

DETECCIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Escherichia Coli* CON TERMOGRAFÍA INFRARROJA

DETECTION OF *Escherichia Coli* GROWTH USING INFRARED THERMOGRAPHY

Guadalupe Hernández-Eugenio, Eliubi Echeverría -Landín y Federico Hahn Schlam

Departamento de Irrigación. Universidad Autónoma Chapingo, 56230. Chapingo, Estado de México. (guhe@correo.chapingo.mx)

RESUMEN

La determinación de contaminación microbiológica debe ser rápida y se debiera medir *in-situ*. En el presente trabajo se desarrolló una metodología rápida y portátil para la detección de *Escherichia coli*, basada en el análisis de imágenes térmicas de infrarrojo. Cultivos de *E. coli* en medio clásico agar LEVINE fueron fotografiados en imágenes térmicas, obtenidas mediante una cámara infrarroja (IR). Dos prototipos fueron acoplados a la cámara IR con la finalidad de mantener una temperatura constante (37 °C) de las muestras. El primero de ellos radiaba calor en la base de las muestras mientras el segundo calentaba la muestra radialmente. La cinética de crecimiento fue seguida con imágenes térmicas, encontrando que el tiempo mínimo de detección de contaminación microbiana fue a las 5 h de crecimiento. El dispositivo más adecuado fue el que suministró calor en la base de las muestras. Así mismo se obtuvieron modelos de predicción para establecer la presencia bacteriana con eficiencia de predicción de 100%

Palabras clave: *Escherichia coli*, cámara infrarroja, emisividad, radiómetro.

INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiológica es importante durante el procesamiento y conservación de alimentos y agua. Microorganismos patógenos son rutinariamente identificados usando marcadores bioquímicos e inmunológicos (Chung *et al.*, 2000; Brabetz *et al.*, 1993) así como por PCR (reacción de polimerización en cadena) (Jothikumar y Griffiths, 2002). Se han desarrollado exitosamente otros métodos usando espectroscopia vibracional (Ellis *et al.*, 2002). Se ha usado microespectroscopia Raman y espectroscopia infrarroja en el mediano y cercano infrarrojo (Javis y Goodacre, 2004), así como el cercano infrarrojo en la identificación de bacterias, hongos y levaduras (Irudayaraj *et al.*, 2001; Hahn, 2002). Sin embargo, en muchos casos se requiere prolongados

ABSTRACT

The determination of microbiological contamination should be rapid and should be measured *in situ*. In the present work, a rapid and portable methodology was developed for the detection of *Escherichia coli*, based on the analysis of infrared thermal images. Cultures of *E. coli* in classic agar LEVINE medium were photographed in thermal images, obtained by means of an infrared camera (IR). Two prototypes were coupled to the IR camera for the purpose of maintaining a constant temperature (37 °C) of the samples. The first of these radiated heat at the base of the samples, while the second heated the sample radially. The growth kinetic was followed by thermal images, resulting that the minimum detection time of microbial contamination was at 5 h of growth. The most adequate device was the one that provided heat at the base of the samples. In addition, prediction models were obtained for establishing bacterial presence with a prediction efficiency of 100%.

Key words: *Escherichia coli*, infrared camera, emissivity, radiometer.

INTRODUCTION

Microbiological contamination is important during the processing and conservation of food and water. Pathogenic microorganisms are routinely identified using biochemical and immunological markers (Chung *et al.*, 2000; Brabetz *et al.*, 1993) as well as by PCR (polymerization chain reaction) (Jothikumar and Griffiths, 2002). Other methods have been successfully developed using vibrational spectroscopy (Ellis *et al.*, 2002). Raman microspectroscopy and infrared spectroscopy have been used in the middle and near infrared (Javis and Goodacre, 2004), as well as the near infrared in the identification of bacteria, fungi and yeasts (Irudayaraj *et al.*, 2001; Hahn, 2002). However, in many cases, prolonged time and analysis of the samples in specific laboratories are required. The infrared technique, in addition to its use in these applications, can be used as thermal infrared. It is a very efficient technique for detecting temperature with high precision on surfaces (Badenas and Caselles, 1992).

Recibido: Enero, 2007. Aprobado: Junio, 2007.

Publicado como ENSAYO en *Agrociencia* 41: 503-511. 2007.

tiempos y análisis de las muestras en laboratorios específicos. La técnica de infrarrojo, además de usarse en estas aplicaciones, se puede utilizar como infrarrojo termal. Es una técnica muy eficiente para detectar temperatura con alta precisión en superficies (Badenas y Caselles, 1992).

La técnica de infrarrojo termal se ha usado poco para estudiar la presencia de bacterias, aunque Wisniewski *et al.* (1997) reportan que es muy efectiva para detectar la presencia de *Pseudomonas syringae* durante la nucleación en el congelamiento de plantas. Una alternativa portátil, simple y de fácil manejo para la identificación de microorganismos es el uso de imágenes térmicas. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar una metodología no destructiva para identificar la presencia de *Escherichia coli* usando imágenes térmicas, identificar la presencia microbiana y desarrollar modelos de predicción que permitan establecer patrones de crecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de *Escherichia coli* en placa

El procedimiento para el aislamiento fue el establecido por la AWWA (1988). Se utilizó como inóculo inicial 1 mL de muestra de agua residual urbana sin tratar. El inóculo inicial fue diluido 1:10 en agua de dilución con KH_2PO_4 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a concentraciones de 0.425 g L^{-1} y 0.25 g L^{-1} . Esta solución se preparó a partir de dos soluciones madre 34 g L^{-1} de KH_2PO_4 y 50 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. El inóculo diluido en tubo de cultivo (1:10) fue consecutivamente rediluido en cascada hasta obtener una dilución de 10^{-10} .

Cada dilución se sembró a 10% en medio líquido constituido de caldo lactosado estéril (Merck KGaA) en una concentración de 13 g L^{-1} por quintuplicado, en tubos de fermentación con tubos Durham invertidos. Todos los tubos de las diluciones seleccionadas se incubaron a 35°C durante $24 \pm 2 \text{ h}$ y se observó la presencia o ausencia de gas dentro de los tubos Durham. Se consideró la prueba positiva cuando había crecimiento microbiano y producción de gas; los negativos se incubaron 24 h más.

Las muestras positivas en medio lactosado se inocularon con una asa de siembra en tubos de fermentación con $10 \pm 0.1 \text{ mL}$ de medio EC estéril. El medio EC (Merck KGaA) se preparó a una concentración de 37 g L^{-1} y se incubó por 24 h a 45°C . La última dilución que presentó crecimiento microbiano y producción de gas en medio EC se usó para el aislamiento. Se tomó con una asa una muestra del cultivo enriquecido para inocular en medio sólido estéril por estrías en la superficie. El medio sólido usado fue agar LEVINE emb (Merck KGaA) a una concentración de 36 g L^{-1} . Las cajas Petri se invirtieron y se incubaron a 35°C por 24 h observándose la aparición y tipo de unidades formadoras de colonias, repitiendo este procedimiento tres veces, en promedio, hasta obtener un cultivo puro homogéneo de colonias rojas con brillo metálico.

The infrared thermography technique has seldom been used to study the presence of bacteria, although Wisniewski *et al.* (1997) report that it is very effective for detecting the presence of *Pseudomonas syringae* during nucleation in the freezing of plants. A simple, portable alternative of easy handling for the identification of microorganisms, is the use of thermal images. Therefore, the objective of the present study was to develop a non-destructive methodology for identifying the presence of *Escherichia coli* using thermal images, to identify microbial presence and to develop prediction models that permit the establishment of growth patterns.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and identification of *Escherichia coli* in Petri dish

The isolation procedure was that established by the AWWA (1988). As initial inoculum, 1 mL was used of untreated urban waste water sample. The initial inoculum was diluted 1:10 in dilution water with KH_2PO_4 and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in concentrations of 0.425 g L^{-1} and 0.25 g L^{-1} . This solution was prepared from two mother solutions: 34 g L^{-1} of KH_2PO_4 and 50 g L^{-1} of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The inoculum diluted in a culture tube (1:10) was consecutively re-diluted until a dilution of 10^{-10} was obtained.

Each dilution was sown at 10% in liquid medium constituted of sterile lactosed broth (Merck KGaA) in a concentration of 13 g L^{-1} in quintuplicate, in fermentation tubes with inverted Durham tubes. All of the tubes of the selected dilutions were incubated at 35°C during $24 \pm 2 \text{ h}$ and the presence or absence of gas was observed in the Durham tubes. The test was considered positive when there was microbial growth and gas production; the negatives were incubated for an additional 24 h.

The positive samples in lactosed medium were inoculated with a pipet in fermentation tubes with $10 \pm 0.1 \text{ mL}$ in sterile EC broth. The EC broth (Merck KGaA) was prepared to a concentration of 37 g L^{-1} and was incubated for 24 h at 45°C . The last dilution that presented microbial growth and gas production in EC medium was used for the isolation. A sample of the enriched culture was taken with a pipet for inoculation in sterile solid medium through striations in the surface. The solid medium used was agar LEVINE emb (Merck KGaA) at a concentration of 36 g L^{-1} . The Petri dishes were inverted and incubated at 35°C for 24 h, observing the appearance and type of colony forming units, repeating this procedure an average of three times, until obtaining homogeneous pure culture of reddish colonies with metallic shine.

In order to conserve it, the pure culture was re-sown in liquid EC broth every 8 d, placing it in the incubator at 35°C . After 24 h of incubation, the liquid medium was placed at room temperature. Pure cultures were selected in solid media of *E. coli* to be analyzed with an infrared camera.

Para conservarlo, se resembró el cultivo puro en medio líquido EC cada 8 d colocándose dentro de la incubadora a 35 °C. El medio líquido después de 24 h de incubación, se puso a temperatura ambiente. Se seleccionaron cultivos puros en medios sólidos de *E. coli* para analizarlos con una cámara infrarroja.

Mediciones térmicas

La cámara infrarroja (mod. D500, Raytheon, Inc., EE.UU.) se calibró, fijando la emisividad, temperatura central, escala de temperatura y paleta de color. La pantalla de la computadora en la cámara permitía observar el lugar enfocado. La cámara tiene un arreglo de 320×240 píxeles con un circuito sensor de 15.52×11.64 mm. Su rango espectral está entre 7 y 14 μm . Considerando el tamaño de píxel de 48.5 μm^2 y una distancia focal de 40 cm se aseguró que toda el área dentro de la caja de Petri (30 000 píxeles) estuviera dentro del intervalo de visión (70 000 píxeles) (Figura 1). Cada píxel corresponde a un área de 53.21 μm^2 , y cada uno tendrá un color dependiente de la temperatura. Dado que una bacteria de *E. coli* tiene tamaño promedio de 4 μm , cada píxel puede tomar miles de bacterias que podrían generar la temperatura. Tener más puntos implica un área de píxeles mayor y, por tanto, una mayor infección.

Se elaboraron dos prototipos para instalar la cámara infrarroja (Figura 2), ambos operados a la temperatura óptima de crecimiento de microorganismos mesófilos (37 °C). El prototipo de la Figura 2a se construyó con dos tubos concéntricos (43 cm largo; 3 y 4 pulgadas diámetro): el tubo externo de PVC y el interno galvanizado. El espacio entre los tubos se llenó con espuma de poliuretano para evitar la transferencia de calor y conservar la temperatura de la muestra en la caja Petri al ser fotografiada. En el tubo interno se enrollaron 4.5 m de resistencia de alambre (90 ohm $\pm$ 5%), en forma de hélice, lo cual corresponde a 30 vueltas alrededor del tubo. La resistencia se conectó a un termostato alimentado mediante un transformador de 24 V a 5 A. El tubo construido emitía calor radial y se colocó en un soporte metálico que mantenía fija la cámara infrarroja en la parte superior del tubo. La distancia entre la lente de la cámara y el portamuestra fue 40 cm.

El segundo prototipo (Figura 2b) presentaba radiación de calor en la base de la muestra. Se utilizaron dos tubos de PVC concéntricos con las mismas dimensiones que en el anterior, y el espacio entre los tubos se relleno con espuma de poliuretano. La cámara infrarroja se fijó a un soporte metálico en la parte superior de los tubos. Una placa de calentamiento controlada a 37 ± 0.2 °C en el extremo inferior de los tubos proveía el calor para las muestras. Para reducir interferencias térmicas, el espacio entre la caja Petri y el tubo interno se cubrió con una película de poliestireno expandido (1 cm espesor).

Ambos prototipos se estabilizaron térmicamente 5 min antes de tomar las imágenes. La caja y el porta muestras fueron marcadas y se hicieron coincidir ambas marcas durante la adquisición de todas las imágenes para asegurar la orientación. Las muestras de biomasa bacteriana en agar se fotografiaron inmediatamente después de extraídas de la incubadora e introducida la caja Petri sin tapa al dispositivo a través de una ranura en la base del mismo, haciendo coincidir las marcas del porta muestras y la caja Petri.

Thermal measurements

The infrared camera (mod. D500, Raytheon, Inc., USA) was calibrated, fixing the emissivity, central temperature, temperature scale and color pallet. The computer screen in the camera allowed the observation of the focused site. The camera has an arrangement of 320×240 pixels with a sensor circuit of 15.2×11.64 mm. Its spectral range is between 7 and 14 μm . Considering the pixel size of 48.5 μm^2 and a focal distance of 40 cm, it was insured that all of the area within the Petri dish (30 000 pixels) was within the vision interval (70 000 pixels) (Figure 1). Each pixel corresponds to an area of 53.21 μm^2 , and each one will have a different color depending on the temperature. Given that a bacteria of *E. coli* has an average size of 4 μm , each pixel can take thousands of bacteria that could generate the temperature. Having more points implies a larger area of pixels, and therefore, a greater infection.

Two prototypes were made to install the infrared camera (Figure 2), both operated at the optimum growth temperature of mesophyll microorganisms (37 °C). The prototype of Figure 2A was constructed with two concentric tubes (43 cm long; 3 and 4 inches diameter): the outside tube of PVC and the inside tube of galvanized metal. The space between the tubes was filled with polyurethane foam to avoid heat transfer and to conserve the temperature of the sample in the Petri dish when being photographed. In the inside tube, 4.5 m of resistance wire (90 ohm $\pm$ 5%) were rolled in the form of a helix, corresponding to 30 turns around the tube. The resistance was connected to a thermostat fed by means of a transformer of 24 V to 5 A. The constructed tube emitted radial heat and was placed on a metal support that maintained the infrared camera in place in the upper part of the tube. The distance between the camera lens and the slide was 40 cm.

The second prototype (Figure 2b) presented heat radiation at the base of the sample. Two concentric tubes of PVC were used with the same dimensions as above, and the space between the tubes was filled with polyurethane foam. The infrared camera was fixed to a metal support at the upper end of the tubes. A heating plate controlled



Figura 1. Imagen infrarroja obtenida en archivo THI y área focal vista desde la cámara, remarcada por el recuadro de la imagen.

Figure 1. Infrared image obtained in THI file and focal area seen from the camera, shown by the scale of the image.

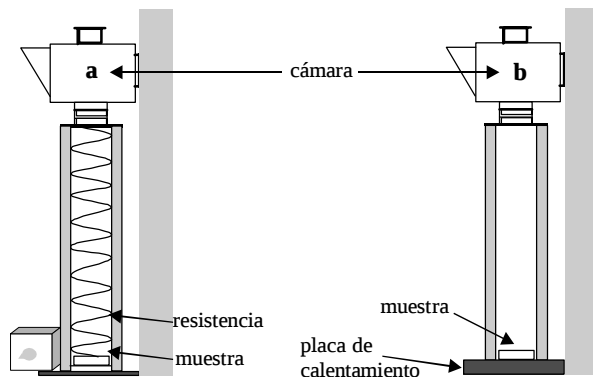


Figura 2. Prototipos elaborados para la adquisición de imágenes térmicas con suministro de (a) calor radial; (b) calor en la base.

Figure 2. Prototypes made for the acquisition of thermal images with supply of (a) radial heat; (b) heat at the base.

Se realizaron dos experimentos, uno de ellos con suministro de calor radial y el otro con el suministro de calor en la base de la muestra. Se obtuvieron cinco imágenes térmicas en cada uno de los tres intervalos de crecimiento bacteriano, a una distancia focal de 40 cm, emisividad de 0.85 y temperatura en la sección de muestreo de 37 °C. Se tomó una única imagen de cada caja Petri, lo que implicó 60 muestras (30 por cada prototipo).

Procesamiento de imágenes

Las imágenes adquiridas fueron almacenadas en la memoria interna de la computadora de la cámara (Compaq iPAQ) con formato THI. El software Report IR de la cámara se usó para abrir el archivo THI, delimitar la zona de interés y ajustar la temperatura de la medición. La imagen resultante fue grabada en la computadora en formato BMP, la cual se procesó mediante el software Image Java donde, a partir de la pantalla a color de 8 bits, la imagen térmica se transforma a una imagen de 8 bits en escala de gris. Los colores usados para evaluar la biomasa fueron: rosa, rojo, naranja, amarillo, verde, azul cielo, azul marino y morado, que corresponden a temperaturas de 37.67, 37.61, 37.58, 37.53, 37.46, 37.38, 37.28 y 37.20 °C. Se obtiene un histograma a partir de la imagen en escala de gris, el cual muestra la cantidad de puntos para cada tono de gris.

Con las pantallas de color abiertas y de escala de gris se seleccionó en la imagen un punto para conocer su valor de gris, el cual aparece en el eje X del histograma. El valor dado representa el número de píxeles con el mismo color.

Predicción de la existencia bacteriana

Se analizaron las imágenes obtenidas del seguimiento al crecimiento bacteriano en los dos experimentos. Se consideraron el número de píxeles promedio de cada color en las imágenes y las desviaciones estándar para encontrar correlaciones que predijeran el contenido microbiano. Las ecuaciones de predicción se obtuvieron

at 37 ± 0.2 °C in the lower end of the tubes provided heat for the samples. To reduce thermal interference, the space between the Petri dish and the inside tube was covered with a film of expanded polystyrene (1 cm thick).

Both prototypes were thermally established 5 min before taking the images. The Petri dish and the slide were marked and both marks were made to coincide during the taking of all of the images to insure orientation. The samples of bacterial biomass in agar were photographed immediately after being extracted from the incubator and introducing the uncovered Petri dish into the device through a slot in its base, insuring that the marks of the slide and the Petri dish coincided.

Two experiments were carried out, one with a supply of radial heat and the other with the heat supplied at the base of the sample. Five thermal images were obtained in each of the three intervals of bacterial growth, at a focal distance of 40 cm, emissivity of 0.85 and temperature in the sampling section of 37 °C. A single image was taken of each Petri dish, which implied 60 samples (30 per each prototype).

Image processing

The acquired images were stored in the internal memory of the computer of the camera (Compaq iPAQ) with THI format. The software Report IR of the camera was used to open the THI file, delimit the zone of interest and adjust the temperature of measurement. The resulting image was recorded in the computer in BMP format, which was processed with the software Image Java where, from the color screen of 8 bits, the thermal image is transformed to an image of 8 bits on the gray scale. The colors used to evaluate the biomass were: pink, red, orange, yellow, green, light blue, dark blue and purple, which correspond to temperatures of 37.67, 37.61, 37.58, 37.53, 37.46, 37.38, 37.28 and 37.20 °C. A histogram was obtained from the image in gray scale, which shows the amount of points for each tone of gray.

With the color screens open and in gray scale, one point was selected in the image to know its gray value, which appears in the X axis of the histogram. The given value represents the number of pixels with the same color.

Prediction of bacterial existence

An analysis was made of the images obtained from the observation of the bacterial growth in both experiments. The average number of pixels of each color in the images was considered along with the standard deviations for finding correlations that predict the microbial content. The equations of prediction were obtained using 15 independent samples per experiment. The models were validated with 15 additional images for each experiment.

RESULTS AND DISCUSSION

The thermal images showed the microbial growth, processed to obtain the number of points corresponding

usando 15 muestras independientes por experimento. Los modelos se validaron con 15 imágenes más por cada experimento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las imágenes térmicas mostraron el crecimiento microbiano, procesándose para obtener el número de puntos correspondientes a cada temperatura y, por tanto, a cada color y tono de gris. Se hicieron tomas térmicas de la superficie de agar estéril y la del agar cubierto de biomasa para identificar posibles diferencias térmicas entre ambos. El número promedio de puntos por color para las cinco repeticiones de la caja testigo y de una caja con 11 h de crecimiento microbiano están en la Figura 3. La sección con biomasa bacteriana presenta mayor número de puntos en la zona térmica definida por los colores rosa, rojo y naranja, (cada color representa una temperatura con una diferencia de 0.01 °C) y señalan un marcado aumento en el número de puntos, con valores de 73, 122 y 66 ante la presencia microbiana. Asimismo, la muestra testigo presenta valores altos en azul cielo, azul marino y morado. Los puntos entre el rosa y el amarillo no aumentaron considerablemente en la muestra testigo libre de patógenos, por lo que fue vinculada al crecimiento microbiano con la cámara calibrada a una emisividad de 0.85. Cabe resaltar que diferentes valores de emisividad pueden afectar el resultado final.

Para identificar variaciones del comportamiento térmico respecto al tiempo del crecimiento bacteriano, se obtuvieron imágenes térmicas a 5, 8 y 11 h de crecimiento. En una primera etapa, las fotografías se tomaron con la cámara infrarroja instalada sobre el prototipo que emite calor en forma radial. Se procesaron las imágenes obteniéndose el número promedio de puntos por color. y los valores de las desviaciones estándar (Cuadro 1); se observan los resultados obtenidos para los colores rosa, rojo, naranja y amarillo. Los colores verde, azul cielo, marino y morado fueron suprimidos por tener una elevada desviación estándar.

A las 11 h se observó una imagen con una gama amplia de tonalidades rojas, lo cual implica dispersión alrededor de 37.61 °C, traduciéndose en altas desviaciones estándar. En el Cuadro 1 se observa que el número de puntos de los colores con menor desviación estándar y con tendencia creciente respecto al tiempo son el naranja y el amarillo. Las fluctuaciones del termopar mostraron variaciones en la temperatura superiores a ± 0.1 °C. Dado que la sensibilidad de la cámara es 0.01 °C, estas perturbaciones se pueden detectar y ocasionan imprecisiones en las imágenes térmicas; por tanto, el control sobre la muestra debe ser más preciso. El suministro de calor radial provoca, en algunas tomas térmicas, interferencia constante en una

to each temperature, and therefore, to each color and tone of gray. Thermal readings were taken of the surface of sterile agar and that of the agar covered with biomass to identify possible thermal differences between the two. The average number of points per color for the five replicates of the control dish and of a dish with 11 h of microbial growth are found in Figure 3. The section with bacterial biomass presents a greater number of points in the thermal zone defined by the colors pink, red and orange, (each color represents a temperature with a difference of 0.01 °C) which indicate a marked increase in the number of points, with values of 73, 122 and 66 with microbial presence. In addition, the control sample presents high values in light blue, dark blue and purple. The points between the pink and the yellow did not show a considerable increase in the pathogen free control sample, thus it was linked to microbial growth with the camera calibrated to an emissivity of 0.85. It should be pointed out that different values of emissivity can affect the final result.

To identify variations of thermal behavior with respect to the time of bacterial growth, thermal images were obtained at 5, 8 and 11 h of growth. In the first stage, the photographs were taken with the infrared camera installed over the prototype that emits radial heat. The images were processed to obtain the average number of points per color, and the values of the standard deviations (Table 1); the results obtained for the colors pink, red, orange and yellow are observed. The colors green, light blue, dark blue and purple were suppressed for having a high standard deviation.

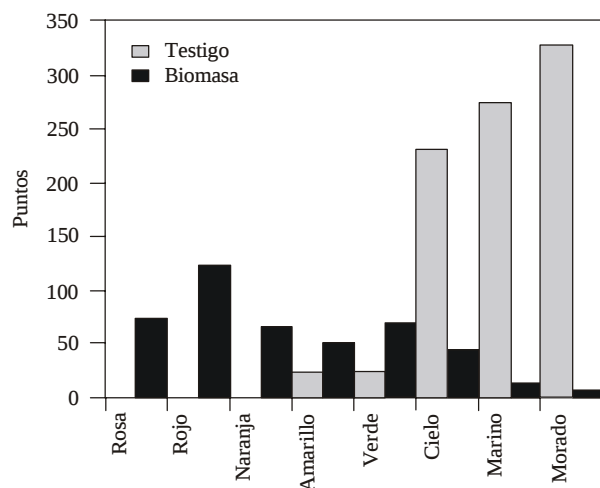


Figura 3. Comparación del número promedio de puntos por cada color de una imagen testigo y otra infectada a 11 h de crecimiento.

Figure 3. Comparison of the average number of points per each color of a control image and an infected one at 11 h of growth.

Cuadro 1. Número promedio de puntos y desviación estándar para cada color a diferente tiempo de crecimiento con calor radial.
Table 1. Average number of points and standard deviation for each color at different growth times with radial heat.

Tiempo (h)	Número promedio de puntos				Desviación estándar			
	Rosa	Rojo	Naranja	Amarillo	Rosa	Rojo	Naranja	Amarillo
5	49	47	63	79	6.20	7.02	1.30	5.66
8	46	90	32	55	12.6	2.97	4.62	5.55
11	50	72	36	50	15.2	21.2	3.54	7.05

zona lateral de las cajas Petri debido a la presencia de la resistencia.

En el segundo experimento se suministró radiación de calor en la base de las muestras. En el Cuadro 2 se presenta el número promedio de puntos de las imágenes térmicas a diferentes tiempos de crecimiento, y las desviaciones estándar correspondientes. Se observa que las zonas térmicas rosa y rojo presentan aumento creciente en el número de puntos respecto al tiempo, y los valores obtenidos de los puntos rosa, rojo, amarillo y naranja tienen baja desviación estándar. En el segundo prototipo se observaron desviaciones estándar menores que las obtenidas a partir de las imágenes del primero.

En el Cuadro 1 se presenta la aparición de puntos naranja, amarillo, rojo y rosa, es decir cuatro temperaturas diferentes. Así, con este prototipo hay un diferencial de temperatura de $37.67\text{--}37.53\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.14\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la superficie de la caja Petri. Dado que el calentamiento es radial, existe una diferencial de temperatura entre los dos extremos opuestos. La diferencial de temperatura en el segundo prototipo fue $0.06\text{ }^{\circ}\text{C}$, siendo el análisis más específico y exacto. La única pérdida de calor ocurre con el ambiente, pero es limitada debido al calentamiento previo al cual se sometió el prototipo. Ese diferencial de temperatura representa la presencia de los patógenos menos la transferencia de calor al ambiente. Al poner la caja de Petri sobre la placa en el segundo prototipo, la temperatura avanza homogéneamente por el cristal, y al estar a la misma temperatura que el agar no hay pérdida lateral de calor. Con el tiempo aumenta el número de puntos rosas

At 11 h of growth an image was observed with a wide range of red tones, which implies dispersion around $37.61\text{ }^{\circ}\text{C}$, which is translated into high standard deviations. In Table 1, it is observed that the number of points of the colors with least standard deviation and with a tendency of increase with respect to time are the orange and yellow. The thermopar fluctuations showed temperature variations of over $\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Given that the sensitivity of the camera is $0.01\text{ }^{\circ}\text{C}$, these disturbances can be detected and cause imprecision in the thermal images; therefore, the control over the sample should be more precise. The supply of radial heat provokes, in some thermal images, constant interference in a lateral zone of the Petri dishes due to the presence of the resistance.

In the second experiment, heat radiation was supplied at the base of the samples. The average number of points in the thermal images at different growth times, and the corresponding standard deviations are shown in Table 2. It is observed that the pink and red thermal zones show a growing increase in the number of points with respect to time, and the values obtained of the pink, red, yellow and orange points have low standard deviation. In the second prototype, lower standard deviations were observed than those obtained from the images of the first prototype.

The appearance of orange, yellow, red and pink points, that is, four different temperatures is shown in Table 1. Thus, with this prototype there is a temperature differential of $37.67\text{--}37.53\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.14\text{ }^{\circ}\text{C}$ on the surface of the Petri dish. Given that the heating is radial, there is a temperature differential between the two opposite

Cuadro 2. Número promedio de puntos para cada color y desviación estándar para cada color a diferente tiempo de crecimiento con calor suministrado en la base.

Table 2. Average number of points for each color and standard deviation for each color at different growth times with heat supplied at the base.

Tiempo (h)	Número promedio de puntos				Desviación estándar			
	Rosa	Rojo	Naranja	Amarillo	Rosa	Rojo	Naranja	Amarillo
5	15	30	8	5	2.51	2.07	3.78	1.64
11	31	68	11	9	9.34	4.51	3.58	1.87
22	100	71	10	5	10.3	5.77	3.27	1.3

indicando una mayor temperatura porque hay microorganismos radiando energía.

Las ecuaciones empíricas desarrolladas para predecir la presencia microbiana son:

$$PB1 = \frac{|\bar{A}n - An|}{|\bar{A}m - Am|} \quad (1)$$

$$PB2 = \sqrt[1/3]{\sqrt{CAn^2 + Am^2}h} \quad (2)$$

$$PB3 = \sqrt[1/2]{\sqrt{\ln(R)^2 + \ln(An)^2}h} \quad (3)$$

$$PB4 = \sqrt[1/3]{\sqrt{\frac{\ln(R)^2}{h} + \ln(An)^2}h} \quad (4)$$

donde, $PB1$, $PB2$, $PB3$ y $PB4$ = parámetros adimensionales que indican la presencia bacteriana; h = tiempo en horas; An , Am y R = número de puntos naranja, amarillo y rojo; $\bar{A}n$ y $\bar{A}m$ = número promedio de puntos naranja y amarillo.

Los puntos de color rojo, naranja y amarillo corresponden a las temperaturas 37.61, 37.58 y 37.53. La relación entre la cantidad de puntos de estas temperaturas proporcionaron una buena predicción de la presencia bacteriana. La fórmula (4) considera además el tiempo de inoculación. Estas fórmulas no presentan constantes en su calibración, dado que sólo se calibra el intervalo en el que se puede predecir la presencia bacteriana.

En el Cuadro 3 se presenta la exactitud en la predicción de presencia bacteriana de las cuatro ecuaciones y el intervalo dentro del cual el *E.coli* es identificado. El número de puntos de color rosa, amarillo, naranja y rojo se obtuvieron de cada imagen muestreada. Con los primeros 15 datos por prototipo (5 por cada tiempo de crecimiento) se obtuvieron las cuatro ecuaciones y los intervalos de operación. Se consideraron los valores mínimos y máximos para definir el intervalo de detección segura; por ejemplo, en la ecuación 1 el intervalo variaba entre 0.2 y 3. Teniendo la ecuación y el intervalo se evaluaron otras 15 imágenes diferentes por prototipo, y si el resultado estaba dentro del intervalo indicaba la presencia del patógeno. Se obtuvo 70% de precisión al utilizar la ecuación 1 con las 15 imágenes de

extremes. The temperature differential in the second prototype was 0.06 °C, this being the most specific and exact analysis. The only heat loss occurs with the environment, but it is limited due to the previous heating applied to the prototype. This temperature differential represents the presence of the pathogens minus the transfer of heat to the environment. When the Petri dish is placed on the plate in the second prototype, the temperature rises homogeneously through the glass, and being at the same temperature as the agar, there is no lateral heat loss. As time progresses, there is an increase in the number of pink points, indicating a higher temperature, because there are microorganisms radiating energy.

The empirical equations developed to predict microbial presence are as follows:

$$PB1 = \frac{|\bar{A}n - An|}{|\bar{A}m - Am|} \quad (1)$$

$$PB2 = \sqrt[1/3]{\sqrt{CAn^2 + Am^2}h} \quad (2)$$

$$PB3 = \sqrt[1/2]{\sqrt{\ln(R)^2 + \ln(An)^2}h} \quad (3)$$

$$PB4 = \sqrt[1/3]{\sqrt{\frac{\ln(R)^2}{h} + \ln(An)^2}h} \quad (4)$$

where, $PB1$, $PB2$, $PB3$ and $PB4$ = adimensional parameters that indicate bacterial presence; h = time in hours; An , Am and R = the number of orange, yellow and red points; $\bar{A}n$ and $\bar{A}m$ = average number of orange and yellow points.

The red, orange and yellow points correspond to temperatures 37.61, 37.58 and 37.53. The relationship between the amount of points of these temperatures provided a good prediction of bacterial presence. Formula (4) also considers the time of inoculation. These formulas do not present constants in their calibration, given that only the interval calculated is that in which bacterial presence can be predicted.

The exactness in the prediction of bacterial presence of the four equations and the interval in which the *E. coli* is identified is shown in Table 3. The number of pink, yellow, orange and red points was obtained from each sampled image. With the first 15 data per prototype

prueba usadas con el prototipo con resistencia. La ecuación 1 requiere valores promedios y se usaron los valores del Cuadro 1 para calcular la presencia de biomasa. Los demás algoritmos no requieren valores promedio y pueden calcularse directamente. La presencia bacteriana se puede calcular en el prototipo con resistencia mediante las ecuaciones 1 y 2, en función de la cantidad de puntos naranja y amarillo. En conjunto, el número de puntos rojos y naranjas son útiles para predecir la presencia bacteriana en el prototipo con resistencia en la placa.

Se probaron unas muestras a las 2 h pero las desviaciones estándar fueron muy altas y no se concluyeron en el análisis. Aunque se empiezan a notar puntos, se requieren más pruebas para asegurar que son bacterias.

CONCLUSIONES

Se demostró que existe diferencia térmica entre las superficie con agar estéril y la superficie contaminada con *E. coli*.

Se probaron dos dispositivos con emisión de calor: uno radial y otro en la base de las muestras; el segundo tuvo mejores características y provocó menor dispersión en las zonas térmicas (colores).

Los modelos de predicción de presencia de biomasa bacteriana predijeron la presencia de biomasa hasta con 100% de eficiencia.

Se puede utilizar otro sistema para procesar las imágenes de color utilizando las bandas RGB con intervalos definidos.

LITERATURA CITADA

- AWWA (American Public Health Association). 1988. Microbiological Examination. In: Clesceri, L. S., A. E. Greenberg A. D. Aeton. (eds). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. U.S.A. pp:1-140.
- Badenas, C., and V. Caselles. 1992. A simple technique for estimating surface temperature by means of thermal infrared radiometer. *Int J. Remote Sensing* 13: 2951-2956.
- Brabetz, W., W. Liebl, and K. H. Schleifer. 1993. Lactose permease of *Escherichia coli* catalyzes active β -galactoside transport in a gram positive bacterium. *J. Bacteriol.* 175: 7488-7491.
- Chung, K. S., C. N. Kim, and K. Namgoong. 2000. Evaluation of the petrifilm rapid coliform count plate method for coliform enumeration from surimi-based imitation crab slurry. *J. Food Protection* 63: 123-125.
- Ellis, D.I., D. Broadhurst, D. B. Kell, J. Rowlandand, and R. Goodacre. 2002. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2822-2828.
- Hahn, F. 2002. Fungal spore detection on tomatoes using spectral Fourier signatures. *J. Biosys. Eng.* 81: 249-259.
- Irudayaraj, J., H. Yangand, and S. Sakhamuri. 2001. Differentiation and detection of microorganisms using Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *J. Mol. Struct.* 606: 181-188.

Cuadro 3. Exactitud de predicción (%) en las cuatro fórmulas usando los valores de los colores obtenidas a partir de las imágenes en ambos prototipos.

Table 3. Accuracy of prediction (%) in the four formulas using the values of the colors obtained from the images in both prototypes.

Fórmula	Intervalo	Exactitud en la determinación de <i>E. coli</i> (%)	
		Prototipo con resistencia	Resistencia en placa
1	0.2 < PB1 < 3	70.0	
2	15 < PB2 < 23	90.0	
3	3 < PB3 < 5		75.0
4	1.5 < PB4 < 2.5		100

(5 for each growth time), the first four equations and operation intervals were obtained. The minimum and maximum values were considered to define the sure detection interval; for example, in equation 1, the interval varied between 0.2 and 3. Once the equation and the interval were obtained, an evaluation was made of another 15 different images per prototype, and if the result was within the interval, it indicated the presence of the pathogen. Seventy per cent precision was obtained using equation 1 with the 15 test images used with the prototype with resistance. Equation 1 requires average values, and the values of Table 1 were used to calculate the presence of biomass. The other algorithms do not require average values and can be calculated directly. Bacterial presence can be calculated in the prototype with resistance by means of equations 1 and 2, as a function of the number of orange and yellow points. All together, the number of red and orange points is useful to predict bacterial presence in the prototype with resistance in the plate.

Some samples were tested after 2 h, but the standard deviations were very high and were not concluded in the analysis. Although points begin to appear, more tests are required to confirm that they are bacteria.

CONCLUSIONS

It was demonstrated that there is thermal difference between the surface with sterile agar and the surface contaminated with *E. coli*.

Two devices with heat emission were tested: one radial and the other at the base of the samples; the latter had better characteristics and provoked less dispersal in the thermal zones (colors).

The models of prediction of the presence of bacterial biomass predicted the presence of biomass with as much as 100% efficiency.

Another system can be used to process the color images using the RGB bands with defined intervals.

- Javis R. M., and R. Goodacre. 2004. Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical Chem.* 76: 40-47.
- Jothikumar, N., and M. W. Griffiths. 2002. Rapid detection of *Escherichia coli* 0157:H7 with multiplex real time PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3169-3171.
- Wisniewski, M., S. E. Lindow, and E. N. Ashworth. 1997. Observations of ice nucleation and propagation in plants using infrared video thermography. *J. Plant Physiol.* 113: 327-334.