

Máquina Automatizada para el Estriamiento de Bacterias en Caja Petri con Agar

Automated Machine for Bacterial Streak in Petri Dish with Agar

Erick Valdivieso¹*

¹Escuela de Ingeniería Mecatrónica, Universidad Internacional del Ecuador, Quito, Ecuador

*Autor Principal/Corresponding author, e-mail: ervaldiviesoca@uide.edu.ec

Abstract— This article presents the prototype design of an automated machine that facilitates, homogenizes and reduces the time of the streaking bacteriological process with a microbiological loop of a urine sample in a culture medium with agar inside a Petri layer, performed in clinical laboratory. The prototype considers the movement of the head of the bacteriological loop in the 3 axes X, Y, Z, with a computerized numerical control (CNC) process. Through a Human-Machine Interface (HMI), the operator can select the type of lined he wants to perform and start the machine. The sterilized loop collects a urine sample from the previously placed open sample container, and places it in the Petri dish together with the Agar, and start the streaks. At the end of the process, the bacteriological loop is moved to a tube inside the machine to be sterilized with heat. The Petri dish is subsequently covered and removed manually by the operator. The HMI is designed with a Node-RED visual programming tool inside a Raspberry Pi3 microprocessor board. For the control, an Arduino Mega open source electronic platform is used with RAMPS 1.4 shields designed to control the stepper motors of the CNC.

Keywords—Arduino, petri dish, bacteria streaking, urine samples, Node-RED

Resumen—

En el presente artículo se muestra el diseño de prototipo de maquina automatizada que facilita, homogeniza y reduce el tiempo el proceso de rayado con un asa microbiológica de una muestra de orina en un medio de cultivo con agar dentro de una capa Petri para el estriamiento de bacterias en un laboratorio clínico. El prototipo considera el movimiento del cabezal del asa bacteriológica en los 3 ejes (X, Y, Z), con un proceso de control numérico computarizado (CNC). Mediante una Interfaz Hombre-Máquina (HMI), el operador puede seleccionar el tipo de rayado que quiere realizar y arrancar la máquina. El asa esterilizada recoge una muestra de orina del recipiente de muestra previamente abierta y colocada en su sitio, y lo coloca en la caja Petri junto con el Agar previamente colocado, y procede al rayado. Al finalizar el proceso, el asa bacteriológica se mueve hasta un tubo dentro de la máquina para esterilizarse con calor. La caja Petri posteriormente es tapada y retirada manualmente por el operador. El HMI está diseñada con una herramienta de programación visual Node-RED dentro de una placa de un microprocesador Raspberry Pi3. Para el control se usa una plataforma electrónica de código abierto Arduino Mega con shields RAMPS 1.4 diseñadas para controlar los motores paso a paso de la CNC.

Palabras Clave—Arduino, caja petri, estriamiento de bacterias, Muestras orinas, Node-RED

I. INTRODUCCIÓN

El proyecto requiere el diseño de una máquina que sea capaz de realizar el estriamiento automático de bacterias en cajas Petri con agar, por eso se necesita conocer las bases teóricas de microbiología para el cultivo de bacterias que se realiza en los laboratorios clínicos y la tecnología mecatrónica con sus diferentes cálculos que se deben realizar para poder obtener un prototipo funcional. En el mercado se dispone de máquinas automáticas comerciales para laboratorios clínicos, entre ellas; AUTOPLAK y SIDECAR.

Los métodos para diagnosticar cepas en el sistema urinario son importantes ya que el sembrado de bacterias se basa en los microorganismos de muestras de orina. El documento del Comité de Microbiología Clínica Chilena nombra 3 importan-

tes métodos para el diagnóstico de estos microorganismos, pero en particular en el más específico es el de uro cultivo, que se refiere al cultivo por estriamiento en una caja Petri, siendo este el más acertado ya que demuestra la facilidad para observar las cepas que proliferan, tanto en su morfología y color, e incluso hacer un conteo de cuantas cepas lograron crecer para así conocer qué tipo de bacteria produce la enfermedad del tracto urinario, al igual que arroja resultados del antibiótico que es el adecuado para tratar al paciente. El estudio nombrado tiene una relevancia en cada especie que da la uropatogénia o patología causada, así también se da como resultado el estudio entre las dos técnicas y demuestra mediante resultados de laboratorio que la siembra ayuda a reconocer de entre tantas especies que pueden causar la enfermedad, con cual se está

enfrentando, ya que los otros test para la infección urinaria solo ayudan a saber si es positivo o negativo el resultado, dando a saber si se tiene una infección o no, pero el problema de estos test es que no ayudan a saber cuál es el patógeno causante. Para la presente tesis es relevante el estudio de ese documento ya que da la importancia de por qué es necesario realizar un uro cultivo, y la necesidad de estos diagnósticos de infecciones urinarias.[1]

El estudio "Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos" se evalúan los métodos de siembra en superficie del agar, en profundidad del agar y en cámara de Neubauer. En el método de siembra en superficie los resultados fueron negativos y sin ningún posible recuento del microorganismo ya que al estar expuestos en la superficie existe una contaminación bacteriana que interviene con el crecimiento celular del patógeno en estudio. Por otra parte la siembra en profundidad tiene un beneficio de que las levaduras proliferan al fondo del agar con un crecimiento notorio en donde se puede realizar el recuento, pero en esta técnica ocurre el mismo error que en la anterior, debido a que se inicia el sembrado en la superficie para tener un mayor número de colonias, pero en la parte superficial las bacterias no deseadas empiezan a invadir el espacio de la muestra impidiendo a la bacteria deseada un crecimiento óptimo. Las dos técnicas de sembrado tienen un alto tiempo de preparación de cada medio. Para la técnica de cámara de Neubauer se utiliza la constante de Mc Farland la cual es de 6×10^8 células/ml, este hace referencia a que debe existir esta constante en el crecimiento bacteriano en la inoculación para que este sea un crecimiento adecuado, de otra forma se debería descartar las muestras por un crecimiento inapropiado, en el estudio mencionado se observa que esta técnica de cámara de Neubauer es la más adecuada por el resultado preciso que permitió la proliferación del patógeno y por tanto el recuento de esta es más sencillo y preciso que las dos anteriores, pero su desventaja se halla en la concentración de celular que debe tener la muestra y el tamaño del microorganismo que se desea ver ya que al tener un tamaño pequeño este dificulta el recuento.[2]

En la investigación se utiliza las dos primeras técnicas por el uso común de los laboratorios y la facilidad que esta tiene, ya que la técnica de cámara de Neubauer es poco utilizada por su desventaja anteriormente mencionada, con el estudio del proyecto se reduce la contaminación de bacterias al usar instrumentos esterilizados con el proceso adecuado de esterilización antes y después del sembrado de la bacteria en el medio de cultivo, al igual que el tiempo utilizado en la preparación de cada muestra es menor al ser un proceso mecánico y programado.

Para el movimiento del prototipo nos basamos en diferentes diseños de máquinas CNC que se mueven en 3 ejes, como en los estudios [3] y [4] en las cuales son máquinas que realizan el movimiento prismático tanto en X,Y y Z, para el diseño utilizamos el libro *CNC Design Machines Tools*.^{en} este se habla de las diferentes tipos de CNC que hay y como se las diseña [5].

Al querer realizar la interfaz del usuario (HMI) se usa

NodeRed como en [6] aquí utiliza una Paspberry Pi3 como una computadora y realiza la interfaz desde NodeRed para conectar varios dispositivos en un mismo servidor y manejarlo desde uno solo. También utilizamos como referencia [7] que utiliza la interfaz en NodeRed para mostrar los datos que se obtienen de sensores de humedad y temperatura dentro de una industria de almacenamiento de productos.

En la primera sección de este paper se puede encontrar la lógica del proyecto lo que es el diagrama de flujo de cómo funciona el software, también cual es el procedimiento que se debe seguir para poder realizar un adecuado estriamiento de bacterias en la siguiente sección se habla sobre el diseño mecánico de la máquina, en la siguiente sección se hablara de las pruebas realizadas al software y en las ultimas sección encontramos la conclusión que obtuvimos al realizar este trabajo y sobre cómo podríamos mejorar este trabajo.

II. METODOLOGÍA

Cuando se quiere trabajar con software en computadora lo primero que se debe realizar es un diagrama de flujo en el cual se explica la lógica del programa.

A. Diagrama de flujo

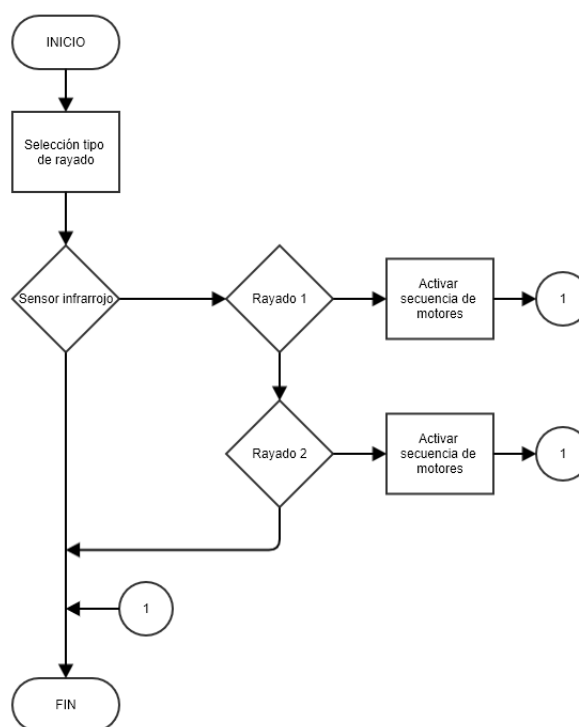


Fig. 1. Diagrama de flujo del programa

En la Fig. 1 se observa el diagrama del flujo del proyecto. Lo primero que hacemos es seleccionar el tipo de rayado, lo siguiente que hace es calibrar la posición inicial con el sensor infrarrojo, por ultimo hace la secuencia según el rayado seleccionado anteriormente.

B. Procedimiento para el estriamiento de bacteria

Los pasos que se deben seguir para el estriamiento de bacterias es el siguiente:

1. Esterilizar el asa colocándola cerca del encendedor hasta que se vea que esta toma un color rojo aproximadamente a 80° C durante 5 segundos.
2. Enfriar el asa retirándola del mechero, pero dejándolo cerca del mismo para que se enfríe aproximadamente un centímetro durante 2 segundos y asegurar que no se vuelva a contaminar.
3. Tomar la muestra con el asa.
4. Realizar el primer estriamiento, unas pequeñas líneas en zigzag con el asa sobre la caja Petri con estrías muy juntas como podemos ver en la Figura 2.
5. Girar la caja Petri y volver a realizar el estriamiento en otra parte de la caja con las estrías más separadas.
6. Repetir el paso 5 pero con las estrías más separada como podemos ver en la Figura 3.
7. Retirar el asa y volver a colocarla sobre el mechero.
8. Cerrar la caja Petri.



Fig. 2. Estriamiento de bacterias [8]

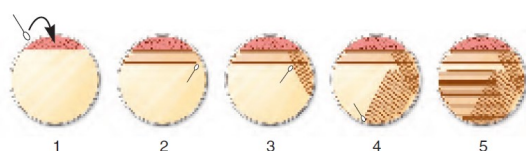


Fig. 3. Forma de estriar bacterias [9]

C. Diseño mecánico

El diseño inicia con un esquema que permite identificar los componentes críticos de la máquina, los mismos que son diseñados mediante el criterio de rigidez por sobre la resistencia ya que se realiza un procedimiento repetitivo y preciso en un tiempo determinado como se muestra en la fig.4. Esta alternativa consiste en un movimiento con articulaciones prismáticas en los ejes X,Y,Z con un tornillo sin fin el cual nos permitirá el movimiento y la potencia será suministrada por motores a pasos.

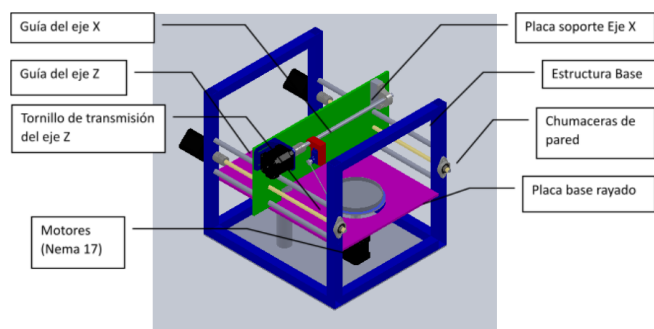


Fig. 4. Bosquejo de alternativa seleccionada

1. *Dimensionamiento de la guía del eje Z:* Para este caso se calcula la guía del eje Z como una maquina con precisión moderada de deflexión admisible

$$D_{req} = \sqrt[4]{\frac{4,8359 \exp -10m^4 \cdot 64}{\pi}}$$

$$D_{req} = 0,009962m = 9,96mm$$

Se estandariza a ejes de 10 mm de diámetro disponibles en acero plata rectificado, como guías para el eje Z; debido a que el eje X es de dimensiones cercanas y que el costo de los ejes no es representativo se coloca las mismas guías en el eje X.

2. *Dimensionamiento de la transmisión de potencia eje X y Z:* Para convertir un giro en un desplazamiento se utilizan tornillos de potencia que se acoplan a motores Nema 17 mediante acoples flexibles y permiten que los diferentes mecanismos acoplados a los ejes X y Z trabajen efectivamente.

Los acoples flexibles para este tipo de motores acoplan ejes de 5 y 8 mm, por lo que se utiliza un tornillo de potencia de 8 mm de diámetro, mismo que permite transmitir movimiento sin sufrir deformaciones ya que la carga está siendo soportada por los ejes guía.

Para acoplar el tornillo se requiere de chumaceras, para máquinas CNC las chumaceras se seleccionan en función del diámetro del eje a acoplar.

3. *Calculo del peso que puede transportar el tornillo seleccionado:* Primero definimos la característica del tornillo a utilizar:

- Número de entradas: 1
- Paso del tornillo: 2mm
- Diámetro exterior = 8 mm
- Tipo de rosca = ACME
- Torque a transmitir = 0.44 N m

Para un tornillo de potencia el torque en función de la carga a transmitir es:

$$T = \frac{F}{2} \left[\frac{l + u \cdot \pi \cdot d_m}{\pi \cdot d_m - u \cdot l} \cdot d_m + \mu_c \cdot d_c \right] \quad (1)$$

máquina estriadora de bacterias no requiere de collarín por lo que la expresión 1 se reduce, despejando la carga a desplazar y sustituyendo valores se tiene.

$$F = \frac{2 \cdot t}{\left(\frac{l + \mu \cdot \pi \cdot d_m}{\pi \cdot d_m - \mu \cdot l}\right) \cdot d_m}$$

$$F = \frac{2 \cdot 0,44N \cdot m}{\left(\frac{2 + 0,4 \cdot \pi \cdot (8 - 2)}{\pi \cdot 6 - (0,4 \cdot 2)}\right) \cdot 8 \exp -3m}$$

$$F = 208,12N$$

Cada tornillo puede desplazar una carga de 208 N, misma que supera en un 100% la carga considerada, dando un factor de carga de 2, que se considera aceptable para el dimensionamiento requerido.

4. *Dimensionamiento de la estructura base:* Para dimensionar la estructura base, se considera un tubo cuadrado de acero inoxidable seleccionado del catálogo de perfiles de Ivan Bohman, mediante un análisis por elementos finitos se determina la carga máxima que puede soportar la estructura base.

Se considera un tubo cuadrado de 25.2x25.4 x1.2 milímetros de espesor en acero inoxidable AISI304, se le aplica una carga de 500 N en la parte superior de la estructura.

Mediante un análisis por elementos finitos, se determina que la estructura sufre una deformación máxima de 6.96e-3 mm, que comparado con la deformación permisible para elementos de máquina de precisión moderada se encuentra dentro del rango establecido, ver Figura 5.

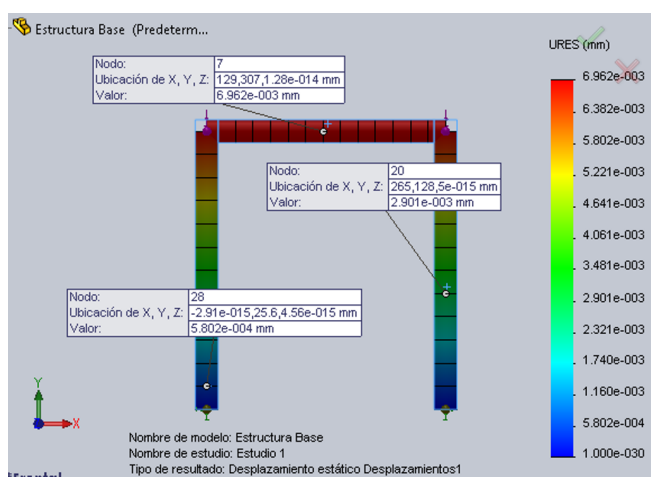


Fig. 5. Estudio de deformación realizado en software CAD

5. *Dimensionamiento de la placa base rayado:* Se selecciona una placa de acero inoxidable ASTM A 240 del catálogo de aceros de Ivan Bohman y se la analiza como una viga doblemente empotrada para determinar el espesor de la placa.

Al igual que los ejes guía se busca la inercia requerida para garantizar la rigidez de la placa, considerando una sección rectangular que debe soportar una carga $W = 50$ N.

La inercia requerida para la placa base de rayado es la mitad de la requerida por los ejes guía, por lo tanto se tiene:

$$I_{req} = -\frac{P \cdot L^3}{192 \cdot E \cdot Y_{adm}}$$

$$I_{req} = -\frac{50N \cdot (0,34m)^3}{192 \cdot 207G \frac{N}{m^2} \cdot -0,17mm^3}$$

$$I_{req} = 2,9086 \exp -10 m^4$$

Al tratarse de una sección rectangular la inercia está dada por

$$I_{req} = -\frac{\pi \cdot D_{req}^4}{64} \tag{2}$$

Considerando h como el espesor de la placa se tiene

$$h = \sqrt[3]{\frac{2,9086 \exp -10m^4 \cdot 12}{340^{-3}}}$$

$$h = 0,0021m = 2,17mm$$

Se selecciona del mercado local una placa de acero inoxidable ASTM A240 de 2.5 mm de espesor, por estandarización la guía central también se fabrica con esta misma placa.

III. RESULTADOS

Para la primera prueba se realiza pruebas con el sensor de distancia SHARP para ver si las lecturas obtenidas son las deseadas, para esto tendremos una medida previamente seleccionada y la compararemos con la del sensor, se puede ver en la Tabla I.

TABLA I
LECTURAS DE DISTANCIA SENSOR SHARP

Distancia (cm)	Lectura (cm)	Resultado
5	5.2	3
8	8.4	2
11	10.9	3
15	15.0	3
20	20.1	3
26	25.4	2
29	28.9	3
17	17.2	3
6	6.0	3
24	24.2	3

Teniendo una tolerancia de ± 0.3 cm para ser un valor aceptable, y considerando 3 como una buena lectura y 1 una mala lectura se puede ver que las lecturas del sensor son buenas lecturas y que con los cálculos realizados no dará problemas al momento de ser usada en el proyecto.

Para la segunda se realiza una prueba de tiempo en la cual se simula la secuencia completa, se toma el tiempo que se demora en completarla y esta debe estar dentro del rango de tiempo establecido de 5 a 7 minutos, ver Tabla II. Si se obtiene un resultado dentro del rango se tiene un SI que significa que el rayado ha sido satisfactorio, mientras que si va fuera del rango el rayado ha sido fallido.

Con los resultados de la prueba se puede decir que el dispositivo si cumpliría la secuencia completa de rayado dentro del tiempo estimado, por lo que se podría decir que la programación fue realizada de manera correcta.

TABLA II
LECTURAS DE DISTANCIA SENSOR SHARP

Prueba	Tiempo (min)	Resultado
Prueba 1	6.55	SI
Prueba 2	6.24	SI
Prueba 3	5.49	SI
Prueba 4	5.48	SI
Prueba 5	7.28	NO
Prueba 6	6.20	SI
Prueba 7	5.39	SI
Prueba 8	5.06	SI
Prueba 9	5.1	SI
Prueba 10	5.33	SI

IV. DISCUSIÓN

Actualmente el diseño de esta máquina tiene la capacidad de realizar el estriamiento de bacterias en caja Petri con agar, ya que en la actualidad las máquinas especializadas en estas áreas son muy costosas y de tamaños excesivos con lo que no es fácil su transportación ni almacenamiento, por otra parte este dispositivo sería fácil de transportar y con su tamaño es factible ubicarlo en cualquier lugar.

V. CONCLUSIONES

1. El proyecto tiene un enfoque principal para facilitar y solucionar errores, mostrando de manera científica un desarrollo de bacterias que alcance la automatización confiable y segura. Manteniendo así avances tecnológicos, técnicos y evolucionar ante cualquier simulación. Dando como facilidad la disminución de tiempo para obtener resultados clínicos. Con un desarrollo clínico a un rango proporcional de resultados entre 5 a 7 minutos por muestra. El dispositivo diseñado permitirá homogeneizar el proceso.
2. La máquina está diseñada para ser portátil, con unas dimensiones de 300 mm de ancho, 400 mm de profundidad y 200 mm de altura, y que consta de los siguientes elementos principales:
 - a) Una estructura de tubo cuadrado de acero inoxidable AISI 304.
 - b) Un asa bacteriológica de platino y su sistema de sujeción que incluye un motor elevador para regular la altura durante el movimiento de estriamiento y un servomotor para controlar el ángulo del rayado.
 - c) Un sistema de movimiento en el plano que incluye dos motores paso a paso Nema17 de 4V y 1.2 A y que se conectan con acoples de 5 a 8 mm a un tornillo sin fin de acero de 8 mm y dos ejes guías de acero plata (DIN 120WVA) rectificado de 10 mm como soporte, conectados en sus extremos con una chumacera KFL01-001.
 - d) Un tubo de esterilización de acero inoxidable, con un sistema de calentamiento con resistencia eléctrica.

- e) La placa del rayado y la base se diseñan con acero inoxidable ASTM240.
- f) La base para la caja Petri incluye un motor paso a paso para el giro de rayado
- g) Un sistema de control compuesto por un microcontrolador Arduino Mega con una Ramps 1.4 que facilita la conexión y programación de los motores.
- h) Para la interfaz HMI se diseñan con la herramienta de programación visual Node-RED dentro de un microordenador Raspberry Pi3, con su respectiva pantalla en el frente del prototipo.

3. Los resultados de la simulación del programa muestran que el rayado se realiza entre 5,5 y 6,5 minutos, con lo cual se cumple el objetivo de obtener un estriado en el rango de 5 a 7 minutos.
4. Con el desarrollo del presente proyecto en el que se ha considerado los avances tecnológicos y con materiales accesibles localmente, se puede simplificar y automatizar
5. El dispositivo está diseñado para un fácil manejo, rapidez y manteniendo precisión de cada una de las evaluaciones dadas o determinadas para dar resultados positivos, sin alterar ni agregar procesos físicos o químicos que afecten el desarrollo natural de las bacterias durante el proceso de estriamiento.
6. La máquina tiene como ventajas, definidas por tiempo, espacio, seguridad y producción eficaz para evaluaciones científicas y específicas, con criterios de evaluación y disminución de tiempo y autenticidad en su desarrollo y despliegue de resultados.

REFERENCIAS

- [1] "Recomendaciones para el diagnóstico microbiológico de la infección urinaria," *Revista chilena de infectología*, vol. 18, pp. 57 - 63, 00 2001. [Online]. Available: <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sciarttextpid=S0716-10182001000100008nrm=iso>
- [2] J. A. Ramírez, J. A. Parra, and A. A. Aldana, "Análisis de técnicas de recuento de microorganismos." *Mente Joven*, vol. 6, pp. 01-08, 2017.
- [3] V. K. Pabolu and S. Srinivas, "Design and implementation of a three dimensional cnc machine," *International Journal on Computer Science and Engineering*, vol. 2, no. 8, pp. 2567-2570, 2010.
- [4] P. A. S. da Rocha, R. D. Souza, and M. E. da Lima Tostes, "Prototype cnc machine design," *Journal of Energy and Power Engineering*, vol. 6, no. 11, p. 1884, 2012.
- [5] J. Marek *et al.*, *Design of CNC machine tools*. MM Publishing, SR O., 2015.
- [6] A. Rajalakshmi and H. Shahnasser, "Internet of things using node-red and alexa," in *2017 17th International Symposium on Communications and Information Technologies (ISCIT)*. IEEE, 2017, pp. 1-4.
- [7] K. Ferencz and J. Domokos, "Using node-red platform in an industrial environment," *XXXV. Jubileumi Kandó Konferencia, Budapest*, pp. 52-63, 2019.
- [8] G. Prats, *Microbiología clínica*, 1st ed. Bogota: Panamericana, 2005.
- [9] J. Melnick, E. Jawetz, E. amd Adelberg, K. Carroll, Jawets, Melnick, and Adelberg, *Microbiología médica*, 27th ed. McGraw-Hill - Mexico, 2016.