

Cuantificación de la energía específica aplicada por un baño ultrasónico mediante el método de calorimetría y capacidad de disgregación de lodo anaerobio

PINEDA-MUÑOZ, Cuauhtémoc Francisco†, RAMÍREZ-VARGAS, María del Rocío, MEDINA-MORENO, Sergio Alejandro, VILLANUEVA-IBÁÑEZ, Maricela, LUCHO-CONSTANTINO, Carlos Alexander, TÉLLEZ-JURADO, Alejandro, TREJO-AGUILAR, Gloria Maribel y JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, Angélica*

Recibido 2 de Octubre, 2017; Aceptado 13 de Diciembre, 2017

Resumen

Se cuantificó la energía específica (ES) generada por un baño ultrasónico mediante el método de calorimetría, evaluando los efectos de diferentes parámetros de operación; Temperatura inicial (TI), tiempo de sonicación (TS) y volumen de la muestra (VM). Se determinó que el parámetro más importante fue el VM. La máxima ES generada fue de 84.2 kJ L⁻¹ y se obtuvo con un VM de 500 mL, una TI de 15°C y TS de 10 min. Finalmente se evaluó el efecto de la máxima energía generada en muestras de lodos anaerobios granulares y se observó disminución del tamaño del gránulo del lodo y la disminución de la concentración de sólidos de cerca de un 60%. Determinamos que el baño ultrasónico generó energía suficiente para estudios con aplicaciones biotecnológicas a nivel sub letal y mantuvo en todos los ensayos un error experimental menor al 5%. Consideramos que más estudios, utilizando equipos económicos y sencillos como los baños ultrasónicos pueden servir como base para entender las interacciones entre procesos biológicos y la sonoquímica.

Ultrasonido de baja frecuencia, Baño ultrasónico, Energía específica, Lodos anaerobios

Abstract

The specific energy (SE) generated by an ultrasonic bath is quantified by means of the Calorimetry method, evaluating the effects of different operating parameters; Initial temperature (IT), sonication time (ST) and sample volume (SV). It was determined that the most important parameter was the VM. The maximum is generated was 84.2 KJ L and was obtained with a VM of 500 ML, a TI of 15 °c and TS of 10 min. Finally, the effect of the maximum energy generated in granulated anaerobic sludge samples was assessed, and a decrease in the size of the sludge granule was observed and the decrease in the concentration of solids of about 60%. We determined that the ultrasonic bath generated sufficient energy for studies with biotechnological applications at sub-lethal level and maintained in all the trials an experimental error less than 5%. We believe that more studies, using simple and economical equipment such as ultrasonic baths, can serve as a basis for understanding the interactions between biological processes and Sonoquímica.

Low frequency ultrasound, Ultrasonic bath, Specific Energy, Anaerobic sludge

Cita: PINEDA-MUÑOZ, Cuauhtémoc Francisco, RAMÍREZ-VARGAS, María del Rocío, MEDINA-MORENO, Sergio Alejandro, VILLANUEVA-IBÁÑEZ, Maricela, LUCHO-CONSTANTINO, Carlos Alexander, TÉLLEZ-JURADO, Alejandro, TREJO-AGUILAR, Gloria Maribel & JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, Angélica. Cuantificación de la energía específica aplicada por un baño ultrasónico mediante el método de calorimetría y capacidad de disgregación de lodo anaerobio. Revista de Ingeniería Biomédica y Biotecnología, 2017. 1-2, 32-38

* Correspondencia al autor (email: ajimenez@upp.edu.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

1. Introducción

El *ultrasonido* o *ultrasonificación* puede definirse como un sonido con una frecuencia mayor a los 18 kHz o 20 kHz la cuál es inaudible por el oído humano (Chisti, 2003; Kwiatkowska, Bennett, Akunna, Walker & Bremner, 2011; Ojha, Mason, O'Donnell, Kerry & Tiwari, 2017). Este fenómeno cuenta con una amplia diversidad de aplicaciones en la ciencia, en la industria y en la medicina. Cuando la frecuencia es mayor a 5 MHz, se denomina como *ultrasonido de diagnóstico* y se utiliza principalmente en la ultrasonografía médica, por ejemplo el ultrasonido prenatal. Cuando la frecuencia se encuentra entre los 20 kHz y los 100 kHz, se conoce como *energía ultrasónica* o *ultrasonido de alta energía*, en este caso es posible afectar químicamente tanto materiales como procesos (Kwiatkowska et al., 2011; Leonelli & Mason, 2010).

Esto se debe principalmente a un fenómeno llamado cavitación, en donde microburbujas de vapor se forman y explotan de forma violenta en una fracción de segundo, generando radicales libres, corrientes microjets con una velocidad de hasta 200 m/s, calentamiento local intenso de hasta 4000 °C y una presión de hasta 1000 atm (Chisti, 2003; Suslick, 2003; Gogate & Kabadi, 2009). Esta *energía ultrasónica* se ha aplicado de forma exitosa en bioprocesos importantes como; en la transformación enzimática, remediación ambiental, fermentación, digestión anaerobia, procesamiento de alimentos, síntesis química asistida de enzimas, extracción de componentes intracelulares, producción de biocombustibles, monitoreo de procesos, bio-sensores, transferencia de material genético y en la desinfección microbiana de agua (Chisti, 2003; Kwiatkowska et al., 2011; Rokhina, Lens & Virkutyte, 2009).

Normalmente estas técnicas aprovechan la alta energía generada para romper moléculas pequeñas de estabilidad relativamente elevada o para desintegrar la pared o membrana celular de diferentes microorganismos (Gogate & Kabadi, 2009; Ojha et al., 2017).

Actualmente se está desarrollando una nueva línea de investigación, donde se estudian los efectos de la *energía ultrasónica* en células vivas utilizando ultrasonido a nivel sub-letal, con la finalidad de modificar el metabolismo celular, activar enzimas o mejorar la transferencia de masa de reactivos y productos a través de la capa límite, membrana o pared celular (Rokhina, Lens & Virkutyte, 2009; Ojha et al., 2017).

Existen dos problemáticas en el estudio de este efecto, la primera es la escasa evaluación de la energía aplicada. Es decir, la diversa forma de reportar la energía ingresada a una muestra, la cual no es necesariamente correcta. Esto causa que los resultados u observaciones no puedan ser reproducidos o comparados. En algunos casos se reporta el valor de la energía eléctrica empleada por el equipo (P , medida en Watts (W)) sin embargo este valor es mayor a la energía sónica aplicada, debido a que depende de la eficiencia del elemento que genera el ultrasonido (transductor). Otros trabajos reportan el tiempo de sonicación, no obstante la energía generada no depende únicamente de este factor. En otras ocasiones se requieren más detalles acerca del equipo utilizado (volumen o área de contacto), sin ellas es imposible comparar la energía aplicada entre diferentes equipos.

Idealmente, la energía específica aplicada debe evaluarse experimentalmente (E_s , medida en kJ L^{-1}) (Chisti, 2003), el método más utilizado y simple es la calorimetría (Mason, Lorimer & Bates, 1992).

Este método incluye parámetros importantes como la energía ingresada al medio, el volumen de la muestra y el tiempo de sonicación, entre otros (Foladori, Bruni, Gianni & Giuliano, 2007).

La segunda problemática puede ser el elevado costo de los equipos de ultrasonido. Los instrumentos recomendados cuentan con una sonda, la cual se introduce en el medio líquido para dispersar el sonido, a pesar de que estos equipos son eficientes en la generación de alta energía, suelen ser costosos, además de que suelen presentar erosión en la sonda por la alta intensidad energética generada. Una alternativa en la investigación inicial de este fenómeno, son los baños ultrasónicos. Estos instrumentos son ampliamente disponibles y son la fuente menos costosa de irradiación ultrasónica, su desventaja es que la energía ultrasónica generada puede ser insuficiente (Gogate & Kabadi, 2009; Mason & Peters, 2002), lo anterior se desconoce a plenitud, debido a la escasez de trabajos que evalúen su desempeño.

El objetivo del presente trabajo fue cuantificar la energía específica aplicada por un baño ultrasónico mediante el método de calorimetría. También se evaluaron mediante un análisis estadístico tres parámetros; el volumen de la muestra, el tiempo de exposición a la sonicación y la temperatura inicial de la muestra para establecer un método con aplicación biotecnológica. Finalmente se evaluó el efecto de la máxima energía específica generada en muestras de lodo anaerobio granular para estimar el efecto del ultrasonido generado por un baño sónico, en la disgregación del lodo y en la solubilización de materia orgánica.

2. Metodología

2.1. Equipo

El instrumento de ultrasonido utilizado fue un baño ultrasónico marca *Magister Technology Modelo SB-3200 DTN*, el cual se operó a una frecuencia constante de 40 kHz. Los experimentos se realizaron por triplicado, utilizando agua destilada como muestra.

2.2. Diseño de experimentos

Con la finalidad de conocer los efectos de la temperatura inicial (T_I), tiempo de sonicación (T_S) y el volumen de la muestra (V_M), en la energía específica (E_S) aplicada por el ultrasonicador, estudiamos cada factor con una cantidad de niveles (n) distintos, donde n dependió de la operación práctica del instrumento. Por lo cual, para T_I , $n=3$ (15°C, 20°C y 25°C), para V_M , $n=4$ (0.5 L, 1 L, 3 L y 4 L), y para el T_S , $n=11$ (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 min).

2.3. Método de calorimetría

Irradiamos con ultrasonido muestras con un volumen, temperatura inicial y tiempo de sonicación determinado. Durante la sonicación medimos la temperatura de la muestra mediante un potenciómetro *Conductronic modelo PC-45* con una precisión de $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Posteriormente graficamos los datos de temperatura (T) vs tiempo (t) y ajustamos a la ecuación de una recta para estimar el valor dT/dt en el tiempo $t=0$. Posteriormente calculamos la energía ultrasónica P mediante (1) (Mason, Lorimer & Bates, 1992).

$$P = \left(\frac{dT}{dt} \right) \times C_p \times M \quad (1)$$

Donde C_P es la capacidad calorífica del solvente (en $J\ kg^{-1}\ ^\circ C^{-1}$) y M es la masa del solvente utilizado (en kg). La intensidad (I , en $W\ L^{-1}$) y la energía específica de ultrasonido (E_S , en $kJ\ L^{-1}$) pueden estimarse con (2) y (3) respectivamente (Foladori et al., 2007).

$$I = \frac{P}{V_M} \quad (2)$$

$$E_S = I \times t \quad (3)$$

Utilizamos (1), (2) y (3), para construir (4).

$$E_S = \left(\frac{dT}{dt} \right) \times \frac{C_P \times M}{V_M} \times t \quad (4)$$

Debido a que las variables M y V_M se refieren a la masa y al volumen de la muestra respectivamente, la sustituimos por la densidad de la muestra, que en el caso particular del agua es de $1\ kg\ L^{-1}$. Finalmente determinamos E_S mediante (5).

$$E_S = \left(\frac{dT}{dt} \right) \times C_P \times t \times Mv \quad (5)$$

2.4. Métodos analíticos

Una vez determinadas, las condiciones de temperatura inicial, tiempo de sonicación y volumen de la muestra en donde se obtuvo la generación máxima de energía específica con el baño ultrasónico. Se prosiguió a evaluar el efecto de esta energía en una muestra de lodo activado, con la finalidad de evaluar la disgregación de lodo granular (disminución del tamaño de partícula) y la solubilización de sólidos totales y totales volátiles (ST y STV).

El lodo anaerobio granular se obtuvo del segundo tanque de sedimentación de la planta piloto de tratamiento de aguas residuales de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Cd. de México. Previo a la ultrasonificación, la muestra de lodo fue diluida y homogenizada en agua destilada en una relación 1:1.

Se estimó la fracción volumétrica del lodo (%v/v) como parámetro para medir la disminución del tamaño de partícula. Para ello se utilizaron 5 tamices de tamaño diferente, de tal forma que el lodo quedó separado en 6 fracciones volumétricas. Los valores de los tamaños de partícula inferior y superior de cada fracción se muestran en la Tabla 1. Cada fracción volumétrica representa el volumen de lodo de un intervalo de tamaño específico con respecto al volumen total del lodo ultrasonificado. La concentración de ST y STV se cuantificó mediante el método gravimétrico descrito en la norma mexicana NMX-AA-034-SCFI-2015.

2.5. Análisis estadístico

Realizamos un análisis estadístico ANOVA y comparación de medias para determinar la diferencia significativa entre tratamientos, utilizando los test de Bonferroni, Fisher y Tukey mediante el software Origin-Pro8.

3. Resultados y discusión

Se evaluaron los efectos del tiempo de sonicación (T_S), del volumen de la muestra (V_M) y de la temperatura inicial (T_i) en la energía específica (E_S) generada con un baño ultrasónico.

3.1. Efecto del tiempo de sonicación

En la Fig.1 mostramos el efecto del T_S en la E_S generada por un baño ultrasónico, con un volumen de muestra de 500 mL y una temperatura inicial de 20°C. Observamos un efecto lineal donde cada minuto de exposición a la sonicación generó 7.33 $kJ\ L^{-1}$. Por otro lado el análisis ANOVA y la comparación de medias de Tukey, Bonferroni y Fisher mostraron que 1 minuto de sonicación es tiempo suficiente para generar una E_S con diferencia significativa ($p < 0.05$).

Además calculamos el error experimental, el cual se mantuvo entre 2.4 % y 4.9 %.

3.2. Efecto del volumen de la muestra

En la Tabla 2 y en la Fig. 2 presentamos los valores de P , I , E_S y el gradiente de temperatura (dT/dt) de muestras irradiadas con ultrasonido con diferente V_M .

Observamos que P , I , E_S y dT/dt , incrementaron en la medida que el V_M disminuyó. En la Fig. 3 presentamos el ajuste de E_S vs V_M , con un $R^2=0.995$, donde observamos un efecto potencial, descrito por (6). Este parámetro presentó el mayor efecto de los tres evaluados. Por otra parte estimamos un incremento de 15.44 kJ L^{-1} si disminuimos el V_M de 500 mL a 400 mL

$$E_S = 43.311 \times M_V^{-0.83} \quad (6)$$

Mason et al., (1992) reportó el efecto contrario al utilizar un sonoreactor de sonda (Undatim a 20 kHz). En sus experimentos P incrementó proporcionalmente al V_M (Obtuvo 84 W, 95 W y 120 W en muestras de 50 mL, 100 ml y 200 mL respectivamente). Las diferencias entre los resultados pueden deberse al uso de diferentes equipos y/o al uso de diferente intervalo de estudio. Se ha reportado que la cavitación se genera principalmente en los primeros 2 cm a 5 cm de contacto con el instrumento (Gogate & Kabadi, 2009), por lo tanto se pueden considerar la generación dos zonas, una con alta ocurrencia de cavitación y otra con poca o nula.

Cuando el V_M se incrementa por encima de la zona de cavitación, la E_S se perderá en la zona donde no hay cavitación (Como se aprecia en nuestros resultados). Por otro lado, al disminuir el V_M por debajo de la zona de cavitación, la misma cavitación será el factor limitante, por ejemplo, cuando el V_M sea 0, la E_S será 0 también.

El análisis estadístico de comparación de medias ($p<0.05$) indicaron diferencia significativa entre cada tratamiento, con excepción de 3 L y 4 L de V_M donde no observamos diferencia significativa de acuerdo a los test de *Bonferroni* y *Tukey*. Para estos experimentos calculamos un error experimental entre 1.1 % y 4.9 %.

3.3. Efecto de la temperatura inicial

A continuación presentamos los efectos de la T_I en dT/dt (ver Fig. 4) y en E_S (ver Fig. 5) utilizando una muestra con $V_M = 500 \text{ mL}$ y $T_S=10 \text{ min}$. Además en la Tabla 3, mostramos los valores de P , I y E_S . Observamos un efecto lineal con $R^2=0.98$, donde la energía específica incrementa en 1.757 kJ L^{-1} al disminuir la T_I en 1°C .

Los análisis de ANOVA ($p<0.05$) y de comparación de medias de *Tukey* y *Fisher* indicaron diferencia significativa entre cada T_I . La desviación estándar para la E_S varió entre 1 kJ L^{-1} y 1.8 kJ L^{-1} , lo cual representa un error experimental de sólo 3% al 5%.

La disminución en la energía específica puede deberse a que, al incrementar la T_I se incrementa la presión de vapor del agua, lo cual disminuyó la generación de microburbujas de vapor y por ende el efecto de cavitación Mason et al., (1992).

Consideramos que el baño ultrasónico presentó una adecuada reproducibilidad en la energía sónica aplicada. De acuerdo a Foladori et al., (2007), 100 kJ L^{-1} es suficiente energía para romper gránulos o flóculos biológicos y para eliminar microorganismos. Por lo tanto, la energía específica generada a 15°C (84.2 kJ L^{-1}), permite un amplio intervalo para evaluar los efectos del ultrasonido a nivel sub-letal en células vivas e incluso en gránulos biológicos.

3.4. Efecto de la ultrasonicación en la disgregación de gránulos anaerobios

Se evaluó la capacidad de un baño ultrasónico para disminuir el tamaño de partícula y para solubilizar sólidos totales y sólidos volátiles de una muestra de lodo anaerobio granular. Utilizando la máxima energía específica evaluada (84.2 kJ L^{-1}).

En la Fig. 6 se muestra la disminución del tamaño del gránulo medido como fracción volumétrica. Se observó que las fracciones I, II, III, IV y V, redujeron su porcentaje v/v en un 10%, 10%, 5%, 6% y 2% respectivamente. Las fracciones con mayor reducción fueron las de mayor tamaño (I y II), y quienes presentaron menor reducción fueron las de menor tamaño. Esto puede explicarse debido que, partículas de mayor tamaño estarán más expuestas a ser atacadas por las microburbujas de cavitación, en comparación con una partícula de menor tamaño. Además, las partículas de mayor tamaño al reducirse, incrementaron a las fracciones volumétricas de las fracciones de menor tamaño. En este caso, la fracción volumétrica VI (\leq a 74 micras) incrementó su fracción desde 13% en el control hasta 32% con el tratamiento ultrasónico (Datos no graficados).

3.5. Efecto de la ultrasonicación en la disminución de sólidos totales y sólidos volátiles

En la Fig. 7 se muestra la disminución de sólidos totales y sólidos volátiles debido a la ultrasonicación de lodos anaerobios granulares mediante un baño ultrasónico. Se observó una elevada disminución de la concentración de sólidos al aplicar ultrasonido en comparación con el control (lodo sin tratamiento). Alcanzando una reducción en la concentración de sólidos totales de 58.2% y una disminución de sólidos volátiles de 59.6%.

Elbesbishy, Hafez y Nakhla, (2011), evaluaron el porcentaje de disminución de material particulado en desechos orgánicos, sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos volátiles y cuantificó una reducción del 9% y del 7% respectivamente después de la sonicación, utilizando un ultrasonificador de sonda.

Los resultados de la disgregación de lodos y de la solubilización de sólidos indican que la energía específica aplicada fue suficientemente fuerte para disminuir de manera significativa la concentración de sólidos y el tamaño de las partículas. Estos resultados indican que el baño ultrasónico puede utilizarse como modelo para evaluar tratamientos ultrasónicos en sistemas biológicos.

4. Agradecimientos

El autor C. F. Pineda-Muñoz agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada 557375 y a la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa, por la donación del lodo anaerobio granular.

5. Conclusiones

Se cuantificó la energía específica generada por un baño ultrasónico y se evaluaron los efectos del tiempo de sonicación, del volumen de la muestra y de la temperatura inicial. Observamos que la energía específica incrementa con; la disminución de T_i y V_M , y con el incremento de T_S . El mayor efecto fue el V_M , seguido de T_S y finalmente T_i . La mayor cantidad de energía generada fue de 84.2 kJ L^{-1} y se obtuvo a una temperatura inicial de 15°C , un volumen de muestra de 500 mL y un tiempo de sonicación de 10 minutos.

Se evaluó el efecto de la máxima energía específica generada en muestras de lodos anaerobios granulares y se observó una reducción del tamaño de partícula del 10% v/v de la fracción de mayor a 2000 micrómetros. Además se observó una disminución de los sólidos totales y de los sólidos totales volátiles de casi 60%.

Los resultados fueron reproducibles y los tratamientos presentaron diferencia significativa. Determinamos que el baño ultrasónico genera suficiente energía para estudiar los efectos del ultrasonido en células vivas y granulos anaerobios a nivel sub-lethal.

6. Referencias

- Chisti, Y. (2003). Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. *Trends in Biotechnology*, 21(2), 89-93.
- Elbeshbishy, E., Hafez, H. & Nakhla, G. (2011). Ultrasonication for biohydrogen production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 2896-2903.
- Foladori, P., Bruni, L., 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.
- Kwiatkowska, B., Bennett, J., Akunna, J., Walker, G. M. y Bremner, D. H. (2011). Stimulation of bioprocesses by ultrasound. *Biotechnology Advances*, 29,768-780.
- Leonelli, C. y Mason, T. J. (2010). Microwave and ultrasonic processing: Now a realistic option for industry. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 49, 885-900.
- Mason, T. J., Lorimer, J. P. y Bates, D. M. (1992). Quantifying sonochemistry: casting some light on a black art. *Ultrasonics*, 30(1), 40-42.
- Mason, T; Peters, D. (2002). Chapter 2 The ultrasonic bath, In *Practical Sonochemistry*. Segunda edición. Woodhead Publishing. Cambridge, 49-63.
- Norma Oficial Mexicana, NMX-AA-034-SCFI-2015. Diario Oficial de la Federación, México, Cd. de México. 2015.
- Ojha, K. S., Mason, T. J., O'Donnell, C. P., Kerry, J. P. y Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrasonic Sonochemistry*, 34, 410-417.
- Rokhina, E. V., Lens, P. y Virkutyte J. (2009). Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends in Biotechnology*, 27(5), 298-305.
- Suslick, K. S. (2003). Chapter 1.41 Sonochemistry, In *Comprehensive Coordination Chemistry II*. Editado por Jon A. McCleverty y Thomas J. Meyer. Pergamon. Oxford. pp. 731-739.