



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE CUAUTILÁN

DESARROLLO DE UNA CELDA ELECTROQUÍMICA MICROBIANA CON
BACTERIAS PROPIONOGÉNICAS PARA INCREMENTAR LA
CONCENTRACIÓN DE PROPIONATO Y DISMINUIR LA CONCENTRACIÓN DE
METANO EN LÍQUIDO RUMINAL *IN VITRO*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

LIC. MARIANA AGUILAR GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARÍA OFELIA MORA IZAGUIRRE, FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES DE CUAUTILÁN

COMITÉ TUTOR

DR. ARMANDO SHIMADA MIYASAKA, FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES DE CUAUTILÁN

DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA

QUERÉTARO, QRO. SEPTIEMBRE, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Ofelia Mora Izaguirre y al Dr. Armando Shimada Miyasaka por recibirme en su laboratorio, por todo el gran apoyo y la confianza que tuvieron en mí y por ser unos excelentes tutores. No solo gracias a ellos crecí profesionalmente sino también como persona. Soy verdaderamente afortunada de pertenecer a su grupo de trabajo.

Al Dr. Germán Buitrón Méndez del Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA), Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería de la UNAM, por permitirme trabajar en sus laboratorios y por todo el conocimiento profesional que adquirí al ser parte de su alumnado.

Un especial agradecimiento a la Dra. Anaid Antaramian Salas y a la M. en C. Adriana González Gallardo por ser las primeras en recibirme en un laboratorio y por compartir conmigo todo su conocimiento. Así como también les doy las gracias como encargadas de la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM Campus Juriquilla por todos los servicios y asesorías que brindaron a este proyecto.

Al Dr. Alfredo Varela Echavarría, Director del Instituto de Neurobiología de la UNAM Campus Juriquilla por sus valiosas asesorías y por permitirme trabajar en su laboratorio, también al Dr. Jorge Tonatiuh Ayala Sumuano y al Dr. Carlos Javier López Victorio por todo el tiempo y enseñanzas que me brindaron.

A la M. en C. María Laura González Dávalos del Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional de la FES Cuautitlán y al M. en B. Jaime Pérez Trevilla del LIPATA, Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería de la UNAM, por todo el gran apoyo técnico y asesorías que siempre recibí de ellos para realizar este proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio RuMeN, en especial al M. en C. Martín Barbosa Amezcua quien siempre me apoyo y compartió su conocimiento, así como a los compañeros del LIPATA, en especial al M. en I. Isaac Rivera Álvarez, quien se tomó el tiempo de enseñarme y ayudarme incondicionalmente con esta tesis.

Y por último, al CONACYT por la beca otorgada en la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán de la UNAM y al proyecto PAPIIT IN213213 por el financiamiento de este trabajo.

RESUMEN

La fermentación ruminal es la actividad metabólica de los microorganismos del rumen, y a través de esta, el rumiante obtiene los nutrientes necesarios para mantener sus funciones biológicas. Los productos de fermentación más importantes son los Ácidos Grasos Volátiles (AGVs), que constituyen hasta 80% de la energía aprovechable por el animal. Un enfoque para mejorar la producción animal ha sido manipular la fermentación de los microorganismos ruminales. Las celdas electroquímicas microbianas o también llamadas celdas bioelectroquímicas son una herramienta biotecnológica útil para explorar y explotar la capacidad de los microorganismos de mejorar el rendimiento de su fermentación. Estos sistemas utilizan la energía eléctrica como una fuerza externa para redirigir las vías metabólicas microbianas hacia un aumento o disminución de los productos finales. En este trabajo, se desarrolló una celda bioelectroquímica para evaluar los cambios en la fermentación ruminal *in vitro* bajo dos diferentes voltajes (0.75 V y 1.5 V). Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones óptimas del rumen, recolectando muestras de líquido ruminal y gas a diferentes tiempos de fermentación para cuantificar AGVs y otros metabolitos. Como resultados, se observaron cambios en la concentración de los productos desde las primeras horas. Con base en la fermentación control (sin potencial eléctrico), la fermentación con 0.75 V fue la que mostró un mayor incremento en la producción de AGVs ($P < 0.0001$): acetato 71 %, propionato 86 % y butirato 63 %. Estos resultados se atribuyen a un aumento de los equivalentes reductores que pudieron acelerar el metabolismo microbiano en presencia del potencial eléctrico. Las celdas bioelectroquímicas modificaron la fermentación de los microorganismos ruminales hacia una producción mejorada de AGVs. Sin embargo, se observó un aumento en la producción de metano de 31 % a partir de las 24 horas de incubación ($P < 0.0001$). No hubo efecto sobre la digestibilidad del sustrato ($P > 0.0001$) pero sí un mayor consumo de azúcares reductores ($P < 0.0001$), lo que podría indicar un mejor uso del flujo de carbonos.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	II
CONTENIDO.....	III
LISTA DE CUADROS.....	VI
LISTA DE FIGURAS	VI
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Metabolismo ruminal.....	5
1.3 Microorganismos Ruminales	8
1.3.1 Bacterias	8
1.3.2 Arqueas metanogénicas.....	11
1.3.3 Protozoos	12
1.3.4 Hongos	14
1.4 Vías metabólicas de producción de AGVs.....	15
1.4.1 Producción de acetato.....	16
1.4.2 Producción de propionato.....	17
1.4.3 Producción de butirato.....	19
1.5 Sistemas bioelectroquímicos	20
1.5.1 Sistemas bioelectroquímicos: fundamentos y clasificación	20
1.5.2 Celdas de combustible microbianas	21
1.5.3 Celdas de electrólisis microbianas	22
1.5.4 Celdas de electrosíntesis microbiana	24
1.5.5 Electrofermentación.....	25
1.5.6 Mecanismos de transferencia de electrones	26
1.5.7 Manipulación del metabolismo microbiano por electrofermentación	27
1.5.8 Sistemas bioelectroquímicos para incrementar la producción de propionato	29

1.5.9 Métodos bioelectroquímicos para estudiar la fermentación ruminal	31
2. JUSTIFICACIÓN.....	33
3. HIPÓTESIS.....	35
4. OBJETIVO GENERAL.....	35
4.1 Objetivos Específicos	35
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	36
6. SECCIÓN I: METODOLOGÍA	37
6.1 Microorganismos y condiciones de cultivo.....	37
6.1.1 Comunidad microbiana propionogénica	37
6.1.2 Microorganismos ruminales.....	38
6.2 Diseño y construcción de las celdas.....	39
6.3 Colonización de los electrodos (ánodo y cátodo)	40
6.4 Operación del sistema como celdas de electrofermentación.....	42
6.4.1 Etapa de adaptación.....	42
6.4.2 Preparación del sustrato para los microorganismos ruminales	42
6.4.3 Celdas de electrofermentación con líquido ruminal	43
6.5 Cuantificación de AGVs.....	45
6.6 Digestibilidad de la materia seca	45
6.7 Modelo estadístico.....	46
7. SECCIÓN I: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
7.1 Colonización de los electrodos	47
7.2 Adaptación del sistema como celdas de electrofermentación	48
7.3 Producción de AGVs bajo un potencial eléctrico de 0.75 V	50
7.4 Producción de AGVs bajo un potencial eléctrico de 1.5 V	52
7.5 Comparación de la producción de AGVs bajo dos niveles de potenciales eléctricos aplicados.	54
7.6 Composición de los AGVs totales.....	55
7.7 Digestibilidad de la materia seca	56
8. SECCIÓN II: METODOLOGÍA	61

8.1 Cinéticas de fermentación	61
8.2 Producción de metano.....	61
8.3 Determinación de azúcares totales residuales	62
8.5 Modelo estadístico.....	62
9. SECCIÓN II: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
9.1 Influencia de la aplicación de un potencial eléctrico (0.75 V) sobre la cinética de producción de AGVs.....	63
9.2 Composición de los AGVs totales.....	65
9.3 Influencia de la aplicación de un potencial eléctrico (0.75 V) sobre la cinética de producción de metano	66
9.4 Digestibilidad de materia seca y azúcares residuales	67
10. CONCLUSIONES	71
11. BIBLIOGRAFÍA	72
12. PRODUCCIÓN	80

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Proyecciones para el año 2050 en el consumo total de carne y productos lácteos de bovino.....	3
Cuadro 2. Clasificación de las bacterias ruminales en grupos de acuerdo al tipo de sustrato que degradan.....	9
Cuadro 3. Ejemplos de la manipulación del metabolismo microbiano mediante electrofermentación.....	28
Cuadro 4. Clasificación de los microorganismos presentes en la comunidad bacteriana propionogénica	38
Cuadro 5. Combinaciones de experimentos a evaluar sección I.....	43
Cuadro 6. Comparación de AGVs con dos niveles de potencial eléctrico.....	54
Cuadro 7. Combinaciones de experimentos a evaluar sección II.....	61
Cuadro 8. Cinética de la producción de AGVs en líquido ruminal <i>in vitro</i>	64
Cuadro 9. Cinética de la producción de metano en líquido ruminal <i>in vitro</i>	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción y consumo aparente nacional de leche de bovino.....	1
Figura 2. Producción y consumo aparente nacional de carne de bovino.....	2
Figura 3. Fermentación ruminal.....	7
Figura 4. Principales vías de producción de AGVs.....	16
Figura 5. Celda de combustible microbiana.....	21
Figura 6. Celda de electrólisis microbiana.....	23
Figura 7. Celda de electrosíntesis microbiana.....	24
Figura 8. Celda de electrofermentación.....	25
Figura 9. Fotografía de la celda electroquímica microbiana.....	39
Figura 10. Fotografía del sistema de experimentación <i>in vitro</i>	44
Figura 11. Densidad de corriente en las celdas de combustible microbianas durante la etapa de colonización de los electrodos.....	47

Figura 12. Producción de AGVs totales durante la etapa de adaptación de las celdas bioelectroquímicas.....	49
Figura 13. Producción de AGVs en líquido ruminal <i>in vitro</i> (0.75 V).....	51
Figura 14. Producción de AGVs en líquido ruminal <i>in vitro</i> (1.5 V).....	53
Figura 15. Composición en porcentaje de los AGVs (0.75 V y 1.5 V).....	55
Figura 16. Porcentaje de digestibilidad de la materia seca (0.75 V y 1.5 V).....	57
Figura 17. Composición en porcentaje de los AGVs (0.75 V).....	65
Figura 18. Azúcares residuales en el líquido ruminal <i>in vitro</i>	67

1. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades

Dentro del sector pecuario, la producción nacional de carne y leche de bovino es la más importante ya que genera el 43 % del valor total del subsector. En el año 2012 se obtuvieron 123 mil mdp, de los cuales, el 54 % correspondió a la producción de carne en canal y el 46 % a la producción de leche (FND, 2014).

En 2012, México fue el sexto productor a nivel mundial de carne de bovino, y el quinceavo productor de leche fresca de vaca (FAOSTAT, 2015). A nivel nacional la producción de carne de bovino ha incrementado (Figura 1) llegando hasta 1'827'322 toneladas en 2014 (AMEG, 2015), con un crecimiento promedio anual de 2.2 % entre 2006 y 2014 (FND, 2014). Los principales estados productores de carne en canal en la actualidad son Veracruz, Jalisco y Chiapas (SIAP-SAGARPA, 2015a). A pesar del incremento en la producción y exportación, el consumo aparente de carne comenzó a disminuir desde 2008 llegando a 1'851'196 toneladas en 2014 (AMEG, 2015). No obstante, la producción de carne de bovino sigue siendo insuficiente para abastecer la demanda interna, por lo que es necesaria la importación de la carne que no se cubre con la producción nacional.

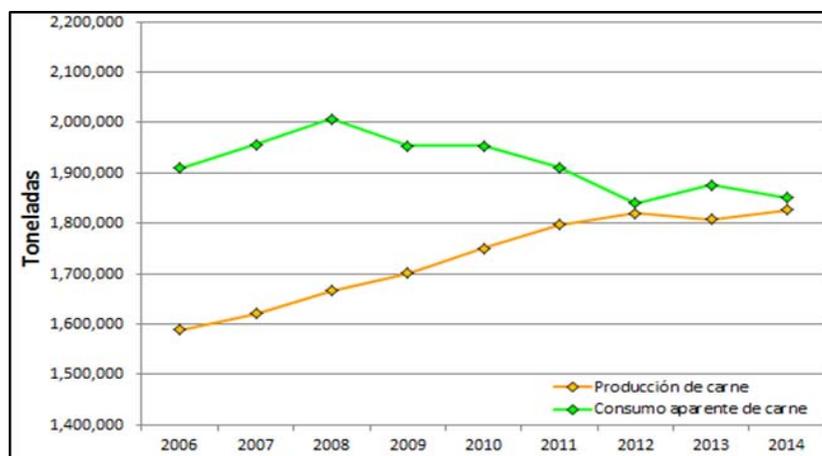


Figura 1. Producción y consumo nacional de carne de bovino 2006-2014 (AMEG, 2015).

En cuanto a la producción de leche de bovino a nivel nacional (Figura 2), se produjeron 11'129.9 millones de litros de leche en 2014 (SIAP-SAGARPA, 2015b), con un crecimiento promedio anual de 1 % (FND, 2014). Los principales estados productores de leche de bovino en la actualidad son Jalisco, Coahuila y Durango (SIAP-SAGARPA, 2015a). Al igual, el consumo aparente de leche incluyendo productos derivados se ha elevado, consumiendo 13'385.3 millones de litros de leche en 2014 (SIAP-SAGARPA, 2015b).

A pesar de que el consumo aparente de productos lácteos ha incrementado en México, el consumo de leche fresca líquida ha disminuido con un simultaneo aumento en el consumo de leche descremada en polvo, siendo México en 2011 el segundo importador de este producto a nivel mundial (FAOSTAT, 2015), solo siendo superado en la actualidad por China (SIAP-SAGARPA, 2015b). Al igual que la leche descremada en polvo, el consumo de productos derivados de la leche como queso, mantequilla y yogurt también ha ido incrementado, por lo que la producción nacional sigue siendo insuficiente para abastecer la demanda; Ubicando a México como un país deficitario en la producción de leche y forzando a importar estos productos en grandes cantidades.

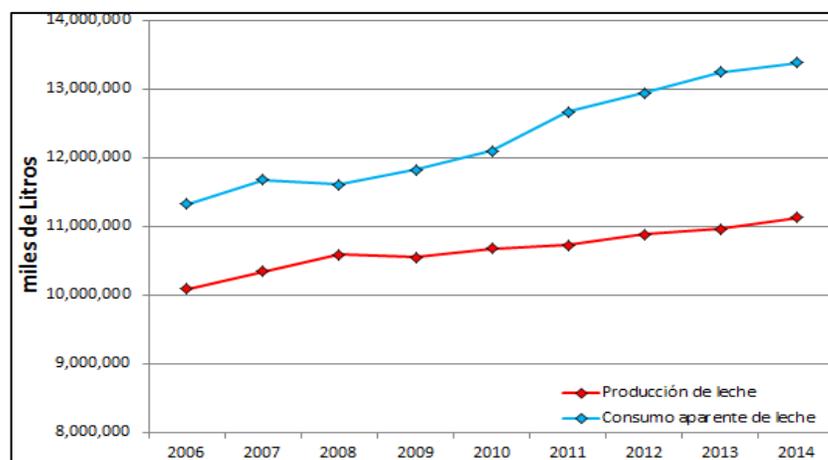


Figura 2. Producción y consumo nacional de leche de bovino 2006-2014 (SIAP-SAGARPA, 2015b).

A nivel mundial la producción de carne y leche de bovino, a pesar de haber crecido en los últimos 50 años, es insuficiente para abastecer la demanda, debido a que la población mundial está creciendo muy rápidamente. De acuerdo con las Naciones Unidas a mediados del 2015, la población mundial se estimó en 7.3 mil millones y se espera que aumente en más de 2 mil millones para el año 2050, alcanzando una cifra de alrededor de 9.7 mil millones de personas (UN, 2015). La mayor parte del crecimiento de la población se producirá en los países en desarrollo, debido a las altas tasas de natalidad y de las poblaciones jóvenes. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) publicó en 2011 las proyecciones de consumo de carne y de productos lácteos de bovino que se esperan para el año 2050 (Cuadro 1). Los datos reportados predicen un incremento en el consumo a nivel mundial de 58 % y solo en los países en desarrollo un incremento de aproximadamente el doble.

Cuadro 1. Proyecciones para el año 2050 en el consumo total de carne y productos lácteos de bovino (Adaptado de FAO, 2011).

	2010	2020	2030	2050	2050/2010
Millones de toneladas					
Mundial					
Carne de bovino	67.3	77.3	88.9	106.3	158 %
Productos lácteos	657.3	755.4	868.1	1034.4	158 %
Países en desarrollo					
Carne de bovino	35.1	43.6	54.2	70.2	200 %
Productos lácteos	296.2	379.2	485.3	640.9	216 %

Este aumento en la demanda trae consigo desafíos en cuanto al uso de recursos globales y a la seguridad alimentaria (World Bank, 2008). Por lo que es necesaria una solución alternativa o sistemas innovadores para aumentar la oferta y poder satisfacer la demanda, realizándolo de una manera sostenible.

El curso actual de las alternativas propuestas al problema, se enfocan en incrementar el número de cabezas de ganado bovino. Sin embargo, el criar más animales no es una solución sostenible, ni económica ni ecológicamente, ya que se presentan varios inconvenientes. La primera es el hecho de que el ganado produce grandes cantidades de metano y aporta hasta 44 % de las emisiones antropogénicas de este gas, con consecuencias de efecto invernadero que contribuyen a la contaminación ambiental (Gerber *et al.*, 2013).

El segundo inconveniente es la superficie necesaria para mantener el ganado, y para ello, se han deforestando grandes bosques con el fin de tener más tierras de pastoreo. Por ejemplo, la expansión agrícola y ganadera son la principal causa de deforestación en América Latina y contribuyen a la pérdida de la biodiversidad (Armenteras y Rodríguez, 2014). Por otra parte, también se tiene que invertir en más agua y alimento para el ganado. La agricultura ha ido cambiando el cultivo de cereales para alimento humano a cultivos de cereales para el ganado, por lo que de cierta manera, compiten con los humanos por el alimento. Dentro de los esfuerzos por encontrar alternativas sustentables para abastecer la demanda de carne y leche de bovino, la investigación y el desarrollo de tecnologías que permitan mejorar la producción de los rumiantes juegan un papel muy importante. Gobiernos como el de Estados Unidos, Alemania y Nueva Zelanda, han invertido muchos recursos económicos en el área ya que la aplicación de la tecnología innovadora puede ahorrar recursos naturales valiosos como la tierra, el agua y el alimento (Cady, 2013).

A fin de desarrollar propuestas innovadoras al problema, es necesario conocer el metabolismo de los rumiantes. Principalmente el metabolismo de los microorganismos presentes en el rumen; encargados de aprovechar los nutrientes del alimento vegetal indigerible por los rumiantes mismos y convertirlos en productos de valor energético para el animal. Estos productos se verán reflejados al final en la formación de alimentos accesibles como productos lácteos y carne.

1.2 Metabolismo ruminal

Los rumiantes son animales mamíferos herbívoros que producen alimentos de alta calidad para el consumo humano como carne y leche, a partir de la digestión de materiales fibrosos (plantas) que no pueden ser utilizados por los animales monogástricos, incluido el hombre. Los rumiantes se alimentan principalmente de plantas que contienen carbohidratos estructurales como celulosa y hemicelulosa, sin embargo por sí mismos tampoco pueden digerirlos. Para esta función poseen un sistema digestivo complejo que les permite aprovechar este tipo de alimentos y de esa forma satisfacer sus requerimientos energéticos. Dentro de este sistema el principal elemento es la fermentación microbiana dentro del rumen. Los microorganismos ruminales son los responsables de degradar y fermentar los carbohidratos, proteínas y lípidos contenidos en el alimento. Los productos de dicha fermentación son compuestos de valor energético para los rumiantes, los cuales absorben y utilizan como fuente de carbono y energía para su crecimiento y producción (Baldwin, 1984; Hobson, 1988; Van Soest, 1994).

Además de los alimentos fibrosos conocidos como forrajes, los rumiantes también se alimentan de granos de cereal ya que aportan carbohidratos altamente fermentables para suplementar sus requerimientos de energía. Los alimentos concentrados se caracterizan por su bajo contenido de fibra y alto contenido de energía. Su uso incrementa la eficiencia y productividad de los animales. Por otro lado, la proteína de la carne de los rumiantes tiene un mayor valor biológico que la proteína presente en su alimento (Oltjen y Beckett, 1996).

A diferencia de los animales monogástricos que presentan un estómago simple, los rumiantes poseen un estómago dividido en cuatro cavidades o compartimientos: retículo, rumen, omaso y abomaso. Al retículo, rumen y omaso se les conoce como pre-estómagos y están desprovistos de células secretoras de cualquier tipo, por lo tanto no realizan secreciones enzimáticas para digerir el alimento.

El único fluido digestivo presente es la saliva, sin embargo, la saliva de los rumiantes no contiene amilasas (Trautmann y Albrecht, 1931), su única función es actuar como amortiguador para mantener el pH adecuado y participa en el reciclaje de nitrógeno. Solo el abomaso tiene las características propias de un estómago simple, ya que posee una mucosa glandular y por sí mismo secreta enzimas digestivas necesarias para desdoblar alimentos complejos. El abomaso es llamado comúnmente “estomago verdadero”.

La ingesta sólida o líquida, entra primero al retículo-rumen. Estos dos pre-estómagos se comunican libremente entre sí, y es donde se lleva a cabo la fermentación del alimento, el mezclado y la mayor absorción de nutrientes. El alimento que ha sido suficientemente fermentado pasa hacia el omaso, pre-estómago responsable de absorber agua y algunos nutrientes. A medida que el alimento atraviesa el omaso, el contenido ruminal se vuelve más seco para su posterior paso al abomaso. Durante las etapas de nacimiento y amamantamiento el sistema digestivo de los rumiantes es rudimentario, pero se desarrolla rápidamente cuando el animal comienza a alimentarse de forrajes (Van Soest, 1994). Los rumiantes tienen el sistema digestivo más diferenciado y complejo de entre todos los mamíferos (Jouany y Morgavi, 2007).

El rumen es un ecosistema abierto y autónomo en el cual el alimento consumido por el animal es fermentado por los microorganismos para formar entre otros ácidos grasos volátiles (AGVs) y biomasa microbiana que sirven como fuente de energía y proteína para los rumiantes (Weimer, 1998). Es también un contenedor adecuado para un medio de cultivo microbiano eficiente ya que ofrece las condiciones necesarias para el crecimiento de muchos microorganismos.

Tiene una capacidad de 100 L o más, dependiendo del tamaño del animal, con un contenido de materia seca entre 10 - 13%. Es un ambiente anaerobio (entre -150 a -350 mV), por lo tanto presenta escasez de oxígeno. Tiene un pH entre 5.5 - 7.0, con un valor promedio de 6.5. El rumen está bien termoregulado ya que mantiene su temperatura entre 38 - 40°C (Clarke, 1997; Dehority, 2003).

La humedad relativa es favorable y la osmolaridad varía entre 250 mOsm/kg (estado hipotónico) antes del alimento y 400 mOsm/kg después del alimento (con respecto a la osmolaridad del plasma, 300 mOsm/kg). Después de la ingestión, la osmolaridad decrece hasta alcanzar el estado hipotónico (Warner y Stacy, 1965).

El rumen asemeja un sistema de cultivo continuo debido a que tiene un constante suministro de nutrientes, condiciones ambientales estables, los productos de la fermentación son removidos y el tiempo de residencia del alimento es compatible con la tasa de fermentación microbiana (Hungate, 1966).

La microbiota ruminal se compone de bacterias, archeas, protozoarios, hongos y también bacteriófagos. Todos forman una compleja comunidad de microorganismos que realizan funciones metabólicas esenciales para el desarrollo, salud y nutrición de los rumiantes (Morgavi *et al.*, 2010). Mientras que la población microbiana ruminal vive en estrecha relación simbiótica con el animal hospedero también hay relaciones simbióticas entre microorganismos (Kurihara *et al.*, 1968).

En el rumen, la fermentación se compone de varias etapas con la participación de diferentes grupos de microorganismos que llevan a cabo interacciones positivas o negativas tales como alimentación cruzada o presa-depredador, y que determinan la eficiencia de la fermentación ruminal (Wolin *et al.*, 1997) (Figura 3).

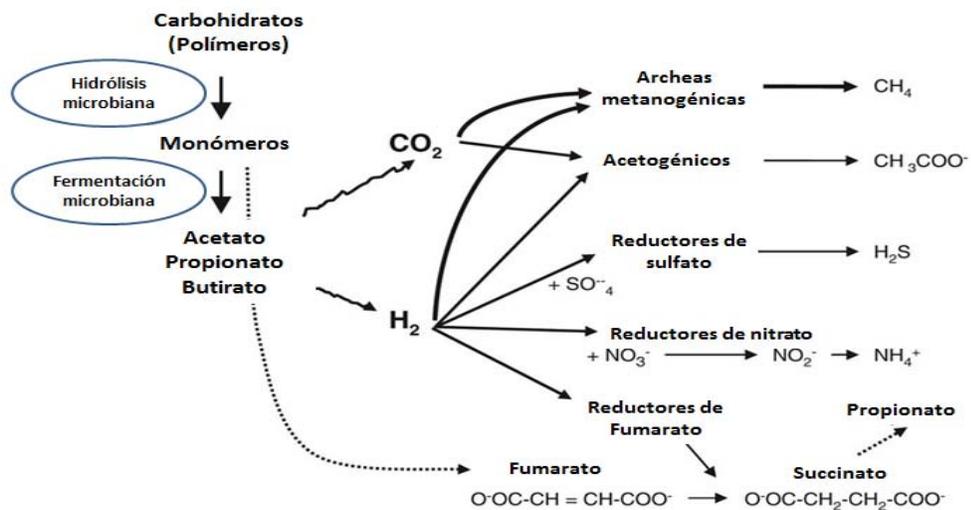


Figura 3. Fermentación ruminal (Adaptado de Morgavi *et al.*, 2010).

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. La segunda etapa es propiamente la fermentación microbiana donde los azúcares y otros compuestos liberados en la hidrólisis son fermentados y convertidos en AGVs (acetato, propionato y butirato), H₂ y CO₂ (Hungate, 1966). 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. 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. También ciertas especies bacterianas reducen compuestos como sulfatos, nitratos e incluso fumarato utilizando el H₂ que se produce en el rumen (Stewart *et al.*, 1997; Morgavi *et al.*, 2010).

1.3 Microorganismos Ruminales

1.3.1 Bacterias

Las bacterias son los microorganismos más abundantes en el rumen. Se encuentran a una concentración de 10¹⁰ - 10¹¹ células/mL. Son responsables de hidrolizar y fermentar las macromoléculas que componen los alimentos. Los productos finales de la fermentación de carbohidratos son mayormente AGVs como acetato, propionato y butirato, los cuales representan la principal fuente de energía para el rumiante y gases como CO₂ y CH₄ (Hungate, 1966). En el rumen existen más de 200 especies y se clasifican en grupos de acuerdo al sustrato que degradan en forma predominante o según los productos finales de su fermentación (Cuadro 2) (Church, 1988).

Cuadro 2. Clasificación de las bacterias ruminales en grupos de acuerdo al tipo de sustrato que degradan (Adaptado de Yokoyama y Johnson, 1988).

Grupo de bacterias	Característica funcional	Productos finales
Celulolíticas <i>Bacteroides succinogenes</i> <i>Ruminococcus flavefaciens</i> <i>Ruminococcus albus</i>	Hidrolizan y fermentan celulosa.	AGVs (especialmente acetato).
Pectinolíticas <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Lachnospira multiparus</i>	Hidrolizan y fermentan pectina.	AGVs (especialmente acetato).
Hemicelulolíticas <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Ruminococcus sp.</i>	Hidrolizan y fermentan hemicelulosa.	AGVs (especialmente acetato).
Amilolíticas <i>Bacteroides amylophilus</i> <i>Streptococcus bovis</i> <i>Succinimonas amyolytica</i>	Hidrolizan y fermentan almidón.	AGVs (especialmente propionato).
Proteolíticas <i>Bacteroides amylophilus</i> <i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Degradan proteínas.	AGVs, péptidos, aminoácidos y amoníaco
Ureolíticas <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> <i>Selenomonas sp.</i> <i>Bacteroides ruminicola</i>	Hidrolizan la urea.	Dióxido de carbono y amoníaco
Sacarolíticas <i>Treponema bryantii</i> <i>Lactobacillus vitulinus</i> <i>Lactobacillus ruminus</i>	Fermentan azúcares simples.	AGVs (especialmente butirato)
Lipolíticas <i>Anaerovibrio lipolytica</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Treponema bryantii</i>	Hidrolizan triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de ácidos grasos.	Ácidos grasos libres y AGVs (especialmente propionato).
Utilizadoras de ácidos <i>Megasphaera elsdenii</i> <i>Selenomonas ruminantium</i>	Metabolizan ácidos intermediarios como el lactato.	Propionato
Productoras de metano <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> <i>Methanobacterium formicicum</i> <i>Methanomicrobium mobile</i>	Producen metano.	Metano
Productoras de amoníaco <i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Megasphaera elsdenii</i> <i>Selenomonas ruminantium</i>	Producen amoníaco.	Amoníaco

Entre los grupos más abundantes están las bacterias celulolíticas como *F. succinogenes* que solo hidrolizan celulosa y fermentan los productos de su hidrólisis para producir acetato; o las bacterias amilolíticas como *R. amylophilus* que solo hidrolizan almidón y producen propionato. A estos grupos se les conoce como “especialistas” ya que solo consumen un tipo de sustrato. Dentro de esta denominación también se encuentran las bacterias hemicelulolíticas y pectinolíticas. En contraste, existen bacterias “generalistas”, las cuales hidrolizan y fermentan un amplio rango de sustratos, como *B. fibrisolvens* que degrada celulosa, almidón, hemicelulosa, pectina, proteínas y lípidos (Stewart *et al.*, 1997).

Otros grupos bacterianos utilizan una variedad de productos de la hidrólisis o de la fermentación de otras bacterias. Entre estos productos intermedios se encuentran lactato, succinato y formato. El lactato puede ser fermentado hasta acetato y propionato, el succinato es convertido en propionato y el formato es precursor del metano.

Las bacterias proteolíticas poseen proteinasas y exopeptidasas para hidrolizar oligopéptidos hasta aminoácidos y péptidos más pequeños. Las bacterias productoras de amoníaco lo forman mediante la desaminación de aminoácidos y se puede formar también de la hidrólisis de la urea por acción de las bacterias ureolíticas. Los aminoácidos y el amoníaco son utilizados por los mismos microorganismos para producir proteína microbiana. Las bacterias lipolíticas hidrolizan triglicéridos y fosfolípidos generando glicerol y ácidos grasos. Y las bacterias sacarolíticas o utilizadoras de azúcares simples degradan monosacáridos como glucosa, fructosa y xilosa (Hungate, 1966; Yokoyama y Johnson, 1988; Stewart *et al.*, 1997).

Las bacterias ruminales son predominantemente gram negativas y anaerobias estrictas, pero también coexisten con anaerobias facultativas, adheridas a las paredes del rumen y encargadas de usar el poco O₂ que entra al sistema digestivo (Van Soest, 1994).

La fermentación de carbohidratos es la principal fuente de energía en forma de enlaces de alta energía de fosfato (ATP) que es utilizada por los microorganismos del rumen para el crecimiento y mantenimiento de sus funciones biológicas. La tasa de replicación de las bacterias es mucho más alta que la de los protozoos; además éstas sufren un constante arrastre hacia el abomaso e intestinos por lo que la población tiene un rápido y continuo recambio. Dentro del rumen, las bacterias pueden localizarse adheridas a los protozoos y a los hongos, adheridas a las partículas de alimento, adheridas al epitelio ruminal, o libres en el medio líquido. Las que se adhieren y colonizan el alimento son muy importantes en la degradación del tejido vegetal, se fijan mediante glicoproteínas lo cual facilita una degradación más eficiente y reduce al mínimo la pérdida de productos hidrolíticos (Baldwin y Allison, 1983).

1.3.2 Arqueas metanogénicas

Las arqueas del rumen son microorganismos anaerobios estrictos y generan metano como producto final de su metabolismo a partir principalmente de la reacción del CO₂ con H₂, y se les conoce como arqueas metanogénicas o microorganismos metanógenos. Pertenecen al dominio *Archaea* del filo *Euryarchaeota* y se encuentran en el rumen en una concentración entre 10⁷ - 10⁹ células/mL dependiendo del tipo de dieta (Kamra, 2005).

A diferencia de las bacterias, los metanógenos no expresan peptidoglicanos en su pared celular y dependiendo de la especie presentan forma de bastón, filamento o cocos (Balch *et al.*, 1979). En términos de metabolismo, los metanógenos ruminales se dividen en (Janssen y Kirs, 2008; Lambie *et al.*, 2015):

- 1) Hidrogenotróficos: los cuales convierten el H₂ o el formato a metano, ejemplo *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium* y *Methanobacterium* spp.
- 2) Metilotróficos: los cuales producen metano a partir de compuestos metilados como metanol y aminas metiladas, ejemplo *Methanosphaera* spp y miembros del orden *Methanomassiliicoccales*.

- 3) Acetoclásticos: los cuales utilizan acetato para producir metano, además de utilizar el H₂ y los compuestos metilados, ejemplo *Methanosarcina*.

Las arqueas metanogénicas tienen un papel muy importante dentro del rumen al consumir el H₂ generado durante la fermentación permitiendo que funcione como un adecuado proceso continuo, debido a que si hay una acumulación de H₂ en el rumen, disminuye la digestibilidad de los alimentos y se desequilibra la actividad fermentativa (Wolin *et al.*, 1997).

1.3.3 Protozoos

Los protozoos, también llamados protozoarios, son microorganismos unicelulares eucariotes pertenecientes al reino Protista y tienen un tamaño aproximado entre 15 - 250 µm de largo y de 10 - 200 µm de ancho. Gruby y Delafond (1843) fueron los primeros en observar y describir a los protozoos ruminales. Se encuentran en menor cantidad que las bacterias, a una concentración de 10⁴ - 10⁶ células/mL. A pesar de que son solo una pequeña fracción del número total de microorganismos ruminales, los protozoos tienen un mayor volumen que representa hasta 50 % de la biomasa ruminal, semejante a la de las bacterias. Una de sus principales funciones en la fermentación es contribuir a la producción de AGVs en el rumen (Williams, 1986; Jouany, 1991).

Son microorganismos estrictamente anaerobios y la mayoría presentan cilios como medio de locomoción, aunque también los hay flagelados. Los protozoos ciliados son los más importantes, se clasifican principalmente dependiendo de sus características morfológicas en holotricos y entodiniomorfos, los cuales tienen diferentes requerimientos nutritivos (Coleman, 1986).

Los protozoos holotricos tienen forma ovalada o redondeada, y su superficie está cubierta de cilios por lo cual son más móviles que los entodiniomorfos. Degradan carbohidratos no estructurales y solubles como fuente de energía y carbono (Williams y Coleman, 1992).

En el rumen se presentan principalmente tres especies: *Isotricha intestinalis*, *Isotricha prostoma*, y *Dasytricha ruminantium*, que fermentan rápidamente glucosa, fructosa, sacarosa, rafinosa, pectina, celobiosa, galactosa, maltosa y pequeños gránulos de almidón. Los productos de su fermentación son acetato, butirato, lactato y trazas de propionato junto con CO₂ e H₂. También sintetizan y almacenan amilopectina a partir de hexosas (Williams y Harfoot, 1976; Prins y Van Hoven, 1997; Van Hoven y Prins, 1977). Además algunos microorganismos metanogénicos se adhieren a la superficie de los protozoos para utilizar inmediatamente el H₂ que se produce (Vogels *et al.*, 1980).

Particularmente, los protozoos holotricos son lo que almacenan polisacáridos de reserva en forma de amilopectina, obteniendo así las principales fuentes de carbono y energía que utilizarán cuando los suministros se agoten durante los intervalos de ingesta de alimento. Esta capacidad evita la degradación rápida de carbohidratos solubles, ya que el sustrato se fermenta lentamente dentro de la célula o se libera hasta que la célula se rompe. Así se puede proteger al rumen de descensos bruscos de pH, si el animal recibe dietas ricas en carbohidratos de alta fermentación (Hungate, 1966; Yokohama y Johnson, 1988).

En contraste, los protozoos entodiniomorfos tienen forma de cilindros aplanados o de esferas, están cubiertos por una capa dura de proteína y solo presentan una banda de cilios en su extremo anterior. Entre los géneros más representativos se encuentran: *Entodinium*, *Epidinium*, *Diplodinium*, *Polyplastron* y *Ophryoscolex* (Williams y Coleman, 1992). Principalmente ingieren alimento particulado como células bacterianas y vegetales, solo en caso de no disponer de estos pueden utilizar carbohidratos solubles.

También ingieren gránulos de almidón como fuente de carbono y energía. Sus productos de fermentación son acetato, butirato, CO₂, H₂ y pequeñas cantidades de lactato, propionato y formato (Abou Akkada y Howard, 1960). Son capaces de adherirse a los tejidos vegetales y degradar parcialmente su pared celular por lo que se les atribuye una participación en la digestión de la fibra (Hungate, 1966).

Otra de sus funciones es metabolizar el lactato para disminuir el pico de acidosis causado por el exceso de carbohidratos fácilmente fermentables, lo cual es un ejemplo de su efecto amortiguador (Jouany, 1994).

1.3.4 Hongos

Los hongos son microorganismos eucariotes heterótrofos que poseen paredes celulares compuestas de quitina. El primer hongo ruminal anaeróbico conocido fue *Neocallimastix frontalis*, el cual fue propuesto por Orpin (1975) al observar que ciertas células móviles, que previamente se creía eran protozoarios flagelados, en realidad eran zoosporas. Y se confirmó que en realidad si eran hongos ya que su pared celular estaba compuesta de quitina. Estos hongos ruminales pertenecen de al orden Neocallimastigales, basados en sus características morfológicas y análisis de la fracción 18S del ARN ribosomal (Hibbett *et al.*, 2007).

Los hongos fueron el último tipo de microorganismo ruminal en ser descubierto por lo que su modo de acción para hidrolizar las partículas de alimento no está bien documentado, y no son esenciales para los rumiantes. Sin embargo, es bien conocido que desempeñan un papel importante en la digestión de la fibra en el rumen y son particularmente abundantes en dietas ricas en forrajes. Los hongos constituyen alrededor del 8 % de la biomasa microbiana ruminal y se encuentran a una concentración de 10^3 - 10^5 células/mL (Orpin y Joblin, 1997). Se han identificado seis géneros en el rumen: *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Orpinomyces*, *Caecomycetes*, *Sphaeromyces* y *Cyllamyces* (Ho y Barr, 1995; Ozkose *et al.*, 2001).

En su fase móvil (zoospora), se reconocen por la presencia de un flagelo que los ayuda a desplazarse en el líquido ruminal hasta llegar a una partícula de alimento. Estos hongos participan en el inicio de la colonización y degradación microbiana de las paredes celulares de las plantas. Una vez en contacto con las partículas de alimento, los hongos se encajan en las fibras formando filamentos ramificados que penetran y debilitan la estructura de la pared vegetal. A partir de este momento comienza la formación de su fase vegetativa no móvil (esporangio) que produce nuevas zoosporas (Bauchop, 1979).

Los hongos ruminales proliferan y sobreviven en ecosistemas colonizados por bacterias y protozoarios, ya que facilitan el acceso a las bacterias que atacan las fibras en los puntos de ruptura que normalmente no están accesibles. De esta manera, se incrementa la superficie disponible para la digestión bacteriana y mejora la degradabilidad de la fibra (Theodorou *et al.*, 1988).

Los hongos del rumen producen complejos enzimáticos compuestos de celulasas, xilanasas, proteasas y esterases, capaces de degradar materiales lignocelulósicos, igual o mejor que las bacterias celulolíticas, e incluso disuelven parte de la lignina. Ya sea secretando enzimas extracelulares al medio o mediante enzimas asociadas a las células (Lowe *et al.*, 1987). Al degradar componentes de las células vegetales, los hongos dependiendo de la especie, pueden producir metabolitos como acetato, lactato, etanol, formato, H₂ y CO₂ (Yarlett *et al.*, 1986).

1.4 Vías metabólicas de producción de AGVs

La ruta principal de la fermentación de hexosas en microorganismos ruminales es la vía Embden–Meyerhof, también conocida como glucólisis. Dos moles de ATP se utilizan para convertir un mol de glucosa a dos moléculas de triosa-fosfato y posteriormente cuatro moles de ATP se forman durante la conversión de las triosas-fosfato en dos moléculas de piruvato y dos de NADH₂. Por lo tanto, los productos netos de la glucólisis son dos moles de ATP, dos de piruvato y dos de NADH₂. Varias enzimas de la vía Embden-Meyerhof se han identificado en la microbiota ruminal indicando que es la principal vía de degradación de glucosa en el rumen (Joyner y Baldwin, 1966).

El piruvato es un intermediario clave en el metabolismo ruminal, ya que puede ser convertido a diversos productos, incluyendo acetato, propionato, butirato, lactato, formato, H₂ y CO₂ (Figura 4). Debido a su rápida conversión a los diversos productos finales antes mencionados, el piruvato apenas se alcanza a detectar en el líquido ruminal (Leng, 1970).

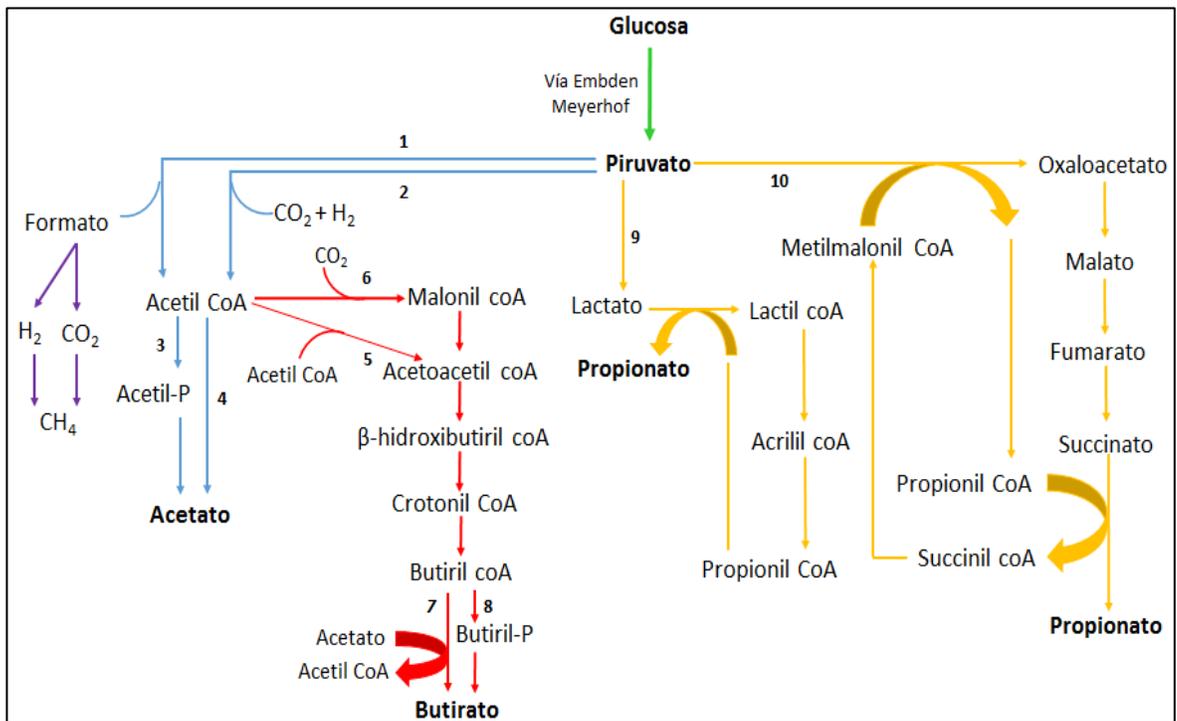


Figura 4. Principales vías de producción de AGVs (Números: 1, 2, 3... etc., se describen en el texto).

1.4.1 Producción de acetato

El acetato es el principal y el más abundante producto de la fermentación de los microorganismos ruminales. Existen dos mecanismos de conversión del piruvato (de tres carbonos) hacia acetato (de dos carbonos) que han sido descritos en la microbiota ruminal, y en ambos hay pérdida de un carbono. La vía más común es la que involucra a la enzima piruvato formiato liasa (Figura 4, Vía No. 1) (Fahey y Berger, 1988), la cual convierte una molécula de piruvato en una de formiato y una de acetil-coA como metabolitos intermedios. El formiato, posteriormente, se convierte en H₂ y CO₂ por acción de otro microorganismo ruminal (Hungate, 1967). La segunda vía (Figura 4, Vía No. 2) oxida al piruvato por medio de la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa, convirtiéndolo en un CO₂, un H₂ y una molécula de acetil-coA con una simultánea reducción de ferredoxina (Baldwin y Allison, 1983).

El acetyl-coA resultante de cualquiera de las dos vías es convertido en acetato, mediante la acción de una fosfotransacetilasa que convierte al acetyl-coA en acetyl-fosfato. Finalmente la enzima acetato cinasa transfiere el grupo fosfato a una molécula de ADP formando un ATP y un acetato (Figura 4, Vía No. 3). Algunos microorganismos como *R. albus* y *R. flavefaciens* realizan una síntesis directa de acetato a partir de acetyl-coA, sin formar acetyl-fosfato como intermediario (Figura 4, Vía No. 4). La primer vía (piruvato formato liasa) es llevada a cabo por bacterias como *B. ruminicola* y *R. albus*, y la segunda vía (piruvato ferredoxina oxidorreductasa) ha sido descrita en microorganismos como *Clostridia*, *M. elsdenii* y *V. alcalescens* (Leng, 1970; Russell y Wallace, 1988).

1.4.2 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 y la vía del acrilato (Johns, 1952). Ninguna de las dos rutas involucra pérdidas de carbono en comparación con la síntesis de acetato y butirato. La primera es la vía del succinato, también llamada vía del ácido dicarboxílico o vía aleatoria, y es la ruta más común y prominente de la conversión de piruvato hacia propionato (Baldwin, 1965). Aproximadamente, 2/3 del propionato formado en el rumen se produce por esta vía, en la cual se incorpora un carbono al piruvato, generalmente un CO₂ o mediante la reacción con una molécula de metilmalonil-coA para formar oxaloacetato (cuatro carbonos), que se convierte en succinato (cuatro carbonos) y posteriormente a propionato (tres carbonos) perdiendo el carbono que ya se había incorporado (Figura 4, Vía No. 10) (Swick y Wood, 1960).

Entre los microorganismos ruminales que llevan a cabo la vía del succinato se encuentran las bacterias del género *Propionibacterium* (Johns, 1951a) y *S. ruminantium* (Paynter y Elsdén, 1970) que producen propionato a partir de glucosa, en contraste con *V. alcalescens* que produce propionato a partir de lactato ya que es incapaz de fermentar azúcares (Johns, 1951b).

La segunda vía fue primeramente descrita por Ladd y Walker (1965) en la bacteria *P. elsdenii* al observar que era capaz de fermentar lactato y acrilato para producir propionato y acetato. Esta ruta es conocida como vía del acrilato, de reducción directa o vía no aleatoria. El succinato no es intermediario en la formación de propionato y el mecanismo se ilustra en la Figura 4, Vía No. 9, donde el piruvato es convertido a lactato, el lactato a lactoil-coA mediante su reacción con un molécula donadora de coA (propionil-coA), el lactoil-coA posteriormente es deshidratado a acrilil-coA y reducido a propionil-coA para finalmente formar propionato, sin que se ganen ni se pierdan carbonos. La coenzima A transferida del propionil-CoA puede ser donada al lactato y continuar el ciclo de formación de propionato (Schweiger y Buckel, 1984). La contribución de esta vía al total de propionato formado en el rumen varía en el rango de 70 a 100 % cuando se utiliza glucosa como sustrato principal (Baldwin *et al.*, 1963).

Al igual que la vía del succinato, la vía del acrilato también puede formar propionato a partir de la fermentación de lactato. La contribución de esta vía al total de propionato formado en el rumen es de 54 % a 88 % cuando hay lactato disponible, y la contribución de esta vía incrementa con el aumento de los carbohidratos altamente fermentables o con la disponibilidad del lactato en la dieta (Baldwin *et al.*, 1962). La bacteria *M. elsdenii* es la única que puede fermentar lactato mediante la vía del acrilato en el rumen (Baldwin, 1965). Utiliza entre 60 % y 80 % del lactato producido en el rumen (Counotte *et al.*, 1981), y es una de las principales bacterias productoras de propionato, especialmente cuando los animales son alimentados con dietas altas en concentrados (Hungate, 1966).

Muchas bacterias como *R. amylophilus* (degrada almidón), *P. ruminicola* (degrada almidón y hemicelulosa), *R. flavefasciens* y *F. succinogenes* (degradan celulosa) producen succinato como un producto de su actividad fermentativa, y lo liberan al medio ruminal. Este succinato es tomado rápidamente y fermentado hasta propionato por *S. ruminantium* (Scheifinger y Wolin, 1973).

Otro ejemplo son los *Lactobacillus* y el *S. bovis*, especies que prosperan con dietas ricas en almidón y que producen altas cantidades de lactato. El lactato es fermentado por otras bacterias, como *M. elsdenii* y *V. alcalescens* hasta propionato, lo que impide que se acumule el lactato.

1.4.3 Producción de butirato

El butirato se sintetiza a partir de acetato o de compuestos que producen acetil-coA, como el piruvato y el glutamato (Barker, 1961), y *B. fibrisolvans* es el principal productor de butirato en el rumen. Existen dos posibles rutas de síntesis, la vía predominante es mediante un proceso de β -oxidación inversa (Miller y Jenesel, 1979), a partir de la condensación de dos moléculas de acetil-coA para generar una molécula de acetoacetil-coA (Figura 4, Vía No. 5). En esta vía, tanto el acetoacetil-coA, el β -hidroxibutiril-coA, el crotonil-coA y el butiril-coA son intermediarios para finalmente producir butirato. Esta vía produce un ATP por mol de butirato producido.

La segunda posible vía de formación del butirato es la que utiliza al malonil-coA como intermediario a partir de la condensación de una molécula de acetil-coA con un CO_2 entrante mediante una acetil-coA carboxilasa (Figura 4, Vía No. 6), para posteriormente ser convertido en acetoacetil-coA y seguir la misma ruta que la primera vía descrita hasta llegar a butirato. La vía del malonil-coA es más utilizada para la síntesis de ácidos grasos de cadena larga y de cadena ramificada (Goldman *et al.*, 1963; Leng, 1970).

Hay dos vías conocidas para catalizar la conversión de butiril-CoA a butirato. La primera involucra a la enzima butiril-CoA:acetato-coA transferasa (Figura 4, Vía No. 7) y la segunda vía utiliza primero una enzima fosfato butiriltransferasa que convierte al butiril-coA en butiril-fosfato (Figura 4, Vía No. 8) para finalmente eliminar el grupo fosfato y formar butirato mediante una butirato cinasa. Esta vía produce un ATP por mol de butirato (Miller y Jenesel, 1979; Vital *et al.*, 2014).

La dieta es el factor más importante para la proporción de los AGVs en el rumen. Las modificaciones en la alimentación de los rumiantes pueden cambiar los patrones de fermentación. En dietas con alto contenido de forraje, el patrón de AGVs en la fermentación ruminal fluctúa entre 65:25:10 a 70:20:10 (acetato: propionato: butirato, en porcentaje molar), mientras que en una dieta alta en concentrados las proporciones de AGVs varían entre 45:40:15 a 50:40:10 (Shimada, 1983). Y en dietas compuestas únicamente de forrajes, el patrón de AGVs genera una mezcla en proporción molar de entre 65 - 74 % de acetato, 15 - 20 % de propionato y 8 - 16 % de butirato (Thomas y Rook, 1977).

1.5 Sistemas bioelectroquímicos

1.5.1 Sistemas bioelectroquímicos: fundamentos y clasificación

Los sistemas bioelectroquímicos (BES, por sus siglas en inglés) se basan en la capacidad de algunos microorganismos para catalizar diferentes reacciones electroquímicas, específicamente, reacciones que involucren una transferencia de electrones como las de óxido-reducción (Rabaey *et al.*, 2007; Rozendal *et al.*, 2008). En la literatura también se denominan tecnologías electroquímicas microbianas (METs, por sus siglas en inglés) (Logan y Rabaey, 2012).

Dependiendo de su modo de operación y de su aplicación se clasifican en cuatro grandes categorías: celdas de combustible microbianas (CCMs) para la generación de energía eléctrica, celdas de electrólisis microbianas (CEMs) que producen principalmente compuestos químicos inorgánicos como el hidrógeno, celdas de electrosíntesis microbianas (CESMs) para la síntesis de compuestos químicos orgánicos y celdas de desalinización microbianas (CDMs) utilizadas para la desalinización del agua en combinación con otras funciones (Wang y Ren, 2013). Entre todos los sistemas, las CCMs son las más estudiadas y son el modelo del cual parten todas las demás, conocidas como celdas microbianas CXM, donde la X representa diferentes aplicaciones (Harnisch y Schröder, 2010).

1.5.2 Celdas de combustible microbianas

Las CCMs son dispositivos que utilizan a los microorganismos para oxidar la materia orgánica e inorgánica y generar energía eléctrica (Logan *et al.*, 2006). Consisten de dos electrodos, un ánodo y un cátodo, que están unidos por un cable externo formando un circuito eléctrico completo, además los compartimientos o cámaras que contienen a los electrodos están separadas por una membrana permeable solo a protones (Bond y Lovley, 2003).

En la cámara anódica los microorganismos crecen y oxidan el sustrato disponible en condiciones anaerobias, liberan electrones, protones y CO₂ al medio. Los protones se dirigen a la cámara catódica atravesando la membrana de intercambio protónico, y al mismo tiempo los electrones son dirigidos al ánodo, gracias a la habilidad que tienen algunos microorganismos de transferir electrones fuera de la célula, lo que se conoce como transferencia de electrones extracelular, TEE (Rabaey, 2010). Una vez en el ánodo viajan al cátodo a través del cable externo que conecta a los electrodos, 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 (Rabaey y Verstraete, 2005; Logan y Regan, 2006a; Lovley, 2006).

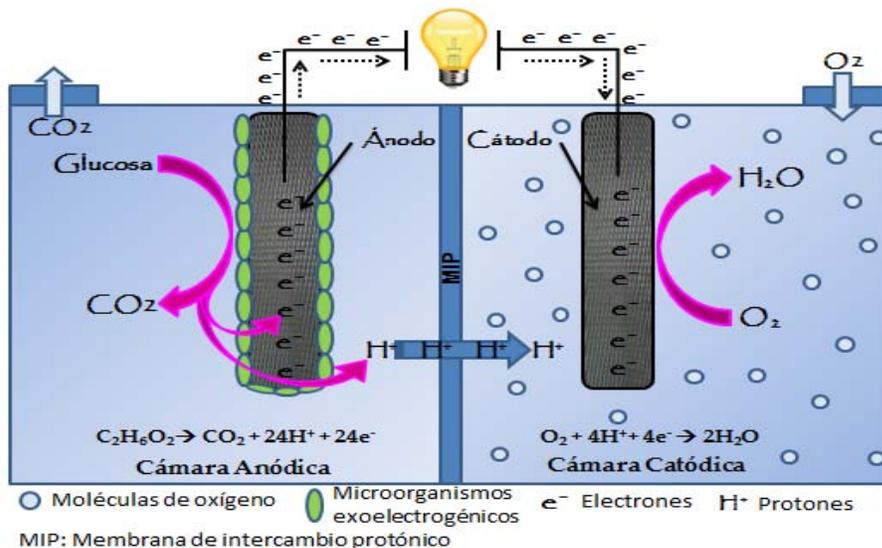


Figura 5. Celda de combustible microbiana

Cuando el oxígeno o moléculas como nitratos y sulfatos, están en la cámara catódica, la generación de corriente eléctrica es producida, pero si no están presentes, la generación no es espontánea. Los electrones que llegan al cátodo reducen alguna molécula para completar el proceso de óxido-reducción (que comenzó en el ánodo) y estimular la corriente eléctrica (Pant *et al.*, 2012). Los microorganismos que generan energía eléctrica se llaman exoelectrogénicos por su capacidad de transferir electrones fuera de la célula (Logan y Regan, 2006b).

1.5.3 Celdas de electrólisis microbianas

Cuando en lugar de utilizar las celdas para producir electricidad, se hace el proceso reverso y se aplica una corriente eléctrica desde una fuente externa, se crea el segundo tipo de sistemas. Las CEMs son un tipo de sistema bioelectroquímico al que se le proporciona energía eléctrica 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 (Logan, 2008).

Funcionan de manera parecida a una CCM y fueron diseñadas para producir H_2 (Liu *et al.*, 2005). Consisten en utilizar los electrones que llegan al cátodo, como ocurre en una CCM, pero con la finalidad de combinarse con los protones para producir H_2 , por lo tanto, este sistema es anaerobio para que los electrones y protones no se combinen con el O_2 . Esta reacción no es espontánea, necesita de energía externa además de la generada por las bacterias para llevar a cabo la reacción (Logan y Grot, 2006; Rozendal *et al.*, 2006). Este proceso es conocido como electrohidrogenesis o electrólisis microbiana (Cheng y Logan, 2007).

El voltaje o potencial eléctrico es la presión o fuerza con la que se empuja a los electrones para que lleguen al cátodo, y se administra a través de una fuente de poder de corriente directa o un potenciostato. Para la producción de H_2 , el voltaje generado por los microorganismos en el ánodo no es suficiente para dirigir la reacción, es por esto que un voltaje externo debe aplicarse. Los cálculos para determinar el voltaje necesario se basan en la energía libre de Gibbs de la reacción (Call y Logan, 2008; Logan *et al.*, 2008; Rozendal *et al.*, 2008).

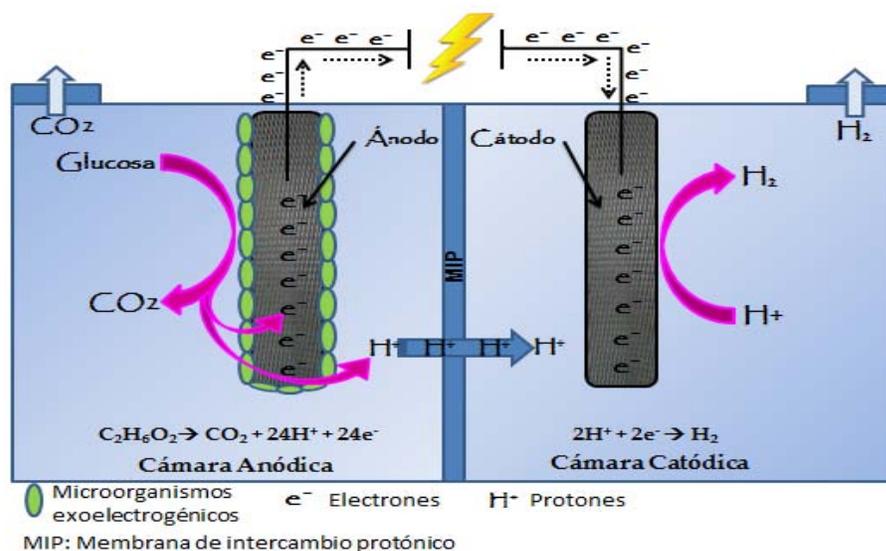


Figura 6. Celdas de electrólisis microbianas

La materia orgánica biodegradable que se puede utilizar en estos sistemas es variable, desde moléculas simples como acetato, glucosa, almidón hasta mezclas complejas como las aguas residuales de las industrias (Pant *et al.*, 2010). Los sistemas bioelectroquímicos más estudiados son las CCMs y las CEMs, y una característica importante de ellos es la ausencia de microorganismos en el cátodo. No obstante, la definición de Hamelers *et al.*, (2010) de sistemas bioelectroquímicos, especifica que son tecnologías que utilizan microorganismos tanto en el ánodo para catalizar reacciones de oxidación, como en el cátodo para reacciones de reducción, es decir, puede haber microorganismos al mismo tiempo en los dos electrodos.

Cuando los microorganismos están en la cámara anódica, le transfieren electrones al ánodo; y cuando están en la cámara catódica, la transferencia ocurre en dirección contraria, el cátodo cede electrones a los microorganismos (Gregory *et al.*, 2004). La finalidad de consumir y aprovechar estos electrones se enfoca en estimular y modificar el metabolismo microbiano (Thrash y Coates, 2008).

1.5.4 Celdas de electrosíntesis microbiana

Las CESM se refieren al tipo de sistemas bioelectroquímicos que se basan en la electrosíntesis microbiana; término que se acuñó por primera vez por Nevin *et al.* (2010), para referirse al proceso en el que la electricidad es fuente de energía para que algunos microorganismos sintetizen compuestos orgánicos a partir de CO_2 . Algunos ejemplos de los compuestos obtenidos mediante esta técnica son acetato (Nevin *et al.*, 2010), butirato (Ganigué *et al.*, 2015) e incluso metano (Cheng *et al.*, 2009).

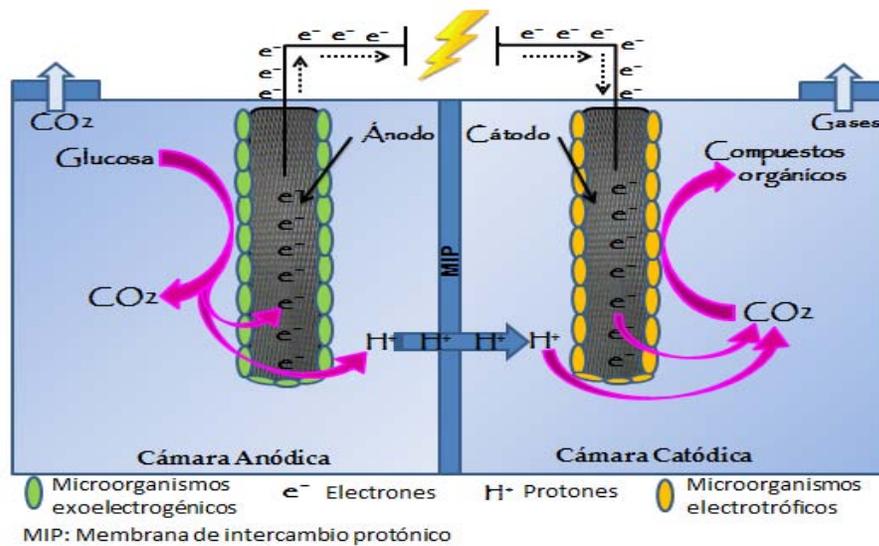


Figura 7. Celda de electrosíntesis microbiana

Posteriormente al surgimiento del término de electrosíntesis microbiana, se ocupó también para referirse a la síntesis de compuestos orgánicos a partir de sustratos diferentes del CO_2 , como la glucosa o el glicerol (Rabaey y Rozendal, 2010). Esta técnica era ya conocida también como electrofermentación, y actualmente varios autores siguen utilizando este nombre como un término más adecuado para diferenciarla de la electrosíntesis microbiana a partir de CO_2 (Kracke y Krömer, 2014; Rosenbaum y Franks, 2014; Harnisch *et al.*, 2015).

1.5.5 Electrofermentación

Esta técnica tiene como finalidad manipular los patrones de una fermentación mediante la aplicación de corriente eléctrica a un medio de cultivo, lo que modifica los productos finales (Rabaey y Rozendal, 2010). Cada microorganismo tiene un metabolismo específico basado en un flujo de electrones que determina como se lleva a cabo una fermentación. Si este flujo de electrones se altera por la acción moduladora de otro flujo de electrones (en forma de corriente eléctrica), las vías metabólicas ya existentes se redirigen, y aumentan o disminuyen los productos de fermentación. De tal manera que, al cambiar el flujo de electrones también cambia el flujo de carbonos (Logan y Rabaey, 2012).

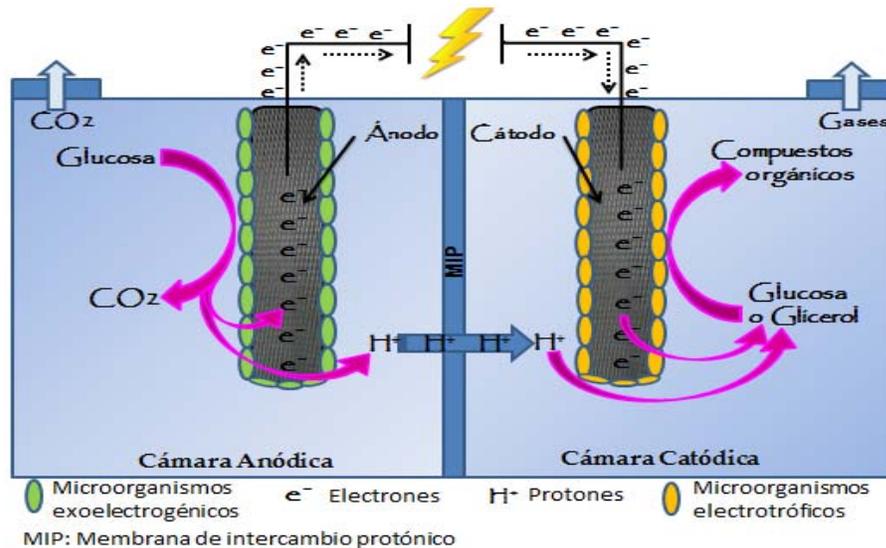


Figura 8. Celda de electrofermentación

La energía necesaria para acelerar o desviar una vía fermentativa depende del sustrato y del producto en cuestión, y debe ser lo suficientemente baja para no provocar la muerte celular, pero lo suficientemente alta para estimular cambios en el metabolismo microbiano. Algunos microorganismos tienen la capacidad de aceptar electrones, ya sea directa o indirectamente, y esto puede aprovecharse con fines diferentes, como el tratamiento de aguas residuales, fijación de carbono, formación de compuestos químicos o biorremediación (Rosenbaum *et al.*, 2011).

La corriente eléctrica puede actuar como una fuente de poder reductor o equivalentes reductores, regenerando rápidamente las coenzimas NAD⁺ y NADP⁺ para formar NADH y NADPH. La abundancia de estas moléculas en las células representa una manera efectiva de incrementar el rendimiento de los productos de la fermentación (Kim y Kim, 1988; Park y Zeikus, 1999).

Otra manera en la que la corriente eléctrica puede contribuir al cambio en las vías metabólicas es mediante la formación de H₂, como ocurre en las CEMs. El H₂ es donador de electrones en la fermentación, y no hay una interacción directa entre el electrodo y los microorganismos (Steinbusch *et al.*, 2010; Harnisch *et al.*, 2015). La acumulación de este producto incrementa la presión parcial de hidrógeno en una fermentación, y en consecuencia habrá un cambio en el balance de electrones y en el metabolismo microbiano (Yerushalmi *et al.*, 1985).

1.5.6 Mecanismos de transferencia de electrones

Se han descrito varios mecanismos por los cuales los microorganismos transfieren o reciben los electrones hacia o desde un electrodo:

- Transferencia de electrones directa: mediante el contacto de los microorganismos con la superficie de un electrodo. Las bacterias presentan en su membrana o en la matriz extracelular diversidad de proteínas redox activas como los citocromos c o complejos enzimáticos asociados a membrana (Lovley, 2012). El mecanismo también incluye la transferencia de electrones mediante pilis conductivos o nanocables; estas estructuras tienen una forma de pelo muy delgado, los microorganismos los forman en respuesta a la transferencia limitada de electrones y permiten a las células que no se encuentran unidas a los electrodos establecer un contacto directo (Reguera *et al.*, 2005).
- Transferencia de electrones indirecta: mediante moléculas redox orgánicas e inorgánicas, que los microorganismos secretan o liberan en la degradación de materiales biológicos. Dichas moléculas son reducidas u oxidadas fuera de la membrana celular para donar o aceptar los electrones hacia o desde un electrodo.

Se conocen como mediadores redox endógenos y los más estudiados son las piocianinas y los ácidos húmicos (Rabaey *et al.*, 2007). Este mecanismo también funciona con moléculas redox artificiales que son agregadas al medio. Éstas moléculas son referidas como mediadores redox exógenos y los más utilizados son el rojo neutro, el metil viológeno y el ácido antraquinona-2,6-disulfónico. A pesar de sus ventajas, los mediadores artificiales pueden ser tóxicos para los microorganismos y representan un costo adicional de operación (Huang y Angelidaki, 2008).

1.5.7 Manipulación del metabolismo microbiano por electrofermentación

Los sistemas bioelectroquímicos han sido aplicados para incrementar la síntesis de una variedad de productos de fermentación. Hongo e Iwahara (1979a), desarrollaron un método al que denominaron fermentación electro-energizante, (EEF, por sus siglas en inglés), actualmente conocido como electrofermentación. Esta metodología consistió en aplicar una corriente eléctrica directa de 1.5 V a un cultivo de *B. flavum*, a través de un electrodo de platino, con el fin de acelerar su metabolismo reductor. Los autores sugirieron que el incremento en la producción era estimulada por la acción reductora del cátodo, mediante la transferencia de electrones hacia los microorganismos (Hongo e Iwahara, 1979b).

Posteriormente a los trabajos de investigación de Hongo e Iwahara, le han seguido varios trabajos similares hasta la actualidad (2016) que se resumen en el Cuadro 3. Se han evaluado diversos microorganismos principalmente como cultivos puros pero también hay algunos estudios con cultivos mixtos. En general, las investigaciones en electrofermentación se han enfocado en incrementar la producción de alcoholes como butanol y etanol, y la producción de ácidos grasos de cadena corta como succinato, butirato, lactato y propionato.

En teoría, se espera que cualquier metabolismo fermentativo pueda ser manipulado mediante un suministro electroquímico de equivalentes reductores, que cambien la relación molar $NAD^+/NADH$, ya sea en presencia o en ausencia de un mediador redox exógeno (Peguin *et al.*, 1994).

Cuadro 3. Ejemplos de la manipulación del metabolismo microbiano mediante electrofermentación

Microorganismo	Producto	Sustrato	Voltaje y mediador redox	Control	Reactor bioelectroquímico	Incremento en el producto	Ref.
			Volts	Concentración o rendimiento del producto		%	
<i>Brevibacterium flavum</i>	Glutamato	Glucosa	1.5 V Rojo neutro	44.3 mg / mL	51 mg / mL	15 %	Hongo e Iwahara, 1979b.
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Butanol	Glucosa	-2.5 V Viológeno de metilo	74.6 mM	93.7 mM	26 %	Kim y Kim, 1988.
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Butanol	Glucosa	-0.56 V Viológeno de metilo	0.09 mol / mol glucosa	0.42 mol / mol glucosa	367%	Peguín <i>et al.</i> , 1994.
<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Succinato Etanol	Glucosa	2.0 V Rojo neutro	51.27 mM 5.21 mM	82.88 mM 21.1 mM	62% 305%	Park y Zeikus, 1999.
<i>Trichosporon capitatum</i>	6-bromo-2-tetralol	6-bromo-2-tetralona	-5.0 V Sin mediador	0.95 g / L	1.41 g / L	48%	Shin <i>et al.</i> , 2001.
<i>Clostridium thermocellum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol	Glucosa	-1.5 V Rojo neutro	1.04 g / L 46.7 g / L	1.68 g / L 52.5 g / L	61% 12%	Shin <i>et al.</i> , 2002.
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Butirato	Sacarosa	-0.4 V Rojo neutro	5.0 g / L	8.8 g / L	76%	Choi <i>et al.</i> , 2012.
Cultivo mixto	1,3-Propanodiol	Glicerol	-0.9 V Sin mediador	0.25 mol / mol glicerol	0.50 mol / mol glicerol	100%	Zhou <i>et al.</i> , 2013.
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Lactato	Glucosa	-0.6 V AQ	1.10 mol / mol glucosa	1.62 mol / mol glucosa	47%	Sasaki <i>et al.</i> , 2014.
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Butanol	Glucosa	0.045 V Sin mediador	5.4 mM	13.5 mM	150%	Choi <i>et al.</i> , 2014.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Etanol Lactato	Glicerol	-0.65 V Rojo neutro	9.61 mM 2.66 mM	22.34 mM 5.64 mM	93 % 76 %	Harrington <i>et al.</i> , 2015.

AQ: ácido antraquinona-2,6-disulfónico

De acuerdo a la información presentada en el Cuadro 3, se observa que los sustratos más frecuentes en las electrofermentaciones son la glucosa y el glicerol, y los mediadores redox más utilizados son el rojo neutro y el viológeno de metilo a diferentes potenciales de voltaje. Los porcentajes de incremento en la concentración o el rendimiento del producto varían dependiendo del tipo de microorganismo y de las condiciones de la electrofermentación.

Cada vez son más los microorganismos evaluados bajo condiciones de electrofermentación que han presentado resultados favorables. Solo en la década de los 2000 los estudios se reducen por estar centrados en el desarrollo de las celdas de electrosíntesis microbiana a partir de CO₂ (Nevin *et al.*, 2010).

1.5.8 Sistemas bioelectroquímicos para incrementar la producción de propionato

Las bacterias anaerobias del género *Propionibacterium* son las principales productoras de propionato a partir de la fermentación de glucosa o lactato, y como metabolitos secundarios también generan acetato y CO₂ en una relación molar de 2:1:1. Pero la concentración de los productos finales puede variar por diversos factores del cultivo, la cepa bacteriana y el sustrato (Piveteau, 1999).

El primer estudio para incrementar la concentración de propionato en un medio de cultivo bacteriano se realizó administrando H₂ y con esto aumentar la presión parcial del medio de cultivo de *P. arboris*. Esta bacteria es gram-negativa y produce propionato, acetato y CO₂ como productos de fermentación de la glucosa. La aplicación de dos atmósferas de H₂ en el medio cambió drásticamente la relación molar propionato-acetato de 2:1 a 16:1. Así, el propionato incrementó su concentración casi como único producto final (12.6 mmol de propionato y 0.8 mmol de acetato), y la fermentación control produjo 11.2 mmol de propionato y 5.8 mmol de acetato. El exceso de H₂ alteró el flujo de carbonos y electrones previniendo que el piruvato se transformara en acetato, H₂ y CO₂ (Thompson *et al.*, 1984).

El primer sistema bioelectroquímico como tal, para incrementar la concentración de propionato en un cultivo bacteriano fue el realizado por Emde y Schink (1990). Dichos autores evaluaron un sistema de electrodos para cambiar los patrones de fermentación de *P. freudenreichii*, con glucosa como sustrato en un sistema amperométrico de tres electrodos: un electrodo de trabajo conectado a un potenciostato que aplica un potencial eléctrico, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar a través del cual fluye la corriente que es registrada. En este sistema de cultivo se probaron cuatro diferentes mediadores exógenos: ácido antraquinona-2,6-disulfónico (AQ), sepulcrato de cobalto (CoS), bencil viológeno y metil viológeno, con un potencial anódico 40 mV más negativo que el potencial redox estándar de cada mediador.

Durante los primeros ensayos se observó que el bencil y el metil viológeno inhibieron el crecimiento de las bacterias y no se registró transferencia de electrones, ni producción de propionato, debido probablemente a la despolarización de la membrana celular, ocasionada por la producción de radicales superóxido, la consecuente peroxidación lipídica de la membrana y a la disminución de NADP. En cambio, con AQ y CoS se observó que grandes cantidades de electrones eran transferidas con un incremento en la producción de propionato. En presencia del AQ, 90 % del total de productos correspondían al propionato con una concentración de 475 μM y 53 μM de acetato; en cambio con CoS se obtuvieron 624 μM de propionato y 17 μM de acetato, estas cantidades indicaron que el propionato representaba 97.3 % de los productos finales.

Posteriormente, Schuppert *et al.* (1992) incrementaron la producción de propionato en la fermentación de un medio de cultivo de *P. acidipropionici* con suero de leche como sustrato. Basándose en los hallazgos previos utilizaron como mediador redox al CoS y un electrodo de platino a un potencial de -0.47 V. Con la aplicación de un potencial eléctrico, la lactosa del suero de leche se fermentó para producir 70 mM de propionato, sin acetato. Lo cual representó la obtención de un 100 % de propionato en el medio de cultivo, comparado con el control en el que se produjeron 49 mM de propionato y 23 mM de acetato. No obstante, en experimentos aún sin la adición de mediadores redox en cultivos continuos hubo transferencia de electrones del electrodo a los microorganismos. Este hecho indicó que el mediador redox podría no ser necesario, disminuyendo así los costos del proceso de escalamiento en modo continuo (Schuppert *et al.*, 1992).

Wang *et al.* (2008) evaluaron si *P. freudenreichii* ET-3 era capaz de utilizar, como mediador redox, un estimulador de crecimiento de bifidobacterias que ellos mismos secretan al medio de cultivo. Este mediador conocido como ácido 1,4-dihidroxi-2-naftoico, regenera las moléculas de NAD⁺. Su objetivo fue desarrollar un sistema aplicando 0.4 V y sin añadir un mediador redox para observar el efecto sobre la producción de propionato en la fermentación de glucosa.

El resultado que ellos observaron fue un cambio en la relación molar acetato: propionato de 2:3 (11.5 mmol de acetato y 17.7 mmol de propionato) a 1:1 (13.6 mmol de acetato y 13.7 mmol de propionato). Estos resultados demostraron la disminución en la producción de propionato, probablemente ocasionada por la disminución de electrones disponibles para formarlo y el incremento de la oxidación de los sustratos hasta acetato y CO₂. Los resultados indicaron que esas condiciones no son adecuadas para incrementar la concentración de propionato.

1.5.9 Métodos bioelectroquímicos para estudiar la fermentación ruminal

El primer estudio sobre los procesos bioelectroquímicos en la fermentación ruminal se enfocó en la posibilidad de generar electricidad en CCMs con microorganismos ruminales como biocatalizadores. Rismani-Yazdi *et al.* (2007) reportaron el uso de comunidades microbianas ruminales para la conversión de celulosa en energía eléctrica, mediante sistemas bioelectroquímicos que utilizan un medio mineral suplementado con líquido ruminal.

Los investigadores demostraron que efectivamente la microbiota ruminal podía utilizarse para generar electricidad a partir de celulosa, ya que era capaz de transferir electrones hacia un electrodo y producir una corriente eléctrica constante sin adicionar un mediador redox por 60 días al menos. Posteriormente, interesados en conocer la composición de la microbiota presente en las celdas, realizaron un análisis filogenético de los microorganismos mediante la amplificación del gen 16S del ARN ribosomal. Entre los principales géneros identificados están *Firmicutes*, *Clostridium*, *Sedimentibacter*, *Desulfotomaculum* y *Ruminococcus*, bacterias que hidrolizan biomasa lignocelulósica vía un sistema complejo de celulasas conocido como celulosoma (Rismani-Yazdi *et al.*, 2007).

Las CCMs pueden utilizarse también como una herramienta para estudiar a los microorganismos ruminales y sus funciones fisiológicas. Uno de los aspectos más importantes es como manipular la relación entre el metano y los AGVs. La producción del metano representa hasta 12 % de pérdida de energía en el rumiante, con un impacto directo en la eficiencia de fermentación.

Dentro de la microbiota ruminal se encuentran las archeas metanogénicas, productoras de metano a partir de H_2 y CO_2 , su función es muy importante para que la fermentación se lleve a cabo adecuadamente (Wolin *et al.*, 1997).

Las CCMs pueden actuar positivamente como alternativa para la utilización del hidrógeno producido en el rumen, utilizándolo como donador de electrones para las comunidades microbianas electrogénicas, y favoreciendo las condiciones para incrementar la producción de propionato y acetato; también compite con las archeas metanogénicas por el uso del H_2 (Bretschger *et al.*, 2009).

Ishii *et al.* (2008) demostraron que dentro de una CCM se inhibía la metanogénesis, de $0.128 \text{ mmol d}^{-1}$ de metano en una fermentación control a $0.009 \text{ mmol d}^{-1}$ de metano dentro de las celdas durante las primeras 30 horas, además se incrementaba temporalmente la concentración de acetato y propionato en muestras de suelo que originalmente producían altas concentraciones de metano.

Por último, Wang *et al.* (2012) estudiaron el efecto de la degradación de paja como sustrato para los microorganismos ruminales sobre la producción de AGVs y la generación de electricidad. Para estos experimentos las CCMs también consistieron en celdas de dos cámaras y los electrodos utilizados fueron placas de grafito. Ellos observaron que la concentración total de AGVs incrementó rápidamente después de la inoculación con microorganismos ruminales, pero a partir de obtener cierta concentración alta empezó a disminuir; los autores explicaron que los microorganismos a partir de cierta concentración utilizaron los AGVs, los oxidaron y continuaron generando electricidad a falta de otro sustrato disponible en el medio.

2. JUSTIFICACIÓN

Un enfoque exitoso para mejorar la producción de los rumiantes ha sido promover un aumento en la disponibilidad energética para el animal, mediante el incremento en la síntesis hepática de glucosa. La gluconeogénesis es su principal vía de suministro, debido a que los rumiantes obtienen menos del 10 % de su requerimiento de glucosa directamente por absorción en el intestino (Young, 1977). Diversos productos de la digestión son fuentes de carbono para la gluconeogénesis: el propionato es cuantitativamente el más importante, seguido por el lactato y los aminoácidos glucogénicos (Huntington *et al.*, 2006). La contribución de AGVs glucogénicos (propionato, isobutirato y valerato) a la formación de glucosa hepática oscila entre 44-78 %, y el propionato representa hasta 95 % de estos AGVs (Larsen y Kristensen, 2013).

La cantidad de propionato que se absorbe a través de la pared ruminal determina la cantidad de lactosa en la leche así como el volumen de su producción. La lactosa regula la osmolaridad de la leche y su concentración en ella es relativamente constante, las células secretoras de la glándula mamaria agregan agua hasta lograr una concentración de lactosa de aproximadamente 4.5 %. Por lo tanto, el volumen de leche es determinado casi completamente por el suministro de glucosa a la glándula mamaria para la síntesis de la lactosa. La glucosa es sintetizada por el hígado, y a su vez depende del suministro de propionato que proviene de la fermentación de los carbohidratos en el rumen.

Aunado a esto, el incremento de propionato en el rumen produce mayor eficiencia energética, reducción en la pérdida calórica, disminución en el uso de aminoácidos para la gluconeogénesis y un incremento en la síntesis de proteína corporal. Lo que se traduce en una ganancia de peso debido al aumento de los niveles de glucosa en sangre y que representa una mayor energía disponible para el animal (Shimada, 1991).

Metodologías diversas se han desarrollado para incrementar la concentración de propionato en el rumen; por ejemplo, la administración de ionóforos como la monensina (Van Maanen *et al.*, 1978), la administración de propilenglicol y glicerol (Cozzi *et al.*, 1996), la administración en la dieta de precursores del propionato como el acrilato y fumarato de sodio, que además disminuyen la producción de metano *in vitro* (Newbold *et al.*, 2005), y otros estudios reportan que la defaunación del rumen también incrementa la producción de propionato (Williams y Withers, 1991). Sin embargo, los ejemplos mencionados presentan desventajas, lo que mantiene activo el desarrollo de nuevas metodologías para incrementar el propionato a nivel ruminal.

Existen otras alternativas que se pueden desarrollar para modificar la fermentación ruminal sin alterar factores importantes como la dieta y sin realizar modificaciones genéticas. Considerando que la fermentación es básicamente un flujo de electrones que van desde compuestos que se oxidan (donadores de electrones) hasta compuestos que se reducen (aceptores de electrones) mediante moléculas transportadoras, es factible pensar que este flujo de electrones puede ser modificado por una fuente de electrones externa (energía eléctrica), alterando de esta manera los patrones de fermentación; y para lograr estos cambios en el metabolismo microbiano se han desarrollado técnicas conocidas como sistemas bioelectroquímicos.

3. HIPÓTESIS

La fermentación de los microorganismos ruminales cambiará al modificar el flujo de electrones de su metabolismo, dirigiéndolo hacia un incremento en la producción de ácidos grasos volátiles a través del uso de energía electroquímica como fuente de equivalentes reductores.

4. OBJETIVO GENERAL

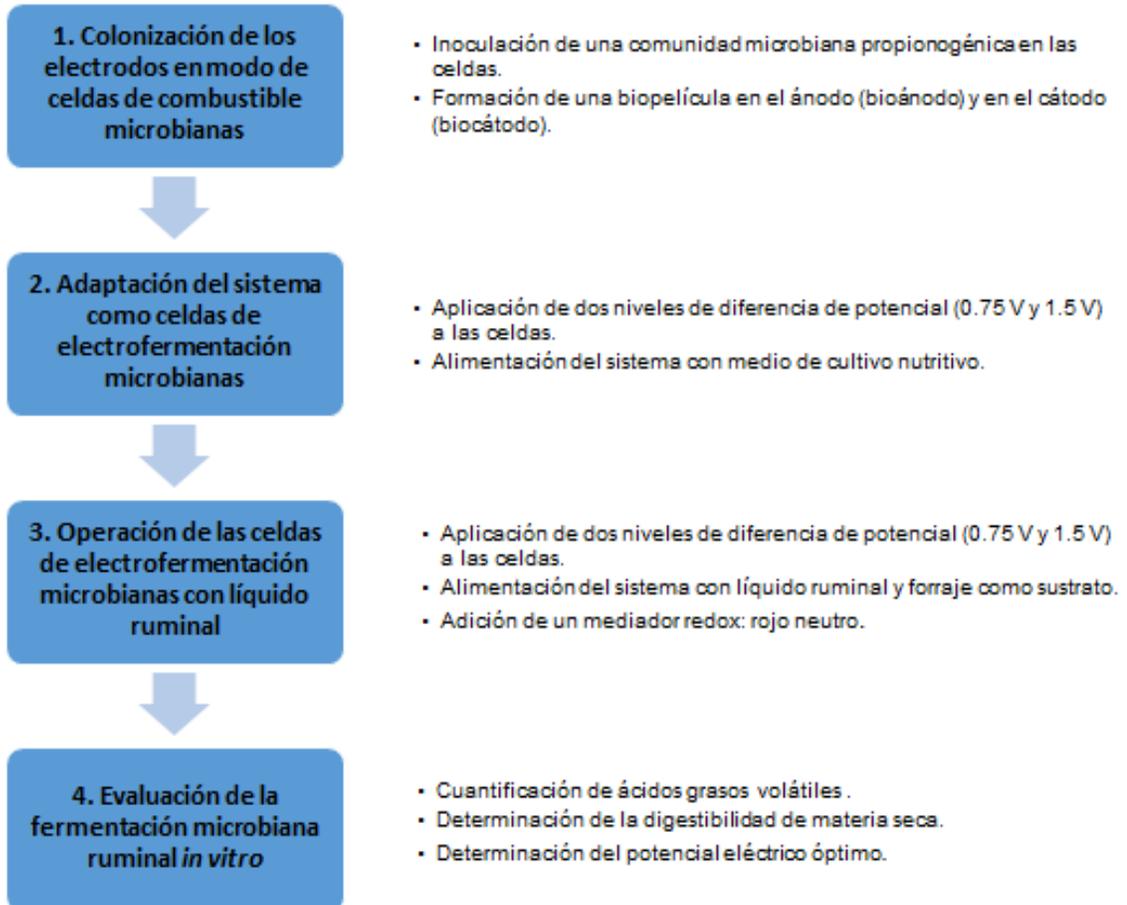
Modificar la fermentación de los microorganismos ruminales dentro de celdas electroquímicas microbianas provocando una mayor producción de ácidos grasos volátiles en líquido ruminal *in vitro*.

4.1 Objetivos Específicos

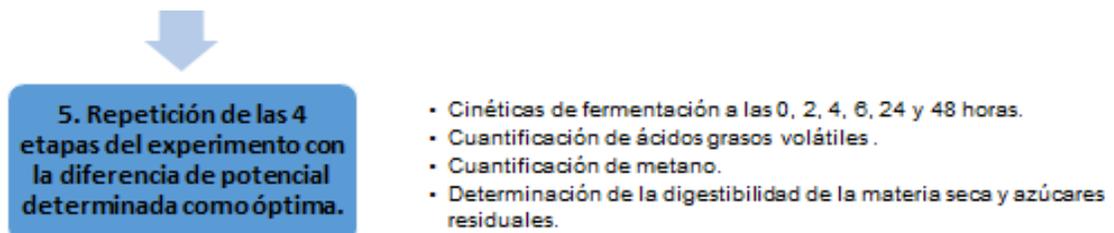
- A. Diseñar y construir una celda electroquímica microbiana.
- B. Evaluar los cambios en la fermentación de microorganismos ruminales dentro de una celda electroquímica microbiana bajo dos niveles de potencial eléctrico.
- C. Evaluar el efecto del rojo neutro como mediador redox sobre la fermentación de microorganismos ruminales *in vitro* dentro de una celda electroquímica microbiana.
- D. Estudiar el efecto del potencial eléctrico de una celda electroquímica microbiana sobre la producción de los ácidos grasos volátiles en líquido ruminal *in vitro*.
- E. Evaluar la cinética de fermentación en la producción de AGVs y gases bajo el mejor potencial eléctrico.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Sección I:



Sección II:



6. SECCIÓN I: METODOLOGÍA

La sección I comprende la realización de los objetivos específicos A, B, C y D así como los puntos 1, 2, 3 y 4 de la estrategia experimental.

6.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

6.1.1 Comunidad microbiana propionogénica

Una comunidad microbiana compuesta de un conjunto de microorganismos propionogénicos aislados de aguas residuales de una granja de cerdos fue proporcionada por el Dr. Toshio Shimada de la Universidad de Illinois en Urbana Champaign, para ser utilizados en la etapa de colonización de los electrodos dentro de las celdas de combustible microbianas y en la etapa de adaptación como celdas de electrofermentación microbianas. De acuerdo a estudios previos, (Shimada *et al.*, 2007; Shimada *et al.*, 2011) se determinó que una de las características de dicha comunidad microbiana era su elevada producción de propionato, razón por la cual nuestro interés de trabajar con estos microorganismos. La clasificación de las bacterias que la conforman se menciona en el Cuadro 4. Los microorganismos fueron cultivados a 37°C bajo condiciones anaerobias en medio nutritivo A que contiene (por litro): glucosa, 2 g; extracto de levadura, 1 g; triptona, 2 g; KH_2PO_4 , 1 g; K_2HPO_4 , 1.66 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g; CaCl_2 , 0.1 g; NaCl , 0.1 g; MgSO_4 , 0.1 g; NaHCO_3 , 3.5 g, L-cisteína, 0.5 g; solución de vitaminas, 1.25 %; y solución de minerales, 1.25 %. El pH del medio fue ajustado a 6.5 antes de esterilizar por autoclave 15 minutos a 121°C (Shimada *et al.*, 2007).

Solución de minerales compuesta por (g/L): $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g; EDTA, 0.5 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g; Na_2SeO_3 , 0.1 g; $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g; H_3BO_3 , 0.05 g; ZnCl_2 , 0.05 g; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g; y $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g (Visser, 1995). Solución de vitaminas compuesta por (mg/L): biotina, 2.0 mg; ácido fólico, 2.0 mg; piridoxina-HCl, 10.0 mg; riboflavina, 5.0 mg; tiamina, 5.0 mg; ácido nicotínico, 5.0 mg; ácido pantoténico, 5.0 mg; vitamina B12, 0.1 mg; ácido p-aminobenzoico, 5.0 mg; y ácido lipóico, 5.0 mg (Wolin *et al.*, 1963).

Cuadro 4. Clasificación de los microorganismos presentes en la comunidad bacteriana propionogénica (Adaptado de Shimada *et al.*, 2011).

Filo	Familia
Actinobacteria	<i>Propionibacteriaceae</i>
	<i>Nocardioideaceae</i>
Bacteroidetes	<i>Rikenellaceae</i>
	<i>Prophyromonadaceae</i>
Chloriflexi	<i>Anaerolineaceae</i>
	<i>Caldilineaceae</i>
Firmicutes	<i>Ruminococcaceae</i>
	<i>Clostridiaceae</i>
	<i>Veillonellaceae</i>
	<i>Peptococcaceae</i>
	<i>Enterococcaceae</i>
Nitrospira	<i>Nitrospiraceae</i>
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>
	<i>Syntrophobacteraceae</i>
	<i>Syntrophaceae</i>
	<i>Methylocystaceae</i>
	<i>Desulfovibrionaceae</i>
	<i>Vibrionaceae</i>
Spirochaetes	<i>Spirochaetaceae</i>

6.1.2 Microorganismos ruminales

Para la obtención del líquido ruminal se emplearon 2 borregos Pelibuey machos adultos, provistos de una cánula ruminal y alimentados con una dieta a base de forraje compuesto de partes iguales de pasto Ryegrass, Orchard variedad Potomac y Bromo inerme. Se recolectaron las muestras de líquido por la mañana antes de su primera alimentación. El procedimiento consistió en introducir una sonda en el rumen a través de la cánula y aspirar por medio de un sistema de sifón (bomba de extracción por vacío). Se recogió el fluido ruminal en un recipiente limpio con tapa hermética y se mantuvo a 39°C durante su traslado al laboratorio, donde al llegar se mezcló con solución amortiguadora de saliva artificial en una relación 4:1. Las muestras de líquido ruminal se gasearon con CO₂ para desplazar el O₂ y mantener un ambiente anaerobio.

Solución amortiguadora de saliva artificial: Se preparó al mezclar la solución amortiguadora A y la solución amortiguadora B en una relación 5:1. La solución amortiguadora A contiene por litro: K_2HPO_4 , 10 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; NaCl, 0.5 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.1 g; Urea, 0.5 g; y la solución amortiguadora B contiene por litro: Na_2CO_3 , 15 g; $Na_2S \cdot 9H_2O$, 1 g. La mezcla se ajusta a un pH final de 6.8 y se mantiene a 39°C hasta su incorporación al líquido ruminal (ANKOM Technology).

6.2 Diseño y construcción de las celdas

Se diseñaron y construyeron cuatro celdas de dos cámaras con base cilíndrica en material acrílico. La Figura 9 muestra una fotografía de la celda con las siguientes dimensiones: longitud, 8 cm por cámara; diámetro, 3.5 cm y volumen de trabajo 100 cm³ por cámara. Los electrodos (ánodo y cátodo) fueron hechos de tela de grafito (Brunsen de Occidente S.A. de C.V., Jal, México) en rectángulos de 8 x 3 cm, con un alambre de titanio (Sigma Aldrich Co., St. Louis, Missouri) de 8 cm de longitud y 0.5 mm de grosor, entretejido en la tela de grafito para posteriormente poder realizar las conexiones al sistema de adquisición de datos.

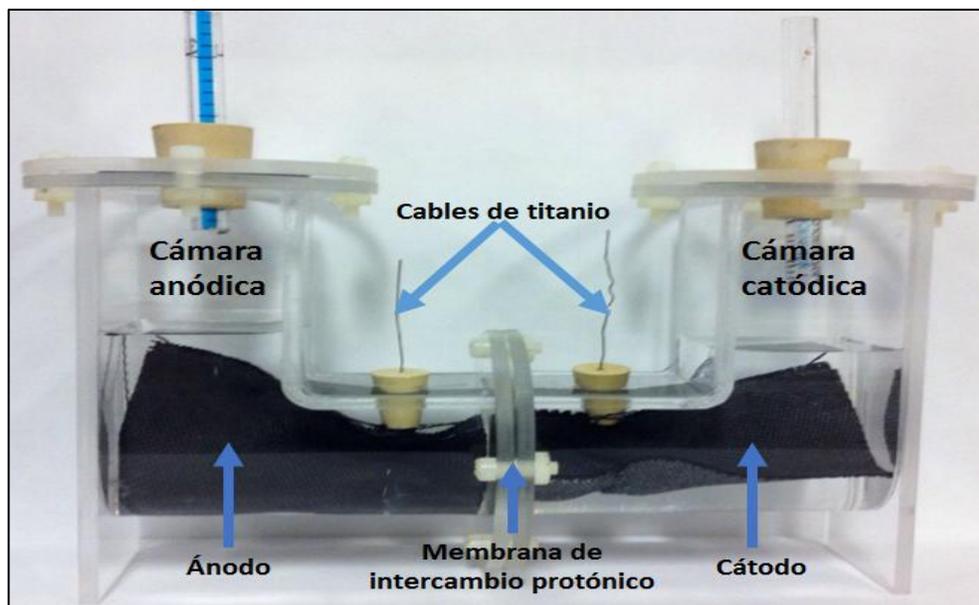


Figura 9. Fotografía de la celda bioelectroquímica microbiana

Cada alambre de titanio atravesaba un tapón de hule que sellaba las celdas. Las cámaras estaban separadas por una membrana de intercambio protónico Nafion 117 (Electrochem, Inc., MA, Estados Unidos), a la cual se le dio un tratamiento previo a ensamblarse en la celda: una hora en peróxido de hidrógeno al 3 % a 80°C, una hora en agua destilada a 80°C, una hora en H₂SO₄ 0.5 M a 80°C y por último una hora en agua destilada a 80°C (Zawodzinski *et al.*, 1993).

6.3 Colonización de los electrodos (ánodo y cátodo)

La colonización de los electrodos es la formación de una biopelícula sobre un material inerte que conduce electricidad. Una biopelícula es un conjunto de células microbianas que están adheridas o asociadas a una superficie y se encuentran protegidas dentro de una matriz de polisacáridos que ellos mismos sintetizan (Donlan, 2002).

Es un proceso que comienza con la unión de células planctónicas (libres en suspensión) a una superficie mediante fuerzas de van der Waals, de carácter débil y reversible, posteriormente se dividen y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia, similar a la formación de colonias en placas de agar. Si estas microcolonias permanecen el tiempo suficiente, pueden anclarse irreversiblemente a la superficie utilizando estructuras de adhesión más especializadas como los pili y secretando exopolisacáridos que forman la matriz extracelular que las protege. La biopelícula incrementa su masa por división celular y comienza a desplegarse en una forma tridimensional. Una vez que alcanza la madurez, algunas células se liberan de la matriz para poder colonizar nuevas superficies (Stoodley *et al.*, 2002).

Para la colonización de los electrodos o formación de la biopelícula, las celdas se operaron como celdas de combustible microbianas en modo de lotes, llamados ciclos de operación, cada ciclo con una duración de 48 horas. La cámara anódica y la cámara catódica contenían 100 mL de medio de cultivo B con un inóculo de la comunidad microbiana propionogénica al 0.05 %.

El medio de cultivo B contiene la siguiente composición: 75 % de medio de cultivo nutritivo A y 25 % de solución amortiguadora de fosfatos 100 mM pH 7.0, esterilizada en autoclave.

Posteriormente a inocular las bacterias, las cámaras de las celdas se gasearon con nitrógeno durante 30 segundos, con el fin de desplazar el O₂ del medio y del espacio de cabeza de la cámara creando un ambiente anaerobio, propio para el crecimiento de los microorganismos de la comunidad propionogénica. Las celdas se colocaron dentro de una incubadora a 37°C para mantener la temperatura constante.

Para la conformación del circuito externo de las celdas se conectó el alambre de titanio (entretejido en los electrodos) a una tarjeta de pruebas mediante un cable caimán-caimán. En la tarjeta de pruebas se colocó una resistencia fija de 1000 Ω y se conectó mediante un cable de cobre a una tarjeta de adquisición de datos USB 6008 (National Instruments, TX, Estados Unidos), acoplada a una computadora que registraba la señal de voltaje con el Software Labview 2013 (National Instruments, TX, Estados Unidos). A partir del voltaje registrado se calculó la densidad de corriente (mA/m²) con las siguientes ecuaciones:

$$J = I / A$$

$$I = V / R$$

Dónde:

- J: Densidad de corriente (A/m²)
- I: Intensidad (A)
- A = Área del electrodo (m²)

Dónde:

- I: Intensidad (A)
- V: Potencial eléctrico (V)
- R: Resistencia (Ohms)

Se operaron las celdas como celdas de combustible microbianas hasta obtener una densidad de corriente reproducible durante tres ciclos de operación continuos (Rivera *et al.*, 2015).

6.4 Operación del sistema como celdas de electrofermentación

6.4.1 Etapa de adaptación

Una vez colonizados los electrodos se operó el sistema como celdas de electrofermentación con las mismas bacterias propionogénicas pero aplicando dos niveles de potencial eléctrico, 0.75 V (750 mV) para un par de celdas y 1.5 V (1500 mV) para otro par de celdas, mediante su conexión a una fuente de poder GW Instek GPS-4303 (Instek America Corp, CA, Estados Unidos). La terminal positiva (cable rojo) de la fuente de poder se conectó al ánodo y la terminal negativa (cable negro) al cátodo. Las diferencias de potencial fueron elegidas en base a la literatura, cuando se adiciona el mediador redox rojo neutro a una fermentación bajo condiciones electroenergizantes (Hongo e Iwahara, 1979a y b; Park y Zeikus, 1999; Shin *et al.*, 2002).

Para la fase de adaptación se alimentaron las celdas en modo de lote con medio de cultivo B en ciclos de operación de 24 horas. Se tomaron muestras del medio al término de cada ciclo para cuantificar los AGVs (acetato, propionato y butirato) hasta obtener una concentración reproducible de AGVs durante al menos tres ciclos seguidos en el medio. Posteriormente a estabilizar la producción de AGVs en el sistema bioelectroquímico se procedió a inocular las celdas con microorganismos ruminales y evaluar el efecto de las diferencias de potencial sobre la fermentación ruminal dentro de las celdas electroquímicas microbianas.

6.4.2 Preparación del sustrato para los microorganismos ruminales

El sustrato para los microorganismos ruminales fue un forraje compuesto de tres partes iguales de pasto Ryegrass, Orchard variedad Potomac y Bromo inerme. Se adicionó a las celdas dentro de bolsas nylon F57 con porosidad de 25 μm (ANKOM Technology, NY, Estados Unidos), previamente molido. Las bolsas fueron lavadas con acetona durante cinco minutos y secadas completamente al aire. La acetona remueve un surfactante (una cera en la superficie de la bolsa) que bloquea los poros de la bolsa e inhibe la digestión microbiana.

Las bolsas fueron pesadas individualmente y su peso se registró como P1; se pesaron 0.25 g (P2) de forraje molido y se colocaron directamente dentro de cada bolsa. Finalmente, se sellaron con una selladora por calor y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso (ANKOM Technology).

6.4.3 Celdas de electrofermentación con líquido ruminal

Subsiguiente a la adaptación del sistema, se continuó con la aplicación de las diferencias de potencial, 0.75 V para dos celdas y 1.5 V para las otras dos, utilizando una resistencia externa de 1000 Ω determinada previamente mediante una curva de polarización. Pero en esta ocasión se inocularon los microorganismos ruminales mediante la alimentación de las celdas con 100 mL de líquido ruminal, previamente extraído y mezclado con saliva artificial. A cada celda se le agregaron cuatro bolsas de sustrato, dos en la cámara anódica y dos en la cámara catódica. Las celdas fueron gaseadas con CO₂ durante 30 segundos por cámara para desplazar el O₂ y asegurar un ambiente anaerobio.

El diseño del experimento consistió en un diseño completamente al azar en un arreglo factorial 2 x 2, dos factores con dos niveles. Factor A: presencia o ausencia de rojo neutro como mediador redox 100 μ M en el líquido ruminal, y Factor B: presencia o ausencia del potencial eléctrico en la celda electroquímica microbiana. Se realizaron cuatro pruebas por potencial eléctrico a evaluar como se indica en el Cuadro 5. Cuatro pruebas para 0.75 V y cuatro para 1.5 V. Se corrieron los experimentos por triplicado.

Cuadro 5. Combinaciones de experimentos a evaluar sección I

Nombre de referencia del experimento	Rojo neutro como mediador redox	Potencial eléctrico (0.75 V o 1.5 V)
Control	Sin	Sin
Control con rojo neutro	Con	Sin
Celda bioelectroquímica	Sin	Con
Celda bioelectroquímica con rojo neutro	Con	Con

El rojo neutro fue elegido como mediador redox ya que presenta propiedades ideales para el transporte de electrones como formar un par redox reversible en el electrodo, ser estable en forma oxidada y reducida, no descomponerse a largo plazo, unirse o pasar a través de la membrana celular, ser soluble en sistemas acuosos y tener un potencial de reducción estándar a pH 7.0 de -0.325 V similar al de las coenzimas NAD/NADH de -0.32 V, lo que significa que funciona como un electrocatalizador para reducir y oxidar a NAD/NADH indispensables en el metabolismo (Park y Zeikus, 1999; Park y Zeikus, 2000; Arechederra *et al.*, 2011).

Los controles son fermentaciones dentro de las celdas sin electrodos ni conexiones, simplemente se utilizaron como un contenedor para que las pruebas tuvieran las mismas condiciones de agitación y difusión de temperatura. El nombre del experimento corresponde a como se hará referencia de las diferentes pruebas durante el análisis de resultados. La figura 10 muestra el montaje del sistema. Los experimentos se realizaron en lote con una duración de cada ciclo de 24 horas, a temperatura de 39°C dentro de una incubadora con agitación de 100 rpm. Como variable dependiente se cuantificó la concentración de los AGVs en las diferentes pruebas al término de las incubaciones (24 horas), así como la determinación de la digestibilidad de la materia seca del sustrato.

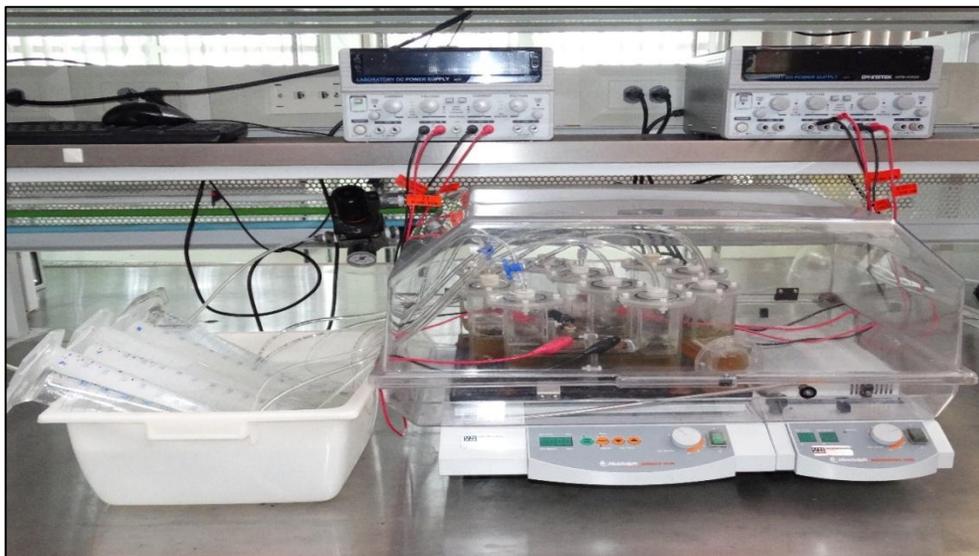


Figura 10. Fotografía del sistema de experimentación *in vitro*

6.5 Cuantificación de AGVs

Para la cuantificación de los productos de fermentación (acetato, propionato, butirato), 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.

Para la preparación de las muestras se tomó 1.5 mL de líquido ruminal de la cámara catódica de cada celda al término de las incubaciones (24 horas), se centrifugaron a 3500 x g por 10 min a 4°C para sedimentar el pellet celular, posteriormente se recuperaron 1200 µL de sobrenadante en un tubo Eppendorf nuevo y se le agregaron 240 µL de ácido metafosfórico al 25 % para obtener una relación 5:1. Se incubaron los tubos en hielo por 30 min para sedimentar las proteínas y centrifugar después a 12 000 x g por 15 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron finalmente filtrados con membranas de fibra de vidrio y almacenados en dilución 1:4 a -20°C hasta el momento de su análisis.

6.6 Digestibilidad de la materia seca

Las bolsas de nylon que contenían el sustrato (forraje molido) fueron recuperadas de las celdas al término de las incubaciones (24 horas). Se lavaron con agua de la llave varias veces hasta que el agua saliera limpia para remover los restos de microorganismos.

Posteriormente al lavado, se secaron las bolsas en un horno a 60°C durante 12 horas y se pesaron las bolsas secas en una balanza analítica para registrar el peso final de cada bolsa como P3. Para calcular el porcentaje de digestibilidad de la materia seca se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Digestibilidad} = \frac{100 - (P3 - (P1 \times C)) \times 100}{P2}$$

P1= Peso original de la bolsa (sin muestra)

P2= Peso de la muestra

P3= Peso final de la bolsa (después de las fermentaciones *in vitro*).

C= Factor de corrección (Peso final de la bolsa blanco / peso original de la bolsa blanco).

6.7 Modelo estadístico

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

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

Dónde:

- Y_{ijk} = es la ijk -ésima observación en el i -ésimo nivel del factor A y en el j -ésimo nivel del factor B.
- μ = es la media general.
- τ_i = es el efecto del i -ésimo nivel del factor A.
- β_j = es el efecto del j -ésimo nivel del factor B.
- $(\tau\beta)_{ij}$ = es el efecto de la interacción del i -ésimo nivel del factor A con el j -ésimo nivel del factor B.
- ϵ_{ij} = error aleatorio experimental.

7. SECCIÓN I: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Colonización de los electrodos

Durante la colonización de los electrodos (adherencia de los microorganismos) se utilizó una comunidad microbiana propionogénica (Cuadro 4) aislada de aguas residuales de una granja de cerdos. Se operó el sistema como celdas de combustible microbianas, de las cuales se registró el voltaje producido en cada ciclo de operación mediante un sistema de adquisición de datos. El operar las celdas de este modo estimula y favorece la colonización de los electrodos. A partir del voltaje generado, la resistencia externa de las celdas y el área del electrodo, se calculó la densidad de corriente (corriente eléctrica por unidad de área, en este caso el área de los electrodos).

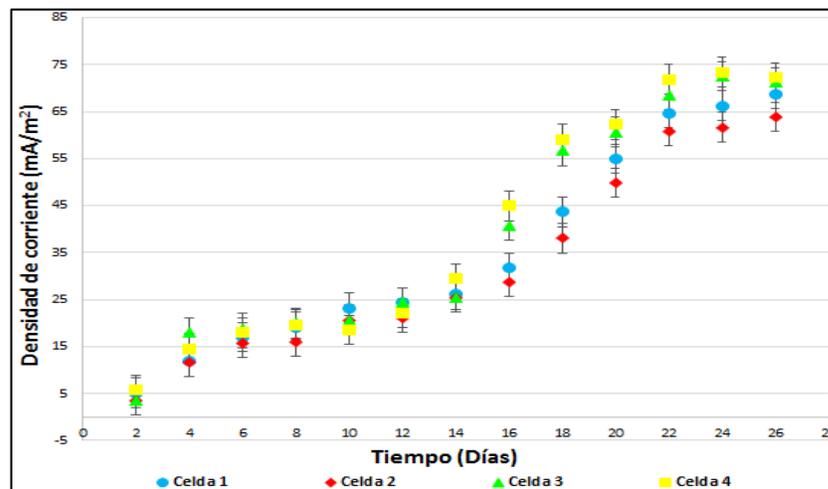


Figura 11. Densidad de corriente en las celdas de combustible microbianas durante la etapa de colonización de los electrodos

La Figura 11, muestra la densidad de corriente (mA/m^2) generada por los microorganismos en cada una de las 4 celdas durante 26 días (13 ciclos de operación). En los primeros ciclos, no hubo variación en la densidad de corriente, fue hasta los 18 días (ciclo 9) para las celdas 1 y 2, y 16 días (ciclo 8) para las celdas 3 y 4, que comenzó a notarse una diferencia en la densidad de corriente producida.

La fase de colonización de los electrodos o formación de la biopelícula se considera lista y estable (es decir, los microorganismos están firmemente adheridos a los electrodos) cuando el voltaje máximo producido y por lo tanto la densidad de corriente generada, es reproducible en al menos tres ciclos de operación seguidos (Call y Logan, 2008; Ren *et al.*, 2014).

Para las cuatro celdas, a partir del ciclo 11 (22 días) y durante los ciclos 12 (24 días) y 13 (26 días) se obtuvo una densidad de corriente constante de $67.98 \pm 3.13 \text{ mA/m}^2$, por lo que se consideró que al término de los 26 días las celdas presentaban un desempeño estable y adecuado para continuar con los experimentos de electrofermentación.

7.2 Adaptación del sistema como celdas de electrofermentación

Después de la colonización de los electrodos, se cambió el modo de operación del sistema desde celdas de combustible microbianas a celdas de electrofermentación (referidas en este trabajo como celdas bioelectroquímicas), utilizando las mismas bacterias propionogénicas pero aplicando un potencial eléctrico mediante la conexión de las celdas a una fuente de poder externa como se mostró en la Figura 10.

El objetivo de esta etapa fue iniciar el proceso de electrofermentación, permitiendo al sistema y en específico a los microorganismos un periodo de adaptación al estímulo de la energía eléctrica. Para esta fase de adaptación se mantuvieron las celdas en cultivo en modo de lote adicionando medio de cultivo B con glucosa como sustrato (mismo medio utilizando en la etapa de colonización) por siete ciclos de operación con una duración de 24 horas cada ciclo.

El potencial eléctrico (0.75 V y 1.5 V) creado por la fuente de poder externa se aplicó a las celdas durante todo el tiempo de cultivo y se tomaron muestras del medio de la cámara catódica al término de cada ciclo de operación (cada 24 horas) para cuantificar la concentración de los AGVs mediante cromatografía de gases.

La Figura 12, representa la evolución de la producción de AGVs durante siete días (siete ciclos de operación) en el medio de cultivo de la cámara catódica, donde se observó que en las celdas bioelectroquímicas con un potencial eléctrico aplicado de 0.75 V se obtuvo una producción estable a partir del día cinco (cinco ciclos de operación) y para las celdas bioelectroquímicas con un potencial eléctrico aplicado de 1.5 V desde el día cuatro (cuatro ciclos de operación), por lo que al término de siete días se podía considerar que las celdas estaban adaptadas al nuevo modo de operación.

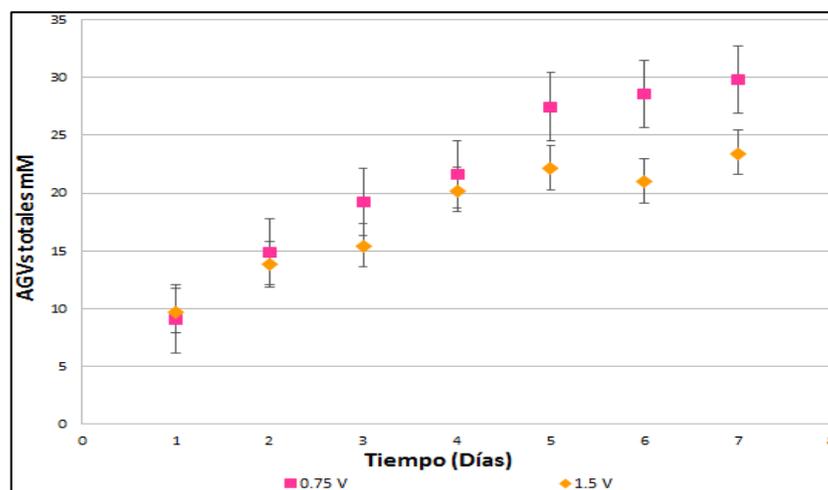


Figura 12. Producción de AGVs totales durante la etapa de adaptación de las celdas bioelectroquímicas

Los datos mostrados en la Figura 12 indican que el periodo de adaptación es muy importante para los microorganismos ya que al aplicar la corriente eléctrica durante los primeros ciclos de operación se obtiene una producción de AGVs mermada o limitada a comparación de los ciclos subsecuentes.

Este hecho significa que el metabolismo de las bacterias necesita de un tiempo determinado para estabilizarse o acostumbrarse a la energía eléctrica independientemente del nivel de voltaje aplicado al sistema y poder desarrollar así su máxima capacidad de producción de AGVs.

7.3 Producción de AGVs bajo un potencial eléctrico de 0.75 V

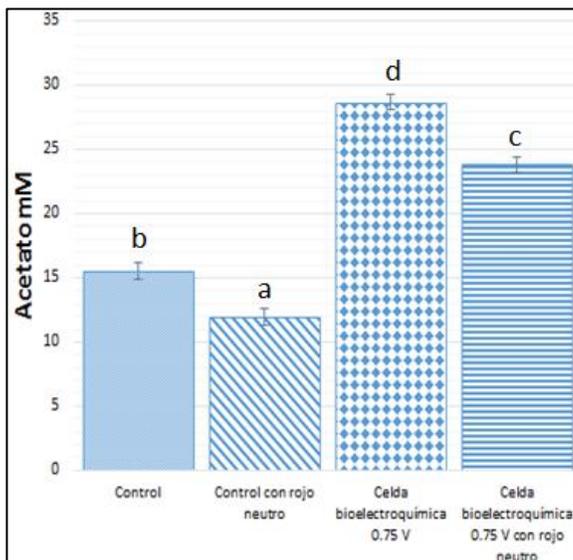
Una vez concluida la etapa de adaptación, el medio de cultivo B fue reemplazado por líquido ruminal para evaluar el efecto de la corriente eléctrica sobre los microorganismos ruminales. El voltaje se aplicó desde el tiempo cero así como el mediador rojo neutro en las respectivas pruebas (Cuadro 5). A las 24 hrs de fermentación se tomó una muestra de líquido ruminal para cuantificar AGVs.

Las celdas bioelectroquímicas con un potencial eléctrico aplicado de 0.75 V estimularon un incremento ($p < 0.0001$ y $n=6$) en la producción de los tres AGVs: acetato, propionato y butirato en el líquido ruminal *in vitro*. La Figura 13, muestra las concentraciones obtenidas en las cuatro pruebas para cada AGV, sin embargo se observa un comportamiento similar entre ellos:

- Se observó una mayor producción de AGVs en las celdas bioelectroquímicas (con y sin rojo neutro) que en las celdas control (con y sin rojo neutro), demostrando que el incremento en la producción de AGVs fue debido a la electrofermentación y no a una fermentación por microorganismos ruminales.
- Se observó que el mediador redox rojo neutro influye negativamente en la producción de AGVs, ya que en presencia del mediador redox no se alcanza la misma concentración que se obtiene en su ausencia, este efecto fue encontrado tanto en las celdas control como en las celdas bioelectroquímicas.
- No hay interacción entre los dos factores evaluados, es decir, el mediador redox rojo neutro no influye sobre el efecto de la corriente eléctrica aplicada a los microorganismos, los factores actúan de manera independiente.

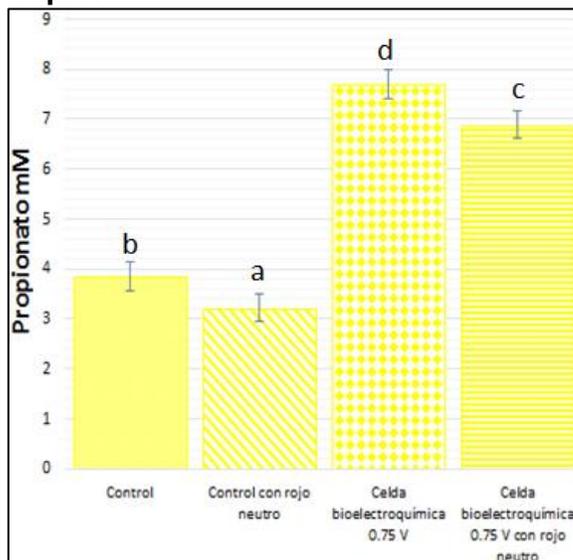
En las celdas bioelectroquímicas con 0.75 V y en ausencia del rojo neutro, la producción de AGVs con respecto a la celda control (sin rojo neutro) incrementó en 84 % para acetato, 99 % para propionato y 66 % para butirato ($p < 0.0001$ y $n=6$); y dentro de las celdas bioelectroquímicas con 0.75 V en presencia del rojo neutro, la producción con respecto al control (sin rojo neutro) incrementó en 53 % para acetato, 79 % para propionato y 51 % para butirato ($p < 0.0001$ y $n=6$).

Acetato



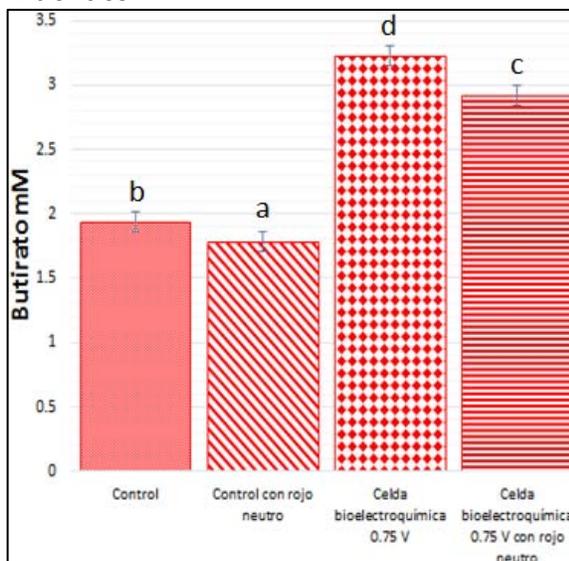
Control	15.55 mM +/- 0.62
Control con rojo neutro	11.95 mM +/- 0.62
Celda bioelectroquímica 0.75 V	28.66 mM +/- 0.62
Celda bioelectroquímica 0.75 V con rojo neutro	23.84 mM +/- 0.62

Propionato



Control	3.85 mM +/- 0.29
Control con rojo neutro	3.22 mM +/- 0.29
Celda bioelectroquímica 0.75 V	7.69 mM +/- 0.29
Celda bioelectroquímica 0.75 V con rojo neutro	6.88 mM +/- 0.29

Butirato



Control	1.94 mM +/- 0.08
Control con rojo neutro	1.78 mM +/- 0.08
Celda bioelectroquímica 0.75 V	3.23 mM +/- 0.08
Celda bioelectroquímica 0.75 V con rojo neutro	2.92 mM +/- 0.08

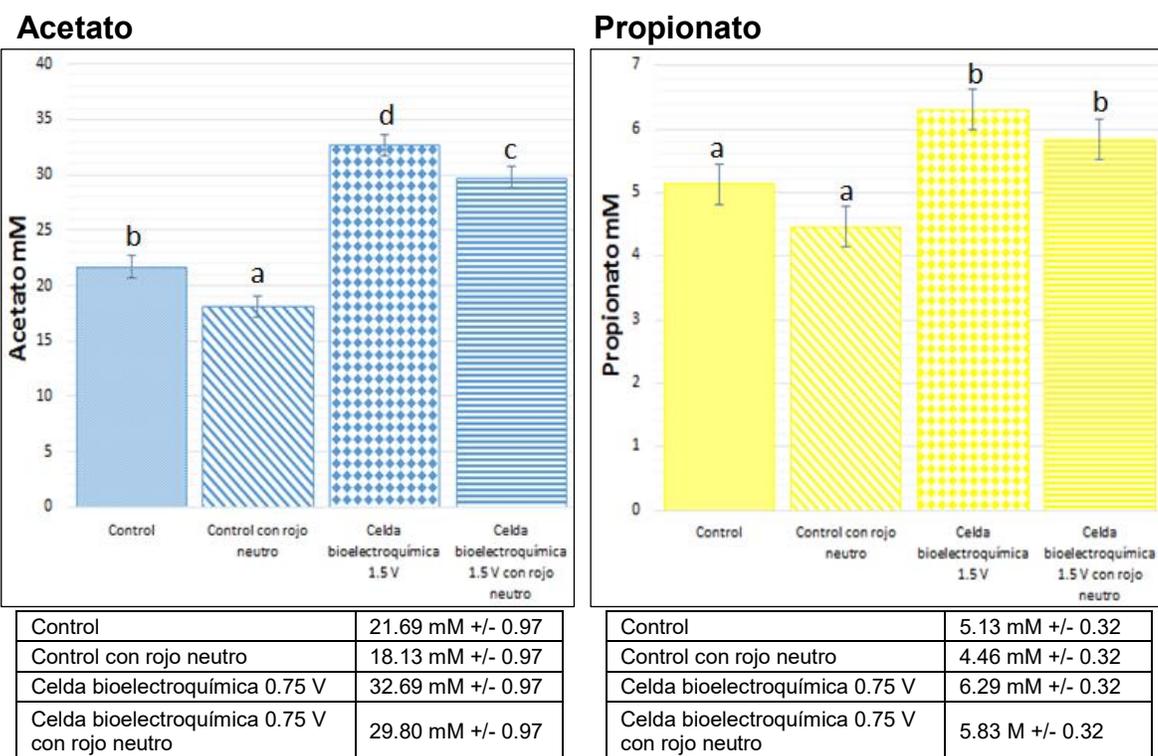
Figura 13. Producción de AGVs en líquido ruminal *in vitro* (0.75 V), $p < 0.0001$, $n = 6$

7.4 Producción de AGVs bajo un potencial eléctrico de 1.5 V

Las celdas bioelectroquímicas con un potencial eléctrico aplicado de 1.5 V generaron también un incremento en la producción de los tres AGVs: acetato, propionato y butirato en el líquido ruminal *in vitro*. Sin embargo, los porcentajes de incremento en la concentración de los AGVs fueron menores en comparación a los obtenidos con un potencial eléctrico aplicado de 0.75 V.

- Se observó una mayor producción de AGVs en las celdas bioelectroquímicas (con y sin rojo neutro) que en las celdas control (con y sin rojo neutro), demostrando que el aumento en la producción de AGVs fue debido a la electrofermentación con 1.5 V y no solo a una fermentación por microorganismos ruminales como se observa en la Figura 14.
- Se observó que el mediador redox rojo neutro influye negativamente en la producción de acetato, ya que con el mediador se disminuyó la capacidad de producción de acetato que los microorganismos ruminales pueden alcanzar. No obstante, en el caso del propionato y el butirato, no se presentaron diferencias en las concentraciones de estos AGVs tanto en las celdas control como en las celdas bioelectroquímicas, lo cual apunta a que no hubo efecto del mediador redox sobre la producción de propionato y butirato.
- Al igual que las pruebas con 0.75 V, no hay interacción entre los dos factores evaluados, es decir, la ausencia o presencia del mediador redox no influye sobre el efecto del voltaje, los factores actúan de manera independiente.

En las celdas bioelectroquímicas con 1.5 V y en ausencia del rojo neutro, la producción de AGVs con respecto al control (sin rojo neutro) incrementó 51 % para acetato, 23 % para propionato y 48 % para butirato ($p < 0.0001$ y $n=6$); y en las celdas bioelectroquímicas con 1.5 V en presencia del rojo neutro, la producción con respecto al control (sin rojo neutro) incrementó en 37 % para acetato, y para propionato y butirato se obtuvo el mismo porcentaje que sin el rojo neutro ($p < 0.0001$ y $n=6$), ya que no hubo diferencia como lo indica la Figura 14.



Butirato

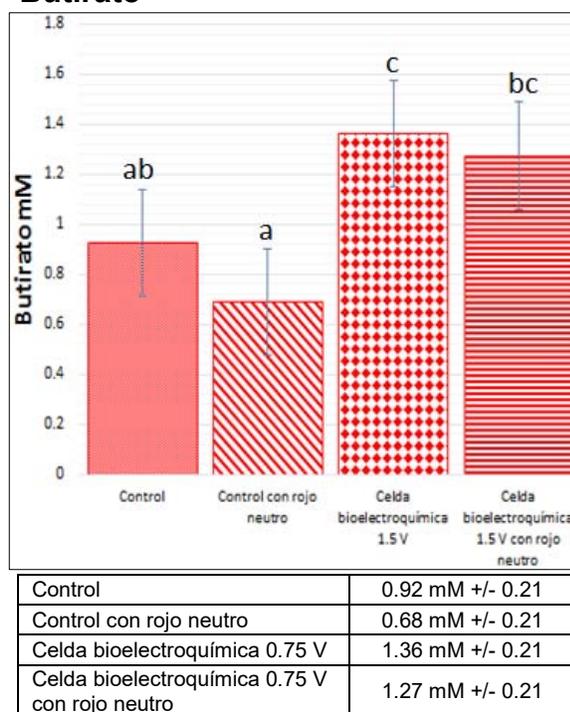


Figura 14. Producción de AGVs en líquido ruminal *in vitro* (1.5 V), $p < 0.0001$, $n = 6$

7.5 Comparación de la producción de AGVs bajo dos niveles de potenciales eléctricos aplicados.

Con la finalidad de elegir el voltaje que mejor favoreciera la producción de AGVs en el líquido ruminal *in vitro*, se realizó un cuadro comparativo (Cuadro 6), en el que se observa notoriamente que para los tres AGVs el incremento ya sea en concentración (mM) o en porcentaje (%) es mayor bajo un potencial eléctrico de 0.75 V, en comparación con 1.5 V.

En caso del propionato se presenta con 0.75 V un incremento (%) de más del triple del obtenido con 1.5 V, y en el caso de los AGVs totales se obtuvo un incremento (%) en la producción de casi el doble. Por lo que se decidió continuar los experimentos aplicando al sistema un potencial eléctrico de 0.75 V. En este cuadro no se tomó en cuenta las pruebas con rojo neutro ya que de acuerdo a los resultados antes mostrados se observó un efecto negativo o nulo, según sea el caso, sobre la producción de AGVs.

Cuadro 6. Comparación de AGVs bajo dos niveles de potencial eléctrico

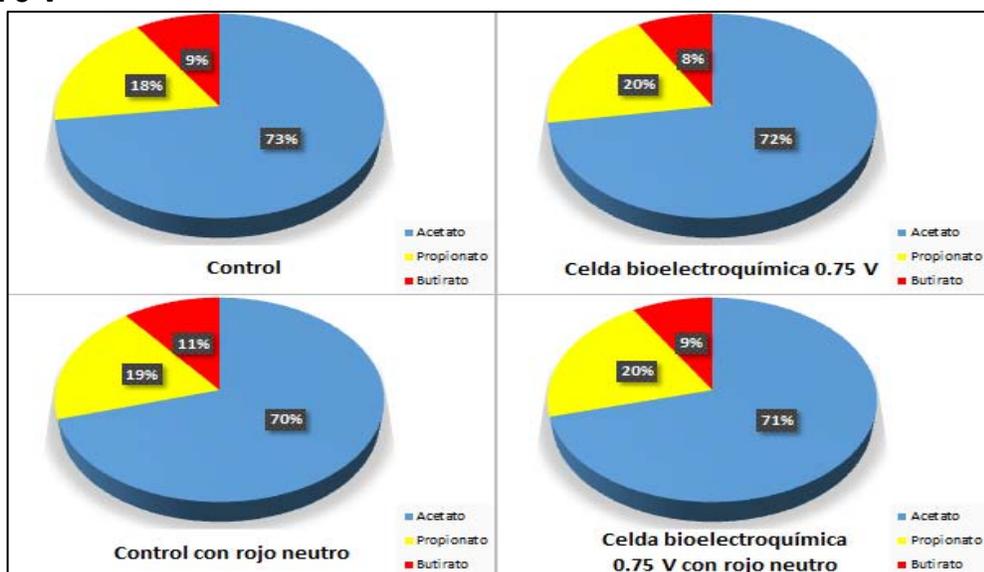
Potencial eléctrico	0.75 V	1.5 V		0.75 V	1.5 V	
Producto	Incremento mM	Incremento mM	EE	Porcentaje %	Porcentaje %	EE
Acetato	13.11 ^a	11 ^b	0.96	84 ^a	51	8.06
Propionato	3.84 ^a	1.16 ^b	0.41	99	23	17.24
Butirato	1.29 ^a	0.44 ^b	0.07	66	48	5.005
AGVs totales	18.24 ^a	12.6 ^b	1.005	85	45	6.95

^{a,b} Distintos superíndices en la misma fila representan diferencias (P<0.05, n=6)

7.6 Composición de los AGVs totales

La adecuada proporción de los AGVs en el rumen es importante ya que puede tener diferentes implicaciones en el metabolismo animal. Para conocer el patrón de fermentación en las celdas se calculó el porcentaje de cada AGV con respecto a la concentración total y se compararon los cambios en la relación molar.

a) 0.75 V



b) 1.5 V

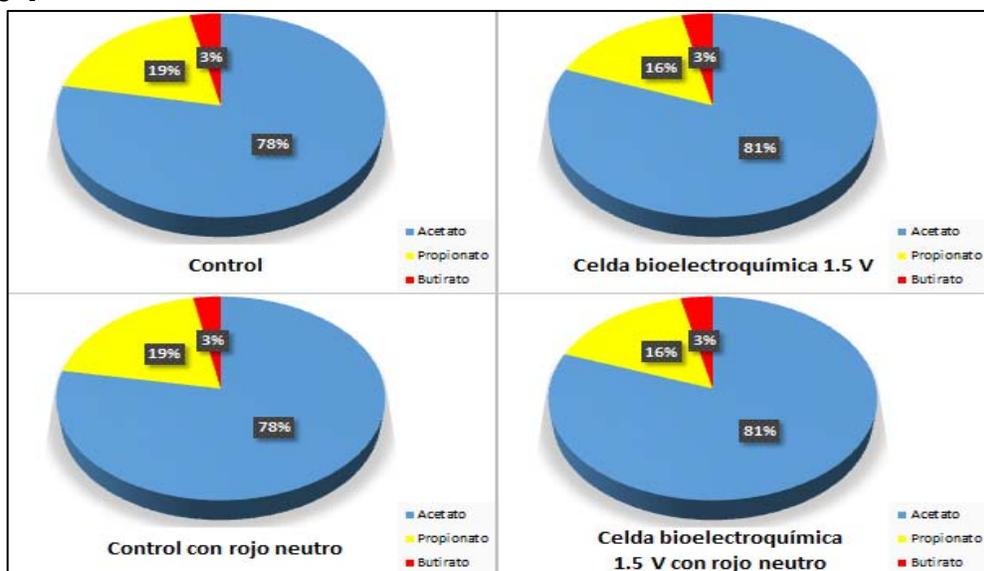


Figura 15. Composición en porcentaje de los AGVs a) 0.75 V b) 1.5 V

La Figura 15a corresponde al experimento con 0.75 V. En el caso del acetato, la proporción oscila entre 70 % y 73 %, para propionato entre 18 % y 20 %, y para butirato entre 8 % y 9 %, estos valores no representan diferencia entre ninguna de las cuatro pruebas ($p > 0.0001$, $n=6$), conservando para todas la misma relación molar de AGVs, y la Figura 15b corresponde al experimento con 1.5 V donde tampoco hubo diferencia entre pruebas ($p < 0.0001$, $n=6$), para el acetato el porcentaje se conservó entre 78 % y 81 %, para propionato entre 16 % y 19 %, y para butirato en 3 % para todas las fermentaciones.

Al no existir diferencia en las relaciones molares entre pruebas, se demuestra que a pesar de que la cantidad total de AGVs haya aumentado con el estímulo de la corriente eléctrica, ésta no modifica la proporción de ninguno de los AGVs con respecto a la concentración total y por lo tanto se conserva la relación molar entre ellos. Igualmente, la adición del rojo neutro no afectó la relación molar, aunque la concentración de AGVs si haya disminuido en presencia del mediador redox. Independientemente de si la concentración de AGVs incrementa o disminuye las relaciones molares se mantienen típicas de una dieta alta en forrajes. Tampoco la interacción de los dos factores evaluados modificó la relación molar entre AGVs.

7. 7 Digestibilidad de la materia seca

De acuerdo a la Figura 16, se puede deducir que no hubo diferencia en el porcentaje de materia seca digerida entre ninguna de las pruebas con respecto a la celda control (sin rojo neutro y sin energía eléctrica) ($p > 0.0001$, $n=6$), ni para los experimentos con un potencial eléctrico aplicado de 0.75 V ni con 1.5 V. Es decir, la corriente eléctrica no tuvo efecto sobre la digestibilidad del forraje, así como tampoco hubo un efecto ejercido por el mediador redox rojo neutro o por la interacción de los dos factores evaluados.

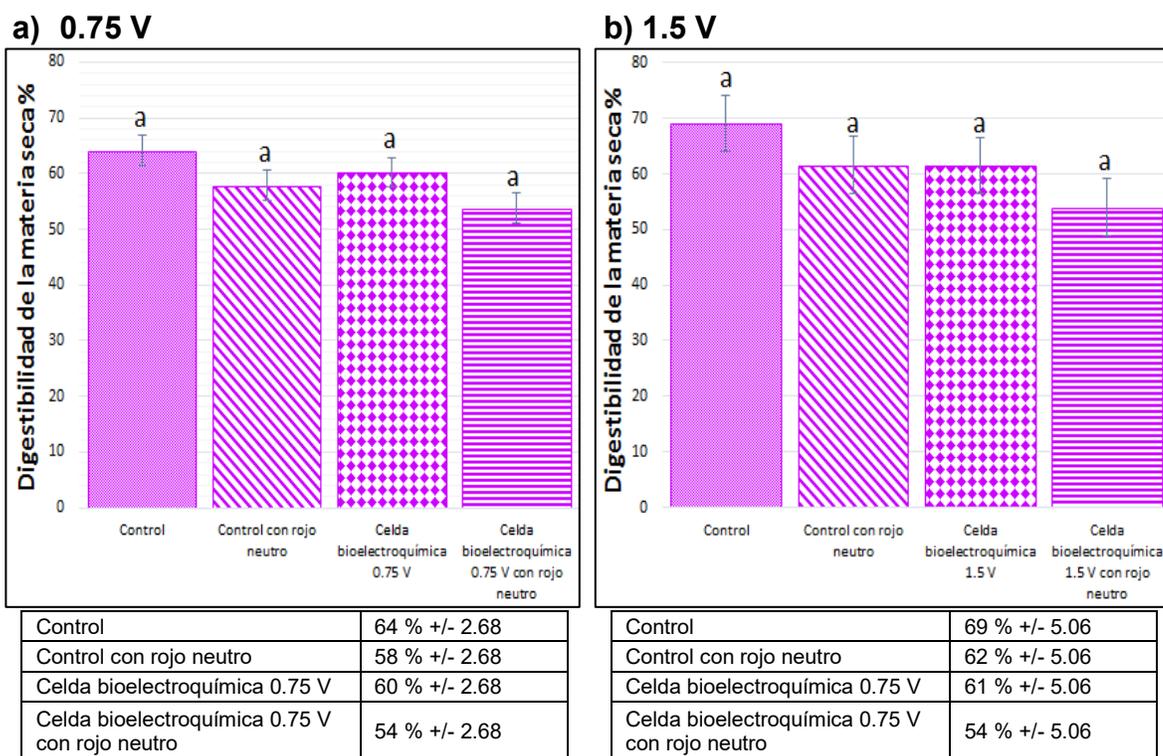


Figura 16. Porcentaje de digestibilidad de la materia seca a) 0.75 V b) 1.5 V $p > 0.0001$, n=6

Con el aumento en la producción de AGVs a pesar de que la digestibilidad del sustrato no fue diferente y con el conocimiento de que en la estequiometría de una fermentación la misma cantidad de carbonos que entran deben de salir, nos condujo a investigar qué impacto tiene el sistema sobre la producción de gases, ya que posiblemente al utilizar los carbonos en más AGVs se disminuya la formación de algún otro producto de la fermentación de los microorganismos ruminales.

De acuerdo a los trabajos reportados en la literatura en cuanto a los sistemas bioelectroquímicos para incrementar la producción de propionato en un cultivo bacteriano (Emde y Schink, 1990; Schuppert *et al.*, 1992), se esperaba un cambio en la proporción de los productos de fermentación, específicamente, un incremento en la producción de propionato con una disminución en la producción de acetato. Sin embargo, los resultados mostraron un incremento considerable de los tres AGVs así como la conservación de sus relaciones molares.

El aumento en la producción de AGVs es atribuido a una mayor regeneración y disponibilidad de equivalentes reducidos para los microorganismos (ej. NADH y NADPH) en presencia de una corriente eléctrica. Los grupos bacterianos dentro del rumen llevan a cabo distintas vías metabólicas y con ellas producen AGVs en diferentes proporciones, por lo que parece ser que la energía eléctrica tiene un efecto uniforme sobre toda la comunidad microbiana. Lo cual confirma que al ser un ecosistema microbiano variado no hay manera de garantizar que únicamente las bacterias propionogénicas puedan aprovechar el flujo de electrones.

Comparando entre los dos voltajes evaluados (0.75 V y 1.5 V), los resultados indicaron que ambos incrementaron la producción de AGVs, pero con diferente magnitud. El potencial eléctrico aplicado que mayor concentración de AGVs produjo en el líquido ruminal fue de 0.75 V. Lo cual indica que el incremento en la producción no es proporcional al aumento en el potencial eléctrico, así como lo reportaron Hongo e Iwahara (1979b), los cuales evaluaron tres diferencias de potencial (1, 1.5 y 3 V) sobre la producción del ácido L-glutámico con *B. flavum* y determinaron que incrementado hasta 1.5 V se lograba el mejor rendimiento en comparación con la fermentación sin energía eléctrica, ya que al aplicar 3 V la producción obtenía un rendimiento incluso más bajo que en el control.

Shin *et al.* (2001) desarrollaron un sistema para mejorar la transformación del 6-bromo-2-tretalona por levaduras *T. capitatum* aplicando 5 V, y al incrementar la intensidad del voltaje a 10 V la conversión disminuyó drásticamente inclusive menor a la del control. Posteriormente, Shin *et al.* (2002) evaluaron un rango de voltajes para determinar el óptimo en la producción de etanol, y observaron que a partir de 5 V la fermentación de *C. thermocellum* se veía afectada, en contraste con *S. cerevisiae* que no tuvo cambios en su producción de etanol a altos voltajes (10 V). Ellos sugieren que el alto potencial eléctrico generó un elevado potencial redox en el cultivo que limitó el reciclaje de cofactores enzimáticos y las actividades metabólicas, además de desigualdades que pudieron deberse a las diferencias en la estructura y proteínas de membrana entre bacterias y levaduras.

Zhou *et al.* (2013) trabajaron con dos diferencias de potencial, 0.6 V y 0.9 V, de las cuales determinaron que 0.9 V incrementaba en mayor cantidad la producción de propanodiol en un cultivo mixto. Como puede notarse cada microorganismo reacciona de manera distinta ante el efecto del nivel de energía eléctrica, por lo que es importante evaluar el potencial eléctrico óptimo para cada cultivo ya que hay un voltaje límite a partir del cual las fermentaciones se ven afectadas.

Analizando la producción de AGVs se observó que no hubo efecto del rojo neutro o que si lo hubo fue de manera negativa, disminuyendo la concentración molar. Dicho efecto fue contrario a lo consultado en la literatura, donde se reportan mayores incrementos en los productos finales que las fermentaciones sin rojo neutro, y de los cuales nos basamos en esta tesis para elegir la concentración a utilizar. Hongo e Iwahara (1979a y b) utilizaron una concentración de 10 μM , Park y Zeikus (1999), Shin *et al.* (2002), y Choi *et al.* (2012) de 100 μM , y por último Harrington *et al.* (2015) de 200 μM . Para los casos, en donde se obtuvo una disminución en las concentraciones, pudo haberse presentado un efecto tóxico del mediador sobre los microorganismos y sus vías metabólicas.

A pesar de que el rojo neutro no es tóxico en ciertas cantidades para algunos microorganismos puede serlo para otros, como para algunas bacterias gram positivas (Barbosa y Peters, 1971) o para *B. flavum* en concentraciones mayores a 100 μM , en donde el efecto tóxico se refleja en una disminución de producción del ácido L-glutámico y en el crecimiento bacteriano (Hongo e Iwahara, 1979a).

También Lin *et al.* (2014), utilizaron un cultivo mixto para degradar tolueno y el resultado fue una reducción en la tasa de degradación debido a un efecto inhibitorio del mediador redox sobre el cultivo. Además, otras moléculas redox son tóxicas para otras bacterias, como *Propionibacterium*, que incrementan su producción de propionato con sepulcrato de cobalto como mediador redox, pero inhiben su crecimiento con metil o bencil viológeno, cuando para otras bacterias, estas moléculas mejoran la producción de sus metabolitos (Emde y Schink, 1990).

Harrington *et al.* (2015) mencionan que tomando en cuenta el metabolismo específico para cada organismo, con sus diferentes vías metabólicas, balances redox, puntos críticos de control metabólico y diferentes proteínas transportadoras de electrones, es de esperarse que el efecto del rojo neutro o cualquier molécula redox influya de distintas maneras en las bacterias. Y no solo va a depender de la presencia del mediador redox, sino también de la concentración del mismo en el medio. Los resultados variables conllevan a la falta de una técnica estándar y controlada para la electrofermentación mediada con rojo neutro, lo cual hace difícil el comparar e interpretar sus efectos y el mecanismo de acción involucrado.

Otros autores reportan en concordancia con esta tesis, que la adición de un mediador redox no es necesaria para cambiar los patrones de fermentación. Van Eerten-Jansen *et al.* (2013) fueron los primeros en demostrar que el acetato se reduce a caproato en cultivos mixtos dentro de una celda de electrofermentación sin la adición de un mediador redox. Así como Zhou *et al.* (2013) reportaron el incremento de propanodiol en cultivos mixtos y Choi *et al.* (2014) modificaron la fermentación de *C. pasteurianum* mediante un sistema bioelectroquímico sin mediadores artificiales. Para una óptima electrofermentación es esencial encontrar microorganismos que utilicen los electrones sin mediadores exógenos.

A pesar del incremento en la concentración total de AGVs, las proporciones moleculares en las celdas bioelectroquímicas se conservaron dentro de los parámetros reportados en la literatura para las dietas compuestas solo de forrajes 65-74 % acetato, 15-20 % propionato y 8-16 % butirato (Thomas y Rook, 1977).

Por último, los análisis estadísticos muestran que la interacción de los dos factores (el mediador redox y el potencial eléctrico aplicado) no es significativa y que el efecto que estos tengan sobre la fermentación es independiente. No obstante, es mejor que el mediador redox no presente efectos positivos, ya que así se elimina un costo extra del proceso y la dependencia a administrar constantemente esta molécula al líquido ruminal.

8. SECCIÓN II: METODOLOGÍA

La sección II comprende la realización del objetivo específico E, así como el punto 5 de la estrategia experimental.

8.1 Cinéticas de fermentación

Para esta sección se repitió el procedimiento realizado en la sección I, exceptuando el diseño experimental. En la sección anterior se hizo un diseño completamente al azar en un arreglo factorial 2 x 2 para evaluar dos factores, mediador redox y potencial eléctrico. Al haber concluido en la sección anterior que el mediador redox no tenía efecto sobre el sistema, se decidió en esta sección evaluar únicamente el efecto de un potencial eléctrico de 0.75 V sobre la cinética de producción de los AGVs y metano.

En el Cuadro 7, se muestran las pruebas evaluadas. Se utilizaron 2 celdas bioelectroquímicas a las que se les aplicó un potencial eléctrico de 0.75 V y dos celdas control. Los experimentos se realizaron por triplicado. Las muestras (líquida y gaseosa) se tomaron a las 0, 2, 4, 6, 24 y 48 hrs. Todas las condiciones físicas y ambientes fueron iguales que en la sección I. Los experimentos tuvieron una duración de 48 horas de incubación, controlados a una temperatura de 39°C dentro de una incubadora digital, con agitación ligera a 100 rpm.

Cuadro 7. Combinaciones de experimentos a evaluar sección II

Nombre de referencia del experimento	Potencial eléctrico, V
Celda control	0.00
Celda bioelectroquímica	0.75

8.2 Producción de metano

Para la medición de gas metano se utilizó un sistema de desplazamiento de agua con probetas invertidas en las cuales se introdujo una manguera conectada a la cámara catódica de cada celda. Se realizaron lecturas de desplazamiento de volumen a diferentes horarios: 0, 2, 4, 6, 24, 48 horas de incubación.

A los mismos horarios, se tomaron muestras de gas del espacio de cabeza de la cámara catódica de la celda, y se determinó la composición de los gases mediante un cromatógrafo SRI8610C con detector de conductividad térmica y dos columnas empacadas en acero inoxidable (6' x 1/8" sílice gel y 6' x 1/8" corte molecular 13X). La temperatura del inyector y del detector fue de 90°C y 150°C, respectivamente. La temperatura de la columna fue de 40°C la cual se mantuvo durante cuatro minutos y se incrementó hasta 110°C a una velocidad de 20°C/min. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 20 mL/min. La concentración de los gases se obtuvo aplicando la ley de los gases ideales.

8.3 Determinación de azúcares totales residuales

Para la determinación de azúcares se tomaron 0.5 mL de líquido ruminal de cada celda para hacer una dilución 1:10 con agua destilada, posteriormente se tomaron 0.5 mL de las muestras diluidas para colocarlos en un tubo de ensayo de vidrio, adicionarle 0.5 mL de fenol al 5% y 2.5 mL de H₂SO₄ al 98%. Los tubos se dejaron enfriar y se tomó la lectura de absorbancia a 490 nm.

8.5 Modelo estadístico

Para evaluar el efecto de los dos tratamientos (control: sin potencial eléctrico) y celda bioelectroquímica: con potencial eléctrico) y seis horas de fermentación (0, 2, 4, 6, 24, 48 horas) en la producción de AGVs, se utilizó un modelo estadístico de diseño completamente al azar en un arreglo factorial de 2 x 6, con la ecuación:

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

Dónde:

- Y_{ijk} = es la ijk -ésima observación en el i -ésimo nivel del factor A y en el j -ésimo nivel del factor B.
- μ = es la media general.
- τ_i = es el efecto del i -ésimo nivel del factor A.
- β_j = es el efecto del j -ésimo nivel del factor B.
- $(\tau\beta)_{ij}$ = es el efecto de la interacción del i -ésimo nivel del factor A con el j -ésimo nivel del factor B.
- ϵ_{ij} = error aleatorio experimental.

9. SECCIÓN II: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Influencia de la aplicación de un potencial eléctrico (0.75 V) sobre la cinética de producción de AGVs

Se realizó un análisis de varianza ANOVA para demostrar los cambios entre la fermentación sin energía eléctrica (celda control) y la fermentación con energía eléctrica (celda bioelectroquímica). El ANOVA indicó que si existe una diferencia en la concentración de AGVs en el líquido ruminal entre los dos tratamientos y entre las seis diferentes horas a las que se cuantificaron los AGVs, así como en la interacción de los dos factores.

El Cuadro 8 muestra las concentraciones de los AGVs (acetato, propionato y butirato) a las diferentes horas de muestreo (0, 2, 4, 6, 24 y 48 horas), tanto para la fermentación control (sin corriente eléctrica) como para la fermentación en las celdas bioelectroquímicas (con un potencial eléctrico aplicado de 0.75 V).

Los resultados del análisis estadístico indicaron que las concentraciones de los AGVs en las celdas bioelectroquímicas si fueron diferentes a las de las celdas control; mostrando un incremento en la concentración molar desde las primeras dos horas de fermentación ($P < 0.0001$, $n = 6$) y se mantuvieron diferentes hasta el último muestreo. Lo cual sugiere un efecto inmediato y constante de la corriente eléctrica sobre el metabolismo de los microorganismos ruminales, modificando los patrones de fermentación. Las cinéticas de producción de los tres AGVs presentaron comportamientos similares.

Al término de la fermentación (48 horas) dentro de las celdas bioelectroquímicas a las cuales se les aplicó un potencial eléctrico de 0.75 V, se obtuvo un incremento en la producción de AGVs correspondiente a 71 % en la concentración molar de acetato, 86 % en el propionato y 63 % en el butirato con respecto a la fermentación control (sin corriente eléctrica). También se observó que la mayor producción de AGVs tanto en las celdas control como en las celdas bioelectroquímicas se lleva a cabo dentro de las primeras seis horas.

Cuadro 8. Cinética de la producción de AGVs en líquido ruminal *in vitro*

Acetato				
Hora	Control		Celda bioelectroquímica	
	\bar{X} mM	EE	\bar{X} mM	EE
0	0 ^a	0.4	0 ^a	0.4
2	17.40 ^a	0.4	30.82 ^b	0.4
4	17.77 ^a	0.4	31.99 ^b	0.4
6	18.25 ^a	0.4	33.29 ^b	0.4
24	21.22 ^a	0.4	36.59 ^b	0.4
48	22.36 ^a	0.4	38.15 ^b	0.4
p<0.0001, n=6				

Propionato				
Hora	Control		Celda bioelectroquímica	
	\bar{X} mM	EE	\bar{X} mM	EE
0	0 ^a	0.13	0 ^a	0.13
2	3.21 ^a	0.13	6.35 ^b	0.13
4	3.39 ^a	0.13	6.74 ^b	0.13
6	3.88 ^a	0.13	7.30 ^b	0.13
24	5.98 ^a	0.13	11.01 ^b	0.13
48	6.50 ^a	0.13	12.07 ^b	0.13
p<0.0001, n=6				

Butirato				
Hora	Control		Celda bioelectroquímica	
	\bar{X} mM	EE	\bar{X} mM	EE
0	0 ^a	0.05	0 ^a	0.05
2	1.32 ^a	0.05	2.11 ^b	0.05
4	1.63 ^a	0.05	2.65 ^b	0.05
6	2.03 ^a	0.05	3.28 ^b	0.05
24	2.54 ^a	0.05	4.12 ^b	0.05
48	2.83 ^a	0.05	4.61 ^b	0.05
p<0.0001, n=6				

9.2 Composición de los AGVs totales

Para comparar la relación molar entre los tres principales AGVs, se calcularon los porcentajes de cada uno con respecto a la concentración total. La Figura 17 representa el porcentaje de los AGVs en el líquido ruminal tanto en la celda control y en la celda bioelectroquímica.

En el caso del acetato, la fracción oscila entre 71 % para el control y 70 % para la celda bioelectroquímica; para el propionato entre 20 % y 22 %, así como para el butirato en 9 % y 8 %, respectivamente. Estos valores no fueron diferentes ($P < 0.0001$, $n=6$), conservándose para las dos pruebas la misma relación molar y composición de AGVs.

Este comportamiento es consistente con la sección I, comprobando que la fermentación se ve influenciada por la corriente eléctrica hacia un aumento en la concentración de los AGVs, pero manteniendo siempre la misma relación molar propia de una dieta alta en forrajes.

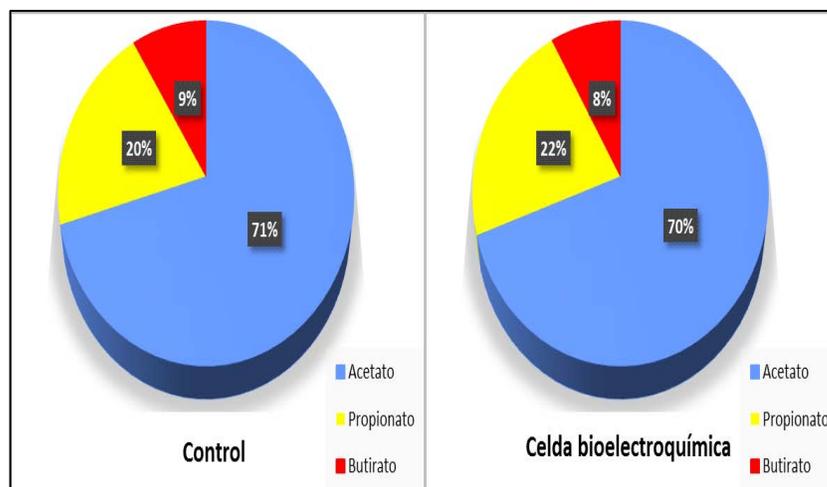


Figura 17. Composición en porcentaje de los AGVs (0.75 V)

9.3 Influencia de la aplicación de un potencial eléctrico (0.75 V) sobre la cinética de producción de metano

La producción de gas metano a diferentes horas de fermentación con líquido ruminal se muestra en el Cuadro 9. Se observa que durante las primeras horas (seis horas) la producción no es diferente entre la celda control y la celda bioelectroquímica. Fue hasta las 24 y 48 horas cuando se observó una mayor producción de AGVs en las celdas bioelectroquímicas en comparación con las celdas control, demostrando que el incremento en la producción de metano fue producto de la electrofermentación. Al término de las fermentaciones se obtuvo un incremento en la concentración de metano del 31 % bajo un potencial eléctrico aplicado de 0.75 V con respecto al control.

Cabe destacar que analizando solo la cinética de fermentación de la celda control no hubo diferencia en la concentración de metano entre las horas 2, 4, y 6, fue hasta las 24 horas que la concentración se mostró diferente a las primera seis horas, lo mismo ocurrió con la electrofermentación; En comparación con la cinética de producción de AGVs en donde observamos que la concentración de AGVs fue diferente entre todas las horas de muestreo.

Cuadro 9. Cinética de la producción de metano en líquido ruminal *in vitro*

Metano				
Hora	Control		Celda bioelectroquímica	
	\bar{X} mM	EE	\bar{X} mM	EE
0	0 ^a	0.019	0 ^a	0.019
2	0.073 ^a	0.019	0.123 ^a	0.019
4	0.089 ^a	0.019	0.144 ^a	0.019
6	0.096 ^a	0.019	0.169 ^a	0.019
24	0.421 ^a	0.019	0.56 ^b	0.019
48	0.609 ^a	0.019	0.801 ^b	0.019
p<0.0001, n=6				

9.4 Digestibilidad de materia seca y azúcares residuales

De manera consistente con la digestibilidad de la materia seca reportada en la sección I, no hubo diferencia entre la celda control y la celda bioelectroquímica, por lo tanto la corriente eléctrica sobre los microorganismos ruminales no incrementó ni disminuyó la digestibilidad del forraje utilizado como sustrato. La celda control y la celda bioelectroquímica tuvieron el mismo porcentaje de digestibilidad de la materia seca de $87 \pm 0.58 \%$. Estos resultados indican que al no haber diferencia en el porcentaje de digestibilidad, el sistema bioelectroquímico no ejerció ningún efecto sobre la etapa de hidrólisis, etapa que descompone los polímeros de carbohidratos como la celulosa, hemicelulosa y pectina en monómeros como la glucosa para que estén disponibles para los microorganismos.

También se determinó la concentración de los azúcares residuales en el líquido ruminal al término de las fermentaciones (48 horas) para evaluar el efecto de la aplicación de un potencial eléctrico de 0.75 V mediante las celdas bioelectroquímicas sobre el consumo de los azúcares. La Figura 18 presenta una diferencia entre ambas pruebas en donde se observa que la fermentación control (sin corriente eléctrica) finalizó con una concentración de azúcares residuales de 29.4 g/L, en comparación con la celda bioelectroquímica con 11 g/L.

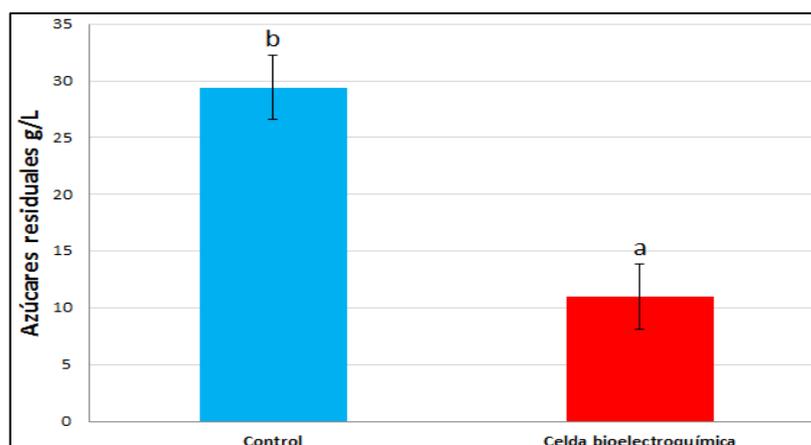


Figura 18. Azúcares residuales en el líquido ruminal *in vitro*, $p < 0.0001$ $n = 6$

Estos resultados indican un mayor consumo de los azúcares disponibles, de más del doble, por parte de los microorganismos en el líquido ruminal dentro de la celda bioelectroquímica, por lo tanto se sugiere que la corriente eléctrica si 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.

La comparación entre el balance de carbono de ambas fermentaciones *in vitro* indica que el incremento obtenido en la producción de AGVs bajo el estímulo de la energía eléctrica es debido a un mayor consumo de glucosa. Sin embargo, es difícil determinar que vías metabólicas fueron alteradas o cuales fueron las exactas desviaciones en el flujo de carbonos, ya que para dicho fin es necesario el marcaje de carbonos con radioisótopos y así poder describir los cambios en los patrones de fermentación.

En referencia a las cinéticas de fermentaciones se destaca que la mayor producción de AGVs ocurrió dentro de las primeras seis horas de fermentación como lo indica la literatura (Gray y Pilgrim, 1951; Stewart y Schultz, 1958). Este comportamiento no se vio modificado por efecto del sistema bioelectroquímico. Sin embargo, la concentración molar si se encontró dirigida hacia un incremento en la concentración final de los AGVs, en diferentes porcentajes para cada uno, pero comprobando que la aplicación de un potencial eléctrico que crea una corriente eléctrica si tiene un efecto sobre la fermentación de los microorganismos ruminales, como se demostró previamente en la sección I.

En cuanto a producción de gas metano dentro de la celda bioelectroquímica, se esperaba que disminuyera como lo propusieron Bretschger *et al.* (2009) y en el trabajo de Ishii *et al.* (2008) que demostraron la inhibición de la metanogénesis dentro de un sistema bioelectroquímico con muestras de suelo que originalmente generaban altas concentraciones. Sin embargo, el incremento en la producción de metano mediante electrofermentación también ha sido reportado por varios autores (Cheng *et al.*, 2009; Van Eerten-Jansen *et al.*, 2012; Marshall *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2015).

La reacción es llevada a cabo por los microorganismos metanogénicos que reducen CO₂ a metano, y la producción incrementa al aplicar un potencial eléctrico adecuado, el proceso es llamado electrometanogénesis, y puede llevarse a cabo de manera directa o indirecta.

De manera directa los metanógenos aceptan electrones del cátodo para transferirlos al CO₂ ($\text{CO}_2 + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$), o de manera indirecta, cuando el potencial aplicado al cátodo es lo suficientemente adecuado para la producción de hidrógeno ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$), el H₂ generado en la celda bioelectroquímica puede ser utilizado por los microorganismos metanogénicos para producir metano (Steinbusch *et al.*, 2010; Harnisch *et al.*, 2015). Además el H₂ producido bioelectroquímicamente en el sistema puede ser aprovechado por otras bacterias para la producción de AGVs (Van Eerten-Jansen *et al.*, 2013) por lo que la formación de H₂ en las celdas puede ser también un mecanismo que influyó en el incremento de la concentración final de AGVs.

Desde la sección I se pensó que al no haber una diferencia en la digestibilidad de la materia seca entre las celdas control y las celdas bioelectroquímicas, probablemente el incremento en la producción de los AGVs coincidía con una disminución en la producción de gases, suficiente como para proveer de los carbonos ocupados en el incremento de los AGVs. Sin embargo, a falta de radioisótopos de carbono, es difícil concluir si únicamente la disminución del CO₂ es debida al incremento en la producción de metano o incluso también contribuyó a la producción de AGVs.

Hammonds (2013) demostró que la producción de acetato de una comunidad microbiana ruminal inoculada dentro de un sistema bioelectroquímico se produjo directamente del consumo de CO₂ con la aplicación de una corriente eléctrica, fenómeno conocido como electrosíntesis microbiana. Mediante la vía metabólica de Wood-Ljungdahl que consiste en la reducción de dos moléculas de CO₂ para formar una de acetato (Drake, 1994).

Lo que sí es un hecho es que a pesar de no encontrar diferencia en la hidrólisis del sustrato, los microorganismos ruminales incrementaron el consumo de glucosa produciendo una mayor cantidad de AGVs, efecto similar al reportado por algunos autores (Park y Zeikus, 1999; Shin *et al.*, 2002). Los resultados sugieren que la corriente eléctrica afecta las vías metabólicas propiamente fermentativas de los microorganismos (reacciones de óxido-reducción) y no a las reacciones de hidrólisis de los polisacáridos, indicando un mejor rendimiento de los carbohidratos.

Como se ha mencionado, el potencial eléctrico para modificar una fermentación depende del tipo de microorganismo utilizado por lo que es considerable que algunas poblaciones sean más sensibles al nivel de energía eléctrica aplicada que otros, pudiendo modificar también la composición de la microbiota. Evento que puede ser comprobado mediante un análisis del gen 16S del ARN ribosomal para conocer la abundancia relativa de los microorganismos en diferentes condiciones.

10. CONCLUSIONES

Las celdas bioelectroquímicas modifican la fermentación *in vitro* de los microorganismos ruminales hacia un incremento en la producción de los tres AGVs y no solo del propionato, conservando la relación molar de los AGVs totales, lo cual al final resulta ser favorable por el papel del acetato y butirato como fuentes de energía para los rumiantes y en la síntesis de grasas de la leche. La mayor producción de AGVs se lleva a cabo en las primeras seis horas de fermentación aún con el incremento en la concentración por efecto del potencial eléctrico. Sin embargo, el uso de las celdas también incrementó la producción de metano en líquido ruminal *in vitro*, lo que representa un inconveniente en este sistema.

De los dos potenciales eléctricos evaluados (0.75 V y 1.5 V), el que incrementó en mayor concentración a los AGVs en el líquido ruminal dentro de las celdas bioelectroquímicas fue de 0.75 V, de tal manera que el aumento en la producción no es proporcional al aumento en el potencial eléctrico aplicado a las celdas. El rojo neutro (100 μ M) como mediador de electrones en el líquido ruminal no mejoró la producción de AGVs dentro de las celdas, sugiriendo que los microorganismos ruminales aprovechan la corriente eléctrica sin mediadores exógenos cumpliendo así un requisito indispensable para ser una electrofermentación óptima.

La aplicación de 0.75 V al líquido ruminal mediante celdas bioelectroquímicas no tiene un efecto sobre la digestibilidad de la materia seca pero si incrementa el consumo de azúcares no reductores de los microorganismos ruminales de modo que hay un mejor aprovechamiento de carbonos. Finalmente, se requiere más investigación para comprender si el incremento en la producción de AGVs en el líquido ruminal dentro de las celdas bioelectroquímicas fue resultado de un mecanismo de acción directo (electrones aceptados directamente del cátodo), indirecto (formación de H₂), mediante electrosíntesis microbiana (conversión de CO₂) o incluso una acción simultánea de los tres mecanismos.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Abou Akkada, A. R., and B. H. Howard. 1960. The biochemistry of rumen protozoa. 3. The carbohydrate metabolism of *Entodinium*. *Biochem. J.* 76:445-451.
2. AMEG (Asociación mexicana de engordadores de ganado bovino, A. C.). 2015. Carne de bovino. Indicadores económicos del sector. www.ameg.org.mx
3. ANKOM Technology. Method 3. *In Vitro* True Digestibility using the DAISY^{II} Incubator (08/05).
4. Arechederra, M. N, P. K. Addo and S. D. Minter. 2011. Poly (neutral red) as a NAD⁺ reduction catalyst and a NADH oxidation catalyst: Towards the development of a rechargeable biobattery. *Electrochim. Acta.* 56:1585-1590.
5. Armenteras, D., y N. Rodríguez Eraso. 2014. Dinámicas y causas de deforestación en bosques de latino américa: una revisión desde 1990. *Colomb. For.* 17:233-246.
6. Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese, and R. S. Wolfe. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* 43:260-296.
7. Baldwin, R. L., W. A. Wood and R. S. Emery. 1962. Conversion of lactate-C¹⁴ to propionate by the rumen microflora. *J. Bacteriol.* 83:907-913.
8. Baldwin, R. L., W. A. Wood and R. S. Emery. 1963. Conversion of glucose-C¹⁴ to propionate by the rumen microbiota. *J. Bacteriol.* 85:1346-1349.
9. Baldwin, R. L. 1965. Pathways of carbohydrate metabolism in the rumen. In: R. W. Dougherty, R. S. Allen, W. Burroughs, W. L. Jacobson and A. D. McGilliard. (Eds.) *Physiology of Digestion in the Ruminant*. Butterworth's Inc., Washington, DC. pp. 379.
10. Baldwin, R. L., and M. J. Allison. 1983. Rumen metabolism. *J. Anim. Sci.* 57:461-477.
11. Baldwin, R. L. 1984. Digestion and metabolism of ruminants. *BioScience.* 34:244-249.
12. Barbosa, P., and T. M. Peters. 1971. The effects of vital dyes on living organisms with special reference to methylene blue and neutral red. *Histochem. J.* 3:71-93.
13. Barker, H. A. 1961. *The Bacteria*. Academic Press, New York.
14. Bauchop, T. 1979. The rumen anaerobic fungi: colonizers of plant fibre. *Ann. Rech. Vet.* 10:246-248.
15. Bond, D. R., and D. R. Lovley. 2003. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1548-1555.
16. Bretschger, O., J. B. Osterstock, W. E. Pinchak, S. Ishii, and K. E. Nelson. 2009. Microbial fuel cells and microbial ecology: applications in ruminant health and production research. *Microb. Ecol.* 59:415-427.
17. Cady, R. 2013. Elanco Animal Health. Food Forward Analysis. 2013. Data on File.
18. Call, D., and B. E. Logan. 2008. Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane. *Environ. Sci. Technol.* 42:3401-3406.
19. Cheng, S., and B. E. Logan. 2007. Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:18871-18873.
20. Cheng, S., D. Xing, D. F. Call, and B. E. Logan. 2009. Direct biological conversion of electrical current into methane by electromethanogenesis. *Environ. Sci. Technol.* 43:3953-3958.
21. Choi, O., Y. Um, and B. I. Sang. 2012. Butyrate production enhancement by *Clostridium tyrobutyricum* using electron mediators and a cathodic electron donor. *Biotechnol. Bioeng.* 109:2494-2502.
22. Choi, O., T. Kim, H. M. Woo, and Y. Um. 2014. Electricity-driven metabolic shift through direct electron uptake by electroactive heterotroph *Clostridium pasteurianum*. *Sci. Rep.* 4:6961.
23. Church, D. C. 1988. *The ruminant animal digestive physiology and nutrition*. Waveland Press Inc., Illinois, USA.
24. Clarke, R. T. J. 1977. The gut and its microorganisms. In: *Microbial ecology of the gut*, (ed. RTJ Clarke, T Bouchop (Eds.)). Academic Press New York.

25. Coleman, G. S. 1986. The metabolism of rumen ciliate protozoa. *FEMS Microbiol. Rev.* 39:321-344.
26. Cozzi, G., P. Berzaghi, F. Gottardo, G. Gabai, and I. Andrighetto. 1996. Effects of feeding propylene glycol to mid-lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64:43-51.
27. Counotte, G. H., R. A. Prins, R. H. Janssen, and M. J. Debie. 1981. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of dl-[2-C] lactate in the rumen of dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:649-655.
28. Dehority, B. A. 2003. *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
29. Donlan, R. M. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8:881-90.
30. Drake, H. L. 1994. Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA "Wood/Ljungdahl" pathway: past and current perspectives. In: *Acetogenesis*. Drake, H. L. (Ed.). New York, N.Y: Chapman and Hall, Inc. pp. 3-60.
31. Emde, R., and B. Schink. 1990. Enhanced propionate formation by *Propionibacterium freudenreichii subsp. freudenreichii* in a three-electrode amperometric culture system. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2771-2776.
32. Fahey, Jr., G. C., and L. L. Berger. 1988. Carbohydrate Nutrition of Ruminants. In: D. C. Church. *The Ruminant animal: Digestive Physiology and Nutrition*. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.
33. FAO. 2011. *World Livestock 2011 – Livestock in food security*. Rome, FAO.
34. FAOSTAT. 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics division. www.faostat3.fao.org
35. FND (Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero). 2014. *Panorama de la Carne y Leche de Bovino*.
36. Fu, Q., Y. Kuramachi, N. Fukushima, H. Maeda, K. Sato, and H. Kobayashi. 2015. Bioelectrochemical analysis of the development of a thermophilic biocathode catalyzing electromethanogenesis. *Environ. Sci. Technol.* 49:1225-1232.
37. Ganigué, R., S. Puig, P. Batlle-Vilanova, M. D. Balaguer, and J. Colprim. 2015. Microbial electrosynthesis of butyrate from carbon dioxide. *Chem. Commun.* 51:3235-3238.
38. Gerber, P. J., H. Steinfeld, B. Henderson, A. Mottet, C. Opio, J. Dijkman, A. Falcucci, and G. Tempio. 2013. *Tackling climate change through livestock - A global assessment of emissions and mitigation opportunities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
39. Goldman, P., A. W. Alberts, and P. R. Vagelos. 1963. The condensation of fatty acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 238:1255-1261.
40. Gray, P. V., and A. F. Pilgrim. 1951. Fermentation in the rumen of the sheep. II. The production and absorption of volatile fatty acids during the fermentation of wheaten hay and lucerne hay in the rumen. *J. Exptl. Biol.* 28:83-90.
41. Gregory, K. B., D. R. Bond, and D. R. Lovley. 2004. Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* 6:596-604.
42. Gruby, D., and O. Delafond. 1843. Recherches sur des animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans l'intestins, pendant la digestion des animaux herbivores e carnivores. *C. R, Acad. Sci. Hebd. Seances. Acad. Sci.* 17:1304-1308.
43. Hamelers, H. V. M., A. Ter Heijne, T. H. J. A. Sleutels, A. W. Jeremiasse, D. P. B. T. B. Strik, and C. J. N. Buisman. 2010. New applications and performance of bioelectrochemical systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:1673-1685.
44. Hammonds, R. 2013. *Bioelectrochemical reduction of carbon dioxide to acetate using a microbial consortium derived from the cow rumen*. All Theses. Paper 1578.
45. Harrington, T. D., A. Mohamed, V. N. Tran, S. Biria, M. Gargouri, J. J. Park, D. R. Gang, and H. Beyenal. 2015. Neutral red-mediated microbial electrosynthesis by *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Zymomonas mobilis*. *Bioresour. Technol.* 195:57-65.
46. Harnisch, F. and U. Schröder. 2010. From MFC to MXC: chemical and biological cathodes and their potential for microbial bioelectrochemical systems. *Chem. Soc. Rev.* 39:4433-4448.

47. Harnisch, F., L. F. M. Rosa, F. Kracke, B. Viridis, and J. O. Krömer. 2015. Electrifying white biotechnology: engineering and economic potential of electricity-driven bio-production. *ChemSusChem*. 8:758-766.
48. Hibbett, D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, *et al.* 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111:509-547.
49. Ho, Y. W., and D. J. Barr. 1995. Classification of anaerobic gut fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. *Mycologia*. 87:655-677.
50. Hobson, P. N. 1988. Introduction. In: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Ed. P. N. Hobson and C. S. Stewart (Eds.)). Blackie Academic and Professional Publishers, London. pp.1-9.
51. Hongo, M., and M. Iwahara. 1979a. Application of electro-energizing method to L-glutamic acid fermentation. *Agric. Biol. Chem.* 43:2075-2081.
52. Hongo, M., and M. Iwahara. 1979b. Determination of electro-energizing conditions for L-glutamic acid fermentation. *Agric. Biol. Chem.* 43:2083-2086.
53. Huang, L., and I. Angelidaki. 2008. Effect of humic acids on electricity generation integrated with xylose degradation in microbial fuel cells. *Biotechnol. Bioeng.* 100:413-422.
54. Hungate, R. E. 1966. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press, London and New York.
55. Hungate, R. E. 1967. Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation. *Arch. Microbiol.* 59:158-164.
56. Huntington, G. B., D. L. Harmon, and C. J. Richards. 2006. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. *J. Anim. Sci.* 84:E14-E24.
57. Ishii, S., Y. Hotta, and K. Watanabe. 2008. Methanogenesis versus electrogenesis: morphological and phylogenetic comparisons of microbial communities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72:286-294.
58. Janssen, P. H., and M. Kirs. 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3619-3625.
59. Johns, A. T. 1951a. The mechanism of propionic acid formation by *Veillonella gazogenes*. *J. Gen. Microbiol.* 5:326-336.
60. Johns, A. T. 1951b. The mechanism of propionic acid formation by *Propionibacteria*. *J. Gen. Microbiol.* 5:337-345.
61. Johns, A. T. 1952. Mechanism of propionate formation by *Clostridium propionicum*. *J. Gen. Microbiol.* 6:123-127.
62. Jouany, J. P. 1991. Defaunation of the rumen. In: *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion* (JP Jouany, ed) INRA Editions, Versailles, France, 239-261.
63. Jouany, J. P. 1994. Manipulation of microbial activity in the rumen. *Arch. fur Tierernaehrung*. 46:133-153.
64. Jouany, J. P., and D. P. Morgavi. 2007. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal*. 1:1443-1466.
65. Joyner, A. E., and R. L. Baldwin. 1966. Enzymatic studies of pure cultures of rumen microorganisms. *J. Bacteriol.* 93:1321.
66. Kamra, D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Curr. Sci.* 89:124-135.
67. Kim, T. S., and B. H. Kim. 1988. Electron flow shift in *Clostridium acetobutylicum* fermentation by electrochemically introduced reducing equivalent. *Biotechnol. Lett.* 10:123-128.
68. Kracke, F., and J. O. Krömer. 2014. Identifying target processes for microbial electrosynthesis by elementary mode analysis. *BMC Bioinformatics*. 15:410.
69. Kurihara, Y., J. M. Eadie, P. N. Hobson, and S. O. Mann. 1968. Relationship between bacteria and ciliate protozoa in the sheep rumen. *J. Gen. Microbiol.* 51:267-288.
70. Ladd, J. N., and D. J. Walker. 1965. Fermentation of lactic acid by the rumen microorganism *Peptostreptococcus elsdenii*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 119:1038-1047.
71. Lambie, S. C., W. J. Kelly, S. C. Leahy, D. Li, K. Reilly, T. A. McAllister, E. R. Valle, G. T. Attwood, and E. Altermann. 2015. The complete genome sequence of the rumen methanogen *Methanosarcina barkeri* CM1. *Standards in Genomic Sciences*. 10:57.

72. Larsen, M., and N. B. Kristensen. 2013. Precursors for liver gluconeogenesis in periparturient dairy cows. *Animal*. 7:1640-1650.
73. Leng, R. A. 1970. Formation and production of volatile fatty acids in the rumen. In: *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*. A. T. Phillipson. Oriel Press, Newcastle upon Tyne, England.
74. Lin, C-W., C-H. Wu, Y-H. Chiu, and S-L. Tsai. 2014. Effects of different mediators on electricity generation and microbial structure of a toluene powered microbial fuel cell. *Fuel*. 125:30-35.
75. Liu, H., S. Grot, and B. E. Logan. 2005. Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. *Environ. Sci. Technol.* 39:4317-4320.
76. Logan, B. E., B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schröder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, and K. Rabaey. 2006. Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ. Sci. Technol.* 40:5181-5192.
77. Logan, B. E., and J. M. Regan. 2006a. Microbial fuel cells-challenges and applications. *Environ. Sci. Technol.* 40:5172-5180.
78. Logan, B. E., and J. M. Regan. 2006b. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 14:512-518.
79. Logan, B. E., and S. A. Grot. 2006. A bio-electrochemically assisted microbial reactor that generates hydrogen gas and methods of generating hydrogen gas. Patent WO2006010149.
80. Logan, B. E. 2008. *Microbial fuel cells*. John Wiley and Sons Inc., Hoboken, N.J.
81. Logan, B. E., D. Call, S. Cheng, H. V. M. Hamelers, T. H. J. A. Sleutels, A. W. Jeremiasse, and R. A. Rozendal. 2008. Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 42:8639-8640.
82. Logan, B. E., and K. Rabaey. 2012. Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies. *Science*. 337:686-690.
83. Lovley, D. R. 2006. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:497-508.
84. Lovley, D. R. 2012. Electromicrobiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 66:391-409.
85. Lowe, S. E., M. K. Theodorou, and A. P. Trinci. 1987. Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1216-1223.
86. Marshall, C. W., Ross, D. E., Fichot, E. B., Norman, R. S., and H. D. May. 2013. Long-term operation of microbial electrosynthesis systems improves acetate production by autotrophic microbiomes. *Environ. Sci. Technol.* 47:6023-6029.
87. Miller, T. L., and S. E. Jenesel. 1979. Enzymology of butyrate formation by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Bacteriol.* 138:99-104.
88. Morgavi, D. P., E. Forano, C. Martin, and C. J. Newbold. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*. 4:1024-1036.
89. Nevin, K. P., T. L. Woodard, A. E. Franks, Z. M. Summers, and D. R. Lovley. 2010. Microbial electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds. *mBio*. 1:e00103-10.
90. Newbold, C. J., S. López, N. Nelson, J. O. Ouda, R. J. Wallace, and A. R. Moss. 2005. Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 94:27-35.
91. Oltjen, J. W., and J. L. Beckett. 1996. Role of ruminant livestock in sustainable agricultural systems. *J. Anim. Sci.* 74:1406-1409.
92. Orpin, C. G. 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.* 91:249-62.
93. Orpin, C. G., and K. N. Joblin. 1997. The rumen anaerobic fungi. In: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Ed. P. N. Hobson and C. S. Stewart). Blackie Academic and Professional Publishers, London.

94. 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.
95. Pant, D., G. Van Bogaert, L. Diels, and K. Vanbroekhoven. 2010. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresour. Technol.* 101:1533-1543.
96. Pant, D., A. Singh, G. Van Bogaert, S. I. Olsen, P. S. Nigam, L. Diels, and K. Vanbroekhoven. 2012. Bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy production and product recovery from organic wastes and industrial wastewaters. *RSC Adv.* 2:1248-1263.
97. Park, D. H., and J. G. Zeikus. 1999. Utilization of electrically reduced neutral red by *Actinobacillus succinogenes*: physiological function of neutral red in membrane-driven fumarate reduction and energy conservation. *J. Bacteriol.* 181:2403-2410.
98. Park, D. H. and J. G. Zeikus. 2000. Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1292-1297.
99. Paynter, M. J. B., and S. R. Elsdon. 1970. Mechanism of propionate formation by *Selenomonas ruminantium*, a rumen micro-organism. *J. Gen. Microbiol.* 61:1-7.
100. Peguin, S., P. Delorme, G. Goma, and P. Soucaille. 1994. Enhanced alcohol yields in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum* using a three-electrode potentiometric system with methyl viologen as electron carrier. *Biotechnol. Lett.* 16:269-274.
101. Piveteau, P. 1999. Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review. *Lait.* 79:23-41.
102. Prins, R. A., and W. Van Hoven. 1977. Carbohydrate fermentation by the rumen ciliate *Isotricha prostoma*. *Protistologica.* 13:549-556.
103. Rabaey, K., and W. Verstraete. 2005. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.* 23:291-298.
104. Rabaey, K., J. Rodríguez, L. L. Blackall, J. Keller, P. Gross, D. Batstone, W. Verstraete, and K. H. Neelson. 2007. Microbial ecology meets electrochemistry: Electricity-driven and driving communities. *ISME J.* 1:9-18.
105. Rabaey, K. 2010. Bioelectrochemical systems: A new approach towards environmental and industrial biotechnology. In: K. Rabaey, L. Angenent, U. Schröder and J. Keller (Eds.). *Bioelectrochemical systems: From extracellular electron transfer to biotechnological application.* London, U.K.; New York, U.S.A. IWA Publishing. pp.1-16.
106. Rabaey, K., and R. A. Rozendal. 2010. Microbial electrosynthesis - revisiting the electrical route for microbial production. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:706-716.
107. Reguera, G., K. D. McCarthy, T. Mehta, J. S. Nicoll, M. T. Tuominen, and D. R. Lovley. 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature.* 435:1098-1101.
108. Ren, L., Y. Ahn, H. Hou, F. Zhang, and B. E. Logan. 2014. Electrochemical study of multi-electrode microbial fuel cells under fed-batch and continuous flow conditions. *J. Power Sources.* 257:454-460.
109. Rismani-Yazdi, H., A. D. Christy, B. A. Dehority, M. Morrison, Z. Yu, and O. H. Tuovinen. 2007. Electricity generation from cellulose by rumen microorganisms in microbial fuel cells. *Biotechnol. Bioeng.* 97:1398-1407.
110. Rivera, I., G. Buitrón, P. Bakonyi, N. Nemestóthy, and K. Bélafi-Bakó. 2015. Hydrogen production in a microbial electrolysis cell fed with a dark fermentation effluent. *J. Appl. Electrochem.* 45:1223-1229.
111. Rosenbaum, M., F. Aulenta, M. Villano, and L. T. Angenent. 2011. Cathodes as electron donors for microbial metabolism: which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresour. Technol.* 102:324-333.
112. Rosenbaum, M. A., and A. E. Franks. 2014. Microbial catalysis in bioelectrochemical technologies: status quo, challenges and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:509-518.

113. Rozendal, R. A., H. V. M. Hamelers, G. J. W. Euverink, S. J. Metz, and C. J. N. Buisman. 2006. Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis. *Int. J. Hydrogen Energy*. 31:1632-1640.
114. Rozendal, R. A., H. V. M. Hamelers, K. Rabaey, J. Keller, and C. J. N. Buisman. 2008. Towards practical implementation of bioelectrochemical wastewater treatment. *Trends Biotechnol.* 26:450-459.
115. Russell, J. B., and R. J. Wallace. 1988. Energy yielding and consuming reactions. In: P. N. Hobson. *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Applied Science, London and New York.
116. Sasaki, K., Y. Tsuge, D. Sasaki, and A. Kondo. 2014. Increase in lactate yield by growing *Corynebacterium glutamicum* in a bioelectrochemical reactor. *J. Biosci. Bioeng.* 117:598-601.
117. Scheffinger, C. C., and M. J. Wolin. 1973. Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined cultures of *Bacteroides succinogenes* and *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Microbiol.* 26:789-795.
118. Schuppert, B., B. Schink, and W. Trösch. 1992. Batch and continuous production of propionic acid from whey permeate by *Propionibacterium acidipropionici* in a three-electrode amperometric culture system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:549-553.
119. Schwieger, G. and W. Buckel. 1984. On the dehydration of (R)-lactate in the fermentation of alanine to propionate by *Clostridium propionicum*. *FEBS Lett.* 171:79-84.
120. Shimada, A. 1983. *Fundamentos de nutrición animal comparativa*. 1ª Ed. Sistemas de Educación Continua en Producción Animal en México A. C. México, D. F.
121. Shimada, T., Zilles J., Raskin L., and E. Morgenroth. 2007. Carbohydrate storage in anaerobic sequencing batch reactors. *Water Res.* 41:4721-4729.
122. Shimada, T., Li, X., Zilles, J. L., Morgenroth, E., and L. Raskin. 2011. Effects of the antimicrobial tylosin on the microbial community structure of an anaerobic sequencing batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 108:296-305.
123. Shimada, A. 1991. *Metabolismo de los carbohidratos*. En: Pérez D.M. Ed. *Manual sobre ganado productor de leche*. Ed. Diana México. pp. 44-63.
124. Shin, H. S., M. K. Jain, M. Chartain, and J. G. Zeikus. 2001. Evaluation of an electrochemical bioreactor system in the biotransformation of 6-bromo-2-tetralone to 6-bromo-2-tetralol. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:506-510.
125. Shin, H. S., J. G. Zeikus, and M. K. Jain. 2002. Electrically enhanced ethanol fermentation by *Clostridium thermocellum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:476-481.
126. SIAP-SAGARPA. 2015a. Resumen nacional de la producción pecuaria. www.siap.gob.mx
127. SIAP-SAGARPA. 2015b. Boletín de leche enero-marzo de 2015. www.siap.gob.mx
128. Srikanth S., M. V. Reddy, and S. V. Mohan. 2012. Microaerophilic microenvironment at biocathode enhances electrogenesis with simultaneous synthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) in bioelectrochemical system (BES). *Bioresour. Technol.* 125:291-299.
129. Steinbusch, K. J. J., H. V. M. Hamelers, J. D. Schaap, C. Kampman, and C. J. N. Buisman. 2010. Bioelectrochemical ethanol production through mediated acetate reduction by mixed cultures. *Environ. Sci. Technol.* 44:513-517.
130. Stewart, W. E., and L. H. Schultz. 1958. *In vitro* volatile fatty acid production from various feeds by bovine rumen microorganisms. *J. Animal Sci.* 17:737-742.
131. Stewart, C. S., H. J. Flint, and M. P. Bryant. 1997. The rumen bacteria. In: *The Rumen Microbial Ecosystem* (Ed. P. N. Hobson and C. S. Stewart (Eds.)). Blackie Academic and Professional Publishers, London. pp. 10-72.
132. Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies, and J. W. Costerton. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:187-209.
133. Suresh, S. 2014. Composite electrodes with immobilized bacteria bioanode and photosynthetic algae biocathode for bio-batteries. University of Saskatchewan. Master of Science Thesis.

134. Swick, R. W. and H. G. Wood. 1960. The role of transcarboxylation in propionic acid fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 46:28-41.
135. Theodorou, M. K., S. E. Lowe, and A. P. Trinci. 1988. The fermentative characteristics of anaerobic rumen fungi. *Biosystems.* 21:371-376.
136. Thomas, P. C., and J. A. F. Rook. 1977. Manipulation of rumen fermentation. In: *Recent advances in animal nutrition.* William, H. and L. Dyfed. pp. 83-109.
137. Thompson, T. E., R. Conrad, and J. G. Zeikus. 1984. Regulation of carbon and electron flow in *Propionispira arboris*: physiological function of hydrogenase and its role in homopropionate formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 22:265-271.
138. Thrash, J. C., and J. D. Coates. 2008. Review: direct and indirect electrical stimulation of microbial metabolism. *Environ. Sci. Technol.* 42:3921-3931.
139. Trautmann, A., and H. Albrecht. 1931. Untersuchungen ueber die Sekretion der Parotis junger und erwachsener Ziegen. (Secretion of the parotis in young and adult goats). *Arch. Wiss. Prakt. Tierheilkde.* 64:93.
140. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. 2015. *World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables.* Working Paper No. ESA/P/WP.241.
141. Van Eerten-Jansen, M. C. A. A., A. Ter Heijne, C. J. N. Buisman, and H. V. M. Hamelers. 2012. Microbial electrolysis cells for production of methane from CO₂: long-term performance and perspectives. *Int. J. Energ. Res.* 36:809-819.
142. Van Eerten-Jansen, M. C. A. A., A. Ter Heijne, T. I. M. Grootcholten, K. J. J. Steinbusch, T. H. J. A. Sleutels, H. V. M. Hamelers, and C. J. N. Buisman. 2013. Bioelectrochemical production of caproate and caprylate from acetate by mixed cultures. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 1:513-518.
143. Van Hoven, W., and R. A. Prins. 1977. Carbohydrate fermentation by the rumen ciliate *Dasytricha ruminantium*. *Protistologica.* 13:599-606.
144. Van Maanen, R. W., J. H. Herbein, A. D. McGilliard, and J. W. Young. 1978. Effects of monensin on *in vivo* rumen propionate production and blood glucose kinetics in cattle. *J. Nutr.* 108:1002-1007.
145. Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant.* 2nd Ed. Cornell University Press, New York. pp. 314-315.
146. Visser, A. 1995. The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Ph.D. Thesis. Wageningen Agricultural University Wageningen, Holland.
147. Vital, M., A. C. Howe, and J. M. Tiedje. 2014. Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. *mBio.* 5:e00889-14.
148. Vogels, G. D., W. F. Hoppe, and C. K. Stumm. 1980. Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:608-612.
149. Wang, C. T., C. M. J. Yang, and Z. S. Chen. 2012. Rumen microbial volatile fatty acids in relation to oxidation reduction potential and electricity generation from straw in microbial fuel cell. *Biomass Bioenergy.* 37:318-329.
150. Wang, H., and Z. J. Ren. 2013. A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnol. Adv.* 31:1796-1807.
151. Wang, Y. F., M. Masuda, S. Tsujimura, and K. Kano. 2008. Electrochemical regulation of the end-product profile in *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 with an endogenous mediator. *Biotechnol. Bioeng.* 101:579-586.
152. Warner, A. C. I., and B. D. Stacy. 1965. Solutes in the rumen of the sheep. *Exp. Physiol.* 50:169-184.
153. Weimer, P. J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective. *J. Anim. Sci.* 76:3114-3122.
154. Williams, A. G., and C. G. Harfoot. 1976. Factors affecting the uptake and metabolism of soluble carbohydrates by the rumen ciliate *Dasytricha ruminantium* isolated from ovine rumen contents by filtration. *J. Gen. Microbiol.* 96:125-136.
155. Williams, A. G. 1986. Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiol. Rev.* 50:25-49.

156. Williams, A. G., and S. E. Withers. 1991. Effect of ciliate protozoa on the activity of polysaccharide-degrading enzymes and fibre breakdown in the rumen ecosystem. *J. Appl. Microbiol.* 70:144-155.
157. Williams, A. G., and G. S. Coleman. 1992. The rumen protozoa. The rumen ecosystem. P. N. Hobson and C. S. Stewart. London. Chapman and Hall. pp. 73-139.
158. Wolin, E. A., Wolin, M. J., and R. S. Wolfe. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* 238:2882-2886.
159. Wolin, M. J., T. L. Miller, and C. S. Stewart. 1997. Microbe-microbe interactions. In: P. N. Hobson and C. S. Stewart (Eds.). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Blackie Academic and Professional, London. pp. 467-491.
160. World Bank. 2008. *Rising food and fuel prices: addressing the risks to future generations*. Washington DC: World Bank.
161. Yarlett, N., C. G. Orpin, E. A. Munn, N. C. Yarlett, and C. A. Greenwood. 1986. Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Biochem. J.* 236:729-739.
162. Yerushalmi, L., B. Volesky, and T. Szczesny. 1985. Effect of increased hydrogen partial pressure on the acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:103-107.
163. Yokoyama, M. T., and K. A. Johnson. 1988. Microbiology of the rumen and intestine. In: D. C. Church. *The ruminant animal: Digestive physiology and nutrition*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.
164. Young, J. W. 1977. Gluconeogenesis in cattle: significance and methodology. *J. Dairy Sci.* 60:1-15.
165. Zawodzinski, T. A., C. Derouin, S. Radzinski, R. J. Sherman, V. T. Smith, T. E. Springer, and S. Gottesfeld. 1993. Water-uptake by and transport through Nafion (R) 117 membranes. *J. Electrochem. Soc.* 140:1041-1047.
166. Zhou, M., J. Chen, S. Freguia, K. Rabaey, and J. Keller. 2013. Carbon and electron fluxes during the electricity driven 1, 3-propanediol biosynthesis from glycerol. *Environ. Sci. Technol.* 47:11199-11205.

12. PRODUCCIÓN

Congresos Nacionales

- **21 Jornadas Académicas UNAM 2014**

Juriquilla, Querétaro, México. Septiembre 29 - Octubre 3, 2014.

Instituto de Neurobiología. Campus UNAM, Juriquilla.

“SISTEMA BIOELECTROQUÍMICO PARA MODIFICAR LA FERMENTACIÓN MICROBIANA RUMINAL *IN VITRO*”

- **Congreso Nacional y Estudiantil de Microbiología Pecuaria 2014**

Distrito Federal, México. 13 - 14 Noviembre, 2014.

UAM-Xochimilco

“SISTEMA BIOELECTROQUÍMICO PARA MODIFICAR LA FERMENTACIÓN DE MICROORGANISMOS RUMINALES *IN VITRO*”

Congreso Internacional

- **Biotrans 2015**

Viena, Austria. 26 - 30 Julio, 2015.

Vienna University of Technology

Austrian Centre for Industrial Biotechnology (ACIB)

"ENHANCED VOLATILE FATTY ACIDS SYNTHESIS IN RUMINAL FLUID USING A BIOELECTROCHEMICAL SYSTEM"

Publicaciones

- Aguilar-González, M; Buitrón, G; Shimada, A; Mora, O. 2016. Estado actual de los sistemas bioelectroquímicos: Factibilidad de su uso para aumentar la producción ruminal de propionato. *Agrociencia*, vol. 50, núm. 2, pp. 149-166.

Estancias de Investigación

- Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA). Unidad Académica Juriquilla. Campus UNAM, Juriquilla, Qro.
Dr. Germán Buitrón Méndez.