



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0416171-8 B1

(22) Data do Depósito: 05/11/2004

(45) Data de Concessão: 09/08/2016



(54) Título: MÉTODO PARA MONITORAR A PRESENÇA DE MICROORGANISMOS FORMADORES DE BIOFILME NA INDÚSTRIA DE PAPEL

(51) Int.Cl.: D21H 21/04

(30) Prioridade Unionista: 06/11/2003 FI 20031614

(73) Titular(es): KEMIRA OYJ

(72) Inventor(es): KOLARI, MARKO, SALKINOJA-SALONEN, MIRJA, HATUNEN, TERHI JOHANNA

"MÉTODO PARA MONITORAR A PRESENÇA DE MICROORGANISMOS FORMADORES DE BIOFILME NA INDÚSTRIA DE PAPEL".

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se a um método para monitorar a presença de microorganismos formadores de biofilme na indústria de fabricação de papel e papelão, para determinação da necessidade de um agente anti-biofilme no processo. Além disso, um kit de montagem é também
10 proporcionado para o método.

Antecedentes da Invenção

Os processos de fabricação de papel e papelão contêm águas de processamento quentes (por exemplo, 45-60°C) que são ricas em nutrientes biodegradáveis e
15 apresentam um benéfico pH (por exemplo, pH 4-9), proporcionando, dessa forma, um satisfatório ambiente para o crescimento de microorganismos. Os micróbios no processo mostram a formação de biofilme, ou seja, crescimento de um biofilme fixado à superfície, crescido e isento de
20 movimentação, isto é, crescimento planctônico. Diversos problemas na indústria do papel são causados pelos biofilmes, isto é, camadas de lodo que se desenvolvem sobre as superfícies de equipamentos de processo e que podem ser retiradas das superfícies. Bio-resíduos das superfícies das
25 máquinas e biofilmes/aglomerados soltos podem provocar diversas perturbações do processo, tais como, redução do fluxo de água, entupimento de filtros, telas, etc., deteriorando a qualidade do produto final, por exemplo, proporcionando furos ou pontos coloridos no produto final

ou rompendo o inteiro tecido de papel. Os biofilmes são difíceis de remover das superfícies do equipamento do processo e normalmente precisam do uso de produtos químicos bastante fortes.

5 Para controle do crescimento de micróbios têm sido adicionados às águas do processo, por exemplo, agentes biocidas. Os micróbios planctônicos têm sido eficientemente controlados pelos agentes biocidas. Entretanto, o uso de biocidas não solucionou todos os problemas dos biofilmes
10 nas máquinas de fabricação de papel ou papelão. Diversas razões existem para isso, entre as quais, a de que uma ampla variedade de micróbios é crescente no processo de fabricação de papel e, também, agora se sabe que o crescimento de bactérias em um biofilme é geralmente mais
15 resistente aos biocidas do que dos micróbios planctônicos.

Um dos presentes inventores, Kolari M., recentemente pesquisou os elementos formadores de biofilme na indústria de papel e papelão, conforme publicado no artigo "Attachment Mechanisms and Properties of Bacterial
20 Biofilms on Non-Living Surfaces", Dissertationes Biocentri Vikki Universitatis Helsingiensis, 12/2003, Tese de PhD, Universidade de Helsinque, Finlândia. Nesse estudo, os formadores de biofilmes foram identificados e suas interações pesquisadas.

25 Conseqüentemente, foram encontrados processos para compreender diferentes tipos de microorganismos formadores de biofilmes: formadores de biofilmes primários, que são capazes de aderir às superfícies limpas e formadores de biofilmes secundários, que depois se aderem

aos biofilmes primários. Os formadores de biofilme primário parecem constituir um pré-requisito para o êxito da colonização superficial de diversos outros micróbios nas máquinas de fabricação de papel e papelão. Por exemplo, a

5 bactéria *Deinococcus geothermalis* é um agente formador de biofilme primário e cepas de diversas espécies de *Bacillus* se aderem aos biofilmes primários dessa bactéria. Kolari M. e outros, no "Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology" (2003), 30, páginas 225-238, descrevem

10 outras bactérias formadoras de biofilme primário. Corrigido com dados mais novos não-publicados, os relevantes microorganismos formadores de biofilme primário reconhecidos são: espécie *Deinococcus geothermalis*; gênero *Meiothermus*, como os tipos *M. silvanus* ou *M. ruber*, gênero

15 *Azospirillum*; gênero *Burkholderia*, tal como, *B. multivorans* ou *B. cepacia*; gênero *Porphyrobacter*, tal como, *P. cryptus*; gênero "*Rubellimicrobium*", e gênero *Thermomonas*, tal como, *T. haemolytica* ou *T. hydrothermalis*. Os formadores de biofilme primário são, tipicamente, moderadamente

20 termofílicos, alguns, com temperaturas máximas de crescimento tão altas quanto 67°C, mas a maioria das cepas mostram um crescimento mais rápido em temperaturas de 45 a 55°C. No entanto, para superar o problema dos biofilmes na indústria de fabricação de papel, a matéria não foi

25 discutida.

Conforme indicado acima, no contexto de formação de lodo nas máquinas de fabricação de papel e papelão, parece que os elementos formadores de biofilme são os micróbios mais danosos e sua prevenção iria melhorar o

funcionamento das máquinas do processo e, em consequência, a produtividade do processo. Para tal finalidade, o presente Depositante divulgou nos recentes Pedidos de patentes FI 2002/1986 e FI 2002/1987, um novo tipo de
5 agente anti-biofilme, que se origina de plantas e que pode ser usado para a prevenção da formação do biofilme e/ou remoção do biofilme já formado, em um processo de fabricação de papel ou papelão.

O uso eficiente dos biocidas ou dos ditos agentes
10 anti-biofilme irá precisar de um efetivo método de monitoramento. Na indústria de papel, o método típico de monitoramento para o crescimento do micróbio é a cultura de uma amostra da água do processo em laboratório. Tais métodos de cultura, entretanto, são demorados e
15 complicados, isto é, levam diversos dias e precisam, *inter alia*, do uso de vários meios de crescimento para isolamento e identificação dos diferentes tipos de micróbios em uma amostra. Além disso, é conhecido que o crescimento do micróbio em laboratório é dependente do meio de cultura,
20 dessa forma, parte dos micróbios presentes em uma amostra normalmente é incapaz de crescer sob as condições de laboratório. Além disso, o monitoramento é tipicamente focado nos micróbios isentos de movimentação. Métodos eficientes para o monitoramento dos efeitos dos agentes
25 anti-biofilme nos micróbios formadores de biofilme não têm sido divulgados. Portanto, de modo convencional, os biocidas, por exemplo, são usados para a inibição não-seletiva de todos os micróbios no processo, pelo que altas quantidades de biocidas são normalmente requeridas.

O documento de patente FI 95597 do presente Depositante descreve um dispositivo que pode ser usado em laboratório ou ser levado para o processo de fabricação de papel para produção de um biofilme sobre as lâminas do mesmo. O biofilme é formado com culturas de levedura pura ou mediante colocação do dispositivo dentro das águas do processo. O crescimento é analisado mediante contagem do número de células de levedura por cm^2 , usando métodos de deposição convencionais. Conforme já mencionado, o método de deposição é demorado, tanto para a identificação dos micróbios danosos, como para a seleção, por exemplo, de um adequado biocida. Além disso, uma parte dos micróbios no biofilme pode deixar de crescer no meio de cultura.

As Patentes U.S. Nos. 6.326.190 e 6.410.256 descrevem um método em que um biofilme bacteriano é formado sobre a superfície de uma pluralidade de saliências dispostas em um dispositivo e a sensibilidade do biofilme aos agentes antibacterianos é determinada. No entanto, nos ditos métodos, o biofilme foi formado através da técnica convencional de demora de tempo, isto é, mediante uso de culturas puras que são cultivadas em laboratório, em um específico dispositivo de laboratório.

Conseqüentemente, existe uma necessidade na indústria de fabricação de papel de métodos mais efetivos para monitoramento da formação de lodo.

Objetivo da Invenção

O objetivo da presente invenção é de proporcionar um adicional método de detecção para a indústria de papel, que possibilite um meio eficiente e econômico de tempo para

o monitoramento do estado microbiológico em um processo de fabricação de papel ou papelão.

Um adicional objetivo da invenção é proporcionar um método de detecção que possa ser usado para um seletivo
5 monitoramento de micróbios formadores de biofilme que são danosos na indústria de papel e que pode ser usado para seleção do agente anti-biofilme, que seja o mais ativo com relação aos biofilmes cultivados sob as condições do processo.

10 Outro objetivo da invenção é proporcionar um kit de montagem, que seja bastante factível para que o método de detecção da invenção seja implementado no local do processo.

Breve Descrição dos Desenhos

15 A figura 1 representa uma modalidade preferida do dispositivo utilizado para amostragem e dispositivo de tratamento/cultura da invenção, usado no exemplo.

Descrição Detalhada da Invenção

Os presentes inventores descobriram agora que um
20 biofilme pode ser formado *in situ*, no processo de fabricação de papel ou papelão, sobre uma superfície de um dispositivo utilizado para amostragem e o biofilme formado no mesmo pode ser analisado, se desejado, diretamente na dita superfície, quanto à presença e quantidade de
25 formadores de biofilme danosos, especialmente de formadores de biofilme primário. Assim, de acordo com a presente invenção, o biofilme formado *in situ* não precisa ser removido da superfície do dispositivo de amostragem.

Além disso, os presentes inventores desenvolveram

um método de detecção para o biofilme formado sobre a superfície do dispositivo de amostragem, que é mais rápido que os métodos baseados em cultura de uso corrente, e que pode ser usado para a detecção da ocorrência de formadores
5 de biofilme presentes em locais particulares do processo e para seleção do agente anti-biofilme mais eficiente e concentração efetiva do mesmo contra o dito biofilme presente naquele local.

O método de detecção agora desenvolvido pode ser
10 usado para monitoramento da necessidade de um agente anti-biofilme em um processo de fabricação de papel ou papelão, entre outras coisas (i.a.), se qualquer agente anti-biofilme for necessário, uma adição posterior do mesmo for necessária e/ou quantidades efetivas/ótimas do agente anti-
15 biofilme a ser adicionado forem necessárias.

As características de caracterização da presente invenção são definidas nas reivindicações apresentadas em anexo.

Conseqüentemente, a presente invenção proporciona
20 um método de detecção para monitoramento do crescimento de micróbios em um processo de fabricação de papel ou papelão, para determinação da necessidade de um agente anti-biofilme no processo, o método compreendendo as etapas de:

(a) submeter um dispositivo de amostragem na linha de
25 processo por um certo período de tempo, por exemplo, por 3 horas a 7 dias, preferencialmente, por 12 horas a 3 dias, de modo a possibilitar ao dito microorganismo formar um biofilme *in situ* no dito processo, sobre a superfície do dispositivo de amostragem;

(b) tratar, opcionalmente, o dito biofilme formado, preferencialmente, a superfície do dispositivo de amostragem com o dito biofilme formado sobre o mesmo, em uma solução de um agente de teste anti-biofilme, por um
5 período de tempo, por exemplo, de 10 minutos a 4 horas, preferencialmente, por 1-2 horas, numa temperatura entre a temperatura ambiente e 65°C, por exemplo, na faixa de 35-65°C, preferencialmente, na faixa de 40-60°C, mais preferencialmente, próximo à temperatura do processo do
10 local de amostragem da linha de processo, tal como, na faixa de 40-60°C;

(c) contatar o dito biofilme, preferencialmente, a superfície do dispositivo de amostragem com o dito biofilme sobre o mesmo, com um meio de cultura líquido em um recesso
15 do dispositivo de cultura por um período de tempo, por exemplo, de 8-48 horas, preferencialmente, de 8-24 horas, mais preferencialmente, de 16-20 horas, numa temperatura entre a temperatura ambiente e 65°C, por exemplo, na faixa de 35-65°C, preferencialmente, na faixa de 40-60°C, mais
20 preferencialmente, próximo à temperatura do processo do local de amostragem da linha de processo, tal como, na faixa de 40-60°C;

(d) remover a solução da cultura e, no caso do biofilme se encontrar no local sobre a superfície do dispositivo de amostragem, também o dispositivo de amostragem do recesso
25 do dito dispositivo e detectar qualitativa e/ou quantitativamente a presença ou ausência de um biofilme aderido sobre as paredes do recesso.

Conforme aqui usados, os termos "processo de

fabricação de papel ou papelão”, e “linha de processo” são usados para abranger as linhas de processo de processos de fabricação a úmido para matérias-primas da indústria de papel e papelão, processos de produção de polpa, processos
5 de secagem de polpa, os processos atuais de fabricação de papel ou papelão e equipamentos dos mesmos, incluindo as máquinas de fabricação de papel e papelão. As máquinas de fabricação de papel e papelão são entendidas como compreendendo a seção de tela com terminal úmido e seção de
10 secagem.

O dispositivo de amostragem pode ser colocado em qualquer local das linhas do processo, incluindo a parte terminal úmida das máquinas de fabricação de papel ou papelão e a extremidade seca das linhas de processo. Além
15 do mais, o ambiente de exposição do dispositivo de amostragem pode ser qualquer meio do processo, incluindo as águas do processo, suspensões de polpa, águas de circulação e residuárias, matérias-primas, reagentes e produtos intermediários, etc. O dispositivo pode ser imerso nas
20 correntes de líquido ou ser levado para a área de esguicho de líquido da linha de processo.

Além disso, o dispositivo de amostragem pode compreender meios de fixação do mesmo, por exemplo, sobre a superfície do equipamento de fabricação de papel, por
25 exemplo, em um recipiente de água do processo de uma máquina de fabricação de papel. Alternativamente, os locais de amostragem da linha de processo podem ser fornecidos com um meio de montagem, em que o dispositivo de amostragem pode ser fixado para o período de formação do biofilme

sobre a superfície do mesmo. O tempo necessário para a formação do biofilme sobre a superfície do dispositivo no processo, depende do local na linha de processo e do tipo de processo, podendo ser adequadamente escolhido por um
5 especialista versado na técnica. Por exemplo, quando o dispositivo se encontrar na seção de tela de uma máquina de fabricação de papel neutro, o tempo de exposição é de 12 a 48 horas, dependendo das condições de limpeza da máquina, isto é, da demora da última paralisação e lavagem.

10 Após a remoção do dispositivo de amostragem do processo, a superfície exposta à formação do biofilme pode, opcionalmente, ser enxaguada ou lavada para remover qualquer material livre.

Numa modalidade preferida da invenção, o biofilme
15 formado é submetido à opcional etapa de tratamento (b) e etapa de cultura (c), ao mesmo tempo em que é colocado no local, isto é, aderido à superfície do dispositivo de amostragem.

Preferencialmente, o método compreende a etapa de
20 tratamento (b) com um ou mais agentes de teste de biofilme, para seleção do agente anti-biofilme mais eficiente, numa vantajosa concentração.

A etapa de tratamento (b) é efetuada, preferencialmente, mediante imersão da superfície do
25 dispositivo de amostragem com o biofilme sobre o mesmo em uma solução que contém o agente de teste anti-biofilme. O tratamento pode ser efetuado mediante um dispositivo de tratamento dotado de um recesso, o qual é preenchido com uma solução que compreende o agente de teste anti-biofilme.

O agente de teste anti-biofilme é dissolvido na solução, a qual é preferencialmente um meio de cultura líquido, água esterilizada e/ou água de processo. O tratamento é preferencialmente efetuado mediante agitação do dispositivo de tratamento em um agitador convencional, por exemplo, entre 150-250 rpm, por um certo período de tempo e sob uma temperatura, por exemplo, conforme definido acima. Após a etapa de tratamento, a superfície é adequadamente lavada, por exemplo, com água esterilizada. Preferencialmente, uma amostra de referência é também fornecida do mesmo local de amostragem, a qual é tratada com a mesma solução, mas na ausência de qualquer agente de teste anti-biofilme.

No presente método, preferencialmente, um ou mais agentes de teste anti-biofilme são testados em diversas concentrações, quanto à eficácia contra os formadores de biofilme presentes no processo monitorado e quanto à determinação da concentração conveniente/ótima do agente a ser usado naquele local do processo. No caso de diversas concentrações de agentes anti-biofilme, podem ser usados diversos dispositivos de amostragem, que foram mantidos no mesmo local da linha de processo, cada dispositivo de amostragem para um agente e para uma concentração. Mais preferencialmente, o dispositivo de amostragem é dotado de uma pluralidade de superfícies separadas, em que cada superfície separada pode ser tratada na etapa (b) com um agente anti-biofilme e uma concentração e também cultivada separadamente na etapa (c). Além disso, na etapa (b), um ou mais dos dispositivos ou superfícies são tipicamente deixados não-tratados com o agente de teste anti-biofilme,

na forma de amostras de referência, isto é, tratadas com a solução simples. A etapa de tratamento (b) da invenção proporciona informação confiável quanto à eficiência dos agentes anti-biofilme testados contra os biofilmes danosos ao processo, uma vez que o teste é focado contra os verdadeiros formadores de biofilme no seu modo de cultura de biofilme, isto é, no biofilme pré-cultivado.

Após a opcional etapa de tratamento (b), os biofilmes tratados podem ser enxaguados ou lavados antes da etapa de cultura (c). A cultura dos biofilmes opcionalmente tratados é realizada em um dispositivo de cultura dotado de um recesso, o qual é preenchido com um meio de cultura líquido, preferencialmente, mediante imersão da dita superfície do dispositivo de amostragem com o biofilme opcionalmente tratado sobre o mesmo, na dita solução. O tempo e temperatura usados na etapa de cultura são, por exemplo, conforme definido acima. Numa modalidade preferida, a etapa de cultura é efetuada com agitação, por exemplo, em um agitador convencional, por exemplo, a 150-260 rpm, uma vez que a agitação foi considerada como sendo bastante benéfica para a formação do biofilme. O dispositivo de agitação pode ser adequadamente disposto com um meio de aquecimento para proporcionar a desejada temperatura. A etapa (c) é usada para formar um biofilme sobre as paredes do dispositivo, o qual pode depois ser tingido na etapa seguinte (d), para detectar qualitativa e/ou quantitativamente a presença ou ausência dos formadores de biofilme no local da amostragem da linha de processo. Preferencialmente, o método compreende a etapa de

tratamento (b), em que essa etapa mostra o grau de micróbios formadores de biofilme que sobreviveram à etapa de tratamento com o agente anti-biofilme.

Conseqüentemente, após a etapa de cultura, a
5 solução de cultura e no caso o biofilme, são tratados no local, isto é, aderidos à superfície do dispositivo de amostragem, na opcional etapa (b) e na etapa seguinte (c), também o dispositivo de amostragem é removido na etapa (d) do recesso do dispositivo de cultura, o recesso sendo
10 opcionalmente lavado, preferencialmente, com água esterilizada, para remover qualquer material livre e quaisquer microorganismos formadores de biofilme aderidos às paredes do recesso são fixados com mordente e a presença e/ou intensidade da formação de cor no recesso é detectada
15 qualitativamente, por exemplo, visualmente, ou quantitativamente, por exemplo, por meio de espectrofotometria, de maneira conhecida. Adequado(s) agente(s) de tingimento inclui(em) qualquer/quaisquer agente(s) convencional(is) adequado(s) para tingimento de
20 biofilmes, tais como:

- formulações de mordentes/fixadores gerais para realçar a biomassa, tal como, violeta cristal ou safranina;
- formulações de mordentes para realçar o número da célula, tais como, laranja acridina, brometo de etídio, DAPI,
25 SYTO16 ou outras formulações de tingimento de ácido nucléico;
- formulações de mordentes de viabilidade para realçar as células de micróbios, tais como, LIVE/DEAD™, CTC ou diversos compostos de tetrazólio;

- formulações de mordentes fluorescentes de função específica, tais como, substratos de enzimas fluorescentes para a detecção da atividade de decomposição de amido, atividade de quitinase, atividade de estearase, atividade
5 de hidrólise de éster de lipídio ou atividade de fosfatase.

Numa modalidade preferida do método da invenção, o dispositivo de amostragem compreende uma pluralidade de saliências alongadas apoiadas, isto é, conectadas sobre um suporte, pelo que, quando levadas ao processo, o biofilme é
10 formado de modo similar sobre cada superfície das saliências. O material das saliências pode ser, por exemplo, aço inoxidável, plástico, tal como, poliestireno ou cerâmico, preferencialmente, aço inoxidável. Na dita modalidade, o dispositivo opcional de tratamento é também
15 dotado de uma pluralidade de recessos para as ditas soluções contendo um ou mais agentes de teste anti-biofilme, em uma ou mais concentrações, um agente de teste anti-biofilme e uma concentração em cada recesso, e a dita solução sem o agente de teste anti-biofilme (para a
20 referência), de modo que as saliências do dito dispositivo de amostragem possam ser imersas nos ditos recessos, uma saliência em cada recesso, após o dispositivo de amostragem ser removido do local de amostragem da linha de processo. Na dita modalidade, também o dispositivo de cultura
25 compreende uma pluralidade de recessos contendo a solução de cultura, de modo que as saliências do dito dispositivo de amostragem, opcionalmente tratadas na etapa (b), possam ser imersas na dita solução, nos recessos do dispositivo de cultura, uma saliência em cada recesso.

O biofilme formado sobre a superfície das
saliências é surpreendentemente suficiente para o método da
invenção e apresenta o adicional benefício de que nenhuma
remoção do biofilme das saliências se faz necessário, o que
5 simplifica e acelera o monitoramento. O principal benefício
da presente modalidade de fácil uso da invenção é que
diversos diferentes agentes anti-biofilme podem ser
testados simultaneamente contra uma pluralidade de
biofilmes similares pré-cultivados, sob as reais condições
10 do processo.

Além do mais, de acordo com a presente invenção,
os reais formadores de biofilme de um local de amostragem
da linha de processo podem ser testados pelos agentes anti-
biofilme em seu estado real de cultura de biofilme, pelo
15 que resultados mais confiáveis podem ser obtidos quanto à
eficiência dos agentes anti-biofilme testados.

O preferido dito dispositivo de amostragem pode
ser qualquer sistema em que as saliências alongadas são
fixadas numa extremidade sobre um suporte,
20 preferencialmente, sobre um suporte plano. O tamanho do
dispositivo de amostragem não é limitado, podendo variar,
dependendo do local da amostragem escolhida no processo e
do sistema de teste. Numa adicional modalidade preferida, o
dispositivo de amostragem compreende uma pluralidade de
25 pinos ou cavilhas dispostos em filas e fixados numa
extremidade sobre uma placa de suporte; e o dispositivo de
tratamento da etapa opcional (b) e o dispositivo de cultura
da etapa (c) são placas dotadas de uma pluralidade de poços
dispostos em filas e adaptados para receber um pino ou

cavilha saliente em um poço, de modo que cada pino/cavilha do dispositivo de amostragem se assente em cada poço da placa do dispositivo de tratamento e cultura. Preferencialmente, os dispositivos de amostragem são tampas
5 dotadas de filas de pinos/cavilhas fixados permanentemente sobre as mesmas, de modo que as tampas podem ser usadas juntas, por exemplo, com placas de múltiplos poços comercialmente disponíveis, tais como, placas de 6, 12 ou 24 poços, preferencialmente, placas de 12 poços, como as
10 placas de poliestireno de 12 poços, como o dispositivo de tratamento (b) e dispositivo de cultura (c). Naturalmente, é desejável escolher o número e filas de poços das placas de tratamento e cultura equiparado ao número e filas de pinos/cavilhas da tampa, de modo que quando a tampa é
15 colocada sobre a placa de múltiplos poços, cada pino/cavilha se assente em um poço da placa. Assim, durante a etapa de tratamento e cultura, uma extremidade dos pinos/cavilhas é imersa no meio líquido presente nos poços da placa, enquanto a outra extremidade é fixada sobre a
20 tampa.

O dispositivo de amostragem, por exemplo, a tampa com pinos/cavilhas, foi verificada como sendo bastante vantajosa para a produção de biofilme *in situ*, no processo de fabricação de papel ou papelão. Também, foi verificado
25 que nenhuma cobertura/invólucro é necessária para o dispositivo de amostragem da invenção no processo, mas o dispositivo de amostragem pode ser colocado e as saliências expostas como tal no processo, de modo que as saliências fiquem diretamente em contato com as condições do processo,

por exemplo, com relação às correntes ou esguichos de água do processo.

O desenvolvimento do biofilme pelos formadores de biofilme primário no dispositivo de amostragem pode ser detectado dentro de 12 a 48 horas. A eficácia dos agentes anti-biofilme contra os biofilmes pré-cultivados pode ser demonstrada dentro de 18 horas. Assim, o presente método possibilita reagir rapidamente a quaisquer mudanças na cultura do biofilme dentro do processo, e também a quaisquer situações problemáticas já ocorridas devido ao dito microorganismo, com relação aos métodos do estado da técnica.

Conseqüentemente, em uma modalidade preferível, é efetivado um monitoramento contínuo em um ou mais locais do processo, em que a ação requerida, por exemplo, necessidade de adição ou posterior adição de agente anti-biofilme, tipo e quantidade efetiva do mesmo, podem ser determinadas sem quaisquer indevidas demoras, as quais são evidentes quando são usados os métodos do estado da técnica. Pelas mesmas razões, a adição de agentes anti-biofilme pode ser otimizada e, por exemplo, graves avarias no processo podem ser previstas, sendo dessa forma evitadas.

Opcionalmente, as saliências do dispositivo de amostragem podem ser usadas como ponto de partida para o isolamento dos micróbios formadores de biofilme primário. Opcionalmente, também as saliências do dispositivo de amostragem podem ser tingidas e a cultura do biofilme quando da exposição às condições do processo pode ser quantificada.

A invenção proporciona ainda um kit de montagem para monitoramento da presença de microorganismo formador de biofilme em um processo de fabricação de papel ou papelão e para determinação da necessidade de um agente anti-biofilme no processo e, opcionalmente, para seleção do agente anti-biofilme mais eficiente. O kit de montagem compreende, pelo menos, uma combinação das seguintes etapas:

(i) um dispositivo de amostragem compreendendo uma pluralidade de saliências alongadas conectadas a um suporte, de modo a possibilitar aos ditos microorganismos formar um biofilme *in situ* no dito processo, sobre a superfície do dispositivo de amostragem;

(ii) opcionalmente, um dispositivo de tratamento, compreendendo uma placa dotada de uma pluralidade de recessos dispostos para receber uma saliência do dispositivo de amostragem em cada recesso da mesma;

(iii) um dispositivo de cultura, compreendendo uma placa dotada de uma pluralidade de recessos dispostos para receber uma saliência do dispositivo de amostragem em cada recesso da mesma;

(iv) um agitador para agitar o dispositivo de tratamento e/ou dispositivo de cultura;

(v) opcionalmente, um detector para detectar a presença ou ausência de quaisquer micróbios tingidos com mordente, aderidos nos recessos do dispositivo de cultura; e

(vi) reagentes, compreendendo:

(a) um ou mais agentes de teste anti-biofilme, adequados para a indústria de papel, preferencialmente, em

uma ou mais diluições;

(b) um meio de cultura líquido;

(c) um agente de tingimento; e

(d) opcionalmente, uma solução de lavagem, tal como,
5 água esterilizada.

Preferencialmente, o kit de montagem compreende:

(i) o dito dispositivo de amostragem, o qual se constitui de uma tampa dotada de uma pluralidade de pinos ou cavilhas em filas fixadas numa extremidade sobre a tampa;

10 (ii) o dispositivo de tratamento; e (iii) o dispositivo de cultura, em que ambos se constituem de placas de múltiplos poços, dotadas de uma pluralidade de poços em filas, em que os pinos/cavilhas do dispositivo de amostragem se assentam nos poços das placas de tratamento e de cultura, um
15 pino/cavilha em cada poço, quando a tampa ou dispositivo de amostragem é colocada na placa de tratamento ou na placa de cultura. Tais dispositivos se encontram descritos acima.

Além disso, em uma modalidade, (ii) os poços da placa de tratamento são preenchidos com uma solução de um
20 ou mais agentes anti-biofilme, em uma ou mais concentrações, em um meio de cultura líquido ou água esterilizada, em que um agente de teste anti-biofilme se dispõe em cada poço, em que pelo menos um poço é preenchido com um meio de cultura ou apenas água esterilizada (poço de
25 referência), e (iii) os poços da placa de cultura são preenchidos com um meio de cultura líquido, em que os poços são vedados com uma tampa removível, por exemplo, uma lâmina de metal.

O termo "agente anti-biofilme", conforme aqui

usado, de modo geral, significa qualquer agente que inibe ou previne o crescimento de um microorganismo. O agente anti-biofilme preferido é adequado para a inibição do modo de cultura do biofilme de microorganismos formadores de biofilme que ocorre na indústria do papel e, mais preferencialmente, de formadores de biofilme primário na indústria do papel, por exemplo, *Deinococcus geothermalis* e/ou outros formadores de biofilme primário mencionados acima. Exemplos de agentes anti-biofilme incluem os produtos químicos biocidas comercialmente disponíveis, tais como, 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida (DBNPA) e bistiocianato de metileno (MBT) e também os agentes anti-biofilme que se originam de plantas, compostos e extratos puros, tais como, aqueles mencionados nos Pedidos de Patentes FI 2002/1986 e FI 2002/1987 citados acima, preferencialmente, compostos fenólicos, por exemplo, galato de octila e galato de laurila, betulina e flavonóis, por exemplo, penta-hidróxiflavona e tri-hidróxiflavona. O termo "agente de teste anti-biofilme", conforme aqui usado, significa um agente anti-biofilme, por exemplo, um composto, uma mistura de dois ou mais agentes anti-biofilme, por exemplo, qualquer combinação de compostos a ser testada e conjuntamente usada ou um extrato, por exemplo, extrato de planta. O agente de teste anti-biofilme é preferencialmente dissolvido em uma solução aquosa, conforme descrito acima.

O meio de cultura é uma solução e pode ser escolhido, por exemplo, de soluções de cultura aquosas comercialmente disponíveis, adequadas para micróbios,

especialmente formadores de biofilme, mais particularmente, formadores de biofilme primário que ocorrem na indústria do papel, tal como, caldo-R2 (comercialmente disponível, por exemplo, da Difco) e de águas de processo esterilizada de máquinas de fabricação de papel ou papelão, preferencialmente contendo nutrientes adicionados.

Uma parte ou todos os reagentes podem se dispor em um recipiente de múltiplas doses, por exemplo, em uma garrafa ou em um recipiente de dose única ou ser preenchidos nos recessos dos ditos dispositivos, conforme mencionado acima.

Adequado(s) agente(s) de tingimento(s) para o kit de montagem inclui(em) qualquer/quaisquer agente(s) convencional(is) adequado(s) para tingimento de biofilmes, tais como, aqueles mencionados acima. Também um reagente, por exemplo, etanol, pode ser fornecido para dissolução do mordente dos recessos, se o kit de montagem for para determinações quantitativas.

O kit de montagem pode ainda compreender, por exemplo, um adequado agitador para agitação das placas de tratamento e/ou cultura, cujo agitador pode, preferencialmente, ser dotado de um sistema de aquecimento para incubação das placas, por exemplo, durante a etapa de tratamento e/ou cultura. Também, um detector pode ser incluído no kit de montagem, tal como, um leitor de placa de múltiplos poços para medições de absorbância ou fluorescência. O tipo de detector depende do método de tingimento usado para os micróbios do biofilme. Também, pipetas podem ser incluídas no kit de montagem.

Exemplo

Nesse experimento, uma modalidade do dispositivo de amostragem da invenção é usado para ilustrar o presente método, para determinação do efeito de diversos agentes anti-biofilme na inativação de biofilmes formados em uma máquina de fabricação de papel.

Nessa modalidade, o dispositivo de amostragem compreende 12 cavilhas de aço inoxidável fixadas numa extremidade sobre uma tampa de aço inoxidável. A tampa com as cavilhas é apresentada na Figura 1, junto com uma placa de tratamento com 12 poços adaptados para receber as cavilhas, quando a tampa é colocada na placa. Adequadamente, a tampa foi projetada para ser complementar às placas de poliestireno de 12 poços comercialmente disponíveis.

Três tampas de dispositivo amostragem são imersas no silo de filtrado transparente de uma máquina de fabricação de papel fino neutro e deixadas suspensas imersas no dito filtrado à temperatura de 52°C da água do processo, durante 68 horas. Depois, os dispositivos de amostragem são removidos, lavados uma vez com água de torneira esterilizada e cada tampa é colocada sobre uma placa de tratamento de 12 poços, de modo que as cavilhas com biofilmes formados *in situ* no processo, na superfície da mesma, são imersas na solução de tratamento dentro dos poços, cada cavilha em um poço, sendo mantidas suportadas em uma extremidade pela tampa.

Cada poço de uma placa de tratamento contém 3,5 mL apenas de água de torneira esterilizada (amostras de

referência) ou 3,5 mL de água de torneira esterilizada junto com um agente anti-biofilme, numa concentração de 1 a 50 ppm (substância ativa). O volume máximo dos poços é utilizado, de modo que quase todo o comprimento das

5 cavilhas será exposto aos agentes anti-biofilme (a solução de tratamento). Os agentes anti-biofilme testados incluem BCDMH, que é o composto de (bromo-cloro-5,5-dimetil-hidantoína), uma mistura de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona e 2-metil-4-isotiazolin-3-ona, THPS, que é o sulfato

10 de (tetrakis(hidróximetil)fosfônio, DBNPA, que é o composto de (2,2-dibromo-2-cianoacetamida), glutaraldeído, MBT (metileno-bis-tiocianato), BNPD, que é o composto de (bromo-2-nitropropan-1,3-diol), todos os quais sendo comercialmente disponíveis.

15 A etapa de tratamento anti-biofilme é realizada mediante incubação das placas com a tampa sobre as mesmas, deixando em repouso à temperatura de 52°C durante 2 horas. Após a etapa de tratamento, as tampas são removidas da placa e lavadas três vezes com água de torneira

20 esterilizada, em seguida, colocadas sobre as placas de cultura de 12 poços, as quais são similares às placas de tratamento, mas os poços contêm 2,5 mL de caldo-R2 esterilizado (Difco). As placas de cultura (placa + tampa, com as cavilhas imersas nos poços) são agitadas a 250 rpm,

25 à temperatura de 52°C durante 17 horas.

Finalmente, as cavilhas e o meio de cultura são removidos dos poços, os poços são lavados uma vez com água de torneira e os micróbios aderidos às paredes dos poços são tingidos com safranina. A quantidade de biofilme

produzida pelos micróbios que sobreviveram da etapa de tratamento com agentes anti-biofilme é avaliada visualmente.

Conseqüentemente, nesse experimento, DBNPA, 5 BCDMH, THPS e glutaraldeído podem eliminar ou remover o biofilme nas cavilhas, de modo que um novo biofilme é formado durante a etapa de cultura. No entanto, após o tratamento do biofilme nas cavilhas com a mistura de isotiazolonas, MBT ou BNPD, o biofilme tratado é ainda 10 capaz de formar um novo biofilme durante a etapa de cultura na superfície das paredes do dispositivo de cultura. A prevenção de novo crescimento de novo biofilme na etapa de cultura com concentração mais baixa do agente anti-biofilme é obtida mediante adição de 5 ppm de DBNPA.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detectar a presença de microorganismos formadores de biofilme em um processo de fabricação de papel ou papelão, para determinação da necessidade de um agente anti-biofilme no processo, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) submeter um dispositivo de amostragem na linha de processo por um período de tempo de 3 horas a 7 dias, de modo a possibilitar aos ditos microorganismos formar um biofilme *in situ* no dito processo, sobre a superfície do dispositivo de amostragem;

(b) tratar a superfície do dispositivo de amostragem com o dito biofilme formado sobre o mesmo em uma solução de um agente de teste anti-biofilme, por um período de tempo de 10 minutos a 4 horas;

(c) contatar a superfície do dispositivo de amostragem com o dito biofilme sobre o mesmo, com um meio de cultura líquido em um recesso do dispositivo de cultura por um período de tempo de 8 a 48 horas em um dispositivo de tratamento provido com um recesso;

(d) remover a solução da cultura e o dispositivo de amostragem do recesso do dito dispositivo de cultura e detectar qualitativa e/ou quantitativamente a presença ou ausência de microorganismos formadores de biofilme aderidos sobre as paredes do recesso.

2. Método, de acordo com a reivindicações 1, caracterizado pelo fato de que após a formação do biofilme

na dita superfície do dispositivo de amostragem, o mesmo é tratado (b) com a solução do agente de teste anti-biofilme, para a seleção do agente anti-biofilme mais eficiente.

5 3. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2, caracterizado pelo fato de:

(a) submeter um dispositivo de amostragem na linha de processo por um período de tempo de 12 horas a 3 dias;

(b) efetuar a etapa de tratamento com a solução de um
10 agente de teste anti-biofilme, por um período de tempo, por exemplo, de 10 minutos a 4 horas, preferencialmente, por 1-2 horas, entre a temperatura ambiente e 65°C, preferencialmente, na temperatura próximo à temperatura do processo do local de amostragem da linha de processo, tal
15 como, na faixa de 40-60°C;

(c) efetuar a etapa de cultura, preferencialmente com agitação, em um meio de cultura líquido em um recesso do dispositivo de cultura por um período de tempo, por exemplo, de 8-48 horas, preferencialmente, de 8-24 horas,
20 numa temperatura entre a temperatura ambiente e 65°C, por exemplo, na faixa de 35-65°C, preferencialmente, próximo à temperatura do processo do local de amostragem da linha de processo, tal como, na faixa de 40-60°C.

25 4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, caracterizado pelo fato de que o tratamento da etapa (b) é efetuado em um dispositivo de tratamento dotado de um recesso, o qual é enchido com uma solução compreendendo o agente de teste antibiofilme e um

meio de cultura líquido, água esterilizada e/ou água de processo, mediante imersão da dita superfície do dispositivo de amostragem na dita solução.

5 5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizado pelo fato de que a etapa (c) é efetuada em um dispositivo de cultura dotado de um recesso, o qual é enchido com o meio de cultura líquido, mediante imersão da dita superfície do dispositivo de
10 amostragem na dita solução.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, caracterizado pelo fato de que na etapa (d), o dispositivo de amostragem e a solução de cultura são
15 removidos do recesso do dispositivo de cultura, em seguida, o recesso é opcionalmente lavado e quaisquer microorganismos formadores de biofilme aderidos às paredes do recesso são tingidos e a presença e/ou intensidade da formação de cor no recesso é detectada qualitativa ou
20 quantitativamente.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, caracterizado pelo fato de que na etapa (a), o dispositivo de amostragem compreende uma pluralidade
25 de saliências alongadas conectadas a um suporte, pelo que, quando levadas ao processo, o biofilme é formado sobre a superfície das saliências.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7,

caracterizado pelo fato de que na etapa (b), o dispositivo de tratamento é dotado de uma pluralidade de recessos contendo uma solução que compreende um ou mais agentes de teste anti-biofilme em uma ou mais concentrações, um agente de teste anti-biofilme com uma concentração em cada recesso, e de uma solução sem qualquer agente de teste anti-biofilme, considerada como referência, e em que as saliências do dito dispositivo de amostragem removidas da linha de processo são imersas na dita solução nos recessos, uma saliência em cada recesso.

9. Método, de acordo com as reivindicações 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que na etapa (c), o dispositivo de cultura compreende uma pluralidade de recessos contendo o meio de cultura líquido, e em que as saliências do dito dispositivo de amostragem, opcionalmente tratadas na etapa (b), são imersas na dita solução de cultura nos recessos do dispositivo de cultura, uma saliência em cada recesso.

20

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9, caracterizado pelo fato de que o dispositivo de amostragem compreende uma pluralidade de pinos ou cavilhas dispostos em filas e fixados numa extremidade sobre uma placa suporte e em que o dispositivo de tratamento da etapa opcional (b) e o dispositivo de cultura da etapa (c) se constituem de placas de múltiplos poços, dotadas de uma pluralidade de poços dispostos em filas e adaptadas para receber um pino saliente em um poço,

de modo que cada pino do dispositivo de amostragem se assente em cada poço da placa dos dispositivos de tratamento e de cultura.

- 5 11. Kit de montagem para detectar a presença de microorganismos formadores de biofilme, de acordo com o método da reivindicação 1, em um processo de fabricação de papel ou papelão, e para determinar a necessidade de um agente anti-biofilme no processo e para selecionar o agente
- 10 anti-biofilme mais eficiente, caracterizado pelo fato de compreender pelo menos uma combinação de:
- (i) um dispositivo de amostragem compreendendo uma pluralidade de saliências alongadas conectadas a um suporte, de modo a possibilitar aos ditos microorganismos
 - 15 formar um biofilme *in situ* no dito processo, sobre a superfície do dispositivo de amostragem;
 - (ii) um dispositivo de tratamento, compreendendo uma placa dotada de uma pluralidade de recessos dispostos para receber uma saliência do dispositivo de amostragem em cada
 - 20 recesso da mesma;
 - (iii) um dispositivo de cultura, compreendendo uma placa dotada de uma pluralidade de recessos dispostos para receber uma saliência do dispositivo de amostragem em cada recesso da mesma;
 - 25 (iv) um agitador para agitar o dispositivo de tratamento e/ou dispositivo de cultura;
 - (v) um detector para detectar a presença ou ausência de quaisquer microorganismos formadores de biofilme aderidos nos recessos do dispositivo de cultura; e

(vi) reagentes, compreendendo:

(a) um ou mais agentes de teste anti-biofilme, adequados para a indústria de papel, preferencialmente, em uma ou mais diluições, para uso no dispositivo de
5 tratamento de (ii);

(b) um meio de cultura líquido, para uso no dispositivo de cultura de (iii); e

(c) agente de tingimento, para uso na detecção da presença ou ausência de quaisquer microorganismos
10 formadores de biofilme com um detector (v).

12. Kit de montagem, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de compreender

(i) um dispositivo de amostragem dotado de uma pluralidade
15 de pinos em filas, fixados numa extremidade sobre uma tampa; e (ii) o dispositivo de tratamento; e (iii) o dispositivo de cultura, em que ambos dispositivo de tratamento e dispositivo de cultura se constituem de placas de múltiplos poços, dotadas de uma pluralidade de poços em
20 filas, em que os pinos do dispositivo de amostragem se assentam nos poços das placas de tratamento e de cultura, um pino em cada poço, quando o dispositivo de amostragem é colocado na placa de tratamento ou na placa de cultura.

25 13. Kit de montagem, de acordo com as reivindicações 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que (ii) os poços da placa de tratamento são enchidos com uma solução de um ou mais agentes de teste anti-biofilme, em uma ou mais concentrações, em um meio de cultura líquido ou

água esterilizada, um agente de teste anti-biofilme em cada poço, e em que pelo menos um poço é enchido com um meio de cultura ou apenas água esterilizada, e (iii) os poços da placa de cultura são enchidos com um meio de cultura líquido, os poços sendo vedados com uma cobertura removível.

14. Uso do método de detecção, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10, ou do kit de montagem de acordo com qualquer uma das reivindicações 12-14, caracterizado pelo fato de que o dito uso se destina ao monitoramento de um processo de fabricação de papel ou papelão, para determinar a necessidade de um agente anti-biofilme no processo e para selecionar o agente anti-biofilme mais eficiente.

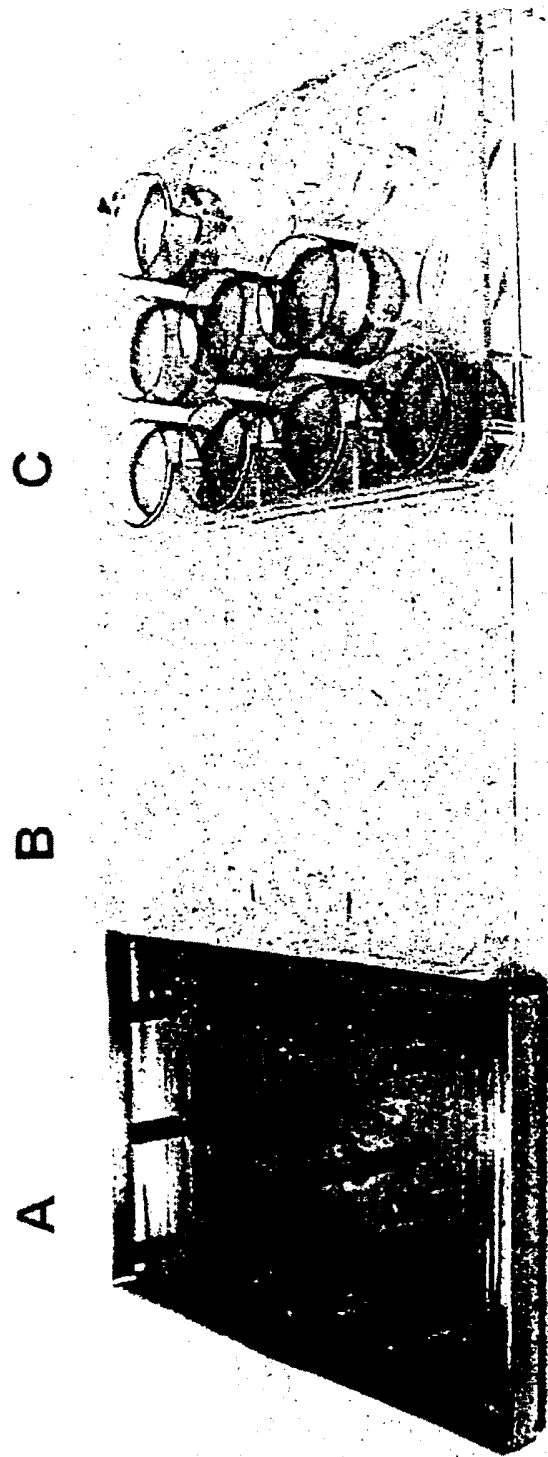


Fig. 1

RESUMO

**"MÉTODO PARA MONITORAR A PRESENÇA DE
MICROORGANISMOS FORMADORES DE BIOFILME NA INDÚSTRIA DE
PAPEL"**

5 A presente invenção é dirigida para um método
para detectar a presença de microorganismos formadores de
biofilme em um processo de fabricação de papel ou papelão,
para determinar a necessidade de um agente anti-biofilme no
processo. O método compreende as etapas de: (a) submeter um
10 dispositivo de amostragem na linha de processo por um certo
período de tempo, de modo a possibilitar aos ditos
microorganismos formar um biofilme *in situ* no dito
processo, sobre a superfície do dispositivo de amostragem;
(b) opcionalmente, tratar o dito biofilme formado com uma
15 solução de um agente de teste anti-biofilme, por um certo
período de tempo; em seguida (c) contatar o dito biofilme
com um meio de cultura líquido em um recesso do dispositivo
de cultura por um determinado período de tempo; e (d)
remover a solução da cultura do recesso do dito dispositivo
20 e detectar qualitativa e/ou quantitativamente a presença ou
ausência de um biofilme aderido sobre as paredes do
recesso. A invenção também proporciona um kit de montagem.