



ENTREGABLE 3. EVALUACIÓN DE LA VISIÓN HIPERESPECTRAL PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO

1. **Identificación de la entidad beneficiaria.**

NIF	G-46421988
ACRÓNIMO	AINIA
NOMBRE COMPLETO	AINIA

2. **Número de expediente, programa y actuación subvencionable.**

Nº EXPEDIENTE	IMDEEA/2021/98
PROGRAMA	PROYECTOS DE I+D EN COOPERACIÓN CON EMPRESAS
ACTUACIÓN SUBVENCIONABLE	IMDEEA-PROYECTOS DE I+D EN COOPERACIÓN CON EMPRESAS

3. **Título del proyecto.**

Tecnologías de detección rápida de microorganismos en alimentos. SAFEFOOD.

4. **Objetivo.**

El objetivo general del paquete de trabajo N.º 2 Evaluación del control microbiológico mediante visión hiperespectral en línea era demostrar la viabilidad del control microbiológico de productos alimenticios en línea mediante la tecnología de visión hiperespectral.

Para ello, se plantean los siguientes dos objetivos particulares:

- Evaluar la tecnología de visión hiperespectral con muestras inoculadas en el laboratorio en el primer periodo de ejecución.
- Desarrollar un prototipo para la estimación de los niveles de enterobacterias y aerobios mesófilos en productos cárnicos en el segundo periodo de ejecución.

5. **Actividades desarrolladas.**

Preparación de las superficies de ensayo

Se realizó la selección de materiales no porosos, que pudieran ser representativos de los utilizados en la industria alimentaria o de las superficies domésticas en contacto con alimentos. También se escogieron los microorganismos diana, que fueron utilizados en los ensayos de inoculación y evaluación de las superficies contaminadas.



Los materiales seleccionados fueron los siguientes:

- Acero inoxidable 304
- Vidrio transparente
- Material cerámico porcelánico

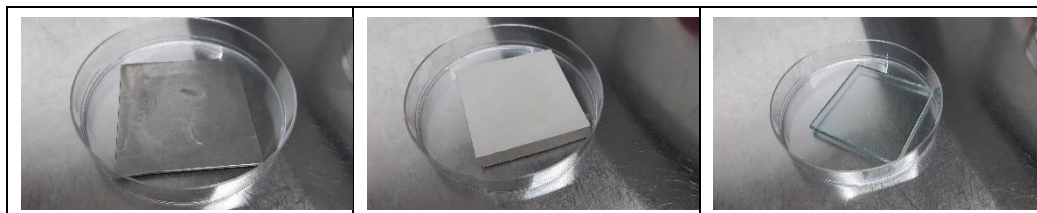


Figura 1. Muestras de los tres materiales seleccionados.

Los materiales fueron cortados a un tamaño de 50x50 mm, con el objetivo de colocar las piezas en el interior de placas Petri de laboratorio de 90X90 mm y, así, permitir su manipulación en condiciones asépticas durante las pruebas de evaluación.

Las superficies fueron desinfectadas con alcohol de 70º previo a las pruebas, secadas a temperatura ambiente en el interior de una cabina de flujo laminar durante 2 horas, codificadas y dispuestas en el interior de placas previo a su inoculación.

Selección y preparación de los microorganismos de ensayo

Se realizó la selección de dos tipos de microorganismos, representativos de los distintos grupos bacterianos, procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT):

- *Escherichia coli* CECT 516. Bacilo bacteriano gram negativo, indicador de la contaminación fecal o una higiene deficiente de los alimentos o las superficies de trabajo en contacto con alimentos.
- *Staphylococcus aureus* CECT 239. Coco gram positivo, presente en la superficie de la piel de humanos y animales, e indicador de la contaminación de los alimentos por una manipulación deficiente de los mismos.

Las cepas fueron regeneradas a partir de cultivos congelados a -80ºC mediante su siembra en medios nutritivos a 37ºC $\pm$ 1 ºC durante 24 horas. Tras este tiempo, se comprobó la viabilidad y pureza de los microorganismos y se realizó el pase de una colonia aislada a caldo de cultivo TSB (*Trypton Soy Broth*).

Posteriormente, se realizó el cultivo *overnight* de los microorganismos a 37ºC $\pm$ 1ºC y fueron preparadas diluciones seriadas del cultivo en tampón SSP para la preparación de inóculos calibrados de las bacterias de ensayo.

Pruebas preliminares de inoculación de materiales

Con el objetivo de preparar los materiales contaminados de ensayo, se realizaron pruebas experimentales preliminares para determinar la cantidad adecuada de inóculo en las piezas, la homogeneidad del inóculo sobre la superficie de la pieza y la recuperación de microorganismos tras el secado del inóculo sobre el material.

Para cada uno de los microorganismos diana se inocularon las siguientes muestras:

- Muestras blanco para su conservación en el laboratorio durante la realización de las pruebas y en las que se realizó el recuento de los microorganismos- tras ese tiempo- para conocer la posible pérdida microbiana durante el tiempo de ensayo (por temperatura o desecación del inóculo)
- Muestras inoculadas a 2 concentraciones diferentes para su observación con la tecnología de visión hiperspectral.

Para las pruebas iniciales, se seleccionó el acero inoxidable como material tipo, así como concentraciones de inóculo altas que permitiesen evaluar, si fuera el caso, un descenso de los niveles inoculados en el tiempo de evaluación de las muestras. Las muestras fueron inoculadas con pipeta estéril en el centro de la pieza para asegurar la adecuada adquisición de imágenes con la cámara hiperspectral en la zona de inoculación.

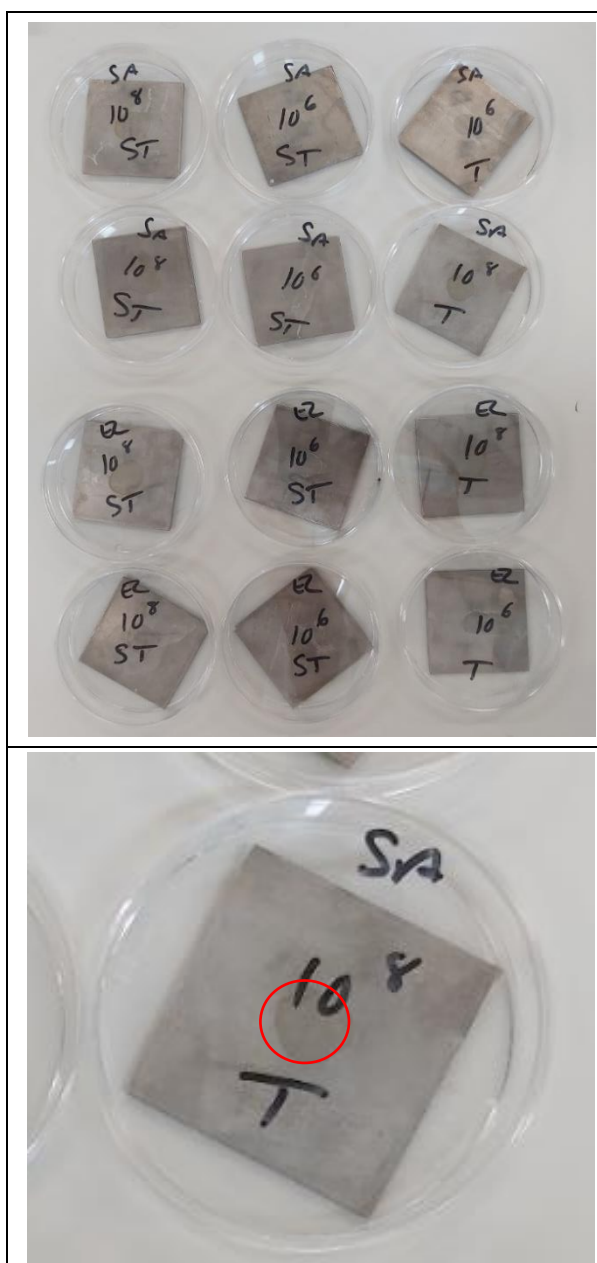


Figura 2. Fotografías de la puesta a punto del proceso de inoculación de materiales.

Los niveles recuperados en placa (equivalentes a la cantidad de microorganismos viables presentes en el material) tras finalizar los ensayos, descendieron 2 unidades logarítmicas respecto al nivel inoculado del microorganismo. Este dato de pérdida de viabilidad de las bacterias diana, por efecto de la desecación de la pieza, fue tenido en cuenta en los ensayos de evaluación posteriores llevados a cabo.

En una segunda fase de ensayo, se realizaron pruebas con los tres materiales seleccionados. Se realizó la inoculación sobre los 25 cm² de superficie de las piezas, simulando con mayor precisión la contaminación detectada en superficies en contacto con alimentos. Para ello, las plazas fueron preparadas y desinfectadas de acuerdo con el protocolo experimental descrito anteriormente. La inoculación se realizó mediante la extensión de 100 µL del inóculo calibrado sobre la pieza, tal como se muestra en las siguientes imágenes.

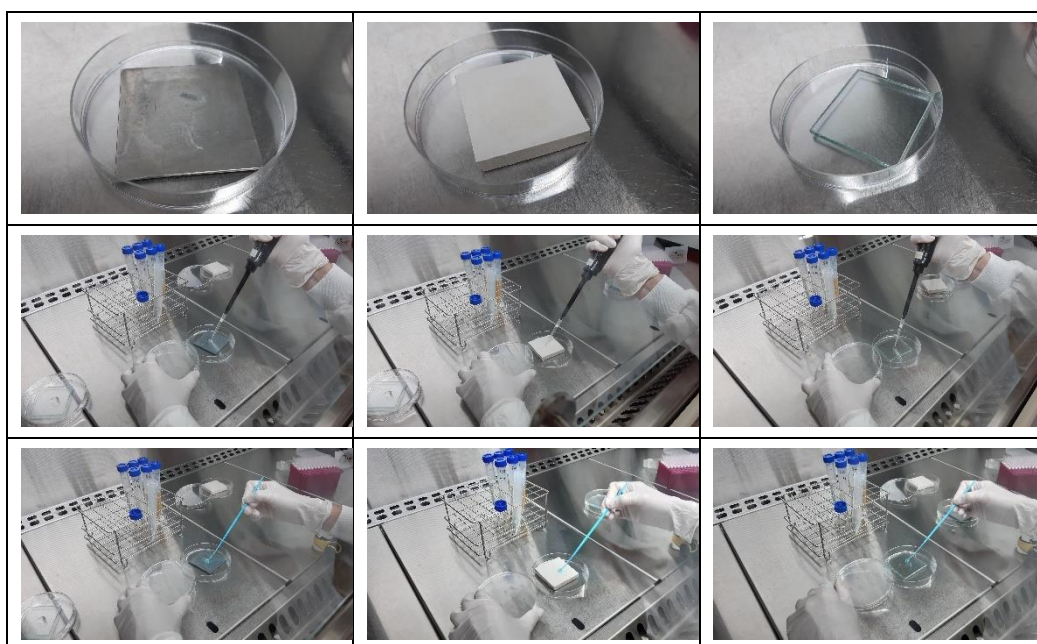


Figura 3. Imágenes de los procesos de inoculación de los tres materiales.

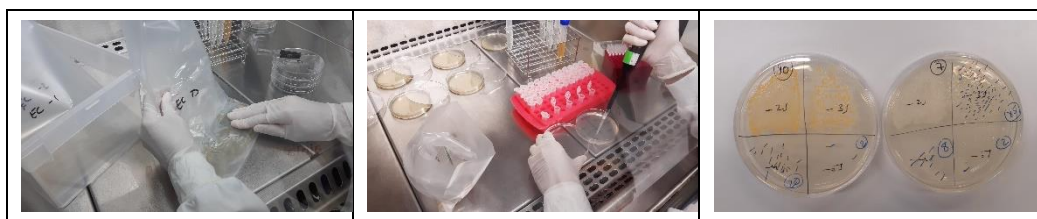


Figura 4. Imágenes del proceso de recuento de microorganismos.

En esta fase experimental, se prepararon piezas con tres niveles distintos de inóculos que fueron observadas seguidamente con el montaje de visión hiperespectral.

En paralelo, se realizó el recuento en placa de los microorganismos presentes en las muestras control que permanecieron en el laboratorio durante las pruebas. Para ello, las piezas contaminadas se introdujeron en una bolsa estéril con caldo neutralizante. Se procedió al lavado de las muestras para la recuperación de los microorganismos en el caldo. Con la solución resultante, se procedió al recuento de los microorganismos en



medio de cultivo Plate Count Agar (PCA), mediante su incubación a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas.

Los resultados correspondientes al nivel inoculado de cada microorganismo se detallan en las siguientes tablas.

Tabla 1. Resumen de la preparación de los materiales contaminados con *E.coli* a diferentes niveles.

Material	Nivel de inoculación	<i>Escherichia coli</i> (ufc/superficie)	Log ufc/superficie
Vidrio	1	91	1,96
	2	3,6E+04	4,56
	3	5,9E+06	6,77
Acero inoxidable	1	10	1,00
	2	1,0E+03	3,00
	3	8,5E+06	6,93
Cerámica	1	10	1,00
	2	1,0E+03	3,00
	3	1,5E+07	7,18

Tabla 2. Resumen de la preparación de los materiales contaminados con *S.aureus* a diferentes niveles.

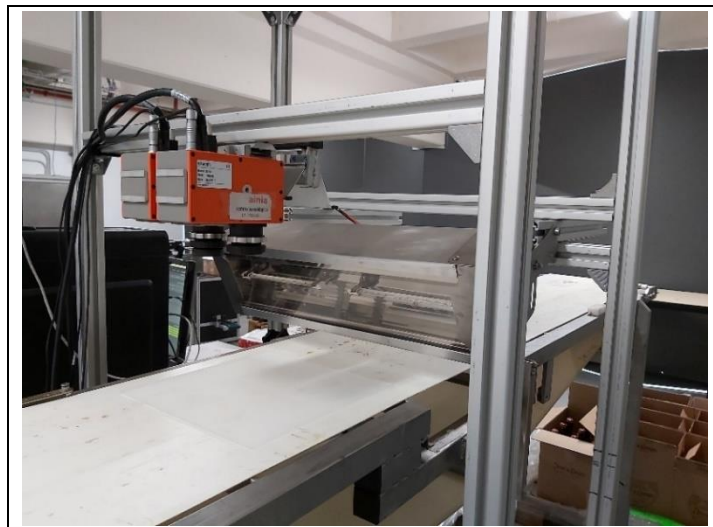
Material	Nivel de inoculación	<i>Staphylococcus aureus</i> (ufc/superficie)	Log ufc/superficie
Vidrio	1	6,2E+02	2,79
	2	1,0E+05	5,00
	3	2,7E+07	7,43
Acero inoxidable	1	1,4E+03	3,15
	2	1,1E+05	5,04
	3	2,0E+07	7,30
Cerámica	1	1,1E+03	3,04
	2	8,1E+04	4,91
	3	3,2E+07	7,51

Montaje de visión hiperespectral para la experimentación en el laboratorio

En primer lugar, se preparó el montaje de visión hiperespectral para medir las muestras de los materiales preparadas en el laboratorio. Durante el desarrollo del proyecto se probaron los siguientes equipos y configuraciones:

- Cámaras: Se instalaron dos cámaras hiperespectrales de escaneo lineal para medir en dos intervalos de longitudes de onda complementarios, a saber: visible e infrarrojo cercano (Vis-NIR) e infrarrojo de onda corta (SWIR)
- Sistemas de iluminación: Se probaron dos tipos de lámparas halógenas y se varió su número y su disposición con respecto a las cámaras y a las muestras.

- Transportador: Se adaptaron hasta tres transportadores de varias anchuras y capaces de funcionar a diferentes velocidades.



(a)



(b)



(c)

Figura 5. Evolución del montaje de visión hiperspectral.

Finalmente, se llegó al montaje de la Figura 5.c.

En segundo lugar, se utilizó ese montaje para medir las muestras de los materiales preparadas en el laboratorio en dinámico y sin ningún tipo de manipulación o contacto. Como resultado, se obtuvieron dos medidas para cada muestra:

- El hipercubo generado a partir de las medidas con las cámaras hiperespectrales.
- El resultado del análisis con el método acreditado en el laboratorio.

Análisis de las muestras de acero inoxidable

En primer lugar, se procesaron las imágenes adquiridas con la cámara Vis-NIR. Se extrajeron espectros representativos del transportador y de las muestras de acero inoxidable de los hipercubos.

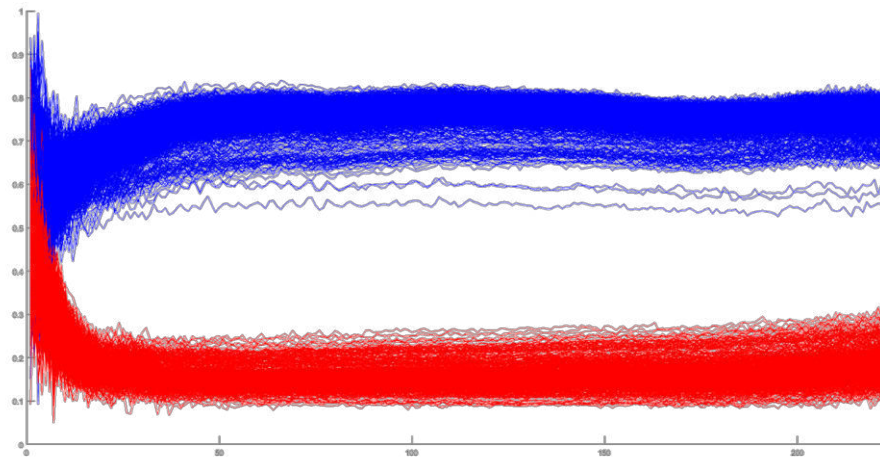
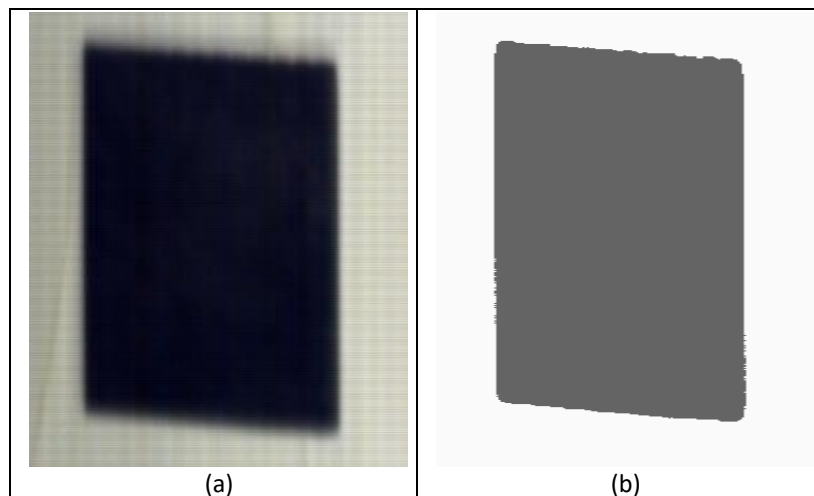


Figura 6. Espectros Vis-NIR del transportador (azul) y de las muestras de acero inoxidable (rojo).

A partir de esos espectros, se generó un modelo de clasificación que se utilizó obtener las imágenes químicas asociadas a cada muestra.



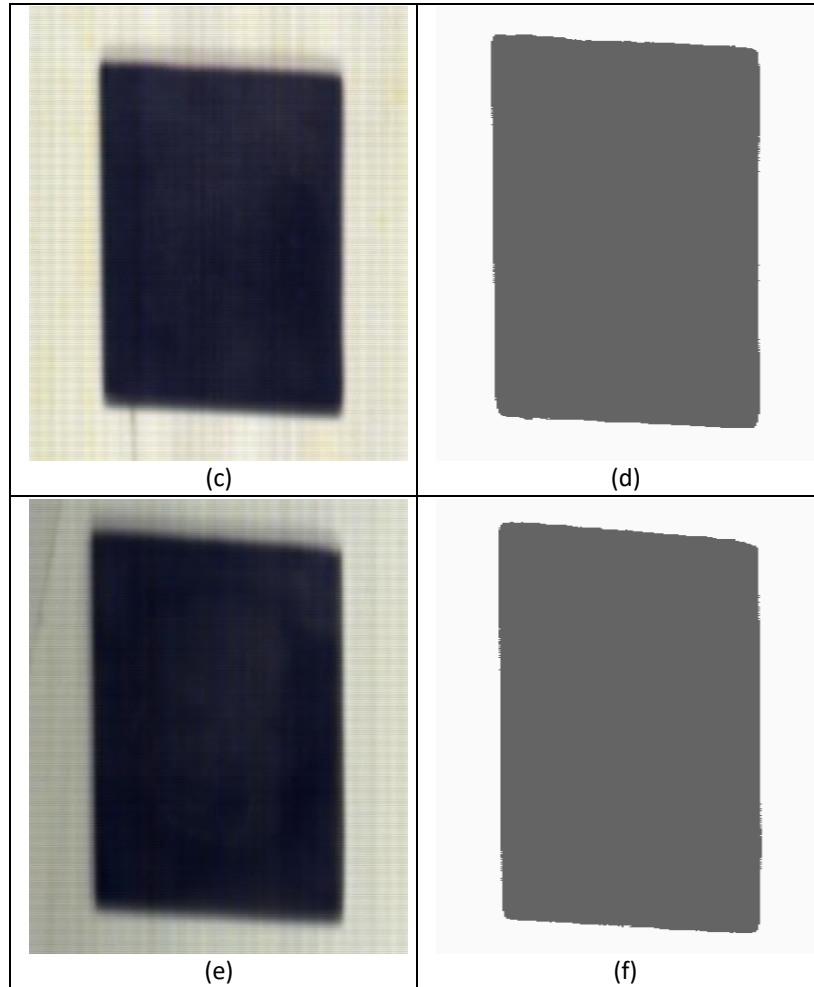


Figura 7. Ejemplos de imágenes “reales” y químicas Vis-NIR de muestras de acero inoxidable: (a, b) control, (c, d) inoculadas con *Escherichia coli* y (e, f) inoculadas con *Staphylococcus aureus*.

Las imágenes químicas resultantes de aplicar los modelos de clasificación se emplearon como máscaras para segmentar automáticamente las muestras de los materiales del transportador en las secuencias capturadas con la cámara. Así, pudo calcularse el espectro promedio en la banda Vis-NIR de las distintas muestras de acero inoxidable (usadas como controles e inoculadas con varias concentraciones de los microorganismos)

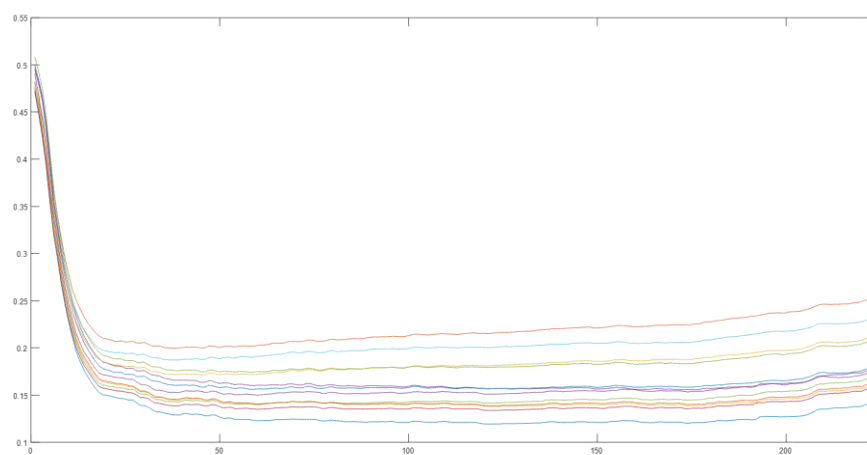


Figura 8. Espectros Vis-NIR promedio de las muestras de acero inoxidable.

Los espectros promedio se utilizaron para tratar de predecir los niveles inoculados en las muestras mediante una regresión de mínimos cuadrados parciales- PLS. Para ello, se aplicaron diversas técnicas de procesamiento de los datos espectrales. Finalmente, se escogió el modelo de predicción que ofreció los mejores valores del coeficiente de regresión y de (la raíz cuadrada del) error cuadrático medio. En la Figura 9, se representan los niveles estimados por el mejor modelo frente a los inoculados en el laboratorio.

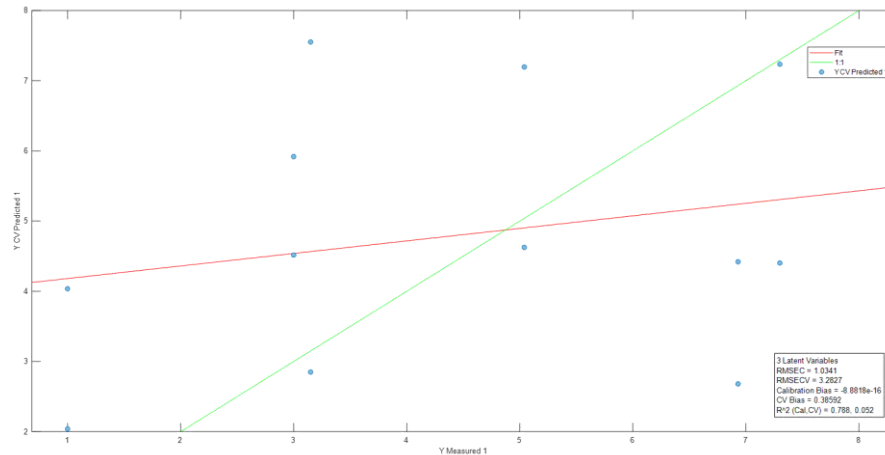


Figura 9. Modelo de regresión Vis-NIR de los niveles de contaminación de las muestras de acero inoxidable.

En segundo lugar, se procesaron las imágenes adquiridas con la cámara SWIR. Se extrajeron espectros representativos del transportador y de las muestras de acero inoxidable de los hipercubos.

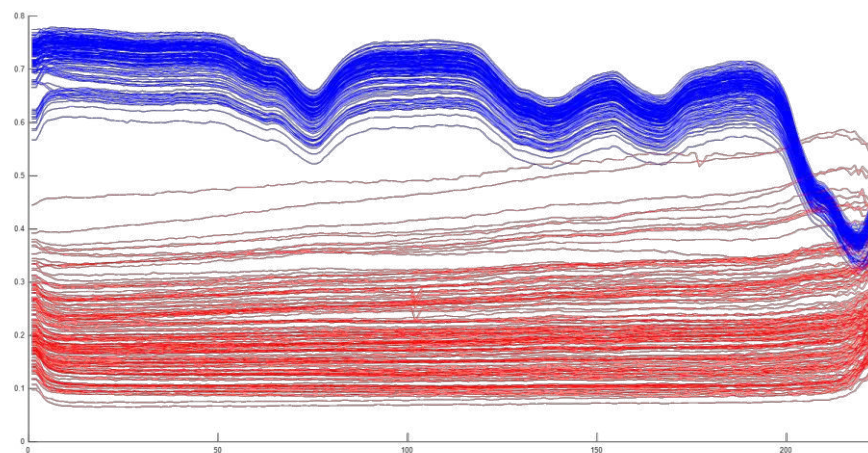


Figura 10. Espectros SWIR del transportador (azul) y de las muestras de acero inoxidable (rojo).

A partir de esos espectros, se generó un modelo de clasificación que se utilizó obtener las imágenes químicas asociadas a cada muestra.

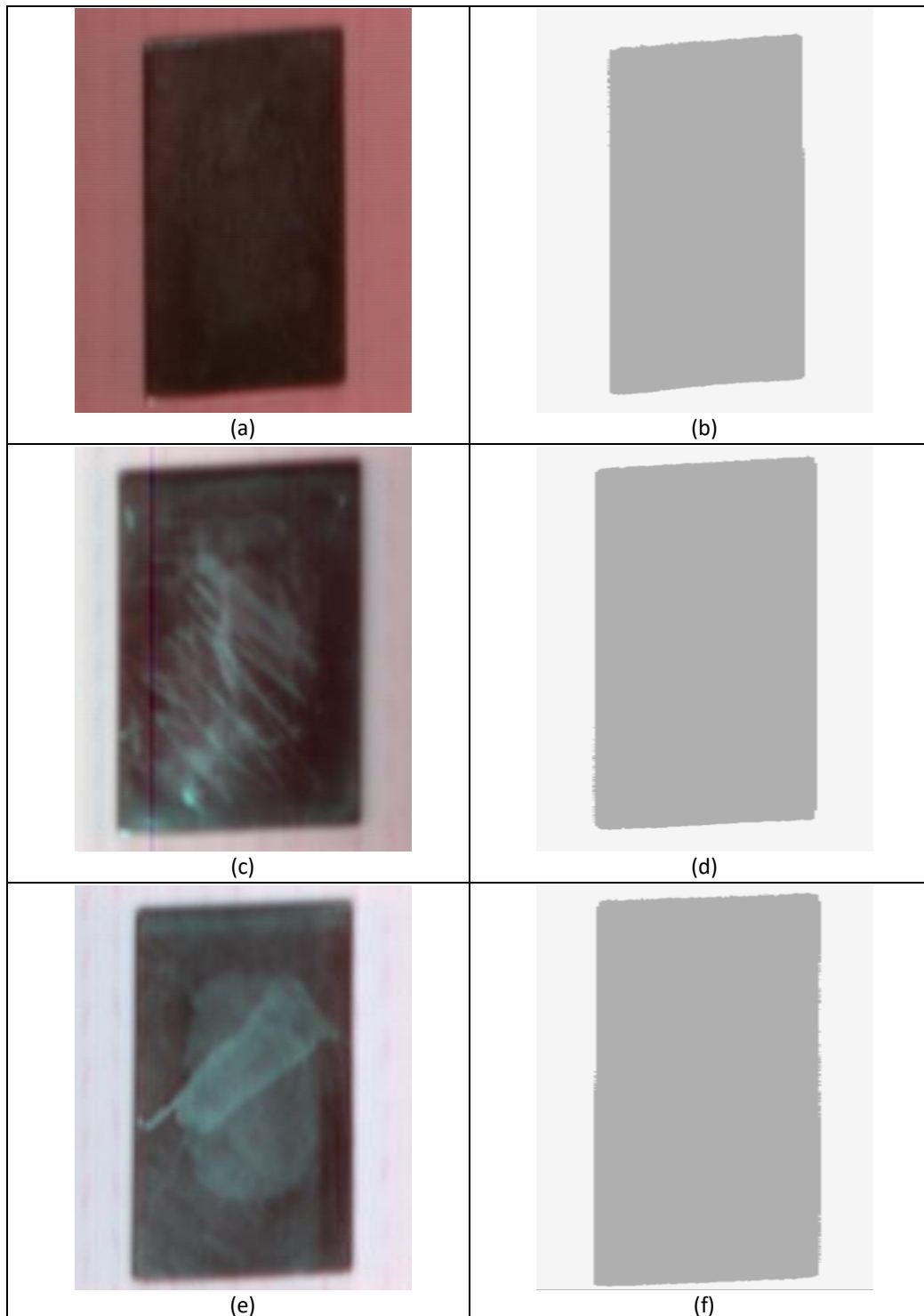


Figura 11. Ejemplos de imágenes “reales” y químicas SWIR de muestras de acero inoxidable: (a, b) control, (c, d) inoculadas con *Escherichia coli* y (e, f) inoculadas con *Staphylococcus aureus*.

Las imágenes químicas resultantes de aplicar los modelos de clasificación se emplearon como máscaras para segmentar automáticamente las muestras de los materiales del transportador en las secuencias capturadas con la cámara. De este modo, pudo calcularse el espectro promedio en la banda SWIR de las distintas muestras de acero inoxidable (de las muestras usadas como controles y de las inoculadas con varias concentraciones de *E. coli* y *S. aureus*)

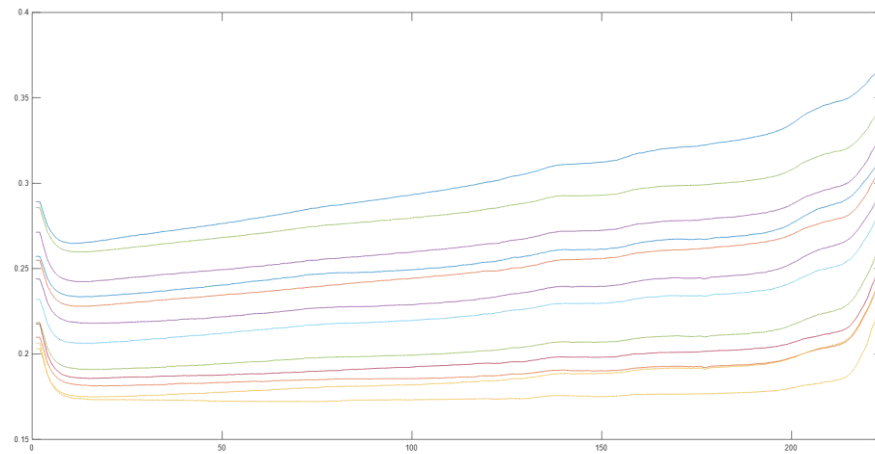


Figura 12. Espectros SWIR promedio de las muestras de acero inoxidable.

Los espectros promedio se utilizaron para tratar de predecir los niveles inoculados en las muestras mediante una regresión de mínimos cuadrados parciales. Para ello, se aplicaron diversas técnicas de procesamiento de los datos espectrales. Finalmente, se escogió el modelo de predicción que ofreció los mejores valores del coeficiente de determinación y de (la raíz cuadrada del) error cuadrático medio. En la Figura 13, se representan los niveles estimados por el mejor modelo frente a los inoculados en el laboratorio.

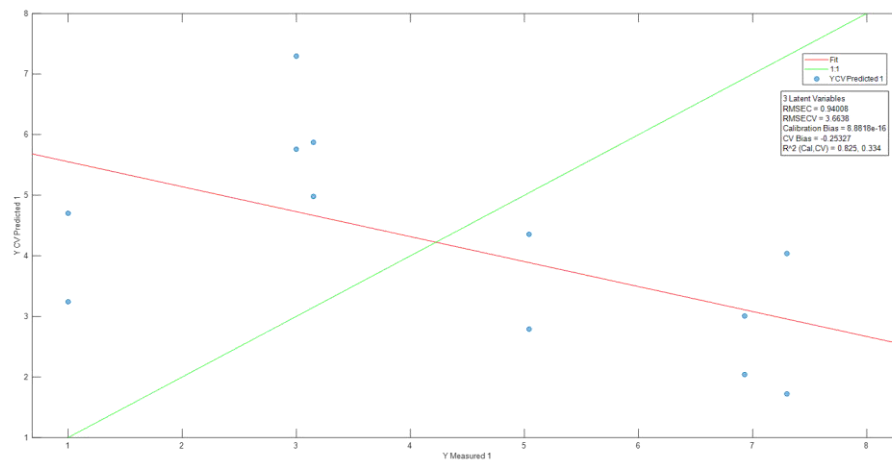


Figura 13. Modelo de regresión SWIR de los niveles de contaminación de las muestras de acero inoxidable.

Análisis de las muestras de cerámica

En primer lugar, se procesaron las imágenes adquiridas con la cámara Vis-NIR. Se extrajeron espectros representativos del transportador y de las muestras de cerámica de los hipercubos.

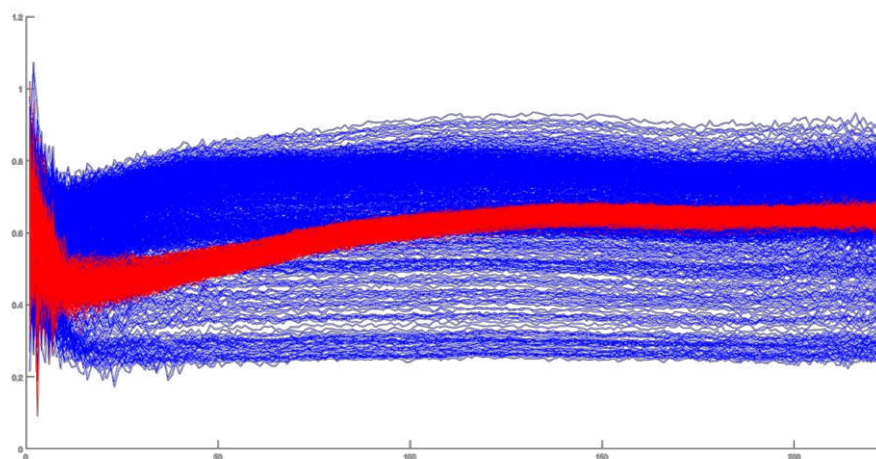
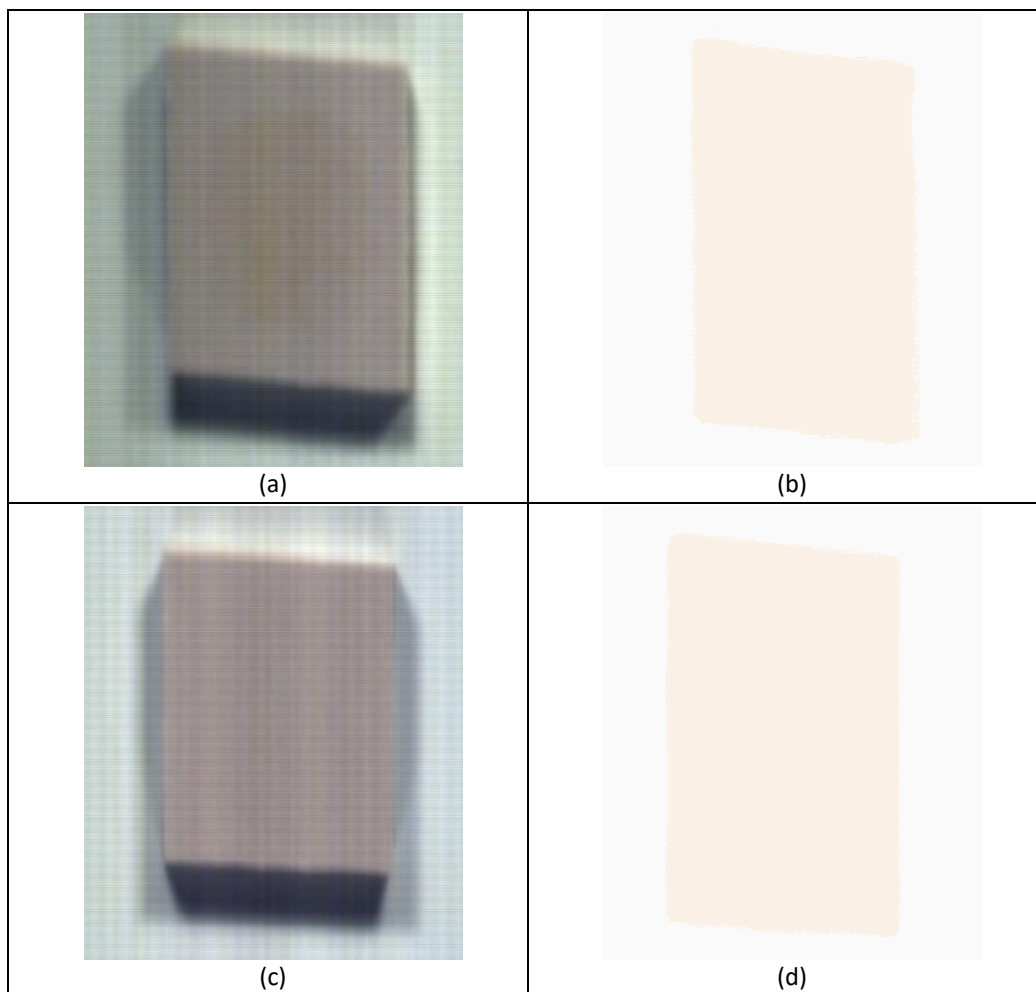


Figura 14. Espectros Vis-NIR del transportador (azul) y de las muestras de cerámica (rojo).

A partir de esos espectros, se generó un modelo de clasificación que se utilizó obtener las imágenes químicas asociadas a cada muestra.



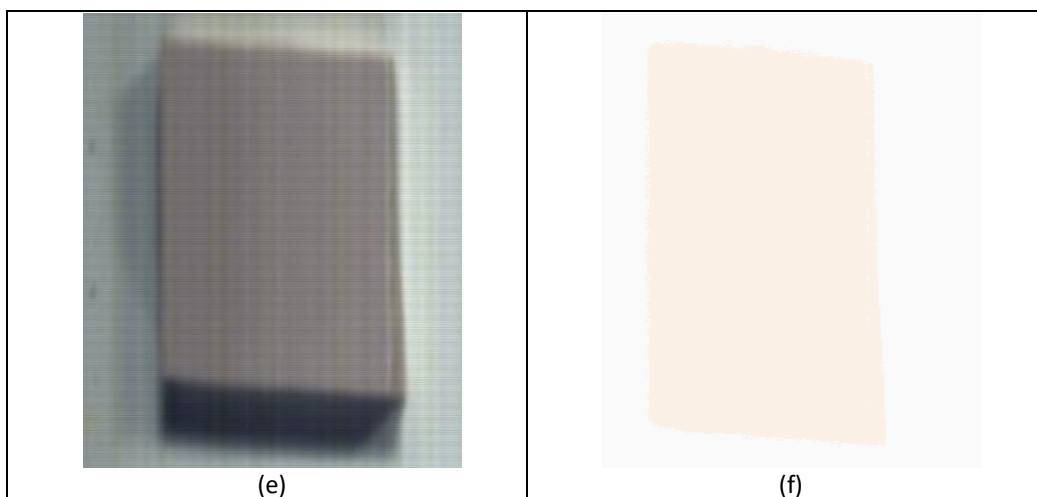


Figura 15. Ejemplos de imágenes “reales” y químicas Vis-NIR de muestras de cerámica: (a, b) control, (c, d) inoculadas con *Escherichia coli* y (e, f) inoculadas con *Staphylococcus aureus*.

Las imágenes químicas resultantes de aplicar los modelos de clasificación se emplearon como máscaras para segmentar las muestras de los materiales del transportador en las secuencias capturadas con la cámara. Así, pudo calcularse el espectro promedio en la banda Vis-NIR de las distintas muestras de cerámica (de las muestras usadas como controles y de las inoculadas con varias concentraciones de *E. coli* y *S. aureus*)

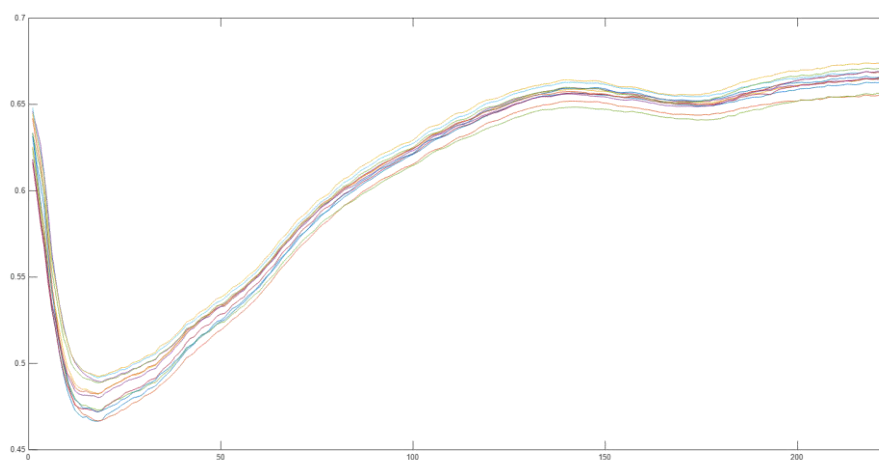


Figura 16. Espectros Vis-NIR promedio de las muestras de cerámica.

Los espectros promedio se utilizaron para tratar de predecir los niveles inoculados en las muestras mediante una regresión PLS. En la Figura 17, se representan los niveles estimados por el mejor modelo frente a los inoculados en el laboratorio.

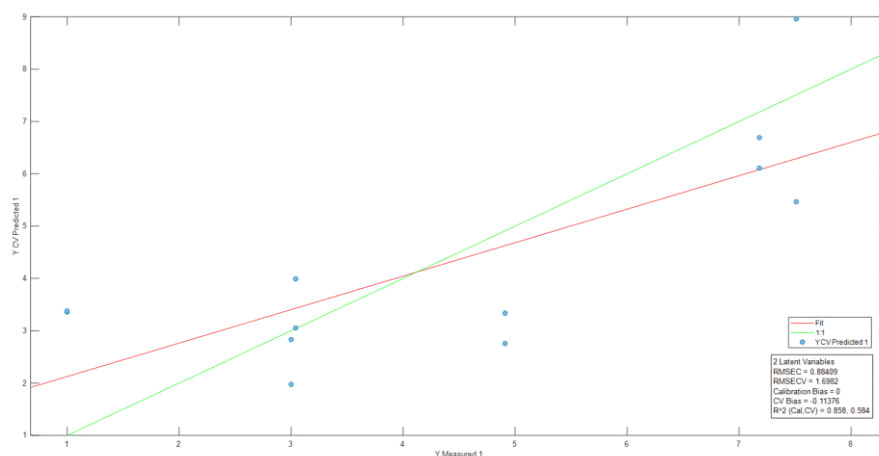


Figura 17. Modelo de regresión Vis-NIR de los niveles de contaminación de las muestras de cerámica.

En segundo lugar, se procesaron las imágenes adquiridas con la cámara SWIR. Se extrajeron espectros representativos del transportador y de las muestras de cerámica de los hipercubos.

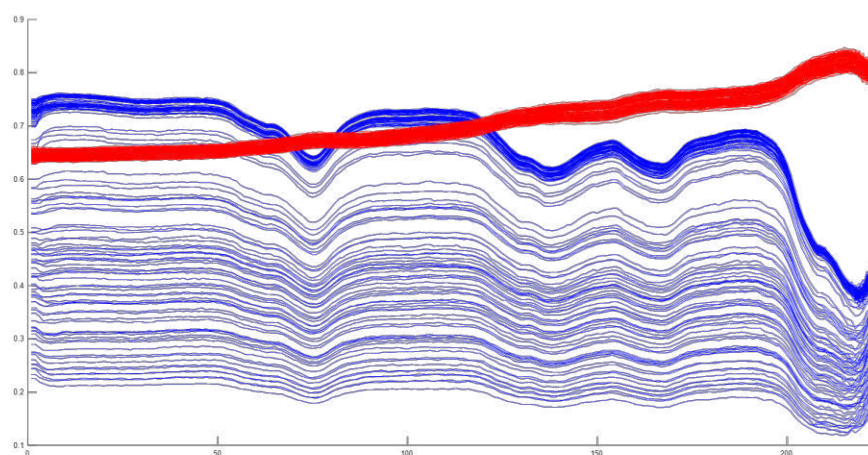


Figura 18. Espectros SWIR del transportador (azul) y de las muestras de cerámica (rojo).

A partir de esos espectros, se generó un modelo de clasificación que se utilizó obtener las imágenes químicas asociadas a cada muestra.

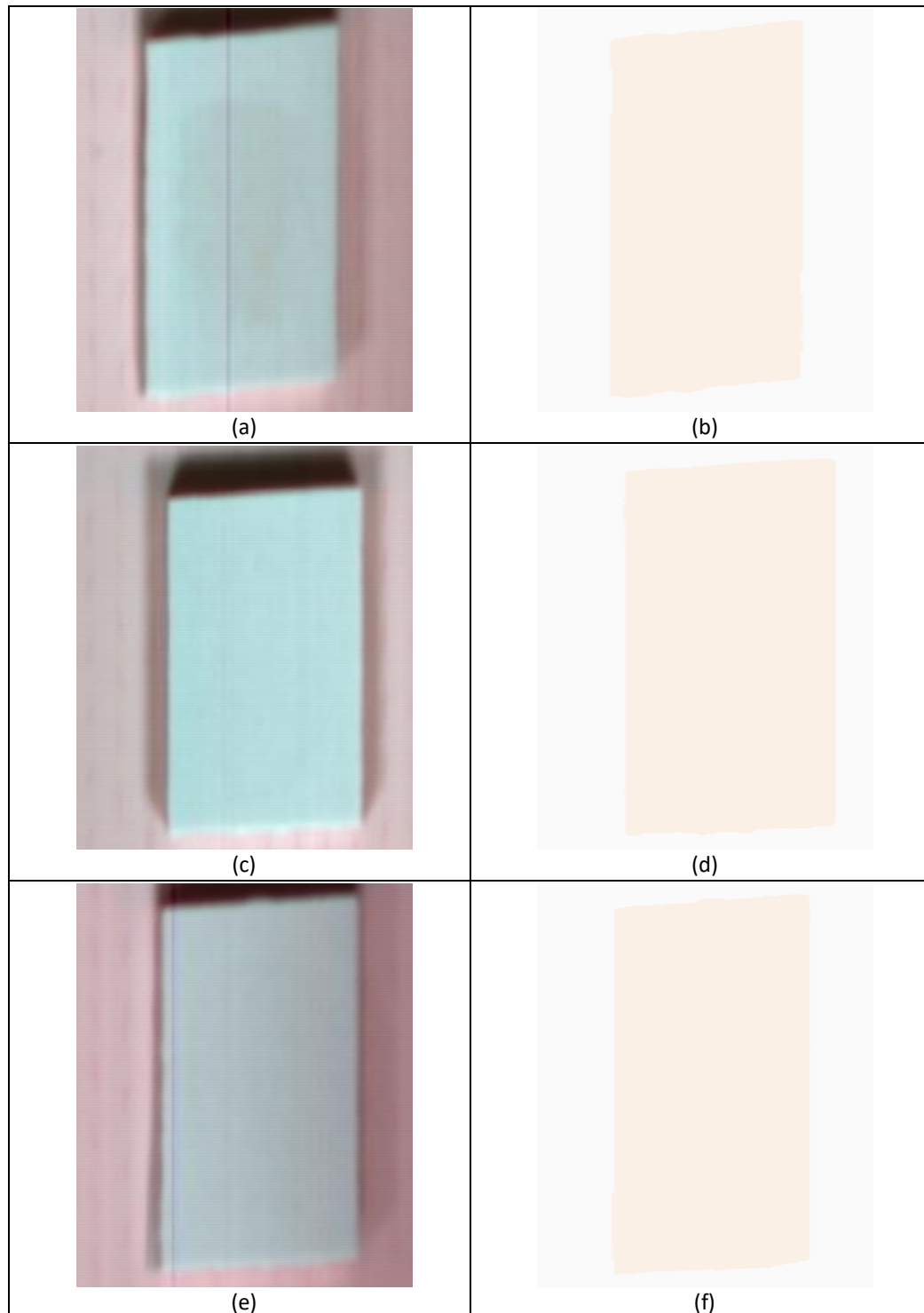


Figura 19. Ejemplos de imágenes “reales” y químicas SWIR de muestras de cerámica: (a, b) control, (c, d) inoculadas con *Escherichia coli* y (e, f) inoculadas con *Staphylococcus aureus*.

Las imágenes químicas resultantes de aplicar los modelos de clasificación se emplearon como máscaras para segmentar las muestras de los materiales en las secuencias capturadas con la cámara. De este modo, pudo calcularse el espectro promedio en la banda SWIR de las distintas muestras de cerámica (de las muestras usadas como controles y de las inoculadas con varias concentraciones de *E. coli* y *S. aureus*)

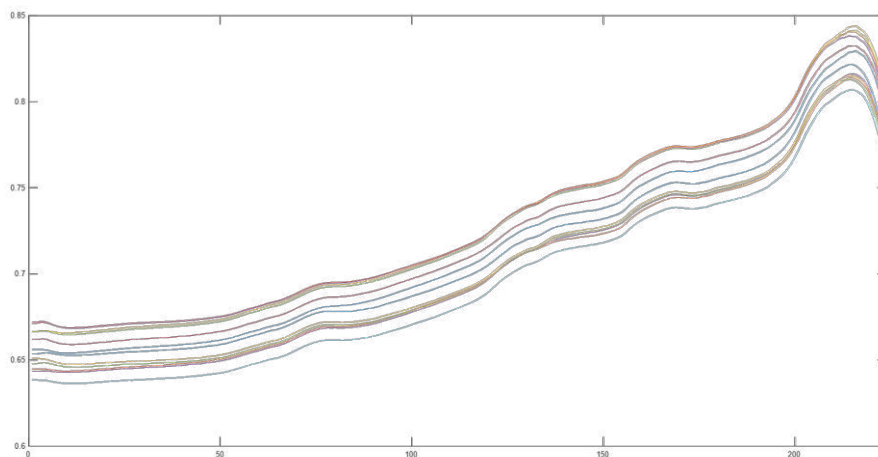


Figura 20. Espectros SWIR promedio de las muestras de cerámica.

Los espectros promedio se utilizaron para tratar de predecir los niveles inoculados en las muestras mediante una regresión PLS. En la Figura 21, se representan los niveles estimados por el mejor modelo frente a los inoculados en el laboratorio.

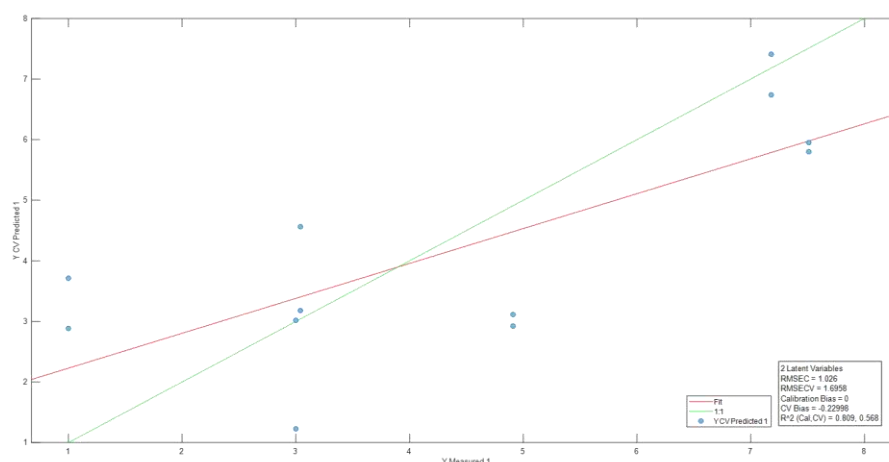


Figura 21. Modelo de regresión SWIR de los niveles de contaminación de las muestras de cerámica.

Análisis de las muestras de vidrio

En primer lugar, se procesaron las imágenes adquiridas con la cámara Vis-NIR. Se extrajeron espectros representativos del transportador y de las muestras de vidrio de los hipercubos.

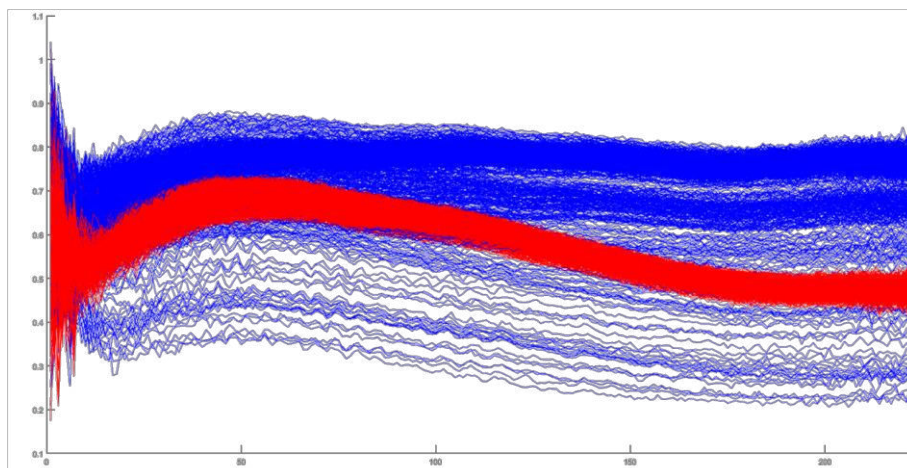
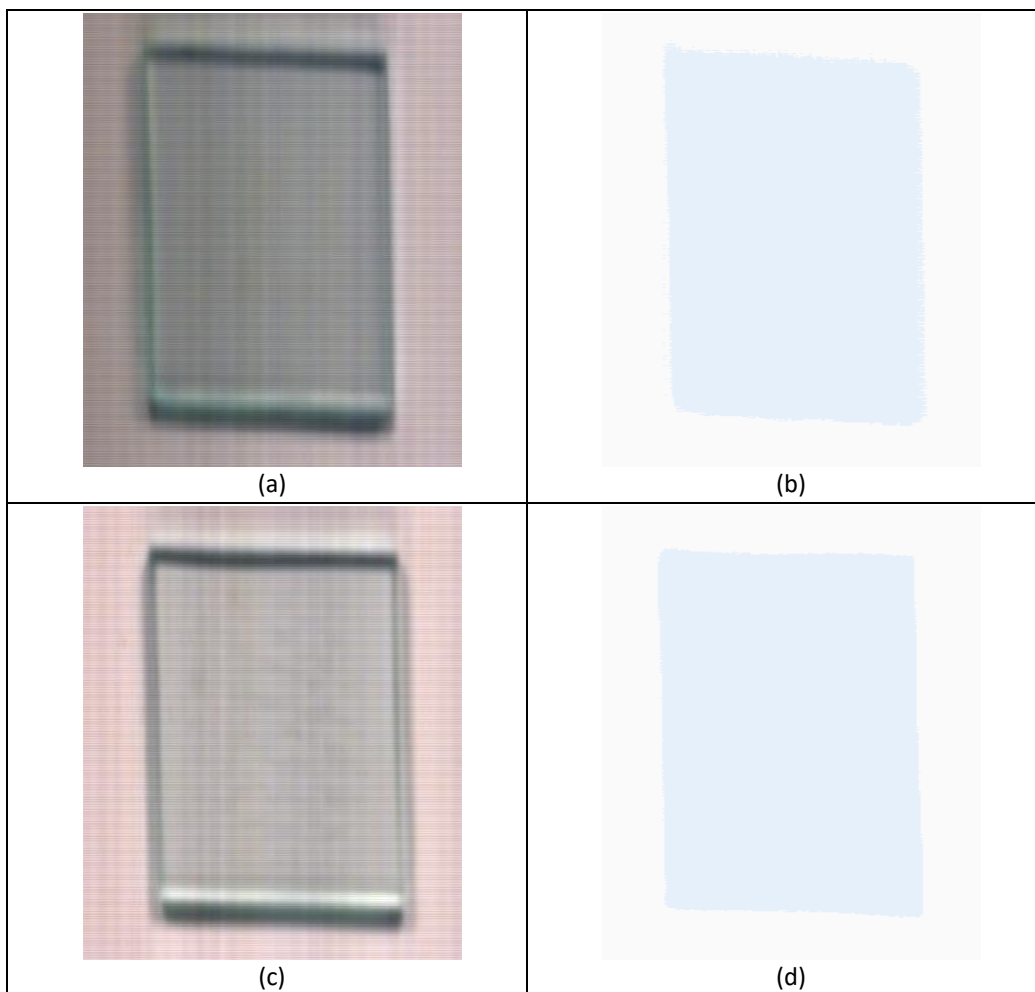


Figura 22. Espectros Vis-NIR del transportador (azul) y de las muestras de vidrio (rojo).

A partir de esos espectros, se generó un modelo de clasificación que se utilizó obtener las imágenes químicas asociadas a cada muestra.



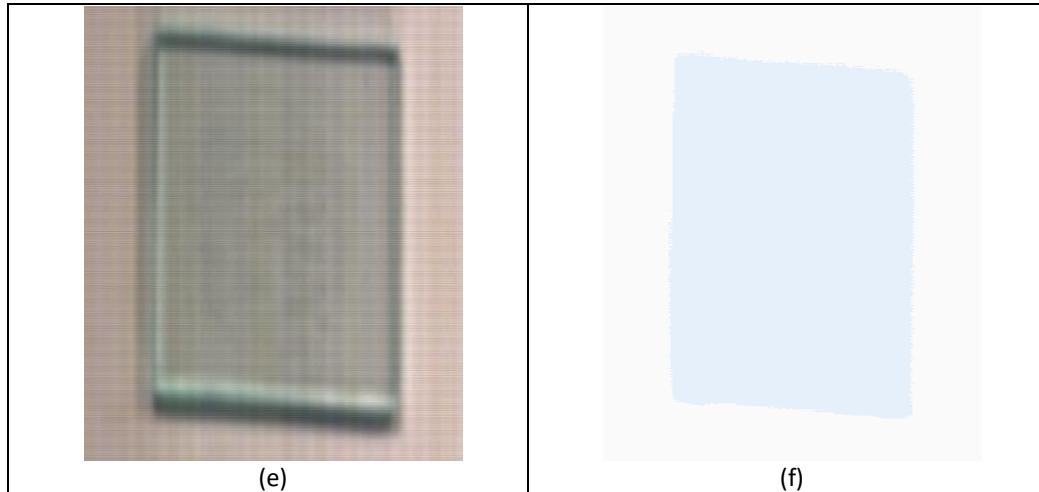


Figura 23. Ejemplos de imágenes “reales” y químicas Vis-NIR de muestras de vidrio: (a, b) control, (c, d) inoculadas con *Escherichia coli* y (e, f) inoculadas con *Staphylococcus aureus*.

Las imágenes químicas resultantes de aplicar los modelos de clasificación se emplearon como máscaras para segmentar las muestras de los materiales del transportador en las secuencias capturadas con la cámara. Así, pudo calcularse el espectro promedio en la banda Vis-NIR de las distintas muestras de vidrio (de las muestras usadas como controles y de las inoculadas con varias concentraciones de *E. coli* y *S. aureus*)

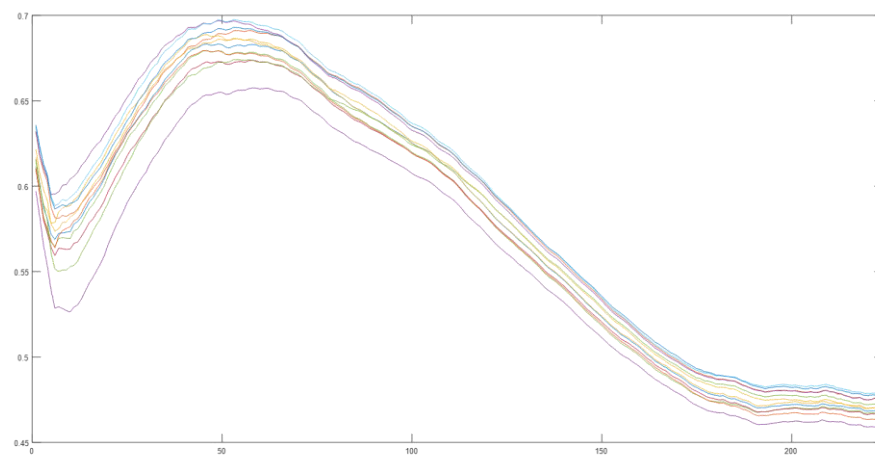


Figura 24. Espectros Vis-NIR promedio de las muestras de vidrio.

Los espectros promedio se utilizaron para tratar de predecir los niveles inoculados en las muestras mediante una regresión PLS. En la Figura 25, se representan los niveles estimados por el mejor modelo frente a los inoculados en el laboratorio.

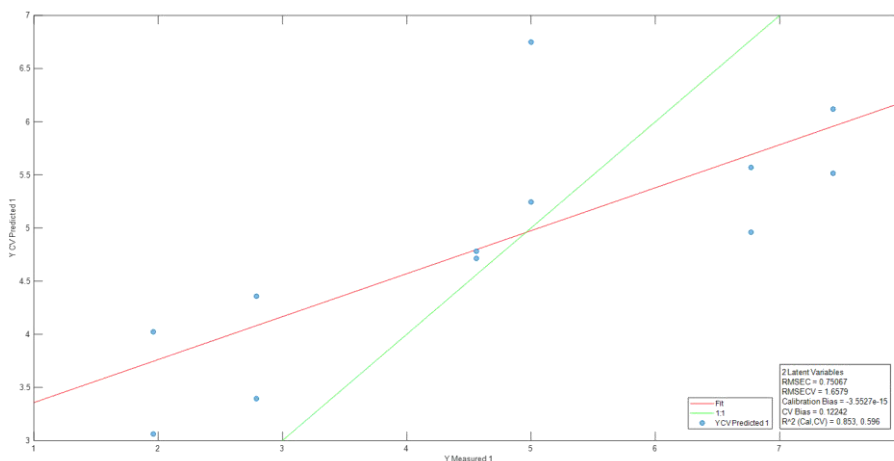


Figura 25. Modelo de regresión Vis-NIR de los niveles de contaminación de las muestras de vidrio.

En segundo lugar, se procesaron las imágenes adquiridas con la cámara SWIR. Se extrajeron espectros representativos del transportador y de las muestras de vidrio de los hipercubos.

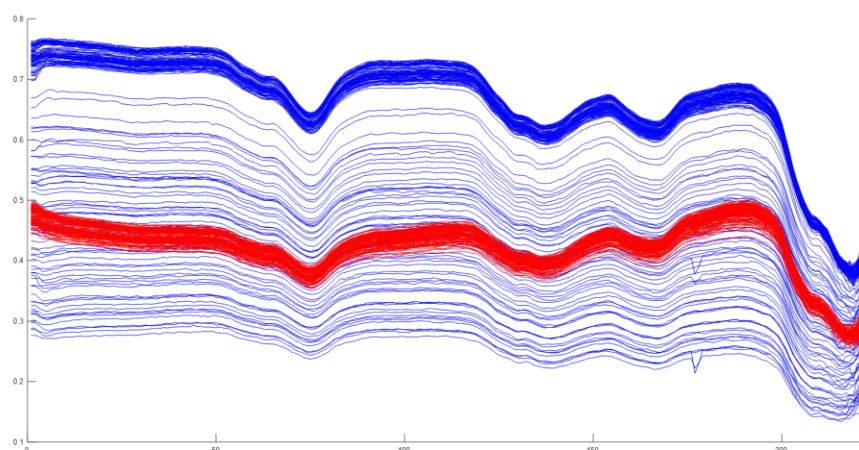


Figura 26. Espectros SWIR del transportador (azul) y de las muestras de vidrio (rojo).

A partir de esos espectros, se generó un modelo de clasificación que se utilizó obtener las imágenes químicas asociadas a cada muestra.

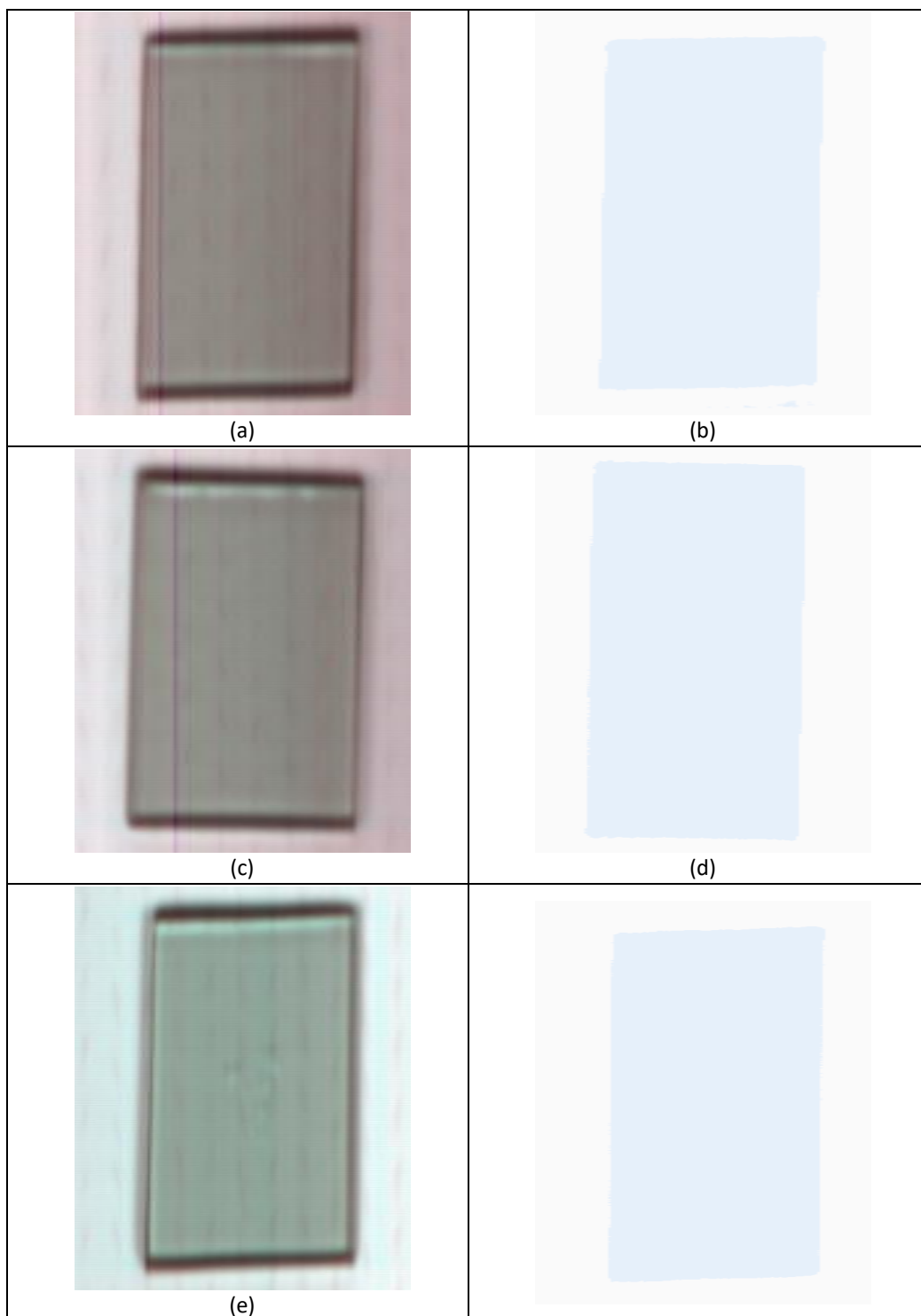


Figura 27. Ejemplos de imágenes “reales” y químicas SWIR de muestras de vidrio: (a, b) control, (c, d) inoculadas con *Escherichia coli* y (e, f) inoculadas con *Staphylococcus aureus*.

Las imágenes químicas resultantes de aplicar los modelos de clasificación se emplearon como máscaras para segmentar las muestras de los materiales en las secuencias capturadas con la cámara. De este modo, pudo calcularse el espectro promedio en la banda SWIR de las distintas muestras de vidrio (de las muestras usadas como controles y de las inoculadas con varias concentraciones de *E. coli* y *S. aureus*)

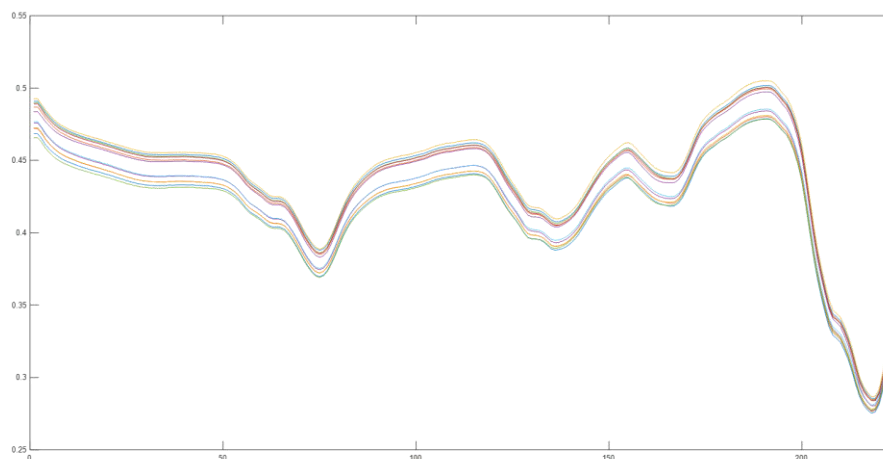


Figura 28. Espectros SWIR promedio de las muestras de vidrio.

Los espectros promedio se utilizaron para tratar de predecir los niveles inoculados en las muestras mediante una regresión PLS. En la Figura 29, se representan los niveles estimados por el mejor modelo frente a los inoculados en el laboratorio.

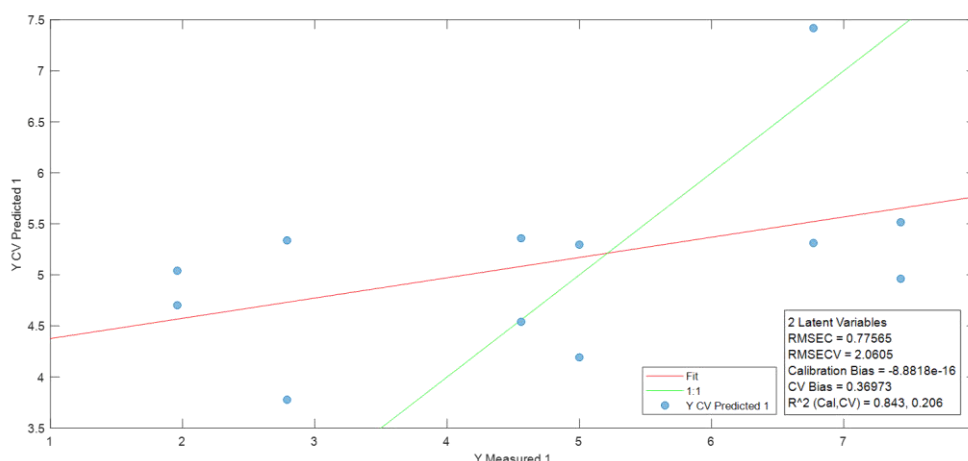


Figura 29. Modelo de regresión SWIR de los niveles de contaminación de las muestras de vidrio.

Evaluación de la visión hiperespectral para el control microbiológico de superficies

En la Tabla 3, se recogen los valores de los coeficientes de determinación y de (las raíces cuadradas de) los errores cuadráticos medios de los dos modelos (Vis-NIR y SWIR) de estimación de los niveles de contaminación microbiológica en las muestras de calibración de los tres materiales estudiados (acero inoxidable, cerámica y vidrio) En la Figura 30, se representan los niveles estimados por los modelos frente a los analizados en el laboratorio.

Tabla 3. Valores de R^2 y RMSE de los modelos desarrollados con las muestras de calibración de los tres materiales.

	Vis-NIR		SWIR	
	R^2 Cal	RMSEC	R^2 Cal	RMSEC
Acero inoxidable	0,788	1,034	0,825	0,940
Cerámica	0,858	0,884	0,809	1,026
Vidrio	0,853	0,751	0,843	0,776

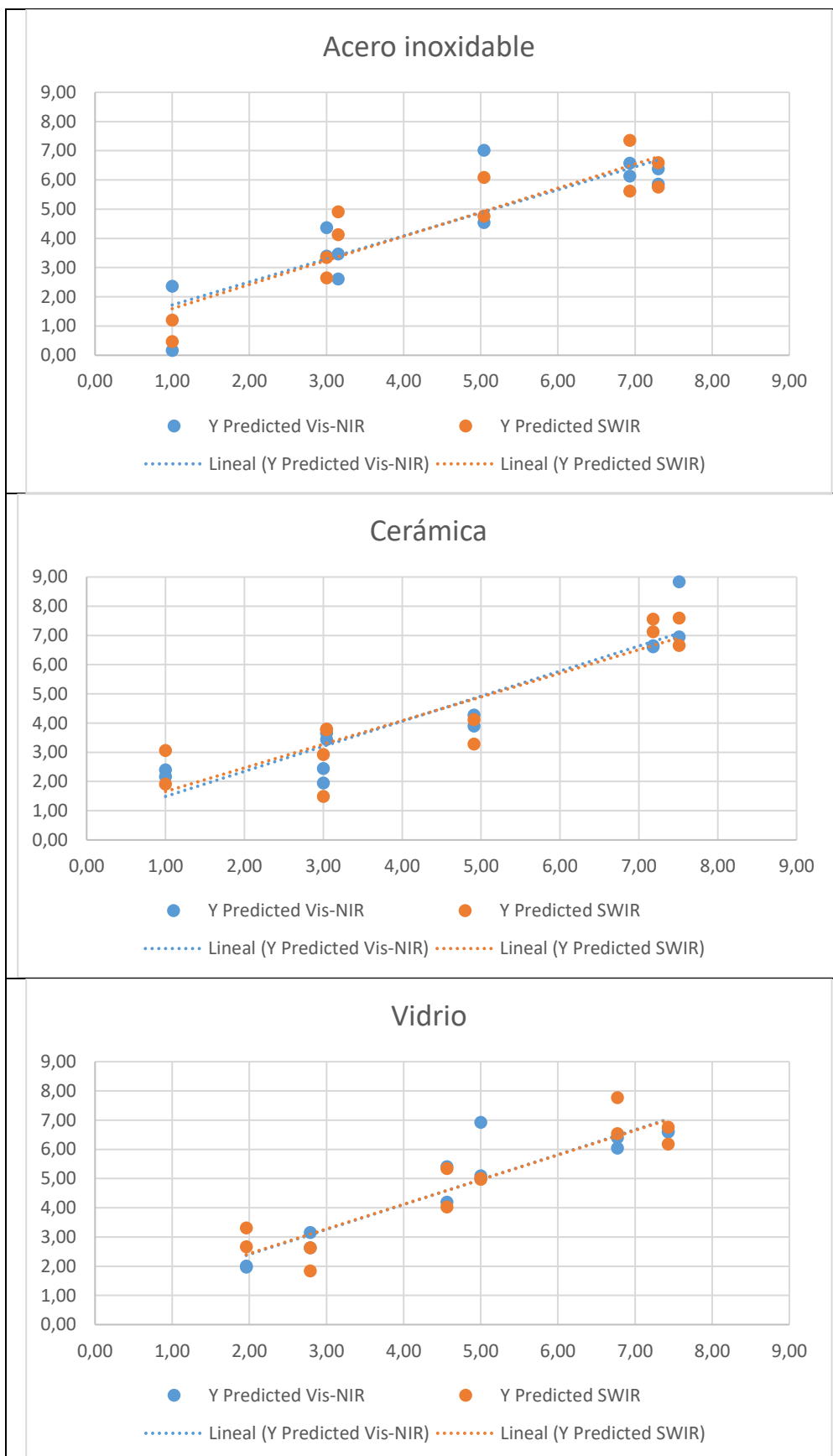


Figura 30. Valores estimados por los modelos de regresión frente a los analizados en el laboratorio para las muestras de calibración de los tres materiales.



6. Conclusiones.

- Se ha realizado la selección de microorganismos y superficies representativos de la contaminación en la industria alimentaria.
- Se ha diseñado un protocolo de inoculación homogénea de los materiales de trabajo a distintos niveles bacterianos que simula la contaminación microbiana que puede producirse en las superficies en contacto con alimentos en la industria.
- Los microorganismos de referencia (*E.coli* y *S.aureus*) utilizados en los ensayos han mostrado un comportamiento similar en los tres materiales utilizados, si bien *E.coli* muestra niveles de desecación superiores a *S.aureus*, sobre todo en los materiales de acero inoxidable y vidrio. Es necesaria la calibración y la estandarización de los inóculos de trabajo que aseguren una contaminación homogénea sobre estas superficies de trabajo.
- Se ha construido un montaje de experimentación con la tecnología de visión hiperespectral que incorpora dos cámaras- en las bandas Vis-NIR y SWIR del espectro electromagnético- y un sistema doble de iluminación halógena en configuración de reflectancia sobre un transportador.
- Se han medidos las muestras de los tres materiales en dinámico en el transportador.
- Se han analizado los datos hiperespectrales en dos fases:
 - Se han generado los modelos de clasificación para segmentar automáticamente las muestras de los materiales del transportador.
 - Se han generado los modelos de regresión para estimar los niveles de microorganismos en las muestras de los materiales.
- Se han obtenido resultados similares en las dos bandas espectrales para los tres tipos de materiales, con valores de (la raíz cuadrada de) el error cuadrático medio de calibración en torno a 1 ufc/superficie (en unidades logarítmicas)
- Se va a mantener la configuración actual del montaje de visión hiperespectral en las primeras fases de la experimentación con las muestras de productos cárnicos para disponer de más datos antes de su optimización.