

USO DE CARBÓN ACTIVADO PARA CONSERVAR BACTERIAS CELULOLÍTICAS LIOFILIZADAS

USE OF ACTIVATED CARBON TO PRESERVE LYOPHILIZED CELLULOLYTIC BACTERIA

Paulino Sánchez-Santillán^{1*}, Mario A. Cobos-Peralta², David Hernández-Sánchez², Alberto Álvarez-Iglesias³,
David Espinosa-Victoria⁴, José G. Herrera-Haro²

¹Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, Universidad Autónoma de Guerrero. Km. 197 Carretera Acapulco-Pinotepa Nacional. 41940. Cuajinicuilapa, Guerrero. (sanchezsantillanp@gmail.com). ²Programa de Ganadería, ⁴Programa de Suelos, Colegio de Postgraduados, Km 36.5, Carretera México-Texcoco. 56230. Montecillo, Texcoco, Estado de México. ³Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, Universidad Nacional del Litoral. Paraje el Pozo, Santa Fe S3000ZAA. Argentina.

RESUMEN

El éxito de la conservación de microorganismos se logra al evitar contaminaciones en el proceso, y al optimizar la sobrevivencia alta y la estabilidad genética. El objetivo de este estudio fue evaluar el uso del carbón activado como preservador de bacterias celulolíticas en el proceso de liofilización. El cultivo de bacterias celulolíticas se obtuvo de cuatro transferencias de fluido ruminal fresco en medios de cultivo y papel Whatman. Como preservador se adicionó carbón activado (CA), antes de liofilizar, y se comparó con un tratamiento testigo sin preservador (SL). Las bacterias liofilizadas se reactivaron en medios de cultivo, en los cuales se midieron sus características y las de las bacterias. Las bacterias reactivadas fueron el inóculo para evaluar la degradación *in vitro* de la materia seca (%DEGMS) y la producción de ácidos grasos volátiles (AGV). El diseño experimental fue completamente al azar repetido en el tiempo. El tratamiento CA degradó 83.3 % de papel Whatman en la reactivación. En la reactivación de las bacterias el potencial óxido-reducción y el pH de los medios de cultivo no fueron diferentes entre tratamientos ($p > 0.05$). El tratamiento CA mostró concentración mayor de bacterias (9.58×10^8 bacterias mL^{-1}), degradación mayor de sustratos (32.75 %DEGMS), producción mayor de ácido acético (54.50 mM L^{-1}) y butírico (12.74 mM L^{-1}), comparado con el tratamiento SL ($p \leq 0.05$). El ácido propiónico y AGV totales presentaron interacción significativa de tratamiento-tiempo. El tratamiento CA produjo más AGV totales ($p \leq 0.05$), pero el ácido propiónico sólo fue diferente entre tratamientos en el

ABSTRACT

Successful conservation of microorganisms is attained by preventing contamination during the process and optimizing high survival and genetic stability. The objective of this study was to evaluate the use of activated carbon as a preserver of cellulolytic bacteria during the process of lyophilization. The cellulolytic bacterial culture was obtained from four transfers of fresh ruminal liquid in culture media and Whatman paper. As a lyoprotectant, activated carbon (CA) was added before lyophilizing and compared with a control treatment without lyoprotectant (SL). The lyophilized bacteria were reactivated in culture media; characteristics of both media and bacteria were measured. The reactivated bacteria were the inoculum in the evaluation of *in vitro* dry matter degradation (%DMDEG) and production of volatile fatty acids (VFA). The experimental design was completely randomized repeated in time. The CA treatment degraded 83.3% of the Whatman paper during reactivation. The oxide-reduction potential and culture media pH were not different between treatments ($p > 0.05$). The CA treatment showed higher concentration of bacteria (9.58×10^8 bacteria mL^{-1}), greater degradation of substrates (32.75 %DMDEG), and higher production of acetic (54.50 mM L^{-1}) and butyric (12.74 mM L^{-1}) acids, compared to the SL treatment ($p \leq 0.05$). Propionic acid and total VFA showed significant treatment-time interaction. The CA treatment produced more total VFA ($p \leq 0.05$), but propionic acid was different only between treatments at the first measurement time ($p \leq 0.05$). Activated carbon has characteristics that preserve cellulolytic bacteria for lyophilization.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: junio, 2015. Aprobado: noviembre, 2015.

Publicado como NOTA en *Agrociencia* 50: 575-582. 2016.

Key words: Lyoprotectant, ruminal bacteria, *in vitro*, lyophilization, degradation.

primer tiempo de medición ($p \leq 0.05$). El carbón activado tiene características de preservador de bacterias celulolíticas para la liofilización.

Palabras clave: Preservador, bacterias ruminales, *in vitro*, liofilización, degradación.

INTRODUCCIÓN

El éxito de la conservación de microorganismos se logra al evitar contaminaciones en el proceso, y al optimizar la sobrevivencia alta y la estabilidad genética. Los métodos de conservación varían y debe elegirse un método para los microorganismos que se conservarán (García y Uruburu, 2000; Morales-García *et al.*, 2010). Un preservador único no existe para la conservación de cualquier tipo de bacterias y deberá identificarse el mejor para cada una (Morales-García *et al.*, 2010).

Un método es la liofilización, en el cual el agua en el material a conservar se congela y se elimina por sublimación, mediante diferencia de presión (Kumar *et al.*, 2013). La liofilización es el proceso más usado para conservar productos biológicos porque deshidrata al eliminar el agua congelada. La naturaleza, tiempo y gasto del proceso dependen de la naturaleza química y física de los microorganismos que serán liofilizados (Ramírez, 2006). El proceso de liofilización es efectivo para la conservación de células, en un estado viable y de latencia de eucariontes y bacterias. Para aumentar la supervivencia de las células sometidas a liofilización se usan sustancias que actúan como protectoras.

La conservación de bacterias relevantes en nutrición animal, mediante liofilización, se ha documentado como parte del proceso de investigación (Safronova y Novikova, 1996; Jung *et al.*, 2004; Cobos *et al.*, 2007; Cobos *et al.*, 2011), pero no hay información del proceso de conservación de los microorganismos. Según Morgan *et al.* (2006), la conservación de microorganismos por liofilización es un método empírico sin incluir teorías comprobadas. En la literatura especializada no se encontró información sobre el uso de preservadores en bacterias celulolíticas anaerobias de origen ruminal. El objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad del carbón activado como preservador de un cultivo de bacterias celulolíticas mediante su capacidad

INTRODUCTION

Successful conservation of microorganisms is attained when contamination is avoided during the process and when high survival and genetic stability is optimized. Conservation methods vary and a method should be selected specifically for the microorganisms to be conserved (García and Uruburu, 2000; Morales-García *et al.*, 2010). No single lyoprotectant exists for the conservation of any type of bacteria and the best for each type must be identified (Morales-García *et al.*, 2010).

One of the methods is lyophilization, in which the water content of the material to be conserved is frozen and eliminated by sublimation caused by a difference in pressure (Kumar *et al.*, 2013). Lyophilization is the most used process for conserving biological products because it dehydrates when the frozen water is eliminated. The nature, time and expense of the process are dependent on the chemical and physical nature of the microorganism to be lyophilized (Ramírez, 2006). It is an effective process for conserving cells in a viable state and organisms such as eukaryotes and bacteria in a latent state. To increase survival of cells subjected to lyophilization, substances are used that act as protectors.

Conservation of bacteria relevant to animal nutrition by lyophilization is documented as part of the research process (Safronova and Novikova, 1996; Jung *et al.*, 2004; Cobos *et al.*, 2007; Cobos *et al.*, 2011), but there is no information about the process of conservation of microorganisms. Morgan *et al.* (2006) indicated that conservation of microorganisms by lyophilization is an empirical method without including proven theories. In the specialized literature, we found no information about the use of lyoprotectants with ruminal anaerobic cellulolytic bacteria. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of activated carbon as a lyoprotectant of a culture of cellulolytic bacteria by observing their capacity to degrade cellulolytic substrates after having been lyophilized.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in the laboratory of Ruminal Microbiology and Microbial Genetics at the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Besides, it was developed

de degradación de sustratos celulolíticos después de liofilizarlas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Además, se desarrolló en una campana (Labconco®) de bioseguridad, con purificador de clase II, y con rayos ultravioleta.

Medio de cultivo fluido ruminal (FR)

El medio de cultivo (esterilizado 15 min en una autoclave (Tuttnauer® 2540F, Israel) a 121 °C y 15 psi) estuvo formado por 30 mL de fluido ruminal (FR) clarificado con 5 mL de solución mineral I [6 g K₂HPO₄ (Sigma) en 1000 mL de H₂O destilada], 5 mL de solución mineral II [6 g KH₂PO₄ (Sigma), 6 g (NH₄)₂SO₄ (Merck), 12 g NaCl (Sigma-Aldrich), 2.45 g MgSO₄ (Sigma) y 1.6 g CaCl-2H₂O (Sigma) en 1000 mL de H₂O destilada], 0.1 mL de resazurina a 0.1 % (Sigma-Aldrich), 0.2 g de peptona de soya (Merck), 0.1 g de extracto de levadura (Sigma), 2 mL de solución sulfido-cisteína [2.5 g L-cisteína (Sigma) en 15 mL de 2N NaOH (Meyer), 2.5 g de Na₂S-9H₂O (Meyer) aforados a 100 mL de H₂O destilada], 5 mL de solución al 8 % de Na₂CO₃ (Baker) y 52.6 mL de H₂O destilada.

Cultivo de bacterias celulolíticas

El fluido ruminal se obtuvo de una vaca Jersey con cánula ruminal. El fluido se centrifugó 3 min a 1157 g en una centrífuga (Eppendorf® 5804, Alemania) a 25 °C. El sobrenadante se recuperó y se usó como inóculo. Nueve mL de medio FR estéril se agregaron a tubos (18×150 mm) con una tira de papel Whatman (3×30 mm) y 0.05 g de celulosa cristalina (Sigma) estériles, bajo flujo de CO₂, en una incubadora (Riossa® EO-71, México) y se mantuvieron 24 h a 29 °C para detectar esterilidad. Un tubo estéril se inoculó con 1 mL de inóculo y se mantuvo a 39 °C, hasta degradar el papel Whatman. A otro tubo estéril se transfirió 1 mL de medio inoculado y se incubó a 39 °C hasta degradar el papel Whatman. Cuatro transferencias se realizaron para obtener un cultivo de bacterias celulolíticas (CBC) con capacidad para degradar papel Whatman. En viales serológicos (50 mL), con una tira de papel Whatman (3×30 mm) y 0.1 g de celulosa cristalina estériles, se depositaron 27 mL de medio FR estéril bajo flujo constante de CO₂, y se mantuvieron 72 h a 39 °C, para detectar esterilidad. Los viales se inocularon con 3 mL del producto obtenido de la

in a biosafety bell (Labconco®), with a class II purifier, and provided with ultraviolet rays.

Ruminal fluid culture medium (FR)

The culture medium was composed of 30 mL ruminal fluid (RF) clarified with 5 mL mineral solution I [6 g K₂HPO₄ (Sigma) in 1000 mL distilled H₂O], 5 mL mineral solution II [6 g KH₂PO₄ (Sigma), 6 g (NH₄)₂SO₄ (Merck), 12 g NaCl (Sigma-Aldrich), 2.45 g MgSO₄ (Sigma) and 1.6 g CaCl-2H₂O (Sigma) in 1000 mL distilled H₂O], 0.1 mL 0.1 % resazurin (Sigma-Aldrich), 0.2 g soy peptone (Merck), 0.1 g yeast extract (Sigma), 2 mL sulfide-cysteine solution [2.5 g L-cysteine (Sigma) in 15 mL 2N NaOH (Meyer), 2.5 g Na₂S-9H₂O (Meyer) gauged to 100 mL distilled H₂O], 5 mL 8 % solution Na₂CO₃ (Baker) and 52.6 mL distilled H₂O. The medium was sterilized for 15 min in an autoclave (Tuttnauer® 2540F, Israel) at 121 °C and 15 psi).

Cellulolytic bacterial culture

The ruminal fluid was obtained from a Jersey cow with a ruminal cannula. The fluid was centrifuged at 1157 g in a centrifuge (Eppendorf® 5804, Germany) for 3 min at 25 °C. The supernatant was recovered and used as the inoculum. Nine milliliters of sterile FR medium were added to sterile tubes (18×150 mm) containing a strip of Whatman paper (3×30 mm) and 0.05 g crystalline cellulose (Sigma) under a flow of CO₂. Tubes were kept in an incubator (Riossa® EO-71, México) at 39 °C until the Whatman paper degraded. One milliliter of the inoculated medium was transferred to another sterile tube and incubated at 39 °C until the Whatman paper was degraded. Four transfers were performed to obtain a culture of cellulolytic bacteria (CCB) capable of degrading Whatman paper. In sterile serological vials (50 mL) containing a strip of Whatman paper (3×30 mm) and 0.1 g crystalline cellulose, 27 mL sterile FR medium were deposited under constant flow of CO₂ and kept at 39 °C for 72 h to detect sterility. The vials were inoculated with 3 mL of the product obtained from the four transfer and incubated at 39 °C until the Whatman paper degraded (10 d).

Treatments

The treatments were: 1) CA, activated carbon as a lyoprotectant; one vial with 0.1 g activated carbon (Hycel) was incubated at 39 °C for 2 h and; 2) SL, no lyoprotectant; one vial as a control treatment. The vials were frozen in a roller freezer (Labconco® Shell Freezer, USA) up to -38 °C and then,

cuarta transferencia y se incubaron a 39 °C hasta degradar el papel Whatman (10 d).

Tratamientos

Los tratamientos fueron: 1) CA, carbón activado como preservador, un vial con 0.1 g de carbón activado (Hycel) se incubó a 39 °C por 2 h y; 2) SL, sin preservador, un vial como tratamiento testigo. Los viales se congelaron en un congelador de rodillo (Labconco® Shell Freezer, EE.UU.) hasta alcanzar -38 °C, luego en una liofilizadora (Labconco® Freezone 6 L, EE.UU.) se liofilizaron 24 h (-50 °C y 13.5 Pa).

Reactivación de los tratamientos

Tubos (18×150 mm) con una tira de papel Whatman (3×30 mm) y 0.05 g de celulosa cristalina, se esterilizaron (15 min a 121 °C y 15 psi). Luego se adicionaron 9 mL de medio FR estéril, bajo flujo de CO₂ y se incubaron 72 h a 39 °C para detectar esterilidad. Seis tubos se inocularon con 0.05 g de liofilizado CA y seis con 0.05 g de SL, bajo CO₂. Los tubos se incubaron 10 d a 39 °C. Después de 7 y 10 d se cuantificó la degradación del papel. Al terminar la incubación se midió: 1) pH con potenciómetro (Orion 250A, Brasil; calibración: pH 7 y 4); 2) potencial de óxido-reducción con un potenciómetro (Orion 710A, Brasil; calibración: solución +220 de óxido-reducción); y 3) concentración de bacterias totales mediante recuento directo en cámara Petroff-Hauser (Hausser #39000, Electron Microscopy Sciences, EE.UU.) y la fórmula: concentración de bacterias = (promedio) (factor de dilución) (2×10⁷).

Degradación *in vitro* de materia seca

Tubos (18×150 mm) con 0.01 g de papel Whatman y 0.05 g de celulosa cristalina se esterilizaron 15 min a 121 °C y 15 psi. Luego se adicionaron 9 mL de medio FR estéril bajo flujo de CO₂ y se incubaron a 39 °C por 72 h para detectar esterilidad. Los tubos (12 repeticiones independientes) se inocularon con 1 mL de CA o SL reactivado. Los tubos se incubaron a 39 °C por 10 d. Después de 7 y 10 d de incubación se cuantificó la degradación del papel. La capacidad de degradación *in vitro* %DEGMS se calculó a los 10 d con la fórmula %DEGMS=(muestra inicial - muestra no degradada / muestra inicial)×100.

Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)

Un mL de medio de cultivo, con 10 d de incubación, se mezcló con ácido metafosfórico al 25 % y se centrifugaron a

in a lyophilizer (Labconco® Freezone 6 L, USA), they were lyophilized 24 h (-50 °C and 13.5 Pa).

Reactivation of treatments

Tubes (18×150 mm) containing a strip of Whatman paper (3×30 mm) and 0.05 g crystalline cellulose were sterilized (15 min at 121 °C and 15 psi). To detect sterility, 9 mL sterile FR medium, under CO₂ flow, was incubated at 39 °C for 72 h. Six tubes were inoculated with 0.05 g lyophilized CA and six with 0.05 g SL, under a flow of CO₂. The tubes were incubated at 39 °C for 10 d. After 7 and 10 d, degradation of the paper was quantified. At the end of incubation the following measurements were taken: 1) pH with a potentiometer (Orion 250A, Brazil; calibration: pH 7 and 4); 2) oxide reduction potential with a potentiometer (Orion 710A, Brazil; calibration: solution +220 oxide-reduction); and 3) concentration of total bacteria by direct count in a Petroff-Hauser chamber (Hausser #39000, Electron Microscopy Sciences, USA) and the formula bacterial concentration = (average) (dilution factor (2×10⁷)).

In vitro dry matter degradation

Tubes (18×150 mm) containing 0.01 g Whatman paper and 0.05 g crystalline cellulose were sterilized 15 min at 121 °C and 15 psi. Under a CO₂ flow, 9 mL of sterile FR medium was added and the tubes were incubated at 39 °C for 72 h to detect sterility. The tubes (12 independent replications) were inoculated with 1 mL CA or SL reactivated and incubated at 39 °C for 10 d. After 7 and 10 d of incubation, paper degradation was quantified. The *in vitro* capacity to degrade, %DMDEG, was calculated at 10 d with the formula %DMDEG=(initial sample - undegraded sample / initial sample)×100.

Concentration of volatile fatty acids (AGV)

One mL of culture medium with 10 d of incubation was mixed with 25 % metaphosphoric acid and centrifuged at 18 800 g for 10 min. The supernatant was placed in vials for chromatography (1.5 mL, Perkin Elmer®, USA). The concentration of AGV was determined in a gas chromatograph (Perkin Elmer®, model Claurus 500, USA) equipped with a flame ionization detector and a capillary column (Elite FFAP, Perkin-Elmer®) 15 m×0.32 mm. The carrier gas was nitrogen (flow 4 mL min⁻¹) and H₂ and O₂ (flow 45 and 450 mL min⁻¹) to produce the flame. The oven, injector and column temperatures were 120, 250 and 250 °C; 1 mL of the sample was injected. Three peaks were obtained during retention

18 800 g, por 10 min; el sobrenadante se colocó en viales para cromatografía (1.5 mL, Perkin Elmer®, USA). La concentración de AGV se determinó en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer®, modelo Claurus 500, EE.UU.) equipado con detector de ionización de flama y columna capilar (Elite FFAP, Perkin-Elmer®) de 15 m×0.32 mm; el gas acarreador fue nitrógeno (flujo de 4 mL min⁻¹) e H₂ y O₂ (flujo de 45 y 450 mL min⁻¹) para generar la flama. Las temperaturas del horno, inyector y columna fueron 120, 250 y 250 °C y se inyectó 1 µL de muestra. Tres picos se obtuvieron en tiempo de retención de 2.16, 2.59 y 3.11 para los ácidos acético, propiónico y butírico.

Diseño y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar. El experimento se repitió una vez y los datos de %DEGMS, AGV, pH, óxido-reducción y concentración de bacterias totales se analizaron como medidas repetidas con el procedimiento MIXTO de SAS (SAS® Institute Inc., 2011). Los promedios se ajustaron por mínimos cuadrados para compararlos con la prueba de Tukey (p≤0.05). Las variables ácido propiónico y AGV se transformaron a log₁₀ y se calculó la raíz cuadrada de %DEGMS para cumplir con el supuesto de homocedasticidad de los datos. El modelo estadístico fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta_{j(i)} + P_k + (\tau P)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

donde Y_{ijk} es la variable de respuesta en observación k , repetición j , tratamiento i ; μ es la media general; τ_i es el efecto del i -ésimo tratamiento; $\delta_{j(i)}$ es el error aleatorio asociado con la j -ésima repetición dentro del i -ésimo tratamiento; P_k es el efecto del k -ésimo tiempo; $(\tau P)_{ik}$ es el efecto de la interacción tratamiento-tiempo; ε_{ijk} es el error aleatorio asociado con k -ésima medida repetida dentro de j -ésima repetición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ochenta y tres por ciento de las repeticiones de la reactivación de las bacterias liofilizadas con CA degradaron el papel a los 7 y 10 d de incubación; en contraste las repeticiones de SL no degradaron el papel en los mismos días. El tratamiento SL tuvo 88.79 % menos capacidad de degradación *in vitro* de sustratos celulolíticos, respecto a CA (Cuadro 1). El tratamiento CA mostró %DEGMS mayor de celulosa cristalina y papel que el tratamiento SL (p≤0.05; Cuadro 1). Esto se debe a que las bacterias celulolíticas son anaerobias y el carbón activado reduce la presencia de oxígeno antes de la liofilización

time 2.16, 2.59 and 3.11 for acetic, propionic and butyric acids.

Statistical design and analysis

The experimental design was completely randomized. The experiment was repeated once and the data on %DMDEG, AGV, pH, oxide reduction and concentration of total bacteria were analyzed as repeated measures with the MIXED procedure of SAS (SAS® Institute Inc., 2011). The averages were fit by minimum squares to compare them with the Tukey test (p≤0.05). The variables propionic acid and VFA were transformed to log₁₀ and the square root of %DMDEG was calculated to comply with the homoscedasticity assumption of the data. The statistical model was

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta_{j(i)} + P_k + (\tau P)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

where: Y_{ijk} is the response variable in observation k , repetition j , treatment i ; μ is general mean; τ_i is the effect of the i th treatment; $\delta_{j(i)}$ is the random error associated with the j th repetition within the i th treatment; P_k is the effect of the k th time; $(\tau P)_{ik}$ is the effect of the interaction treatment-time; ε_{ijk} is the random error associated with the k th repeated measure within the j th repetition.

RESULTS AND DISCUSSION

Eighty-three percent of the repetitions of lyophilized bacteria reactivated with CA degraded the paper at 7 and 10 d of incubation. In contrast, the repetitions of SL did not degrade the paper in the same time. The SL treatment was 88.79 % less capable of degrading the cellulolytic substrates *in vitro*, relative to the CA treatment (Table 1). The CA treatment exhibited higher %DMDEG of crystalline cellulose and paper than the SL treatment (p≤0.05; Table 1). This is because cellulolytic bacteria are anaerobic, and the activated carbon reduces the presence of oxygen before lyophilization (Malik, 1990); lyoprotectants increase survival of lyophilized bacteria (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006; Morales-García *et al.*, 2010). Activated carbon functions as a lyoprotectant in lyophilization processes because of its characteristics of reversible physical adsorption, adsorption in the liquid phase without elimination by simple desorption and porosity (Littrell *et al.*, 2002; Roussak and Gesser, 2013). Activated carbon is used to support

Cuadro 1. Concentración de bacterias [Bacterias], porcentaje de degradación *in vitro* de la materia seca (%DEGMS), pH y concentración de ácido acético y butírico después de 10 d de incubación con bacterias celulolíticas liofilizadas con y sin carbón activado como preservador[†].

Table 1. Bacterial concentration [Bacteria], percentage of *in vitro* degradation of dry matter (%DMDEG), pH and acetic and butyric acid concentration after 10 d of incubation of lyophilized cellulolytic bacteria, with and without activated carbon as a lyoprotectant[†].

Tratamiento	[Bacterias]	%DEGMS	pH	Acético, mM L ⁻¹	Butírico, mM L ⁻¹
CA	9.58×10 ^{8a}	32.75 ^a	7.09 ^a	54.50 ^a	12.74 ^a
SL	7.21×10 ^{8b}	3.67 ^b	7.10 ^a	40.09 ^b	8.63 ^b
EEM	0.927	0.234	0.061	1.410	0.928

[†] Las variables no presentaron interacción significativa tratamiento tiempo ($p > 0.05$); a, b: valores promedio con distinta letra en una misma columna son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$); EEM: error estándar del valor promedio; CA: Carbón activado como preservador; SL: sin preservador. [‡] The interaction treatment-time did not have a significant effect ($p > 0.05$) on the variables. a, b: average values with different letters in the same column are statistically different ($p \leq 0.05$); EEM: standard error of the average value; CA: activated carbon as lyoprotectant; SL: without lyoprotectant.

(Malik, 1990) y los preservadores aumentan la supervivencia de bacterias liofilizadas (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006; Morales-García *et al.*, 2010). El carbón funciona como preservador en procesos de liofilización por sus características de adsorción física reversible, adsorción en fase líquida sin eliminación por desorción simple y porosidad (Littrell *et al.*, 2002; Roussak y Gesser, 2013). El carbón activado se usa como soporte para crecimiento microbiano en biorremediación (Gabr *et al.*, 2009; Mercier *et al.*, 2013) y adsorción de bacterias para su aislamiento (Yuan *et al.*, 2012).

La concentración de bacterias totales en el tratamiento CA fue 2.37×10^8 bacterias mL⁻¹ más que con SL ($p \leq 0.05$). El carbón en su proceso de activación aumenta el área de superficie (Elder, 2010; Villareal *et al.*, 2015), que le permite absorber bacterias dentro de su estructura porosa y liberarlas después (Roussak y Gesser, 2013; Villareal *et al.*, 2015). Las diferencias de la concentración de bacterias entre tratamientos y %DEGMS (Cuadro 1) se reflejaron en la producción de AGV (Cuadro 2). Las bacterias celulolíticas producen más ácido acético durante la fermentación de carbohidratos (Zavaleta, 1976). El tratamiento CA produjo 14.41 y 4.11 mM L⁻¹ más ácido acético y propiónico que el tratamiento SL ($p \leq 0.05$).

El pH tuvo valores neutros y sin diferencias entre tratamientos ($p > 0.05$; Cuadro 1) lo cual facilitó el crecimiento de bacterias celulolíticas, ya que una

microbial growth in bioremediation (Gabr *et al.*, 2009; Mercier *et al.*, 2013) and to adsorb bacteria for their isolation (Yuan *et al.*, 2012).

The concentration of total bacteria in the CA treatment was 2.37×10^8 bacteria mL⁻¹, more than with the SL treatment ($p \leq 0.05$). In its process of activation, the carbon increases in surface area (Elder, 2010; Villareal *et al.*, 2015), which permits it to absorb bacteria into its porous structure and release them later (Roussak and Gesser, 2013; Villareal *et al.*, 2015). The differences in bacterial concentration between treatments and %DMDEG (Table 1) are reflected in production of AGV (Table 2). The cellulolytic bacteria produce mostly acetic acid during carbohydrate fermentation (Zavaleta, 1976). The CA treatment produced 14.41 and 4.11 mM L⁻¹ more acetic and propionic acid than treatment SL ($p \leq 0.05$).

pH showed neutral values with no differences between treatments ($p > 0.05$; Table 1), facilitating cellulolytic bacterial growth since a decrease in pH interferes with their adhesion to the cellulosic material (Nag-Jin *et al.*, 2005). Barboza *et al.* (2009) pointed out that cellulolytic bacteria require neutral pH (Table 1) for adequate activity. The negative oxide reduction potential of the culture media indicates that they are highly reducing. In our study, the culture media were not different ($p > 0.05$) between treatments because activated carbon is an apolar compound (Mendonça *et al.*, 2015) and does not affect growth. But, the interaction of the CA

Cuadro 2. Potencial de óxido reducción (Óxido) y concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y ácido propiónico[†] en medios inoculados con bacterias celulolíticas liofilizadas y conservadas con carbón activado.**Table 2. Oxide reduction potential and concentration of volatile fatty acids (AGV) and propionic acid[†] in media inoculated with lyophilized cellulolytic bacteria and preserved with activated carbon.**

Tratamiento	Tiempo	Óxido	AGV, mM L ⁻¹	Propiónico, mM L ⁻¹
CA	1	-224.6 ^{ab}	92.72 ^a	18.82 ^a
CA	2	-233.9 ^{ab}	73.88 ^b	9.84 ^b
SL	1	-269.2 ^a	58.51 ^c	10.69 ^b
SL	2	-194.2 ^b	58.59 ^c	8.96 ^b
EEM		19.62	0.024	0.036

[†] Las variables presentaron interacción tratamiento tiempo ($p \leq 0.05$); a, b, c: valores promedio con distinta letra en una misma columna son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$); EEM: error estándar del promedio; CA: carbón activado como preservador; SL: sin preservador, testigo ❖ [†] Variables affected by the interaction treatment-time ($p \leq 0.05$); a, b, c: values with different letter in a column are statistically different ($p \leq 0.05$); EEM: standard error of the average; CA: activated carbon as lyoprotectant; SL: without lyoprotectant, control.

disminución en el pH interfiere con la adherencia de las bacterias celulolíticas al material celulósico (Nag-Jin *et al.*, 2005). Barboza *et al.* (2009) señalaron que las bacterias celulolíticas requieren pH neutro (Cuadro 1) para su actividad adecuada. El potencial de óxido-reducción negativo de los medios de cultivo indica que es altamente reductor. En nuestro estudio los medios de cultivo no presentaron diferencias ($p > 0.05$) entre tratamientos, debido a que el carbón activado es un compuesto apolar (Mendonça *et al.*, 2015) y no afecta el crecimiento. Pero la interacción del tratamiento CA en ambos tiempos de medición fue significativa (Cuadro 2).

CONCLUSIONES

El carbón activado fue efectivo como preservador de bacterias celulolíticas liofilizadas, ya que conservó la viabilidad y capacidad de degradación de celulosa.

LITERATURA CITADA

Barboza, S. P., K. L. Parker, and I. D. Hume. 2009. Integrative Wildlife Nutrition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Heidelberg, Germany. 342 p.

Cobos, M. A., A. Ley de Coss, N. D. Ramírez, S. S. González, and R. C. Ferrera. 2011. *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid. Res. Vet. Sci. 90: 26-30.

Cobos, M. A., M. Pérez-Sato, J. Piloni-Martini, S. S. González, and J. R. Bárcena. 2007. Evaluation of diets containing

treatment at both measuring times was significant (Table 2).

CONCLUSIONS

Activated carbon was effective as a lyoprotectant of lyophilized cellulolytic bacteria, conserving their viability and capacity to degrade cellulose.

—End of the English version—



shrimp shell waste and an inoculum of *Streptococcus milleri* on rumen bacteria and performance of lambs. Anim. Feed Sci. Technol. 132: 324-330.

Elder, G. M. 2010. Activated charcoal: to give or not to give. Int. Emerg. Nurs. 6: 76-80.

Gabr, R. M., S. M. F. Gad-Elrab, R. N. N. Abskharon, S. H. A. Hassan, and A. A. M. Shoreit. 2009. Biosorption of hexavalent chromium using biofilm of *E. coli* supported on granulated activated carbon. World J. Microbiol. Biotechnol. 25: 1695-1703.

García, L. M. D., y F. Uruburu F. 2000. La conservación de cepas microbianas. Actualidad SEM. 30: 12-16.

Jung H. G., F. M. Engels, and P. J. Weimer. 2004. Degradation of lucerne stem cell walls by five rumen bacterial species. NJAS – Wageningen J. Life Sci. 52: 11-28.

Kumar, S., P. L. Kashyap, R. Singh, and A. K. Srivastava. 2013. Preservation and maintenance of microbial cultures. In: Arora, D. K., S. Das, and M. Sukumar (eds). Analyzing Microbes. Manual of Molecular Biology Techniques. Berlin Heidelberg. Springer Protocols Handbooks. pp: 135-152.

- Littrell, K. C., N. R. Khalili, M. Campbell, G. Sandí, and P. Thiyagarajan. 2002. Structural characterization of activated carbon adsorbents prepared from paper mill sludge. *Appl. Phys. A* 74 (Suppl): S1403-S1405.
- Malik K. A. 1990. Use of activated charcoal for the preservation of anaerobic phototrophic and other sensitive bacteria by freeze-drying. *J. Microbiol. Methods*. 12: 117-124.
- Mercier, A., G. Wille, C. Michel, J. Harris-Hellal, L. Amalric, C. Morlay, and F. Battaglia-Brunet. 2013. Biofilm formation vs. PCB adsorption on granular activated carbon in PCB-contaminated aquatic sediment. *J. Soils. Sediments*. 13: 793-800.
- Mendonça, L. Z., Z. M. Magriotis, M. C. das Graças, W. S. Douglas, J. M. Guilherme, S. S. Viera, and D. N. Lee. 2015. Natural clay and commercial activated charcoal: properties and application for the removal of copper from cachaça. *Food Control*. 47: 536-544.
- Morales-García, Y. E., E. Duque, O. Rodríguez-Andrade, J. de la Torre, R. D. Martínez-Contreras, R. Pérez-y-Terrón, y J. Muñoz-Rojas. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología*. 14: 11-29.
- Morgan, C. A., N. Herman, P. A. White, and G. Vesey. 2006. Preservation of micro-organisms by drying; a review. *J. Microbiol. Methods*. 66: 183-193.
- Muñoz-Rojas, J., P. Bernal, E. Duque, P. Godoy, A. Segura, and J. L. Ramos. 2006. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 472-477.
- Nag-Jin, C., J. I. Y. I. Jee, O. Sejong, K. Byoung-Chul, H. Han-Joon, and J. K. Young. 2005. Effect of pH and oxygen on conjugated linoleic acid (CLA) production by mixed rumen bacteria from cows fed high concentrate and high forage diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 643-653.
- Ramírez N., J. S. 2006. Liofilización de Alimentos. ReCiTeIA. Cali, Colombia. 36 p.
- Roussak, O. V., and H. D. Gesser. 2013. Carbon-based polymers, activated carbons. *In: Springer US. Applied Chemistry: A Textbook for Engineers and Technologists*. 2nd ed. Springer-Verlag New York Inc. pp: 279-290.
- SAS. Institute Inc. 2011. Statistical Analysis System, SAS, User's Guide: SAS Inst., Cary, NC. pp: 119-130.
- Safronova V. I. and N. I. Novikova. 1996. Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: lyophilization and liquid nitrogen freezing. *J. Microbiol. Methods*. 24: 231-237.
- Villarreal, J., C. A. Kahn, J. V. Dunford, E. Patel, and R. F. Clark. 2015. A retrospective review of the prehospital use of activated charcoal. *Am. J. Emerg. Med.* 33: 56-59.
- Yuan, R., B. Zhou, C. Shi, L. Yu, C. Zhang, and J. Gu. 2012. Biodegradation of 2-methylisoborneol by bacteria enriched from biological activated carbon. *Front. Environ. Sci. Eng.* 6: 701-710.
- Zavaleta E. de L. 1976. Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes. *Ciencia Vet.* 1: 223-240.