

ESTADO ACTUAL DE LOS SISTEMAS BIOELECTROQUÍMICOS: FACTIBILIDAD DE SU USO PARA AUMENTAR LA PRODUCCIÓN RUMINAL DE PROPIONATO

Mariana Aguilar-González¹, Germán Buitrón², Armando Shimada-Miyasaka³ y Ofelia Mora-Izaguirre³. 2017. Engormix.com.

1.-Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

2.-Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas. Instituto de Ingeniería, UNAM.

3.-Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN).

www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Fisiología digestiva y manejo del alimento](#)

RESUMEN

Los sistemas bioelectroquímicos 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 el aumento o disminución de los productos finales. En este ensayo se presentan los fundamentos de estos sistemas, su clasificación y como fueron evolucionando hasta llegar a conformarse como tal, en un rubro de tecnologías emergentes. El potencial de aplicación de estos sistemas es diverso, incluidas la generación de energía, la biorremediación y la producción de compuestos químicos de valor agregado. Hacemos énfasis en la electrofermentación, técnica enfocada en la producción microbiana de compuestos químicos orgánicos como alcoholes y ácidos grasos de cadena corta, a través de la aplicación de energía eléctrica. El propionato toma mayor relevancia en este ensayo, debido a su contribución en el metabolismo de los rumiantes como mayor precursor de glucosa hepática. Los conocimientos actuales sobre los sistemas bioelectroquímicos para optimizar la fermentación propiónica se resumen. Además se presenta una recopilación sobre los trabajos de investigación enfocados en la aplicación de estas nuevas tecnologías al estudio de la fermentación de los microorganismos ruminales. También analizamos los requerimientos de estos sistemas para su aplicación in vivo, y enfatizamos que el uso de estas metodologías en el área de la ecológica microbiana ruminal se sitúa en los primeros intentos, por lo cual es necesaria una mayor investigación.

Palabras clave: Sistemas bioelectroquímicos, electrones, fermentación ruminal, propionato, rumiantes, *Propionibacterium*.

INTRODUCCIÓN

La fermentación ruminal es la actividad metabólica de los microorganismos presentes en el rumen, y a través de ésta, el rumiante obtiene los nutrientes necesarios para el mantenimiento de sus funciones biológicas. Los ácidos grasos volátiles (AGV): acetato, propionato y butirato, son los mayores productos de fermentación de los microorganismos ruminales y constituyen hasta 80 % de la energía aprovechable para el animal; el carbono restante se elimina en forma de calor y de metano (Bergman y Wolff, 1971). Un enfoque exitoso para mejorar la producción de los rumiantes es promover un aumento en la disponibilidad energética para el animal, mediante el aumento en la síntesis hepática de glucosa. La gluconeogénesis es su principal vía de suministro, porque los rumiantes obtienen menos del 10 % de su requerimiento de glucosa directamente por absorción en el intestino (Young, 1977).

Diversos productos de la digestión se constituyen en 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 AGV glucogénicos (propionato, isobutirato y valerato) a la formación de glucosa hepática oscila entre 44 % hasta 78 %, y el propionato representa hasta 95 % de estos AGV (Larsen y Kristensen, 2013).

Metodologías diversas se desarrollaron para incrementar la concentración de propionato en el rumen: proporcionar ionóforos como la monensina (Van Maanen et al., 1978), propilenglicol y glicerol (Cozzi et al., 1996), y en la dieta agregar precursores del propionato como el acrilato y fumarato de sodio, que además disminuyen la producción de metano in vitro (Newbold et al., 2005). Otros estudios documentaron que la defaunación del rumen también incrementa la producción de propionato en él (Williams y Withers, 1991). Sin embargo, los ejemplos

mencionados presentan desventajas, lo cual mantiene activo el desarrollo de metodologías para incrementar el propionato ruminal.

Existen otras alternativas que se pueden desarrollar para modificar la fermentación ruminal sin cambiar o alterar factores importantes, como la dieta, la composición de la microbiota ruminal, y sin realizar modificaciones genéticas; entre ellas se encuentran los sistemas bioelectroquímicos.

La fermentación es básicamente un flujo de electrones que va de compuestos que se oxidan (donadores de electrones) a compuestos que se reducen (aceptores de electrones) mediante moléculas transportadoras. Por lo tanto es factible que este flujo se modifique por una fuente de poder externa y se alterarían los patrones de fermentación. Con este fin se desarrollaron técnicas conocidas como sistemas bioelectroquímicos.

El objetivo de esta investigación fue describir el conocimiento actual sobre los sistemas bioelectroquímicos desarrollados para aumentar la producción de propionato y su aplicación en el estudio del metabolismo de los microorganismos ruminales. Además, presentar las bases de los sistemas bioelectroquímicos para comprender como funcionan y como se utilizan para modificar los patrones de fermentación de diversos microorganismos.

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

CELDA DE COMBUSTIBLE MICROBIANA (CCM)

Las CCM son dispositivos que utilizan a los microorganismos para oxidar la materia orgánica e inorgánica y generar energía eléctrica (Logan et al., 2006). Consisten, como todos los sistemas bioelectroquímicos, 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 los electrones llegan 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). Cuando el oxígeno u otras moléculas aceptoras, como nitratos o sulfatos, están presentes 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 generación de corriente eléctrica (Pant et al., 2012). Los microorganismos que generan energía eléctrica son referidos como exoelectrogénicos por su capacidad de transferir electrones fuera de la célula (Logan y Regan, 2006b).

Cuando en lugar de utilizar las celdas para producir electricidad, se hace el proceso inverso y se aplica al sistema una corriente eléctrica desde una fuente externa, se desarrolla el segundo tipo de sistemas bioelectroquímicos, conocido como celdas de electrólisis microbianas.

CELDA DE ELECTRÓLISIS MICROBIANA

Las CEM son un tipo de sistema bioelectroquímico al que se le proporciona energía eléctrica para lograr un determinado proceso o la formación de productos químicos principalmente inorgánicos como el hidrógeno, el peróxido de hidrógeno, el hidróxido de sodio, y otros (Logan, 2008). Funcionan de manera parecida a una CCM, ya que son modificación de éstas, y fueron principalmente diseñadas para producir H₂ (Liu et al., 2005a).

El sistema consiste en utilizar los electrones que llegan al cátodo, como ocurre en un CCM, pero con la finalidad de combinarse con los protones para producir H₂, por lo tanto, este sistema debe de estar en anaerobiosis para que los electrones y protones no se combinen con el oxígeno. Esta reacción no se produce espontáneamente,

necesita de una cantidad de energía externa y 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 electrolisis microbiana (Cheng y Logan, 2007).

El voltaje o también denominado diferencia de potencial, es la presión o la 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 de un potenciostato. Para la producción de hidrógeno, el voltaje generado por los microorganismos en el ánodo no es suficiente para dirigir la reacción, por lo cual un voltaje externo debe aplicarse al sistema. Los cálculos para determinar el voltaje que se necesita se basan en la energía libre de Gibbs de la reacción redox (Call y Logan, 2008; Logan et al., 2008; Rozendal et al., 2008).

La materia orgánica biodegradable que se puede utilizar en estos sistemas es variable, desde moléculas simples como acetato, glucosa, almidón o celulosa, hasta mezclas complejas como las presentes en aguas residuales de diferentes industrias (Pant et al., 2010).

Los sistemas bioelectroquímicos más estudiados son las CCM y las CEM, 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 emergentes que utilizan microorganismos en el ánodo para catalizar reacciones de oxidación y en el cátodo para reacciones de reducción, es decir, puede haber microorganismos al mismo tiempo en los dos electrodos. Cuando los microorganismos están presentes en la cámara anódica, estos 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). Este proceso da origen al tercer tipo de sistema bioelectroquímico.

CELAS DE ELECTROSÍNTESIS MICROBIANA

Las CESM son un tipo de sistemas bioelectroquímicos basadas 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 sinteticen 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).

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

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 existentes se redirigen, y ocasionan aumento o disminución de los productos de fermentación. De tal manera que al cambiar el flujo de electrones también cambia el flujo de carbonos (Logan y Rabaey, 2012).

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 es una manera efectiva de incrementar el rendimiento de los productos de la fermentación (Kim y Kim, 1988; Park y Zeikus, 1999). Otra manera en que la corriente eléctrica puede contribuir al cambio en las vías metabólicas es mediante la formación de H_2 , como ocurre en las celdas de electrolisis microbianas. El H_2 es donador de electrones en la fermentación, no hay interacción directa entre el electrodo y los microorganismos (Steinbusch et al., 2010; Harnisch et al., 2015). La acumulación de este producto aumenta la presión parcial de hidrógeno en un cultivo bacteriano en fermentación; en consecuencia habrá un cambio en el balance de electrones, y por lo tanto del metabolismo microbiano (Yerushalmi et al., 1985).

MECANISMOS DE TRANSFERENCIA DE ELECTRONES

Los mecanismos por los cuales los microorganismos transfieren o reciben los electrones hacia o desde un electrodo son:

- ◆ **Transferencia de electrones directa:** mediante el contacto directo de los microorganismos con la superficie de un electrodo. Las bacterias presentan en su membrana celular 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 pueden secretar al medio o liberar en la degradación de materiales biológicos. Estas moléculas son reducidas u oxidadas fuera de la membrana celular para posteriormente 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 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 son un costo adicional de operación (Huang y Angelidaki, 2008).

MANIPULACIÓN DEL METABOLISMO MICROBIANO MEDIANTE ELECTROFERMENTACIÓN

Los sistemas bioelectroquímicos se han aplicado para incrementar la síntesis de una variedad de productos de fermentación. El primer estudio fue realizado por Hongo e Iwahara (1979a). Estos autores desarrollaron un método al que denominaron fermentación electro-energizante (EEF, por sus siglas en inglés), conocido ahora como electrofermentación. Esta metodología consiste en aplicar una corriente eléctrica directa de 1.5 V a un cultivo de *Brevibacterium flavum*, a través de un electrodo de platino, con el fin de acelerar su metabolismo reductor. En la fermentación electro-energizante, así como en el testigo, se utilizó glucosa como sustrato y rojo neutro como mediador redox. El resultado fue la producción de ácido L-glutámico (51 mg mL⁻¹), con un incremento de 15 % en el rendimiento, en comparación con la fermentación testigo (44.3 mg mL⁻¹). Los autores sugirieron que el incremento en la producción parecía estimularse por la acción reductora del cátodo, mediante la transferencia de electrones hacia los microorganismos (Hongo e Iwahara, 1979b).

Kim y Kim (1988) también utilizaron el método electro energizante para manipular la fermentación de la bacteria *Clostridium acetobutylicum* e incrementar la producción de butanol a partir de glucosa. Ellos inocularon los microorganismos en el cátodo, aplicaron -2.5 V y metil viológeno al cultivo como mediador redox. Ellos no observaron diferencia en el consumo de sustrato y crecimiento celular con el testigo. Sin embargo, la producción de butanol se aumentó 26 % (93.7 mmol) respecto al testigo (74.6 mmol). Simultáneamente hubo una disminución de 25 % en la producción de acetona (37.8 mmol en el testigo y 28.4 mmol en el sistema bioelectroquímico).

Park y Zeikus (1999) mostraron que el poder reductor de una corriente eléctrica puede utilizarse para manipular la fermentación de *Actinobacillus succinogenes*, con glucosa como sustrato y rojo neutro como mediador redox. En la cámara catódica inocularon los microorganismos con un voltaje de 2 V a través de electrodos de tela de grafito; observaron que el poder reductor incrementó el consumo de glucosa, el crecimiento celular, 20 % la producción de succinato y disminuyó la producción de acetato (50 % comparado con los controles). Los autores mostraron que el mediador redox rojo neutro se une a la enzima fumarato reductasa y transfiere los electrones del electrodo a la célula, y así la enzima reduce el fumarato a succinato.

La producción de etanol por *Clostridium thermocellum* y *Saccharomyces cerevisiae* también fue manipulada mediante un sistema bioelectroquímico con rojo neutro y como sustrato celulosa y glucosa, respectivamente (Shin et al., 2002). En ese estudio el etanol incrementó 61 % con *C. thermocellum*. El cultivo testigo presentó 1.04 g L⁻¹ y la fermentación con -1.5 V generó 1.68 g L⁻¹. El incremento con *S. cerevisiae* fue menor, pero también fue significativo, de 46.7 g L⁻¹ a 52.5 g L⁻¹ de etanol, equivalente a 12 %. Por el contrario, disminuyó la producción de acetato con ambos microorganismos en comparación con los controles (Shin et al., 2002).

El cambio en la producción de lactato con *Corynebacterium glutamicum*, se realizó en un reactor bioelectroquímico, con un cátodo regulado a -0.6 V y antraquinona-2, 6-disulfonato como mediador redox. La concentración de lactato incrementó de 1.10 mol de producto por mol de glucosa a 1.62 mol de producto por mol de glucosa (Sasaki et al., 2014). Otro grupo de investigación, logró modificar la fermentación de *Clostridium pasteurianum* mediante una diferencia de potencial de 0.045 V, pero sin adicionar mediadores redox al medio de cultivo. La producción de butanol se incrementó a 13.5 mmol en comparación a 5.4 mmol con la fermentación sin electricidad (Choi et al., 2014).

Harrington et al. (2015) observaron el efecto de la corriente eléctrica en la bacteria *Klebsiella pneumoniae*. Ellos reportaron un incremento de 93 % en la producción de etanol, simultánea a la de lactato de 76 %, con rojo neutro como mediador redox y -0.65 V a través del sistema. La concentración de etanol en el testigo fue 9.61 mmol y de lactato 2.66 mmol; en contraste con la concentración en la electrofermentación que fue 22.34 mmol de etanol y 5.64 mmol de lactato. En teoría, se espera que cualquier metabolismo fermentativo pueda ser manipulado mediante un suministro electroquímico de equivalentes reducidos, que cambien la relación molar NAD/NADH, ya sea en presencia o en ausencia de un mediador redox exógeno (Peguin et al., 1994).

MÉTODOS BIOELECTROQUÍMICOS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE PROPIONATO

Las bacterias anaerobias del género *Propionibacterium* son las productoras principales de propionato a partir de la fermentación de glucosa o lactato, como metabolitos secundarios también generan acetato y CO_2 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 estudio de la manipulación de los productos de fermentación por bacterias propionogénicas es de gran interés en la industria de productos lácteos, ya que la cantidad de los metabolitos de estas bacterias afectan el sabor del queso Suizo (Hettinga y Reinbold, 1972). También en la producción animal es de gran importancia, porque el propionato es el precursor gluconeogénico cuantitativo más importante en el metabolismo de los rumiantes (Huntington et al., 2006).

El primer estudio para incrementar la concentración de propionato en un medio de cultivo bacteriano se realizó administrando hidrógeno, para aumentar la presión parcial del medio de crecimiento de *Propionispira arboris*. Esta bacteria es Gram-negativa, fijadora de nitrógeno y libera propionato, acetato y CO_2 como productos de fermentación de glucosa. Dos atmósferas de hidrógeno en el medio cambiaron 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 el testigo produjo 11.2 mmol de propionato y 5.8 mmol de acetato. El exceso de hidrógeno alteró el flujo de carbono y electrones previniendo que el piruvato se transformara en acetato y CO_2 (Thompson et al., 1984).

El primer sistema bioelectroquímico como tal, para incrementar la concentración de propionato en un cultivo bacteriano fue realizado por Emde y Schink (1990). Ellos evaluaron un sistema de electrodos para cambiar los patrones de fermentación de *Propionibacterium freudenreichii*, con glucosa como sustrato en un sistema amperométrico de tres electrodos: un electrodo de trabajo conectado a un potenciostato que aplica una diferencia de potencial, 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 con las bacterias: ácido antraquinona-2,6-disulfónico (AQ), sepulcrato de cobalto (CoS), bencil viológeno y metil viológeno, con potencial anódico 40 mV más negativo que el potencial redox estándar de cada mediador.

Durante los primeros ensayos Emde y Schink (1990) observaron que el bencil viológeno 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 estos compuestos no polares. En cambio, con AQ y CoS se observó que grandes cantidades de electrones eran transferidas, con el incremento en la producción de propionato. En presencia del AQ 90 % del total de productos formados 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.

Schuppert et al. (1992) continuaron los estudios de Emde y Schink (1990), se centraron en el incremento en la producción de propionato durante la fermentación de un medio con suero de leche y *Propionibacterium acidipropionici*. Basados en los hallazgos previos utilizaron como mediador redox al CoS y un electrodo de platino regulado a un potencial de -0.47 V. Con aplicación de un potencial eléctrico y en cultivo en modo de lote, la lactosa del suero de leche fue fermentada para producir 70 mmol de propionato, sin producción de acetato. Esto representa la obtención de 100 % de propionato en el medio de cultivo, comparado con el testigo en el que se produjeron 49 mmol de propionato y 23 mmol 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, con lo que se reducen los costos del proceso de escalamiento en modo continuo.

Wang et al. (2008) evaluaron si *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 podría utilizar, como mediador redox, un estimulador de crecimiento de bifidobacterias que secretan al medio de cultivo (ácido 1,4-dihidroxi-2-naftoico). Esta molécula tiene actividad redox para regenerar las moléculas de NAD. Su objetivo fue desarrollar un sistema bioelectroquímico aplicando un potencial de 0.4 V y sin la necesidad de añadir un mediador redox para observar el efecto sobre la producción de propionato en la fermentación de glucosa. El resultado más importante 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 mostraron 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 CO_2 . Los resultados indicaron que esas condiciones no son adecuadas para incrementar el propionato.

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 CCM 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 de dos cámaras con electrodos de grafito, utilizaron un medio mineral suplementado con líquido ruminal clarificado para estimular el hábitat ruminal y proveer a los microorganismos factores de crecimiento, se inoculó con microorganismos ruminales en un ambiente anaerobio y se mantuvieron las celdas en condiciones óptimas para el rumen. Los investigadores mostraron que efectivamente la microbiota ruminal podía utilizarse como biocatalizadora para generar electricidad a partir de celulosa, ya que podía transferir electrones hacia un electrodo producían una corriente eléctrica constante sin adicionar un mediador redox por 60 días al menos. Después, 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. Los investigadores sugieren que ese sistema puede generar electricidad a partir de una diversidad de sustratos ricos en residuos celulósicos (Rismani-Yazdi et al., 2007).

Las CCM 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 AGV. La producción del metano representa hasta 12 % de pérdida de energía en el rumiante, con un impacto directo en la eficiencia de fermentación, además de que es un gas con efecto invernadero y el ganado contribuye con 44 % de las emisiones antropogénicas de metano (PinosRodríguez et al., 2012; Gerber et al., 2013). Dentro de la microbiota ruminal se encuentran las archeas metanogénicas, productoras de metano a partir de H_2 y CO_2 , la función de estos microorganismos es muy importante para que la fermentación ruminal se lleve a cabo adecuadamente, debido a que si hay una acumulación de H_2 en el rumen, la presión parcial aumenta, se inhibe la función de las proteínas involucradas en el transporte de electrones, disminuyen la digestibilidad de los alimentos y desequilibra la actividad fermentativa (Wolin et al., 1997). Por esto la producción de metano es necesaria a pesar de las desventajas que representa su emisión.

Las CCM 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 hidrógeno (Bretschger et al., 2009). Ishii et al. (2008) mostraron que dentro de una CCM se inhibía la metanogénesis, de 0.128 mmol d^{-1} de metano en una fermentación testigo a 0.009 mmol d^{-1} de metano dentro de las celdas durante las primeras 30 h; además, aumentaba temporalmente la concentración de acetato y propionato en muestras de suelo que originalmente producían altas concentraciones de metano.

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 CCM 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 AGV, los oxidaron y continuaron generando electricidad a falta de otro sustrato disponible.

Nuestro grupo actualmente está desarrollando un sistema bioelectroquímico para evaluar los cambios en la fermentación de los microorganismos ruminales in vitro con una corriente de energía eléctrica directa. Hemos observado modificaciones en los patrones de fermentación hacia el incremento en la producción de los ácidos grasos volátiles: acetato, propionato y butirato (resultados no publicados). Nuestro grupo también está investigando como incrementar el ácido propiónico ruminal a expensas de la disminución en el ácido acético. Pero, hemos encontrado que el efecto de la energía eléctrica se ejerce sobre la producción de los tres AGV y no solo en el propionato como se esperaba al inicio. También hemos probado el efecto de un mediador redox en la fermentación ruminal, y niveles variados de diferencias de potencial, con lo que determinamos que nuestro sistema no requirió mediadores externos. Nuestros datos muestran evidencia de que es posible incrementar la producción de los AGV in vitro, y el sistema podría modificarse para realizarlo in vivo con más investigación y tecnología (Aguilar-Glez et al. Resultados no publicados).

APLICACIÓN DE SISTEMAS BIOELECTROQUÍMICOS IN VIVO

La brecha entre los estudios in vitro y los estudios in vivo representa uno de los mayores retos en la investigación científica. Los sistemas bioelectroquímicos deben optimizarse en su diseño para administrarlos a los animales vía oral, con la finalidad de que alcancen el rumen y se mantengan ahí sin pasar a otros órganos del sistema digestivo. Los factores a considerar son:

- ◆ Diseño de la celda: miniaturización de los dispositivos actuales y configuración adecuada. Uno de los requisitos que consideramos importante es que la configuración de la celda sea de forma tubular, con el fin de administrarla vía oral con ayuda de un embolo, como se administran varios productos al ganado bovino. Los distintos tipos de sistemas bioelectroquímicos tienen configuraciones diversas: rectangulares, en forma de H, tubulares, en forma de U, o miniaturizadas para sitios poco accesibles (Du et al., 2007). El desarrollo de variantes es posible en dependencia de las necesidades de cada aplicación, pero es importante mantener el desempeño; para esto se deben considerar factores como: tipo de microorganismo, sustrato, agitación, pH, temperatura, los electrodos, la distancia entre ellos, la composición de los medios, el tipo de membrana, la resistencia interna de la celda, los mediadores redox, entre otros (Liu et al., 2005b).
- ◆ Fuente de energía: en los ensayos in vitro, las celdas están conectadas a un equipo que administra corriente directa, el cual a su vez, requiere de estar siempre conectado a una terminal de energía eléctrica, pero para la aplicación de las celdas in vivo, es necesario y determinante el reemplazo de esta fuente de poder por un batería como pueden ser las baterías de litio.

Los nuevos retos en el área consisten en crear sistemas efectivos que permitan a los microorganismos desempeñarse como biocatalizadores óptimos y lograr que produzcan compuestos de interés en concentraciones significativas, además de comprender a fondo como es que utilizan el poder reductor administrado por la energía eléctrica para modificar sus vías metabólicas y cómo interactúan con las superficies de los electrodos.

CONCLUSIONES

La importancia del propionato como el precursor gluconeogénico mayor en rumiantes demanda el estudio de técnicas nuevas para aumentar su disponibilidad en el rumen. Los sistemas bioelectroquímicos representan para los autores de este ensayo una posibilidad de optimizar la fermentación de las bacterias propionogénicas ruminales, para obtener rendimiento mayor del producto. La electrofermentación es una opción para modificar los patrones de fermentación, así como la composición de los productos finales. El incremento en el conocimiento sobre este tema está creciendo rápidamente, cada vez son más los estudios del efecto de la energía eléctrica sobre el metabolismo de diversos microorganismos. Sin embargo, el entendimiento de la interacción de los sistemas bioelectroquímicos con los microorganismos ruminales hasta ahora es limitado y es necesario hacer más investigaciones al respecto. La posibilidad de incrementar la producción de propionato en el rumen, mediante sistemas bioelectroquímicos es factible, lo que motiva a continuar estudiándolos y responder preguntas como ¿qué tipo de bacterias ruminales se verían afectadas? ¿qué mecanismos de transferencia de electrones utilizan? ¿cuál será el efecto de estos sistemas sobre la simbiosis con el animal? entre otras. El reto reside en afrontar los obstáculos tecnológicos presentes, para en un futuro mejorar la producción de rumiantes con el uso de éstas tecnologías.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es parte de la tesis de maestría (UNAM) del primer autor. M. Aguilar-González que agradece al CONACYT la beca otorgada en la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM, México. Se agradece al proyecto PAPIIT IN213213-3 por el financiamiento y también al proyecto CONACYT 240590 (UNAM, México).

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Glez, M., G. Buitrón, A. Shimada, A. Varela-Echavarría, and O. Mora. 2015. Use of a bioelectrochemical system to increase propionate in ruminal fluid in vitro. Unpublished data.
- Bergman, E. N., and J. E. Wolff. 1971. Metabolism of volatile fatty acids by liver and portal-drained viscera in sheep. *Am. J. Physiol.* 221: 586-592.
- Bond, D. R., and D. R. Lovley. 2003. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1548-1555.
- 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.
- 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.
- Cheng, S., and B. E. Logan. 2007. Sustainable and efficient biohydrogen production via electrohydrogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 18871-18873.
- 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.
- 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.

- 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.
- Du, Z., H. Li, and T. Gu. 2007. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol. Adv.* 25: 464-482.
- 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.
- 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.
- 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.
- Gregory, K. B., D. R. Bond, and D. R. Lovley. 2004. Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* 6: 596-604.
- 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.
- 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.
- 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.
- Harnisch, F., L. F. M. Rosa, F. Kracke, B. Virdis, and J. O. Krömer. 2015. Electrifying white biotechnology: engineering and economic potential of electricity-driven bio-production. *ChemSusChem.* 8: 758-766.
- Hettinga, D. H., and G. W. Reinbold. 1972. The propionic acid bacteria - a review. III. Miscellaneous metabolic activities. *J. Milk Food Technol.* 35: 436-447.
- Hongo, M., and M. Iwahara. 1979a. Application of electro-energizing method to L-glutamic acid fermentation. *Agric. Biol. Chem.* 43: 2075-2081.
- Hongo, M., and M. Iwahara. 1979b. Determination of electroenergizing conditions for L-glutamic acid fermentation. *Agric. Biol. Chem.* 43: 2083-2086.
- 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.
- 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.
- Ishii, S., Y. Hotta, and K. Watanabe. 2008. Methanogenesis versus electrogenesis: morphological and phylogenetic comparisons of microbial communities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 286-294.
- 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.
- Kracke, F., and J. O. Krömer. 2014. Identifying target processes for microbial electrosynthesis by elementary mode analysis. *BMC Bioinformatics.* 15: 410.
- Larsen, M., and N. B. Kristensen. 2013. Precursors for liver gluconeogenesis in periparturient dairy cows. *Animal.* 7: 1640-1650.
- Liu, H., S. Grot, and B. E. Logan. 2005a. Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate. *Environ. Sci. Technol.* 39: 4317-4320.
- Liu, H., S. Cheng, and B. E. Logan. 2005b. Power generation in fed-batch microbial fuel cells as a function of ionic strength, temperature, and reactor configuration. *Environ. Sci. Technol.* 39: 5488-5493.
- 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.
- Logan, B. E., and J. M. Regan. 2006a. Microbial fuel cells-challenges and applications. *Environ. Sci. Technol.* 40: 5172-5180.
- Logan, B. E. and J. M. Regan. 2006b. Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends Microbiol.* 14: 512-518.
- 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.
- Logan, B. E. 2008. Microbial fuel cells. John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ. 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.
- Logan, B. E., and K. Rabaey. 2012. Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies. *Science.* 337: 686-690.
- Lovley, D. R. 2006. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 497-508.
- Lovley, D. R. 2012. Electromicrobiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 66: 391-409.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- Peguín, 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.
- Piveteau, P. 1999. Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review. *Lait.* 79: 23-41. Rabaey, K., and W. Verstraete. 2005. Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.* 23: 291-298.
- 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.
- 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.
- Rabaey, K., and R. A. Rozendal. 2010. Microbial electrosynthesis - revisiting the electrical route for microbial production. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 706-716.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rosenbaum, M. A., and A. E. Franks. 2014. Microbial catalysis in bioelectrochemical technologies: status quo, challenges and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 509-518.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Thrash, J. C., and J. D. Coates. 2008. Review: direct and indirect electrical stimulation of microbial metabolism. *Environ. Sci. Technol.* 42: 3921-3931.
- 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.
- 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.
- Wang, H., and Z. J. Ren. 2013. A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnol. Adv.* 31: 1796-1807.
- 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.
- 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.
- Wolin, M. J., T. L. Miller, and C. S. Stewart. 1997. Microbemicrobe interactions. In: P. N. Hobson and C. S. Stewart (Eds.). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Blackie Academic and Professional, London. pp. 467-491.
- 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.
- Young, J. W. 1977. Gluconeogenesis in cattle: significance and methodology. *J. Dairy Sci.* 60: 1-15.

[Volver a: Fisiología digestiva y manejo del alimento](#)