



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE UN SISTEMA BIOELECTROQUIMICO SOBRE LOS PATRONES DE
FERMENTACION RUMINAL *IN VITRO*, POSIBLES CAMBIOS EN EL METABOLISMO DEL MICROBIOMA

Tesis
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
MVZ. ROCÍO LÓPEZ HERNÁNDEZ

TUTORA PRINCIPAL:
DRA. MARÍA OFELIA MORA IZAGUIRRE, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.

COMITÉ TUTOR:
DR. ARMANDO SHIMADA MIYASAKA, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.
DRA. BIBIANA CERCADO QUEZADA, CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO EN
ELECTROQUÍMICA.

QUERÉTARO, QRO. MAYO 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

| | Pag |
|---|-----|
| Resumen | 4 |
| 1. Antecedentes | 6 |
| 1.1 Ambiente ruminal | 9 |
| 1.2 Fermentación ruminal | 9 |
| 1.2.1 Principios fermentación anaerobia | 12 |
| 1.3 Vías metabólicas AGVs | 14 |
| 1.3.1 Producción aceto | 15 |
| 1.3.2 Producción propionato | 15 |
| 1.3.3 Producción butirato | 15 |
| 1.4 Biomasa microbiana | 14 |
| 1.5 Electrofermentación | 16 |
| 1.5.1 Técnicas electroquímicas microbianas | 16 |
| 1.5.2 Principios | 17 |
| 1.5.3 Mecanismo de transferencia de electrones extracelular (TEE) | 18 |
| 1.5.4 Electrofermentación anódica (fermentación desequilibrada) | 19 |
| 1.5.5 Electrofermentación catódica (electrosíntesis bacteriana) | 20 |
| 1.5.6 Electroodos como medio para controlar el potencial redox | 21 |
| 1.5.7 Voltaje aplicado como fuente de energía | 23 |
| 1.5.7 Diseño electrofermentador | 23 |
| 2. Justificación | 25 |
| 3. Hipótesis | 26 |
| 4. Objetivo general | 26 |
| 4.1 Objetivos específicos | 26 |
| 5. Metodología y materiales | 27 |
| 5.1 Exploración de diferente potenciales de electrodo sobre la producción de AGVs | 27 |
| 5.1.1 Instalación celdas de electrofermentación | 27 |
| 5.1.2 Obtención y recolección de líquido ruminal | 27 |
| 5.1.3 Preperación del sustrato | 28 |
| 5.1.4 Selección de potencial utilizado | 28 |
| 5.1.5 Tratamientos para evaluación de potencial, alimentación y tiempo de operación | 28 |
| 5.1.6 Diseño estadístico | 29 |
| 5.1.7 Análisis electroquímico | 29 |
| 5.1.8 Análisis químico | 29 |
| 5.2 Evaluación de potenciales de electrodo seleccionados sobre biomasa microbiana y DMS | 29 |
| 5.2.1 Potencial óptimo | 29 |
| 5.2.2 Diseño de celdas de electrofermentación | 30 |
| 5.2.3 Tratamientos a evaluación y tiempos de operación | 31 |
| 5.2.4 Preparación bolsas digestibilidad | 31 |
| 5.2.5 Medición DMS | 31 |
| 5.2.6 Medición de biomasa | 32 |
| 5.3 Validación de potencial 0.9 al ser evaluadas DMS, biomasa microbiana, pH, relación NADH/NAD ⁺ y AGVs | 32 |
| 5.3.1 Diseño experimental | 32 |

| | |
|--|----|
| 5.3.2 Tratamientos a evaluación y tiempos de operación | 32 |
| 5.3.3 Análisis químico | 33 |
| 5.3.4 5.3.4 Cuantificación NAD/NADH | 33 |
| 6. Resultados y discusión | 34 |
| 6.1 Exploración de diferente potenciales de electrodo sobre la producción de AGVs | 34 |
| 6.1.1 Diferencias en pH y conductividad | 34 |
| 6.1.2 Concentración de AGVs | 35 |
| 6.1.3 Análisis electroquímico de los electrodos | 38 |
| 6.2 Evaluación de potenciales de electrodo seleccionados sobre biomasa microbiana y DMS. | |
| 6.2.1 Desaparición de la materia seca | 40 |
| 6.2.2 Biomasa microbiana | 40 |
| 6.3 Validación de potencial 0.9 al ser evaluadas DMS, biomasa microbiana, pH, relación NADH/NAD ⁺ y AGVs | 41 |
| 6.3.1 Desaparición de la materia seca | 41 |
| 6.3.2 Biomasa microbiana | 42 |
| 6.3.3 Potencial de hidrógeno (pH) | 43 |
| 6.3.4 Relación NADH/NAD ⁺ : | 43 |
| 6.3.5 AGVs | 45 |
| 6.3.6 Relación molar AGVs | 48 |
| 7. Conclusión | 50 |
| 8. Bibliografía | 51 |
| 9. ANEXOS | 51 |
| Anexo 1. Gráficas obtenidas por OCV inicial durante la exploración de diferente potenciales de electrodo sobre la producción de AGVs. | 53 |
| Anexo 2. Gráficas obtenidas por CA durante la exploración de diferente potenciales de electrodo sobre la producción de AGVs. | 56 |
| Anexo 3. Gráficas obtenidas por OCV final durante la exploración de diferente potenciales de electrodo sobre la producción de AGVs. | 60 |
| Anexo 4. Artículo publicado: Single-Chamber Electro-Fermentation of Rumen Fluidincreases Microbial Biomass and Volatile Fatty Acid Production without Major Changes in Diversity | 64 |

RESUMEN

La fermentación ruminal es la actividad metabólica de los microorganismos que habitan en el rumen, y a través de esta, el animal obtiene los nutrientes necesarios para mantener sus funciones biológicas y productivas. Los productos de fermentación más importantes son los Ácidos Grasos Volátiles (AGVs), que constituyen hasta 80% de la energía aprovechable por el animal. Debido a la gran importancia que tienen los AGV y la fermentación para el rumiante, se han buscado diferentes mecanismos mediante los cuales se puedan manipular los productos de la fermentación de los microorganismos ruminales.

En este trabajo exploramos la manipulación a través de electrofermentación (EF), que implica el uso de medios electroquímicos para dirigir y controlar los procesos fermentativos. Se realizaron pruebas en semiceldas de tres electrodos con malla de níquel como electrodo de trabajo y malla de platino como contraelectrodo; se analizaron cuatro valores de potencial (-0.3, -0.2, 0.2 y 0.3 V/Ag/AgCl), así como el efecto del tiempo de operación (24 h, 48 h) en operación en lote con y sin alimentación (zacate Rhodes) para los microorganismos ruminales. Los tratamientos se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: 32°C, agitación 60 rpm y 100 ml de líquido ruminal.

El potencial -0.3 V/Ag/AgCl fue el que presentó mayor diferencia en la producción de ácido acético (101.9 mM), ácido propiónico (31.3 mM) y ácido butírico (32.9 mM) ($p < 0.001$ y $n=3$). Por el contrario, el tiempo de operación y la alimentación con zacate no afectaron los cambios en la concentración de los AGVs. Sin embargo, se observó un deterioro en electrodos de trabajo y contraelectrodos, por lo que se determinó que no eran los materiales adecuados.

Por lo tanto, se modificó una celda de una cámara con dos electrodos: trabajo y contraelectrodo; ambos de acero inoxidable, a los cuales les fueron aplicados potenciales eléctricos a partir de una fuente de poder (gw instek 4303).

Esta campaña experimental se dividió en dos fases: en la primera fase se analizaron dos potenciales eléctricos (0.4 V y 0.9 V) y un grupo control (sin potencial aplicado), los cuales fueron seleccionados según el potencial de celda de los experimentos con cambios en la producción de AGVs en la primera fase experimental. Los tratamientos se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: 38 °C, agitación 60 rpm, 100 ml de líquido ruminal y 0.5 g de forraje dentro de una bolsa de digestibilidad. Se recolectaron muestras de líquido ruminal en tres tiempos (6, 12 y 24 horas), para posteriormente medir digestibilidad de la materia seca y producción de biomasa. Las celdas bioelectroquímicas con un potencial eléctrico aplicado de 0.4 V no presentaron diferencias respecto al grupo control en ningún grupo ($p > 0.001$; $n=3$) en digestibilidad de la materia seca y producción de biomasa. En el caso de las celdas bioelectroquímicas con un potencial eléctrico aplicado de 0.9 V presentaron diferencias respecto al grupo control ($p < 0.001$ y $n=3$) en digestibilidad de la materia seca a las 12 y 24 horas, mientras que para producción de biomasa la diferencia fue a las 24 horas ($p < 0.001$ y $n=3$).

Tomando en cuenta estos resultados, se llevó a cabo una tercer fase experimental en la cual se utilizaron dos celdas con potencial eléctrico de 0.9 V (tratamiento) y dos celdas sin voltaje (control), con las mismas condiciones experimentales y condiciones de muestreo. En este caso, se midió digestibilidad de la materia seca, producción de biomasa, AGVs, pH, NAD⁺ y NADH. En el caso de las celdas bioelectroquímicas con un potencial eléctrico aplicado de 0.9 V se observó un incremento respecto al grupo control ($p < 0.001$ y $n=12$) en digestibilidad de la materia seca y producción de biomasa ($p < 0.001$, $n=5$) a las 12 y 24 horas; en el caso de la producción de AGVs (acetato, propionato y butirato) se observó un aumento respecto al grupo control a las 24 horas ($p < 0.001$, $n=3$), manteniendo la relación molar entre control y tratamiento ($p < 0.001$ y $n=3$). En el caso de pH no se observaron diferencias entre grupo control y tratamiento ($p > 0.001$).

y n=12). NAD⁺ presentó diferencias únicamente las primeras 6 horas (p<0.001 y n=3), mientras que las diferencias en NADH se presentaron a las 12 horas (p<0.001 y n=3).

1. Antecedentes

1.1 Ambiente ruminal

Los rumiantes son animales hervíboros capaces de obtener energía y producir alimentos de alta calidad como carne y leche a partir de plantas, las cuales se considerarían alimentos de un escaso valor nutritivo debido a su alto porcentaje de carbohidratos estructurales (como celulosa y hemicelulosa) y su bajo porcentaje de proteínas. Esta capacidad está dada por la organización anatómica del tracto gastrointestinal de los rumiantes que ha sido resultado de un largo proceso de adaptación a alimentos ricos en celulosa (Contreras *et al.*, 2010).

A diferencia de los monogástricos que presentan un estómago simple, los rumiantes han desarrollado un estómago complejo dividido en cuatro compartimentos rumen, retículo, omaso y abomaso, en el cual en animales adultos la proporción promedio en tamaño es de aproximadamente 80%, 5%, 7% y 8%, respectivamente; los primero tres se consideran divertículos esofágicos ya que están desprovistos de células secretoras de enzimas que favorezcan la digestión, el único provisto de esta función es el abomaso que es considerado el "estómago verdadero" (Relling *et al.*, 2003; Romagnoli *et al.*, 2017).

Debido a que los rumiantes no cuentan con enzimas celulolíticas propias que le permitan acceder a la glucosa a partir de polisacáridos con enlaces B-glucosídicos, celulosa y hemicelulosa; los preestómagos deben mantener un ambiente que permita el crecimiento y la multiplicación de los microorganismos, que son responsables de las fermentarlos hasta piruvato, ácidos grasos volátiles, CH₄, masa microbiana y CO₂ (Henderson *et al.*, 2015, McDonald *et al.*, 1995; Medrano, 2018).

Por lo tanto, se puede decir que la relación entre los rumiantes y los microorganismos constituye una simbiosis, resultado de un proceso de coevolución en la que el rumiante otorga un ambiente propicio para la multiplicación y actividad metabólica microbiana en el rumen. Este órgano asemeja a un sistema de cultivo continuo, en el que hay una continua incorporación de agua y alimentos para los microorganismos y una permanente remoción de desechos y productos finales (tasa de retención 12 horas para los líquidos y de hasta de 18-72 horas para partículas de alimentos), cuya acumulación podría frenar el proceso fermentativo. Además, asegura a los microorganismos que alberga (bacterias, protozoos, virus y hongos) una serie de condiciones estables de temperatura (38-43°C), osmolaridad (250 mOsm/kg a 400 mOsm/kg), potencial redox (-240 a -450 mV) y pH (5.5 a 7.0); siendo éste el principal determinante del tipo y número de microorganismos (Pechín, 1999; Islas *et al.*, 2020; Weimer, 2015). Este ambiente es controlado principalmente por el tipo y cantidad de alimento consumido, la mezcla de los alimentos, el paso de los alimentos a segmentos posteriores del aparato digestivo, la rumia, la cantidad de saliva que ingresa al rumen, la remoción de los desechos no digeribles y la absorción de los AGVs (Contreras *et al.*, 2010).

Por su parte, los microorganismos aportan al rumiante los productos de la fermentación que puede utilizar, tales como los AGVs, la síntesis de proteínas bacterianas, aminoácidos esenciales y no esenciales y vitaminas hidrosolubles. Además, algunas bacterias del rumen son capaces de inactivar determinadas sustancias potencialmente tóxicas, tales como nitritos, fitoestrógenos, y toxinas vegetales y de hongos (Contreras *et al.*, 2010).

Estos microorganismos pueden encontrarse suspendidos en el líquido ruminal, adheridos a la superficie de los alimentos o adheridos a la pared ruminal, esta distribución y cantidad de especies varía de acuerdo con el tiempo y al tipo de alimentación. Los microorganismos más importantes son bacterias, protozoos y hongos. De las bacterias se han reconocido 22 géneros y 63 especies anaeróbicas, en una concentración de 10⁹ – 10¹⁰ /g de contenido ruminal y de aeróbicas facultativas, 10⁴ /g de contenido ruminal. Los protozoos representan la microfauna ruminal y se desarrollan preferentemente a pH superior a 6. Se han identificado

6 géneros y 16 especies. Su concentración es de $10^4 - 10^6$ /por g de contenido ruminal. Los hongos son estrictamente anaerobios y constituyen alrededor del 8 % de la biomasa microbiana ruminal y se encuentran a una concentración de $10^3 - 10^5$ células/mL. Se han identificado seis géneros en el rumen: Neocallimastix, Piromyces, Orpinomyces, Caecomyces, Sphaeromyces y Cyllamyces (Ozkose *et al.*, 2001; Contreras *et al.*, 2010).

Existen diferentes clasificaciones para los microorganismos ruminales pero la clasificación funcional es una de las más extendidas debido a que nos ayuda a entender cuáles son los productos obtenidos de cada sustrato (Cuadro 1, 2 y 3) (Relling *et al.*, 2003, Contreras *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Clasificación funcional de las bacterias ruminales, sustratos y productos.

| Grupo de bacterias | Tinción Gram | Morfología | Característica funcional | Productos finales |
|--|--|--|--|---|
| Celulolíticas <i>Fibobacter succinogenes</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Ruminococcus albus</i> <i>Clostridium lochheadii</i> | Negativo Negativo Positivo Positivo | Bacilo Bacilo Coco Bacilo (esporas) | Fermentan e hidrolizan carbohidratos estructurales de pared (Celulosa) | AGVs Preferentemente Acetato |
| Aminolíticas <i>Bacteroides amylophilus</i> <i>Streptococcus bovis</i> <i>Succinimonas amyolytica</i> | Negativo Positivo Negativo | Bacilo Coco Oval | Fermentan e hidrolizan carbohidratos de reserva de granos (almidón) | AGVs Preferentemente Propionato |
| Pectinolíticas <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Lachnospira multiparus</i> | Negativo Negativo Positivo | Bacilo Bacilo Bacilo curvo | Hidrolizan y fermentan pectina. | AGVs Preferentemente Acetato |
| Hemicelulolíticas <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Ruminococcus sp.</i> | Negativo Negativo Positivo | Bacilo Bacilo Bacilo | Hidrolizan y fermentan hemicelulosa. | AGVs Preferentemente Acetato |
| Sacarolíticas <i>Treponema bryantii</i> <i>Lactobacillus vitulinus</i> <i>Lactobacillus ruminus</i> | Negativo Positivo Positivo | Espiral Bacilo Bacilo | Fermentan carbohidratos simples (azúcares vegetales) | AGVs Preferentemente Butirato |
| Lactolíticas <i>Megasphaera elsdenii</i> <i>Selenomonas ruminantium</i> | Positivo Negativo | Coco Bacilo curvado | Metabolizan lactato | Ácidos grasos libres y AGVs Preferentemente Butirato |
| Lipolíticas <i>Anaerovibrio lipolytica</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> | Negativo Negativo | Bacilo Bacilo curvado | Metabolizan las grasas | Ácidos grasos libres y AGVs Preferentemente Propionato |

| | | | | |
|---|----------------------------------|-----------------------------|--------------------|--|
| Proteolíticas <i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> | Negativo Negativo | Bacilo Bacilo curvado | Degradan proteínas | AGVs, péptidos, aminoácido y amoníaco |
| Metanogénicas (arqueas) <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> <i>Methanobacterium formicicum</i> <i>Methanomicrobium mobile</i> | Positivo Negativo | Bacilo Bacilo | Producen metano | Metano (CH ₄), CO ₂ |
| Ureolíticas <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> <i>Selenomonas sp.</i> <i>Bacteroides ruminicola</i> | Negativo Negativo Negativo | Espiral Bacilo Bacilo | Hidrolizan urea | Amoníaco (NH ₃), CO ₂ |

Adaptado de Relling *et al.*, 2003; Aguilar, 2016; Castillo-González *et al.*, 2014.

Cuadro 2 Clasificación de los protozoos ruminales y sus sustratos de fermentación.

| Familia | Género | Substrato a fermentar | | | |
|-------------------------|---------------------|-----------------------|----------|----------|--------------|
| | | Almidón | Azúcares | Celulosa | Hemicelulosa |
| <i>Isotrichidae</i> | <i>Isotricha</i> | X | X | | |
| | <i>Dasytricha</i> | X | X | | |
| <i>Ophryoscolecidae</i> | <i>Diplodium</i> | X | | X | X |
| | <i>Etnodinium</i> | X | X | | X |
| | <i>Epidinium</i> | X | | X | X |
| | <i>Ophryoscolex</i> | X | | X | X |

Contreras *et al.*, 2010

Cuadro 3. Principales hongos ruminales

| Hongos celulolíticos | Productos de fermentación |
|---------------------------------|---|
| <i>Neocallimastix frontalis</i> | Lactato, Acetato, Formiato, Succinato, Etanol |
| <i>Piromyces communis</i> | Celobiosa |
| <i>Orpinomyces joyonii</i> | Glucosa |

Castillo-González *et al.*, 2014.

1.2 Fermentación ruminal

1.2.1 Principios de la fermentación anaerobia

Como se mencionó anteriormente, el rumen funciona como una cámara de fermentación anaerobica con un potencial redox de -350 mV, el que varía entre -240 a -450 mV. El potencial redox es una medida de la

actividad de los electrones y está relacionado con el pH y con el contenido de oxígeno, siendo análogo al pH, ya que éste mide la actividad de protones y el potencial redox de los electrones. Un potencial redox positivo y de alta magnitud, es indicativo de un ambiente que favorece las reacciones de oxidación y uno negativo, y de baja magnitud, es de un ambiente reductor. Los microorganismos aerobios estrictos tienen un metabolismo activo en potenciales redox positivos, mientras que los anaerobios estrictos demuestran actividad metabólica solo a potenciales redox negativos. El potencial redox negativo del rumen es responsable que los hidratos de carbono sólo se descompongan hasta AGVs y no hasta CO₂ y agua, de manera que la energía contenida en los AGVs quede disponible para el rumiante (Contreras *et al.*, 2010).

En la fermentación anaerobia, el proceso redox ocurre en ausencia de aceptores terminales de electrones debido a la ausencia de oxígeno. La ausencia de un aceptor exógeno de electrones en la fermentación limita el rendimiento energético obtenido, por lo tanto, los microorganismos deben superar dos problemáticas: cómo se conservará la energía y cómo se llevará a cabo el equilibrio redox (Jin *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2008).

Los microorganismos fermentadores conservan la energía acoplando la síntesis de ATP a la descomposición de una molécula de sustrato compleja que se encuentra en su entorno. La descomposición produce especies más simples, una más oxidada y la otra más reducida que el sustrato. El ATP sirve como un depósito de energía química para un microorganismo fermentador, que puede gastar para fines como el mantenimiento y la reproducción celular, la síntesis de biomasa y el transporte de especies químicas a través de su membrana (Jin *et al.*, 2007). En la fermentación, el ATP se produce mediante un proceso llamado fosforilación a nivel de sustrato, en el que el ATP se forma directamente de un intermediario rico en energía durante los pasos del catabolismo de un compuesto orgánico o a través del establecimiento de una fuerza motriz a través de la membrana que puede impulsar la síntesis de ATP (Kracke *et al.*, 2015; Madigan *et al.*, 2008).

Las reacciones redox ocurren a pares. Para que ocurra cualquier oxidación debe ocurrir también una reducción acoplada. En reacciones de este tipo, nos referiremos a la sustancia reducida, en este caso el H₂, como el donador de electrones, y a la sustancia oxidada, en este caso los productos de fermentación. El hidrógeno es un metabolito central en la fermentación ruminal, el equilibrio de iones de hidrógeno (H⁺) y gas hidrógeno disuelto (H₂) determinan directamente el potencial redox del rumen y, por tanto, el posible grado de oxidación de los piensos (Hegarty, 1999; Van Linguen *et al.*, 2016). También se ha sugerido que la presión de hidrógeno controla termodinámicamente la producción de AGVs (Van Linguen *et al.*, 2016).

Más del 90% de la distribución de los átomos de hidrógeno en el rumen residen en el agua. Sin embargo, los protones en el agua no pueden intercambiarse libremente con otros protones, excepto cuando se liberan o se utilizan en reacciones de hidrogenación/ hidratación. Sin embargo, en el fluido del rumen, se produce una transferencia sustancial de protones durante la fermentación microbiana, de modo que una proporción sustancial de los átomos de hidrógeno en el metano y el gas hidrógeno se derivan del agua. A una temperatura de 39°C, la concentración de hidrógeno disuelto en el fluido ruminal a granel variaría entre aproximadamente 90 mM y 250 mM (Hegarty, 1999).

Para que se lleve a cabo la producción de AGVs debe haber una transferencia interespecie de H⁺ en el rumen, ya que se ha observado que en cultivo puros las bacterias ruminales tienden a producir compuestos como H₂, lactato, etanol y succinato como estrategia para oxidar el NADH⁺ producido durante la glucólisis; sin embargo, en el rumen, estos mismos microorganismos producen CO₂, CH₄ y AGVs (Ramírez *et al.*, 2014)

Para poder llevarse a cabo la transferencia de electrones entre donadores y aceptores en la fermentación ruminal, es necesaria la presencia de transportadores de electrones. Existen dos tipos generales de transportadores de electrones: los que difunden libremente (coenzimas) y los que están unidos firmemente a enzimas anclados en la membrana citoplasmática (grupos prostéticos). Los transportadores fijos funcionan en las reacciones de transporte electrónico asociado a membranas como citocromos, NADH-ubiquinona oxidoreductasa, hidrogenasa, ferredoxina y otras enzimas unidas a la membrana. Los transportadores difusibles más frecuentes incluyen las coenzimas nicotinamida adenín dinucleótido (NAD⁺) y NAD-fosfato (NADP). El potencial de reducción en condiciones estándar (25°C, pH 7.0, 1 atm) del par NAD/NADH (o del par NADP/NADPH) es de -0.32 V (Bhagchandani *et al.*, 2020; Madigan *et al.*, 2008). En el caso del NAD⁺/NADH, los electrones cedidos por un donador de electrones pueden reducir el NAD⁺ a NADH, y el último se puede reconvertir a NAD⁺ donando electrones a un aceptor. NAD⁺ y NADH facilitan la reacción redox sin consumirse en el proceso. Así, a diferencia de lo que ocurre con el donador primario de electrones o con el aceptor, que se requieren en grandes cantidades, la célula necesita solamente pequeñas cantidades de NAD⁺ y NADH porque constantemente se reciclan. Esta relación entre NAD⁺/NADH actúa en reacciones específicas de la red metabólica y su equilibrio influencia la red de fermentación en general (González-Cabaleiro *et al.*, 2015; Hoelzle *et al.*, 2014; Madigan *et al.*, 2008).

Aunque anteriormente se consideraba a NADH como un portador de electrones capaz de transmitir y dirigir la producción de H₂ directamente, actualmente se sabe que la ferredoxina (Fd) debido a su potencial de reducción más negativo, es el único portador de electrones capaz de dirigir la producción de H₂. La reducción de ferredoxina tiene lugar únicamente en la oxidación de piruvato a Acetil-CoA y su oxidación da lugar a la formación de H₂ (Figura 1) (González-Cabaleiro *et al.*, 2015; Van Linguen *et al.*, 2015).

FAD (H₂) es otro portador de electrones presente en el proceso de fermentación y está asociado a las reacciones metabólicas altamente exergónicas debido a su potencial de reducción menos negativo. Se ha descrito que desempeña un papel de intermediario facilitando el acoplamiento de una reacción metabólica altamente energética con la generación de la fuerza motriz del protón relacionada con la oxidación de NADH (González-Cabaleiro *et al.*, 2015)

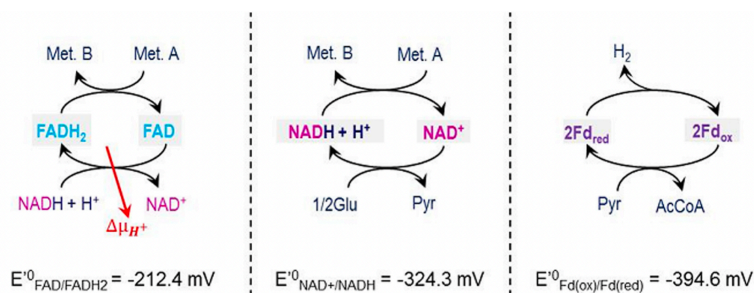


Figura 1. Portadores de electrones con su potencial reductor específico en condiciones estándar (González-Cabaleiro *et al.*, 2015).

Los potenciales de reducción (cuadro 4) de los transportadores de electrones y la capacidad de estos a unirse a hidrógeno varían de acuerdo con el pH y a la fuerza iónica, por lo que estos dos factores son de suma importancia en la termodinámica metabólica (Hoelzle *et al.*, 2014).

Cuadro 4. Potenciales de reducción estándar (ΔE°) en voltios (vs. SHE) de los portadores de electrones primarios involucrados en la actividad anaeróbica (Hoelzle *et al.*, 2014).

| Media Reacción | I=0.10 M | | | I=0.25 M | | |
|---------------------------------------|----------|---------|---------|----------|---------|---------|
| | pH 5 | pH 7 | pH 8 | pH 5 | pH 7 | pH 8 |
| $Fd^{3+} + e^- \rightarrow Fd^{2+}$ | -0.4009 | -0.4009 | -0.4009 | -0.4030 | -0.4030 | -0.4030 |
| $NAD^+ + H^+ + 2e^- \rightarrow NADH$ | -0.2589 | -0.3181 | -0.3477 | -0.2569 | -0.3160 | -0.3456 |

| | | | | | | |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| $\text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{NADPH}$ | -0.2636 | -0.3227 | -0.3523 | -0.2574 | -0.3166 | -0.3462 |
| $\text{FAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{FADH}_2$ | --- | -0.219 | --- | --- | --- | --- |
| $\text{FMN} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{FMNH}_2$ | -0.1007 | -0.219 | -0.2781 | -0.1027 | -0.2210 | -0.2801 |
| $\text{Cyt C}_{\text{ox}} + \text{e}^- \rightarrow \text{Cyt C}_{\text{red}}$ | 0.2223 | 0.2223 | 0.2223 | 0.2121 | 0.2121 | 0.2121 |

Existen controles metabólicos sensibles a los cambios redox como los cambios en la proporción de NADH/NAD^+ , estos controles son enzimas que regulan la transcripción de genes que codifican enzimas oxidantes de NADH . Estas enzimas Rex (represor redox) se unen a los operones aguas arriba de los genes que codifican principalmente hidrogenasas y citocromos cuando el ratio NADH/NAD^+ es bajo, lo que impide la producción de enzimas que oxidan el NADH (Pei *et al.*, 2011).

Estas interacciones entre la proporción NADH/NAD^+ , las concentraciones del producto reducido y la expresión de citocromos y oxidantes de NADH mantienen un potencial redox estable en la célula y, de manera similar al mantenimiento de la reserva de ATP, asegurando que el citoplasma mantenga un nivel adecuado de NAD^+ para el poder reductor en el metabolismo energético.

Por lo tanto, puede decirse que los cofactores redox como NADH y NADPH juegan un papel fundamental en el acoplamiento del catabolismo con anabolismo, generación de energía y producción metabólica de la fermentación.

1.3 Vías metabólicas de producción de AGVs

El ecosistema ruminal es complejo debido a la diversidad de microorganismos presentes y a la manera en la que se adaptan e interactúan entre ellos, teniendo una relación simbiótica. Por lo que, las vías de fermentación variarán de acuerdo a la comunidad bacteriana presente y a las condiciones del rumen (Figura 2).

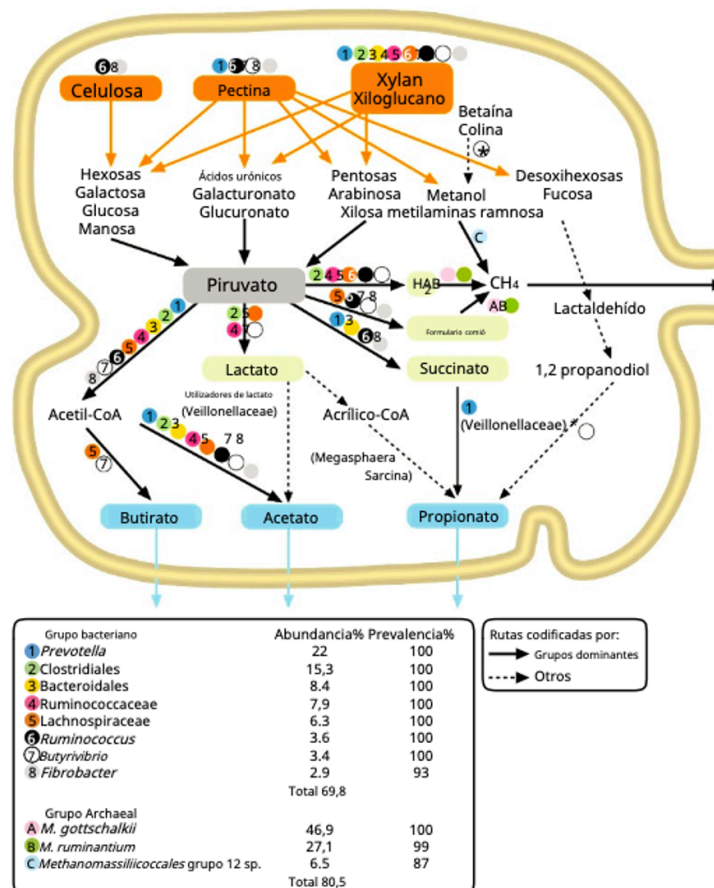


Figura 2. Ilustración simplificada que muestra la degradación y el metabolismo de los carbohidratos estructurales de las plantas por parte de los grupos de bacterias y arqueas dominante (Seshardi *et al.* 2018).

La fermentación ruminal puede dividirse en tres etapas:

La primera etapa es la hidrólisis microbiana de los polímeros contenidos en el alimento como los carbohidratos estructurales de las plantas: celulosa, hemicelulosa y pectina, y algunos compuestos de reserva energética: almidón, proteínas y lípidos. Estos polímeros son degradados a monómeros y oligomeros por acción de los fermentadores primarios o microorganismos hidrolíticos (Figura 3) (Contreras *et al.*, 2010). En esta etapa se lleva a cabo la vía principal de la fermentación de las hexosas, la glucólisis (o ruta de Embden–Meyerhof), que produce dos equivalentes de piruvato, ATP y NADH. El NADH, debe oxidarse de nuevo a NAD⁺ para mantener la glucólisis y para mantener más pasos metabólicos del metabolismo microbiano general que dependen del piruvato (Van Linguen *et al.*, 2019).

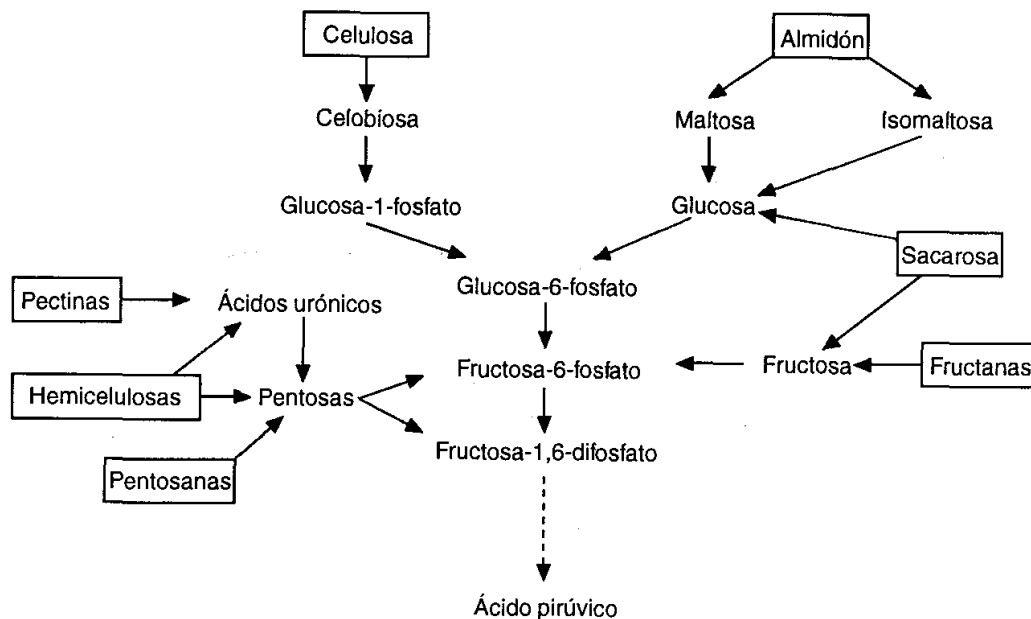


Figura 3. Etapa primaria de la fermentación ruminal (McDonald, 1995).

Aunque la vía glucolítica es la más importante en las células eucariotas y procariotas, no es la única. La vía de las pentosas es una ruta multifuncional para la degradación de hexosas, pentosas y otros hidratos de carbono (Varela y Grotiuz, 2008).

El ácido pirúvico derivado de la glucosa es un intermediario clave en el metabolismo fermentador de los hidratos de carbono, ya que de él derivará la segunda etapa de la fermentación microbiana donde será convertido en diversos productos como AGVs (acetato, propionato y butirato), H₂ y CO₂ (Figura 4). Esta etapa se lleva a cabo por los mismos fermentadores primarios o por otro grupo de microorganismos conocidos como fermentadores secundarios, los cuales no tienen la capacidad de hidrolizar polímeros. El metabolismo microbiano además recicla factores esenciales al grupo anterior y posibilita la transferencia de H⁺ entre los fermentadores primarios y secundarios (Baldwin, 1984; Varela y Grotiuz, 2008).

En la tercera y última etapa, las moléculas de H₂ y CO₂ son aprovechadas como sustrato por otros microorganismos como archeas metanogénicas o bacterias acetogénicas para producir metano y acetato, respectivamente (Contreras *et al.*, 2010).

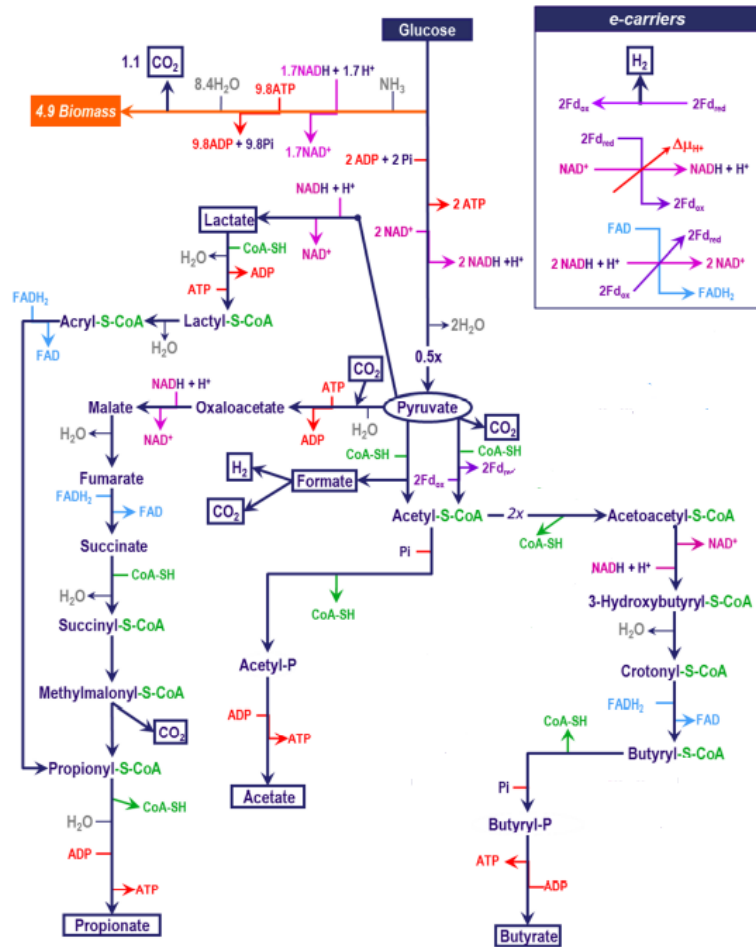


Figura 4. Principales vías de producción de AGVs (Adaptado de González-Cabaleiro *et al.*, 2015).

1.3.1 Producción de acetato

El acetato es el AGV más abundante en el rumen debido a que en la fermentación anaeróbica, hay necesidad de reacciones que permitan utilizar el exceso de H^+ que se produce, el cual es transferido a especies utilizadoras de H^+ y su producción a partir de piruvato no está directamente relacionada con la oxidación del NADH (Contreras *et al.*, 2010; Val Linguen *et al.* 2019).

Existen dos mecanismos mediante los cuales se puede producir acetato a partir de piruvato. La vía más común es la que involucra a la enzima piruvato formiato liasa, la cual convierte una molécula de piruvato en una de formiato y una de acetil-coA en metabolitos intermedios. El formiato, posteriormente, se convierte en H_2 y CO_2 por acción de otro microorganismo ruminal (Hungate, 1967). La segunda oxida el piruvato por medio de la enzima piruvato ferredoxina oxidorreductasa, convirtiéndolo en un CO_2 , un H_2 y una molécula de acetil-coA con una simultánea reducción de ferredoxina (Aguilar, 2016; Medigan *et al.*, 2008). La producción de acetato es favorecida por una alimentación rica en fibra.

1.3.2 Producción de propionato

El propionato es el segundo producto de fermentación más abundante del rumen después del acetato. Es sintetizado por las bacterias ruminales a partir de dos vías metabólicas:

- La vía del succinato (descarboxilación del succinato): gasta un NADH^+ y un FADH_2 .
- La vía del acrilato (reducción del lactato): gasta un NADH y un FADH_2 .

Este tipo de fermentación tiene la ventaja de que genera una molécula más de ATP (Pechín, 1999). La producción de propionato es favorecida cuando los animales son alimentados con dietas altas en concentrados.

1.3.3 Producción de Butirato

El butirato se sintetiza a partir de acetato o de compuestos que producen acetil- CoA, como el piruvato y el glutamato. La producción de butirato acopla la oxidación de NADH a la reducción de acetoacetil-CoA y crotonil-CoA (Aguilar, 2016; Val Linguen *et al.* 2019).

Los AGVs, son productos de desecho de los microorganismos ruminales, pero constituyen el 80% de la energía utilizable del rumen, tanto por absorción como por eludir al omaso; el restante (20%) se elimina en forma de calor y como CH₄. Su concentración en el rumen varía de 70-130 mM, su porcentaje relativo es 70:20:10, acetato, propionato y butirato respectivamente; aunque las concentraciones y proporciones varían según el tipo de dieta (Shimada, 2009).

Debido a que la fermentación es un proceso bioeléctrico, en el que los electrones se transfieren de un donante de electrones a un aceptor de electrones, se cree que se puede modificar a través de un proceso llamado electrofermentación, que será descrito adelante.

1.4 Biomasa microbiana

La biomasa se define como la energía acumulada en forma de organismos vivos, por lo que es proporcional al número de células y está relacionada con el crecimiento microbiano.

El crecimiento celular bacteriano depende de un gran número de reacciones. Algunas de estas reacciones son transformaciones energéticas, las cuales se encuentran influenciadas por las condiciones físicas y químicas del medio dónde se encuentran los microorganismos.

El metabolismo de una célula microbiana se puede describir como un sistema organizado en un catabolismo de recolección de energía acoplado a un anabolismo y mantenimiento que consume energía. Como se mencionó anteriormente, las bacterias anaerobias ruminales obtienen energía catabólica principalmente por fosforilación a nivel de sustrato, produciendo una producción neta de ATP, que luego se utiliza en anabolismo y mantenimiento que consume energía. En el proceso fermentativo, al no existir un aceptor final de electrones como el oxígeno, obtiene una menor cantidad de energía y por lo tanto una menor cantidad de biomasa celular (González-Cabaleiro *et al.*, 2015; Medigan *et al.*, 2008).

La fermentación de cultivos mixtos (FCM) presenta una alta diversidad en las actividades catabólicas que aumenta la flexibilidad de la población microbiana, facilitando la supervivencia de la población general al maximizar la cosecha de energía y enfrentando con éxito los cambios ambientales que limitan energéticamente el crecimiento microbiano (González-Cabaleiro *et al.*, 2015).

1.5 Electrofermentación

La electrofermentación (EF) es un proceso biotecnológico que combina técnicas electroquímicas microbianas con procesos fermentativos, manipulando el metabolismo de los microorganismos mediante la utilización de electrodos de estado sólido como aceptores y donadores de electrones, imponiendo un campo eléctrico (Chan *et al.* 2020; Moscoviz *et al.*, 2016; Schievano *et al.* 2016).

Esta tecnología ha sido implementada principalmente en procesos de fermentación, en los cuales se busca que los microorganismos transformen la materia orgánica en productos químicos que puedan ser utilizados por los humanos, como: ácidos orgánicos, aminoácidos, alcoholes, solventes, vitaminas, enzimas, así como biocombustibles y biopolímeros (Viridis *et al.* 2022).

1.5.1 Técnicas electroquímicas microbianas

Las técnicas electroquímicas microbianas describen una variedad de tecnologías emergentes que utilizan interacciones electrodo-bacteria para aplicaciones biotecnológicas (Krake *et al.*, 2015).

Los sistemas bioelectroquímicos (SBE), que se basan en la capacidad de las bacterias electroactivas (BEA), incluidos los exoelectrógenos y electrótrofos, de realizar una transferencia bidireccional de electrones entre componentes bióticos y abióticos, mediante la cual los microorganismos o biomacromoléculas con actividad redox catalizan el proceso de intercambio (Gong *et al.*, 2020; Schievano *et al.*, 2016).

Un SBE convencional consta de un ánodo y un cátodo separados por una membrana permeable a protones, y bacterias electroactivas que generalmente se encuentran unidos a los electrodos formando biopelículas electroquímicamente activas (BEF) (Babauta *et al.*, 2012; Bond y Lovley, 2003).

Los SBE más estudiados son las celdas de combustible microbianas (CCM) y las celdas de electrólisis microbianas (CEM). Las CCM son dispositivos que utilizan a los microorganismos para oxidar la materia orgánica e inorgánica y generar un flujo de electrones hacia el cátodo, cuando llegan los electrones al cátodo en condiciones aerobias, se combinan con los protones para reducir moléculas de oxígeno hasta formar agua, lo que crea un flujo de corriente eléctrica (Kumer *et al.*, 2017). En cambio, las CEM utilizan una fuente externa de corriente eléctrica que llega al cátodo para lograr un determinado proceso o la formación de productos químicos inorgánicos como el hidrógeno, el peróxido de hidrógeno, el hidróxido de sodio y otros, este proceso es anaerobio (Logan, 2008).

Estos sistemas se basan principalmente en el grado de reducción de un producto, pero recientemente se ha demostrado que no necesariamente el grado de reducción de un producto, sino más bien la vía metabólica que conduce del sustrato elegido al compuesto objetivo decide si hay un excedente o demanda de electrones dentro de la red metabólica de los microorganismos fermentadores. Esto se destacó con la producción de 1,4-butanodiol y 2,3-butanodiol a partir del azúcar. Ambos productos tienen el mismo grado de reducción, pero las diferentes vías metabólicas empleadas para la producción conducirán a diferentes subproductos y a un balance general de electrones diferente, de modo que en el caso del 2,3-butanodiol es necesario equilibrar un excedente de electrones, mientras que en el caso de usar 1,4-butanodiol hay una escasez de electrones que limita el rendimiento teórico (Kracke y Krömer, 2014). Por ello se ha puesto interés en buscar mecanismos mediante los cuales se pueda modificar el metabolismo de los microorganismos, tal como la electrofermentación.

1.5.2 Principios

Las fermentaciones son bioprocesos redox equilibrados internamente en los que un sustrato fermentable se oxida y se reduce en ausencia de un aceptor de electrones externo. Por lo general, las reacciones redox que ocurren durante los procesos de fermentación involucran el ciclo de transportadores de electrones, como NAD⁺ que se reduce a NADH tras la oxidación del sustrato. Para regenerar el portador de electrones (es decir, NAD⁺) para su reutilización continua en la ruta de fermentación, los electrones almacenados en NADH se transfieren a una molécula oxidada, generando así un producto reducido (Viridis *et al.*, 2022).

En el proceso de electrofermentación, los electrodos pueden actuar como sumideros o fuentes de electrones. Al aplicar potenciales redox externos se estimulan las tasas metabólicas, eludiendo las restricciones termodinámicas impuestas por la disparidad redox interna, dando lugar a un proceso de electrofermentación desequilibrada o electrosíntesis bacteriana (Bhagchandani *et al.*, 2020; Mukherjee *et al.*, 2021).

Se ha propuesto que este proceso de fermentación podría utilizar la transferencia de electrones bacterianos para promover el metabolismo de sustancias mediante el cambio del estado redox intracelular, como el potencial redox y la relación NADH / NAD⁺. También pueden modificar el medio cambiando el equilibrio redox y el pH; todo lo anterior puede estimular la elongación o descomposición de la cadena de carbono para mejorar el rendimiento general de biomasa y la producción de un producto específico. La relación entre las reacciones electroquímicas y bioquímicas juntas ayuda a disminuir las limitaciones termoquímicas de la fermentación anaeróbica convencional. Tal control electroquímico que ejerce no sólo tiene efectos sobre el metabolismo microbiano y la regulación celular, sino también sobre las interacciones entre especies y la selección de poblaciones bacterianas en cultivos microbianos mixtos (Bhagchandani *et al.*, 2020; Moscoviz *et al.*, 2016; Schievano *et al.*, 2016).

Los microorganismos o los electrodos podrían proporcionar electrones para superar las limitaciones metabólicas en la EF anódica o catódica, respectivamente. El producto oxidado se genera cuando el electrodo sirve como aceptor de electrones en los procesos de EF anódicos (EFA), lo que se conoce como fermentación desequilibrada. Por el contrario, el electrodo suministra electrones hacia el poder reductor intracelular para impulsar la biosíntesis de productos reducidos, que se denomina EF catódica (EFC) o electrosíntesis microbiana (Gong *et al.*, 2020). EFA puede explotarse potencialmente cuando el compuesto reducido es un producto no deseado, y se ha propuesto como un enfoque estratégico para reemplazar el oxígeno requerido en los procesos tradicionales de respiración aeróbica con el ánodo (Vassilev *et al.*, 2021).

En los procesos de EFC el electrodo funciona como donante de electrones proporcionando un excedente de electrones a la célula, además de los derivados de la oxidación del sustrato. Esto desencadena un aumento en el contenido de NADH intracelular que, en última instancia, puede traducirse en una mayor formación del producto final reducido, en relación con el producto final oxidado. Sin embargo, aún no está claro si la transferencia de electrones extracelulares está involucrada en los procesos de EF o si el electrodo polarizado simplemente actúa como un medio para controlar el potencial de oxidación-reducción (ORP) del caldo de fermentación en su interfaz con el electrodo y, a su vez, el estado redox intracelular que altera la formación y distribución de productos reducidos y oxidados (figura 5) (Virdis *et al.*, 2022). Además, la presencia de un electrodo polarizado puede desencadenar interacciones sintróficas y cooperativas, basadas en la transferencia de electrones entre especies, así como modificar la composición de la comunidad bacteriana (Aguilar-González *et al.*, 2022; Toledo-Alarcón *et al.*, 2021; Chu *et al.*, 2020).

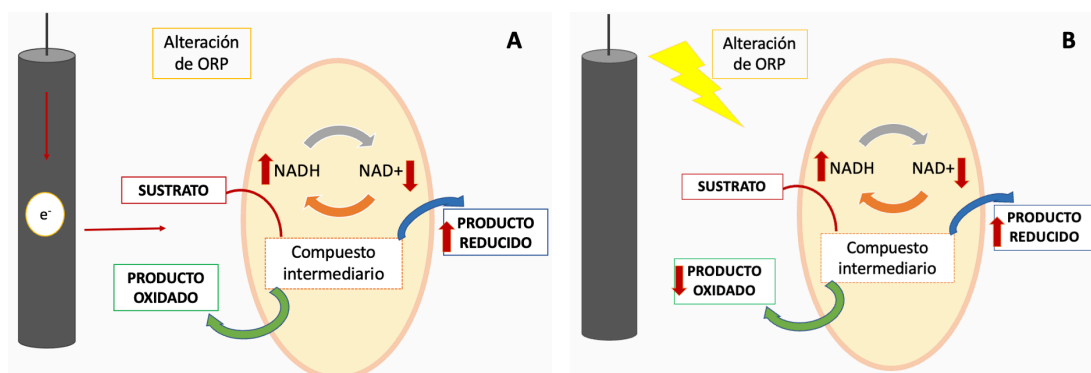


Figura 5. Conversión de sustrato en productos a través de electrofermentación con el electrodo sirviendo como donante de electrones (A) o como un medio para controlar el potencial redox del entorno de reacción (B) (modificado de Virdis *et al.*, 2022).

1.5.3 Mecanismo de transferencia de electrones extracelular (TEE)

El movimiento de electrones ocurre en tres pasos: la oxidación del sustrato, la transferencia de electrones a las proteínas correspondientes y el paso final de la transferencia extracelular de electrones. El flujo de electrones proviene de un donante de electrones con un potencial redox relativamente menor hacia un aceptor de electrones, que tiene un potencial redox relativamente alto (Schievano *et al.*, 2016).

Esta TEE puede ser directa e indirecta (Figura 6):

1. TEE directo: Puede ocurrir a través de un contacto directo entre las bacterias electroactivas y una interfaz del electrodo o metales sin la participación de ningún compuesto redox disociativo. La TEE directa se puede lograr mediante citocromos, NADH-ubiquinona oxidorreductasa, hidrogenasa, ferredoxina y otras enzimas unidas a la membrana (Kracke, 2015).
2. TEE indirecta o por mediador: Algunos compuestos químicos con actividad redox, denominados "lanzaderas de electrones" o "cofactores", podrían permitir el transporte indirecto de electrones a partir de materiales conductores. Estos compuestos redox difusibles incluyen principalmente moléculas auto-secretadas (flavinas, fenazinas), mediadores de transferencia de electrones exógenos (rojo neutro, metil viológeno, etc.) y metabolitos primarios (H_2 , formato, acetato, etc.) (Krumer *et al.*, 2017).

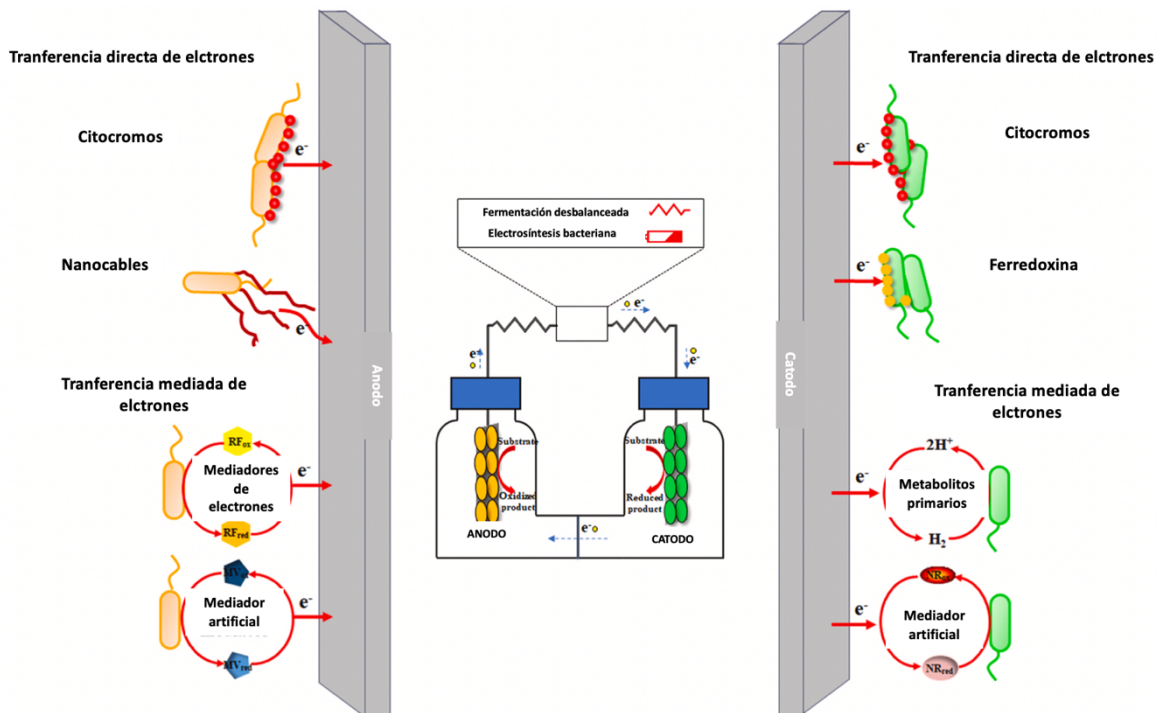


Figura 6. Mecanismos de transferencia bidireccional de electrones extracelulares (EET) durante el proceso de electrofermentación (modificado de Gong *et al.*, 2020).

Sin embargo, aunque en el proceso de electrofermentación no se puede excluir la ocurrencia de un flujo de electrones (que involucre especies activas redox en el caldo de fermentación), esto a menudo no puede explicar el cambio en la distribución de los productos finales (Moscoviz *et al.*, 2016).

1.5.4 Electrofermentación anódica (fermentación desequilibrada)

Como se ha mencionado, la fermentación necesita lograr un equilibrio redox. La falta de un aceptor de electrones significa que los electrones del sustrato deben recuperarse en los productos, lo que conduce a productos que tienen el mismo o mayor grado de reducción primaria que el sustrato. Esto hace termodinámicamente imposible la síntesis de productos oxidados con alto rendimiento. La fermentación 'desequilibrada' se puede potenciar a través de la respiración anaeróbica de un ánodo, que puede apoyar la reoxidación de cofactores y minimizar la síntesis de subproductos no deseados (Vassilev *et al.*, 2021).

En la EFA, el electrodo sólido acepta electrones derivados de reacciones oxidativas y se comporta como un sumidero favorable para disminuir el potencial redox, oxidando el H_2 a H^+ . Esto puede fomentar el consumo de NADH y crear gradientes de protones suficientes para la generación de ATP y un posible aumento en los rendimientos de biomasa (Kracke y Krömer, 2014; Schievano, 2016). Además se ha observado que también tiene efectos en la regulación de genes clave de enzimas involucradas en la producción de H_2 y en la descarboxilación de piruvato (Arusnari *et al.*, 2020).

La fermentación desequilibrada se puede dividir en TEE directo y en TEE mediado por lanzaderas (Figura 7).

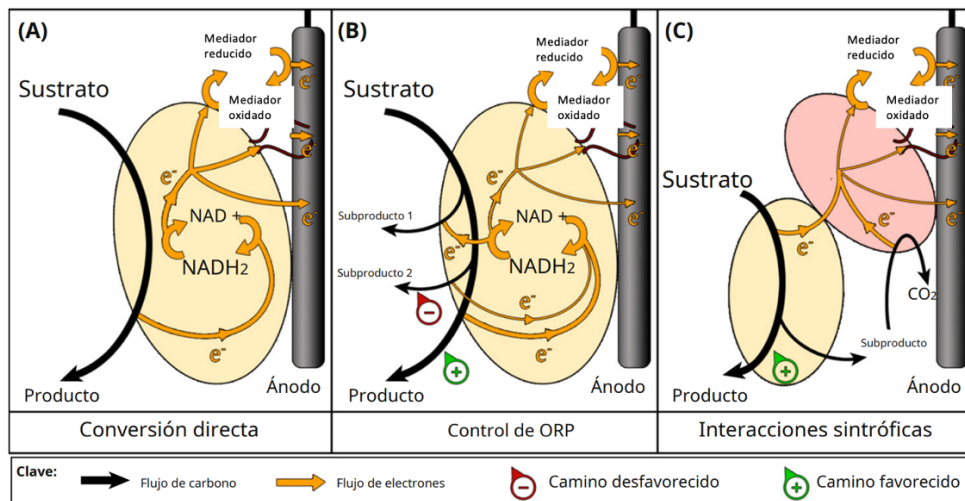


Figura 7. Representación esquemática de los posibles mecanismos que pueden ocurrir durante la electrofermentación anódica (EFA). (A) El sustrato se convierte directamente en el producto y el exceso de electrones se disipa completamente en el ánodo mediante mecanismos de transferencia extracelular de electrones. (B) El exceso de electrones generado durante la formación de los productos oxidados no se disipa completamente en el ánodo y una sección del sustrato se utiliza para este propósito. La eliminación de electrones en el ánodo conduce a la reducción de NADH/NAD⁺. (C) El microorganismo fermentativo (amarillo) consume el sustrato pero no puede interactuar con el ánodo. El microorganismo electroactivo (rojo) actúa como mediador entre el microorganismo fermentativo y el ánodo a través de mecanismos de transferencia de electrones entre especies (Moscoviz *et al.*, 2016).

1.5.5 Electrofermentación catódica (electrosíntesis bacteriana)

Se ha demostrado que las reacciones catódicas son una forma factible de reducir las fuentes de carbono inorgánico como el dióxido de carbono y generar metano o ácidos orgánicos de cadena corta (principalmente acetato), a través de procesos denominados respectivamente electrometanogénesis y electrosíntesis microbiana. De este modo, las bacterias sirven como biocatalizadores que facilitan la

transferencia de electrones hacia la producción de compuestos reducidos (Nevin *et al.*, 2011; Vassilev *et al.*, 2021).

El proceso de fermentación al no contar con un aceptor externo de electrones como el oxígeno, deben utilizar la fosforilación a nivel de sustrato para generar la mayor parte del ATP. Luego, los electrones en exceso generalmente se consumen mediante la reducción del sustrato, principalmente mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta o en forma de gas hidrógeno. Al utilizar un electrodo sólido que acepta electrones derivados de reacciones oxidativas y se comporta como un sumidero favorable para reducir el potencial redox, oxidando el H₂ a H⁺. Esto puede fomentar el desequilibrio en la proporción NADH/ NAD⁺ y crear gradientes de protones suficientes para la generación de ATP (Mukherjee *et al.*, 2021; Kracke y Krömer, 2014; Schievano *et al.*, 2016).

Este mecanismo se basa tanto en la transferencia indirecta de electrones, como en la existencia de electrótrofos, microorganismos que pueden aceptar electrones de donantes extracelulares. Estos microorganismos requieren estrategias para permitir el transporte de electrones a través de capas aislantes en la superficie celular externa.

En general, aún no se ha desarrollado la suficiente investigación para comprender las vías de captación de electrones. Por lo tanto, se requiere una aclaración fisiológica más completa de los mecanismos de absorción de electrones microbianos para evaluar la aplicabilidad comercial de EFC.

1.5.6 Electrodo como medio para controlar el potencial redox

Una estrategia técnicamente mucho más simple para EF en comparación con las reacciones específicas de microorganismos con un ánodo o cátodo como se presentó anteriormente es utilizar ampliamente la electroquímica para manipular el entorno redox (es decir, el ORP) o pH de las células microbianas, lo que afecta la actividad metabólica y, a su vez, la redistribución de los productos de fermentación. Varios estudios han demostrado que el control del potencial redox puede influir en gran medida en el espectro metabólico de las fermentaciones microbianas, especialmente en condiciones anaeróbicas. El potencial redox es un parámetro de control importante, ya que se correlaciona directamente con el NAD⁺/ NADH intracelular (Chandrasekhar *et al.*, 2021; Viridis *et al.*, 2022).

Por lo que este tipo de procesos ha generado interés para ser utilizado en electrofermentadores con cultivos microbianos mixtos o cultivos abiertos. En este tipo de estrategias, los medios de control de procesos son en general limitados y orientan la actividad de la comunidad hacia un espectro de productos más reducido, obligando a las células a ajustar la estequiometría de reducción del sustrato para mantener el equilibrio de electrones.

1.5.7 Voltaje aplicado como fuente de energía

Aunque se ha observado una conversión mediada por la corriente, la corriente eléctrica durante EF no siempre es suficiente para explicar el cambio en la proporción del producto final (Choi *et al.*, 2014; Flynn *et al.*, 2010). Se ha demostrado que una pequeña cantidad de electrones induce significativamente las vías de consumo de NADH sobre la contribución estequiométrica de los electrones como equivalentes reductores (Choi *et al.*, 2014).

Los voltajes aplicados para modificar el metabolismo bacteriano, han sido muy variados y en ocasiones contradictorios debido a los diferentes factores que influyen en él como el tipo de sustrato, el material del electrodo y la configuración de la celda.

Los voltajes aplicados en este trabajo, se basan en los resultados obtenidos por Emde y Schink (1990) dónde obtuvieron un aumento de 63% en propionato al aplicar un voltaje de -0.2 V vs SHE a *Propionobacterium freudenreichi* y en los resultados obtenidos por Aguilar et al., (2022) dónde al aplicar un voltaje de 0.350 V vs SHE al líquido ruminal, obtuvo un aumento general en la producción de AGV.

1.5.8 Diseño del electrofermentador

La efectividad del electrofermentador dependerá principalmente de (i) interacciones entre microorganismos, (ii) parejas redox disueltas del medio, (iii) interacciones entre microorganismos y la superficie de los electrodos a través de mecanismos celulares de transferencia extracelular de electrones (TEE), (iv) sustrato y (v) configuración de la celda.

Parte importante en el desarrollo de un electrofermentador es la elección del tipo de cultivo que será utilizado. Aunque los cultivos puros han sido los más comúnmente estudiados (tabla 4) son menos viables en cuanto a la producción industrial, ya que se requieren métodos costosos de esterilización para mantener la comunidad deseada. Por lo que la utilización de cultivos abiertos o cultivos mixtos, han tenido recientemente un mayor interés para reducir los costos en el proceso.

Este tipo de cultivos que utilizan diversos consorcios de microbios, convierten sustratos en productos a través de procesos metabólicos sintróficos entre bacterias. Su potencial metabólico está limitado solo por el rango genético de toda la comunidad, lo que permite una utilización de sustrato y un espectro de productos más amplios. Los controles de proceso, como el potencial aplicado, pH, carga de sustrato, y tipo de sustrato se puede utilizar para ajustar los resultados metabólicos de cultivos mixtos hacia los productos deseados (Virdis *et al.*, 2022).

Se han utilizado anteriormente cultivos mixtos de bacterias ruminales en CCM (Bretschger *et al.*, 2010; Rismani *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014) y en celdas de electrólisis bacterianas (Aguilar *et al.*, 2022, Hammonds, 2013) demostrando que estos consorcios microbianos tienen la capacidad de donar y aceptar electrones del medio, además de poder funcionar de manera sinérgica para la producción de productos valiosos y energética, por lo que podrían ser utilizados en un electrofermentador.

El ánodo y cátodo, así como sus reacciones pueden tener lugar en la misma sección del reactor o estar separadas dentro de diferentes cámaras por uno o más separadores (por ejemplo, membranas de intercambio iónico). Si los productos de contrarreacción son compatibles con la pureza de los productos de reacción del electrodo de trabajo, la configuración de cámara única es la ideal, y los fermentadores tradicionales con la simple adición de electrodos pueden actuar como sistemas EF. Cuando los productos o condiciones anódicos y catódicos puedan afectar negativamente el medio y la pureza del producto, la EF debe tener lugar en reactores separados adecuadamente. Cuando la extracción y concentración de un producto es el objetivo, se podrían incluir múltiples separadores para garantizar la pureza de este (Schievano *et al.*, 2016).

Los materiales ideales para electrodos deben tener una superficie biocompatible requerida para la interacción bacteria-electrodo, área de superficie específica adecuada, fuerte estabilidad química (incluida la resistencia a la corrosión), excelente resistencia mecánica, alta conductividad, un sistema escalable y fabricable, y bajo costo (Chen *et al.*, 2020;) Cercado *et al.*, 2013).

Se pueden usar metales valiosos como el platino para catalizar la reacción y, por lo tanto, reducir el sobrepotencial. Sin embargo, este proceso es muy caro. Por lo tanto, las alternativas como el acero inoxidable son una buena opción y se pueden utilizar para fabricar reactores anaeróbicos de una sola cámara (Hernandez-García *et al.*, 2020). Otros materiales a base de aleaciones como Ti / Ru y hierro-

grafito pueden impulsar el proceso de metanogénesis. Materiales a base de carbono como el grafito y carbono vítreo reticular, que se usa comúnmente para producir el ánodo, también se puede usar para la fabricación del cátodo si lo que se busca es formar un biocátodo (Gong *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2017).

Las estrategias tradicionales para alterar los equilibrios redox incluyen el burbujeo de gas, la adición de cosustratos y el control del pH. Se puede burbujear oxígeno dentro del cultivo de inóculo para actuar como un aceptor de electrones y así neutralizar los equivalentes redox del metabolismo microbiano. En la fermentación anaeróbica, el nitrógeno se utiliza para reducir la acumulación de metabolitos gaseosos. Por otro lado, cuando se requieren donantes de electrones adicionales, H₂ se burbujea gas para aumentar el metabolismo reductor. Las limitaciones en la eficiencia de transferencia de masa debido a la menor solubilidad en la fase gaseosa son los principales inconvenientes del microburbujeo (Bhagchandani *et al.*, 2020).

El pH normalmente se controla agregando tampones a los medios de cultivo o agregando ácido (p. ej., HCl) o soluciones alcalinas (p. ej., NaOH). Un problema es mantener el pH sin influir en las condiciones osmóticas y la salinidad de la solución como resultado de la acumulación de iones (p. Ej., Na⁺, Cl⁻ etc.) (Hernández-García *et al.*, 2020; Schievano *et al.*, 2016).

Tomando en cuenta los anteriores aspectos y visualizando la posible utilización del sistema bioelectroquímico *in vivo*, se requeriría que el sistema fuera lo más simple y resistente posible, para poder ser utilizado en un rumiante en condiciones naturales. Por lo que se sugiere el empleo de un sistema de una sola cámara con electrodos metálicos empelando únicamente un potencial eléctrico externo.

| PROCESO | ORGANISMO | V SHE vs | SUSTRATO | PRODUCTO | INCREMENTO EN EL PRODUCTO | Referencia |
|--------------------|--|-------------|------------------|--|---------------------------|-------------------------------------|
| Anódico | <i>Escherichia coli</i> | 0.2 | Glucosa | Acetoína | 53±4% | Förster <i>et al.</i> , 2017. |
| Anódico | <i>Shewenella oneidensis</i> | 0.4 | Glicerol | Etanol Acetato | 52±4% | Flynn <i>et al.</i> , 2010. |
| Anódico | <i>Escherichia coli</i> | 0.51 | Glicerol | Actato Etanol Lactato | 27% 19% 15% | Emde <i>et al.</i> , 1989. |
| Anódico | <i>Escherichia coli diseñada</i> | 0.2 | Glicerol | Etanol Acetato | 35±5% 20±1% | Sturm-Richter <i>et al.</i> , 2015. |
| Anódico | Bacterias ruminales | 0.1 | CO ₂ | Acetato | 26% | Hommands, 2013. |
| Anódico/ Cátodo | <i>Escherichia coli HP3</i> | -0.2 0,8 | Piruvato | H ₂ Lactato | 8% 19% | Arunasri <i>et al.</i> , 2020 |
| Catódico | <i>Propianobacterium freudenreichi</i> | -0.2 | Glucosa | Propionato Acetato | 63% 1% | Edme y Schink, 1990. |
| Catódico | <i>Propionibacterium acidi-propionici</i> | -0.47 | Lactosa | Propionato | 63% | Schuppert <i>et al.</i> , 1992. |
| Catódico | <i>Clostridium tyrobutyricum</i> | -0.17 | Sucrosa | Butirato | 76% | Choi <i>et al.</i> , 2012. |
| Catódico | <i>Clostridium pasteurianum</i> | -0.6 | Glucosa | Lactato Acetato Butirato Propionato | 26% | Choi <i>et al.</i> , 2014. |
| Catódico | <i>Corinobacteryum glutamicum</i> | -0.6 | Glucosa | Lactato | 47% | Sasaki <i>et al.</i> , 2014. |
| Catódico | <i>Clostridium ljungdahlii</i> | -0.7 | HCO ₃ | Acetato | 52% | Bajracharya <i>et al.</i> , 2015. |
| Catódico | Bacterias ruminales | -0.75 | Forraje | Acetato Propionato Butirato Metano | 71% 86% 63% 31% | Aguilar <i>et al.</i> , 2022. |
| Catódico | Cultivo mixto | -0.90 | Glicerol | 1,3- Propanediol | 100% | Zhou <i>et al.</i> , 2010. |
| Catódico | <i>Methanobacterium Thermoatotrophicus</i> | -1.5 | CO ₂ | Metano | - | Sato <i>et al.</i> , 2019. |
| Catódico | <i>Methanobacterium palustre</i> | -0.8 | CO ₂ | Metano | 80% | Cheng <i>et al.</i> , 2009. |

Cuadro 4. Ejemplos representativos de síntesis de productos químicos mediante electrofermentaciones anódicas y catódica.

2. JUSTIFICACIÓN

Los rumiantes han desarrollado una relación simbiótica con ciertos microorganismos, en la cual el animal proporciona un ambiente ideal para el crecimiento y reproducción de estos. Mientras que los microorganismos proporcionan al rumiante productos de la fermentación que puede utilizar, tales como los AGVs, la síntesis de proteínas bacterianas, aminoácidos esenciales y no esenciales y vitaminas hidrosolubles. Los AGVs son especialmente importantes porque representan hasta el 80% de la energía utilizada por el rumiante, el cual los utilizará para producir alimento de alto valor nutricional para la alimentación humana.

Debido a que la fermentación es un proceso en el que los electrones se transfieren de un donante de electrones a un aceptor de electrones, este puede ser modificado a través de un proceso llamado electrofermentación, utilizando electrodos de estado sólido como mediadores de electrones, imponiendo un campo eléctrico. Estos electrodos pueden actuar como sumideros de electrones o como fuentes que permiten una fermentación desequilibrada o la electrosíntesis bacteriana.

Aguilar *et al.* (2022) estudiaron este proceso, utilizando una celda de electrosíntesis bacteriana de dos cámaras separadas por una membrana de intercambio de protones, en la cual se estimuló a las bacterias bajo un potencial de 0.350 vs SHE observado un aumento en la producción general de AGVs en la cámara catódica.

Sin embargo, se necesita probar estas tecnologías en condiciones de operación más similares a las *in vivo*, así como determinar las condiciones óptimas para aumentar la producción de AGVs, por lo que es necesario extender las condiciones de voltaje, así como identificar qué material de electrodo es adecuado para las condiciones ruminales y entender cuáles son las modificaciones metabólicas para poder diseñar y predecir las rutas metabólicas implicadas en este proceso. Todo lo anterior con la finalidad de beneficiar la producción de leche y carne en México.

3. Hipótesis:

- El sistema bioelectroquímico diseñado modifica el metabolismo microbiano, aumentando la síntesis de AGVs a través de un proceso de electrofermentación.
- Existen materiales de electrodos y un voltaje óptimo de funcionamiento del sistema bioelectroquímico que modifican el ambiente ruminal *in vitro* para aumentar la concentración de AGVs.

4. Objetivo general:

Modificar la fermentación de los microorganismos ruminales dentro de celdas electroquímicas microbianas, provocando una mayor producción de ácidos grasos volátiles en líquido ruminal *in vitro*.

4.1 Objetivos Específicos:

1. Construir una celda electroquímica microbiana que simule las condiciones ruminales.
2. Evaluar el desempeño de tres materiales metálicos como electrodos.
3. Evaluar los cambios en la fermentación de microorganismos ruminales dentro de una celda electroquímica microbiana bajo diferentes niveles de potencial eléctrico, tiempos y alimentación.
4. Conocer si el voltaje tiene efectos sobre digestibilidad de materia seca, biomasa microbiana y relación NADH/NAD⁺.

5. Materiales y métodos:

5.1. Exploración de diferente potenciales de electrodo sobre la producción de AGVs

5.1.1 Diseño de celdas

Se utilizaron cuatro semiceldas de una cámara, con las siguientes dimensiones: longitud de 10 cm, diametro 5 cm y volúmen de trabajo de 90 cm³ por cámara y las cuales fueron cerradas por un tapón de caucho. El electrodo de trabajo estaba compuesto por malla de níquel (2 cm x 2 cm, Alfa Aesar) unido a un alambre de titanio de 10 cm, un contraelectrodo compuesto de malla de platino (2 cm x 2 cm, Alfa Aesar) unido a alambre de titanio. Se utilizaron tres electrodos de referencia de Ag/AgCl saturados y un electrodo de Ag/AgCl 3.5 M.

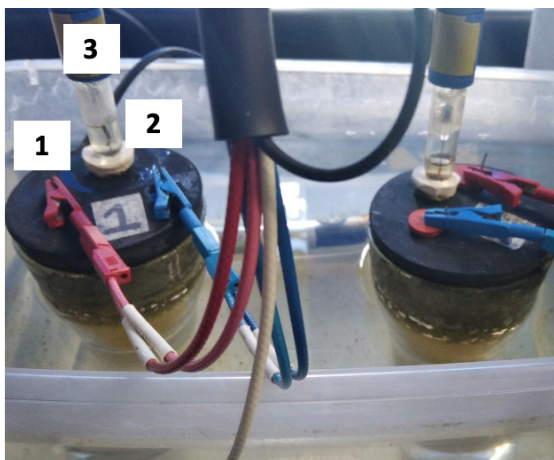


Figura 8. Semicelda electroquímica microbiana. (1) Electrodo de trabajo, (2) contraelectrodo, (3) electrodo de referencia.

Para la conformación del circuito externo y control de las celdas, se conectaron los electrodos a un potenciostato VSP Potentiostat (BioLogic, Francia) mediante un cable caimán-caimán, los registros se llevaron a cabo con Software Ec-lab 2014 Version 10.38 (BioLogic, Francia).

Las celdas se rellenaron con líquido ruminal de bovino y se mantuvieron a temperatura constante de 35 °C en un baño de agua con agitación de 60 rpm.

5.1.2 Obtención y conservación de líquido ruminal

Para la obtención del líquido ruminal se empleó un bovino de 8 años de edad, provisto de cánula ruminal y alimentado con una dieta a base de forraje en pastoreo a libertad. Los muestreos se llevaron a cabo en las mañanas, recolectando las muestras directamente del rumen con guantes estériles y separando la fase líquida de la sólida a través de un filtro estéril. La fase líquida fue almacenada en un recipiente limpio con tapa hermética, el cuál se mantuvo a una temperatura de 38°C durante su traslado al laboratorio.

5.1.3 Preparación del sustrato para las celdas

El sustrato que se utilizó para alimentar a los microorganismos ruminales fue Zacate Rhodes, el cual se desecó parcialmente con microondas durante 10 minutos y posteriormente se molió (1mm).

5.1.4 Potencial óptimo

Se planteó evaluar cuatro potenciales experimentales: 0.200 V, -0.325 V, 0.200 V y 0.325 V vs Ag/AgCl; basado en estudios preliminares:

- 0.200 V: fue elegido de acuerdo con los estudios realizados por Emde & Schink (1990) y Shuppert, et al. (1992), quienes estimularon bajo este potencial cultivos puros de bacterias propiogénicas (*Propionibacterium acidi-propionici*) alimentadas con glucosa, con la finalidad de aumentar la producción de propionato.
- -0.325 V: este potencial fue empelado debido a que Aguilar et al., (2022) obtuvieron un incremento en la producción de AGVs en líquido ruminal bajo este potencial, utilizando una celda de electrólisis microbiana.

5.1.5 Tratamientos para evaluación de potencial, alimentación y tiempo de operación

Los tratamientos en función del potencial de electrodo de trabajo, el tiempo de operación, y la adición de alimento al medio ruminal se resumen en el cuadro 5.

| Tratamiento | Potencial aplicado (vs Ag/AgCl) | Alimentación | Tiempo(h) |
|-------------|---------------------------------|--------------|-----------|
| A | 0.2 | No | 48 |
| B | 0.325 | No | 48 |
| C | 0.2 | No | 48 |
| D | 0.2 | Sí | 48 |
| E | 0.325 | Sí | 24 |
| F | 0.325 | Sí | 48 |
| G | -0.2 | Sí | 24 |
| H | -0.2 | Sí | 48 |
| I | -0.325 | Sí | 24 |
| J | -0.325 | Sí | 48 |
| K | -0.2 | No | 24 |
| L | -0.2 | No | 48 |

Cuadro 5. Codificación de los tratamientos aplicados para evaluar el potencial del electrodo, el tiempo de operación y la alimentación con zacate en cada celda con líquido ruminal.

5.1.6 Diseño experimental

El diseño experimental consistió en un diseño completamente al azar en un arreglo factorial de tres factores. Factor A: Voltaje aplicado (0.200 V, -0.325 V, 0.200 V y 0.325 V vs Ag/AgCl), Factor B: tiempo del tratamiento (24 y 48 horas), Factor C: alimentación (con o sin). Se realizó una repetición por cada tratamiento a evaluar con cuatro réplicas.

Como variable dependiente se cuantificó pH, conductividad y AGVs al terminar cada ciclo.

5.1.7 Análisis electroquímico

Las técnicas electroquímicas empleadas fue un ciclo de circuito abierto (OCV) con duración de 10 minutos, posteriormente se empleó cronoamperometría (CA) con duración de 24 o 48 horas dependiendo del tratamiento a evaluar. Finalmente, se verificó el cambio de potencial a circuito abierto de los electrodos en cada unidad experimental.

5.1.8 Análisis químico

Muestras del líquido ruminal fueron colectadas al inicio y final de cada tratamiento. El pH y la conductividad fueron medidos en cada muestra empleando un medidor multiparámetros (Oakton, PCD 500).

Para la cuantificación de AGVs, se utilizó un cromatógrafo de gases Varian 3300 con detector de ionización de llama y una columna capilar Zebron ZB-FFAP con características de longitud 15 cm, diámetro interno 0.53 mm (Phenomenex, CA, Estado Unidos). Las condiciones de operación del cromatógrafo de gases fueron las siguientes:

- La temperatura de la columna se mantuvo a 70°C durante 1.5 min y se incrementó hasta los 130°C a una tasa de 10°C por min, alcanzando la temperatura final a los 7.5 min.
- Temperatura del inyector 190°C
- Temperatura del detector 210°C.
- Fase móvil: Nitrógeno a un flujo de 9.5 mL/min
- Presión: Aire 60 psi; N₂ 70 psi; H₂ 40 psi.

5.2 Evaluación de potenciales de electrodo seleccionados sobre biomasa microbiana y DMS.

5.2.1 Elección de potenciales

Los voltajes fueron seleccionados según los potenciales de celda en los que se observaron cambios en la producción de AGVs en la primer fase experimental (Figura 12).

5.2.2 Diseño de las celdas de electrofermentación

Se instalaron cuatro celdas de electrofermentación de una cámara con volúmen de trabajo de 100 cm³ por cámara. Se utilizaron tanto para el ánodo como para el cátodo electrodos de acero inoxidable (2 cm x 2 cm) unidos a un alambre de titanio de 10 cm.

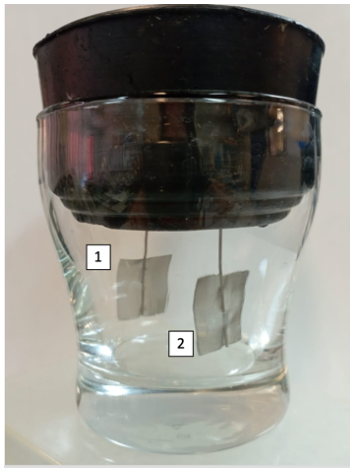


Figura 9. Fotografía del electrofermentador (EF) de una cámara. (1) Ánodo, (2) Cátodo.

Para la conformación del circuito externo de las celdas se conectaron los electrodos a una fuente de poder gw instek 4303 mediante un cable caimán.

5.2.3 Diseño experimental

El diseño experimental consistió en un diseño completamente al azar en un arreglo factorial 2 x 2, dos factores con dos niveles. Factor A: Voltaje aplicado, Factor B: tiempo del tratamiento. Se realizaron tres repeticiones por potencial eléctrico a evaluar (4 V y 0.9V) así como dos réplicas y un grupo control por repetición. Los experimentos se realizaron en lote con una duración de cada ciclo de 24 y 48 horas, a temperatura de 38°C dentro de una incubadora con agitación de 60 rpm.

El control se complementó solo con el líquido ruminal, el sustrato y los electrodos diseñados, mientras que otros reactores se complementaron con el líquido ruminal, el sustrato, los electrodos y el potencial de 0.4 V y 0.9 V.

Como variable dependiente se cuantificó biomasa y desaparición materia seca (DMS) al terminar cada ciclo.

Para la evaluación del efecto de dos factores (potencial eléctrico y tiempo) se utilizó un modelo estadístico para un diseño completamente al azar en un arreglo factorial con dos factores:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

I: 1,2; j:1,2, 3

Dónde:

Y_{ijkl} = Respuesta de la variable dependiente en el i-ésimo potencial de la j-ésima hora de la l-ésima alimentación.

μ = Efecto de la media poblacional.

τ_i = es el efecto del i-ésimo nivel del factor potencial (0.4 V, 0.9 V y sin voltaje).

β_j = es el efecto del j-ésimo nivel del factor tiempo (6, 12 y 24 horas).

$(\tau\beta)_{ij}$ = es el efecto de la interacción del i-ésimo nivel del factor potencial con el j-ésimo nivel del factor tiempo.

ε_{ijk} = error aleatorio experimental.

5.2.3 Tratamientos a evaluación y tiempos de operación

Los tratamientos en función del potencial de celda y el tiempo de operación, se resumen en el cuadro 6.

| Voltaje | Tiempo |
|-------------|------------------|
| Sin voltaje | 6, 12 y 24 horas |
| 0.4 V | 6, 12 y 24 horas |
| 0.9 V | 6, 12 y 24 horas |

Cuadro 6. Tratamientos utilizados en segunda experimentación

5.2.4 Preparación bolsas digestibilidad

La preparación del sustrato fue igual que en la primera fase experimental (5.1.2), posteriormente se introdujo el sustrato a bolsas de digestibilidad con porosidad de 25 μm (ANKOM F57, Technology, NY, Estados Unidos). Las bolsas fueron lavadas con acetona durante cinco minutos y secadas completamente a 60°C durante 24 horas.

Posteriormente fueron pesadas individualmente, su peso se registró como Pb; se pesaron 0.5 g (Pm) de forraje molido y se colocaron directamente dentro de cada bolsa. Finalmente, se sellaron por calor y se almacenaron en desecador ambiente hasta su uso.

5.2.5 Medición DMS

Al término de cada ciclo (24 y 48 horas) se recolectaban las bolsas de digestibilidad de cada celda, se realizaron lavados con agua destilada hasta quitar cualquier residuo de líquido ruminal. Posteriormente se secaron a 60°C durante 24 horas, se introdujeron en un desecador durante 10 minutos y se pesaron en balanza analítica (Ohaus). Para calcular el porcentaje de digestibilidad de la materia seca se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DMS} = \frac{(P_f - P_i)}{P_m} * 100$$

Pi= Peso inicial de bolsa más forraje.

Pf= Peso final de bolsa más forraje.

Pm= Peso de la muestra (Pi-Pb).

Pb= Peso de bolsa.

5.2.6 Medición de biomasa microbiana

La medición de biomasa se llevó a cabo al terminar cada ciclo (24 y 48 horas) recolectando 100 ml del líquido ruminal de cada celda, el cual se mezcló en una relación 1:5 con saliva artificial, obteniendo un volumen final de 500 ml. Posteriormente se introdujo la mezcla en un bioreactor my-Control de 3 litros (Applikon Biothecnology, Holanda) el cuál cuenta con un sensor de biomasa con el cuál se llevaron a cabo las mediciones.

5.3 Validación de potencial 0.9 al ser evaluadas DMS, biomasa microbiana, pH, relación NADH/NAD⁺ y AGVs :

Una vez evaluadas las diferencias entre los grupos experimentales de la segunda fase experimental, se evaluó finalmente el potencial con mayores diferencias observadas (0.9 V) con las mismas condiciones experimentales.

5.3.1 Diseño experimental

Para la evaluación del efecto de dos factores (potencial eléctrico y tiempo) se utilizó un modelo estadístico para un diseño completamente al azar en un arreglo factorial con dos factores:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

I: 1,2; j:1,2, 3

Dónde:

Y_{ijk} = Producción de AGVs (acetato, propionato y butirato) en el i-ésimo potencial de la j-ésima hora.

μ = Efecto de la media poblacional.

τ_i = es el efecto del i-ésimo nivel del factor potencial (0.9V y sin voltaje).

β_j = es el efecto del j-ésimo nivel del factor tiempo (6, 12 y 24 horas).

$(\tau\beta)_{ij}$ = es el efecto de la interacción del i-ésimo nivel del factor potencial con el j-ésimo nivel del factor tiempo.

ϵ_{ijk} = error aleatorio experimental.

5.3.2 Tratamientos a evaluación y tiempos de operación

Los tratamientos en función del potencial de celda y el tiempo de operación, se resumen en el cuadro 6

| Voltaje | Tiempo |
|-------------|------------------|
| Sin voltaje | 6, 12 y 24 horas |
| 0.9 V | 6, 12 y 24 horas |

Cuadro 7. Tratamientos utilizados en tercera experimentación

5.3.3 Análisis químicos

Muestras del líquido ruminal fueron colectadas al final de cada tratamiento El montaje de las celdas (5.2.2), la preparación de las bolsas de digestibilidad (5.2.3), la medición de DMS (5.2.4) y biomasa microbiana (5.2.5) se llevó a cabo como en la segunda fase experimental. La medición de pH y AGVs se llevó a cabo como en la primera fase experimental (5.1.7).

5.3.4 Cuantificación NAD/NADH

La medición de NAD/NADH se llevó a cabo al término de cada ciclo (6, 12 y 24 horas) mediante el kit fluorométrico ab176723 (abcam, Cambridge, Reino Unido). Para ello, se tomó un 1 ml de muestra, se centrifugó a 10,000 g por 15 minutos a 4°C, el pellet obtenido fue suspendido en 100 μ L de buffer de lisis y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se realizó una segunda centrifugación a 2500 rpm por 5 minutos, se transfirió sobrenadante a un nuevo tubo y se mantuvo en hielo. Del sobrenadante obtenido se agregó 25 μ L con 25 μ L de buffer de extracción en un pozo de una placa de 100 pozos, se incubó a 35°C por 15 minutos y a cada pozo se agregó 25 μ L de reaction mixture. La lectura se realizó en Varioskan a 540/ 590 nm de absorbancia durante 60 minutos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Exploración de diferente potenciales de electrodo sobre la producción de AGVs

6.1.1 Diferencias en pH y conductividad

Al finalizar el tiempo experimental de todos los tratamientos, el pH de las muestras de medio ruminal se encontró en el rango de 5.2 a 7.1 (Figura 10). Los tratamientos que presentaron diferencias fueron: A, B, I y J, los tratamientos A y B tendieron a presentar un pH más básico (7.1), mientras que los tratamientos I y J presentaron un pH más ácido (5.2) (Figura 10). Para los tratamientos B, I y J el potencial utilizado fue 0.325 tanto positivo como negativo, obteniendo resultados opuestos.

Bhagchandani *et al.* (2020) y Moscoviz *et al.* (2016) observaron que el proceso de EF puede modificar el pH, principalmente con la liberación de protones disponibles en el agua, fomentando la conservación de NADH y con ello promoviendo el metabolismo anabólico bacteriano; lo que puede estimular la elongación o descomposición de la cadena de carbono para mejorar el rendimiento general de biomasa y la producción de un producto específico, (Sharma *et al.*, 2013, Hommands, 2013). Estos cambios en cuanto a reducción de pH y aumento de AGVs, han sido observado también por González-Cabaleiro *et al.* (2015) quien en un modelado basado en energía determinó que a un pH bajo aumentan las concentraciones principalmente de acetato y butirato. Esto coincide con nuestros resultados, dónde se aumentó la producción de AGVs al disminuir el pH.

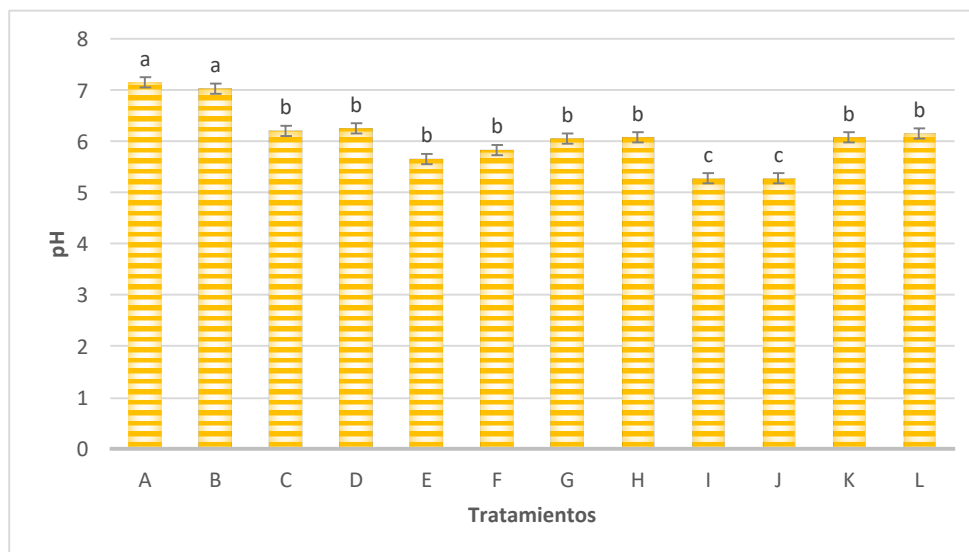


Figura 10. Valores de pH de las muestras al final cada tratamiento indicado en el Cuadro 5 ($P < 0.05$, $n=4$)

La conductividad de un medio corresponde a la suma de iones presentes, los cuales favorecen los procesos de transferencia electroquímicos, por lo que es de esperarse que un medio con mayor conductividad favorezca la síntesis de AGVs mientras que uno con menor sea desfavorable.

La conductividad del medio ruminal al finalizar los tratamientos varió en el rango de 6 - 17 mS cm^{-1} ; el valor más elevado se observó en el tratamiento C (17 mS cm^{-1}) y el menor en el tratamiento L (6 mS cm^{-1}), siendo este el único que presentó una diferencia significativa ($P < 0.05$, $n=4$).

Tomando en cuenta estos resultados se considera que el tratamiento C al tener una mayor conductividad y el tratamiento I, J al tener bajo pH, son los tratamientos que más podrían favorecer a la producción de AGVs a través de un proceso electroquímico.

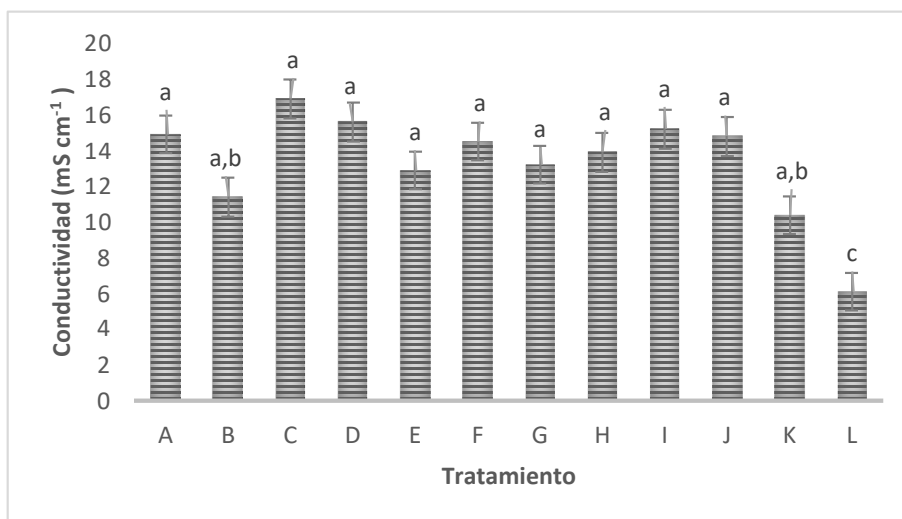


Figura 11. Valores de conductividad de las muestras al final cada tratamiento indicado en el Cuadro 5 ($P < 0.05$, $n=4$)

6.1.2 Concentración de AGVs:

Las muestras de medio ruminal obtenidas después de los tratamientos descritos en el Cuadro 5, se encontraron en un intervalo de 52.5 mM a 101.9 mM, siendo el máximo valor para el tratamiento C, seguido de los tratamientos I y J, mientras que los demás tratamientos no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$ y $n=4$) (cuadro 8 A).

Las mismas diferencias se observaron para propionato, dónde la concentración se encontró en un intervalo de 13.4 mM a 31.3 mM, siendo el tratamiento C el de mayor concentración seguido por los tratamientos I y J, mientras que no se observaron diferencias significativas para los otros tratamientos ($p < 0.05$ y $n=4$) (cuadro 8 B).

Finalmente, se observó que el patrón se repetía en butirato, siendo en este caso el intervalo de 9.0 mM a 32.9 mM, cuya concentración fué mayor en el tratamiento C seguido por el I y J, sin observarse diferencias entre los otros tratamientos ($p < 0.05$ y $n=4$) (cuadro 8 C).

Por lo tanto, la concentración global de los AGVs fue mayor en los tratamientos C, I y J, lo que nos indica que se puede aumentar la producción de AGVs tanto con potenciales positivos como negativos. Otro punto a observar es que la hay una amplia diferencia entre los dos potenciales, lo que nos indica que la obtención de los AGVs podría ser por diferentes mecanismos, aunado a esto si se relacionan estos resultados con los obtenidos en pH y conductividad, dónde en el tratamiento C no se observaron diferencias en cuanto a pH pero fue el tratamiento con una mayor conductividad, mientras que en los tratamientos I y J si existió una disminución del pH y una conductividad promedio.

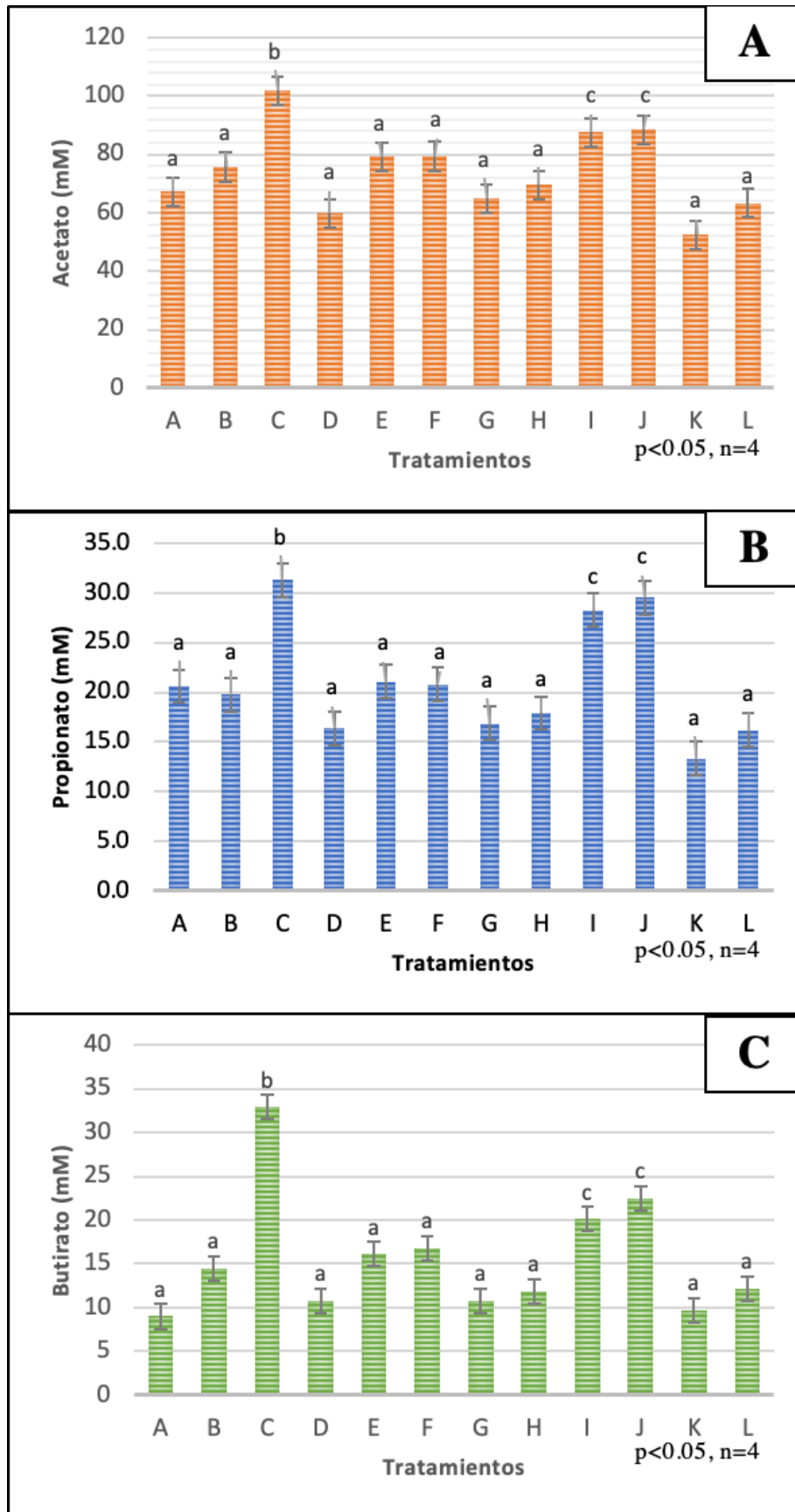


Figura 10. Producción de AGVs en medio ruminal después de ser sometidos a los tratamientos descritos en el Cuadro 5. A) Acetato, B) Propionato y C) Butirato ($p < 0.05$ y $n = 4$).

La relación entre la disminución del pH y el incremento en la producción de AGVs observados en los tratamientos I y J, tiene sentido al tomar en cuenta que dichos ácidos orgánicos tienen una constante de disociación (pKa) baja, cediendo protones al medio y provocando una disminución de pH (Sauvant *et al.*, 1999). Dicha relación inversa no fue observada en el caso del tratamiento C, el cual presentó la mayor concentración de AGVs pero no disminuyó el pH, indicando que existe otro factor tamponante en el medio que podría ser un factor intrínseco de los alimentos ingeridos previamente por el rumiante o amoniaco, si se viese estimulada la síntesis de proteína microbiana.

Tomando en cuenta lo anterior y el hecho de que los electrodos empleados fueron metálicos; puede descartarse la posibilidad de una reacción por biopelícula o una reacción electroquímica directa con dichos electrodos, y se pueden atribuir que los cambios observados se debieron al efecto del campo eléctrico sobre el metabolismo bacteriano, siendo el efecto diferente dependiendo el potencial empleado.

Debido a esto, no es necesaria la separación de las cámaras de fermentación para aumentar la producción de AGVs en líquido ruminal, como se ha realizado en anterioridad (Aguilar *et al.*, 2022).

Los tres tratamientos que mostraron un incremento en la producción de AGVs (C, I y J) también presentaron diferencias respecto a la producción promedio esperada de bovinos al ser alimentado con una ración 100% forraje (Mc Donald, 1995), incluso mayor que la producción mM de AGVs en dietas con 65% de concentrado (cuadro 8) (Domínguez *et al.*, 2019).

Cuadro 8. Producción (mM) de acetato, propionato y butirato en los tratamientos C, I, J en líquido rumina en comparación a una alimentación bovina convencional (Mc Donald, 1995, Domínguez *et al.*, 2019).

| Tratamiento | Acetato | Propionato | Butirato |
|--|----------------|-------------------|-----------------|
| Forraje 100% | 48 -80 | 15-20 | 7-12 |
| Forraje 35% Concentrado 65% | 70 | 28 | 17 |
| C | 101.9 +/- 4.9 | 31.3 +/- 1.7 | 32.9 +/- 1.4 |
| I | 87.7 +/- 4.9 | 28.3 +/- 1.7 | 20.1 +/- 1.4 |
| J | 88.6 +/- 4.9 | 29.6 +/- 1.7 | 22.5 +/- 1.4 |

6.1.3 Análisis electroquímico de los electrodos

Se registró el potencial a circuito abierto (OCV) de los electrodos de trabajo y contraelectrodos al inicio y al final de cada uno de los tratamientos (Cuadro 5), con la finalidad de registrar su variación y determinar la integridad de los materiales en el medio ruminal.

Los potenciales iniciales de los electrodos fueron estables; en el caso del electrodo de trabajo mantenía potenciales entre -0.4 V a -0.6 V y el contraelectrodo mantenía potenciales entre -0.2 V a -0.4 V. Pero dichos potenciales no se mantuvieron estables al final de los experimentos; variando el potencial del electrodo de trabajo en un rango de -0.2 a -0.4 V y el contraelectrodo entre -0.1 a -0.6 V (Anexo 1) (figura 11).

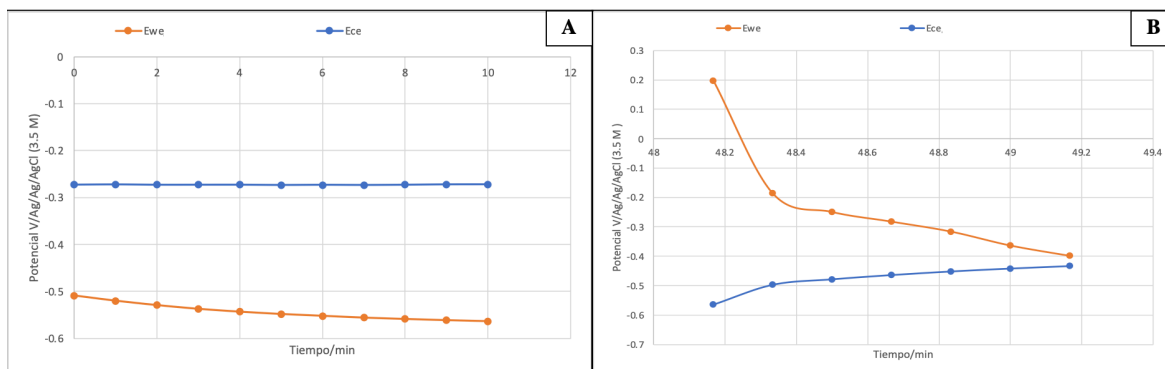


Figura 11. Valores del potencial de circuito abierto para electrodo de trabajo y contraelectrodo. Ejemplo del tratamiento C indicado en el cuadro 1. A) Condición al tiempo inicial, B) Condición al tiempo final experimental.

Las diferencias entre las OCV iniciales y finales en el caso del electrodo de trabajo derivaron a potenciales menos negativos, siendo el tratamiento C el que presentó una menor variación (Figura 12 A). Mientras que en el caso del contraelectrodo el potencial derivó a valores más negativos, siendo los tratamientos C, I y J los que presentaron menor variación (Figura 12 B).

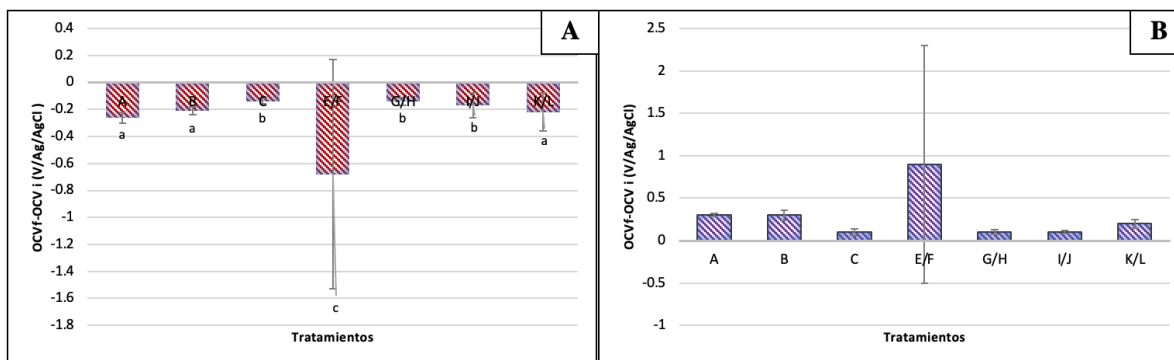


Figura 12. Variación en el potencial de circuito abierto entre condición inicial y final para: A) Electrodo de trabajo, B) Contraelectrodo ($p < 0.005$).

Adicionalmente a lo anterior, físicamente, los electrodos presentaron incrustaciones, desprendimiento de material y deformación.

Estas variaciones en los potenciales iniciales y finales, así como los cambios físicos observados, indicaron que estos electrodos metálicos sufrieron algún tipo de modificación en su superficie.

Hernández (2013), menciona que los electrodos de níquel pueden sufrir estas alteraciones por un desgaste adhesivo al estar en contacto con materia orgánica. Segura (2000), por su parte, menciona que adicionalmente, el níquel puede sufrir un proceso de corrosión consecuencia de un ataque electroquímico por el pH del electrolito.

Lo anterior es importante, ya que los materiales ideales para electrodos deben tener un área de superficie específica adecuada, fuerte estabilidad química (incluida la resistencia a la corrosión), excelente resistencia

mecánica, alta conductividad, un sistema escalable y fabricable, y bajo costo (Chen *et al.*, 2020). Esta derivación en los potenciales, aunados a los cambios físicos observados podrían indicar que los electrodos no son químicamente estables o resistentes mecánicamente.

Gong *et al.* (2020), menciona que, aunque los electrodos de platino son una buena opción para ser utilizados como contraelectrodos ya que reducen los sobrepotenciales, pero su uso es limitado debido a su elevado costo. Por lo que propone materiales más económicos como el acero inoxidable que se pueden utilizar para fabricar reactores anaeróbicos de una sola cámara.

Otro punto a considerar es la relación que existió entre la menor diferencia de potenciales de los electrodos y el aumento de AGVs en los tratamientos C, I y J. Esto podría indicarnos que hay potenciales dónde existe una menor adhesión de la materia orgánica en los materiales de electrodos y volviendo más efectivo el campo eléctrico aplicado.

Debido a lo anterior, se registró el potencial de celda del tratamiento C, I y J durante la cronoamperometría los cuales fueron estables durante el tiempo de tratamiento. En el caso del tratamiento C, el potencial de celda se mantuvo en 0.9 V, mientras que en el tratamiento I y J se mantuvo en 0.4 V (Figura 12).

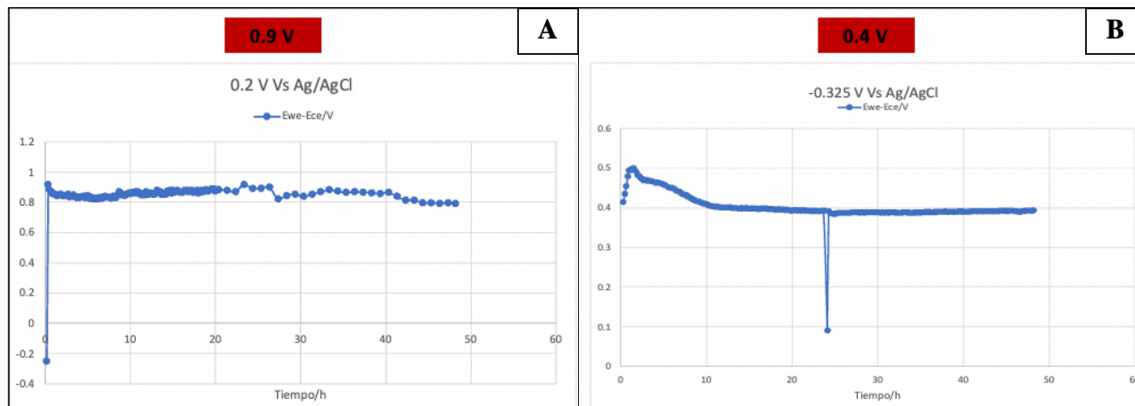


Figura 13. Potencial de celda tratamiento C (A), I y J (B), obtenidos mediante conoamperometría.

6.2 Evaluación de potenciales de electrodo seleccionados sobre biomasa microbiana y DMS

6.2.1 Desaparición de la materia seca:

La desaparición de la materia seca en el tratamiento con 0.9 V presentó diferencias respecto al control y al tratamiento 0.4 V a las 12 y 24 horas ($P < 0.05$, $n=3$), sin embargo, no se observaron diferencias entre tratamientos y grupo control en las primeras 6 horas ($P > 0.05$, $n=3$). Es decir, la desaparición de la materia seca aumenta al ser aplicado un potencial de 0.9 V durante 12 horas y este efecto permanece hasta las 24 horas.

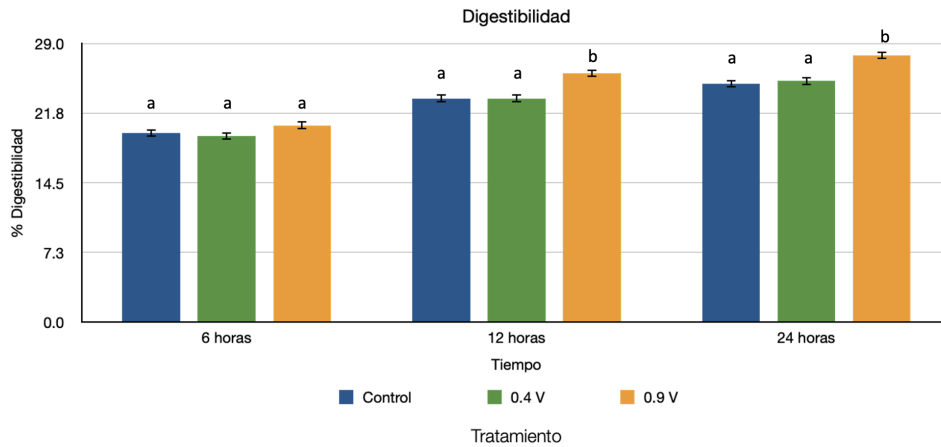


Figura 14. Efecto de la aplicación de potenciales eléctricos de 0.4 V y 0.9 V sobre la digestibilidad de la materia seca a las 6, 12 y 24 horas ($P < 0.05$, $n=3$).

6.2.2 Biomasa microbiana:

La biomasa (UFC/ml) en el tratamiento con 0.9 V presentó diferencias respecto al control y al tratamiento 0.4 V a las 24 horas ($P < 0.05$, $n=3$), sin embargo, no se observaron diferencias entre tratamientos y grupo control en las primeras 12 horas ($P > 0.05$, $n=3$). Es decir, existe un aumento en la producción de biomasa microbiana al utilizar un potencial eléctrico de 0.9 V después de las 12 horas.

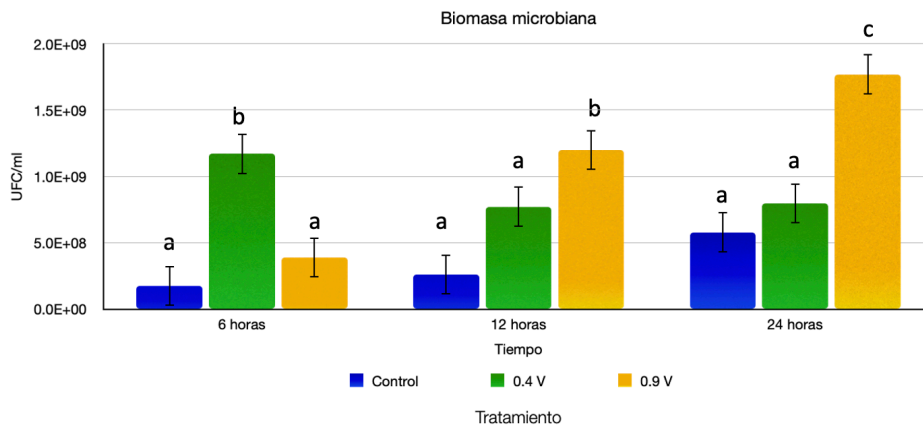


Figura 15. Efecto de la aplicación de potenciales eléctricos de 0.4 V y 0.9 V sobre la biomasa a las 6, 12 y 24 horas ($P < 0.05$, $n=3$).

6.3 Validación de potencial 0.9 al ser evaluadas DMS, biomasa microbiana, pH, relación NADH/NAD⁺ y AGVs

Al observar que en el primer experimento no existieron diferencias respecto a biomasa y digestibilidad entre el grupo control y al utilizar un potencial eléctrico de 0.4 V, se decidió realizar una segunda experimentación en la cual se utilizaría únicamente el potencial eléctrico de 0.9 V y un grupo control (sin voltaje), en tres tiempos 6, 12 y 24 horas (tabla 10).

Durante esta experimentación se tomaron muestras para medir digestibilidad de la materia seca, biomasa, pH, AGVs, NAD⁺ y NADH.

6.3.1 Desaparición de la materia seca:

La desaparición de la materia seca en el tratamiento con 0.9 V presentó diferencias respecto al control a las 12 y 24 horas ($P < 0.05$, $n = 18$), sin embargo, no se observaron diferencias entre el tratamiento y grupo control en las primeras 6 horas ($P > 0.05$, $n = 18$). Es decir, el efecto del voltaje sobre la digestibilidad de la materia seca se da al aplicar un potencial eléctrico de 0.9 V a partir de 12 horas.

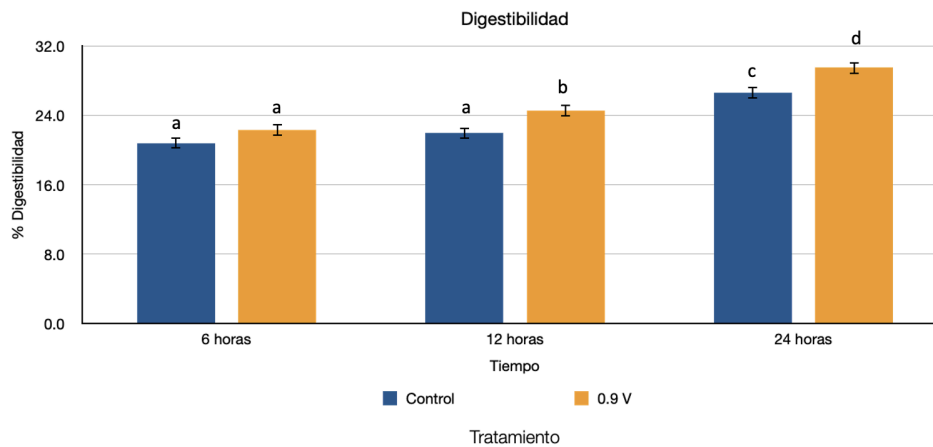


Figura 16. Efecto de la aplicación de potencial eléctrico 0.9 V sobre la digestibilidad de la materia seca a las 6, 12 y 24 horas ($P < 0.05$, $n = 18$).

Aguilar *et al.* (2022), no observó diferencias en cuanto a digestibilidad al aplicar 0.75 V al líquido ruminal mediante celda bioelectroquímica durante 48 horas, sin embargo, sí observó un mayor consumo de los azúcares disponibles, de más del doble, por lo tanto, se sugiere que la corriente eléctrica sí tuvo un efecto sobre el consumo de los carbohidratos, favoreciendo el incremento en el consumo de glucosa para formar mayor cantidad de productos de fermentación.

El incremento en la desaparición de la materia seca, indica que el proceso de electrofermentación utilizando 0.9 V tiene un efecto sobre la etapa de hidrólisis, etapa en la que se descomponen los polímeros de carbohidratos como la celulosa, hemicelulosa y pectina en monómeros como la glucosa para que estén disponibles para los microorganismos. Este efecto también puede deberse a un incremento en las poblaciones bacterianas como se observa en el punto 6.3.2.

6.3.2 Biomasa microbiana:

La biomasa microbiana (UFC/ml) en el tratamiento con 0.9 V presentó diferencia respecto al control a las 12 y 24 horas ($P < 0.05$, $n = 5$), sin embargo, no se observaron diferencias entre el tratamiento y grupo control en las primeras 6 horas ($P > 0.05$, $n = 5$). Es decir, el efecto del voltaje sobre la biomasa se da al aplicar un potencial eléctrico de 0.9 V a partir de 12 horas.

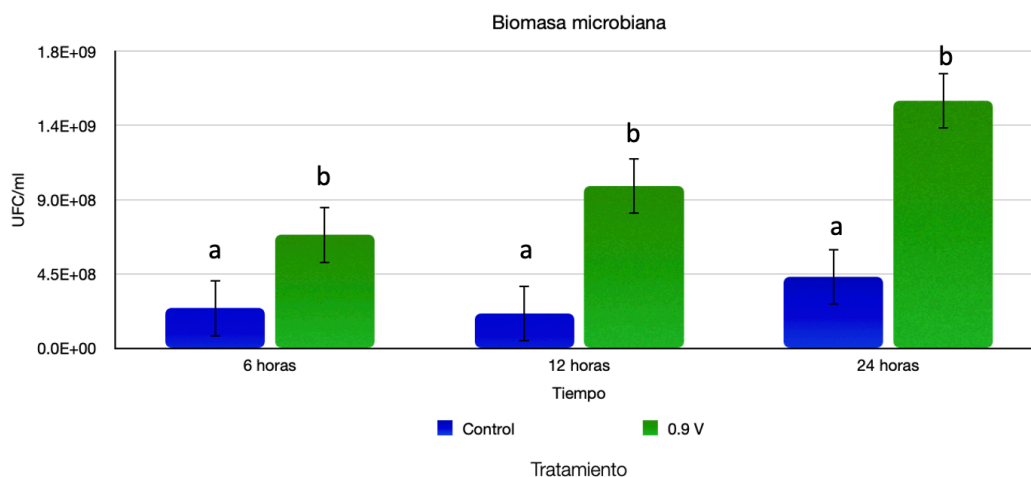


Figura 17. Efecto de la aplicación de potencia eléctrica 0.9 V sobre la biomasa a las 6, 12 y 24 horas ($P < 0.05$, $n = 5$).

Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de fermentación al no contar con un aceptor externo de electrones como el oxígeno, deben utilizar la fosforilación a nivel de sustrato para generar la mayor parte de ATP. Luego, los electrones en exceso generalmente se utilizan en la reducción del sustrato, principalmente mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta o en forma de gas hidrógeno si los electrones no se pueden utilizar en la reducción a nivel sustrato. Al utilizar un electrodo sólido que acepta electrones derivados de reacciones oxidativas y se comporta como un sumidero favorable para reducir el potencial redox, oxidando el H_2 a H^+ . Esto puede fomentar el desequilibrio en la relación $NADH/NAD^+$ y crear gradientes de protones suficientes para la generación de ATP y un posible aumento en los rendimientos de biomasa (Kracke y Krömer, 2014; Schievano 2016; Meng *et al.*, 2016; Chandrasekhar *et al.*, 2021; Choi y Sang, 2016).

Chandrasekhar *et al.* (2021), también observaron al analizar un proceso de electrofermentación con un cultivo mixto que existe simbiosis entre los microorganismos, en la cual un microbio individual promueve el crecimiento del segundo microbio al sintetizar los factores de crecimiento que este necesita. Por ejemplo, un grupo de microorganismos puede hidrolizar el sustrato complejo en sus monómeros, donde otro grupo de microorganismos puede consumir esos monómeros para la formación del producto.

6.3.3 Potencial de hidrógeno (pH):

No se presentaron diferencias entre el tratamiento (0.9 V) y el grupo control en ninguno de las mediciones ($P > 0.05$, $n = 18$).

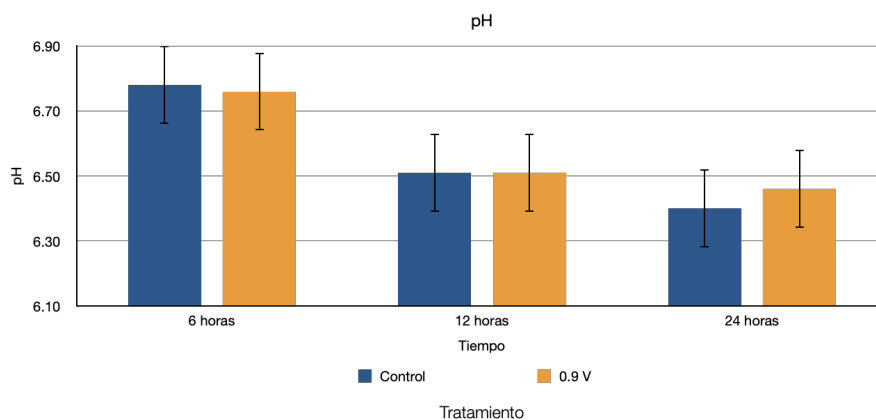


Figura 18. Efecto de la aplicación de potencial eléctrico 0.9 V sobre el pH a las 6, 12 y 24 horas ($P > 0.05$, $n = 18$).

Aunque no se observaron diferencias entre el grupo control y el tratamiento respecto al pH, sí existieron diferencias entre el tiempo a las 6 y a las 24 horas ($P > 0.05$, $n = 18$), siendo que este disminuyó. El descenso en el pH, puede deberse a una acumulación de hidrogeniones dentro del sistema debido a la acumulación de los AGV, ya que estos presentan una constante de disociación (pK_a) baja, cediendo protones al medio y provocando una disminución de pH.

La disminución en el pH no presenta relación con la aplicación del campo eléctrico.

Por otra parte, se ha observado que la EF puede modificar el pH u ORP del medio y con ello el equilibrio redox; lo que puede estimular la elongación o descomposición de la cadena de carbono para mejorar el rendimiento general de biomasa y la producción de un producto específico (Bhagchandani *et al.*, 2020; Moscoviz *et al.*, 2016). Por lo que, se puede suponer que el efecto del campo eléctrico no tiene un efecto directo sobre el pH y que los cambios observados no se deben únicamente a un desequilibrio redox.

6.3.4 Relación NADH/NAD⁺:

Las proporciones de concentración de coenzimas intracelulares (NAD⁺, NADH y relación NADH/NAD⁺) del líquido ruminal cultivado en las dos condiciones (0.9 V y sin voltaje), como se observa en la figura 17.

Se observó que al ser aplicada una corriente (0.9 V) en las primeras 6 horas, la proporción de NAD⁺ fue menor que la del grupo control ($P < 0.01$, $n = 3$), mientras que NADH no pudo ser medible. A las 12 horas se observó que no existieron diferencias entre el grupo control y el tratamiento (0.9V) ($P > 0.01$, $n = 3$) respecto a NAD⁺, aunque se observó un incremento en la concentración de NADH en el tratamiento y una disminución de la relación NADH/NAD⁺ en comparación al grupo control ($P < 0.01$, $n = 3$). A las 24 horas no se observaron diferencias entre tratamiento y grupo control para NAD⁺, NADH, ni relación NADH/NAD⁺ ($P > 0.01$, $n = 3$).

Esto quiere decir que la utilización de electrodos polarizados (0.9 V) afectó el reciclaje de NAD⁺ y NADH dentro de la célula sin consumirse en el proceso. Alterando el proceso de reducción de NAD⁺ las primeras 6 horas y aumentando las reservas de NADH a las 12 horas, con lo que se vio alterada la relación NADH/NAD⁺. Dicha alteración en el equilibrio de la relación NADH/NAD⁺ no es observable a las 24 horas.

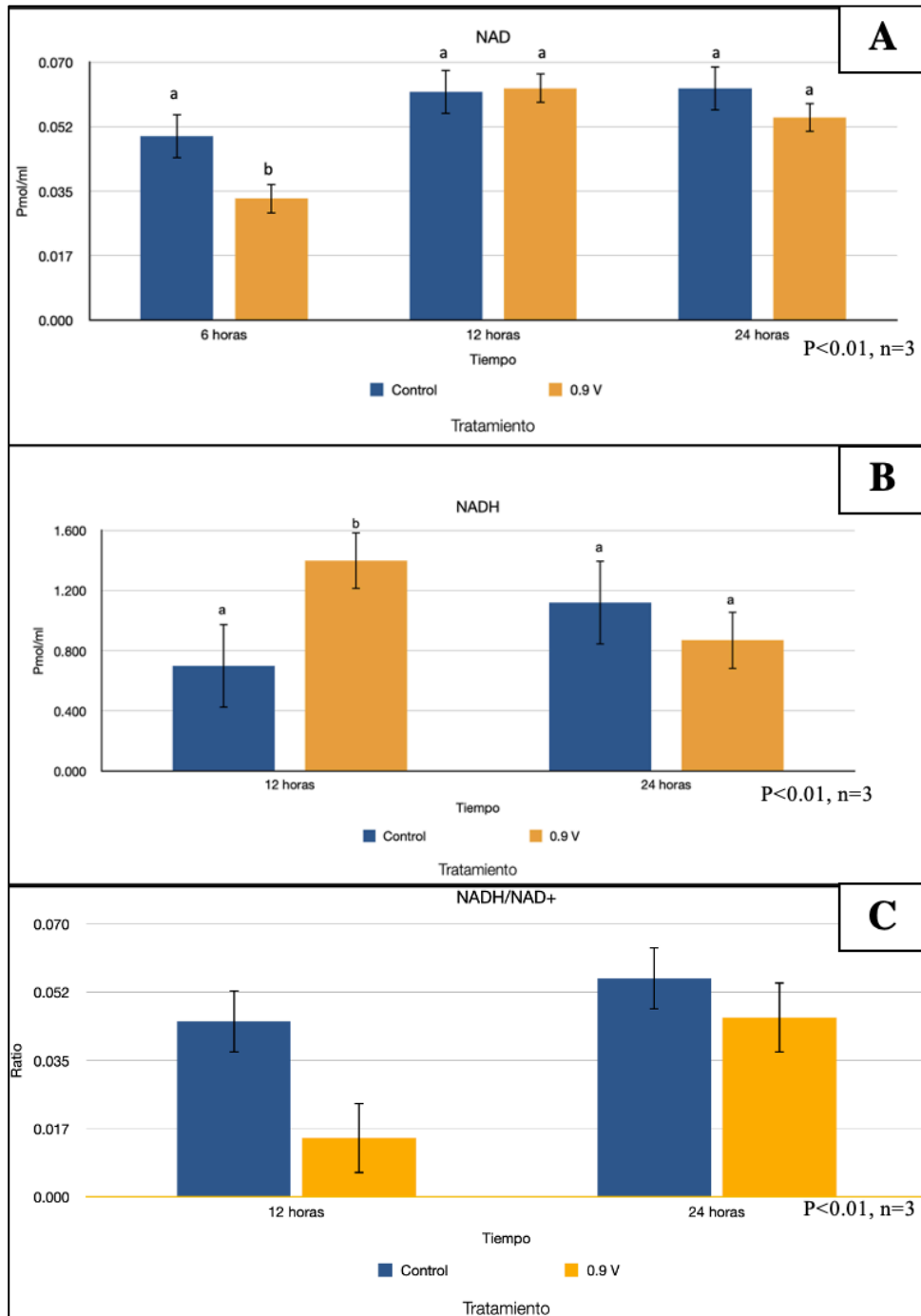


Figura 19. Efecto de la aplicación de potencial eléctrico 0.9 V sobre la relación NADH/NAD⁺ a las 6, 12 y 24 horas. A) NAD⁺, B) NADH, C) ratio NADH/NAD⁺.

Sang *et al.*, (2016), al estudiar las modificaciones del metabolismo bacteriano (*G. sulfurreducens*) por EFA, observaron que la relación NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺ disminuían, mientras que la proporción de ATP/ADP aumentaban.

En cuanto al uso de EFC, se ha observado que existe un incremento en NADH intracelular que, en última instancia, puede traducirse en una mayor formación del producto final reducido, en relación con el producto final oxidado (Hoelzle *et al.*, 2014; Viridis *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2013). También en este tipo de procesos electrofermentativos, al existir un exceso de electrones puede producirse gas hidrógeno, el cual puede afectar indirectamente la relación NADH/NAD⁺ (Mukherjee *et al.*, 2021).

Este desequilibrio en las relaciones de NADH/NAD⁺ tienen un efecto en la regulación de las rutas metabólicas microbianas, afectando también así la regulación celular (Choi *et al.*, 2014; Moscoviz *et al.*, 2016).

Pei *et al.* (2011), descubrieron un conjunto de enzimas reguladoras que son capaces de responder a cambios en la proporción de NADH/NAD⁺ regulando la transcripción de genes que codifican enzimas oxidantes de NADH. Estas enzimas Rex (represor redox) se unen a los operones aguas arriba de los genes que codifican principalmente hidrogenasas y citocromos cuando el ratio NADH/NAD⁺ es bajo, lo que impide la producción de enzimas que oxidan el NADH.

Estos resultados concuerdan con lo observado al analizar la relación NADH/NAD⁺ en el líquido ruminal al utilizar un potencial eléctrico de 0.9 V, en el que se observó que al disminuir el ratio de estas coenzimas, existió un aumento en la concentración de NADH y este desbalance se encuentra relacionado con los resultados obtenidos en biomasa la cuál aumentó, posiblemente debido a un aumento en la proporción de ATP en la célula que puede ser utilizado en sus actividades anabólicas. Así también, estos cambios se correlacionaron los patrones de fermentación dentro de la celda, como se discutirá más adelante en la sección 6.3.5.

6.3.5 Ácidos grasos volátiles (AGVs):

Se realizó un análisis de varianza ANOVA para analizar los cambios en la fermentación entre el grupo control (sin potencial eléctrico) y bajo un potencial eléctrico de 0.9 V (tratamiento). El cuál indicó un incremento en la concentración molar de acetato, y butirato en el líquido ruminal *in vitro*, entre el control y tratamiento a las 24 horas (P<0.05, n=3). Mientras que para el caso de propionato se observó que incremento sucedió a las 12 horas (P<0.05, n=3) (Figura 18).

Al término de la fermentación (24 horas) dentro de las celdas bioelectroquímicas a las cuales se les aplicó un potencial eléctrico de 0.9 V se observó un incremento en la producción de AGVs vs el grupo control, principalmente de acetato (27 %) y butirato (25%) (Cuadro 11).

En el caso del propionato se observó que el incremento se llevó a cabo a las 12 horas (P<0.05, n=3) y este decayó hasta obtener una concentración molar igual a la del grupo control a las 24 horas (P>0.05, n=3).

Cuadro 11. Incremento porcentual de la producción de AGVs al aplicar un potencial eléctrico de 0.9 V a líquido ruminal *in vitro* respecto al grupo control (sin voltaje), al transcurrir 24 horas.

| AGV | Incremento mM | EE | % Incremento | EE |
|------------|---------------|------|--------------|------|
| Acetato | 22 | 6.46 | 26.6 | 10.5 |
| Propionato | 0 | 0.75 | 0 | 9.52 |
| Butirato | 2.3 | 0.58 | 24.41 | 8.72 |

Estos resultados difieren de los obtenidos por Aguilar *et al.* (2022), quien al utilizar una celda bioelectroquímica de bioelectrodos carbonosos con líquido ruminal, observó que la mayor producción de AGVs tanto en las celdas control como en las celdas bioelectroquímicas se llevó a cabo dentro de las primeras seis horas. Además de reportar un mayor incremento porcentual en la producción de AGVs respecto al grupo control, 71 % en la concentración molar de acetato, 86 % en el propionato y 63 % en el butirato. Estas diferencias entre los resultados pueden deberse a las diferencias respecto a la instalación de celda bioelectroquímica entre los dos experimentos, como fueron la separación de las celdas y el material de los electrodos.

Al comparar los resultados obtenidos con la producción promedio esperada de bovinos al ser alimentado con una ración 100% forraje (Mc Donald, 1995), se puede observar que el grupo control se encuentra dentro del rango, mientras que existe un aumento en la producción de AGVs al utilizar un potencial eléctrico de 0.9 V (Cuadro 12).

Cuadro 12. Producción promedio (mM) de acetato, propionato y butirato en líquido ruminal de ganado vacuno alimentado 100% con forraje (Mc Donald, 1995).

| Ración | Acetato | Propionato | Butirato |
|---------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| Forraje 100% | 48 -80 | 15-20 | 7-11 |
| Control | 82.56 +/- 9.13 | 19.56 +/- 0.96 | 9.42 +/- 0.81 |
| 0.9 V | 104.55 +/- 6.46 | 19.20 +/- 0.75 | 11.72 +/- 0.58 |

Otro punto a contemplar es el hecho de que aunque exista una mayor producción de AGVs en el medio ruminal, el pH no se ve afectado debido a que el potencial aumenta de igual manera la síntesis micobiana, teniendo un efecto buffer. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la primera fase experimental con el tratamiento C (cuadro 5) cuyo potencial de celda fue de 0.9V (figura 12).

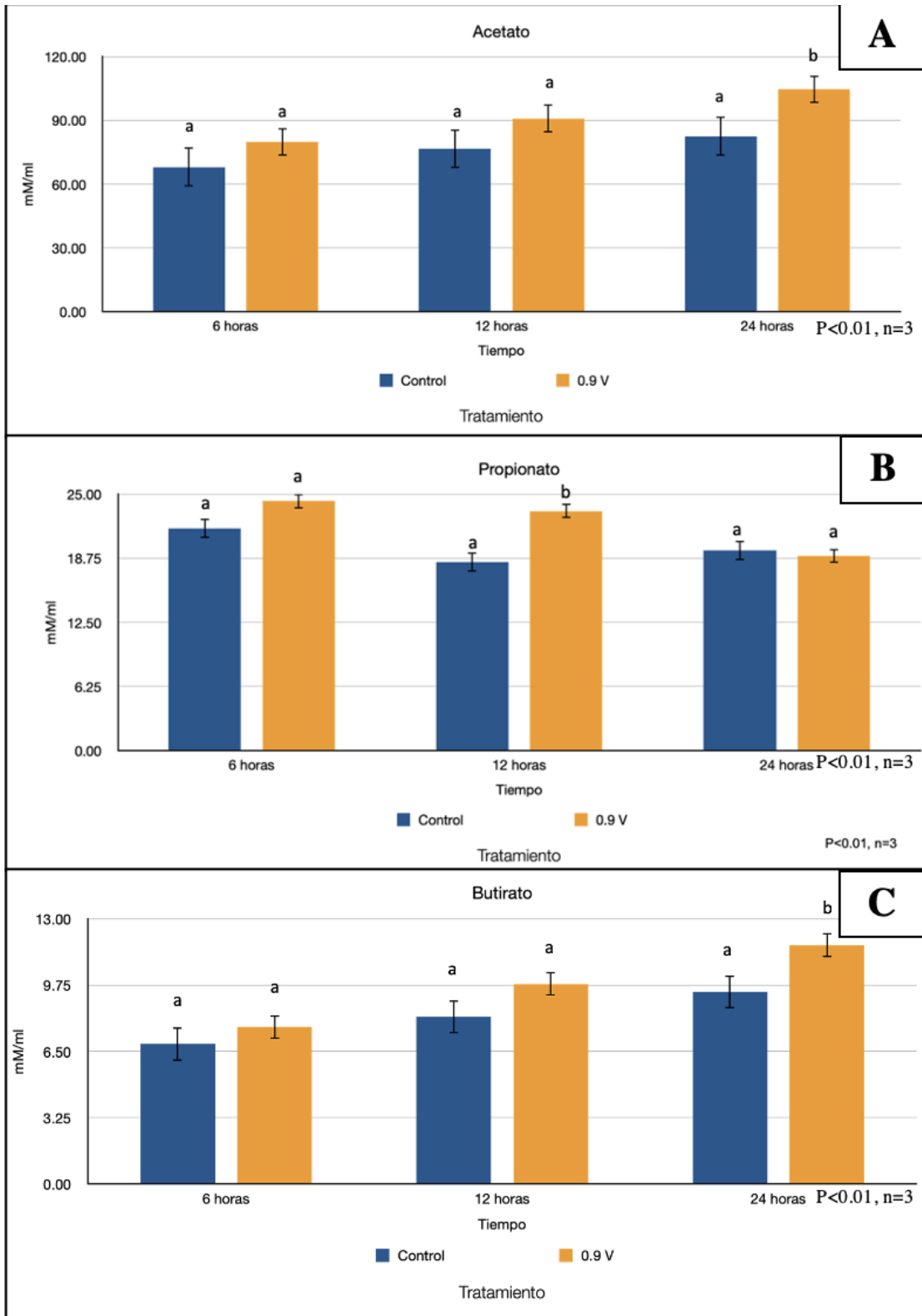


Figura 20. Efecto de la aplicación de potencial eléctrico 0.9 V sobre la producción de AGV a las 6, 12 y 24 horas. A) acetato, B) butirato, C) propionato.

6.3.6 Relación molar AGVs:

Para comparar la relación molar entre los tres principales AGVs, se calcularon los porcentajes de cada uno con respecto a la concentración total, así como su variación respecto al tiempo. La Figura 16 representa el porcentaje de los AGVs en el líquido ruminal tanto en la celda control y en la celda bioelectroquímica a las 6, 12 y 24 horas.

Comprobando que la fermentación se ve influenciada por la corriente eléctrica hacia un aumento en la concentración de los AGVs, la cual mantuvo la misma relación molar entre grupo control y al aplicar 0.9 V a líquido ruminal *in vitro* hasta las 12 horas. Las diferencias fueron observadas ($P < 0.01$, $n=3$) hasta las 24 horas, donde existió un incremento en la relación molar de acetato a expensas del propionato.

Este efecto puede deberse a la acumulación de metabolitos intermediarios en el medio, ya que al no existir remoción de estos, se presenta un efecto negativo en las reacciones metabólicas microbianas y/o incluso podría alterar los flujos de electrones de las principales vías metabólicas (Chandrasekhar *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2019).

Se obtuvieron hallazgos similares de investigaciones anteriores que mostraron que las altas presiones de H_2 o CO_2 favoreció la producción de acetato y butirato, pero detuvo la producción de propionato a partir de los carbohidratos (Arslan *et al.*, 2013).

Dos posibles vías en el sistema anaeróbico para la reutilización de CO_2 y H_2 son conversión acidogénica a acetato por homoacetógenos. Los homoacetógenos pueden convertir autotróficamente CO_2 y H_2 a acetato durante el proceso de acidogénesis (Wan *et al.*, 2016).

En estudios previos con cultivos mixtos, se observó que al emplearse el proceso de electrofermentación las proporciones de propionato y butirato aumentaron con la disminución de lactato al inicio del tratamiento, lo que indica el cambio de fermentación de tipo lactato a fermentación ácida mixta. Por lo general, la formación de lactato se acompaña del consumo de NADH (Bajracharya *et al.*, 2017). Esto coincide con los resultados observados, en los cuales se observa que existe una relación entre la concentración de NADH y la producción de propionato a las 12 horas del tratamiento, para posteriormente disminuir a expensas de un incremento en la producción de acetato.

Los compuestos más reducidos (propionato y butirato) o incluso aquellos con idéntico grado de reducción (lactato) aumentan su producción en los sistemas catódicos (Emde y Schink, 1990). En estos sistemas también se ha observado que gran parte de este carbono se oxida aún más a acetato y butirato para generar más ATP, el cual como se mencionó anteriormente está relacionado con el ratio $NADH/NAD^+$.

Los sistemas de consorcios microbianos, si bien son más fáciles de configurar y operar que los sistemas de cultivos puros tienden a producir predominantemente acetato y butirato. Sin embargo, la correlación entre el potencial aplicado y la distribución redox del producto sigue siendo evidente, con un aumento del acetato y butirato observada dentro del rango potencial de -0.8 a $+0.2$ vs SHE (Jiang *et al.*, 2018; Shanthi Sravan *et al.*, 2018; Villano *et al.*, 2017).

Asimismo, el potencial redox estándar para la reducción de CO_2 a acetato es -0.48 V (frente a Ag/AgCl) a pH 7.0 (Bajracharya *et al.*, 2017), el cual es similar al empleado en la fracción catódica del electrofermentador. Por lo tanto, es razonable plantear la hipótesis de que el sistema no únicamente puede modificar la distribución de los electrones dentro de las vías metabólicas hacia productos reducidos, sino que puede existir la reutilización de los gases de escape acidógenos en el cátodo.



Figura 21. Relación molar entre los tres principales AGVs (acetato, propionato y butirato) en el grupo control y al ser aplicado un potencial eléctrico de 0.9 V en líquido ruminal *in vitro* durante A) 6 horas, B) 12 horas y C) 24 horas.

7. Conclusión:

Las celdas bioelectroquímicas modifican la fermentación *in vitro* de los microorganismos ruminales hacia un incremento en la producción de AGVs, principalmente acetato y butirato, que actúan como fuentes de energía tanto para los rumiantes como para los microorganismos, los cuales pueden utilizarla en sus actividades de crecimiento bacteriano y por lo tanto se refleja en un aumento de la biomasa.

La aplicación de 0.9 V al líquido ruminal mediante celdas bioelectroquímicas tiene un efecto sobre la digestibilidad de la materia seca de modo que hay un mejor aprovechamiento de carbonos, aunque no

queda claro si este efecto se debe al aumento de la biomasa microbiana o al efecto del cátodo sobre la hidrólisis de carbohidratos.

Al observarse cambios en la relación NADH/NAD^+ podemos concluir que el efecto del proceso de electrofermentación se debe principalmente a una manipulación del metabolismo microbiano, alterando las limitaciones termodinámicas propias de un proceso fermentativo en la producción de productos reducidos. Aunque no puede descartarse la posibilidad de que, aunado al cambio metabólico, exista un proceso de indirecto (formación de H_2) o un proceso de electrosíntesis microbiana (conversión de CO_2).

En cuanto al diseño del electrofermentador, se puede concluir que no es necesario la separación del cátodo y el ánodo para incrementar la producción de AGVs. Aunque no se pudo verificar a partir de técnicas electroquímicas el comportamiento de los electrodos de acero inoxidable, puede concluirse que, al observarse resultados replicables, los electrodos fueron estables y que son adecuados para ser utilizados en líquido ruminal.

Sin embargo, aunque este es un acercamiento hacia la comprensión de cómo un electrodo polarizado puede influir en el rendimiento bacteriano, aún se necesitan realizar más estudios moleculares y bioquímicos, para predecir el rendimiento de EF y definir criterios de diseño sólidos con escenarios de aplicabilidad a mayor escala e *in vivo*.

Bibliografía:

1. Aguilar-González, M., Buitrón, G., Shimada-Miyasaka, A., Mora-Izaguirre, O. 2016. State of the art of bioelectrochemical systems: feasibility for enhancing rumen propionate production. *Agrociencia* 50:146-166.
2. Aguilar-González, M., Buitrón, G., Shimada, A., Ayala-Sumuano, J., González-Dávalos, L., Varela-Echavarría, A., & Mora, O. (2022). Study on manipulation of ruminal fermentation using a bioelectrochemical system. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*.
3. Arslan, D., Steinbusch, K.J., Diels, L., De Wever, H., Hamelers, H.V., Buisman, C.J., 2013. Selective carboxylate production by controlling hydrogen, carbon dioxide and substrate concentrations in mixed culture fermentation. *TecBio*
4. Arunasri, K., Yeruva, D. K., Krishna, K. V., & Mohan, S. V. (2020). Monitoring metabolic pathway alterations in *Escherichia coli* due to applied potentials in microbial electrochemical system. *Bioelectrochemistry*, 134, 107530.
5. Babauta, J., Renslow, R., Lewandowski, Z., & Beyenal, H. (2012). Electrochemically active biofilms: facts and fiction. A review. *Biofouling*, 28(8), 789-812
6. Bajracharya, S., Krige, A., Matsakas, L., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2022). Advances in cathode designs and reactor configurations of microbial electrosynthesis systems to facilitate gas electro-fermentation. *Bioresource Technology*, 127178.
7. Baldwin, R. L. 1984. Digestion and metabolism of ruminants. *BioScience*. 34:244-249.
8. Bhagchandani, D. D., Babu, R. P., Sonawane, J. M., Khanna, N., Pandit, S., Jadhav, D. A., & Prasad, R. (2020). A comprehensive understanding of electro-fermentation. *Fermentation*, 6(3), 92.
9. Bond, D. R., and D. R. Lovley. 2003. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1548-1555.
10. Bretschger, O., Osterstock, J. B., Pinchak, W. E., Ishii, S. I., & Nelson, K. E. (2010). Microbial fuel cells and microbial ecology: applications in ruminant health and production research. *Microbial ecology*, 59(3), 415-427.
11. Castillo-González, A. R., Burrola-Barraza, M. E., Domínguez-Viveros, J., & Chávez-Martínez, A. (2014). Rumen microorganisms and fermentation. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(3), 349-361.
12. Cercado, B., Felipe Chazaro-Ruiz, L., Ruiz, V., de Jesus Lopez-Prieto, I., Buitron, G., & Razo-Flores, E. (2013). Biotic and abiotic characterization of bioanodes formed on oxidized carbon electrodes as a basis to predict their performance. *Biosensors & Bioelectronics*, 50, 373-381. doi:10.1016/j.bios.2013.06.051
13. Chandrasekhar, K., Kumar, A. N., Kumar, G., Kim, D. H., Song, Y. C., & Kim, S. H. (2021). Electro-fermentation for biofuels and biochemicals production: Current status and future directions. *Bioresource technology*, 323, 124598.
14. Chen, H., Dong, F., & Minter, S. D. (2020). The progress and outlook of bioelectrocatalysis for the production of chemicals, fuels and materials. *Nature Catalysis*, 3(3), 225-244.
15. Contreras, P., & Noro, M. (2010). Rumen: morfofisiología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa. *Facultad deficiencias agropecuarias, Universidad austral de Chile. Valdivia. Chile*.
16. Choi, O., Um, Y., & Sang, B. I. (2012). Butyrate production enhancement by *Clostridium tyrobutyricum* using electron mediators and a cathodic electron donor. *Biotechnology and bioengineering*, 109(10), 2494-2502.

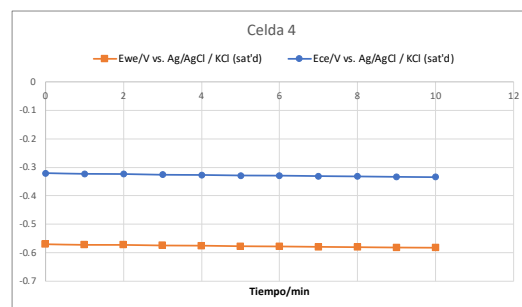
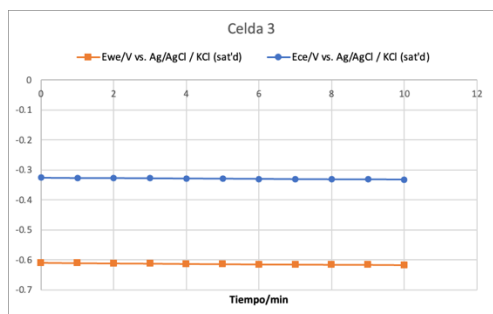
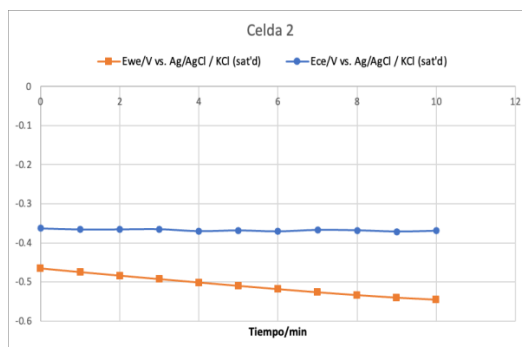
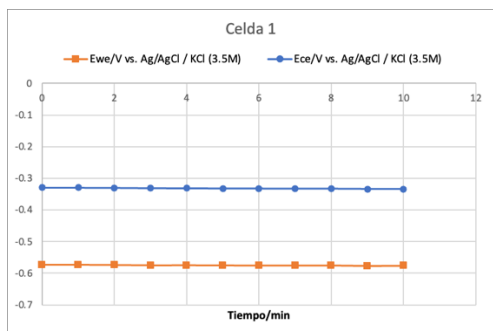
17. Choi, O., Kim, T., Woo, H. M., & Um, Y. (2014). Electricity-driven metabolic shift through direct electron uptake by electroactive heterotroph *Clostridium pasteurianum*. *Scientific reports*, 4(1), 1-10.
18. Chung, T. H., & Dhar, B. R. (2021). An Overview of Electro-Fermentation as a Platform for Future Biorefineries. *Sustainable Solutions for Environmental Pollution: Waste Management and Value-Added Products*, 1, 1-40.
19. Emde, R., & Schink, B. (1990). Enhanced propionate formation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* in a three-electrode amperometric culture system. *Applied and environmental microbiology*, 56(9), 2771-2776.
20. Emde, R., Swain, A., & Schink, B. (1989). Anaerobic oxidation of glycerol by *Escherichia coli* in an amperometric poised-potential culture system. *Applied microbiology and biotechnology*, 32(2), 170-175.
21. Förster, A. H., Beblawy, S., Golitsch, F., & Gescher, J. (2017). Electrode-assisted acetoin production in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 1-11
22. Flynn, J. M., Ross, D. E., Hunt, K. A., Bond, D. R., & Gralnick, J. A. (2010). Enabling unbalanced fermentations by using engineered electrode-interfaced bacteria. *MBio*, 1(5), e00190-10.
23. Gong, Z., Yu, H., Zhang, J., Li, F., & Song, H. (2020). Microbial electro-fermentation for synthesis of chemicals and biofuels driven by bi-directional extracellular electron transfer. *Synthetic and systems biotechnology*, 5(4), 304-313.
24. González-Cabaleiro, R., Lema, J. M., & Rodríguez, J. (2015). Metabolic energy-based modelling explains product yielding in anaerobic mixed culture fermentations. *Plos one*, 10(5), e0126739
25. Hammonds, R. (2013). Bioelectrochemical reduction of carbon dioxide to acetate using a microbial consortium derived from the cow rumen.
26. Hegarty, R. S., & Gerdes, R. (1999). Hydrogen production and transfer in the rumen. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*, 12, 37-44.
27. Hernandez-Garcia, K. M., Cercado, B., Rodriguez, F. A., Rivera, F. F., & Rivero, E. P. (2020). Modeling 3D current and potential distribution in a microbial electrolysis cell with augmented anode surface and non-ideal flow pattern. *Biochemical Engineering Journal*, 162. doi:10.1016/j.bej.2020.107714
28. Hoelzle, R. D., Viridis, B., & Batstone, D. J. (2014). Regulation mechanisms in mixed and pure culture microbial fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 111(11), 2139-2154.
29. Hungate, R. E. 1967. Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation. *Arch. Microbiol.* 59:158-164.
30. Hungate, R. E. 1966. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press, London and New York.
31. Jin, Q., & Bethke, C. M. (2007). The thermodynamics and kinetics of microbial metabolism. *American Journal of Science*, 307(4), 643-677.
32. Kracke, F., and Krömer, J. O. (2014). Identifying target processes for microbial electrosynthesis by elementary mode analysis. *BMC Bioinformatics* 15:6590. doi: 10.1186/s12859-014-0410-2
33. Kracke, F., Vassilev, I., & Krömer, J. O. (2015). Microbial electron transport and energy conservation—the foundation for optimizing bioelectrochemical systems. *Frontiers in microbiology*, 6, 575
34. Kumar, A., Hsu, L. H.-H., Kavanagh, P., Barrière, F., Lens, P. N. L., Lapinsonnière, L., ... Leech, D. (2017). *The ins and outs of microorganism–electrode electron transfer reactions*. *Nature Reviews Chemistry*, 1(3). doi:10.1038/s41570-017-0024
35. Logan, B. E. 2008. *Microbial fuel cells*. John Wiley and Sons Inc., Hoboken, N.J.
36. Lovley, D. R. (2021). Electrotrophy: Other Microbial Species, Iron, and Electrodes as Electron Donors for Microbial Respirations. *Bioresource Technology*, 126553.

37. McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh, J., Morgan, C. 1995. *Nutricion Animal*. (5th ed). Acribia. Zaragoza, Esp
38. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2008). Brock biology of microorganisms 12th edn. *Int. Microbiol*, 11, 65-73.
39. Meng, J., Xu, Z., Guo, J., Yue, Y., & Sun, X. (2013). Analysis of enhanced current-generating mechanism of *Geobacter sulfurreducens* strain via model-driven metabolism simulation. *PLoS One*, 8(9), e73907.
40. Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trabaly, E., & Bernet, N. (2016). *Electro-Fermentation: How To Drive Fermentation Using Electrochemical Systems*. *Trends in Biotechnology*, 34(11), 856865. doi:10.1016/j.tibtech.2016.04.009
41. Mukherjee, T., & Mohan, S. V. (2021). Metabolic flux of *Bacillus subtilis* under poised potential in electrofermentation system: Gene expression vs product formation. *Bioresource Technology*, 342, 125854.
42. Owens, F. N., & Basalan, M. (2016). Ruminant fermentation. In *Rumenology* (pp. 63-102). Springer, Cham.
43. Ozkose, E., B. J. Thomas, D. R. Davies, G. W. Griffith, and M. K. Theodorou. 2001. *Cyllamyces aberensis* gen.nov. sp. nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. *Can. J. Bot.* 79:666-673.
44. Pechin, G. H. (1999). Metabolismo ruminal de los hidratos de carbono y los lípidos. *ANUARIO de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad nacional de la Pampa. Provincia de la Pampa, Republica de Argentina*.
45. Pei, J., Zhou, Q., Jing, Q., Li, L., Dai, C., Li, H., ... & Shao, W. (2011). The mechanism for regulating ethanol fermentation by redox levels in *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Metabolic engineering*, 13(2), 186-193.
46. Ramírez, J. F., Posada Ochoa, S., & Noguera, R. (2014). Ruminant methanogenesis and mitigation strategies. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 9(2), 307-323.
47. Relling A, G Mattioli. 2003. *Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.
48. Rismani-Yazdi, H., Christy, A. D., Dehority, B. A., Morrison, M., Yu, Z., & Tuovinen, O. H. (2007). Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells. *Biotechnology and bioengineering*, 97(6), 1398-1407.
49. Sauvant, D., Meschy, F., & Mertens, D. (1999). Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogenes des rations. *Productions Animales* 12.1 (1999): 49-60.
50. Schievano, A., Sciarria, T. P., Vanbroekhoven, K., De Wever, H., Puig, S., Andersen, S. J., ... & Pant, D. (2016). Electro-fermentation—merging electrochemistry with fermentation in industrial applications. *Trends in biotechnology*, 34(11), 866-878
51. Schuppert, B., Schink, B., & Trösch, W. (1992). Batch and continuous production of propionic acid from whey permeate by *Propionibacterium acidipropionici* in a three-electrode amperometric culture system. *Applied microbiology and biotechnology*, 37(5), 549-553.
52. Shimada Miyasaka, A. (2009). *Nutrición animal*. Trillas
53. Sasaki, K., Tsuge, Y., Sasaki, D., & Kondo, A. (2014). Increase in lactate yield by growing *Corynebacterium glutamicum* in a bioelectrochemical reactor. *Journal of bioscience and bioengineering*, 117(5), 598-601.
54. Seshadri, R., Leahy, S. C., Attwood, G. T., Teh, K. H., Lambie, S. C., Cookson, A. L., ... & Kelly, W. J. (2018). Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 Collection. *Nature biotechnology*, 36(4), 359-367.
55. Shanthi Sravan, J., Butti, S.K., Sarkar, O., Vamshi Krishna, K., Venkata Mohan, S., 2018. Electrofermentation of food waste – Regulating acidogenesis towards enhanced volatile fatty acids production. *Chem. Eng. J.* 334, 1709–1718.

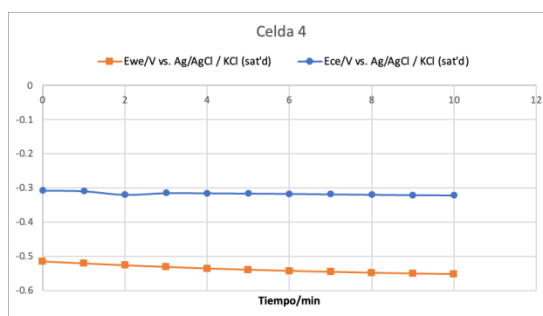
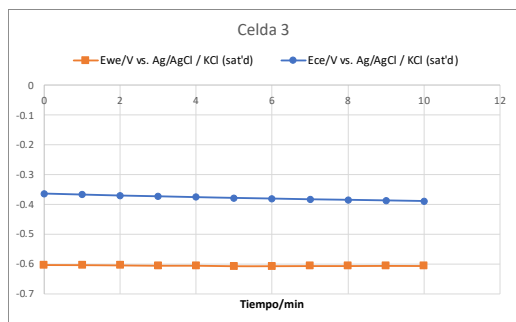
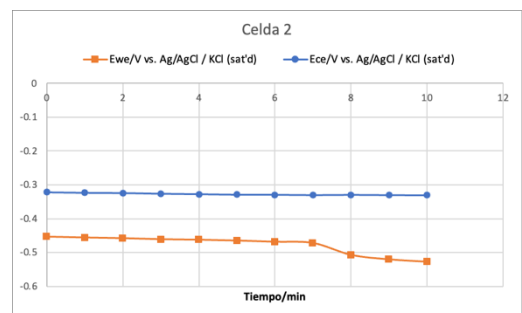
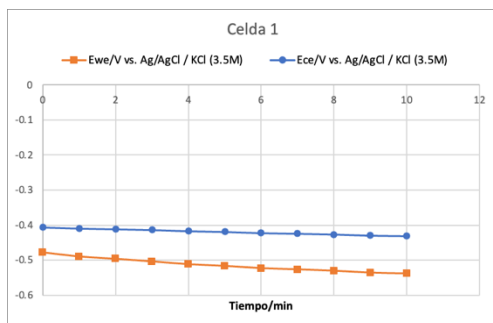
56. Song, J., Sasaki, D., Sasaki, K., Kato, S., Kondo, A., Hashimoto, K., & Nakanishi, S. (2016). Comprehensive metabolomic analyses of anode-respiring *Geobacter sulfurreducens* cells: the impact of anode-respiration activity on intracellular metabolite levels. *Process Biochemistry*, *51*(1), 34-38.
57. Sturm-Richter, K., Golitsch, F., Sturm, G., Kipf, E., Dittrich, A., Beblawy, S., ... & Gescher, J. (2015). Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells. *Bioresource technology*, *186*, 89-96.
58. Toledo-Alarcon, J., Fuentes, L., Etchebehere, C., Bernet, N., & Trably, E. (2021). Glucose electro-fermentation with mixed cultures: A key role of the Clostridiaceae family. *International Journal of Hydrogen Energy*, *46*(2), 1694-1704.
59. Van Lingen, H. J., Plugge, C. M., Fadel, J. G., Kebreab, E., Bannink, A., & Dijkstra, J. (2016). Thermodynamic driving force of hydrogen on rumen microbial metabolism: a theoretical investigation. *PloS one*, *11*(10), e0161362.
60. Van Lingen, H. J., Fadel, J. G., Moraes, L. E., Bannink, A., & Dijkstra, J. (2019). Bayesian mechanistic modeling of thermodynamically controlled volatile fatty acid, hydrogen and methane production in the bovine rumen. *Journal of theoretical biology*, *480*, 150-165.
61. Varela, G., and G. Gomez. "Temas de bacteriología y virología médica." *Fisiología y Metabolismo Bacteriano. Uruguay* (2008).
62. Vassilev, I., Aversch, N. J., Ledezma, P., & Kokko, M. (2021). Anodic electro-fermentation: Empowering anaerobic production processes via anodic respiration. *Biotechnology Advances*, *48*, 107728.
63. Villano, M., Aulenta, F., Ciucci, C., Ferri, T., Giuliano, A., Majone, M., 2010. Bioelectrochemical reduction of CO₂ to CH₄ via direct and indirect extracellular electron transfer by a hydrogenophilic methanogenic culture. *Bioresour. Technol.* *101*, 3085–3090
64. Viridis, B., Hoelzle, R., Marchetti, A., Boto, S. T., Rosenbaum, M. A., Blasco-Gómez, R., ... & Villano, M. (2022). Electro-fermentation: Sustainable bioproductions steered by electricity. *Biotechnology Advances*, 107950.
65. Wang, Z., Hong, Q., Shu, M., Chen, Y., Dong, L., & Ming, Y. (2014). Rumen bacteria convert cellulose into electricity in two-chamber microbial fuel cell. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, *6*(4), 727-732.
66. Yu, Y. Y., Zhai, D. D., Si, R. W., Sun, J. Z., Liu, X., & Yong, Y. C. (2017). Three-dimensional electrodes for high-performance bioelectrochemical systems. *International journal of molecular sciences*, *18*(1), 90.
67. Zhou, M., Yan, B., Lang, Q., & Zhang, Y. (2019). Elevated volatile fatty acids production through reuse of acidogenic off-gases during electro-fermentation. *Science of the total environment*, *668*, 295-302.

Anexo 1. Gráficas obtenidas por OCV inicial durante la exploración de diferente potenciales de electrodo sobre la producción de AGVs

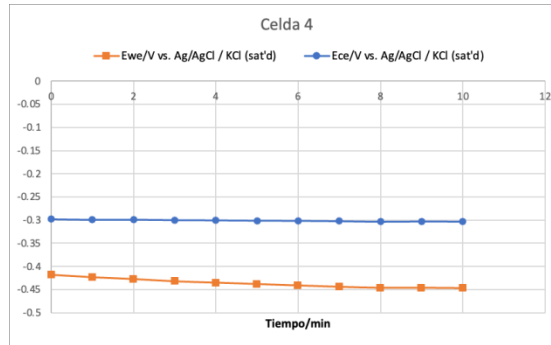
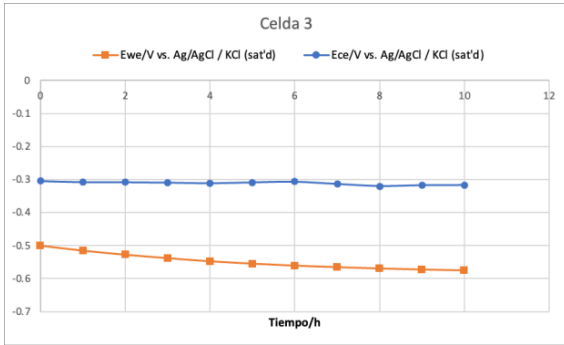
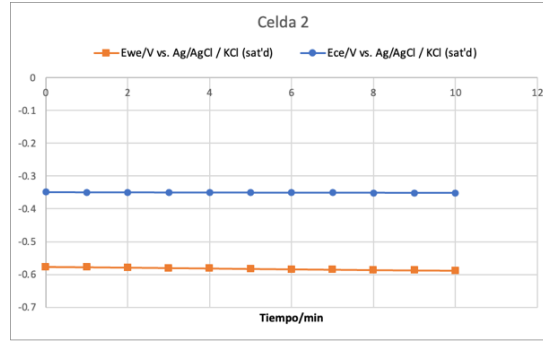
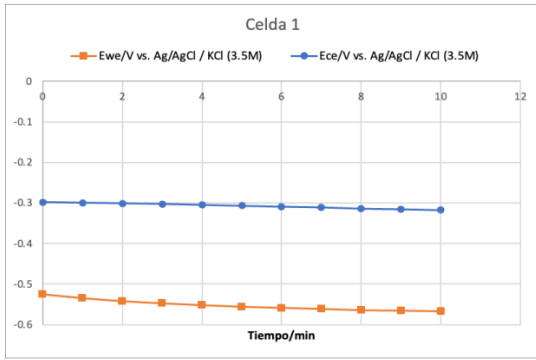
Tratamiento A



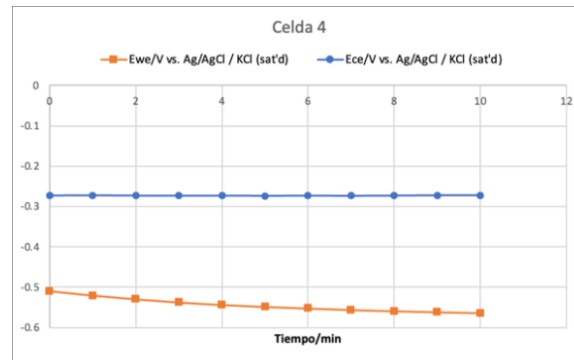
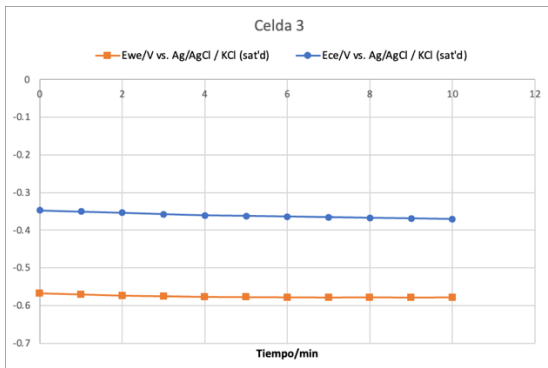
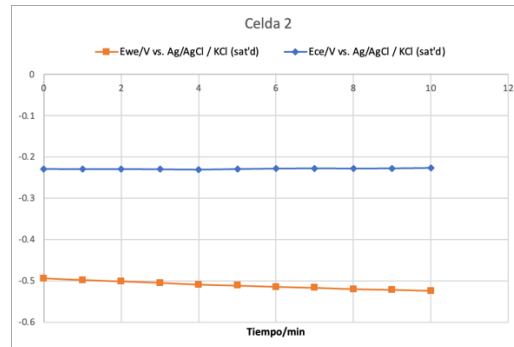
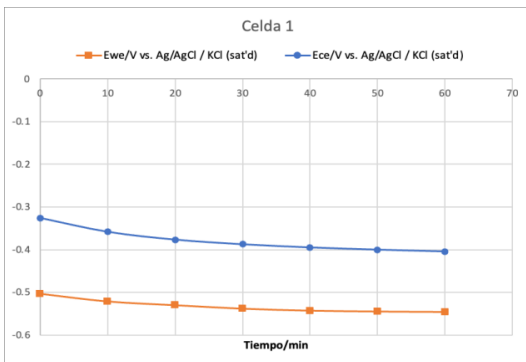
Tratamiento B



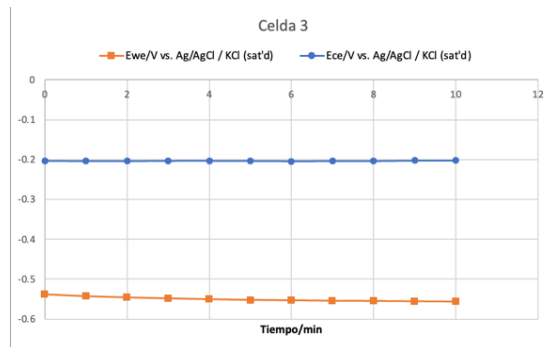
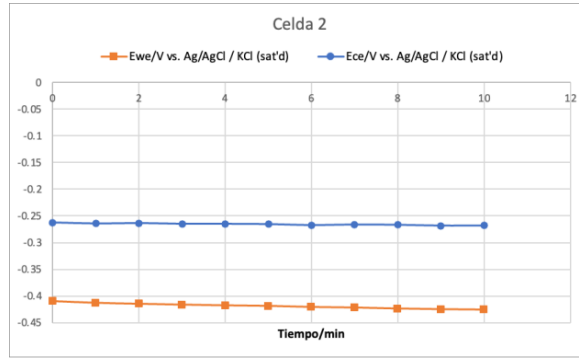
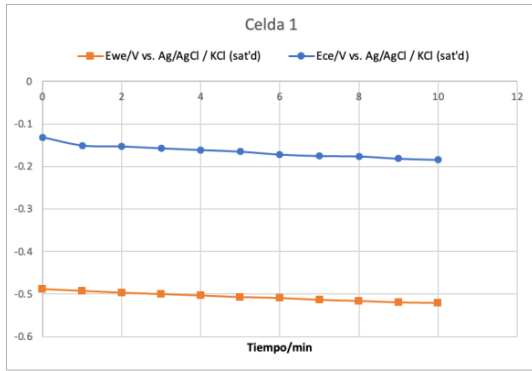
Tratamiento C



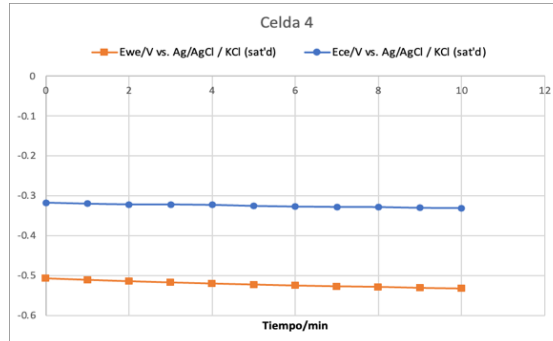
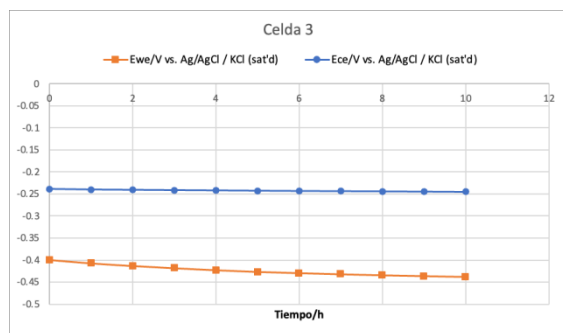
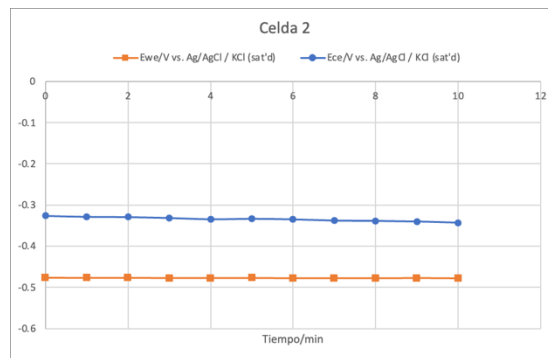
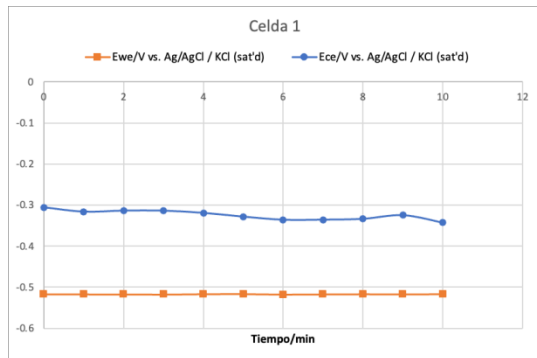
Tratamiento E/F



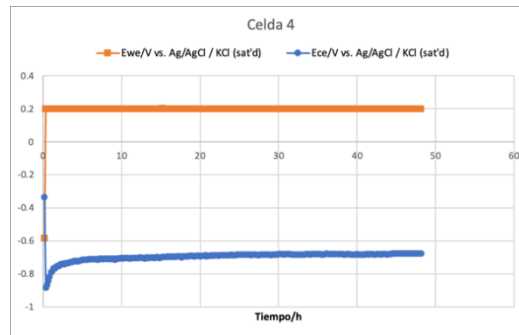
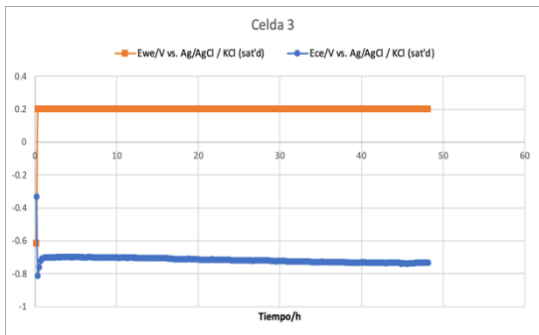
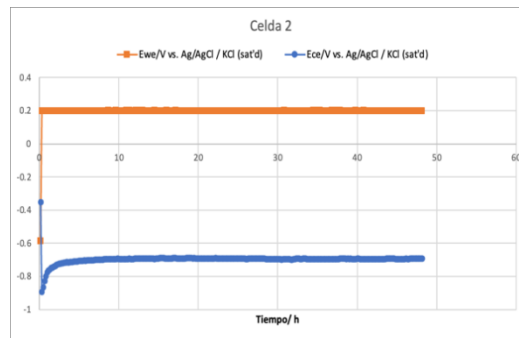
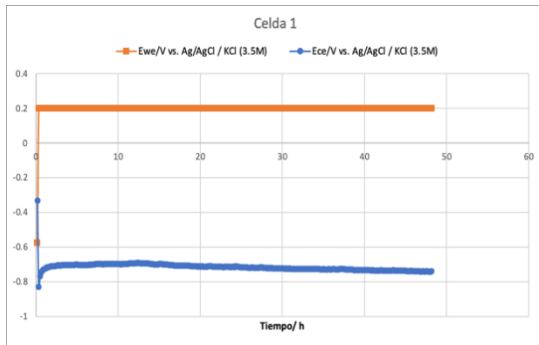
Tratamiento G/H



Tratamiento I/J

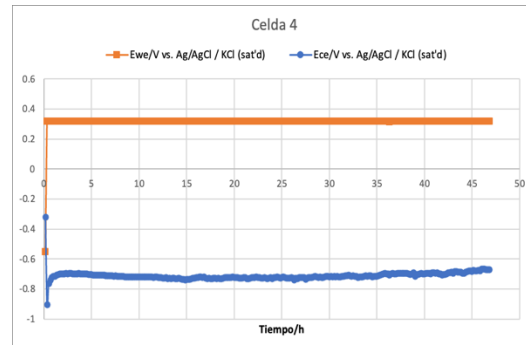
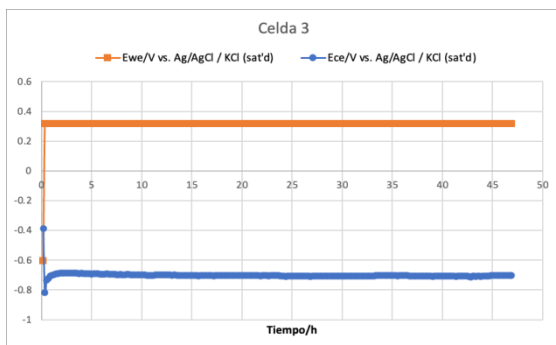
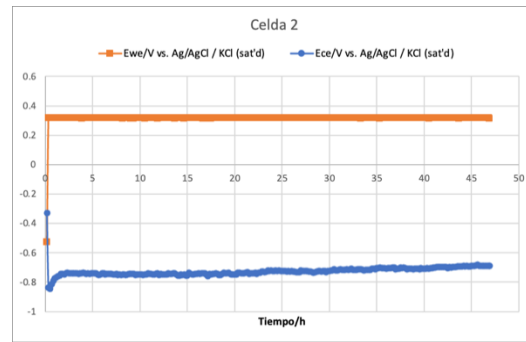
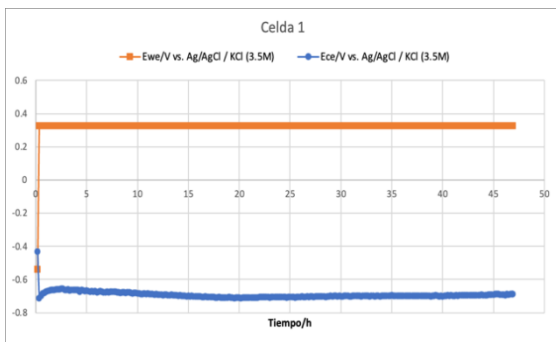


Tratamiento K/L

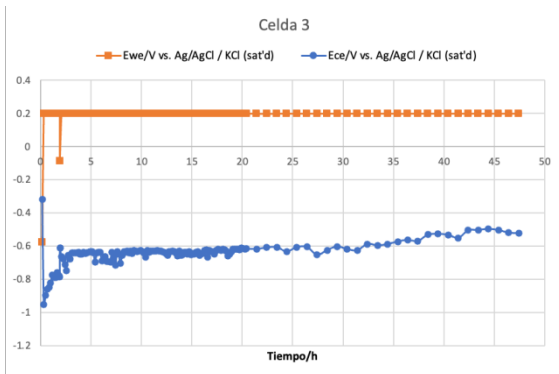
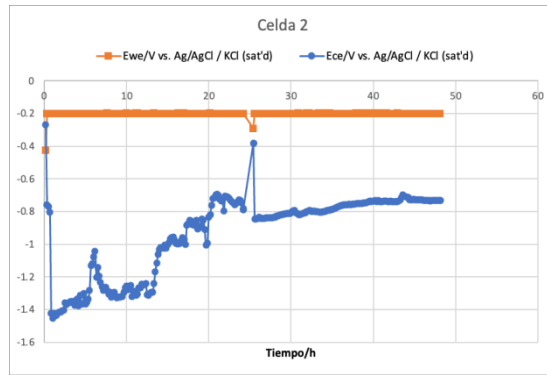
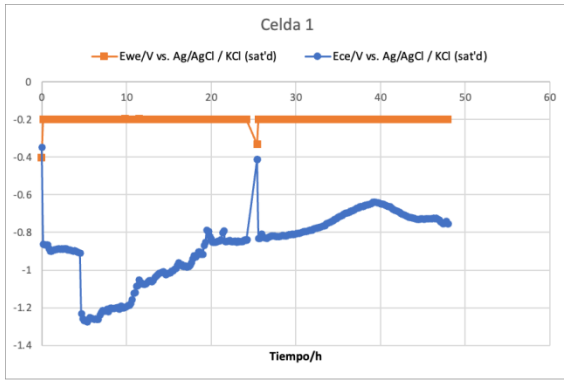


Anexo 2. Gráficas obtenidas por CA durante la exploración de diferentes potenciales de electrodo sobre la producción de AGVs.

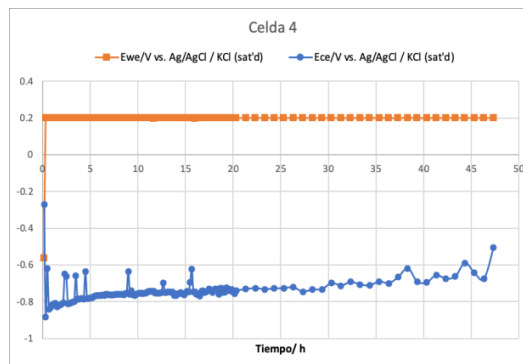
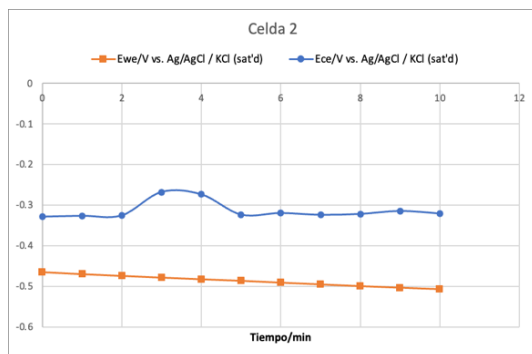
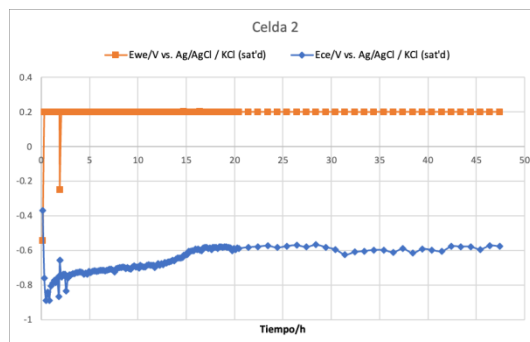
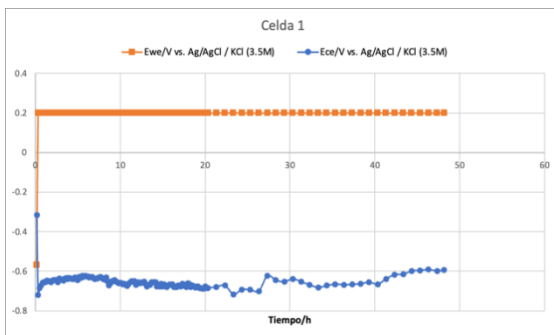
Tratamiento A



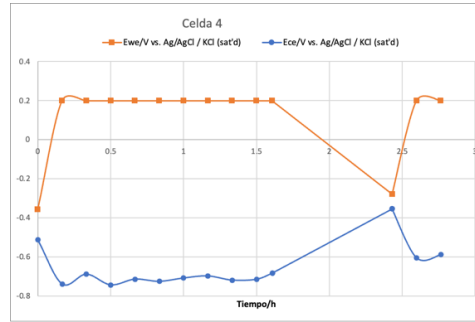
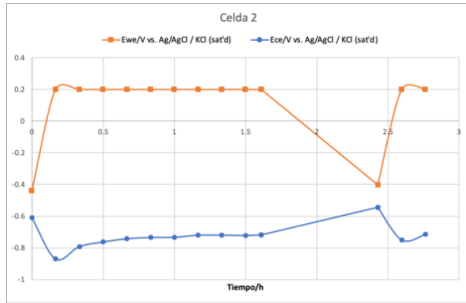
Tratamiento B



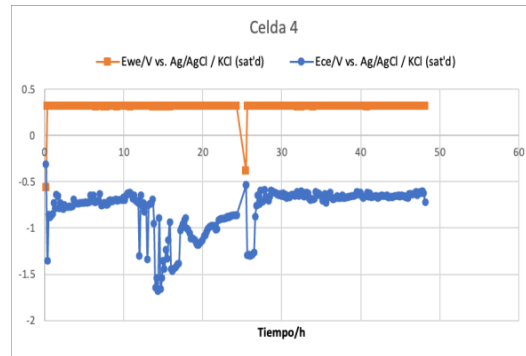
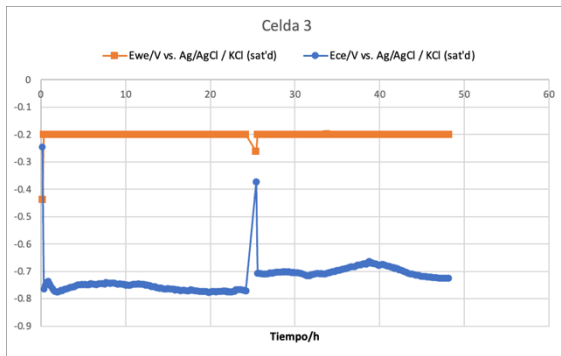
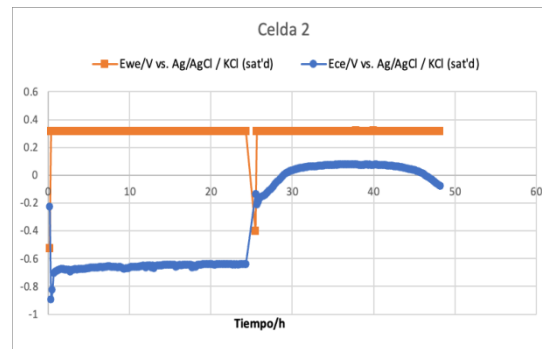
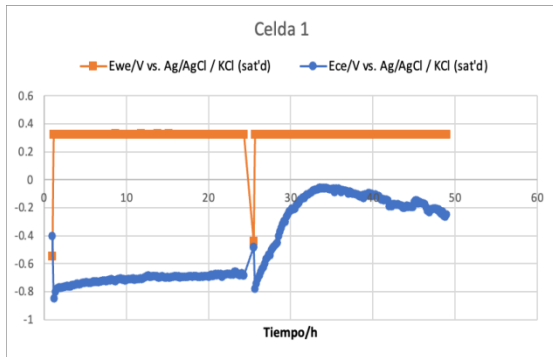
Tratamiento C



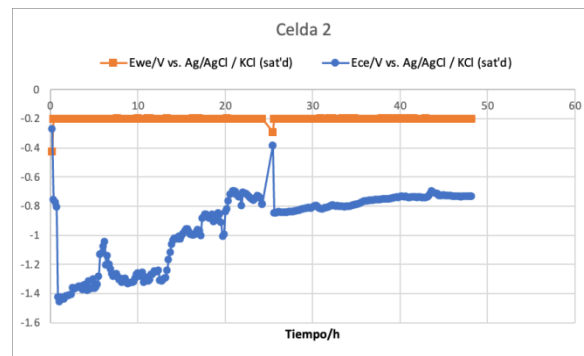
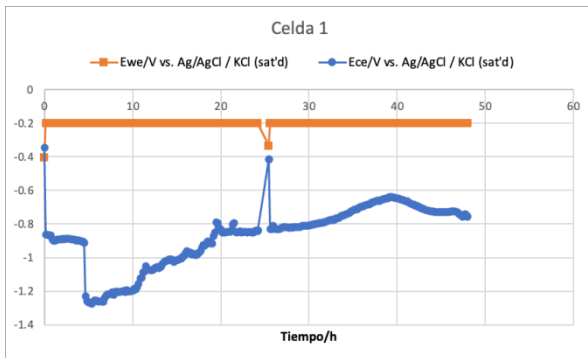
Tratamiento D

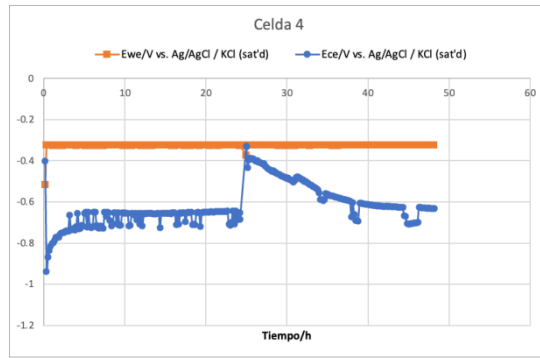
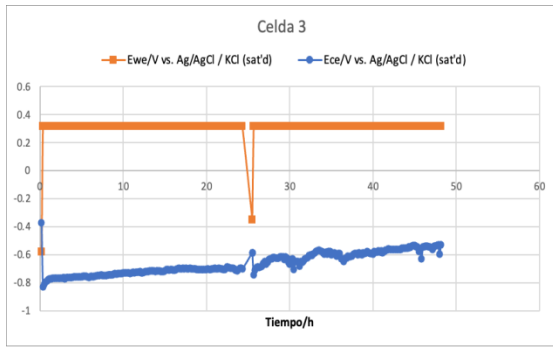


Tratamiento E/F

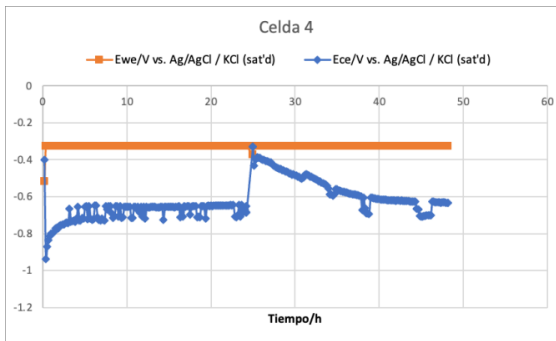
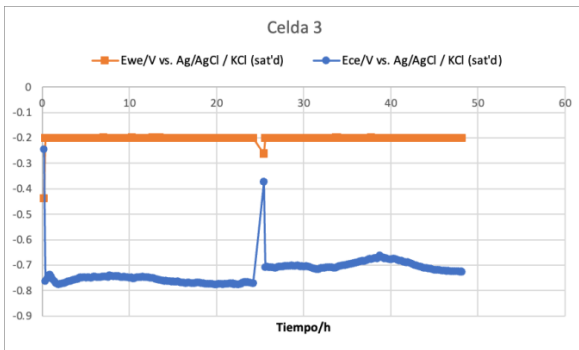
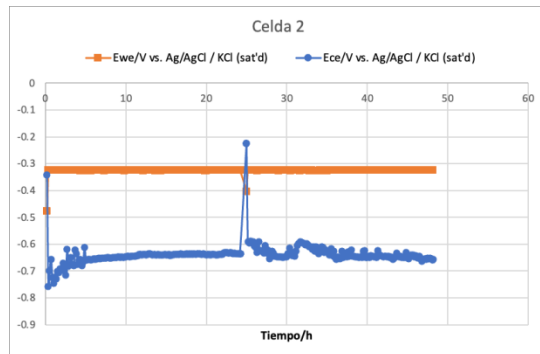
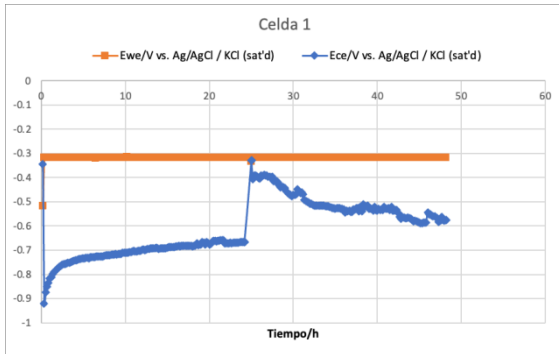


Tratamiento G/H

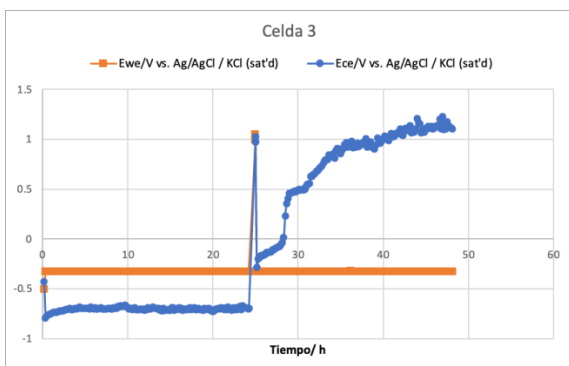




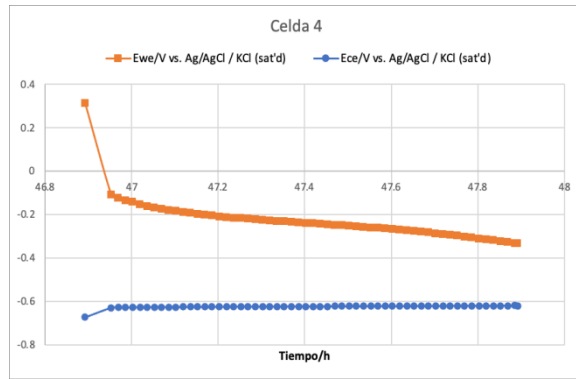
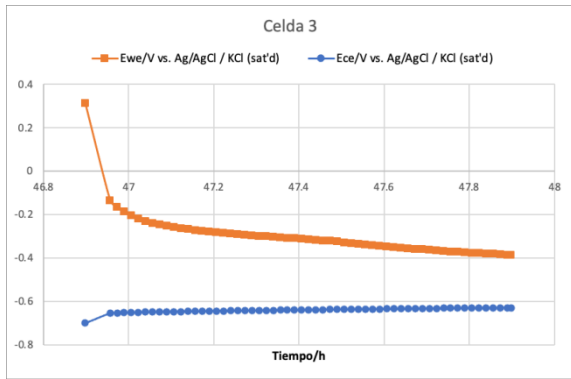
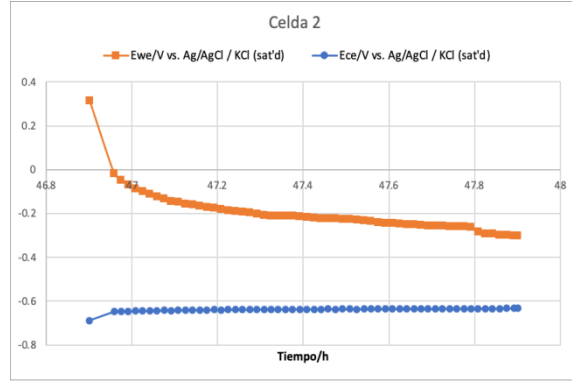
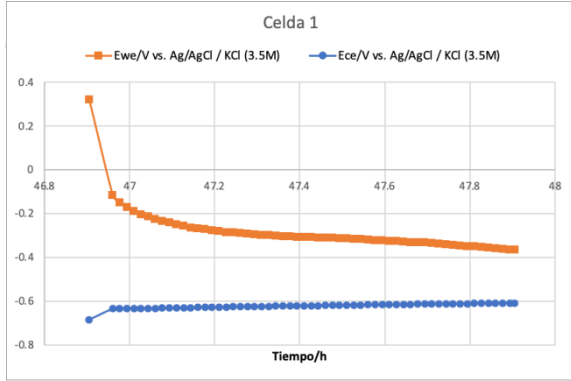
Tratamiento I/J



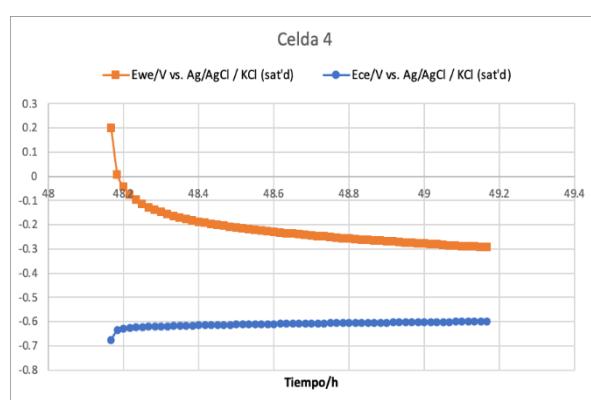
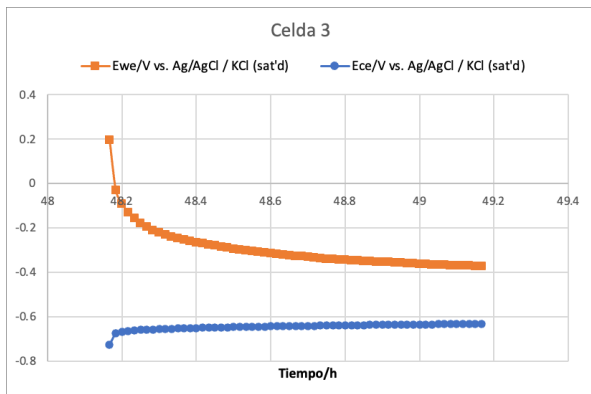
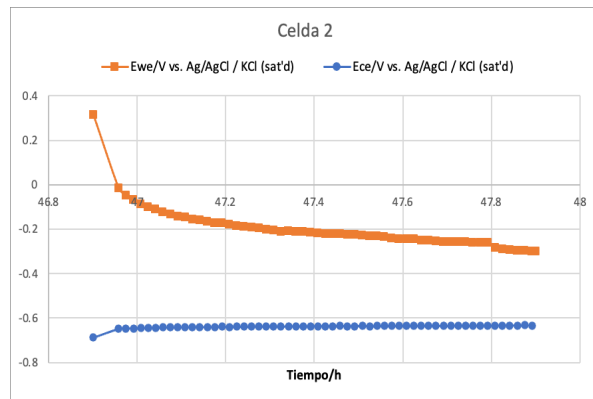
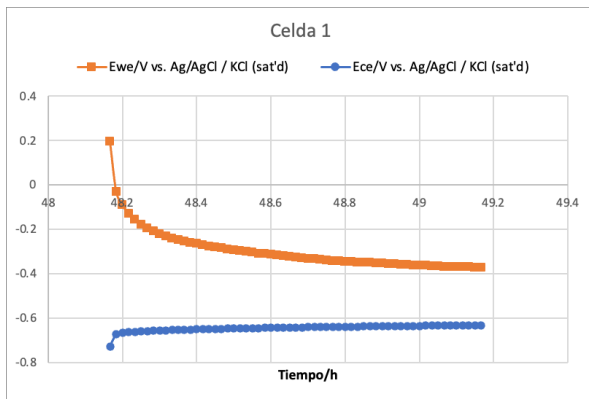
Tratamiento K/L



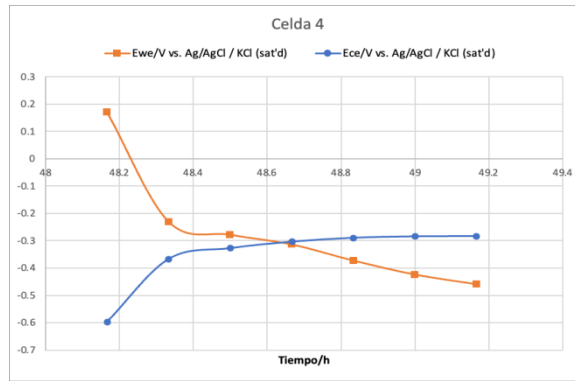
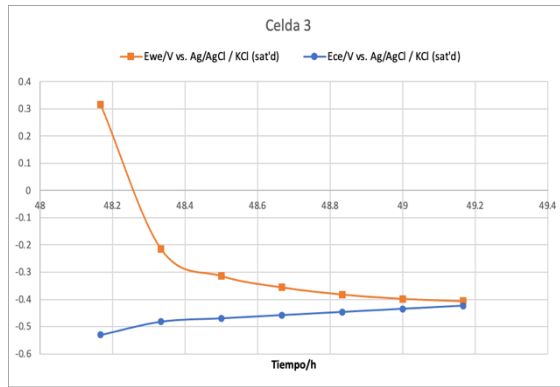
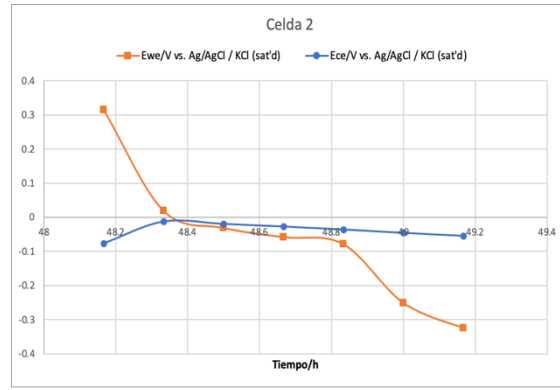
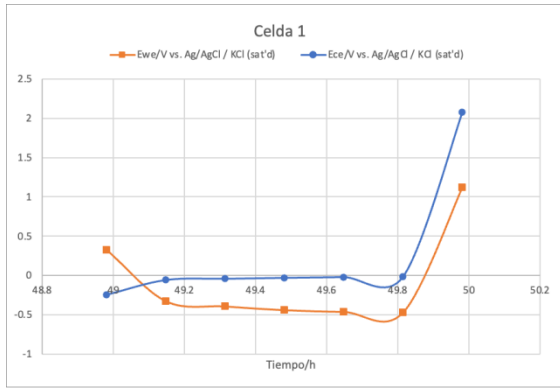
Anexo 3. Gráficas obtenidas por OCV final durante la exploración de diferente potenciales de electrodo sobre la producción de AGVs.



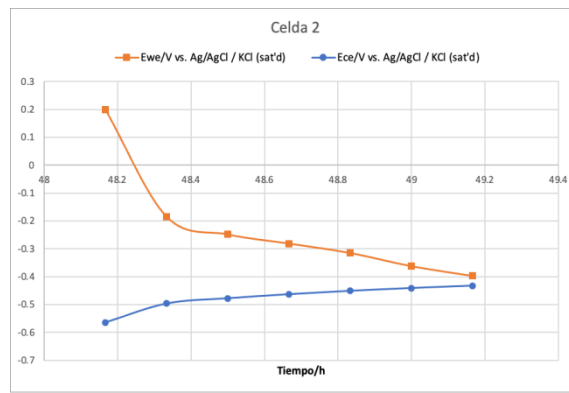
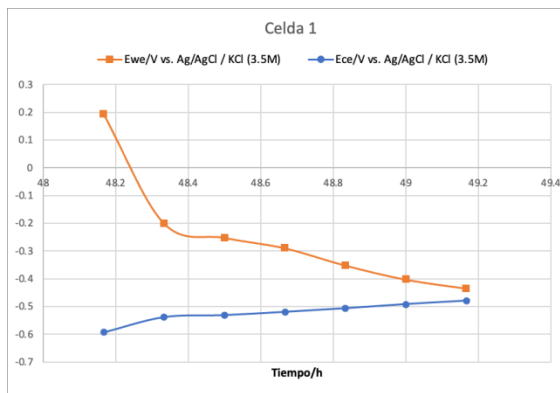
Tratamiento B



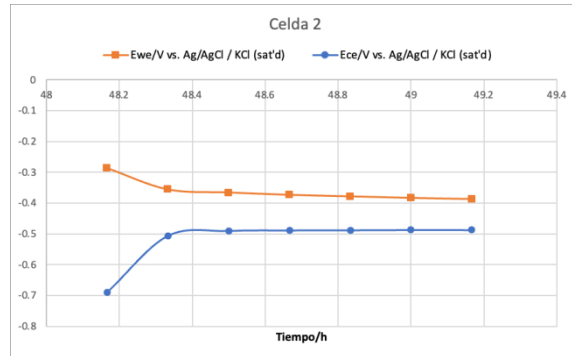
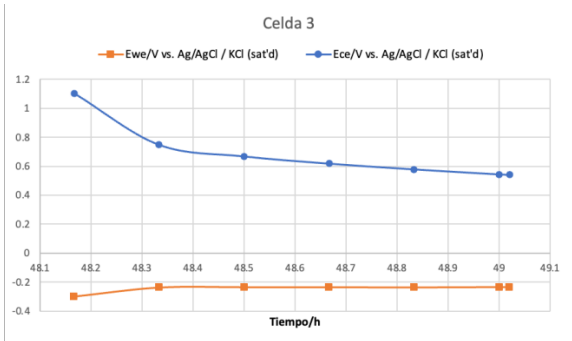
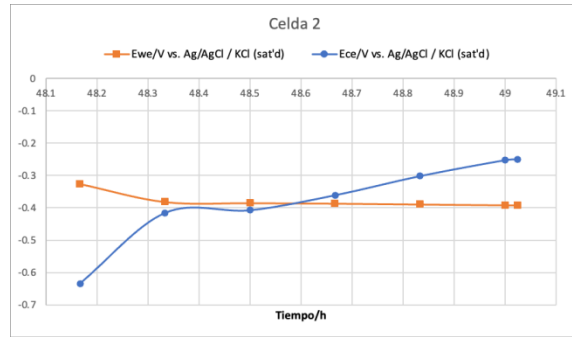
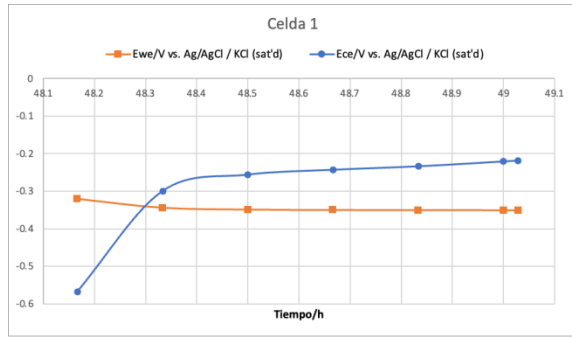
Tratamiento C



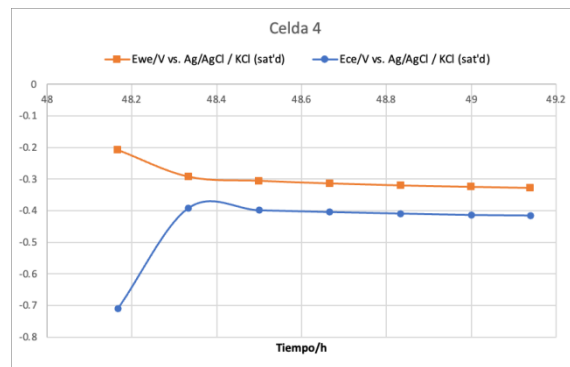
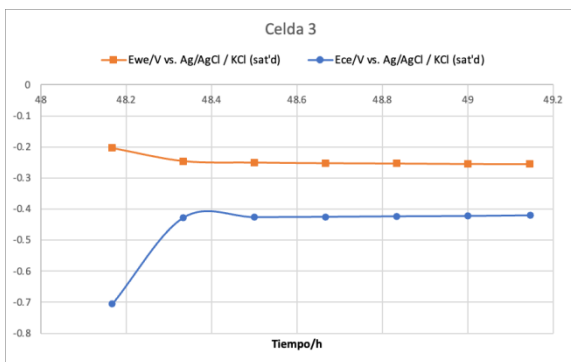
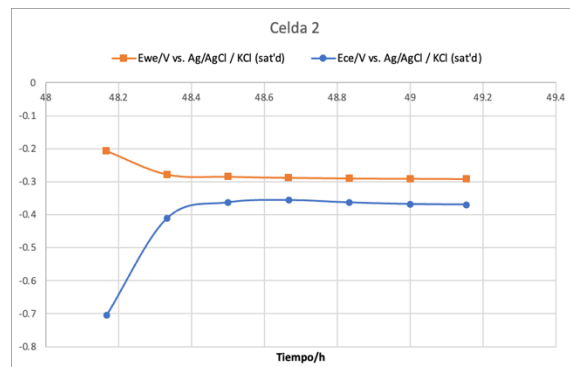
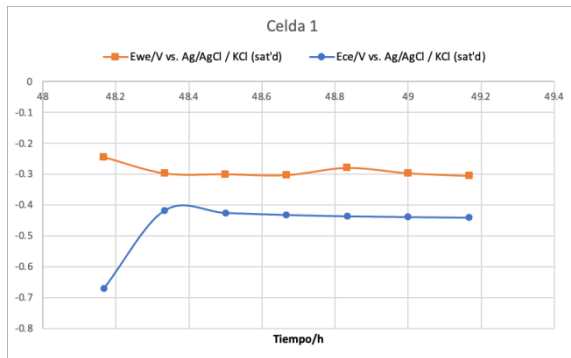
Tratamiento E/F



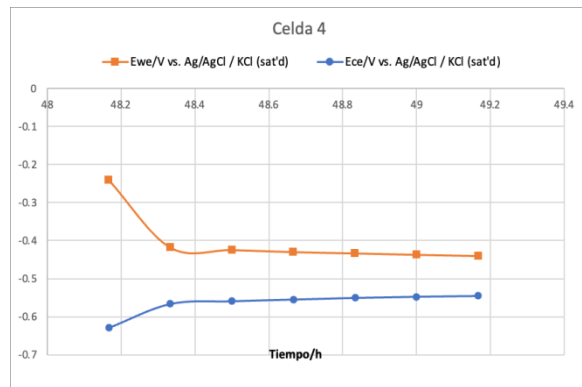
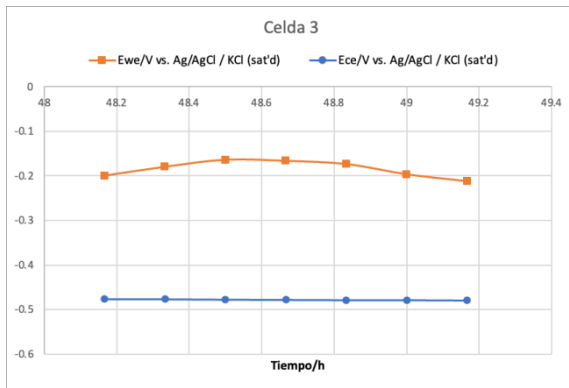
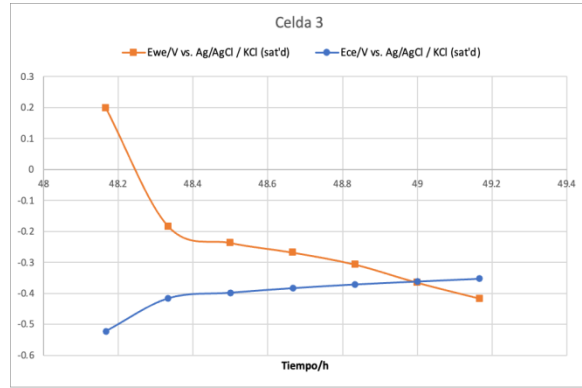
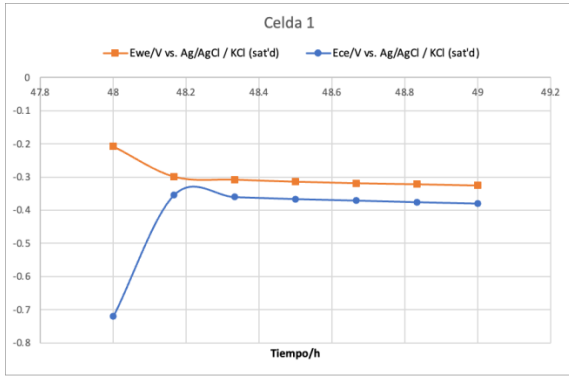
Tratamiento G/H



Tratamiento I/J



Tratamiento K/L





Article

Single-Chamber Electro-Fermentation of Rumen Fluid increases Microbial Biomass and Volatile Fatty Acid Production without Major Changes in Diversity.

Rocío López-Hernández ¹, Bibiana Cercado-Quezada ², Haiku D. J. Gómez-Velázquez ³, Carolina Robles-Rodríguez ¹, Laura González-Dávalos ³, Alfredo Varela-Echavarría ⁴, Armando Shimada ³ and Ofelia Mora ^{3,*}

¹ Posgrado en Ciencias de la Producción y la Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 04510, Mexico; mvz.rlh@gmail.com (R.L.-H.); carolaina1912@comunidad.unam.mx (C.R.-R.)

² Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica S.C. (CIDETEQ), Pedro Escobedo 76703, Qro., Mexico; bcercado@cideteq.mx

³ Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN), Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán (FESC)-UNAM, Queretaro 76231, Qro., Mexico; haiku@cuautitlan.unam.mx (H.D.J.G.-V.); lauragd@comunidad.unam.mx (L.G.-D.); shimada@unam.mx (A.S.)

⁴ Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Queretaro 76231, Qro., Mexico; avarela@unam.mx

* Correspondence: ofemora66@unam.mx

Abstract: Rumen fermentation (RF) is a complex of oxidation-reduction reactions by rumen micro-biota, and its end-products are the volatile fatty acids (VFA), which constitute the main energy source for the host animal. We speculated that the process could be manipulated through electro-fermentation (EF) by utilizing solid-state electrodes as electron sources. This study aimed to evaluate the effects of a single chamber EF application (0.4 vs. 0.9 V) for 6, 12, or 24 h, on the resulting microbial biomass, dry matter digestibility (DMD), VFA production, NADH/NAD ratio, and composition of its bacterial communities. The application of a 0.9V electric potential for 24h exerted the most significant changes in RF compared to the control treatment (0V) increasing microbial biomass (12%), DMD (58%), VFA concentrations (~84%), and reducing NAD/NADH ratio (~50%), without a significant impact on bacterial diversity. These results suggest that the application of a 0.9V electric potential allows the microbiota to better hydrolyze and digest the feed's components and could serve as an electron sink to produce VFAs. Hence, EF can give innovative solutions to a range of drawbacks that limit the RF process. Nonetheless, more studies are needed to understand how a solid electrode and external electric energy work.

Keywords: rumen fermentation; electro-fermentation; bio-electro-chemical system; microbiota; volatile fatty acids

Citation: López-Hernández, R.; Cercado-Quezada, B.; Gómez-Velázquez, H.D.J.; Robles-Rodríguez, C.; González-Dávalos, L.; Varela-Echavarría, A.; Shimada, A.; Mora, O. Single-Chamber Electro-Fermentation of Rumen Fluid increases Microbial Biomass and Volatile Fatty Acid Production without Major Changes in Diversity. *Fermentation* **2023**, *9*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s):

Received: 22 February 2023

Revised: 26 March 2023

Accepted: date Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Ruminants evolutionarily adapted their digestive tract to feed on fibrous roughages, some of which are undigestible for humans and other animals [1]. They convert these materials through a fermentation process by the microbiota in the rumen (ruminal fermentation, RF). Hence, ruminal microbes play a key role in the degradation of feed carbohydrates such as cellulose, hemicellulose, pectin, and starch, as well as fats, proteins, and non-protein nitrogen [1,2]. The main end-products of RF are volatile fatty acids (VFA), such as acetate, propionate, and butyrate, which constitute up to 80% of the energy usable by the host animal; the rest is lost and released as carbon dioxide, methane, and heat [3].

A complex and dynamic microbial ecology characterizes the ruminal environment, with populations of strict and facultative anaerobes, such as bacteria, fungi, and protozoa which change over time and feeding. Microbial metabolic activities and proliferation are favored in this organ, promoted by a physiological pH of 5.5 to 7.0, temperature that ranges from 38 to 41 °C, an osmolarity between 250 to 400 mOsm/kg, and a redox potential oscillating from −240 to −450 mV [1,3]. These conditions are highly stable and are similar to those of an ideal commercial fermentation chamber [1]. Hence, there seems to be an opportunity to manipulate the ruminal fermentation to enhance its efficiency, increase the synthesis of VFAs, and decrease the concentration of methane. In this way, a better nutrition for the host animal could be promoted resulting in higher animal production and therefore an increased output of meat and milk, staples of human nutrition.

Considerable research efforts have focused on methods to manipulate ruminal fermentation, including diet modifications [2,4], the use of antibiotic ionophores [5], plant extracts [6,7], and probiotics [1,2,4,8]. Recently, novel biotechnological approaches using bio-electro-chemical systems (BES) have also been employed with similar purposes resulting in the development of electro-fermentation tools (EF) [9–12]. EF involves the application of an electrical field in a microbial fuel cell (MFC) yielding valuable end-products from electricity-driven microbial CO₂ reduction. Hence, EF involve unbalanced fermentation and microbial electro-synthesis (MES) using bidirectional electron transfer to promote microbial metabolism [13]. Fermentation is a flow of electrons that travel from oxidizing compounds (electron donors) to reducing compounds (electron acceptors) through carrier molecules such as NADH/NAD, ferredoxin, and FAD. Therefore, it is feasible to modify this electron flow with an external energy source with solid electrodes, thus altering the fermentation patterns to increase the synthesis of VFAs and improve ruminant nutrition efficiency. The major difference between EF and other BES is that EF do not require high current densities. In this context, electric current is not the desired product nor the main energy source but is instead a trigger that allows the fermentation process to occur under unbalanced conditions.

There are few studies using BES in ruminal fluids to manipulate RF with the purpose of generating electricity using MFC. The findings of these studies suggest that an electric potential increases the VFA concentration. For example, the application of current in a double-chamber H-type MFC with a carbon electrode using a rumen microorganism inoculum converts the soluble cellulose into electricity [14]. Also, production of electricity was observed when aquatic plants (*Cana indica*) [15] and purified microcrystalline cellulose [16] were incorporated as a substrate in an air-cathode MFC. In the same way, using an external resistance on similar cellulose fed MFC, showed an increase in production of electricity and changed the VFA concentration [17]. Another study demonstrated the suppression of methanogenesis accompanied by increased electricity and changes in rumen bacterial communities when MFC was applied [18]. Moreover, when bermudagrass straw was added to an MFC, the rumen microorganisms metabolized it into electricity and increased VFA concentrations [19]. These studies suggest that changes on VFA concentrations could be related to the increment of electricity production and changes in the oxidation-reduction potential (ORP).

Therefore, based on these previous findings and in contrast to the studies that employed the MFC principle, in the EF an external electric potential source is applied and is one of the reasons that make it a viable alternative for rumen manipulation. We hypothesize that an external voltage applied in EF could enhance fermentation patterns and electricity-driven ruminal microbiota metabolism to increment VFA concentrations. Recently, we evaluated the effects of an external electric potential (0.75 V) using a double-chamber EF separated by a proton membrane with a rumen microorganism inoculum [20]. We observed an increase in acetate, propionate, and butyrate concentration and changes in the diversity of bacterial communities.

In this study we evaluated the effects of two external electric potentials (0.4 and 0.9V) in a single-chamber EF configuration using a rumen microorganism inoculum and

Rhoades grass pasture as substrate measuring dry matter digestively (DMD), biomass, bacterial communities, and VFA production.

2. Materials and Methods

2.1. Ruminant Fluid Collection

Fluid samples were collected from two rumen-cannulated clinically healthy Brown Swiss 8-year-old steers freely grazing on native pastures at the Centro de Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal (CeNID-Fisiología, INIFAP). Experimental protocols were performed according to the Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 [21]. This work was approved by the Internal Committee for Care and Use of Experimental Animals (CICUAE.DC-2019/4-2, UNAM). Samples were filtered with gauze, stored, and transported in a thermos flask at 37 °C [22].

2.2. Electro-Fermentation System Design and Operation

The electro-fermentation system was constructed using a sterilized glass beaker chamber (10 cm length, 5 cm diameter) with an airtight rubber stopper which operated as a single chamber as shown in Figure 1. Briefly, the system contained anode and cathode electrodes, made with stainless steel (2 × 2 cm, 0.2 mm thickness) attached to a titanium wire (10 cm in length, with a 0.5 mm diam. Sigma-Aldrich), which passed through a rubber plug to establish electrical contact [20]. The single-chamber EF was operated with 100 mL of rumen fluid inoculum and Rhoades grass, as substrate. This substrate was previously dried and milled (2 mm mesh) and 0.5 g were placed in digestibility filter bags with 0.25 µm pore size (F57, ANKOM, NY, USA) and then heat-sealed.

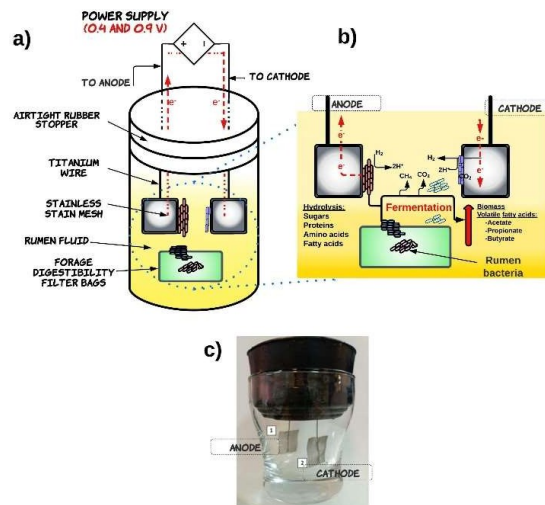


Figure 1. Schematic basic structural components (a) and function (b) of the single chamber electro-fermentation (c). In a single-chamber electro-fermentation system, both anode and cathode electrodes are placed in the same chamber, and the microorganisms are grown in both electrodes. The external electric potential application supplies electrons to the solid conducting anode. The electron donors are transferred through the electroactive bacteria (EAB) achieved via direct extracellular electron transfer (ETT) mechanisms or mediators. It promotes the oxidative reactions of organic compounds in fermentation, which releases electrons into a circuit. The electron sink at the anode leads to the reduced NADH/NAD⁺ ratio resulting in the compensating cellular regulation favoring pathways to regulate NADH, promoting fermentation efficiency and improving biomass yields. The reduction reactions can occur in the cathode electrode, which is colonized by microorganisms that reduce the substrate using the electrons provided by the anode, which contribute to producing valuable products like volatile fatty acids.

The experimental design for the EF system was completely randomized in a factorial scheme, which consisted of two factors and different levels: 1) electric potential (0.4 and 0.9 V) and 2) operating time (6, 12, and 24 h). The same configuration but without electric potential application (0V) was used as a control treatment for each operating time. The electric potential of 0.4 and 0.9 V were supplied by a DC multi-channel direct power supply (GW Instek GPS-403; Instek America Corp.).

The electric potential and the stainless-steel electrodes were chosen based on previous work [20], as well as pilot experimental results in our laboratory, in which we evaluated rumen EF in a single chamber constructed with nickel (We) and platinum (Ce) electrodes at different electric potential and operating time (with and without substrate). These previous results showed a significant increase in VFA that does not depend on operating time. However, considerable electrode physical deterioration caused oscillation in electric potential values and low stability (unpublished data). All single chamber EF were incubated with shaking (60 rpm, 38 °C) to simulate in vitro rumen conditions.

2.3. Biomass Determination

Rumen biomass from each EF treatment was quantitated using a My-control bioreactor (Applikon Biotechnology, Netherlands). Briefly, aliquots of rumen fluid were diluted 1:5 with artificial saliva consisted of a two buffer solution combined in a 4:1 ratio of buffer A (10.0 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L NaCl, 0.1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, and 0.5 g/L urea) and buffer B (15 g/L Na_2CO_3 , 1 g/L $\text{Na}_2\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), adjusted to pH 6.8 [20]. Diluted rumen fluid samples were then placed in the bioreactor for biomass measurements, and the results were expressed as Log₁₀ UFC/mL.

2.4. Dry matter Digestibility

The in vitro dry matter digestibility (DMD) by rumen fluids in each EF treatment was measured in filter bags according to the manufacturer's protocol (ANKOM Technology, USA). After the EF treatment, filter bags were washed extensively with water and dried at 60°C for 24 h, and weighed. The results were expressed as % DMD.

2.5. Volatile Fatty Acid Quantification by Gas Chromatography

Total and individual VFA products of each EF treatment were determined by gas chromatography according to Chung et al., [17]. Rumen fluid samples (10 mL) were collected and acidified with 1 mL of 0.6 M HCl, then 1.5 mL aliquots were centrifuged (5000 × g, 10 min, 4°C) and 1.2 mL of supernatant was recovered in 1.5 mL microcentrifuge tube. Next, 240 µL of 25% metaphosphoric acid were added to each supernatant which was incubated on ice for 30 min for protein precipitation, and centrifuged (10,000× g, 15 min, 4 °C). Finally, supernatants were collected and filtered with Whatman glass microfiber filters (2 mm diam). One µL of each sample was injected into an Agilent gas chromatograph (GC) series 7890B (Wilmington, DE) coupled to a flame ionization detector. The carrier gas (nitrogen) flow rate was maintained at 9.5 mL min⁻¹. The injector temperature was set at 190 °C in splitless mode. A Zebtron ZB-FFAP capillary column (15 m × 0.53 mm inner diameter × 0.25 µm) was used. The initial oven temperature was 70 °C, which was held for 1.5 min, and raised to 130 °C at 10 °C min⁻¹, then raised to 210 °C at 1°C min⁻¹, and held for 5 min. GC data processing was performed using Chemstation software (Agilent Technologies). The results are expressed as mM of VFA of rumen fluid (mM) using VFA standards curve calibration.

2.6. NADH/NAD Ratio Assay

NADH/NAD ratio production during EF treatments was quantified using an enzymatic commercial fluorometric kit ab1723 (Abcam, Cambridge, England) according to the manufacturer's protocols.

2.7. DNA Extraction and Illumina Sequencing

To evaluate bacterial communities of EF in rumen fluid, the genomic DNA was extracted from each single-chamber treatment ($n = 3$). Rumen DNA extraction was performed according to the RBB + C method (23). Samples (1 mL) were homogenized with zirconium beads and lysis buffer followed by centrifugation and the supernatant was recovered. Then, 10 mM ammonium acetate, 98% isopropanol, and 70% ethanol were added to the supernatant for nucleic acid precipitation. Finally, for protein removal and DNA purification, QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) columns were used.

DNA concentration was quantitated using a Qubit 3.0 fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and DNA integrity was verified by 1% agarose gel electrophoresis. DNA rumen microbiota 16s rRNA sequencing was performed by Research and Testing Laboratory (RTL) Genomics with the Illumina My-seq platform. Illumina produces FASTQ files with a Phred offset of +33.

Data quality control and analyses were performed using the USEARCH V.11 pipeline. The FASTQ forward and reverse files were merged into a single FASTQ file per sample; quality control and processing included removing adapters and cutting the sequences to length-based filtering of 400 bp (reads smaller than 200 bp were excluded from the analysis). The resulting filtered reads were then aligned to RDP V.16 operational taxonomic units (OTUs) for taxonomy assignment. OTUs were selected at 97% sequence similarity. The UCLUST method was used to cluster the reads into OTUs [24]. Alpha diversity values for bacterial communities of rumen samples were obtained using various diversity indexes (observed OTUs, Chao's estimate, Shannon's diversity index) [22].

2.8. Statistical Analysis

Single chamber EF were performed in two replicates, and the obtained data (DMD, biomass yield, and NADH/NAD ratio) were measured in triplicate. The results were expressed as mean and standard errors. The data were subjected to a two-way analysis of variance (ANOVA), and comparative mean differences were determined by Tukey's test. Statistical analyses were assessed with the software JMP V.5.0.1. Data on rumen bacteria diversity were analyzed using the R software with the help of the Phyloseq library [25]. In addition, some graphics were produced with GraphPad Prism software version 6 (San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Effects of Ruminal Electrofermentation on Biomass and Dry Matter Digestibility

To determine the effects of *in vitro* EF of a grass substrate with rumen fluid, the biomass, DMD, and VFA were evaluated, and the results are shown in Figure 2. In general, the factors that influenced the most the measured parameters were the operating time of 24 h and 0.9 V as electric potential compared to the control (0V). In this sense, no significant changes were present in microbial growth biomass (Log₁₀ UFC/mL) throughout the operating time for the control treatment. Interestingly, both electric potentials (0.4 and 0.9 V) improved the biomass content, especially the latter which exerted the most significant effect ($p < 0.05$) (up to 12%, after 12 and 24 h); followed by the 0.4 V-treatment with an increase of 10% at 12 and 24 h (Figure 2a). According to two-way ANOVA, significant effects were observed for the factor time ($p = 0.018$), which was higher for 24 h; in contrast, the interactions of factors were not significant ($p = 0.829$).

Dry matter digestibility increased in all three operating times, with and without electric current (Figure 2b). No significant changes were observed, however, at 6 h among treatments and control treatment at 24 h showed an increase of 42%, compared to the 6 h-control ($p < 0.05$, capital letters). Moreover, the application of electric potential enhanced DMD through the operating time, with 0.9 V showing a significant increase of 50 and 58% at 12 h and 24 h, respectively, as compared to the 6 h-control treatment. Likewise, only at 24 h, the 0.9 V-treatment was significantly higher among groups at the same time frame.

The time factor showed the most influence on increasing the DMD ($p = 0.0001$), while the interaction of the factors did not show statistical differences ($p = 0.856$).

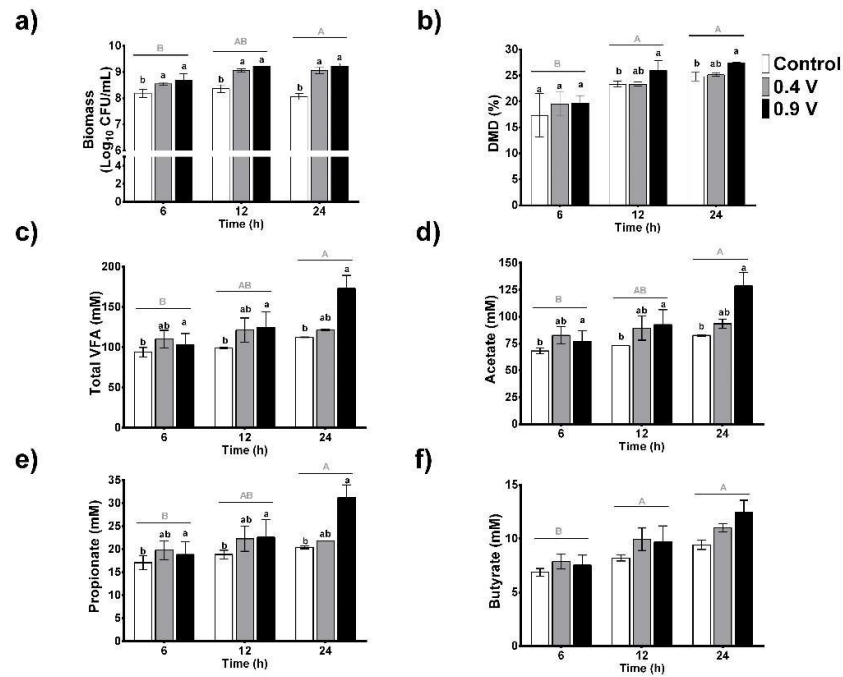


Figure 2. Effects of in vitro ruminal electrofermentation through electronic potential (0.4 and 0.9 volts) application at 6, 12 and 24 h on biomass (a), dry matter digestibility (b), total volatile fatty acids (c), and individual acetate (d), propionate (e), and butyrate (f) production. Means values and SEM. The data were analyzed using a two-way ANOVA to determine whether there were significant differences in means of parameters between the potential electric treatments and the time. Different letters indicate significant differences by the post-hoc analysis using the Tukey HSD Test at $p < 0.05$ (capital letters through the effects of time factor and lower cases for the effects of treatment groups factor).

3.2. Volatile Fatty Acids

The effects of electric potential on VFA concentration are shown in Figure 2c. No significant changes for total VFA on control treatments throughout the operation time were observed ($p > 0.05$). In contrast, application of current changed the total VFA through the operating time exclusively with 0.9 V which at 24 h increased about 84% compared to the 6 h-control and an increase of 53% compared to the 24 h-control. The two-way ANOVA analysis revealed significant effects in both factors and showed the effects of treatment ($p = 0.035$) and over time ($p = 0.028$), but its interaction was not ($p = 0.235$). Comparing the means, the treatment of 0.9V and the time of 24 h were statistically different, compared to the control treatment and the 6 h, respectively. For individual VFA concentrations, similar behaviors were observed. Namely, no significant changes were observed for acetate, propionate, and butyrate for the control treatment throughout time and again the electric potential application of 0.9 V, exclusively at 24 h, exerted the most significant increases of 88, 82, and 81% for these individual VFA with a proportion of 74:18:7, respectively (Figure 2d–f).

According to these results, the 0.9 V treatment at 24 h exerted the most significant changes on ruminal electro-fermentation which was selected for pH, NADH/NAD ratio, and bacterial communities' analysis.

3.3. Effects of Rumen Electro-Fermentation on pH and NADH/NAD Ratio

Ruminal pH is an ideal and dynamic condition (5.5 to 7.0, in physiologic conditions) for metabolic activities and proliferation of the microbiota, as well as favoring the fermentation process. As shown in Figure 3a, the pH values in the control treatment remained constant and ranged from 6.6 to 6.78 over time. In contrast, the electric potential application of 0.9V in ruminal EF significantly decreased the pH values (6.7 to 6.2), showing the lowest values at 24 h and 8% lower compared to the control treatment. Again, the effects of both factors were showed significant for treatments ($p = 0.006$) and time ($p = 0.002$), but their interaction effects were not ($p = 0.127$). It suggests that 0.9 V treatment and time at 24 h provide an optimal pH condition to increasing biomass, and VFA.

The concentrations of enzymatic cofactors NAD⁺, and NADH and their ratio in ruminal fluids EF are shown in Figure 3b–d. NAD concentrations increased slightly over time in the control treatment without reaching significant values (Figure 3b). Significant changes were found either on NAD concentrations between control or 0.9 V treatments through two-way ANOVA analysis ($p < 0.045$). When the 0.9V was applied, NAD concentrations increased significantly two-fold at 24 h, compared to the 6 h-control treatment, showing an important effect by the time factor ($p < 0.001$).

The NADH concentrations in ruminal fermentations were higher than in oxidized form (Figure 3c). The control treatment presented an important increase in NADH concentration after 24 h (5-fold). Hence, in this case, the interactions factors effects of treatment groups vs. time are showed significant, where the 6 h and 24 h control had the most effects for increasing NADH concentration ($p = 0.002$). Interestingly, the application of 0.9 V prevented the increment of NADH concentration over time, including at 24 h, which represented half of the 24 h-control treatment level. Thus, the NADH/NAD ratio showed a similar behavior, in which the 0.9V treatment at 24 h prevented the increment of NADH/NAD ratio compared to control. These results suggest that the electrons from the electric potential application in EF might affect the microbial intracellular redox conditions and could be due by re-oxidation of NADH to NAD⁺ in the cells, producing more VFA.

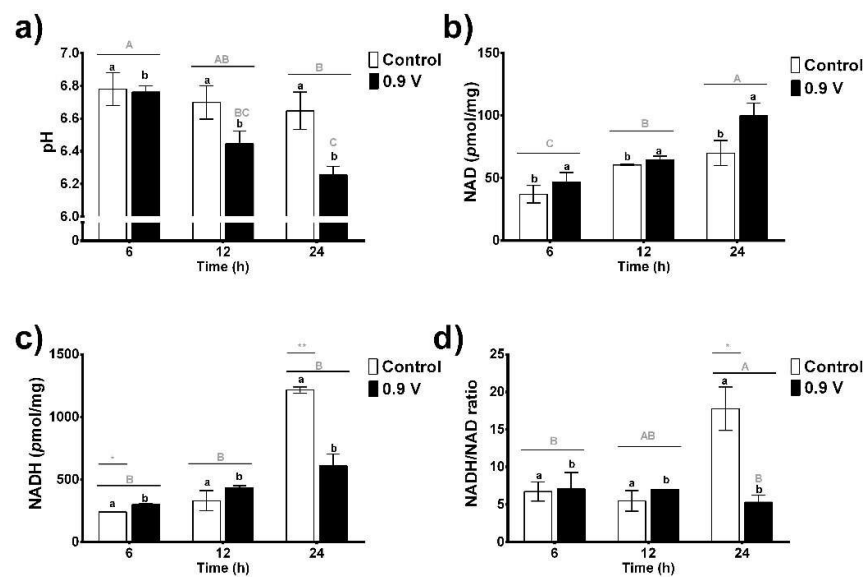


Figure 3. Effects of in vitro ruminal electrofermentation using electronic potential (0.9 volts) application at 6, 12 and 24 h. on pH (a), NAD (b) and NADH (c) concentration, as well as NADH/NAD ratio. Means values and SEM. The data were analyzed using a two-way ANOVA to determine whether there were significant differences in means of parameters between the potential electric treatments and the time. Different letters indicate significant differences by the post-hoc analysis

using the Tukey HSD Test at $p < 0.05$ (capital letters through the effects of time factor and lower cases for the effects of treatment groups factor, and *, ** indicates the significant differences by the interaction factors effects of treatment groups vs. time).

3.4. Rumen Microbial Community Composition across Electro-Fermentation Systems

After quality control of 965,044 total raw sequences, 604,300 high-quality reads were obtained in the pre-process data (trimming, filtering, denoising, and clustering) for further analysis (Table S1). Accordingly, a total of 2161 OTUs were identified for bacteria across all samples (Table S2).

Bacterial composition abundances of EF of rumen fluid at 24 h of operating time are shown in Figure 4. An average abundance of 4517 reads for the control treatment was observed, and the application of 0.9V electrical potential resulted in a higher abundance of 4686 reads (Figure 4a). A total of 17 bacterial Phyla were obtained for all samples, and the two most predominant were Firmicutes and Bacteroidetes with average proportions of 52.38% and 40.59% for the three groups, respectively (Figure 4b). The Phylum Proteobacteria also represented a considerable fraction (1.08%), followed by Verrucomicrobia (0.95%) and Actinobacteria (0.84%) across the three samples. The remainder highly abundant Phyla observed represent the 1.31% clustering as “Other” (Tables S3 and S4). No differences were found in the Firmicutes/Bacteroidetes ratio ranging from 1.19 to 1.35 among groups, although the 0.9V-treatment presented the highest values.

A similar bacterial composition was observed regarding the major genera (top 10) (Figure 4c), and similar proportions were found among groups. 126 taxa at the genus level were present in all samples across treatments. The most predominant bacterial genus was *Clostridium* (~15%), followed by *Mucinivorans* (~9.40%), *Capnocytophaga* (~8.47%), and *Prevotella* (~7.89%) by groups (Figure 4d). The remainder taxa at the genus level were clustered in “Others”, representing 40.28%, of which 10% are not assigned taxa or unidentified species in the RDP database (Table S5), indicating that many ruminal bacteria have not been characterized yet.

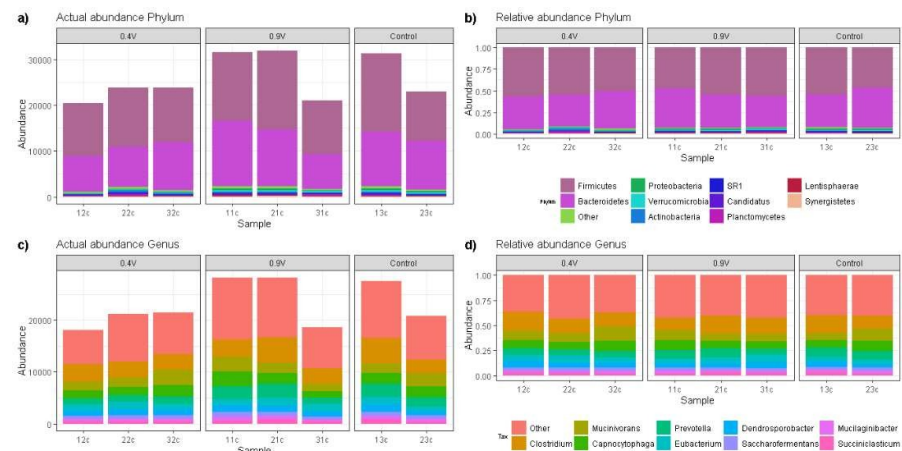


Figure 4. Bacterial community compositions at different taxon levels in the rumen fluid through invitro electrofermentation using electronic potential of 0.4V and 0.9V. The composition of actual and relative abundance bacteria at the phylum (a,b) and genus (c,d) levels.

3.5. Rumen Bacterial Diversity and Similarities in the Electro-Fermentation system

Alpha diversity indexes for bacterial communities in rumen fluid across electro-fermentation conditions are shown in Table 1. The richness of bacterial communities’ did not present significant differences among all groups measured by observed OTUs. Similarly, no differences in the Shannon diversity and Chao1 indices were observed. These results indicate that the electric potential did not affect the bacterial communities at the Phylum

level. However, EF enhanced microorganism proliferation (as shown in biomass results, Figure 2a) which suggests changes in their metabolism.

Table 1. Alpha diversities of bacterial communities of in vitro electrofermentation on diversity and richness of rumen bacteria using electronic potential at 24 h.

| Treatment | Observed OTUs | Chao-1 Index | Shannon Index |
|-----------|---------------|---------------|---------------|
| Control | 1329.0 ± 23.0 | 1395.3 ± 5.4 | 6.12 ± 0.03 |
| 0.4 V | 1317.0 ± 27.0 | 1361.2 ± 22.0 | 6.15 ± 0.00 |
| 0.9 V | 1294.3 ± 11.6 | 1350.8 ± 13.0 | 6.06 ± 0.03 |

Data are showed as mean and error standard. Different letters indicate significant ($p < 0.05$) differences between groups using the Tukey test.

According to the bacterial community comparisons using a Jensen-Shannon divergence as a beta diversity measurement, microbial samples in the 0.9V group clustered closely into a large group along the second principal coordinate (variance explained = 23%), whereas the 0.4V and control group samples were clustered in the first PCoA (Figure 5). Moreover, the analysis of similarity (ANOSIM) revealed no significant differences in the composition of bacterial communities ($R = 0.19, p = 0.83$). It again highlighted the robust stability of the ruminal bacterial community against the electric potential application, which in the absence of changes in alpha diversity and richness of these bacteria, increased VFA production.

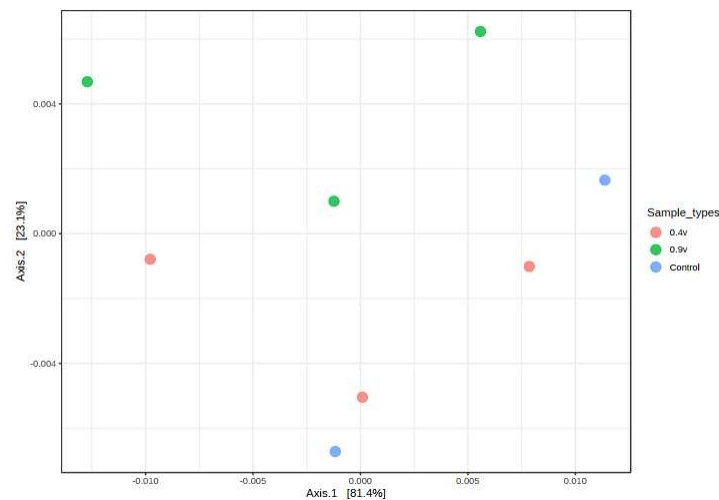


Figure 5. Principal coordinate analysis (PCoA) plots of the bacterial community compositions in the rumen fluid of electrofermentation application systems using a Jensen-Shannon divergence. The percentages of variation explained by PC1 and PC2 are indicated on the axes.

4. Discussion

Ruminal fermentation is a catabolic spontaneous process, in which microorganisms conserve energy by anaerobically decomposing organic matter producing valuable end-products such as VFA that are usable energy forms for the host animal. Nevertheless, the energy from RF is also released as CO₂, methane, and heat [4]. Extensive studies have been performed to manipulate the RF and make it more efficient [1,2,6,8]. In this study, we applied a bioelectrochemical system in the rumen fluid using a single-chamber EF to evaluate its effects on VFA production, biomass yield, and bacterial communities.

EF is a fairly new field that can manipulate microbe metabolism using solid-state electrodes as electron mediators such that the anode is used as an electron acceptor and the cathode as an electron donor (Figure 1) [11,12]. EF can help stabilize and optimize fermentation metabolism through controlled redox and pH, substrate purity, and end-product

VFA formation. In this sense, in the present study, the application of an electric potential of 0.9V in rumen fluid exerted at 24 h the most significant increment of DMD, and VFA concentrations (acetate, propionate, and butyrate), as well as reducing the pH and reduced NADH/NAD ratio.

In a previous work [20], we demonstrated that an external power supply of 0.4V in a double-chamber EF increments the VFA concentration, but no changes were found in DMD, microbial biomass, and community biodiversity at the Phylum level. In contrast, in this study, significant changes were observed in DMD and biomass, that appear to be associated with the EF system configuration and the application of an electric potential of 0.9V. The basic difference between the single and double chamber EF is the absence of a dividing membrane in the single chamber and in the double-chamber different conditions can be maintained in each compartment. Advantages of a single chamber configuration are its reduced cost and the oxygen diffusion rate into the anode that is higher than in the double chamber design [26]. The present results suggest that the application of external electric current changes the fermentation patterns of the rumen microorganisms, favoring their proliferation (biomass) and metabolism, therefore enhancing VFA production.

All microorganisms need an electron donor and acceptor to maintain their metabolism and for this function the reducing/oxidating agents NADH/NAD couple. These agents are found in all living cells and are involved in the transfer of electrons, such as in glycolysis, the citric acid cycle and, as in this case, fermentation. NAD in the oxidized form (NAD⁺), serves as an electron acceptor, and its reduced form (NADH) donates electrons.

The key role of electrical current in EF is as an alternate source of reducing or oxidizing power, potentially more sustainable than conventional substrates produced through feed (i.e., glucose) [12] or by control of the oxidation-reduction potential of the fermentation broth. Kracke and Krömer [27] calculated the theoretical yields of different metabolites for glucose and glycerol EF models and reported that an excess of redox cofactors (NADH and NADPH) induced by a cathode can drive specific reduction reactions. In this regard, the consumption of reducing power by an electron sink (i.e., an anode) can improve microbial biomass yields. Our results are in accordance with the findings of these authors.

NAD⁺ is reduced to NADH in fermentation and must be regenerated to sustain the process by reoxidation of NADH. Most VFAs derived from organic substrates produce NADH, but only some metabolites, such as lactate, butyrate, and propionate, allow its reoxidation [9–12]. Thus, the excess of NADH may be reoxidized by reducing other organic compounds and producing more reduced compounds such as VFAs, and some of it could act as an electron sink. Overall, if more electron donors are produced in the system, as occurs in the applications of EF, more VFAs are produced thus storing extra electrons [28].

Our results of decreased NADH/NAD ratio at 24 h could be related to the extra electrons donated by the application of 0.9 V of electric potential, compared to control treatment, thus increasing VFA production, according to the aforementioned. In addition, the possible formed biofilm of electroactive microorganisms through the extracellular electron transfer (EET) could interact with the solid electrodes, as a possible mechanism for electron transfer that could conserve energy either coupled or uncoupled reactions, whereby the electrons derived from electrodes aid in the catalytic generation of the energy carriers NADH or ATP [10–12]. Moreover, other electron transfer mechanisms can also be established in the rumen fluid through direct ETT (nanowires, cytochromes) or shuttle mediated ETT (i.e., flavins, H₂, formate, etc.) [10,13]. This process of transferring electrons in and out of the cell (ETT) can occur in three steps: (1) the oxidation of the substrate, (2) the transfer of electrons to the corresponding proteins, and (3) extracellular electron transport [10]. The electrons are transferred to proteins present in the outer membrane by diffusible intracellular electron carriers such as NADH/NAD. Therefore, the electric current could affect both extracellular and intracellular ORP, and thus affect the overall biological regulation through changes in the proton carrier balance significantly impacting

the end-products of fermentation. In addition, the reduction of NADH/NAD ratio after 10h by EF has previously been reported in cathodic EF with pure cultures, compared to the control fermentations thus in agreement with our results [29].

Rumen fluid has been previously used successfully in a microbiological fuel cell for the generation of electricity employing different substrates such as cellulose, aquatic plants, and straw [6,7,14–16,18]. Those studies focused on the generation of electricity and revealed an important increase in VFA and gas production, as well as a drop in pH. However, using EF as an electron donor was not investigated in these studies as no external electric potential was applied. Nevertheless, at least one of these studies observed changes in bacterial taxa throughout the days of operation when different substrates were introduced in the MFC. Rizmani et al., [16] reported that Firmicutes, Methanoculleus, and Methanobrevibacter were the dominant taxa in an MFC configuration, and over 90 days of operation, bacterial taxa decreased.

In this work, the electric potential in the EF did not affect the diversity of bacterial communities in the rumen fluid, although it increased the proliferation of the microorganisms as shown in abundance and biomass, as well as in the increment of VFA, compared to the control treatment. Taxa found in all samples across EF in rumen fluid coincide with what previous authors have described in rumen microbial ecology [2,4,6,22], although more studies are still needed regarding the changes in the fungal communities [30], allowing a greater understanding of the effects of the application of electrical potential. Furthermore, no significant changes were observed in bacterial alpha and beta diversities in this study across the EF conditions, showing a robust microbiota ecology in the rumen.

5. Conclusions

This study is one of the first to explore and apply single chamber electro fermentation using 0.9 V as electric potential at 24 h on rumen fluid resulting in the increment in microbial biomass and VFA concentration. The concomitant decrease in NADH/NAD suggests that a modulation of fermentation patterns on microbial metabolism occurs under our experimental conditions. These microorganisms hydrolyzed and digested the dry matter and could serve as an electron sink to produce VFA. This provides an improvement in biomass yield without changes of diversity at the Phylum level. Hence, EF can help to overcome a range limitations of the rumen fermentation process, which could be applied to in vivo studies to improve ruminant nutrition and increase the efficiency of meat and milk production.

Limitations and Challenges. This EF system also provides a new framework for the study of inter-actions between rumen electroactive bacteria and fermenters. Nevertheless, although this is one approach towards the understanding of how a solid electrode and current energy can enhance rumen fermentation, more molecular and biochemical studies are needed to find the advantages and limitations of EF. In addition, it will be important to assess potential changes in methane production and fungal communities, characterize the microbial biofilm formed, and define robust design criteria of the electrode material to be replicated efficiently at a large scale.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: Summary of 16S rRNA gene sequencing reads for bacterial across samples; Table S2: Operational Taxonomic Units (OTUs) of bacteria in rumen fluid across electro-fermentation application; Table S3: Taxonomic of OTUs in rumen fluid across electro-fermentation application; Table S4: Bacterial relative abundance at phylum level (top 10) across electrofermentation application on rumen fluid; Table S5. Bacterial relative abundance at genus level (top 10) across electrofermentation application on rumen fluid

Author Contributions: Conceptualization, O.M., B.C.-Q. and A.S.; methodology, R.L.H., H.D.J.G.V., C.R.R. and L.G.D.; software, H.D.J.G.V. and C.R.R.; validation, O.M., A.V.E., and A.S.; formal analysis, R.L.H. and H.D.J.G.V.; investigation, R.L.H. and H.D.J.G.V.; resources, R.L.H., B.C.-Q., and L.G.D.; data curation, H.D.J.G.V., and C.R.R.; writing, original draft preparation, H.D.J.G.V.; writing review and editing, A.V.E., O.M. and A.S.; visualization, R.L.H. and H.D.J.G.V.; supervision, O.M.,

B.C.-Q., and A.S.; project administration, L.G.D. and O.M.; funding acquisition, O.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by PAPIIT (IN213021-UNAM).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of Internal Committee for Care and Use of Experimental Animals of Universidad Nacional Autónoma de México (CICUAE.DC-2019/4-2, UNAM).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data that support the findings of this study are available as supplementary material; the sequence read archive (SRA) in NCBI as BioProject PRJNA945450, as well as from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: R.L.H. gratefully acknowledges CONACYT for their fellowship. Jaime Pérez Trevilla, Lab-Technician from the Laboratory of Research on Advanced Processes for Water Treatment-UNAM for his assistance with VFA and GC analysis, and Dr. Ricardo Basurto Gutierrez from CeNID-Fisiología, INIFAP for his help in obtaining rumen fluid.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Millen, D.D.; De Beni Arrigoni, M.; Pacheco, R.D.L. Eds. Ruminant fermentation. In *Rumenology*. Springer, Switzerland, **2016**, 1–314 p.
2. Nagaraja, T.G.; Newbold, C.J.; van Nevel, C.J.; Demeyer, D.I. Manipulation of ruminal fermentation. In *The rumen microbial ecosystem*. Dordrecht: Springer Netherlands; **1997**; pp 523–632. http://link.springer.com/10.1007/978-94-009-1453-7_13
3. Aguilar-González, M.; Buitrón, G.; Shimada-Miyasaka, A.; Mora, O. State of the art of bioelectrochemical systems: feasibility for enhancing rumen propionate production. *Agrociencia*. **2016**, *50*, 149–66.
4. Castillo-González, A.R.; Burrola-Barraza, M.E.; Domínguez-Viveros, J.; Chávez-Martínez, A. Rumen microorganisms and fermentation. *Arch Med Vet*. **2014**, *46*, 349–61.
5. Azzaz, H.H.; Murad, H.A.; Morsy, T.A. Utility of ionophores for ruminant animals: a review. *Asian J Anim Sci*. **2015**, *9*(6), 254–65.
6. Zhou, R.; Wu, J.; Lang, X.; Liu, L.; Casper, D.P.; Wang, C.; Zhang, L.; Shen, W. Effects of oregano essential oil on in vitro ruminal fermentation, methane production, and ruminal microbial community. *J Dairy Sci*. **2020**, *103*(3), 2303–14. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-16611>
7. Jadhav, R.V.; Kannan, A.; Bhar, R.; Sharma, O.P.; Gulati, A.; Rajkumar, K.; Zhang, L.; Sheng, W. Effect of tea (*Camellia sinensis*) seed saponins on in vitro rumen fermentation, methane production and true digestibility at different forage to concentrateratios. *J Appl Anim Res*. **2018**, *46*(1), 118–44.
8. Arowolo, M.A.; He, J. Use of probiotics and botanical extracts to improve ruminant production in the tropics. *Anim Nutr J*. **2018**, *4*(3), 241–9. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.010>
9. Yamada, S.; Takamatsu, Y.; Ikeda, S.; Kouzuma, A.; Watanabe, K.; Towards application of electro-fermentation for the production of value-added chemicals from biomass feedstocks. *Front Chem*. **2022**, *9*, 1–7.
10. Moscoviz, R.; Toledo-Alarcón, J.; Trably, E.; Bernet, N. Electro-fermentation: how to drive fermentation using electrochemical systems. *Trends Biotechnol*. **2016**, *xx*:1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.009>
11. Bhagchandani, D.D.; Babu, R.P.; Sonawane, J.M.; Khanna, N.; Pandit, S.; Jadhav, D.A.; Khilari, S.; Prasad, R. A comprehensive understanding of electro-fermentation. *Fermentation*. **2020**, *6*(92), 1–31.
12. Schievano, A.; Sciarria, T.P.; Vanbroekhoven, K.; Wever, H. De.; Puig, S.; Andersen, S.J.; Rabaey, K.; Pant, D. Electro-fermentation-merging electrochemistry with fermentation in industrial applications. *Trends Biotechnol*. **2016**, *34*(11), 866–78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.007>
13. Gong, Z.; Yu, H.; Zhang, J.; Li, F.; Song, H. Microbial electro-fermentation for synthesis of chemicals and biofuels driven by bidirectional extracellular electron transfer. *Synth Syst Biotechnol*. **2020**, *5*(4), 304–13. <https://doi.org/10.1016/j.syn-bio.2020.08.004>
14. Rismani-Yazdi, H.; Christy, A.D.; Dehority, B.A.; Morrison, M.; Yu, Z.; Tuovinen, O.H. Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells. *Biotechnol Bioeng*. **2007**, *97*(6), 1398–407.
15. Zang, G.L.; Sheng, G.P.; Tong, Z.H.; Liu, X.W.; Teng, S.X.; Li, W.W.; Yu, H.Q. Direct electricity recovery from *Canna indica* by an air-cathode microbial fuel cell inoculated with rumen microorganisms. *Environ Sci Technol*. **2010**, *44*(7), 2715–20.
16. Rismani-Yazdi, H.; Carver, S.M.; Christy, A.D.; Yu, Z.; Bibby, K.; Peccia, J.; Touvinen, O.H. Suppression of methanogenesis in cellulose-fed microbial fuel cells in relation to performance, metabolite formation, and microbial population. *Bioresour Technol*. **2013**, *129*, 281–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.137>

17. Chung, R.; Kang, E.Y.; Shin, Y.J.; Park, J.J.; Park, P.S.; Han, C.H.; Kim, B.; Moon, S.I.; Park, J.; Chung, P.S. Development of a consolidated anaerobic digester and microbial fuel cell to produce biomethane and electricity from cellulose biomass using bovine rumen microorganisms. *J Sustain Bioenergy Syst.* **2019**, *9*, 17–28.
18. Tsan, W.C.; Ming, Y.C.; Sheng, C.Z.; Shuai, T. Effect of biometric flow channel on the power generation at different Reynolds numbers in the single chamber of rumen microbial fuel cells (RMFCs). *Int J Hydrogen Energy.* **2011**, *36*(15), 9242–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.04.208>
19. Wang, C.T.; Yang, C.M.J.; Chen, Z.S. Rumen microbial volatile fatty acids in relation to oxidation reduction potential and electricity generation from straw in microbial fuel cells. *Biomass and Bioenergy.* **2012**, *37*, 318–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.09.016>
20. Aguilar-González, M.; Buitrón, G.; Shimada, A.; Ayala-Summano, J.; González-Dávalos, L.; Varela-Echavarría, A.; Mora, O. Study on manipulation of ruminal fermentation using a bioelectrochemical system. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* **2022**, *1–10*.
21. Norma Oficial Mexicana nom-062-zoo-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. **2001**. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf;
22. Rodríguez-González, S.; González-Dávalos, L.; Robles-Rodríguez, C.; Lozano-Flores, C.; Varela-Echavarría, A.; Shimada, M.; Miyasaka, A.; Mora, O. Isolation of bacterial consortia with probiotic potential from the rumen of tropical calves. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* **2023**, *107*, 2–7.
23. Yu, Z.; Morrison, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques.* **2004**, *36*, 808–812.
24. Edgar, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.* **2010**, *26*(19), 2460–1.
25. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One.* **2013**, *8*(4).
26. Saravanan, N.; Karthikeyan, M. Study of single chamber and double chamber efficiency and losses of wastewater treatment. *Int Res J Eng Technol.* **2018**, *5*(3), 1225–30.
27. Kracke, F.; Lai, B.; Yu, S.; Krömer, J.O. Balancing cellular redox metabolism in microbial electrosynthesis and electrofermentation—A chance for metabolic engineering. *Metab Eng.* **2018**, *4*, 109–20. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.12.003>
28. Chen, B.; Rupani, P.F.; Azman, S.; Dewil, R.; Apples, L. A redox-based strategy to enhance propionic and butyric acid production during anaerobic fermentation. *Bioresour Technol.* **2022**, *361*, 127672.
29. Choi, O.; Kim, T.; Woo, H.M.; Um, Y. Electricity-driven metabolic shift through direct electron uptake by electroactive heterotroph *Clostridium pasteurianum*. *Sci Rep.* **2014**, *4*.
30. Niu, D.; Yu, C.; Zheng, M.; Jianjun, R.; Li, C.; Xu, C. Effects of ensiling on *Irpex lacteus* fermentation in wheat straw: Chemical composition, in vitro rumen digestibility, and fungal community. *Anim Feed Sci Technol* **2022**, *292*, 115433. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115433>

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.