Ultrasonidos para la detección y el análisis no invasivo de microorganismos en productos lácteos

José Ramón Iglesias (jose.iglesias@capsa.es)
Domingo Terroba (domingo.terroba@capsa.es)

1. Antecedentes

Existen trabajos que mencionan la utilización de los ultrasonidos para la detección de la degradación de alimentos envasados (Gestrelius et al., 1991), utilizando una técnica ultrasónica de medida por efecto doppler, del "streaming" acústico. Con un concepto distinto, Ahvenainen et al. usaron la ecografía para la detección de microorganismos (Ahvenainen et al, 1989). Este método no es apto para su uso en envases de cartón, ya que los sistemas ecográficos carecen de la sensibilidad adecuada para ello. En una patente del año 1987, M. Nagata et al. describen un método ultrasónico para la detección de microorganismos en productos envasados a través de la medida de transmisión de propagación ultrasónica. Hæggström (1997) fue capaz de mejorar la precisión del sistema de Nagata, detectando contaminaciones en leche y sopa en etapas tempranas de crecimiento, aunque se vio obligado a utilizar envases modificados para poder sumergirlos en agua.

2. Estudio preliminar

Se inició primeramente un estudio de muestras en envases de cristal de laboratorio con objeto de determinar la capacidad de detectar una amplia variedad de contaminaciones en leche mediante un dispositivo de medida de transmisión de señales ultrasónicas. Los envases de cristal favorecieron la posibilidad de realizar el control térmico a través de un baño líquido.

Las muestras de leche eran inoculadas y envasadas en botellas de vidrio de 250 ml. Las botellas con las muestras se almacenaban en una nevera para su conservación a 4 °C, durante un tiempo siempre inferior a 5 días y hasta su uso para la medida. De forma paralela se inoculaban otras botellas con la misma concentración de microorganismos para poder correlacionar las medidas de propagación ultrasónica con las medidas de crecimiento bacteriano mediante PCA.

El dispositivo experimental aparece esquematizado en la figura 1. En él podemos apreciar un sistema emisor, un sistema receptor y el baño donde las muestras de leche se mantienen a la temperatura constante de 35 °C. El sistema emisor consta de un transductor piezoeléctrico alimentado eléctricamente por un generador de funciones Agilent 33120 que proporciona a dicho transductor trenes de onda de 10 V pico a pico. El sistema receptor está formado por un transductor piezoeléctrico que envía la señal a un osciloscopio Tektronix TDS520. Por último, las señales capturadas se almacenan en un ordenador a través de un software desarrollado para esta aplicación. Los transductores (figura 2) están fabricados en base a un disco piezoeléctrico PZ 27 (Ferroperm) de 20 mm de diámetro. Se les ha dotado de una contramasa de Araldite –Ciba&Geigy- y una línea de retardo de metacrilato. Se realizaron estudios con distintas frecuencias de trabajo entre 1 y 4 MHz. El baño termostático dispone de un control de temperatura con una precisión de 0,01 °C. Sin embargo, al no estar diseñado el tanque de agua para esta aplicación específica, pueden aparecer gradientes y fluctuaciones de temperatura del orden de la décima de grado. Por ello se estimó conveniente realizar la medida con una referencia de leche estéril que permita eliminar el error experimental que proviene de los defectos de control de temperatura del baño.

Para obtener los parámetros acústicos relevantes de cara a la detección del crecimiento de microorganismos, se adquirieron las señales a través del osciloscopio y se almacenaron en el ordenador a intervalos de 3 minutos. El estudio de los parámetros acústicos se realiza a través del espectro en frecuencia de la señal adquirida. El módulo y la fase de la transformada proporcionan información de la amplitud de la señal y de la velocidad de propagación, respectivamente.

Las pruebas llevadas a cabo revelaron claramente la presencia microbiana en la leche. La figura 3 muestra las curvas de variación de la velocidad en las cuales se pone de manifiesto la multiplicación de los microorganismos a través del aumento de la diferencia entre la velocidad de propagación desde el comienzo de la incubación a 35ºC. El paso de la zona gris a la zona amarilla podría marcar un posible criterio para considerar como positiva la detección en un ensayo de crecimiento microbiano. En estas curvas aparecen notables diferencias entre unos microorganismos y otros, lo cual puede ser indicativo del inóculo y del tipo de contaminante de la muestra de leche. Se aprecia que la medida ultrasónica de la leche infectada con *Bacillus cereus* es la que pone de manifiesto más precoz y claramente la presencia bacteriana, mientras que la presencia de *Micrococus,* con un lentísimo crecimiento, se advierte pasadas unas 30 horas y con un leve cambio en la velocidad de propagación. Hay otros aspectos interesantes, como las distintas fases que se aprecian en la detección del crecimiento del *B. subtilis* que podrían estar relacionados con distintos procesos metabólicos.

De esta manera se estableció la potencialidad de la medida ultrasónica como método de detección de posibles contaminaciones microbianas en la leche durante las etapas iniciales de crecimiento de dichas contaminaciones. Según esto, la detección tiene lugar antes de que se produzcan cambios drásticos en las propiedades físico-químicas de la leche. Otra importante característica del procedimiento de detección ultrasónica de microorganismos es su relativa inespecificidad, mostrándose válido para un amplio espectro de contaminaciones, si bien es cierto que la velocidad de detección no es la misma para los distintos microorganismos. Esto puede proporcionar pistas acerca de la naturaleza del microorganismo principal responsable de una determinada contaminación. Sin embargo, para poder realizar una discriminación entre microbios sería necesario un estudio estadístico mucho más amplio de las posibles contaminaciones. El hecho de que en muchos casos, éstas no se deban a un sólo microorganismo dificulta aún más la discriminación entre ellos. La variación de los distintos parámetros que caracterizan la propagación ultrasónica en leche contaminada parece depender de distintas causas como son el tamaño y número de microorganismos presentes, el tipo de metabolismo y las características del sustrato lácteo en el que crecen.

2.1. Control térmico en paquetes laminados de cartón

Para llevar a cabo las medidas de propagación ultrasónica a través de envases de cartón fue necesario cambiar el sistema de control térmico que pasó de un baño líquido a una estufa. Al igual que el baño de agua, esta cámara se estabilizaba a 35 ºC Esto supuso realizar cambios en los propios transductores que ahora habían de incorporar unos discos elásticos de silicona de unos 2 mm de espesor y 40 mm de diámetro, ligeramente convexos, permitiendo una adecuada transmisión de la onda ultrasónica entre estos y el envase. La atenuación de la onda, por otro lado, es un factor especialmente importante en envases con capas de papel, ya que puede dar lugar a la pérdida total de la señal ultrasónica antes de poder ser recibida. Se escogió una frecuencia de trabajo de 1 MHz. En la figura 4 se muestra la variación de temperatura que experimenta el aire del interior de la cámara (rojo) desde que se conecta el

sistema de control de temperatura, partiendo de temperatura ambiente. En negro se presenta el calentamiento de la leche en el interior del envase, partiendo también de temperatura ambiente. Se puede apreciar que hay una notable diferencia entre la media hora que tarda la cámara en ponerse a la temperatura de incubación de 35 ºC, y las 13-15 horas que tarda la leche en alcanzar dicha temperatura. Esto es debido a las buenas prestaciones que como aislante térmico tienen este tipo de envases. Durante el tiempo que la temperatura va aumentando, también lo hace la velocidad de propagación. Para poder distinguir claramente que las variaciones de velocidad son debidas a la presencia de microorganismos en la leche y no a un cambio en temperatura es deseable alcanzar la temperatura de incubación lo antes posible. Esto nos obligó a buscar otras formas más eficaces de calentar la leche en el interior del envase, a través de resistencias en contacto directo con los mismos. De esta forma, el tiempo de incubación se vio reducido apreciablemente, según se aprecia en la figura 5.

2.2. Control de la humedad

A lo largo de numerosos ensayos se pudo comprobar que, a pesar de que la temperatura de la leche en el interior de los envases llegaba a estabilizarse al cabo de un tiempo, la velocidad de propagación de la señal ultrasónica no alcanzaba la estabilización ni tan siquiera después de 2-3 días de medida. Finalmente se descubrió que, a pesar de las capas plásticas externas del envase, el cartón era capaz de intercambiar humedad con el ambiente, siendo este intercambio muy lento. Desafortunadamente, pequeños cambios en el contenido de humedad del envase provocan variaciones en la medida de la amplitud y velocidad de propagación comparables a las producidas por la presencia de microorganismos en la leche. Estos cambios lentos producidos por las variaciones en el contenido de humedad se pueden observar simplemente añadiendo o retirando un recipiente con agua del interior de la estufa. De esta forma se midió el tiempo de vuelo de una onda ultrasónica al atravesar una capa del laminado del envase. El resultado aparece en la figura 6 donde se aprecian los cambios evidentes en dicho tiempo al variar las condiciones de humedad, de manera que cuando esta decrece, también lo hace el tiempo que tarda la señal en atravesar el material. Estos resultados indican la necesidad de realizar no sólo un adecuado control térmico de las muestras de leche, sino también de la humedad ambiente en el lugar donde se realizan los ensayos de detección microbiológica.

2.3. Esquema del prototipo: descripción de los elementos

A continuación se diseñó y desarrolló un prototipo con 8 alojamientos para poder analizar simultáneamente 8 envases. Este prototipo se ha realizado según las especificaciones contempladas en la Patente PCT/ES 03/00287 (Elvira et al., 2003). El cuerpo principal del sistema de medida lo constituye una cámara climatizada en temperatura y humedad (Figura 7) a la cual van sujetos los 8 alojamientos. A dicha cámara han de llegar las conexiones eléctricas pertinentes, tanto para realizar la climatización, como para la transmisión de señales entre los emisores y receptores de ultrasonidos con los sistemas electrónicos de generación y detección de señales, respectivamente. Asimismo, el sistema dispone de una conexión de agua para llevar a cabo el control de humedad. La climatización se controla a través de dispositivos tipo PID que regulan la temperatura de cada uno de los 8 alojamientos, así como la temperatura y la humedad general de la cámara principal. La electrónica de excitación y recepción de ultrasonidos (Figura 8) la componen un generador de señal Agilent 33120, un osciloscopio digital Tektronix 220 y un multiplexor de 8 canales de emisión y 8 de recepción desarrollado en la Universidad de Jaén. Este multiplexor, comandado por el ordenador de control vía RS-232, pone en conexión el generador y el osciloscopio con la pareja emisor-receptor de ultrasonidos de cada canal sucesivamente. Los transductores ultrasónicos,

desarrollados en el Instituto de Acústica específicamente para este prototipo, se diseñaron para una frecuencia de trabajo de 800 kHz. Las señales capturadas por el osciloscopio se envían vía GPIB a la CPU de control, donde son tratadas e interpretadas para evaluar el estado de la leche. Todo el proceso de medida viene comandado por la CPU a través de un software desarrollado en LabView, mediante el cual se mide la propagación ultrasónica en los 8 canales sucesivamente, se registran los datos de humedad y temperatura y se obtienen y analizan las señales del osciloscopio. Por último, el algoritmo de interpretación de datos desarrollado, activa una alarma en el caso de que las medidas indiquen un crecimiento microbiano en un determinado paquete.

2.4. Resultados experimentales

El desarrollo de las pruebas para evaluar el funcionamiento del dispositivo consistió en la medida de paquetes de leche recién envasada, estéril, y otros inoculados con distintos microorganismos. Paralelamente se realizaban recuentos microbianos por PCA del inóculo así como de la leche después de haber sido analizada mediante ultrasonidos, comparándose los resultados del prototipo con dichos recuentos. Se tomaban 8 paquetes de leche de los cuales 6 eran inoculados y 2 se dejaban como estériles. Tras la incubación se procedía al análisis microbiológico (PCA, Bactometer, Promilite III de Promicol) y físico-químico (pH, acidez y estabilidad al etanol) de las muestras inoculadas.

A partir de un conjunto estadísticamente significativo de curvas estériles (amplitud y tiempo de vuelo) pertenecientes a paquetes recién salidos de línea se estableció el comportamiento de la curva de esterilidad de cada envase. Dicha curva alude al trazo que se obtendría en la medida en el caso de que un determinado paquete fuera estéril. Esta curva es calculada para cada paquete (ya que las medidas de cada paquete son ligeramente distintas unas de otras) durante las primeras horas de medida, en particular entre la quinta y séptima horas. Hasta la quinta hora entendemos que las variaciones obtenidas en las medidas de los parámetros ultrasónicos responden a la estabilización en temperatura y humedad de los paquetes. En las figuras 9 y 10 se muestran ejemplos de detección de *B. cereus* y *P. vulgaris* atendiendo a la medida de la amplitud de la onda y de su tiempo de vuelo respectivamente. Se han encontrado distintos comportamientos para la amplitud y el tiempo de vuelo para los distintos microorganismos inoculados. Esto muestra que la dependencia entre los parámetros ultrasónicos y el crecimiento microbiano responde a diferentes efectos que dicho crecimiento produce en la leche. Podemos estar hablando de aumento en la viscosidad debido a los productos de desecho del metabolismo, cambio en las propiedades elásticas debidos a cambios en la estructura de las proteínas, e incluso a mejora del acoplamiento transductor-paquete en aquellos casos en los que el crecimiento de bacterias produce gas en abundancia, incrementándose la presión en el interior de los paquetes (los cuales pueden llegar a romperse si no se extraen a tiempo de la cámara de medida). Se pudieron asimismo apreciar similitudes entre especies correspondientes al mismo género.

3. Conclusiones

El aumento de la automatización y el control en la industria alimentaria está llevando a la incorporación de numerosos sensores. En muchos casos, se utilizan distintas técnicas de medida que proporcionan información complementaria de los procesos analizados. En este escenario es esperable la aparición de nuevos sistemas de ultrasonidos junto con otras técnicas de análisis (biosensores, sensores ópticos, infrarrojos,...) en las cadenas de producción y control de calidad de alimentos.

En el presente trabajo se han mostrado algunas posibles aplicaciones de la medida de los parámetros de propagación ultrasónica al control de procesos de producción de alimentos. Las técnicas ultrasónicas son en general muy robustas, pero posiblemente su principal ventaja es la posibilidad de caracterizar materiales de forma no invasiva. Esto hace posible la detección de contaminaciones en leche envasada sin abrir dicho envase o el seguimiento de un proceso fermentativo sin introducir un sensor en el interior del reactor, según se ha descrito. De esta manera se evitan posibles contaminaciones, peligro siempre presente en aquellas técnicas de medida que precisan la extracción de muestras.

Sin embargo, las medidas ultrasónicas suelen ser medidas indirectas, es decir, medidas en las que las magnitudes detectadas se relacionan con alguna característica del medio que es la que realmente nos proporciona la información que se busca. Esta característica pone de manifiesto la carencia en muchos casos de modelos válidos y estudios tanto teóricos como experimentales que permitan relacionar las distintas magnitudes. Por ello es necesario realizar un intenso trabajo en este sentido que aumente las capacidades de las técnicas ultrasónicas para obtener información de los procesos industriales de elaboración de alimentos que pretendan ser inspeccionados mediante ellas.

4. Referencias

- Ahvenainen, R, Mattila, T, Wirtanen, G, 1989. Lebensm.-Wiss. Technol. 22, 268-272.
- Becker, T., Mitzscherling, M., Delgado, A., 2001. Engineering Life Science 1(2), 61-67.
- Gestrelius, H., Mattila, T., Ahvenainen, R., 1991. Trends in Food Science and Technology 5 (12), 379-383 .
- Elvira, L., Montero de Espinosa, F., Resa, P., Gómez-Ullate, Y, 2003. Patente Europea PCT/ES 03/00287.
- Hæggström, E., 1997. Applied Physics Series No. 214. 1-115. Espoo, Finland
- Kress-Rogers, E. and Brimelow, C.J.B., 2001. Instrumentation and sensors for the food industry, 2nd ed., pp.355-402. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- Nagata, M., Kaneoka, T.,Imano, S.,Matumoto, H., 1987. Fujimori Kogyo Co. Ltd.. EP269815.
- Rodríguez, A., Canosa, J. & Tojo, J. (2001). *J. Chem. Thermodynamics, 33,* 1383-1397.
- Urick, J.R., (1947). Journal of Applied Physics 18, 983-987.
- Valtz, A., Coquelet, C., Nikitine, C. & Richon, D. (2006). *Thermochimica Acta, 443*, 251–255.
- Winder, W.C., Aulik, D.J., Rice, A.C., 1970. American Journal of Enology and Viticulture 21 (1), 1-11.

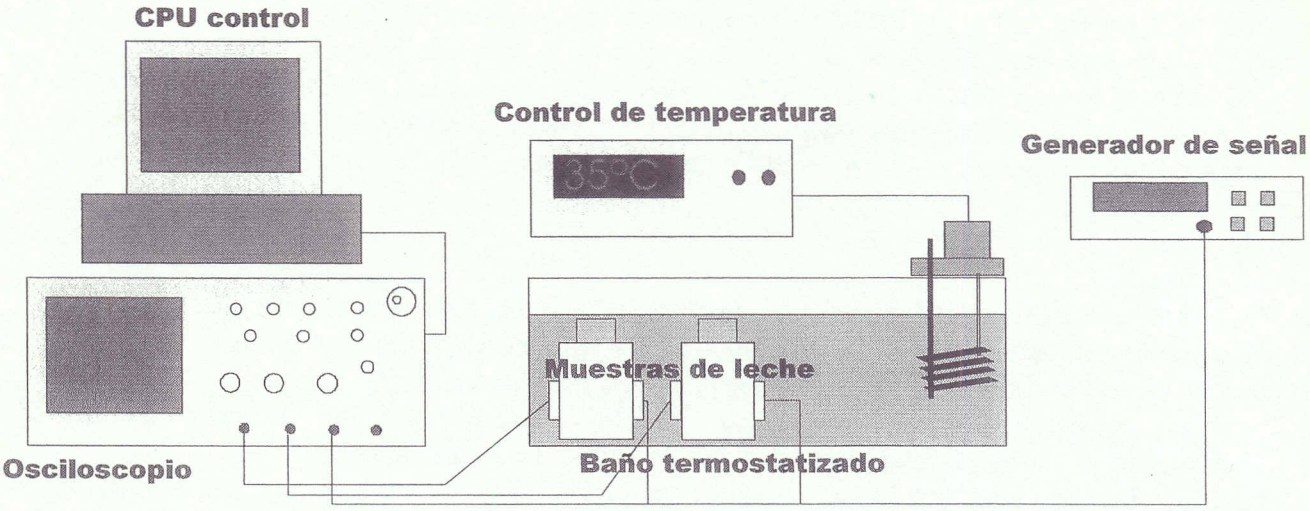

Figura 1. Esquema de la técnica experimental de medida

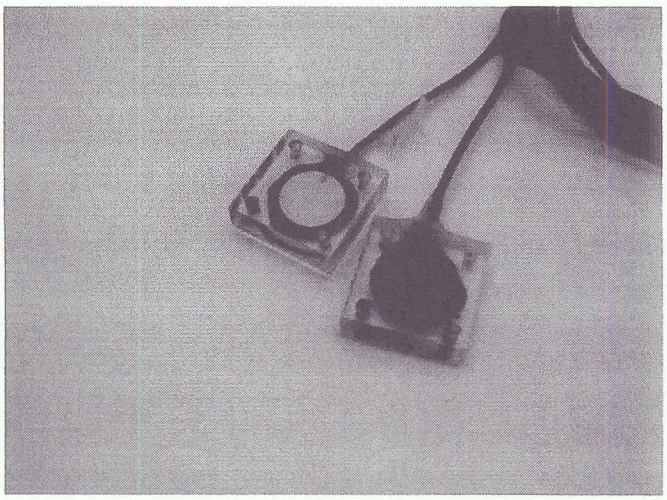

Figura 2. Vista trasera y delantera de 2 transductores para medidas de transmisión.

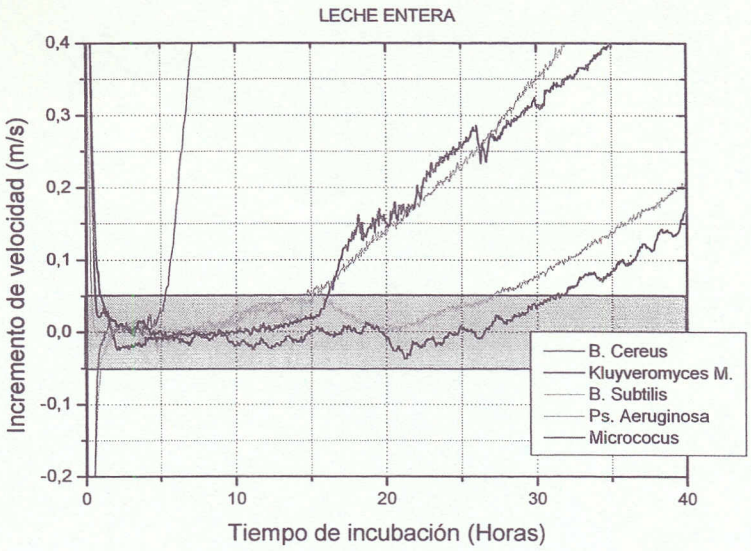

Figura 3. Velocidad de propagación en leche entera contaminada por distintos microorganismos

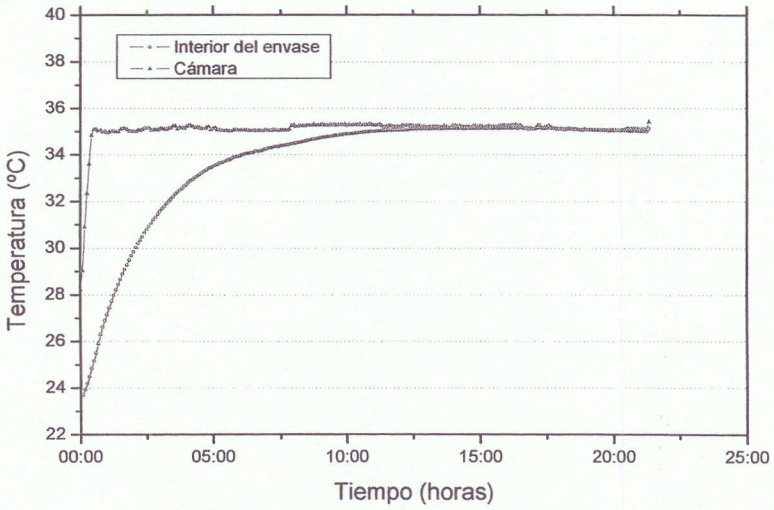

Figura 4. Curvas de estabilización térmica de la cámara (rojo) y la leche dentro del envase (negro) partiendo de temperatura ambiente.

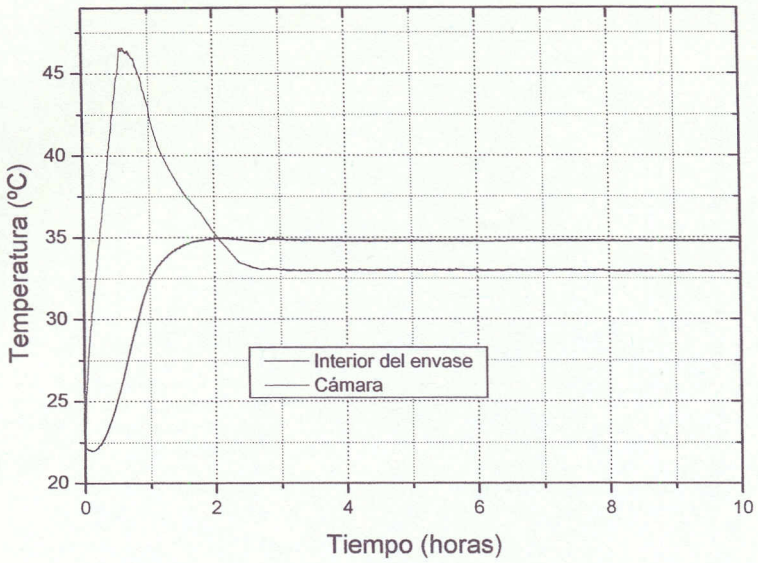

Figura 5. Temperatura de la cámara (rojo) y de la leche en el interior del envase (negro) utilizando la placa de calentamiento en contacto.

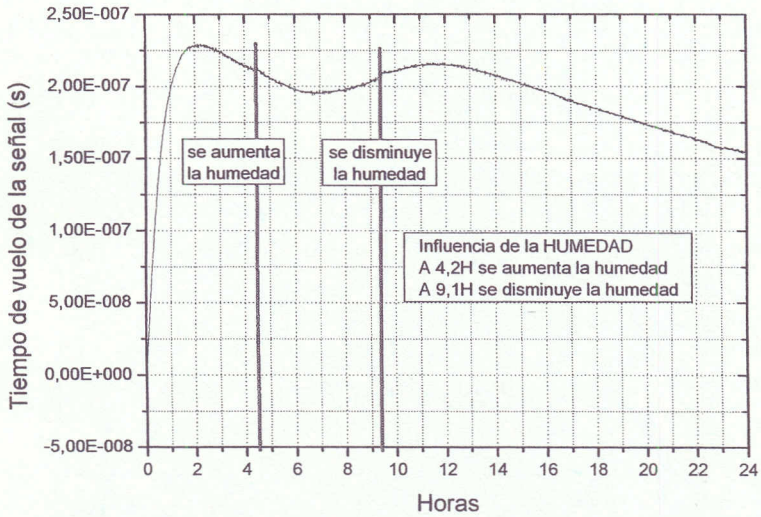

Figura 6. Variación del tiempo de vuelo de la señal al atravesar una muestra de pared del envase para distintas condiciones de humedad.

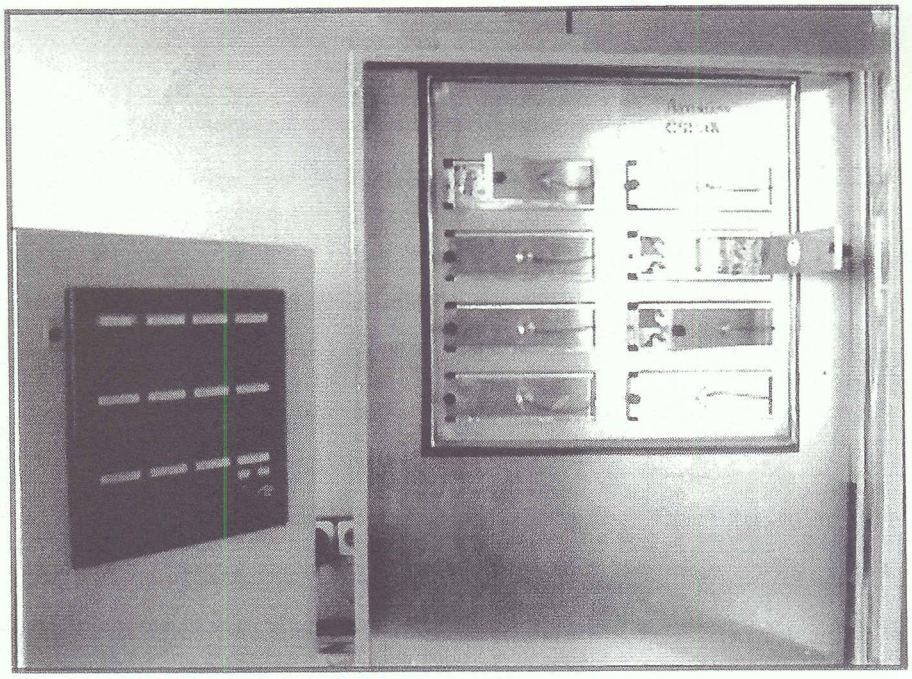

Figura 7. Cámara de medida y cuadro de control de climatización

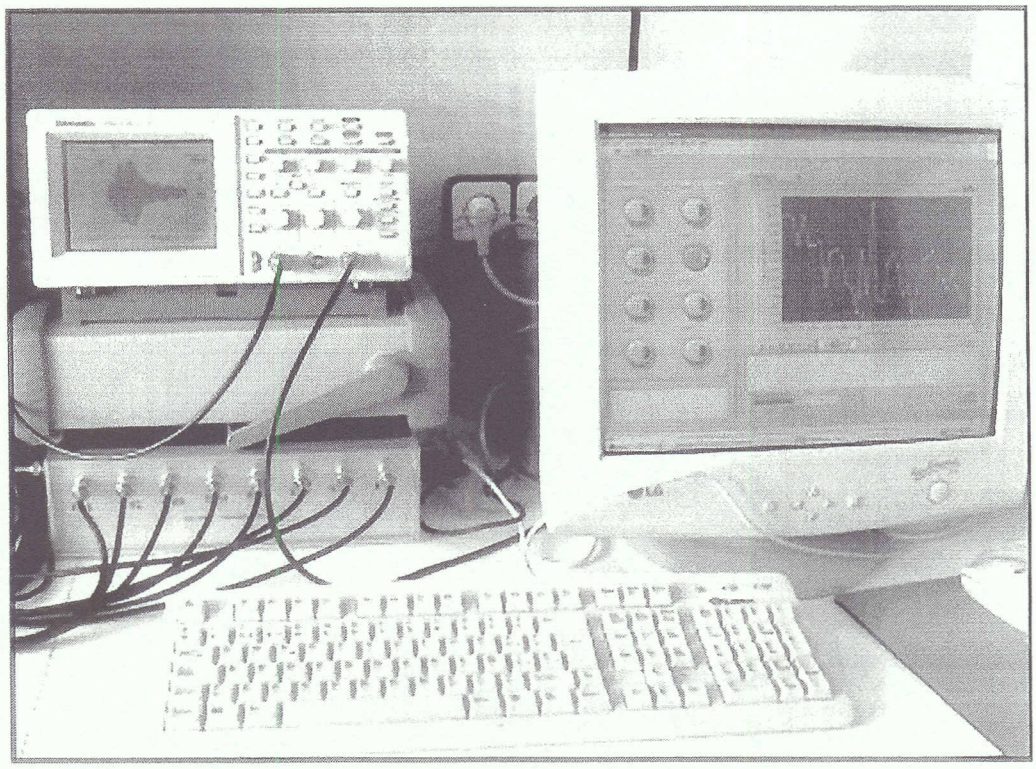

Figura 8. Electrónica de generación y recepción y CPU de control con el software activo.

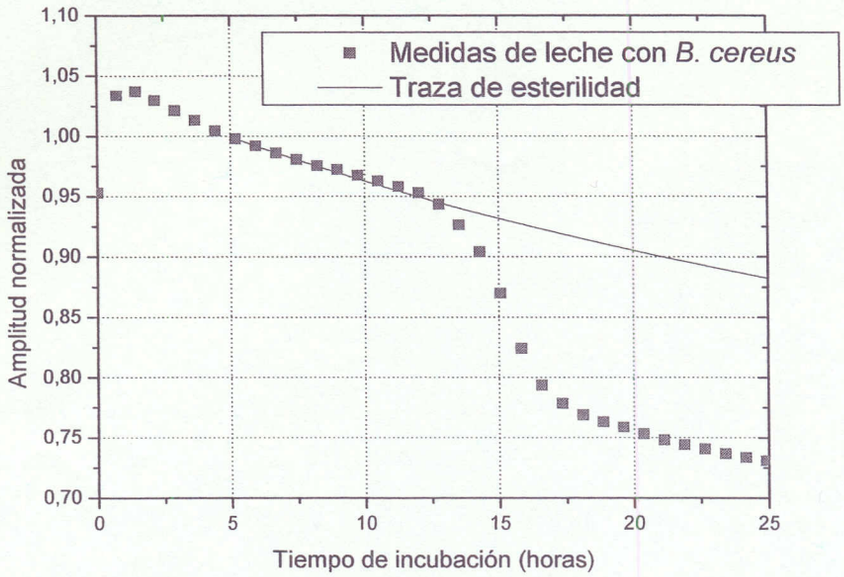

Figura 9. Amplitud de la onda medida en leche inoculada con *B. cereus* (cuadros). A partir de la hora 13 se aprecia una notable diferencia con respecto al comportamiento de la curva de esterilidad (línea continua).

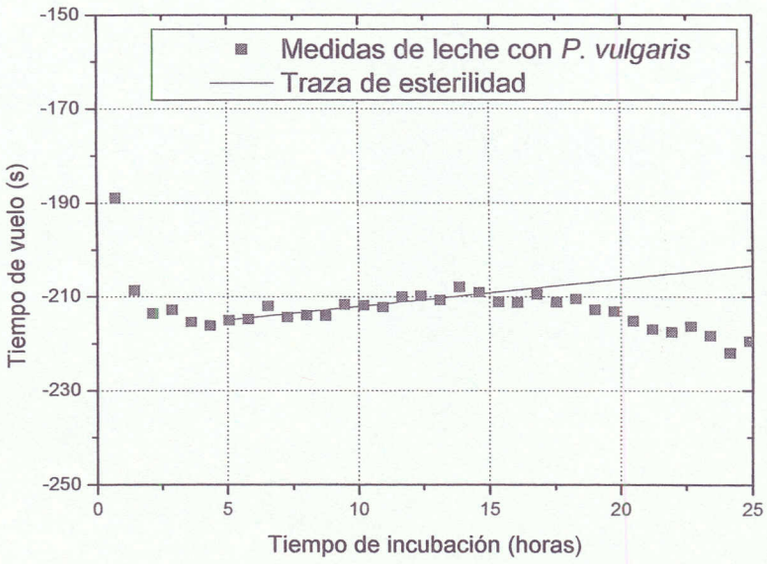

Figura 10. Tiempo de vuelo de la onda medida en leche inoculada con *P. vulgaris* (cuadros). A partir de la hora 18 se aprecia una notable diferencia con respecto al comportamiento de la curva de esterilidad (línea continua).