后作为垃圾投弃。如果能将这些活性污泥控制在一定条件下发酵生产生物降解塑料,就可以做到一举两得,变废为宝。本研究利用食品工厂污水处理站的活性污泥进行混合发酵,然后对抽提出的细胞内含物进行理化测试和鉴定,筛选出适于菌体繁殖生长和发酵的培养基,目的在于寻找一条成本较低的利用活性污泥中的杂菌发酵生产生物降解塑料 PHB 的途径。本文是研究的第一部分,筛选适合活性污泥生长的培养基配方。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

活性污泥:取自广州四明燕塘乳业公司污水处理站。葡萄糖( $C_6H_{12}O_6$ )、硫酸铵( $(NH_4)_2SO_4$ )、磷酸二氢钾( $KH_2PO_4$ )、氯仿( $CHCl_3$ )、甲醇( $CH_3OH$ )、浓硫酸( $H_2SO_4$ , 98%):北京化工厂生产,分析纯。

### 1.2 实验设备

有盖塑料箱:容积为 3.5 L, 36 个,盖上均匀开有 5 个圆孔,直径 1 cm,以保证通气;

气泵、塑料气管、砂头、定时器;

发酵设备:采用自制间歇批量培养箱,如图 1 所示;

抽提设备:采用索氏抽提器。

### 1.3 实验方法

1.3.1 活性污泥的生长与发酵 参照 Yu P. H. 等人提出的方法<sup>[6]</sup>,在广州四明燕塘乳业公司污水处理站的污水处理池入水口处取得活性污泥与污水的混合物,静置 2 h,取下层沉降物约 40 L,在实验室中摇匀后,在每个塑料箱中加入 1 L 活性污泥,再加入 1 L 液体培养基,定时充气培养 48 h。以 12 h 为一循环,充气 10 h,静置 1 h,然后取出 1 L 上清液,再加入 1 L 液体培养基。

1.3.2 干细胞的烘制 活性污泥生长和发酵 48 h 后停止充气,取出上清液,将沉降物于室温下  $4\ 000\ r \cdot \min^{-1}$  离心 20 min,取沉淀于  $80\ ^\circ C$  下烘制 36 h 后,得到干细胞,准确称量其重量为 M,然后用搅拌机将干细胞打碎成细微的颗粒或粉末。

1.3.3 生长培养基的筛选 采用  $L_9(3^4)$  正交表,设定 C、N、P 三因素三水平的 9 个不同配方,见表 1。其中碳源由葡萄糖提供,氮源由  $(NH_4)_2SO_4$  提供,磷源由  $KH_2PO_4$  提供,每个配方做 4 次重复取平均。根据细胞总增重率进行直观分析和方差分析,得到适于细菌生长的配方。

1.3.4 生长曲线的绘制 从污水处理站取回活性污泥进行培养,开始充气后,分别于 0、4、8、12、24、28、32、36 h 时用移液管取均匀溶液 5 mL 于已烘干并预称过的培养皿中,在  $80\ ^\circ C$  下放置 0.5 h 后准确称量其重量,计算出菌体的重量为  $m_{ij}$ 。根据不同时间及不同配方下,菌体重量增加的情况作出细胞的生长曲线图。

## 2 结果与分析

### 2.1 活性污泥生长培养基的筛选

采用  $L_9(3^4)$  正交表,针对 C、N、P 三种因素三种水平,根据细胞的总增重率进行直观分析和方差分析,结果见表 2、表 3。

通过对极值 R 进行直观分析可以看到,C、N、P 三种因素均对活性污泥的生长有影响,影响程度的大小次序为  $P > C > N$ 。根据结果分析,采用 C1 水平、

图 1 自制发酵培养箱示意图

Figure 1 Diagram of fermentation pond

表 1 三种因素三种水平的设定

Table 1 Establishment of three factors and three levels

	葡萄糖 $C_6H_{12}O_6$	硫酸铵 $(NH_4)_2SO_4$	磷酸二氢钾 $KH_2PO_4$	误差
	A	B	C	D
水平 1	$8g \cdot 1000mL^{-1}H_2O$	$0.75g \cdot 1000mL^{-1}H_2O$	$0.75g \cdot 1000mL^{-1}H_2O$	—
水平 2	$6g \cdot 1000mL^{-1}H_2O$	$0.50g \cdot 1000mL^{-1}H_2O$	$0.50g \cdot 1000mL^{-1}H_2O$	—
水平 3	$4g \cdot 1000mL^{-1}H_2O$	$0.25g \cdot 1000mL^{-1}H_2O$	$0.25g \cdot 1000mL^{-1}H_2O$	—

表 2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表 9 种配方下细胞的总增重率  
Table 2 Total enhancement of cell weight in nine preparations of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) table

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
初始 5mL 细胞干重 <i>m/g</i>	0.013 5	0.018 8	0.020 5	0.017 8	0.018 6	0.017 6	0.021 6	0.016 7	0.026 1
干细胞的重量 <i>M/g</i>	10.879 9	11.437 5	11.007 4	10.628 3	11.124 3	12.225 2	11.229 6	11.532 3	12.961 3
细胞的总增重率 <i>y/%</i>	49.80	33.89	25.85	32.82	33.25	42.35	23.08	42.24	19.04

注:细胞的总增重率 =  $(M - m \times 400) / M$

*M*—— 活性污泥经生长发酵和离心烘制后的重量; *m*—— 活性污泥开始培养后第一次抽取的 5mL 溶液烘干后的重量。

表 3 利用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表筛选活性污泥生长培养基配方  
Table 3 Optimization on preparation of active sludge by L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) table

	A	B	C	D	<i>y</i>				$\sum y$	$\sum y/4$
1	1	1	1	1	38.85	38.05	57.13	65.17	199.20	49.80
2	1	2	2	2	35.32	31.42	27.79	41.04	135.57	33.89
3	1	3	3	3	23.98	28.99	26.48	23.94	103.39	25.85
4	2	1	2	3	27.88	29.69	41.12	32.58	131.27	32.82
5	2	2	3	1	35.67	32.10	29.72	35.51	133.00	33.25
6	2	3	1	2	50.59	43.10	42.07	33.64	164.40	42/35
7	3	1	3	2	22.53	23.01	23.13	23.65	92.32	23.08
8	3	2	1	3	47.88	36.09	10.64	44.33	168.94	42.24
9	3	3	2	1	9.68	16.62	23.82	26.03	76.15	19.04
<i>I</i> <sub>1</sub>	*438.16	422.79	*537.54	408.35	$G = \sum(\sum y) = 1\ 209.24$					
<i>I</i> <sub>2</sub>	433.67	*437.51	342.99	397.29	$G^2 = 1\ 462\ 261.38$					
<i>I</i> <sub>3</sub>	337.41	348.94	328.71	403.60	$CT = G^2/9n = 1\ 462\ 261.38/9 \times 4 = 40\ 618.37$					
$R = I_{\max} - I_{\min}$	100.75	88.57	208.83	11.06	$S_{\text{总}1} = \sum(\sum y)^2/4 - CT = 175\ 229.06/4 - 40\ 618.37 = 3\ 188.89$					
$R^2 = I_1^2 + I_2^2 + I_3^2$	493\ 899.36	491\ 925.51	514\ 641.66	487\ 482.03	$S_{\text{总}} = \sum y^2 - CT = 44\ 983.74 - 40\ 618.37 = 4\ 365.37$					
$R^2/3n$	41\ 158.28	40\ 993.79	42\ 886.80	40\ 623.50	$S_{e^2} = S_{\text{总}} - S_{\text{总}1} = 4\ 365.37 - 3\ 188.89 = 1\ 176.48$					
<i>S</i> <sub>1</sub> <sup>2</sup>	539.91	375.42	2\ 268.43	5.13	$n = \text{重复实验次数}$					

表 4 利用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表筛选活性污泥生长培养基配方的方差分析

Table 4 Variance analysis of preparation of active sludge by L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) table

方差来源	偏差平方和 <i>s</i> <sup>2</sup>	自由度 <i>f</i>	平均偏差平方和 <i>s</i> <sup>2</sup> / <i>f</i>	<i>F</i> 检验值
A	539.91	2	269.96	6.62**
B	375.42	2	187.71	4.61*
C	2\ 268.43	2	1\ 134.22	27.83**
e1	5.13	2		
e2	1\ 176.48	27		$F_{0.01}(2, 29) = 5.42$
e	1\ 187.61	29	40.75	$F_{0.05}(2, 29) = 3.33$

注:各因素的自由度 *f* = 水平数 - 1; 重复实验误差的自由度 *f*<sub>e2</sub> = 配方数 × (重复实验次数 - 1)。

N2 水平和 P1 水平的组合, 即葡萄糖浓度为 8 g · 1000mL<sup>-1</sup>H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度为 0.5 g · 1000mL<sup>-1</sup>H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 浓度为 0.75 g · 1000mL<sup>-1</sup>H<sub>2</sub>O 时, 活性污泥的生长会取得最佳效果。实验中当采用配方的葡萄糖浓度为 8 g · 1000mL<sup>-1</sup>H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度为 0.75 g · 1000mL<sup>-1</sup>H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 浓度为 0.75 g · 1000mL<sup>-1</sup>H<sub>2</sub>O 时, 活性污泥的生长最好, 细胞的总增重率达到 49.80%。

对实验结果进行的方差分析证实了直观分析的

判断, 从偏差平方和中可以看到, 在 C、N、P 三种因素中, *s*<sub>P</sub><sup>2</sup> > *s*<sub>C</sub><sup>2</sup> > *s*<sub>N</sub><sup>2</sup>, 说明 P 对细胞生长的影响最大, 而 C 和 N 次之。F 值检验表明, C 和 P 对细胞的生长影响极显著, 而 N 对细胞生长有显著影响。

C、N、P 三种因素均对活性污泥的生长有影响, 符合文献上的报道<sup>[7]</sup>。但是在影响程度方面, P 的程度比 C 高, 较为少见, 估计这与活性污泥中的菌种有关。由于广州四明燕塘乳业公司是以生产冰淇淋为主的食品工厂, 而在冰淇淋中又广泛添加含有 P 的乳化剂和增稠剂等, 因此在其排放的污水中, 也含有大量的含 P 化合物, 有可能造成它的污水处理站的活性污泥较为适应相对富磷环境, 从而使 P 成为其生长的第一限制性元素。

## 2.2 活性污泥的生长曲线

在活性污泥培养期间, 定时取样测定菌体重量, 根据其变化作出活性污泥生长曲线图, 如图 2, 3, 4 所示。从图中可以看到, 活性污泥的生长在 0—12 h 内呈对数上升, 以后则基本趋于平稳。

通常, PHB 的生产分为两个时期: 首先是细胞生长增殖期, 菌种在营养丰富的培养基上生长繁殖, 获得尽可能多的细胞; 其次是 PHB 生产累积期, 菌种

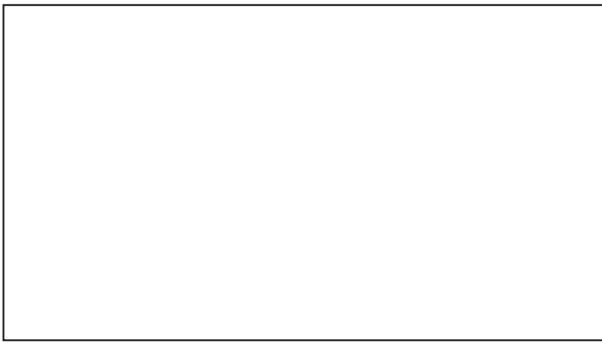


图 2 配方 1、2、3 的活性污泥生长曲线

Figure 2 Dynamic of microbial biomass in preparation 1, 2 and 3

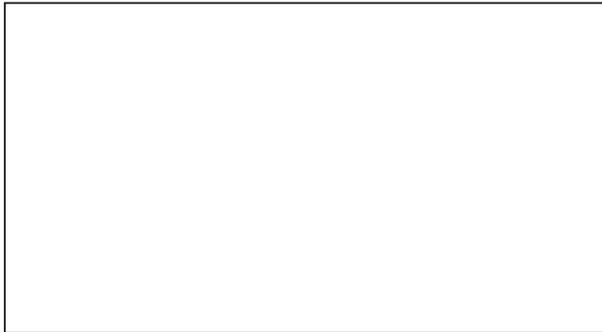


图 3 配方 4、5、6 的活性污泥生长曲线

Figure 3 Dynamic of microbial biomass in preparation 4, 5 and 6



图 4 配方 7、8、9 的活性污泥生长曲线

Figure 4 Dynamic of microbial biomass in preparation 7, 8 and 9

在限制营养的培养基上培养发酵, 获得尽可能多的 PHB。实验结果表明, 在本实验条件下, 活性污泥里的菌种在各种培养基中的生长基本在 12 h 后达到平衡, 因此在以后的应用中, 可以考虑先用上述筛选出的适于生长的培养基培养 12 h, 然后即转用适于发酵的培养基培养, 这样可以较为经济地得到 PHB 产品。

### 3 讨论与结论

目前生产 PHB 的主要方法是细菌发酵法, 即使使用各种 PHB 高产菌种, 如 *Alcaligenes eutrophus*<sup>[8, 9]</sup>, *Rhizobium meliloti*<sup>[10]</sup>, *Methylobacterium extorquens*<sup>[11]</sup>,

*Pseudomonas oleovorans*<sup>[12]</sup> 等, 或是将 PHB 合成酶关键基因导入 *Escherichia coli*<sup>[13, 14]</sup> 等细菌中, 然后使用这些经过遗传修饰的菌种进行发酵生产。由于全部是采用纯菌, 各种工艺条件要求严格而且苛刻, 使其生产成本大幅度提高。例如, *Alcaligenes eutrophus* 是公认的 PHB 高产菌种, 其产量可高达细胞干重的 85% 以上, 但是它的生长要求十分苛刻, 所需的碳源采用葡萄糖, 微量元素则包括:  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{VitB}_1 \cdot \text{HCl}$ 、 $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{O}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  等, 还需要一定的温度、pH、C:N、通入  $\text{O}_2$  的量等各种适宜的条件, 稍有偏差, 则 PHB 的产量就会有天壤之别。目前人们研究较多的降低成本的方法主要集中在它的碳源上, 即尝试采用一些廉价的、纯度较低的蔗糖等, 甚至是糖厂生产后的废弃物, 如废糖蜜等, 或是其它食品工厂生产后的废水<sup>[15]</sup>, 也有人从活性污泥中分离出一些产 PHB 的菌种, 进行发酵生产<sup>[16]</sup>。但是由于使用的仍然是纯菌, 虽然碳源的成本有所降低, 其它的生产费用还是没有得到根本改变, 因此成本仍然很高。

本研究利用活性污泥生产 PHB, 特点是采用杂菌, 除 C、N、P 三种因素之外, 其余条件均与污水处理站的曝气池相同, 无需控温, 无需控 pH, 无需在无菌环境中操作, 大大减少了各种烦琐的运作过程, 方便易行。适于活性污泥中细菌生长增殖的培养基为葡萄糖  $8\text{g} \cdot 1000\text{mL}^{-1}\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $0.50\text{g} \cdot 1000\text{mL}^{-1}\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.75\text{g} \cdot 1000\text{mL}^{-1}\text{H}_2\text{O}$ , 配方简单, 各组分的含量相对纯菌培养低得多, 价格低廉。这些特点使本研究具有良好的利用前景。

### 参考文献:

- [1] 赵岳荣, 苏灼佳, 钟松辉, 等. 光降解塑料——一种很有前途的塑料[J]. 化学世界, 1992, 3: 97 - 100.
- [2] 曾庆藻, 顾秉兰. 可降解塑料的进展[J]. 上海化工, 1994, 14(9): 38 - 43.
- [3] 姜 华, 王文燕. 降解塑料的开发与利用[J]. 金陵石油化工, 1994, 12(2): 19 - 22.
- [4] 许开天, 赵树杰. PHB 在生物医学中的应用研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 1995, 1(1): 85 - 91.
- [5] 郭丽华, 吴 明. 生物降解性塑料生产工艺的发展[J]. 自然杂志, 1991, 14(3): 197 - 200.
- [6] Yu PH, Chua H, and Ho L. Y. Microbial synthesis of biodegradable plastics. Proceedings of the Asia - Pacific Conference on sustainable energy and environmental technology, 1996. 623 - 630.
- [7] Chua H, Yu P H F, and Ho L Y. Coupling of wastewater treatment with

- storage polymer production[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1996, 63 - 65: 627 - 635.
- [8] Lee In Young, Kim Guk Jin, and Choi Dea Keon et al. Improvement of hydroxyvalerate fraction in poly - ( $\beta$  - hydroxybutyrate - co -  $\beta$  - hydroxyvalerate) by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Fermentation*[J]. *Bioengineering*, 1996, **81**(3): 255 - 258.
- [9] Park Jin - Sed, Lee Yong - Hyun. Metabolic Characteristics of isocitrate dehydrogenase leaky mutant of *Alcaligenes eutrophus* and its utilization for poly -  $\beta$  - hydroxybutyrate production[J]. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 1996, **81**(3): 197 - 205.
- [10] Jan S, Roblot C, and Fourtois J et al.  $^1\text{H}$  NMR spectroscopic determination of poly(3 - hydroxybutyrate) extracted from microbial biomass [J]. *Enzyme Microbiology Technology*, 1996, **18**(3): 195 - 201.
- [11] Pomerleau Y, Perier M, and Bourque D. Dynamics and control of the fed - batch production of poly -  $\beta$  - hydroxybutyrate by *Methylobacterium extorquens*. *Computer Application in Biotechnology*. Oxford, United Kingdom. Edited by Munack Axel and Schuegerl Karl Elsevier, 1996. 107 - 112.
- [12] Kim Young Baek, Rhee Young Ha, and Han Sin - Ho et al. Poly - 3 - hydroxyalkanoates Produced from *Pseudomonas Oleovorans* Grown with  $\omega$  - Phenoxyalkanoates[J]. *Macromolecules*, 1996, **29**(10): 3 432 - 3 435.
- [13] Lee Sang Yup. PHB extrusion by cells of recombinant *Escherichia coli* [J]. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 1996, (2): 147 - 149.
- [14] Middelberg Anton P J, Lee Sang Yup, and Martin Jennifer et al. Size analysis of poly(3 - hydroxybutyric acid) granules produced in recombinant *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 1995, **17**(2): 205 - 210.
- [15] Rusendi D, Sheppard John D. Hydrolysis of potato processing waste for the production of poly -  $\beta$  - hydroxybutyrate[J]. *Bioresource Technology*, 1995, **54**(2): 191 - 196.
- [16] Dave Heena, Ramakrishna C, and Desai JD. Production of PHA by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp. IPCB - 403[J]. *Indian Journal of Experiment Biology*, 1996, **34**(3): 216 - 219.