

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

## STATE OF THE ART OF BIOELECTROCHEMICAL SYSTEMS: FEASIBILITY FOR ENHANCING RUMEN PROPIONATE PRODUCTION

Mariana Aguilar-González<sup>1</sup>, Germán Buitrón<sup>2</sup>, Armando Shimada-Miyasaka<sup>3</sup>, Ofelia Mora-Izaguirre<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Distrito Federal 04510, México. <sup>2</sup>Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas. Instituto de Ingeniería, UNAM. Bulevard Juriquilla 3001, Querétaro, Querétaro 76230, México. <sup>3</sup>Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN). Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, UNAM. Bulevard Juriquilla 3001, Querétaro, Querétaro 76230, México. (ofemora66@unam.mx).

### 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.

### ABSTRACT

Bioelectrochemical systems are biotechnology tools useful in the exploration and exploitation of the ability of microorganisms to improve their fermentation yield. These systems use electricity as an external energy source to redirect microbial metabolic pathways toward increasing or decreasing end products. This essay presents the fundamentals of these systems, their classification and how they evolved to become what they are in the field of emerging technologies. The potential application of these systems is diverse: generation of electric energy, bioremediation and production of value-added compounds, among others. Here, we emphasize electrofermentation, which is a technique focusing on the microbial production of organic chemical compounds, such as alcohols and short-chain fatty acids, by applying electric energy. Because of its contribution to ruminant metabolism as the major precursors of hepatic glucose, propionate takes on particular relevance in this essay. Current knowledge on bioelectrochemical systems in optimizing propionic fermentation is summarized. Moreover, we review work focused on application of these new technologies in the study of fermentation of ruminal microorganisms. Besides, we analyze the requirements of these systems for *in vitro* application and we point out that use of these methodologies in the area of ruminal microbial ecology is among the first attempts, and therefore, more research is needed.

**Key words:** Bioelectrochemical systems, electrons, ruminal fermentation, propionate, ruminants, *Propionibacterium*.

\* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: noviembre, 2014. Aprobado: septiembre, 2015.

Publicado como ENSAYO en *Agrociencia* 50: 149-166. 2016.

**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

## INTRODUCTION

Ruminal fermentation is the metabolic activity of the microorganisms present in the rumen. It is through this activity that ruminant animals obtain the nutrients necessary to maintain their biological functions. Volatile fatty acids (VFAs), acetate, propionate and butyrate, are the major fermentation products of ruminal microorganisms and constitute up to 80 % of the energy usable by the animal; the remaining carbon is eliminated in the form of heat and methane (Bergman and Wolff, 1971). An approach successful for improving ruminant production is promoting an increase in energy available to the animal by increasing hepatic synthesis of glucose. Gluconeogenesis is its main supply route since ruminants obtain less than 10 % of their glucose requirements directly by absorption in the intestine (Young, 1977).

Diverse products of digestion are sources of carbon for gluconeogenesis; propionate is quantitatively the most important, followed by lactate and the glucogenic amino acids (Huntington *et al.*, 2006). The contribution of glucogenic VFAs (propionate, isobutyrate and valerate) to the formation of hepatic glucose ranges between 44 % and 78 %, and propionate accounts for up to 95 % of these VFAs (Larsen and Kristensen, 2013).

Several methodologies were developed to increase propionate concentration in the rumen: to provide ionophores such as monensin (Van Maanen *et al.*, 1978), propylene glycol and glycerol (Cozzi *et al.*, 1996), and diet supplementation with propionate precursors such as acrylate and sodium fumarate, which also decreases production of methane *in vitro* (Newbold *et al.*, 2005). Other studies documented that defaunation also increases propionate production in the rumen (Williams and Withers, 1991). However, these examples have disadvantages and development of methodologies to increase ruminal propionate remains active.

Other alternatives can be developed to modify ruminal fermentation without changing or altering important factors, such as diet, composition of ruminal microbiota, or causing genetic modifications, among which are bioelectrochemical systems.

Fermentation is basically a flow of electrons that travel from oxidizing compounds (electron donors) to reducing compounds (electron acceptors) by means

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).

of transporting molecules. Therefore, it is feasible to modify this flow with an external source of power, altering fermentation patterns. Techniques known as bioelectrochemical system have been developed with this objective in mind.

The objective of this research was to describe current knowledge on bioelectrochemical systems that developed to increase propionate production and their application in the study of ruminal microbial metabolism. We also present the bases of bioelectrochemical systems to enable understanding of how they function and how they are used to modify fermentation patterns of diverse microorganisms.

### **Bioelectrochemical systems: fundamentals and classification**

Bioelectrochemical systems (BES) are based on the ability of some microorganisms to catalyze different electrochemical reactions, specifically, reactions that involve electron transfer, such as redox (Rabaey *et al.*, 2007; Rozendal *et al.*, 2008). In the literature, they are also called microbial electrochemical technologies (METs) (Logan and Rabaey, 2012). Depending on their mode of operation and their application, they are classified into four large groups: microbial fuel cells (MFC) for generating electricity, microbial electrolysis cells (MEC) to produce mainly inorganic compounds, such as hydrogen, microbial electrosynthesis cells (MES) to synthesize organic chemical compounds, and microbial desalination cells (MDC) to desalinate water in combination with other functions (Wang and Red, 2013). Among these systems, MFC are the most studied and are the model for all others (microbial X cells, MXC), the X representing different applications (Harnisch and Schröder, 2010).

### **Microbial fuel cells**

Microbial fuel cells (MFC) are devices that use microorganisms to oxidize organic and inorganic matter to generate electric energy (Logan *et al.*, 2006). Like all bioelectrochemical systems, they consist of two electrodes, an anode and a cathode, which are joined by an external wire to complete an electric circuit. Moreover, the compartments, or chambers, containing the electrodes are separated by a proton exchange membrane (Bond and Lovley, 2003).

## Celdas de combustible microbianas (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  $\text{CO}_2$  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 reverso 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.

## Celdas de electrólisis microbianas

Las CEM son un tipo de sistema bioelectroquímico al que se le proporciona energía eléctrica

In the anode chamber, the microorganisms grow and oxidize the substrate available under anaerobic conditions; they release electrons, protons and  $\text{CO}_2$  into the medium. The protons move into the cathode chamber passing through the proton exchange membrane and, at the same time, the electrons are pumped to the anode because some microorganisms are able to transfer electrons outside the cell (known as extracellular electron transfer, EET) (Rabaey, 2010). Once in the anode, they travel to the cathode through the external wire that connects the electrodes. When the electrons arrive at the cathode under aerobic conditions, they combine with the protons to reduce oxygen molecules to form water. This creates an electron flow (electric current) (Rabaey and Verstraete, 2005; Logan and Regan, 2006a; Lovley, 2006). When oxygen or other receptor molecules, such as nitrates or sulfates, are present in the cathode chamber, an electric current is produced, but if they are not present, generation is not spontaneous. The electrons that reach the cathode reduce a molecule to complete the redox process (that begins in the anode) and to stimulate generation of an electric current (Pant *et al.*, 2012). The microorganisms that generate electric energy are referred to as exoelectrogenic because of their capacity to transfer electrons out of the cell (Logan and Regan, 2006b).

When, instead of using cells to produce electricity, the process is reversed and an electric current from an external source is applied, the second type of bioelectrochemical systems develops; these are known as microbial electrolysis cells.

## Microbial electrolysis cells

Microbial electrolysis cells (MEC) are a type of bioelectrochemical system to which electric energy is provided to achieve a given process or formation of chemical products, mainly inorganic, such as hydrogen, hydrogen peroxide and sodium hydroxide, among others (Logan, 2008). They function like MFC since MEC are modified MFC and were designed primarily to produce  $\text{H}_2$  (Liu *et al.*, 2005a).

The system consists of using the electrons that arrive at the cathode, as occurs in an MFC, but the aim is to combine them with the protons to produce  $\text{H}_2$ . Therefore, the system must be under anaerobic conditions so that the electrons and protons do not combine with oxygen. This reaction is not spontaneous; it needs some external energy as well



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  $H_2$  (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  $H_2$ , 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 electrólisis 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, específica 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

as that generated by the bacteria to carry out the reaction (Logan and Grot, 2006; Rozendal *et al.*, 2006). This process is known as electrohydrogenesis or microbial electrolysis (Cheng and Logan, 2007).

The voltage, also denominated potential difference, is the pressure or force with which the electrons are driven toward the cathode. It is supplied through a direct current power source or a potentiostat. For the production of hydrogen, the voltage generated by the microorganisms in the anode is not enough to drive the reaction. For this reason, external voltage must be applied to the system. The calculations to determine the necessary voltage are based on Gibbs free energy for redox reaction (Call and Logan, 2008; Logan *et al.*, 2008; Rozendal *et al.*, 2008).

Biodegradable organic matter that can be used in these systems is variable, from simple molecules, such as acetate, glucose, starch or cellulose, and even complex mixtures like those present in wastewater from different industries (Pant *et al.*, 2010).

The most studied bioelectrochemical systems are MFC and MEC. One important characteristic is the absence of microorganisms in the cathode. Nevertheless, Hamelers *et al.* (2010) defined bioelectrochemical systems specifically as emerging technologies that use microorganisms in the anode to catalyze oxidizing reactions and in the cathode for reducing reactions. That is, there may be microorganisms in the two electrodes at the same time. When microorganisms are present in the anode chamber, they transfer electrons to the anode. When microorganisms are in the cathode chamber, transfer occurs in the opposite direction; the cathode gives up electrons to the microorganisms (Gregory *et al.*, 2004). Consumption and use of these electrons is focused on stimulating and modifying microbial metabolism (Thrash and Coates, 2008). This process gives rise to the third type of bioelectrochemical system.

### Microbial electrosynthesis cells (MES)

Microbial electrosynthesis cells (MES) are a type of bioelectrochemical system based on microbial electrosynthesis, a term coined by Nevin *et al.* (2010) to refer to the process in which electricity is the energy source for some microorganisms to synthesize organic compounds from  $CO_2$ . Some examples of compounds obtained with this technique are acetate

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.

### Celdas 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<sub>2</sub>. 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<sub>2</sub>, 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<sub>2</sub> (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

(Nevin *et al.*, 2010), butyrate (Ganigué *et al.*, 2015) and methane (Cheng *et al.*, 2009).

Later on, the term microbial electrosynthesis was also used to refer to the synthesis of organic compounds from substrates different from CO<sub>2</sub>, such as glucose or glycerol (Rabaey and Rozendal, 2010). This technique was already known also as electrofermentation. Now, it is the term that several authors continue to use as more adequate to differentiate this process from CO<sub>2</sub> microbial electrosynthesis (Kracke and Krömer, 2014; Rosenbaum and Franks, 2014; Harnisch *et al.*, 2015).

### Electrofermentation

This technique manipulates the patterns of a fermentation process by applying electric current to the culture medium to modify end products (Rabaey and Rozendal, 2010). Each microorganism has a specific metabolism based on an electron flow that determines how fermentation is carried out. If this flow is altered by the modulating action of another electron flow (in the form of an electric current), the existing metabolic pathways are redirected causing an increase or decrease in fermentation products. Moreover, when the electron flow changes, the carbon flow also changes (Logan and Rabaey, 2012).

The energy needed to accelerate or divert a fermentation pathway depends on the substrate and the product of interest. It should be low enough to not cause cell death, but high enough to stimulate changes in microbial metabolism. Some microorganisms have the capacity to accept electrons, directly or indirectly. This fact can be used for different ends, such as wastewater treatment, carbon fixation, formation of chemical compounds, or bioremediation (Rosenbaum *et al.*, 2011).

Electric current can act as a source of reducing power, or reducing equivalents, which rapidly regenerates the coenzymes NAD and NADP to form NADH and NADPH, respectively. The abundance of these molecules in the cells represents an effective way to increase the fermentation yield (Kim and Kim, 1988; Park and Zeikus, 1999). Another manner in which electric current can contribute to changing metabolic pathways is by forming H<sub>2</sub>, as occurs in microbial electrolysis cells. In the process of fermentation, H<sub>2</sub> is an electron donor, and there is no direct interaction between electrode

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<sub>2</sub>, como ocurre en las celdas de electrólisis microbianas. El H<sub>2</sub> 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).

and microorganisms (Steinbusch *et al.*, 2010; Harnisch *et al.*, 2015). Accumulation of H<sub>2</sub> increases partial pressure in a fermenting bacterial culture. Consequently, there will be a change in the electron balance and, therefore, in microbial metabolism (Yerushalmi *et al.*, 1985).

### Mechanisms of electron transfer

Mechanisms by which microorganisms transfer or receive electrons toward or from an electrode are:

- Direct electron transfer through direct contact between the microorganism and the electrode surface. Present in bacterial cell membrane or in the extracellular matrix is a diversity of redox-active proteins, such as cytochrome c or enzymatic complexes associated with the membrane (Lovley, 2012). The mechanism also includes electron transfer through conductive pili, or nanowires. These structures are very thin hair-shaped formed by the microorganism in response to the limited transfer of electrons. They permit the cells that are not joined to the electrodes to establish direct contact (Reguera *et al.*, 2005).
- Indirect electron transfer by organic and inorganic redox molecules that microorganisms can secrete into the medium or release during degradation of biological materials. These molecules are reduced or oxidized outside the cell membrane and the electrons are later donated or accepted to or from an electrode. These molecules are known as endogenous redox mediators, the most studied of which are piocyanins and humic acids (Rabaey *et al.*, 2007). This mechanism also functions with artificial redox molecules that are added to the medium and are referred to as exogenous redox mediators. The most utilized of these are neutral red, methyl viologen and anthraquinone-2,6-disulfonic acid. Despite their advantages, artificial mediators can be toxic for the microorganisms and thus represent an additional operating cost (Huang and Angelidaki, 2008).

### Manipulation of microbial metabolism by electrofermentation

Bioelectrochemical systems have been used to increase synthesis of a variety of fermentation

- 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 pirocianinas 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<sup>-1</sup>), con un incremento de 15 % en el rendimiento, en comparación con la fermentación testigo (44.3 mg mL<sup>-1</sup>). 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

products. The first study was conducted by Hongo and Iwahara (1979a). These authors developed a method they called electro-energizing fermentation (EEF) and today is known as electrofermentation. This methodology consists of applying 1.5 V to a culture of *Brevibacterium flavum* through a platinum electrode with the objective of accelerating its reductive metabolism. In electro-energizing fermentation, as well as in the control, glucose was used as the substrate and neutral red as the redox mediator. The result was production of L-glutamic acid (51 mg mL<sup>-1</sup>), with an increase of 15 % in yield, relative to the control fermentation (44.3 mg mL<sup>-1</sup>). The authors suggested that the increase in production seemed to be stimulated by the reducing action of the cathode that transferred electrons to the microorganisms (Hongo and Iwahara, 1979b).

Kim and Kim (1988) also used the electro-energizing method to manipulate fermentation of the bacterium *Clostridium acetobutylicum* and increase butanol production from glucose. They inoculated the microorganisms in the cathode and applied -2.5 V and methyl viologen to the culture as the redox mediator. They did not observe a difference in substrate consumption or cell growth relative to the control, but butanol production did increase 26 % (93.7 mmol), relative to the control (74.6 mmol). Simultaneously, there was a decrease of 25 % in acetone production (37.8 mmol in the control and 28.4 mmol in the bioelectrochemical system).

Park and Zeikus (1999) showed that the reducing power of an electric current can be used to manipulate fermentation of *Actinobacillus succinogenes* with glucose as substrate and neutral red as the redox mediator. In the cathode chamber, they inoculated the microorganisms with a voltage of 2 V through graphite cloth electrodes. They observed that the reducing power increased glucose consumption, cell growth and succinate production by 20 %, and reduced acetate production (50 %, relative to the controls). The authors showed that the redox mediator neutral red bonds with the enzyme fumarate reductase and transfers the electrons from the electrode to the cell and, thus, the enzyme reduces fumarate to succinate.

Ethanol production by *Clostridium thermocellum* and *Saccharomyces cerevisiae* was also manipulated by a bioelectrochemical system with cellulose and glucose, as substrates, and neutral red (Shin *et al.*,



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<sup>-1</sup> y la fermentación con -1.5 V generó 1.68 g L<sup>-1</sup>. El incremento con *S. cerevisiae* fue menor, pero también fue significativo, de 46.7 g L<sup>-1</sup> a 52.5 g L<sup>-1</sup> 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).

2002). In that study, ethanol increased 61 % with *C. thermocellum*. The control culture produced 1.04 g L<sup>-1</sup>, and fermentation with -1.5 V yielded 1.68 g L<sup>-1</sup>. The increase using *S. cerevisiae* was less but was also significant, 46.7 g L<sup>-1</sup> to 52.5 g L<sup>-1</sup> ethanol, equivalent to 12 %. In contrast, acetate production decreased with both microorganisms relative to the controls (Shin *et al.*, 2002).

Change in lactate production with *Corynebacterium glutamicum* was accomplished in a bioelectrochemical reactor with a cathode regulated to -0.6 V and anthraquinone-2,6-disulfonate as redox mediator. Lactate concentration increased from 1.10 mol of product per mol of glucose to 1.62 mol of product per mol of glucose (Sasaki *et al.*, 2014). Another research group was able to modify fermentation of *Clostridium pasteurianum* using a potential difference of 0.045 V across the system, but without adding redox mediators to the culture medium. Butanol production increased to 13.5 mmol relative to 5.4 mmol when fermentation was without electricity (Choi *et al.*, 2014).

Harrington *et al.* (2015) observed the effect of electric current on *Klebsiella pneumoniae*. They reported an increase of 93 % in ethanol production simultaneous to the 76 % increase in lactate, with neutral red as redox mediator and applying -0.65 V through the system. Ethanol concentration in the control was 9.61 mmol and that of lactate was 2.66 mmol, contrasting with the concentration in electrofermentation, which was 22.34 mmol ethanol and 5.64 mmol lactate. In theory, any fermentation metabolism can be manipulated by electrochemical supply of reduced equivalents, which change the NAD/NADH molar ratio, whether in the presence or absence of an exogenous redox mediator (Peguin *et al.*, 1994).

### Bioelectrochemical methods for increasing propionate production

Anaerobic bacteria of the genus *Propionibacterium* produce propionate through fermentation of glucose or lactate. As secondary metabolites they also generate acetate and CO<sub>2</sub> in a molar ratio of 2:1:1. However, the concentration of the final products may vary because of diverse factors of the culture, the bacterial strain and the substrate (Piveteau, 1999).

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 (Peguín *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  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  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

The dairy product industry has been greatly interested in the study of manipulating fermentation by propionogenic bacteria since the quantity of metabolites of these bacteria affect the flavor of Swiss cheese (Hettinga and Reinbold, 1972). It is also of great importance in animal production because propionate is the most important quantitative gluconeogenic precursor in ruminant metabolism (Huntington *et al.*, 2006).

The first study to enhance propionate concentration in a bacterial culture medium administered hydrogen to increase the partial pressure of the *Propionispira arboris* growing medium. *P. arboris* is a Gram-negative, nitrogen-fixing bacterium that releases propionate, acetate and  $\text{CO}_2$  as major end products of carbohydrate fermentation. Two atmospheres of hydrogen in the medium drastically changed the propionate:acetate molar ratio from 2:1 to 16:1. Thus, propionate increased in concentration as practically the sole end product (12.6 mmol propionate and 0.8 mmol acetate), while the control produced 11.2 mmol propionate and 5.8 mmol acetate. Excess hydrogen altered the carbon and electron flow, preventing pyruvate from transforming into acetate and  $\text{CO}_2$  (Thompson *et al.*, 1984).

Emde and Schink (1990) produced the first bioelectrochemical system as such for increasing propionate concentrations in a bacterial culture. They tested a system of electrodes to change fermentation patterns of *Propionibacterium freudenreichii* with glucose as substrate using a three-electrode amperometric culture system: one working electrode connected to a potentiostat that applies a potential difference, a reference electrode and a counter electrode through which the current flows and can be recorded. In this culture system, four different exogenous mediators were tested with the bacteria: anthraquinone-2,6-disulfonic acid (AQ), cobalt sepulcrate (CoS), benzyl viologen and methyl viologen, with anodic potential 40 mV more negative than the standard redox potential of each mediator. During the first trials, Emde and Schink (1990) observed that both benzyl and methyl viologen inhibited bacterial growth and no electron transfer or propionate production was registered. This was likely due to depolarization of the cell membrane caused by these non-polar compounds. In contrast, with AQ and CoS, large quantities of electrons were transferred when propionate production increased.

de acetato. El exceso de hidrógeno alteró el flujo de carbono y electrones previniendo que el piruvato se transformara en acetato y  $\text{CO}_2$  (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  $475 \mu\text{M}$  y  $53 \mu\text{M}$  de acetato; en cambio con CoS se obtuvieron  $624 \mu\text{M}$  de propionato y  $17 \mu\text{M}$  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  $-0.47 \text{ V}$ . 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

In the presence of AQ, 90 % of all products formed were propionate with a concentration of  $475 \mu\text{M}$  and  $53 \mu\text{M}$  acetate, while with CoS,  $624 \mu\text{M}$  propionate and  $17 \mu\text{M}$  acetate were obtained. These quantities indicated that propionate represented 97.3 % of the end products.

Schuppert *et al.* (1992) continued the studies of Emde and Schink (1990), focusing on increasing propionate production during fermentation of a medium with whey permeate and *Propionibacterium acidipropionici*. Based on previous findings, they used CoS as the redox mediator and a platinum electrode regulated to a potential of  $-0.47 \text{ V}$ . By applying electric potential in fed-batch culture, the lactose of the whey permeate fermented to produce 70 mmol propionate with no acetate production. This means obtaining 100 % propionate in the culture medium, relative to the control, which produced 49 mmol propionate and 23 mmol acetate. Nevertheless, in experiments even without adding redox mediators in continuous cultures, there was electron transfer from the electrode to the microorganisms. This indicated that the redox mediator may not be necessary, and if so, costs of the continuous mode scaling process would decrease.

Wang *et al.* (2008) tested whether *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 was able to use, as a redox mediator, a bifidobacterium growth stimulator, 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid, it secretes into the culture medium. This molecule has the redox activity to regenerate NAD molecules. Their objective was to develop a bioelectrochemical system by applying 0.4 V without adding a redox mediator and observe its effects on propionate production in glucose fermentation. Their most important finding was a change in the molar ratio of acetate:propionate from 2:3 (11.5 mmol acetate and 17.7 mmol propionate) to 1:1 (13.6 mmol acetate and 13.7 mmol propionate). The decrease in the propionate production was probably caused by a decrease in electrons available for its formation and the increase in oxidation of the substrates to acetate and  $\text{CO}_2$ . The results indicated that those conditions are not adequate for increasing propionate.

### Bioelectrochemical methods for the study of ruminal fermentation

The first study on bioelectrochemical processes in ruminal fermentation focused on the possibility

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<sub>2</sub>. 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

de generando electricidad in MFC with ruminal microorganisms as biocatalyzers. Rismani-Yazdi *et al.* (2007) reported the use of ruminal microbial communities to convert cellulose into electric energy. With two-chamber graphite electrode bioelectrochemical systems, they used a mineral medium supplemented with clarified ruminal liquid to stimulate the ruminal habitat and provide the microorganisms with growth factors. They inoculated the medium with ruminal microorganisms in an anaerobic environment and maintained the cells in optimum ruminal conditions. The researchers showed that, ruminal microbiota can in fact be used to generate electricity from cellulose since it was capable of transferring electrons to an electrode producing a constant electric current for at least 60 days without adding a redox mediator. Interested in determining the composition of the microbiota present in the cells, they conducted a phylogenetic analysis of the microorganisms based on 16s rRNA gene sequence comparisons. Among the main genera identified were *Firmicutes*, *Clostridium*, *Sedimentibacter*, *Desulfotomaculum* and *Ruminococcus*, bacteria that hydrolyze lignocellulosic biomass via a complex cellulase system known as cellulosome. The researchers suggest that this system can generate electricity from a diversity of substrates rich in cellulosic wastes (Rismani-Yazdi *et al.*, 2007).

MFC can also be used as a tool in the study of ruminal microorganisms and their physiological functions. One of the most important aspects is how to manipulate the relation between methane and VFAs. Methane production accounts for 12 % of ruminant energy loss, with a direct impact on fermentation efficiency. Moreover, it is a greenhouse gas and livestock produces 44 % of anthropogenic methane emissions (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2012; Gerber *et al.*, 2013). Among the ruminal microbiota are methanogenic archaea, microorganisms that produce methane from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. Their function is very important for adequate ruminal fermentation. If H<sub>2</sub> accumulates in the rumen, partial pressure increases, the function of the proteins involved in electron transport is inhibited, feed digestibility decreases, and fermentation becomes unbalanced (Wolin *et al.*, 1997). For this reason, methane production is necessary in spite of the disadvantages of its emission.

MFC can act positively as an alternative for using the hydrogen produced in the rumen as an electron



y 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 (Pinos-Rodríguez *et al.*, 2012; Gerber *et al.*, 2013). Dentro de la microbiota ruminal se encuentran las archeas metanogénicas, productoras de metano a partir de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, 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<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> de metano en una fermentación testigo a 0.009 mmol d<sup>-1</sup> de metano dentro de las celdas durante las primeras

donor for the electrogenic microbial communities while favoring the conditions to increase acetate and propionate production. They also compete with methanogenic archaea for hydrogen (Bretschger *et al.*, 2009). Ishii *et al.* (2008) showed that in an MFC, methanogenesis is inhibited, from 0.128 mmol d<sup>-1</sup> methane in a control fermentation to 0.009 mmol d<sup>-1</sup> inside MFC during the first 30 h. Moreover, acetate and propionate concentrations increased temporarily in soil samples that originally produced high methane concentrations.

Wang *et al.* (2012) studied the effect of degrading straw, as the substrate, by ruminal microorganisms on production of VFAs and electricity. For these studies, the MFC also consisted of two-chamber cells and the electrodes used were graphite plates. They observed that the total VFA concentration increased rapidly after inoculation with ruminal microorganisms. After reaching a certain high concentration, however, it began to decrease. The authors explained that the microorganisms, after a certain concentration, oxidized VFAs and continued to generate electricity because there was no other substrate available.

Our group is currently developing a bioelectrochemical system to assess changes in *in vitro* fermentation by ruminal microorganisms with direct electric current. We have observed modifications in the fermentation patterns to increased production of the volatile fatty acids acetate, propionate and butyrate (unpublished data). Our group is also studying how to increase ruminal propionic acid at the expense of decreasing acetic acid. However, we have found that electric energy affects production of the three VFAs and not just of propionate, as was expected at the beginning. We have also tested the effect of a redox mediator on ruminal fermentation and various levels of potential difference, with which we determined that our system did not require external mediators. Our data show evidence that it is possible to increase *in vitro* production of VFAs, and the systems can be modified for their *in vivo* application with more research and technology (Aguilar-Glez *et al.* Unpublished data).

### ***In vivo* application of bioelectrochemical systems**

The gap between *in vitro* and *in vivo* studies is one of the greatest challenges for scientific research. Bioelectrochemical systems should be optimized in

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 el AGV, lo 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

their design to be administrated to animals orally so that they reach the rumen and remain there without passing to other organs of the digestive system. The factors to consider are the following:

- Cell design: miniaturization of current devices and adequate configuration. One of the requirements we consider important is that cell configuration should be tubular shaped to enable oral administration with a bolus gun, as several products are administered to cattle. Different types of bioelectrochemical systems have diverse configurations: rectangular, H-shaped, tubular, U-shaped, or miniaturized for not easily accessible sites (Du *et al.*, 2007). Development of variants is possible depending on the needs of each application, but it is important to maintain high performance. To this end, factors such as type of microorganism, substrate, shaking, pH, temperature, electrodes, distance between electrodes, medium composition, membrane type, internal resistance of the cell, and redox mediators should be considered (Liu *et al.*, 2005b).
- Energy source: In *in vitro* trials, the cells are connected to a direct current power supply, which in turn must be connected to a socket outlet. For *in vivo* application of the cells, however, it is necessary and determinant to use a battery, such as a lithium battery.

The new challenges in this area consist of creating effective systems that allow the microorganisms to perform optimally as biocatalyzers and to produce compounds of interest in significant concentrations. Another challenge is to reach full understanding of how they use the reducing power administrated by electric energy to modify their metabolic pathways and how they interact with electrodes surfaces.

## **CONCLUSIONS**

The importance of propionate as the major gluconeogenic precursor in ruminants demands the study of new techniques to increase its availability in the rumen. For the authors of this paper, bioelectrochemical systems are a promising possibility for optimizing fermentation of ruminal propionogenic bacteria to obtain higher yields. Electrofermentation is an option for modification of

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

fermentation patterns as well as of the composition of final products. Knowledge in this topic is growing rapidly; there are increasingly more studies on the effect of electric energy on the metabolism of diverse microorganisms. However, understanding the interaction between bioelectrochemical systems and ruminal microorganisms is still limited and more research is necessary. The possibility of increasing propionate production in the rumen with bioelectrochemical systems is feasible, motivating further study to answer questions such as the following. What type of ruminal bacteria will be affected? What electron transfer mechanisms do they use? What will be the effect of these systems on host-bacterial symbiosis? The challenge lies in overcoming current technological obstacles for future improvement of ruminant production with the use of these technologies.

—End of the English version—

-----\*-----

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 estas 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. Viridis, 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 electro-energizing 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. Nealon. 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. Euserink, 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 acidi-propionici* 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. Microbe-microbe 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.