

Dos configuraciones diferentes para la descripción temporal de actividad de *Escherichia coli* mediante speckle dinámico

E.E. Ramírez Miquet, L. Martí López y O.R. Contreras Alarcón
Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear,
Calle 30 No. 502, Miramar, Playa, La Habana, Cuba.
e-mail: ermiquet@ceaden.edu.cu

Recibido el 1 de abril de 2011; aceptado el 9 de agosto de 2011

Se presentan los resultados experimentales de la aplicación de la técnica de speckle dinámico para describir actividad de células bacterianas de la especie *Escherichia coli* (ATCC 25922) cultivadas en placas de Petri de dos compartimientos, empleando uno de ellos como control no inoculado. En los experimentos se registraron imágenes de cuadros de speckle que se procesaron y posteriormente, se obtuvieron señales ópticas de la actividad bacteriana utilizando una única concentración de inóculo y dos configuraciones diferentes de incidencia de haz de luz láser sobre el medio bajo estudio. Los resultados obtenidos para ambas configuraciones son discutidos. Se concluye que el método, la instalación diseñada y montada y el procesamiento de imágenes asociado, permitieron detectar y describir la actividad bacteriana.

Descriptores: Speckle dinámico; actividad bacteriana; inóculo; UFC; procesamiento de imágenes.

We present the experimental results of applying the laser dynamic speckle technique to describe bacterial cells activity corresponding to the species *Escherichia coli* (ATCC 25922) cultivated in two-compartment Petri dishes, using one of them as a non-inoculated control blank. In the experimental series we registered speckled images and after processing them, we obtained optical signals of the bacterial activity corresponding to a single cell concentration and two different laser beam impact configurations. The results for both configurations are discussed. We conclude that the method, the designed and mounted set-up and the associated image processing allowed the detection and description of the bacterial activity.

Keywords: Dynamic speckle; bacterial activity; inoculum; CFU; image processing.

PACS: 42.30.Ms; 42.62.Be

1. Introducción

Algunos medios biológicos y no biológicos como las frutas, las plantas, las semillas o los microorganismos y las pinturas o las superficies sometidas a corrosión, presentan cambios en la textura superficial y fluctuaciones en los índices de refracción. Estos efectos producen que cuando las superficies de estos medios son iluminadas, la luz se disperse [1-15]. Los procesos que ocurren en estos medios han sido descritos mediante diferentes métodos, entre ellos la termografía infrarroja [16-17], la tomografía óptica [18] o la microcalorimetría [19] y su empleo muchas veces requiere de una instalación sofisticada o de condiciones de trabajo bien controladas.

Cuando incide luz coherente sobre una superficie se produce una distribución de irradiancia aleatoria denominada patrón de speckle [1-15]. La formación de estos patrones viene dada por la distribución aleatoria de fases que se produce cuando la luz se refleja en la superficie y aparecen puntos claros y oscuros típicos de un cuadro de interferencia. Si la superficie iluminada presenta algún grado de actividad, como en el caso de los medios antes mencionados, se observa un patrón de speckle dinámico. Este fenómeno se manifiesta como un cambio en la estructura del patrón de moteado en el tiempo y se relaciona con la evolución del medio dispersor, por lo que la caracterización de la evolución de dicho patrón, puede suministrar información acerca de los procesos que tienen lugar en el medio.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos a partir de experimentos que permitieron detectar actividad bacteriana de cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) empleando las propiedades de los speckles dinámicos. Dicha actividad pudo describirse mediante el empleo de un procesamiento digital de imágenes basado en el método de las diferencias temporales [13]. Algunos trabajos previos tratan los sistemas bacterianos utilizando técnicas de speckle [20-21]. Sin embargo, el tratamiento tiene un enfoque diferente desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo, no siendo un objetivo la determinación en el tiempo del momento a partir del cual el sistema biológico comienza a comportarse significativamente diferente.

La *E. coli* constituye un modelo experimental atractivo y extensamente empleado en la literatura. Las bacterias de esta especie habitan típicamente en los intestinos de mamíferos y por ende en las aguas negras y su presencia está asociada al establecimiento de algunos estándares higiénicos sanitarios por ser responsables de enfermedades heteropatógenicas, heterotoxigénicas, heteroinvasivas y hemorrágicas [22-24,27].

Para desarrollar el trabajo experimental que se pretende abordar, se ha supuesto que la técnica de speckle dinámico podría describir la actividad bacteriana relativa a cepas de *E. coli*. Esta hipótesis se basa en varios elementos. La actividad que describe la dinámica del sistema se manifiesta cuando el cuadro de interferencia aleatorio cambia su estructura debido al movimiento de las zonas dispersoras, en este caso las células de las bacterias y sus asociaciones. Por otra parte los

cambios en el índice de refracción que se producen, generan variaciones en el camino óptico e imprimen dinámica al sistema. Si un haz de luz coherente atraviesa un medio poblado de bacterias o se refleja en su superficie, experimentará cambios de fase, cambios de dirección de propagación, cambios de polarización y cambios de atenuación que podrían utilizarse para describir la actividad bacteriana. El registro de imágenes de speckle de células bacterianas debe brindar información sobre su actividad, debido a que los cambios que experimenta la fase de la onda luminosa producen cambios de la estructura del cuadro de speckle que pueden a su vez, asociarse a los procesos que tienen lugar en el medio bajo estudio.

Partiendo de las evidencias enunciadas, esta investigación se propone como objetivo probar la técnica de speckle dinámico y determinar sus posibilidades para describir la actividad de células de la especie *E. coli*, utilizando dos configuraciones diferentes en la forma de iluminar la muestra. Se pretende comprobar experimentalmente si: a) la técnica es capaz de detectar actividad relativa a células *E. coli*, b) los valores de actividad obtenidos responden a la configuración utilizada para iluminar la placa de Petri y c) el tiempo en que se detecta la actividad diferenciada entre el medio de cultivo y las bacterias es o no dependiente de la configuración utilizada.

2. Materiales y métodos

En los experimentos se utilizaron placas de Petri de dos compartimientos. Ambos compartimientos contienen medio de cultivo sólido (Agar Mueller Hinton (MHA), Oxoid) pero solo uno de ellos fue inoculado con células bacterianas utilizando el método de hisopo calibrado [25], con el que se logra una distribución homogénea de las cepas bacterianas en el medio de cultivo. De esta forma, por un lado se logra un registro de la actividad de fondo inherente al medio de cultivo, mientras en el otro compartimiento se registra la actividad bacteriana. El medio de cultivo es de color verde muy pálido, prácticamente transparente, de manera que es posible monitorear un proceso que ocurre a nivel superficial.

La Fig. 1 muestra un esquema simplificado de la instalación experimental con dos configuraciones diferentes para iluminar la muestra objeto de estudio. En la configuración a), la placa de Petri está colocada de manera que el haz incide directamente sobre el medio de cultivo. En el esquema representado en b) se muestra otra forma de iluminar la placa; en este caso el haz incide por la parte inferior, de manera que accede indirectamente al medio de cultivo después de atravesar un volumen del material de la placa.

El esquema de la instalación se describe a continuación:

La muestra (1) está en una placa de Petri 90 mm de diámetro que contiene medio de cultivo. El diodo láser (2) (Sanyo, DL3147-060) emite luz de 650 nm de longitud de onda con una potencia luminosa de 10 mW. A su vez, esta fuente de luz láser está acoplada a una lente convexa (3) que ilumina cada uno de los compartimientos de la placa de Petri con un haz divergente de 12 cm² y trabaja en un régimen

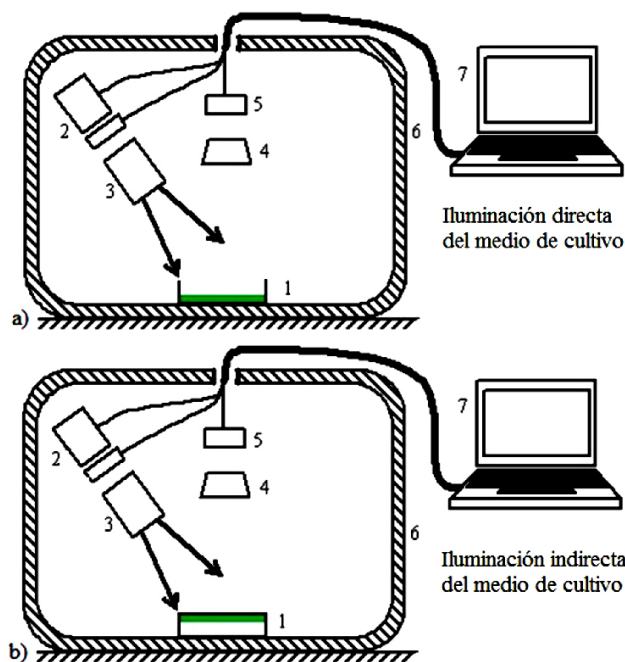


FIGURA 1. Configuraciones utilizadas en la realización de los experimentos.

estabilizado en temperatura. El objetivo fotográfico (4) (Krasnogorsky factory S. A. Sverev, Industar 61 L/D) tiene una distancia focal de 50 mm y está acoplado a una cámara CMOS USB Vimicro ZC0301PLH (5).

El dispositivo anteriormente descrito se coloca en el interior de una incubadora (6) estabilizada a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, temperatura que se reporta como la óptima para que se produzca el crecimiento de la *E. coli* [26-27].

La señal de la cámara se introduce en el computador (7) mediante una interfaz USB. El ordenador se encarga de controlar la captura de los cuadros de speckle resultantes de la instalación y de procesarlos empleando unos códigos programados en Matlab R2009a.

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando 0,7 McFarland como concentración de inóculo, la cual es equivalente a $2,1 \times 10^8$ UFC/mL. Dicha concentración se determinó utilizando el sistema Diramic [28] que proporciona un resultado de UFC/mL utilizando la turbidez del medio de cultivo poblado con bacterias. Cada experimento para cada configuración se repitió seis veces.

El medio de cultivo se preparó a partir de bases deshidratadas, siguiendo las especificaciones de los fabricantes [29]. El medio está compuesto por infusión de carne (2 g/L), almidón (1,5 g/L), peptona de caseína H (17,5 g/L) y agar bacteriológico (17 g/L) y fue comprado por el Biocen al fabricante alemán SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH Berlin. Inmediatamente después de un proceso de esterilización, se dejaron enfriar las bases hasta $45-50^\circ\text{C}$. Luego se coloraron las placas de Petri en el equipo de flujo laminar y se les agregó el medio de cultivo hasta una altura de 1 mm, se dejó solidificar y se incubó durante 24 horas a 37°C .

El procedimiento utilizado para la ejecución de los experimentos es el siguiente:

1. Se esteriliza la incubadora con alcohol al 90 % de pureza.
2. Se prepara la placa de Petri con medio de cultivo. Se siembran las células de las bacterias *E. coli* (ATCC 25922), en el medio de cultivo de uno de los compartimientos.
3. Se energizan el diodo láser y la incubadora.
4. Inmediatamente se coloca la placa de Petri adecuadamente en la parte inferior del equipo de manera que queden iluminados ambos compartimientos. Se verifica utilizando el programa controlador que la cámara esté bien enfocada y con parámetros que permitan capturar una imagen de un cuadro de speckle completamente desarrollado.
5. Se cierra la incubadora herméticamente y se esperan 25 segundos hasta que se establezca la temperatura.
6. Se ejecuta el programa de las capturas. A partir de este instante y durante 24 horas, se captura una imagen de la placa de Petri cada 15 minutos, para un total de 96 imágenes. El programa indica que las capturas han terminado 24 horas después.
7. Se verifica que no se hayan formado colonias en el compartimiento de control para garantizar que no se contaminó la placa con otras bacterias que pudieran poblar el interior de la incubadora.
8. Se procesa la información obtenida de la instalación.

El procesamiento de las imágenes se basó en el método de las diferencias temporales propuesto por Martí-López *et al.* [13]. Este método permite obtener la diferencia del módulo de los valores de irradiancia normalizados respecto a la potencia de dos cuadros de speckle consecutivos $D(m, n, k)$. Al sustraer estos valores pixel a pixel y hallar el módulo de la diferencia, se tiene un registro de lo que ha cambiado en el patrón de speckle como consecuencia de la actividad bacteriana que tiene lugar en el compartimiento de la placa de Petri sembrado con células de *E. coli*. De igual forma se puede conocer cómo se comporta la actividad del medio de cultivo.

La definición de irradiancia está dada por la expresión:

$$E = \frac{P}{A} \quad (1)$$

donde P representa la potencia luminosa del haz y A el área de irradiación.

Teniendo en cuenta que se registran los cambios en el patrón de speckle, el módulo de la diferencia de los valores de irradiancia viene dado por la expresión:

$$D(m, n, k) = |E(m, n, k + p) - E(m, n, k)| \quad (2)$$

donde m y n son los índices espaciales (píxeles) de la imagen y k y p representan la componente temporal de la secuencia que contienen la información de la dinámica del sistema. Para el caso específico del procesamiento de estas imágenes se utilizó $p = 1$ que permite procesar dos imágenes consecutivas.

En el procesamiento de las imágenes resultantes de la instalación se ha definido la actividad media como:

$$D_{MEAN}(k) = \frac{1}{MN} \sum_{n=1}^N \sum_{m=1}^M D(m, n, k) \quad (3)$$

Los valores de la media de la diferencia de la distribución de irradiancia son utilizados para determinar cuantitativamente la actividad bacteriana en ambas configuraciones. Si los valores medios de $D(m, n, k)$ cambian en el tiempo, es porque las bacterias están experimentando una actividad que el sistema puede detectar y el procesamiento de las imágenes puede diferenciar de la actividad inherente al medio de cultivo.

Si se utiliza un criterio de acumulación de la actividad, de manera que las fluctuaciones en los valores no se tengan en cuenta, si no que se sumen para analizar el fenómeno de manera global, entonces la definición de actividad acumulada viene dada por la expresión:

$$D_{CUM}(m, n, k) = \sum_{k=1}^K D_{MEAN}(m, n, k) \quad (4)$$

3. Resultados y discusiones

La secuencia de imágenes que se muestra en la Fig. 2 evidencia que se ha detectado actividad. Al comparar el comportamiento de la secuencia de imágenes en los compartimientos

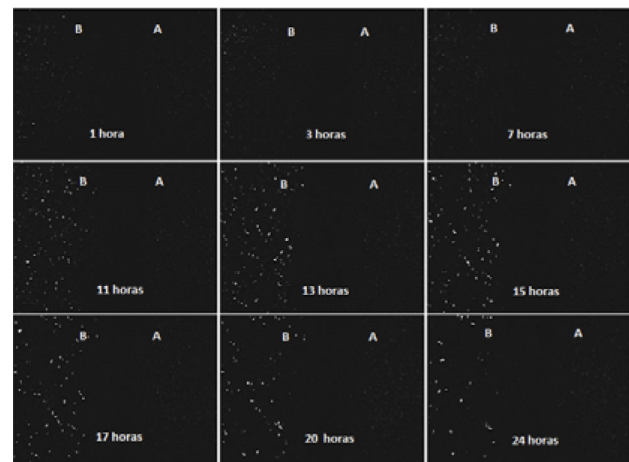


FIGURA 2. Secuencia temporal de imágenes de una placa de Petri de dos compartimientos. En el compartimiento B se inocularon cepas bacterianas a una concentración de 0,7 McFarland.

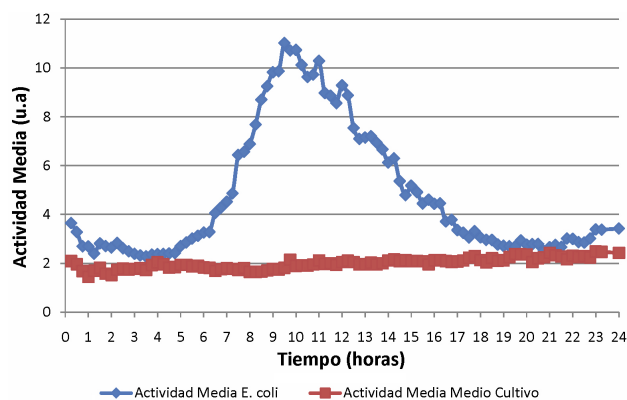


FIGURA 3. Actividad media para inóculo a 0,7 McFarland empleando la configuración de iluminación directa del medio de cultivo.

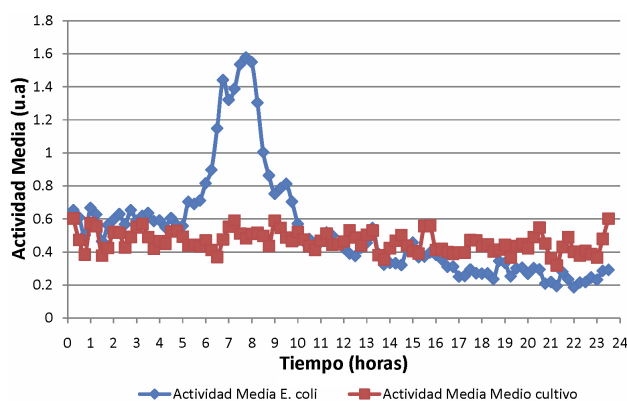


FIGURA 4. Actividad media para inóculo a 0,7 McFarland empleando la configuración de iluminación indirecta del medio de cultivo.

A (medio de cultivo) y **B** (medio de cultivo inoculado con *E. coli*), se observa que la estructura del cuadro de speckle correspondiente al compartimiento **B** de la placa de Petri se modifica en el tiempo, mientras que la del compartimiento **A** permanece muy similar.

Este resultado constituye una evidencia cualitativa de que se ha detectado un cambio en la estructura del compartimiento inoculado que está asociado a la actividad bacteriana inherente a las células de *E. coli*.

Luego de procesar las secuencias de imágenes correspondientes a ambos experimentos utilizando el método de las diferencias temporales, se obtuvieron los resultados que se muestran en las Fig. 3 y 4 para las actividades medias de ambas configuraciones.

Para la actividad acumulada se obtuvieron los resultados que se muestran en las Fig. 5 y Fig. 6.

Las gráficas de la Fig. 3 (iluminación directa) y la Fig. 4 (iluminación indirecta) muestran el comportamiento del promedio de la actividad media de los experimentos, obtenida en ambos compartimientos de la placa Petri, el inoculado con células de *E. coli* (gráfico azul), y el que solo contiene medio de cultivo (gráfico rojo). En ambas configuraciones, se detecta una actividad que se incrementa en el tiempo y luego

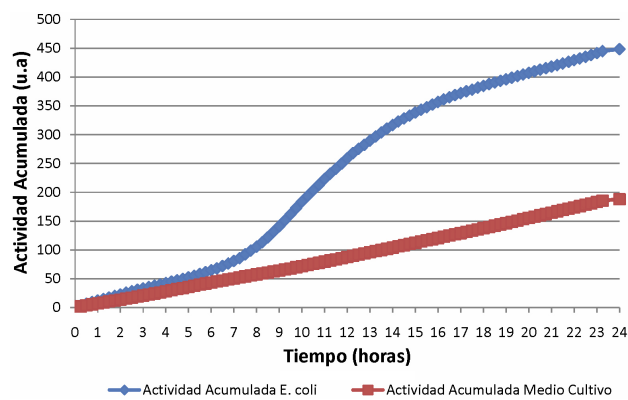


FIGURA 5. Actividad acumulada para inóculo a 0,7 McFarland con la configuración de iluminación directa del medio de cultivo

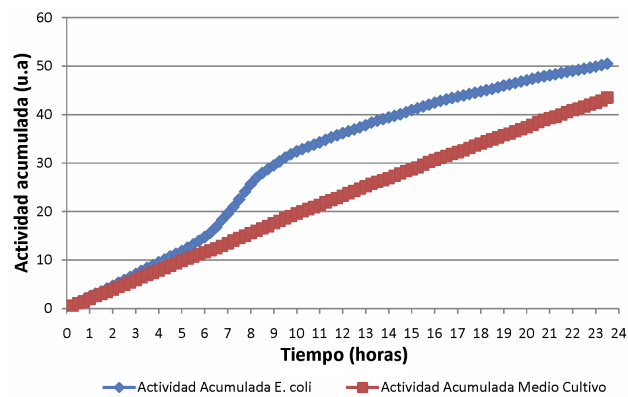


FIGURA 6. Actividad acumulada para inóculo a 0,7 McFarland con la configuración de iluminación indirecta del medio de cultivo.

tiene una decadencia en el compartimiento donde se sembraron las células de *E. coli*, mientras que en el compartimiento donde sólo se añadió medio de cultivo, la actividad se mantiene prácticamente invariable durante el tiempo de incubación. De estos resultados se deriva que la forma en que se representa la actividad bacteriana es independiente de la configuración utilizada, empleando un haz de luz que incide directa o indirectamente.

De igual forma, las Fig. 5 y 6 muestran una actividad acumulada que evidencia una diferenciación en la forma en que se comporta la actividad del medio inoculado y el no inoculado, que es independiente de la configuración de incidencia del haz de luz.

Para ambos compartimientos, el inoculado y el no inoculado, resultó notable que los valores de actividad asociados al experimento con la segunda configuración, fueron menores como resultado de incidencia indirecta de la luz, lo que está relacionado con la atenuación que experimenta el haz cuando tiene que atravesar un volumen del material de la placa, antes de incidir sobre la zona de estudio.

Esto puede explicarse si se analiza la expresión (1). En el caso en el que el haz incide indirectamente sobre el medio de cultivo, después de atravesar un volumen de la placa de Petri, los valores de actividad son menores porque la variación

de la potencia del haz $\Delta P = (P_f - P_0)$ es negativa debido a que el haz se ha atenuado y en consecuencia la irradiancia, parámetro descriptor de la actividad, disminuye.

No obstante debe señalarse que el tiempo en el que se produce la actividad diferenciada de la *E. coli* respecto a la actividad del medio de cultivo es independiente de la configuración de incidencia del haz. Este fenómeno tiene lugar aproximadamente a las 5 horas de iniciados los experimentos y tanto la actividad media como la acumulada lo hacen evidente. Esto demuestra que la técnica de speckle dinámico empleada es consecuente con el fenómeno independientemente de las condiciones de incidencia o atenuación del haz, elemento que soporta el potencial que tiene esta técnica para describir fenómenos en este tipo de medios. Este resultado coincide con los reportes de Hahn *et al.* en su trabajo [16-17], donde detectaron presencia de bacterias *E. coli* en aproximadamente 5 horas utilizando imágenes térmicas.

La forma en que se presenta la actividad puede encontrar una analogía en el trabajo de Monod [22]. En su publicación, él explica que el crecimiento bacteriano ocurre por fases y los resultados que se han obtenido en esta serie experimental, pueden explicarse con el esquema de crecimiento planteado por Monod. Primeramente, la actividad se manifiesta como una fase latente, posteriormente tiene un crecimiento hasta un valor máximo y, por último, presenta un decaimiento. Las imágenes de los patrones de speckle combinados con el procesamiento basado en el método de las diferencias temporales permitieron obtener un esquema de crecimiento muy parecido al modelo utilizado en microbiología. Basándonos en esa analogía puede decirse que el crecimiento bacteriano es la mayor contribución a la actividad que el sistema es capaz de detectar.

Como las bacterias han sido distribuidas uniformemente en la superficie, los procesos ligados al crecimiento bacteriano modifican, en consecuencia, la estructura del cuadro de speckle de manera igualmente uniforme. Este fenómeno permite que la distribución de irradiancia en el área de estudio presente cambios estructurales homogéneos que pueden ser

fácilmente procesados por el método de las diferencias temporales para representar gráficamente la evolución de la actividad bacteriana. Por lo tanto puede decirse que la actividad tiene lugar fundamentalmente a nivel superficial, donde la influencia del medio en forma de agar, es poco significativa.

4. Conclusiones

La instalación experimental y el procesamiento de las imágenes asociado, basados en la técnica de speckle dinámico, permiten la caracterización de la actividad bacteriana en placas de Petri y la representación de la evolución de dicha actividad en el tiempo; no es posible la descripción de la actividad sin contar con todos estos elementos.

Se ha podido demostrar tanto cualitativamente como cuantitativamente que la actividad diferenciada detectada se encuentra relacionada con eventos que ocurren en el medio de cultivo, específicamente en el compartimento inoculado y que el tiempo en que se detecta esta actividad es independiente de la configuración de incidencia directa o indirecta del haz.

De los resultados obtenidos se deriva que los objetivos propuestos han sido cumplimentados y que la hipótesis establecida se ha comprobado, la técnica de speckle dinámico combinada con un procesamiento adecuado de las imágenes permite detectar y describir la actividad de las células bacterianas de *E. coli*.

Agradecimientos

Muchos agradecimientos a todos los miembros del Laboratorio de Microbiología de la Dirección de Diagnóstico del CNIC por toda su colaboración. Igualmente agradecer a la Dra. Luz Marina Miquet, al Dr. Efrén Andrade y a la Dra. Dinorah Hernández por su ayuda. Por último, expresar nuestro agradecimiento a los árbitros y revisores por sus críticas constructivas y las preguntas interesantes que puedan hacernos.

1. R. Arizaga, M. Trivi y H. Rabal, *Optics & Laser Technologies* **31** (1999) 163-169.
2. A. Mavilio, M. Fernández, M. Trivi, H. Rabal y R. Arizaga, *XIV Convención científica de Ingeniería y Arquitectura Cujae* (2008).
3. R. Arizaga, N.L. Cap, H. Rabal y M. Trivi, *Opt. Eng.* **41** (2) (2002) 287-294.
4. A. Mavilio, M. Fernández, M. Trivi, H. Rabal y R. Arizaga, *Rev. Cub. Física* **27** (2010) 34-41.
5. A. Mavilio, M. Fernández, M. Trivi, H. Rabal y R. Arizaga, *Signal Processing* **90** (2010) 1623-1630.
6. M. García, R. Guzmán y A. Vargas, *Rev. Cub. Física* **27** (2010) 13-17.
7. R.A. Braga Jr, G.F. Rabelo, L.R. Granato, E.F. Santos, J.C. Machado, R. Arizaga, H.J. Rabal y M. Trivi, *Biosystems Engineering* **91** (4) (2005) 465-469.
8. C.M. Waterman-Storer, A. Desai, J.C. Bulinski y E.D. Salmon, *Current Biology* **8** (1998) 1227-1230.
9. R.A. Braga Jr, I.M. Dal Fabbro, F.M. Borem, G.F. Rabelo, R. Arizaga, H.J. Rabal y M. Trivi, *Biosystems Engineering* **86** (3) (2003) 287-294.
10. E. da Silva Jr., E.R. Teixeira da Silva, M. Muramatsu y S.C. da Silva Lannes, *Food Research International* **43** (2010) 1470-1475.

11. G.F. Rabelo, R.A. Braga Jr., I.M.D. Fabbro, M.R. Trivi, H.J. Rabal y R. Arizaga, *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* **9** (2005) 570-575.
12. C.I. Cabello, G. Bertolini, S. Amaya, R. Arizaga, y M. Trivi, *Rev. Cub. Física* **25** (2008) 67-69.
13. L. Martí-López, H. Cabrera, R.A. Martínez-Celorio, y R. González-Peña, *Opt. Com.* **283** (2010) 4972-4977.
14. H.J. Rabal y R.A. Braga, *Dynamic laser speckle and Applications* (Rochester, New York: Brian J. Thompson 2009) p. 1-22.
15. R.A. Braga, C.M.B. Nobre, A.G. Costa, T. Sáfyadi y F.M. da Costa *Opt. Com.* **284** (2011) 646-650.
16. G. Hernández-Eugenio, E. Echevarría-Landín, y F. Hahn-Schlam, *Agrociencia, Red de revistas científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal* **41** (5) (2007).
17. F. Hahn, G. Hernández, E. Echevarría y E. Romanchick, *Canadian Biosystems Engineering* **48** (4) (2006) 7-13.
18. W. Tan, A.L. Oldenburg, J.J. Norman, T.A. Desai y S.A. Boppart, *Opt. Exp.* **14** (2006) 7159-7171.
19. P.L. Volpe, *J. Braz. Chem. Soc.* **8** No.4 (1997).
20. S.E. Murialdo, G.H. Sendra, L.I. Passoni, R. Arizaga, J.F. Gonzalez, H. Rabal y M. Trivi, *Journal of Biomedical Optics* **14** (2009) 064015-064015-6.
21. G. Meschino, S. Murialdo, L. Passoni, H. Rabal y M. Trivi, *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC, Annual International Conference of the IEEE.* 2010)
22. J. Monod, *Annu. Rev. Microbiol* **3** (1949) 371-394.
23. M.T. Kelly, D.J. Renner y J.J. Farmer III, in *Manual of Clinical Microbiology* (American Society for Microbiology 1985).
24. C.L. Moe, *Manual of Environmental Microbiology* (Washington, USA. American Society of Microbiology Press 2002) p. 184-204.
25. A.J. Salle, *Bacteriología* 4ta Edición (Edit. Gustavo Gili S.A. 1960) p. 159-75.
26. V.S. Cooper, A.F. Bennett y R.E. Lenski, *Evolution* **55** (2001) 889-896.
27. B. Ridolph, K.M. Gebendorfer, J. Buchner y J. Winter, *J. Biol. Chem.*, (Paper in Press. Published on April 20, 2010), Manuscript M110.103374. The latest version is at <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M110.103374>.
28. F. Travieso Ruíz, G. Roura Carmona, C. Romay Penabad y R. Contreras Alarcón, *Rev. Lat. Microbiología* **46** (2004) 67-71.
29. J.H. Mueller y J. Hinton, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **48** (1941) 330-333.