

Imagen hiperespectral para la detección de contaminación microbiana en espinaca fresca envasada

I. Aligbe¹, B. Diezma Iglesias¹ y V. Díaz Barcos²

¹ LPF-TAGRALIA. Dpto. Ingeniería Rural. Universidad Politécnica de Madrid. E.T.S.I. Agrónomos. Avda. Complutense s/n. 28040 Madrid. e-mail: belen.diezma@upm.es

² Dpto. de Ciencias y Tecnologías Aplicadas a la Ingeniería Técnica Agrícola. Universidad Politécnica de Madrid. E.U.I.T. Agrícola. Avda. Complutense s/n. 28040 Madrid.

Resumen

La seguridad alimentaria de hortalizas de hoja puede verse comprometida por contaminaciones microbianas, lo que ha motivado la promoción mundial de normas de seguridad en la producción, el manejo poscosecha y el procesado. Sin embargo, en los últimos años las hortalizas han estado implicadas en brotes de *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*, lo que obliga a plantear investigaciones que posibiliten la detección de contaminación por microorganismos con técnicas rápidas, no destructivas y precisas.

La imagen hiperespectral integra espectroscopia e imagen para proporcionar información espectral y espacial de la distribución de los componentes químicos de una muestra. Los objetivos de este estudio fueron optimizar un sistema de visión hiperespectral y establecer los procedimientos de análisis multivariante de imágenes para la detección temprana de contaminación microbiana en espinacas envasadas (*Spinacia oleracea*).

Las muestras de espinacas fueron adquiridas en un mercado local. Se sometieron a la inoculación mediante la inmersión en suspensiones con poblaciones iniciales de 5 ó 7 unidades logarítmicas de ufc de una cepa no patógena de *Listeria innocua*. Después de 15 minutos de inoculación por inmersión, las hojas fueron envasadas asépticamente. Se consideró un tratamiento Control-1 no inoculado, sumergiendo las espinacas en una solución tampón (agua de peptona) en lugar de en solución inoculante, y un tratamiento Control-2 en el que las hojas no se sometieron a ninguna inmersión. Las muestras se almacenaron a 8°C y las mediciones se realizaron 0, 1, 3, 6 y 9 días después de inocular. Cada día se determinaron los recuentos microbianos y se adquirieron las imágenes con una cámara VIS-NIR (400-1000 nm). Sobre los gráficos de dispersión de los scores de PC1 y PC2 (análisis de componentes principales computados sobre las imágenes hiperespectrales considerando el rango de 500-940 nm) se reconocieron diferentes patrones que se identificaron con niveles de degradación; así se seleccionaron píxeles que conformaron las clases de no degradados, semi-degradados y degradados. Se consideraron los espectros promedio de cada clase para asignar los píxeles anónimos a una de las tres clases. Se calculó la distancia SAM (*Spectral Angle Mapper*) entre el espectro promedio de cada categoría y cada espectro anónimo de las imágenes. Cada píxel se asignó a la clase a la que se calcula la distancia mínima. En general, las imágenes con los porcentajes más altos de píxeles levemente degradados y degradados correspondieron a contenidos microbiológicos superiores a 5 unidades logarítmicas de ufc.

Palabras clave: Seguridad alimentaria, Análisis de imagen multivariante, Contaminación microbiana, Hortalizas de hoja

Potential Application of Hyperspectral Imaging for Detection of Contamination in Packaged Fresh Spinach

Abstract

Microbial contamination is a concern about food safety of fresh leafy vegetables which is the basis for the worldwide promotion of safety standards in production, postharvest handling and processing. However, fresh leafy vegetables have been implicated in outbreaks of *Escherichia coli*, *Salmonella spp* and *Listeria monocytogenes* in recent years. These facts justify further research works in detection of micro-organism contamination in vegetables using rapid, non destructive and accurate techniques.

Hyperspectral imaging integrates spectroscopy and imaging to provide both spectral and spatial information on the distribution of the components of an object, chemicals or organisms. The objectives of this study were to

optimize a hyperspectral vision system and to establish the multivariate image analysis procedures for the early detection of microbial contamination in fresh packaged spinach leaves (*Spinacia oleracea*).

Fresh bagged spinaches were purchased from local market. Two sample subgroups were subjected to inoculation in dipping suspensions with initial populations of 5 and 7 log cfu of a non-pathogenic strain of *L. innocua* respectively. After 15 minutes of inoculating by immersion, leaves were drained and then aseptically packed into low-density polyethylene bags. Also, non-inoculated spinach (control-1) similarly treated with sterile buffer (peptone water) instead of inoculums, and second non-inoculated and non-dipped (no treatment with sterile buffer) spinach (control-2) were prepared. Samples were stored at 8°C and measurements were performed at 0, 1, 3, 6 and 9 days after inoculation. Four replicas of each sample group (log 5 cfu/g, log 7 cfu/g, control-1, control-2) were prepared for each day analysis. Each day analysis, microbial cell counts were determined and hyperspectral images with a push-broom-hyperspectral camera in the range of 400-1000 nm were acquired, .

The noisy part of the raw relative reflectance spectra was removed, therefore, only wavelengths comprised between 500 and 940 nm were considered. Representative pixels of non-degraded, mild-degraded and degraded classes were selected taking into account the different patterns appearing in 2D scatter plots performed by plotting PC1 (principal component) against PC2 scores of images. Average spectra of each class were considered to classify the anonymous pixels into one of the three classes. Spectral angle mapper (SAM) distances were computed between the average spectrum of each quality class and each anonymous spectrum of the images. Each pixel was assigned to the class to which it computed the minimum distance. In general, images with the higher percentages of mild-degraded and degraded pixels corresponded to microbiological contents higher than 5 log cfu.

Keywords: Food safety, Multivariate image analysis, Microbial contamination, Leafy vegetables

Introducción y/o Justificación

Las hojas de espinaca pueden albergar un gran número de microorganismos aerobios mesófilos y psicrotróficos deteriorantes (Babic y Watada, 1996); además, las verduras recién cortadas pueden albergar patógenos y ser vehículos de enfermedades transmitidas por alimentos (Siripatrawan *et al.*, 2011).

La imagen hiperespectral es una técnica que integra espectroscopia e imagen para proporcionar simultáneamente información espectral y espacial de las características de una muestra. Se trata de una técnica no destructiva, no contaminante, rápida y relativamente barata, lo que la ha convertido en una de las herramientas más estudiadas para la exploración y supervisión de muestras en muchos ámbitos de investigación; también en agricultura, donde las aplicaciones comprenden desde el análisis de imágenes satelitales para el mapeo de cubiertas vegetales o la identificación de estrés en la vegetación, al análisis de imágenes de laboratorio para la detección de contaminantes o la cuantificación de parámetros bioquímicos. En particular, existe un interés creciente en su aplicación para la evaluación de la calidad y la seguridad de los productos agroalimentarios (Dale *et al.*, 2013).

En lo que refiere a estudios centrados en hoja, existe abundante bibliografía sobre imagen hiperespectral remota, pero no muchas aplicaciones de toma de imágenes de forma localizada. Aunque los fundamentos de la técnica son comunes, existen diferencias que dificultan que los resultados obtenidos en la primera sean siempre de aplicación directa en la segunda. Como aplicaciones locales en hortaliza de hoja hay que mencionar los trabajos de Kang *et al.* (2011), que mediante imagen hiperespectral de fluorescencia detectaron contaminación fecal en hojas de lechuga y espinaca, y de Siripatrawan *et al.* (2011) que implementaron la imagen hiperespectral para la detección de contaminación por *E. coli K12* en espinaca fresca, mediante un modelo basado en redes neuronales artificiales.

En el ámbito del análisis de imagen, donde tradicionalmente se ha considerado cada imagen como un todo, a finales de los 80 surge la filosofía de considerar cada píxel como un individuo, que en su conjunto constituyen los elementos de la muestra u observaciones, dando lugar al análisis multivariante de imágenes (*Multivariate Image Analysis*, MIA) (Prats-Montalbán, 2005). Este modo de análisis es especialmente útil en las imágenes hiperespectrales de productos biológicos, en las que

la localización de características es aleatoria. En el MIA la imagen se convierte en una nueva estructura, en la que las filas corresponden a los píxeles y las columnas a las longitudes de onda espectrales; esta nueva matriz se puede analizar por medio de modelos de estructuras latentes. El análisis de componentes principales (PCA) es el modelo de compresión de la información más frecuentemente utilizado en el MIA (Duchesne, Liu y MacGregor, 2012). Píxeles con características similares se agruparán en zonas cercanas en el nuevo espacio latente, lo que puede ayudar a la identificación de píxeles con defectos, con diferente composición y/o estructura...; su reubicación en la imagen original permite la visualización de la distribución de la característica en estudio.

Los objetivos de este estudio fueron optimizar un sistema de visión hiperespectral y establecer los procedimientos de análisis multivariante de imágenes para la detección temprana de contaminación microbiana en espinacas envasadas (*Spinacia oleracea*).

Material y Métodos

Las muestras de espinacas fueron adquiridas en un mercado local. Se sometieron a la inoculación mediante la inmersión en suspensiones con poblaciones iniciales de 5 ó 7 unidades logarítmicas de ufc (Unidades Formadoras de Colonia) de una cepa no patógena de *Listeria innocua* (M5, M7). Después de 15 minutos de inoculación por inmersión, las hojas fueron envasadas asépticamente. Se consideró un tratamiento control-1 no inoculado, sumergiendo las espinacas en una solución tampón (agua de peptona) en lugar de en solución inoculante, y un tratamiento control-2 en el que las hojas no se sometieron a ninguna inmersión. Las muestras se almacenaron a 8°C y las mediciones se realizaron 0, 1, 3, 6 y 9 días después de inocular. Para el recuento tanto de los microorganismos mesófilos se utilizó la técnica de siembra en placa, empleando como medio de cultivo PCA (Scharlab) e incubando a 30°C durante 48 horas. La solución remanente se preincubó a 20°C durante 1 hora para realizar, posteriormente, el recuento de *Listeria* mediante siembra en placa empleando como medio de cultivo CHROMagar™ Identification *Listeria* (CHROMagar, Francia), incubando las placas Petri a 37 °C durante 24-48 h. Los recuentos microbianos se expresaron como log₁₀ ufc/g.

El sistema de visión hiperespectral consiste en una cámara de tipo CCD (Andor Luca) equipada con un espectrógrafo Headwall Photonics Hyperspec™ VNIR que trabaja en el rango espectral comprendido entre 400 y 1000 nm. La adquisición y el almacenamiento de la imagen se configura en un PC a través de una aplicación informática específica Headwall Hyperspec™. La iluminación es suministrada por dos lámparas halógenas. La muestra se escanea línea a línea según se desplaza y pasa bajo el campo de visión de la cámara (sistema de barrido). La cámara se ha configurado para obtener una resolución espectral de 3 nm y una resolución espacial es de 260 µm. La imagen se adquiere del haz de las hojas. El hiper cubo obtenido contiene el espectro de reflectancia relativa de cada píxel al haber sido computado respecto a un blanco de referencia.

El programa ENVI se ha utilizado para llevar a cabo el análisis multivariante de imagen basado en el análisis de componentes principales. Se consideró el rango espectral comprendido entre 500 y 940 nm, eliminando así las bandas más ruidosas de las imágenes hiperespectrales. El gráfico de dispersión de los PC1 y PC2 se utilizó para la identificación de los diferentes patrones espectrales presentes en las imágenes (píxeles no degradados, semi-degradados y degradados). De cada clase identificada se computó un espectro promedio. Para asignar la totalidad de los píxeles de las imágenes a una de las clases definidas se calculó la distancia SAM (Spectral Angle Mapper) entre el espectro promedio de cada categoría y cada espectro anónimo. Cada píxel se asignó a la clase para la que se calculó la distancia mínima. Se llevaron a cabo análisis de varianza para identificar diferencias significativas entre muestras para los factores contenido microbiológico total y número de píxeles de las imágenes clasificados como degradados y semi-degradados.

Resultados y Discusión

En la Figura 1 se presentan los gráficos de dispersión en el espacio definido por los dos primeros componentes principales, de los píxeles de hojas correspondientes al primer día de medida y al tratamiento Control-2 (izquierda) y al último día de ensayo de los tratamientos M5 y M7. Se observan patrones muy diferentes entre las muestras, a partir de los cuales se seleccionan regiones para definir los píxeles más representativos de los estados de degradación.

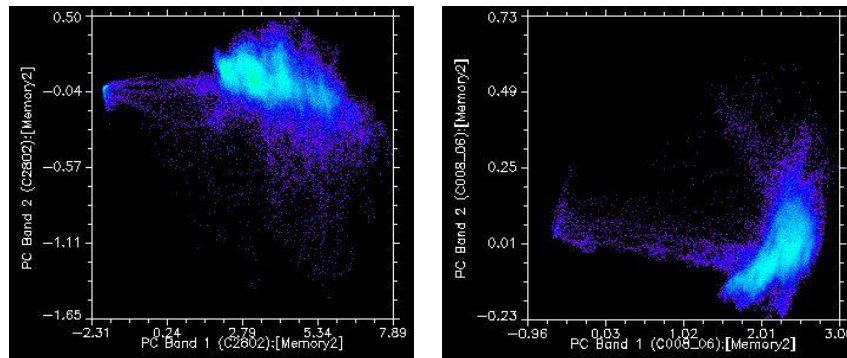


Figura 1. Gráfico de dispersión bi-dimensional de los píxeles de imágenes correspondientes al tratamiento Control-2 durante el primer día de medida (izquierda), y de los tratamiento M5 y M7 durante el último día de medida (derecha) en el espacio definido por los dos primeros componentes principales.

Para obtener agrupaciones de píxeles disjuntas se procedió a depurar sucesivamente los grupos originalmente definidos sobre los gráficos de dispersión, así se llegó a tres conjuntos de píxeles puros (no degradados, semi-degradados y degradados) cuyos espectros medios se presentan en la Figura 2. La principal diferencia se encuentra en el nivel de reflectancia en el rango visible, que aumenta para los píxeles degradados, pudiendo indicar degradación de pigmentos como la clorofila. La reflectancia en el rango NIR, relacionada con el contenido de agua, disminuye en el grupo de píxeles degradados, lo que ya se ha observado en trabajos previos (Diezma *et al.*, 2011).

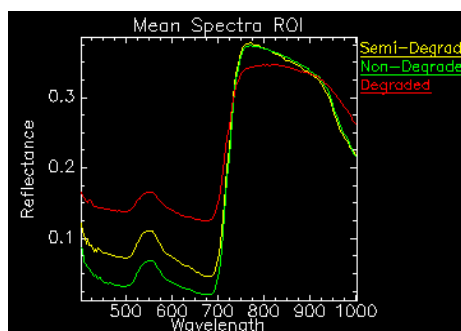


Figura 2. Espectros medios de reflectancia de los tres grupos de píxeles seleccionados como píxeles puros no degradados, semi-degradados y degradados.

En la Figura 3 se representa la visualización de asignación de píxeles a alguna de las clases según la distancia SAM para hojas de los tratamientos Control-1, Control-2 y M7 en el primer y el último día de medida. Los píxeles verdes corresponden a la clase de no degradados, los amarillos a los semi-degradados y los rojos a los degradados. A pesar de que en las hojas presentadas se puede observar mayor porcentaje de píxeles degradados en las muestras del tratamiento M7, el análisis de la totalidad de las hojas permite verificar una gran variabilidad intra grupo.

En la Figura 4 se representan los valores medios de porcentajes de píxeles degradados, semi-degradados y la suma de ambos y de microorganismos totales para cada tratamiento a lo largo de los días de ensayo. En primer lugar hay que señalar que el recuento de microorganismos totales para el tratamiento Control-1, desde el primer día de muestreo, dio valores superiores a 5 log ufc/g, lo que

puede indicar que en el proceso de manipulación se produjo una contaminación incontrolada. Se observa que más que la concentración de *Listeria* es el recuento de microorganismos totales lo que determina el nivel de deterioro de las hojas. Considerando el valor de 5 log ufc/g de microorganismos totales como el punto a partir del que se considera que un producto perecedero inicia su deterioro, se comprueba que de los casos en los que se supera este valor (15), el 73,3% supera el 50% de píxeles degradados y semi-degradados.

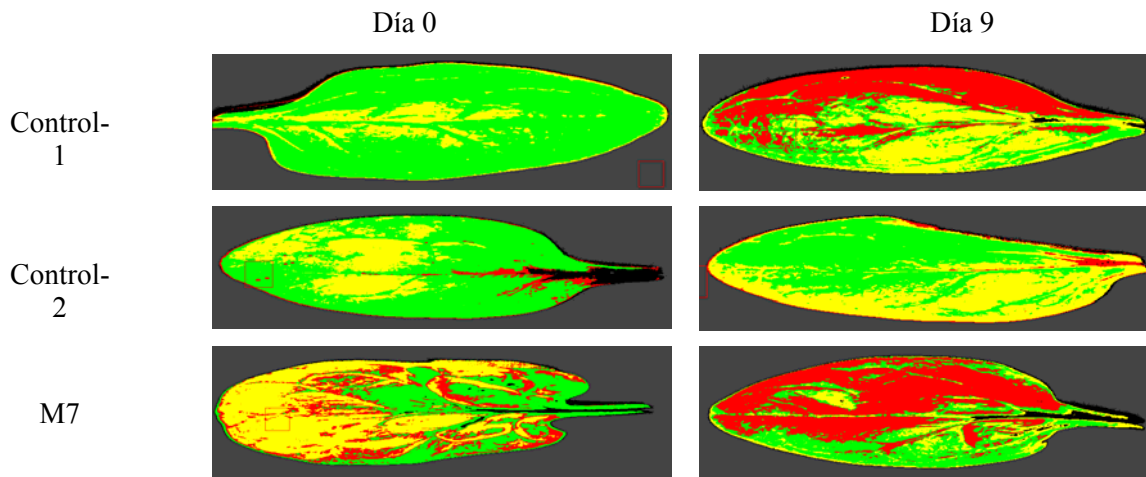


Figura 3. Imágenes de visualización de la asignación de píxeles a una de las tres clases: verde píxeles no degradados, amarillo píxeles semi-degradados, rojos píxeles degradados.

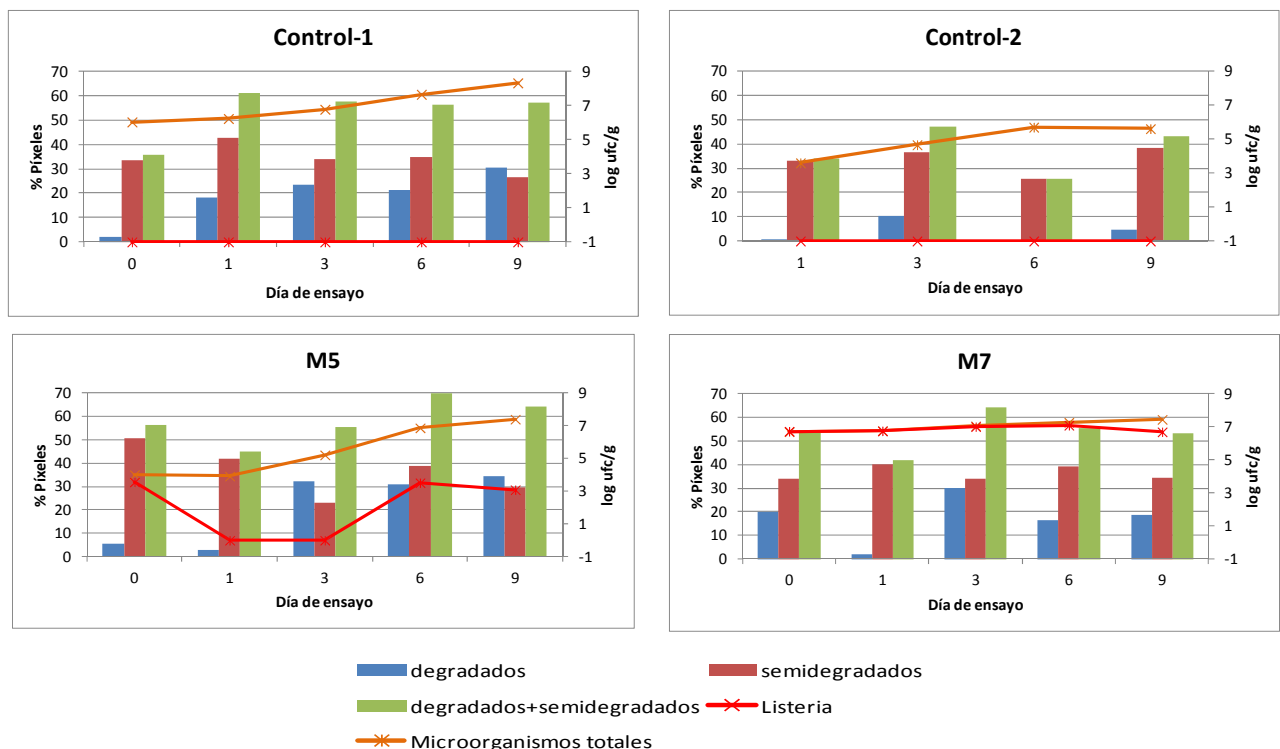


Figura 4. Valores medios de píxeles degradados y semi-degradados y recuento de microorganismos para cada tratamiento a lo largo de los días de ensayo.

Los análisis de varianza mostraron que los valores de píxeles degradados y semi-degradados permitieron distinguir el tratamiento Control-2 del resto de los tratamientos (Figura 5, izquierda). El análisis correspondiente al recuento de microorganismos totales indica que existen diferencias significativas entre el grupo formado por los tratamientos Control-2 y M5, con contenido microbiano

medio de 5 log ufc/g y 5.5 log ufc/g, respectivamente, y el grupo formado por Control-1 y M7 (Figura 5, derecha), con contenidos medios superiores a 7 log ufc/g.

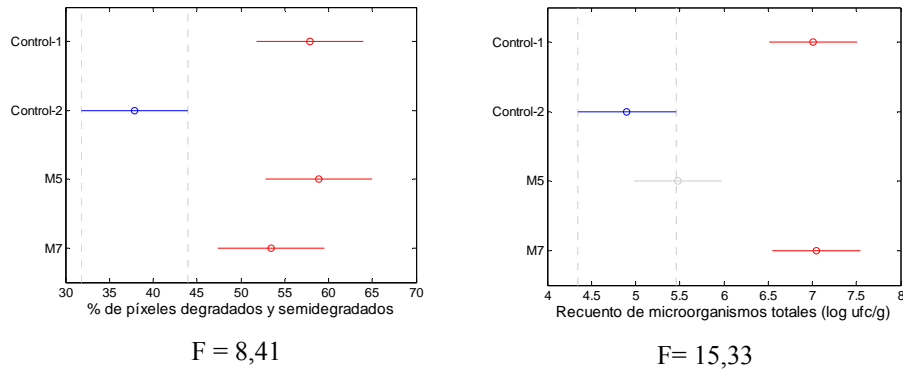


Figura 5. Comparación múltiple del % de píxeles degradados y semi-degradados (izquierda) y el recuento de microorganismos totales (derecha) categorizados por tratamiento (Control-1, Control-2, M5 y M7). Los puntos representan el valor medio y las líneas horizontales el rango considerando el error estándar de la media.

Conclusiones

En el presente trabajo se presenta una primera aproximación a la aplicación de MIA a las imágenes hiperespectrales de espinacas sometidas a diferentes cargas microbiológicas. Se han definido los espectros representativos de tres niveles diferentes de degradación, a partir de los cuales se clasifican todos los píxeles de las imágenes adquiridas. En general, las imágenes con los porcentajes más altos (superiores a 50%) de píxeles semi-degradados y degradados correspondieron a contenidos microbiológicos superiores a 5 unidades logarítmicas de ufc, lo que permitiría utilizar la imagen hiperespectral para la identificación de muestras con una carga microbiológica media superior a ese valor clave en el deterioro de un alimento perecedero, aunque el sistema no ha permitido distinguir entre muestras sometidas a cargas microbiológicas conformadas por distintas especies, entre ellas *Listeria innocua*.

Agradecimientos

El presente trabajo se ha desarrollado a partir de los avances conseguidos en el proyecto nacional MULTIHORT (AGL2008-05666-C02-01/ALI). Los autores agradecen la colaboración del Centro de Vigilancia Sanitaria Animal (VISAVET de la Universidad Complutense de Madrid).

Bibliografía

- Babic, I., Watada, A.E. (1996). Microbial populations of fresh-cut spinach leaves affected by controlled atmospheres. *Postharvest Biology and Technology* **9**, 187–193.
- Dale, L.M., Thewis, A., Boudry, C., Rotar, I., Dardenne, P., Baeten, V., Fernandez Pierna J.A. (2013). Hiperespectral imaging applications in agriculture and agro-food product quality and safety control: A review. *Applied Spectroscopy Reviews* **48**, 142-159.
- Diezma, B., Lleó, L., Herrero, A., Lunadei, L., Roger, J.M. (2011). La imagen hiperespectral como herramienta de evaluación de la calidad de hortaliza de hoja mínimamente procesada. *VI Congreso Ibérico de AgroIngeniería*, Évora (Portugal), ISBN: 978-972-778-113-3.
- Duchesne, C., Liu, J.J., MacGregor, J.F. Multivariate image analysis in the process industries: A review. (2012). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **117**, 116-128.
- Kang, S., Lee, K., Son, J. Kim, M.S. (2011). Detection of fecal contamination on leafy greens by hyperspectral imaging. *Procedia Food Science* **1**, 953-999.



- Prats-Montalban, J.M. (2005). Control estadístico de procesos mediante análisis multivariante de imagen. Th. Doctoral Universidad Politécnica de Valencia.
- Siripatrawan, U., Makino, Y., Kawagoe, Y., Oshita, S. (2011). Rapid detection of *Escherichia coli* contamination in packaged fresh spinach using hyperspectral imaging. *Talanta* **85**, 276-281.