

Ultrasonicación de baja frecuencia aplicada a la producción biológica de hidrógeno

Cuauhtémoc Francisco Pineda Muñoz, Sergio Alejandro Medina Moreno, Alejandro Téllez Jurado, María del Rocío Ramírez Vargas, Maricela Villanueva Ibáñez, Carlos Alexander Lucho Constantino, Gloria Maribel Trejo Aguilar y A. Jiménez González

C.Pineda, S.Medina, A.Tellez, M.Ramirez, M.Villanueva, C.Lucho, G.Trejo y A.Jimenez
Universidad Politécnica de Pachuca
ajimenez@upp.edu.mx

F. Trejo, (eds.). Ciencias Biologicas y de la Salud, Proceedings-©ECORFAN-México, Pachuca, 2017.

Abstract

Biological hydrogen production processes have the potential to generate an ideal biofuel with the highest energy content and without CO₂ emissions. However, to achieve industrial application, it requires improvement of H₂ production rate, H₂ yield and the generation of stable and active inoculum at large-scale. Low frequency ultrasound may be fundamental in the development of the process due to various beneficial effects such as improvements in; mass transfer, beneficial bacterial activity, detrimental bacterial inhibition and many others. The present chapter summarized the state of the art of the use of ultrasonication to increase the biological production of hydrogen. Especially in the dark fermentation process and in the pretreatment of the inoculum. Different reports show that ultrasound can increase biological hydrogen production. However, their results differ considerably in the optimal operating conditions reported. Furthermore the specific mechanisms of action remain unclear. The clarification of these phenomena will contribute to the improvement in the overall process.

Ultrasonicación, ultrasonido de baja frecuencia, pretratamiento de inóculo, producción biológica de hidrógeno

Introducción

Actualmente, el rápido incremento en la demanda de energía a nivel mundial es abastecido principalmente por combustibles fósiles (Argun & Dao, 2017). En el 2013, los hidrocarburos aportaron más del 81% de la demanda de energía primaria a nivel mundial (Bundhoo & Mohee, 2016). Sin embargo, son una fuente no renovable de energía que causa impactos negativos de gran importancia en el suelo, agua, aire y en el clima (Azwar, Hussain & Abdul-Wahab, 2014). Además, el agotamiento de los combustibles fósiles y el incremento en las emisiones de gases de efecto invernadero han provocado un incremento en la demanda de energías limpias (Chong, Sen, Kayaalp & Ang, 2012). Debido a lo anterior, la exploración de energías alternativas y amigables con el ambiente como el hidrógeno (H₂) se consideran de gran importancia (Argun & Dao, 2017).

El gas de hidrógeno (H₂) es un combustible idóneo debido a que es sustentable, renovable y posee alto contenido energético, además, en su combustión no genera emisiones de CO₂, sólo produce calor y vapor de agua (Gokfiliz & Karapinar, 2017; Lutpi, Jahim, Mumtaz, Harun & Abdul, 2016). En la actualidad, el 96% del H₂ producido se obtiene a partir del reformado de vapor de gas natural (Meoruani & Hamdaoui, 2016), el cual depende de los hidrocarburos. Una alternativa son los procesos biológicos como la biofotólisis de agua, la fotofermentación y la fermentación oscura de materia orgánica. De los anteriores, la fermentación oscura es la tecnología con aplicación más práctica y con la tasa de producción más alta.

Sin embargo esta tecnología aún no se encuentra disponible en el mercado, esto se debe a la necesidad de mejorar la eficiencia, la tasa de producción y los rendimientos del proceso. También requiere de grandes cantidades de inóculo con actividad biológica y estable (Chang, Li & Liu, 2011; Elbeshbishy, Hafez & Nakhla, 2011; Hsu & Lin 2016). Debido a lo anterior, se investiga actualmente de manera intensa, el desarrollo de métodos que permitan mejorar la producción biológica de hidrógeno en términos económicos, ambientales, de consumo de energía, de calidad del producto y para disminuir el tiempo de procesamiento (Gogate & Khabadi, 2009). Una tecnología que puede contribuir a la producción de biológica de H₂ (PBH) es el ultrasonido de baja frecuencia (UBF), en donde se han desarrollado 3 estrategias principales:

1. El pretratamiento de inóculo: Generalmente en la PBH se utilizan consorcios microbianos en lugar de cultivos puros, debido a que suelen ser más eficientes y prácticos. Sin embargo la mayor desventaja de los consorcios es la coexistencia de bacterias productoras de H₂ (BPH) y bacterias consumidoras de H₂ (BCH). En este sentido, la ultrasonicación puede utilizarse para inhibir a las BCH mientras mantiene o incluso incrementar la actividad de las BPH (Bundhoo & Mohee, 2016).
2. El pretratamiento de sustrato: En la PBH se pueden utilizar desechos orgánicos como materia prima, los cuales son ampliamente disponibles y relativamente baratos. Entre ellos se encuentran los residuos lignocelulolíticos, los cuales se componen principalmente de polímeros de carbohidratos (celulosa, hemicelulosa) y polímeros aromáticos (lignina). Sin embargo, debido a su estructura, presentan una tasa de biodegradación muy lenta. Esta estructura puede debilitarse mediante el uso de UBF, facilitando su consumo por las BPH (Eker & Sarp 2017; Argun & Dao 2017).
3. Mediante el uso de sonobiorreactores: Durante el proceso de fermentación es posible acoplar diferentes tipos de reactores con un instrumento sónico (sonobiorreactor), el cual puede, además de otorgar las 2 estrategias antes mencionadas, incrementar la transferencia de masa debido a un incremento en la agitación del medio (Chisti, 2003).

Otras ventajas del UBF son que no requiere reactivos químicos, presenta una elevada eficiencia energética y reduce el tiempo de procesamiento en comparación con otras técnicas convencionales, además su desempeño es económicamente factible. Debido a lo anterior se considera como una energía amigable con el ambiente (Rokhina, Lens & Virkutyte, 2009). En este capítulo, se presentan los fundamentos de la ultrasonicación, aplicaciones y antecedentes del ultrasonido de baja frecuencia en la producción biológica de hidrógeno.

Generación de la potencia ultrasónica y fundamentos de la ultrasonicación

El ultrasonido es un sonido que se encuentra por encima de la capacidad del oído humano. El cual puede clasificarse en dos tipos (Tabla 1.1), dependiendo de la frecuencia utilizada y del área de aplicación (Chisti 2003; Kwiatkowska, Bennet, Akunna, Walker, & Bremner, 2011). La frecuencia de ultrasonido se refiere al número de repeticiones o ciclos de las ondas sónicas por segundo. La energía que se ingresa en el fluido depende la intensidad, la cual relaciona diversas variables; la velocidad de la onda, la densidad del fluido y la diferencia de presión alcanzada en las etapas de la cavitación (Chisti, 2003).

Tabla 1.1 Clasificación de la ultrasonicación

Parámetro	Baja frecuencia	Alta frecuencia
Rango de Frecuencia	20-100 kHz	2-10 MHz
Energía	Alta	Baja
Nombre	Ultrasonido convencional	Rango extendido o diagnóstico ultrasónico
Aplicaciones	Limpieza, soldadura y sonoquímica	Imágenes médicas y análisis químicos

Fuente: Datos a partir de Chisti (2003); Kwiatkowska et al., (2011)

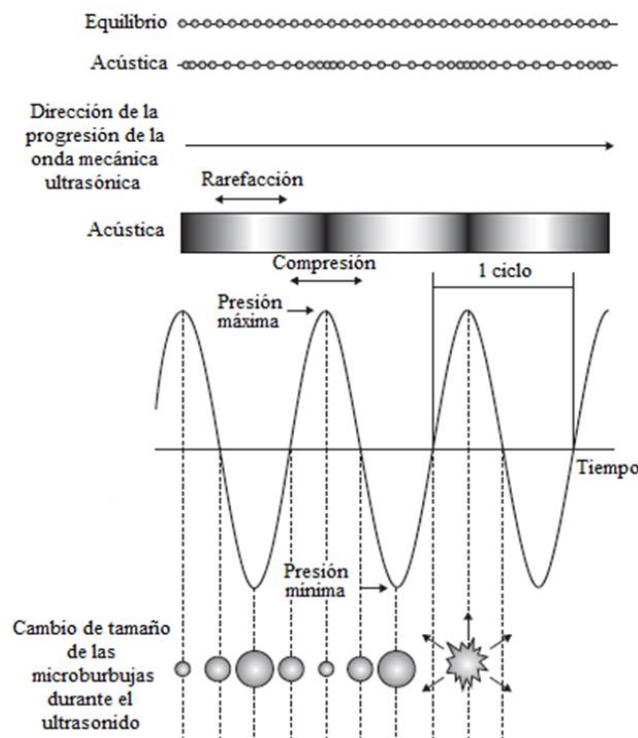
La energía sónica se obtiene a partir de la transformación de la energía eléctrica mediante un transductor sónico. Existen dos tipos de transductores de uso común, los piezoeléctricos y los magnetostrictivos, en donde los primeros son los más utilizados (Tiwari & Mason, 2012). La razón por la cual se considera al ultrasonido como una fuente de energía notable se debe al fenómeno de cavitación acústica.

En donde, el ultrasonido se transmite mediante ondas acústicas que de forma alternada, extienden y comprimen la estructura molecular del medio a través del cual pasan. Estas etapas se conocen como *rarefacción* y *compresión* (Elbeshbishy & Nakhla, 2011).

1. **Rarefacción:** En esta fase, se genera una presión negativa lo suficientemente fuerte para superar las fuerzas de atracción intermoleculares, en donde, un volumen muy pequeño del medio líquido pasa a un estado gaseoso en forma de cavidades diminutas también llamadas microburbujas.
2. **Compresión:** En esta fase, las microburbujas de gas son comprimidas pero no desaparecen.

La Figura 1.1, muestra como durante ciclos sucesivos de rarefacción y compresión, las microburbujas pueden incrementar su tamaño hasta alcanzar un nivel inestable en donde colapsan violentamente, liberando una gran cantidad de energía. Durante este colapso se puede alcanzar temperaturas de hasta 5,000°C y presiones de hasta 2,000 atmósferas. Otros efectos importantes son la generación de enormes fuerzas cortantes debidas a la onda de choque producida por la implosión de las microburbujas y la generación de diferentes especies de radicales libres, producto de la fragmentación del solvente. Finalmente, si las microburbujas colapsan cerca de una superficie sólida, sufren de una implosión asimétrica. En donde, el espacio de la microburbuja no puede ocuparse por el lado en contacto con la superficie sólida y es principalmente ocupado por el lado en contacto con el medio líquido. Lo anterior genera un microjet líquido, el cual puede causar daño a la superficie sólida, incrementar la penetración del solvente dentro de una superficie porosa e incrementar la transferencia de calor y de masa desde y hacia la superficie. Si la superficie sólida se encuentra en forma de polvo, entonces la sonicación puede causar la ruptura de la partícula, disminuyendo su tamaño y la dispersión de partículas finas a través del medio (Chisti, 2003; Braguglia, Gianico & Mininni, 2010; Elbeshbishy & Nakhla, 2011; Tiwari & Mason, 2012; Mason, Chemat & Ashokkumar, 2015).

Figura 1.1 Cavitación ultrasónica



Método de cuantificación de la energía ultrasónica

Uno de los requisitos más importantes en la utilización del ultrasonido en la PBH es la necesidad de encontrar la cantidad apropiada de energía acústica aplicada al medio así como utilizar un parámetro de sonicación adecuado que represente esta energía. Casi todos los instrumentos ultrasónicos tienen la capacidad para variar la potencia generada.

Por ejemplo, la amplitud de la vibración del transductor. Sin embargo, este parámetro no es una medida de la energía neta que ingresa al medio (Tiwari & Mason, 2012). En algunos casos, sólo se reporta el valor de la energía eléctrica (W) del instrumento ultrasónico, sin embargo este valor es mayor a la energía que ingresa al sistema. En otros casos la falta la información acerca del volumen sonificado hace imposible el cálculo de la energía específica. Cuando la intensidad se reporta en forma de $W\ m^{-2}$, el área de la punta del transductor debe de conocerse para calcular la energía entregada a un volumen de sistema determinado (Chisti, 2003). La potencia ultrasónica o la intensidad son factores importantes que se han utilizado como una medida del poder ultrasónico en la sonoquímica. Sin embargo dependen de la eficiencia en la conversión energética del transductor del equipo, es decir, equipos con diferente eficiencia de conversión aplicarán diferente energía aun cuando la intensidad, frecuencia y tiempo de exposición sea el mismo (Koda, Kimura, Kondo & Mitome, 2003).

Una de las formas de medir la energía que ingresa a un sistema, es mediante el método de calorimetría. Este método permite el cálculo de la energía específica E_S , el cual es útil para realizar la comparación de los resultados obtenidos con la sonicación a través de diferentes condiciones de operación y considerando a la energía transferida al sistema, el volumen de la muestra sonicada y el tiempo de sonicación. A partir del valor de la potencia (P , medido en W) y el volumen de la muestra a tratar (V , medido en L) calcula a la intensidad (I), como la relación $I=P/V$ en unidades de $W\ L^{-1}$. La energía específica se calcula al multiplicar a I por el tiempo de duración del tratamiento, $E_S = I \times t$. Esta se expresa en unidades de $W\ s\ L^{-1}$, $J\ L^{-1}$ o $kJ\ L^{-1}$ (Foladori, Laura, Gianni & Giuliano, 2007).

Antecedentes del ultrasonido en sistemas biológicos

El primer antecedente acerca de los efectos del ultrasonido en seres biológicos fue reportado por (Wood & Lomis, 1928). Observaron que la ultrasonicación a una frecuencia entre 100-700 kHz, era capaz de matar formas de vida inferiores (ranas y peces pequeños) mientras que bacterias sobrevivían. Un año después Harvey y Loomis reportaron que bajo condiciones apropiadas, el ultrasonido a una frecuencia aproximada de 400 kHz era capaz de matar bacterias luminosas en agua a 19°C. Sin embargo consideraron que el método era demasiado caro para utilizarse de forma práctica o comercial (Harvey & Loomis, 1929).

Posteriormente, en la década de los 60s, la industria comenzó a utilizar al ultrasonido como método de limpieza, lo cual ocasionó un rápido desarrollo y por ende una reducción en el costo del equipo. Surgieron los primeros baños ultrasónicos y fue entonces cuando diferentes laboratorios de biología y bioquímica comenzaron a utilizar a la sonoquímica, básicamente para la ruptura celular, gracias a la mayor disponibilidad de equipos ultrasónicos (Leonelli & Mason, 2010; Ojha, Mason, O'Donnell, Kerry & Tiwari, 2017). Fue también es esa época cuando los mecanismos específicos de desactivación de los microorganismos debido a la ultrasonicación comenzaron a reportarse. Se observó que la inactivación de microorganismos depende de diferentes parámetros como; la temperatura, la frecuencia de ultrasonido y la potencia acústica. Además se obtenían diferentes resultados dependiendo del tipo de microorganismo bajo estudio (Kurorawa et al., 2016). En 2003, se reportó el efecto de diferentes parámetros ultrasónicos como la frecuencia (desde 20 hasta 850 kHz), la potencia acústica y el tiempo de exposición en la muerte de bacterias.

Donde observaron un aumento en el porcentaje de muerte de *Bacillus* al incrementar el tiempo de exposición y la intensidad del ultrasonido en una frecuencia baja (entre 20 y 38 kHz) mientras que a mayor frecuencia (desde 512 hasta 850 kHz) se observó la desagrupación de bacterias (Mason, 2007). A partir entonces el uso de la ultrasonificación puede dividirse en dos grandes áreas, su uso para la ruptura celular y su uso para incrementar la actividad biológica.

Aplicación del ultrasonido en la ruptura celular

Desde la década de los 60's hasta nuestros días, la ultrasonificación ha sido principalmente utilizada en la ruptura de células y en la industria de los alimentos (Mason, Chemat & Ashokkumar, 2015). La disrupción celular mediante ultrasonido (a 20 kHz o 40 kHz) ha servido para liberar enzimas intracelulares y organelos con aplicación en la industria y en la medicina (Ojha, et al., 2017). Los efectos moleculares del ultrasonido que permiten la desintegración de la célula se ilustran en la Fig. 2.1 (Rokhina, Lens & Virkutyte, 2009). En donde podemos apreciar tres cambios en la célula inducidos por el ultrasonido; Físicos, químicos y por estrés. Se considera que estos cambios ocasionan la muerte o desactivación biológica de la célula, debido a la lisis de la membrana o pared celular, la ruptura de organelos y enzimas. Además pueden causar la pérdida de material intracelular, la modificación de la carga superficial de la célula y la ruptura de las sustancias poliméricas extracelulares.

Es importante resaltar que diferente tipo de célula, puede responder de forma significativamente diferente en cuanto a su sensibilidad al ultrasonido. Se ha reportado que la tasa de rendimiento de biomasa y la tasa de crecimiento de *Anabaena flos-aquae* (una cianobacteria) se incrementaba, mientras que el mismo tratamiento en *Selenastrum capricornutum* (una microalga) redujo su tasa de crecimiento (Chisti, 2003).

Figura 2.1 Efectos moleculares del ultrasonido de baja frecuencia en células microbianas

Cambios físicos

Térmicos: Pirólisis y combustión

- El daño celular depende de la energía absorbida, la máxima temperatura y el tiempo de exposición. Los daños incluyen lisis parcial o total (i)

Cavitación y fuerzas de corte

- Cambios en las estructuras internas de la célula (ii)
- Modifica la estabilidad de las enzimas (iii)
- Ruptura del núcleo y liberación de ADN (iv)
- Ruptura de sustancias poliméricas extracelulares (v)

Cambios químicos

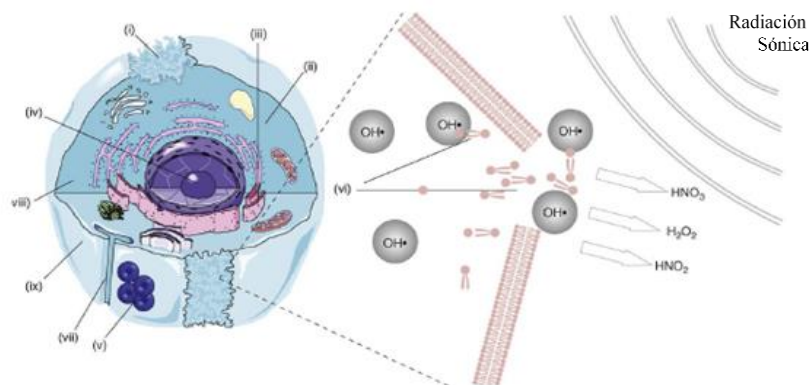
Generación de radicales libres

- Liberación de ácido nítrico, ácido nitroso y peróxido de hidrógeno debido a la interacción entre radicales libres y la célula (vi)
- Disminución de la estabilidad celular (vii)

Cambios inducidos por estrés

Corrientes acústicas

- Incremento en la permeabilidad de la membrana y por ende, en la transferencia de sustrato hacia el interior de la célula (viii)
- Modificación de la carga superficial de la célula (ix)
- Ruptura de la membrana celular (vi)



Fuente: Adaptado de Rokhina, Lens y Virkutyte, 2009

Aplicación del ultrasonido para incrementar la actividad celular

En 1983, Willians reportó que el ultrasonido fue capaz de incrementar la permeabilidad de la membrana celular en microorganismos (Chisti, 2003). A partir de entonces una nueva área de investigación surgió “la utilización del ultrasonido en células vivas a nivel sub letal. En 1992, Sinisterra publicó una revisión acerca de las aplicaciones del ultrasonido en la biotecnología, enfocando su estudio en procesos biotecnológicos que utilizaban células o enzimas libres tratadas con ultrasonido. Encontró experimentos que reportaban el incremento en la actividad biológica de células y enzimas utilizando ultrasonido a un nivel sub letal (Sinisterra, 1992).

Posteriormente, Chisti (2003) publicó una revisión sobre el uso de sonobiorreactores (biorreactores acoplados con un instrumento sónico) para intensificar el desempeño de microorganismos (Kwiatkowska et al., 2011). En el 2004, diferentes autores reportaron que el incremento en la permeabilidad de las membranas podía incrementar el transporte de sustrato hacia el interior de las células, lo cual promovía la actividad del microorganismo (Wang et al., 2012). En 2007, se demostró que el incremento en la actividad biológica no era exclusivo de células y que se podía observar también en la actividad de lodos anaerobios al utilizar ultrasonido de baja intensidad. Consideraban que los efectos producidos se debían al daño que sufrían las células, los cuales incrementaban la permeabilidad de la célula, la selectividad de la membrana y pared celular e incrementaba la actividad de las enzimas y el metabolismo de las células (Xie, Liu & Yan, 2007).

En 2009, se observó que el ultrasonido también podía incrementar la solubilidad de sustancias y que este podía modificar el metabolismo de un consorcio y la biodegradabilidad de un lodo (Liu et al., 2009). En el 2010, se publicó un estudio en donde utilizaron ultrasonido para incrementar la producción de biogás y la reducción del tiempo de digestión anaerobia de flóculos y gránulos anaerobios (Xu, Chen, Shi, Wang & Zhu, 2010).

Ultrasonido de baja frecuencia en la producción biológica de hidrógeno

Guo, Kim, Sung y Lee, (2010) evaluaron el efecto del pretratamiento ultrasónico en la producción de H₂, utilizando lodo anaerobio de digestión pretratado con choque térmico a una temperatura de 90°C durante 15 min y sacarosa como sustrato, encontró condiciones óptimas con un tiempo de sonicación de 10 s y una intensidad de 130 W/L, incrementó la tasa de producción de H₂ en 1.3 veces al aplicar ultrasonido de forma directa en el lodo y 1.48 veces cuando el ultrasonido se aplicó en la solución. reportaron que el tiempo de exposición presentó mayor efecto que la amplitud y que la interacción entre parámetros no era significativa. More y Ghangrekar, (2010) evaluaron el efecto del ultrasonido en un consorcio microbiano anaerobio para la producción de H₂ en celdas de combustible microbianas. Evaluaron tiempos de exposición desde 2.5 hasta 15 min.

Las condiciones óptimas fueron 5 min de exposición a la ultrasonicación, con una frecuencia de 40 kHz y un potencial de ultrasonido de 120 W. Sus observaciones fueron que la combinación de ultrasonido con choque térmico no mejoró la producción de H₂. Elbeshbishy, Hafez y Nakhla, (2010) utilizaron lodo anaerobio como inóculo y glucosa como sustrato, los parámetros principales de estudio fueron el tiempo de exposición y el control de temperatura. Las condiciones óptimas de operación fueron 20 min y temperatura controlada. Aplicaron una energía específica de 79 kJ g⁻¹ TS. Obtuvieron un incremento en la tasa volumétrica del 120% con respecto a un lodo sin tratar y sin fuente de carbono y un incremento del 40% sobre un lodo pretratado con choque térmico. Wang, Fang, Fang y Bu, (2010) compararon los efectos del ultrasonido y de la luz ultravioleta. Utilizaron orujo de manzana como sustrato. Irradiaron de forma directa 30 g de lodo con ultrasonido durante diferentes tiempos (desde 15 hasta 60 min). Utilizando un baño sónico.

La condición óptima fue de 30 min. Ambos tratamientos alcanzaron una producción acumulada máxima de H₂ similar (100 mL g⁻¹ TS). Sin embargo, el tratamiento ultrasónico obtuvo una tasa de producción máxima 22.7% mayor que el tratamiento con luz ultravioleta. Elbeshbishy et al., (2011) reportaron el incremento en la producción de H₂ en reactores de tanque agitado (RTA) en tres sistemas distintos. El primer sistema fue un RTA con desperdicios de comida en la alimentación (control), el segundo sistema fue un RTA con desperdicios de comida sonicados en la alimentación y el tercer sistema fue un sonobiorreactor, el cual consta de un RTA conectado con una probeta ultrasónica en el fondo.

Observaron que la mayor producción de H₂ se obtuvo en el sonobiorreactor. Wang et al., (2012) evaluaron el ultrasonido en un fotobiorreactor. Utilizaron como inóculo a *Rhodospseudomonas palustris* SQK 01. La aplicación del ultrasonido fue intermitente. Las condiciones óptimas se obtuvieron al aplicar 40 W de potencia sónica, intervalos de agitación de 3/ s, una concentración de sustrato de 75 mmol/L a un flujo de 40 ml/h. Observaron que el ultrasonido disminuyó la concentración de H₂ en el medio (desde 300 μmol L⁻¹ a 50 μmol L⁻¹), lo cual implicó que el ultrasonido liberó H₂ gaseoso desde el líquido y disminuyó su presión parcial. Lo cual permitió un incremento en la tasa de producción y del rendimiento de H₂ en 2 veces lo obtenido con un fotobiorreactor convencional. Elbeshbishy, Hafez y Nakhla, (2012) observaron mediante estudios por lote el efecto de la ultrasonicación, como método de pretratamiento de residuos de pulpa. Evaluaron tiempos desde 0.5 min hasta 30 min, en muestras de 100 mL. La condición óptima fue de 30 min de sonicación, en donde se incrementó la máxima cantidad de H₂ producido en 88% (80 mL g⁻¹ SSV), mientras que la tasa máxima de producción de H₂ se incrementó en un 145% en comparación con el control. Yang, Guo, Cao, Zheng y Ren, (2012) evaluaron la reducción concomitante de lodo biológico con la producción de H₂ mediante la comparación de tres tratamientos; Ultrasonido, ozonación y la combinación de ambos. Observaron que la combinación de métodos presentó mayor producción en comparación con los métodos individuales.

Las condiciones óptimas fueron una dosis de 0.1558 g O₃ g⁻¹ SD y una densidad ultrasónica de 1.423 W mL⁻¹. El rendimiento máximo fue de 9.28 mL H₂ g⁻¹SD, la tasa de producción máxima fue de 1.84 mL h⁻¹. Wan y Yin (2017), publicaron una revisión acerca de los diferentes métodos de pretratamiento para enriquecer bacterias productoras de hidrógeno en cultivos mixtos. De un análisis sobre cerca de 150 artículos publicados en los últimos 8 años, sólo el 3.57% ha sido acerca de la ultrasonicación. Lo cual indica que es un área nueva de investigación con amplio potencial.

En la Tabla 2.1, se muestra un análisis comparativo de diferentes reportes sobre la mejora en la producción de H₂ mediante fermentación oscura utilizando ultrasonido como método de pretratamiento de inóculo. Debido a lo anterior se excluyeron los estudios con distinto método de producción biológica, así como los que no estudiaron el efecto en el pretratamiento del inóculo y que se presentaron anteriormente. Las características seleccionadas enfatizan las condiciones óptimas del pretratamiento, la energía específica como parámetro sónico de comparación y los resultados obtenidos en la producción de H₂.

Tabla 2.1 Producción de H₂ mediante fermentación oscura utilizando inóculo mixto pretratado con ultrasonido

Pre tratamiento	Sustrato	Parámetro evaluado	Rango	Valor Óptimo	ES (kJ L-1)	R-H2	Rmax	Pmax	Ref.
US	Sacarosa	Intensidad (W L-1)	100-240	130	1.3c	ND	30% > control, IS	Sin efecto	Guo et al., 2010
		Tiempo de sonicación (s)	3-17	10			48% > control, MS		
US, CT, AC y BA	Glucosa	Tiempo de sonicación (min)	5-40	20	869c	1.55 mol H2/mol glucosa, 121% > control	16.6 mL h-1, 64% > control	382 mL, 117% > control	Elbeshbishy et al., 2010

US y UV	Agua residual de orujo de manzana	Tiempo de sonicación (min)	0-60	30	ND	ND	18.8 mL g ⁻¹ SST h ⁻¹ , 61% > control	104 mL g ⁻¹ SST, 36% > control	Wang et al., 2010
US	Residuos de pulpa	Sitio de sonicación	Inf Reactor	Reactor	ND	332 mL H ₂ /g SSV, 84% > control	4.8 L L ⁻¹ d ⁻¹ , 84% > control	ND	Elbesbishy et al., 2011
CT-US, CT-OZ y CT-US-OZ	Digestión de inóculo	Dosis de ozono (g O ₃ g ⁻¹ SD)	0.05-0.2	0.1558	ND	9.28 mL H ₂ g ⁻¹ SD	1.84 mL h ⁻¹	ND	Yang et al., 2012
		Intensidad (W mL ⁻¹)	0.3-1.5	1.423	5122c				

Energía específica (ES), rendimiento de H₂ (R-H₂), máxima producción de H₂ (R_{max}), producción neta máxima de H₂ (P_{max}), ultrasonido (US), choque térmico (CT), ácido (AC), básico (BA), ultravioleta (UV); ozonación (OZ), combinación choque térmico y ultrasonido (CT-US), combinación choque térmico y ozonación (CT-OZ), combinación choque térmico, ultrasonido y ozonación (CT-US-OZ), sólidos disueltos (SD), sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), Influyente (Inf), valores calculados a partir de datos (c), valores no disponibles o no calculables (ND), inóculo sin pretratamiento (control), inóculo sonicado (IS), inóculo-sustrato sonicado (MS).

La mayoría de las investigaciones evaluaron un solo tratamiento y muy pocos han evaluado la combinación del ultrasonido con otro tratamiento. La combinación con ozono parece mejorar la producción de H₂ mientras que la combinación con choque térmico parece no ser efectiva. Los sustratos evaluados han sido diversos, desde sustratos definidos hasta sustratos complejos incluyendo la autodigestión del lodo biológico. Los principales parámetros sónicos evaluados son el tiempo de sonicación y la intensidad, en donde hay gran variación en el rango de estudio, desde 3 s hasta 60 min para el tiempo de exposición y desde 100 W L⁻¹ hasta 1,500 W L⁻¹ para la intensidad. También se observaron condiciones de óptimas de pretratamiento considerablemente distintas, sin embargo se observan dos condiciones que pueden ser positivas para el proceso; el uso de temperatura controlada (30°C) y el uso de la sonicación en el reactor.

Cabe mencionar que debido al uso de parámetros de sonicación diferentes y a la falta de mayor información en los reportes, no fue posible estimar la energía específica (E_S) en algunos estudios. No obstante, en los estudios donde se estimó la E_S se observó que existía también, gran variación en la condición óptima alcanzada, desde 1.3 kJ L⁻¹ hasta 5,122.8 kJ L⁻¹. Por otro lado, todos los estudios coincidieron en que la sonicación bajo condiciones adecuadas incrementó la producción de H₂ así como su rendimiento.

Agradecimientos

El autor C. F. Pineda-Muñoz agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada 557375.

Conclusiones

El uso del ultrasonido de baja frecuencia para incrementar el desempeño en la producción biológica de hidrógeno, ha sido reportado por pocos investigadores. En donde, han utilizado principalmente lodo anaerobio como inóculo, mientras que han empleado diferentes tipos de reactores y sustratos. Los resultados obtenidos han demostrado que la ultrasonicación puede incrementar la producción de H₂, en donde se ha utilizado principalmente el tiempo de sonicación y la intensidad como parámetros sónicos. Sin embargo, existe gran diferencia en las condiciones de pretratamiento utilizadas, así como en las condiciones óptimas, a pesar de utilizar equipos ultrasónicos similares. Más aún, la falta de información sobre las condiciones de pretratamiento en algunos reportes dificulta la reproducción del pretratamiento y de los resultados. Por otro lado, se observó que el uso de sonobiorreactores y el control de temperatura pueden mejorar aún más la eficiencia y producción de H₂. Debido a lo anterior, es necesaria mayor investigación sobre los efectos moleculares y celulares del ultrasonido en el proceso biológico, esto permitirá esclarecer las condiciones a las cuales el método de ultrasonicación mejora la producción de H₂.

Referencias

- Argun, H. & Dao, S. (2017). Bio-hydrogen production from waste peach pulp by dark fermentation: effect of inoculum addition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(4), 2569-2574.
- Azwar, M. Y., Hussain, M. A. & Abdul-Wahab, A. K. (2014). Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31, 158-173.
- Braguglia, C. M., Gianico, A. & Mininni, G. (2012). Comparison between ozone and ultrasound disintegration on sludge anaerobic digestion. *Journal of Environmental Management*, 95, S139-S143.
- Bundhoo, M. A. Z. & Mohee, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 6713-6733.
- Chang, S., Li, J. Z. & Liu, F. (2011). Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. *Renewable Energy*, 36, 1517-1522.
- Chisti, Y. (2003). Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. *Trends in Biotechnology*, 21(2), 89-93.
- Chong, S., Sen, T. K., Kayaalp, A. & Ang, H. M. (2012). The performance enhancement of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for domestic sludge treatment – A State-of-the-art review. *Water Research*, 46, 3434-3470.
- Eker, S. & Sarp, M. (2017). Hydrogen gas production from waste paper by dark fermentation: Effects of initial substrate and biomass concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(4), 2562-2568.
- Elbeshbishy, E., Hafez, H. & Nakhla, G. (2010). Enhancement of biohydrogen production using ultrasonication. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 6184-6193.
- Elbeshbishy, E., Hafez, H. & Nakhla, G. (2011). Ultrasonication for biohydrogen production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 2896-2903.
- Elbeshbishy, E., Hafez, H. & Nakhla, G. (2012). Viability of ultrasonication of food waste for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 2960-2964.
- Elbeshbishy, E. & Nakhla, G. (2011). Comparative study of the effect of ultrasonication on the anaerobic biodegradability of food waste in single and two-stage systems. *Bioresource Technology*, 102, 6449-6457.
- Foladori, P., Laura, B., Gianni, A. & Giuliano, Z. (2007). Effects of sonication on bacteria viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry—Fecal indicators, wastewater and activated sludge. *Water Research*, 41, 235-243.
- Gogate, P. R. & Kabadi, A. M. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 44, 60-72.
- Gokfiliz, P. & Karapinar, I. (2017). The effect of support particle type on thermophilic hydrogen production by immobilized batch dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(4), 2553-2561.

- Guo, Y. P., Kim, S. H., Sung, S. H. & Lee, P. H. (2010). Effect of ultrasonic treatment of digestion sludge on bio-hydrogen production from sucrose by anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, *35*, 3450-3455.
- Harvey, E. N. & Loomis, A. L. (1929). The destruction of luminous bacteria by high frequency sound waves. *Journal of Bacteriology*, *17*(5), 373-376.
- Hsu, C. W. y Lin, C. Y. (2016). Commercialization model of hydrogen production technology in Taiwan: Dark Fermentation technology applications. *International Journal of Hydrogen Energy*, *41*, 4489-4497.
- Koda, S., Kimura, T., Kondo, T. & Mitome, H. (2003). A standard method to calibrate sonochemical efficiency of an individual reaction system. *Ultrasonic Sonochemistry*, *10*, 149-156.
- Kurorawa, M., King, P. M., Wu, X., Joyce, E. M., Mason, T. J. & Yamamoto, K. (2016). Effect of sonication frequency on the disruption of algae. *Ultrasonics Sonochemistry*, *31*, 157-162.
- Kwiatkowska, B., Bennett, J., Akunna, J., Walker, G. M. & Bremner, D. H. (2011). Stimulation of bioprocesses by ultrasound. *Biotechnology Advances*, *29*, 768-780.
- Leonelli, C. & Mason, T. J. (2010). Microwave and ultrasonic processing: Now a realistic option for industry. *Chemical Engineering and Processing*, *49*, 885-900.
- Liu, C., Xiao, B., Dauta, A., Peng, G., Liu, S. y Hu, Z. (2009). Effect of low power ultrasonic radiation on anaerobic biodegradability of sewage sludge. *Bioresource Technology*, *100*, 6217-6222.
- Lutpi, N. A., Jahim, J. M., Mumtaz, T., Harun, S. & Abdul, P. M. (2016). Batch and continuous thermophilic hydrogen fermentation of sucrose using anaerobic sludge from palm oil mill effluent via immobilisation technique. *Process Biochemistry*, *51*, 297-307.
- Mason, T. J., Chemat, F. & Ashokkumar, M. (2015). Power ultrasonics for food processing. *Power Ultrasonics*, *27*, 815-843.
- Mason, T. J. (2007). Development in ultrasound–Non-medical. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *93*, 166-175.
- Merouani, S. & Hamdaoui, O. (2016). The size of active bubbles for the production of hydrogen in sonochemical reaction field. *Ultrasonic Sonochemistry*, *32*, 320-327.
- More, T. T. & Ghangrekar, M. M. (2010). Improving performance of microbial fuel cell with ultrasonication pre-treatment of mixed anaerobic inoculum sludge. *Bioresource Technology*, *101*, 562-567.
- Ojha, K. S., Mason, T. J., O'Donnell, C. P., Kerry, J. P. & Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 410-417.
- Rokhina, E., Lens, P. & Virkutyte, J. (2009). Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends in Biotechnology*, *27*(5), 298-305.
- Sinisterra, J. V. (1992). Application of ultrasound to biotechnology: an overview. *Ultrasonics*, *30*(3), 180-185.

- Tiwari, B. K. & Mason, T. J. (2012). Chapter 6 – Ultrasound processing of fluids foods. P. J. Cullen, B. K. Tiwari & V.P. Valdramidis. (Ed.), *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluids Foods* (135-165). San Diego, USA: Academic Press.
- Wang, H., Fang, M., Fang, Z. & Bu, H. (2010). Effects of sludge pretreatments and organic acids on hydrogen production by anaerobic fermentation. *Bioresource Technology*, *101*, 8731-8735.
- Wang, J. & Yin, Y. (2017). Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.135>.
- Wang, Y. Z., Xie, X. W., Zhu, X., Liao, Q., Chen, R., Zhao, X. & Lee, D. J. (2012). Hydrogen production by *Rhodospseudomonas palustri* CQK 01 in a continuous photobioreactor with ultrasonic treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, *32*, 15450-15457.
- Wood, R. W. & Loomis, A. L. (1928). The physical and biological effects of high-frequency sound-waves of great intensity. *Journal of the Franklin Institute*, *205*(1), 151-153.
- Xie, B., Liu, H. & Yan, Y. (2007). Improvement of the activity of anaerobic sludge by low-intensity ultrasound. *Journal of Environmental Management*, *90*, 260-264.
- Xu, G., Chen, S., Shi, J., Wang, S. & Zhu, G. (2010). Combination treatment of ultrasound and ozone for improving anaerobic biodegradability of waste activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*, *180*, 340-346.
- Yang, S. S., Guo, W. Q., Cao, G. L., Zheng, H. S. & Ren, N. Q. (2012). Simultaneous waste activated sludge disintegration and biological hydrogen production using an ozone/ultrasound pretreatment. *Bioresource Technology*, *124*, 347-354.