



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112015000340-0 B1



(22) Data do Depósito: 17/07/2013

(45) Data de Concessão: 12/04/2022

(54) Título: MÉTODOS DE ENDEREÇAMENTO DE UMA INFESTAÇÃO DE MICROORGANISMO EM UM SISTEMA DE PROCESSAMENTO INDUSTRIAL

(51) Int.Cl.: C12Q 1/02; C12Q 1/04; C12Q 1/68.

(30) Prioridade Unionista: 17/07/2012 US 13/550,748.

(73) Titular(es): NALCO COMPANY.

(72) Inventor(es): LILIYA LUND; LAURA E. RICE.

(86) Pedido PCT: PCT US2013050896 de 17/07/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/015044 de 23/01/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 07/01/2015

(57) Resumo: MÉTODO PARA CONSTRUIR UM ÍNDICE DE DIVERSIDADE E UM ÍNDICE DE VIABILIDADE DE MICROORGANISMOS EM PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS. A invenção é direcionada a métodos e composições para identificar os micro-organismos específicos presentes em uma poção particular de processos de fabricação papel. O método envolve obtenção e comparação de um índice de diversidade de uma amostra a partir do processo. Porque nenhum sistema é completamente livre de infestação biológica, utilizando informação tomada das mudanças nas populações provê informação útil na proteção do sistema a partir de efeitos indesejados. Não somente o índice de diversidade permite distinguir entre eventos biológicos e não biológicos, ele ainda permite para a predição de problemas sem previamente conhecer que um organismo particular causará um problema particular.

“MÉTODOS DE ENDEREÇAMENTO DE UMA INFESTAÇÃO DE MICRO-ORGANISMO EM UM SISTEMA DE PROCESSAMENTO INDUSTRIAL”

Referência Cruzada aos Pedidos Relacionados

[001]Este pedido é uma continuação em parte do Pedido de Patente Norte-Americano 13/360.238 depositado em 24 de janeiro de 2012.

Declaração em Relação a Pesquisa ou Desenvolvimento Federalmente Patrocinado

[002]Não aplicável.

Antecedente da Invenção

[003]A presente invenção relaciona-se geralmente a composições de matéria, aparato e métodos úteis em detectar, identificar, e dirigir micro-organismos presentes em sistemas de processamento comerciais.

[004]A presença e crescimento de certos micro-organismos em sistemas de processamentos comerciais é um desafio contínuo. Muitos dos vários estágios dos sistemas de processamentos comerciais contêm uma variedade de condições tendo diferentes quantidades de água, nutrientes, calor, protetores, substratos ancorantes, condições químicas, e/ou ausência de predadores que sempre funcionam como nichos ambientais adequados para colonização de todos os tipos de micro-organismos. Crescimento da população por esses micro-organismos sempre coloca um número de problemas, incluindo funções no processo de degradação e encrostando os produtos finais.

[005]Um tal problema é formação de depósito de crosta induzido por micro-organismo. Crosta é o acúmulo em uma superfície de um ítem presente em um sistema de processamento comercial de uma composição sólida rígida compreendendo material orgânico e/ou inorgânico depositado. A crosta pode ser secreções e/ou colônias de micro-organismos propriamente ditos. Em particular, a crosta pode incluir ou consistir de acúmulo de um ou mais tipos de cascas duras e/ou suporte de quitina

e/ou organismos corais. Crosta pode ter muitos impactos ou sistemas negativos tais como eficiência operacional diminuída, falência de equipamento prematura, perda na produtividade, perda na qualidade do produto, e riscos relacionados a saúde aumentados. Pior de tudo, a crosta deve ser sempre fisicamente removida por raspagem ou outros meios físicos e isto requer encerramento dispendioso ou desmontagem de parte ou todo do sistema de processamento.

[006] Outro problema que micro-organismo representa é através da formação de biofilmes. Biofilmes são camadas de materiais orgânicos compreendendo micro-organismos ou substância exopolimérica secretada por micro-organismos que auxiliam na formação de colônias microbianas. Biofilmes podem crescer nas superfícies do equipamento de processamento bem como em tanques de fluidos. Esses biofilmes são ecossistemas complexos que estabelecem um meio para concentrar nutrientes e oferecem proteção para o crescimento. Biofilmes podem acelerar a crosta, corrosão, e outros processos de encrustamento. Não somente os biofilmes contribuem para a redução das eficiências do sistema mas eles também provêem um excelente ambiente para proliferação microbiana de outros micro-organismos, incluindo organismos patogênicos. É então importante que biofilmes e outros processos de encrustamento sejam reduzidos para a melhor extensão possível para maximizar a eficiência de processamento e minimizar os riscos relacionados a saúde a partir de tais patógenos.

[007] Vários fatores contribuem para estender a contaminação biológica e governam a resposta apropriada. Temperatura da água; pH da água; nutrientes orgânicos e inorgânicos, condições de crescimento tais como condições aeróbicas ou anaeróbicas, e em alguns casos a presença ou ausência de luz solar etc, podem desempenhar um papel importante. Esses fatores também ajudam a decidir quais tipos de micro-organismos podem estar presentes no sistema de água e como melhor controlar aqueles micro-organismos. Identificação apropriada do micro-

organismo é também crucial para responder apropriadamente. Diferenças em relação se os micro-organismos são plantas, animais, ou fungos, ou se eles são plântônicos ou sésseis determinam quão efetivos vários biocontroles serão. Por causa da diferença de micro-organismos induzir diferentes problemas, identificação apropriada é crucial para remediar apropriadamente efeitos microbianos indesejados. Finalmente porque problemas quimicamente causados não podem ser remediados com biocidas, é também necessário identificar quais problemas têm origens não biologicamente baseadas.

[008]Técnicas padrões tipicamente usadas para monitorar sistemas de processamento incluem técnicas de contagem de placa padrões. Essas técnicas requerem períodos de incubação prolongados e não provêm informação adequada para controle pró-ativo e prevenção de problemas relacionados ao crescimento microbiano. Mais recentemente, medidas de adenosina trifosfato (ATP) têm sido usadas como meios de controle pró-ativo. Entretanto, os reagentes são dispendiosos e pequenos volumes são amostrados a partir de grandes sistemas de água. Enquanto é possível quantificar atividade microbiana em uma amostra com o uso do ensaio de ATP, a reação é incapaz de discriminar entre ATP que é produzido por um tipo de micro-organismo comparado a outro e não detecta organismos que são viáveis mas inibidos. Outra desvantagem é que este método não pode ser usado para determinar contribuição microbiana para falhas na chapa, porque a maioria dos organismos não é viável seguindo exposição ao calor da seção secadora. Coleta de dados é também infrequente, levando a quebras significantes nos dados. Assim, esta abordagem provê informação limitada no estado dos micro-organismos no sistema de interesse. Em adição, essas abordagens são tipicamente usadas para monitorar bactéria planctônica. Embora em alguns casos, superfícies podem ter um swab coletado e analisado a fim de quantificar biofilme de bactéria. Essas abordagens são muito tediosas e consumidoras de tempo.

[009] Padrões de oxigênio dissolvido (OD) têm sido usados para medir atividade microbiana em fluidos, como é bem conhecido que atividade microbiana e metabolismo aeróbico leva a uma diminuição nas concentrações de oxigênio dissolvido. Patentes Norte-Americanas 5.190.728 e 5.282.537, revelam um método e aparato para monitorar o encrostamento em águas comerciais utilizando medidas de OD. Entretanto, a abordagem requer o uso de adições de nutriente para diferenciar encrostamento biológico do não biológico e não há menção de como o padrão é renovado para medidas adicionais após a superfície do padrão ter encrostado. Em adição, a abordagem revelada requer um meio de continuamente fornecer oxigênio.

[010] O padrão DO eletroquímico estilo Clark usual tem muitas limitações tais como: interferências químicas (H_2S , pH, CO_2 , NH_3 , SO_4 , Cl^- , Cl_2 , ClO_2 , MeOH, EtOH e várias espécies de íons), calibração frequente e substituição de membrana, resposta lenta e leituras oscilantes, choque térmico, e requerimentos de alto fluxo através de membranas. Um novo tipo de padrão de oxigênio dissolvido, que tem recentemente sido feito comercialmente disponível por um número de companhias (por exemplo, HACH, Loveland, CO), supera quase todas essas limitações de forma que OD pode ser medido online no processamento de águas. Este novo padrão OS (LDO) é baseado em meia vida de decaimento de fluorescência onde a presença de oxigênio encurta a meia vida da fluorescência de um fluoróforo excitado. O fluoróforo é imobilizado em um filme em uma superfície sensora e a excitação é provida com um LED azul. Patentes Norte-Americanas 5.698.412 e 5.856.119 revelam um método para monitorar e controlar atividade biológica em fluidos em que OD é medido em combinação com pH e/ou ORP (potencial de redução de oxidação) para medir transições no comportamento metabólico, especificamente relacionado ao esgotamento de nutriente/substrato.

[011] Técnicas de plaqueamento convencionais e resíduos oxidantes podem indicar dose biocida adequada e controle de crescimento microbiano, enquanto de-

posição, falhas e quebras permanecem prevalentes. Existe uma clara necessidade de prover informação mais precisa em relação ao crescimento microbiano e formação de biofilme em sistemas industriais. Técnicas de PCR quantitativas permitem rápida análise de falhas de chapas, feltros, amostras de processamento de água etc, para determinar a contribuição de micro-organismos para problemas de qualidade. Esta nova abordagem tem sido demonstrada para permitir para um mais diagnóstico pró-ativo de problemas levando a eficiência da máquina melhorada e qualidade de produto.

[012]Então é claro que existe uma utilidade clara em novos métodos e composições para a identificação apropriada de micro-organismos presentes em sistemas de processamento comerciais. A técnica descrita nesta seção não é tencionada para constituir uma admissão que qualquer patente, publicação ou outra informação referida aqui é "Técnica Anterior" com respeito a esta invenção, a menos que especificamente designado tal como. Em adição, esta seção não deve ser construída para significar que uma pesquisa tenha sido feita ou que nenhuma outra informação pertinente como definido em 37 CFR parágrafo 1,56(a) existe.

Breve Resumo da Invenção

[013]Pelo menos uma modalidade da invenção é direcionada a um método de direcionar uma infestação de micro-organismo em um sistema de processamento industrial. O método compreende as etapas de: 1) tomar pelo menos uma primeira medida que identifica a concentração relativa de dois ou mais organismos presentes em pelo menos uma porção do sistema de processamento industrial, as identificações pelo menos parcialmente definindo um índice de diversidade basal, 2) tomando pelo menos uma segunda medida que identifica a concentração relativa de dois ou mais organismos presentes em pelo menos uma porção do sistema de processamento industrial, as identificações pelo menos parcialmente definindo um índice de diversidade subsequente a pelo menos uma segunda medida tomada depois que

a(s) primeira(s) medida (s), 3) notando qualquer mudança relativa em concentração dos dois organismos, 4) se a segunda medida difere a partir da medida por uma quantidade maior que uma quantidade limite pré-determinada determinando se a mudança é associada com um efeito não desejado no sistema de processamento industrial, e 5) implementando um remédio para remediar o efeito não desejado.

[014]A primeira e segunda medida pode ser feita por pelo menos um item selecionado a partir da lista consistindo de análise de DNA, análise de PCR, análise de qPCR, e quaisquer combinações dos mesmos. A quantidade limite pode ser 100 células por mL de fluido tomado a partir do sistema ou 100 células por grama de um produto final do processo industrial, ou outras amostras sólidas tomadas a partir do processo incluindo, mas não limitado a filtros. O método pode ainda compreender a etapa de identificar se um dos organismos é um pioneiro e se um é um adaptador; se um é um pioneiro e sua concentração aumenta por mais que o limite no índice subsequente, a remediação inclui aplicação de um regime biocida com alvo no pioneiro, se nenhum formadores de biofilme são detectados a remediação inclui identificação e eliminação de um vetor não biológico que facilita o assentamento dos micro-organismos.

[015]A despeito da identidade de pelo menos um organismo, se suas concentrações relativas aumentam para a medida anterior por uma quantidade maior que o limite ainda se a população biológica geral permanece a mesma, um tratamento biocida pode ser adicionado ao sistema.

[016]O método pode ainda compreender a etapa de correlacionar a mudança em seu índice de diversidade a outro evento que ocorreu no sistema industrial, o outro evento selecionado a partir da lista consistindo de: mudança da fonte de pelo menos um material de alimentação, mudando o tipo de pelo menos um material de alimentação, mudando a taxa de operação de pelo menos uma porção do sistema, e quaisquer combinação das mesmas, e revertendo o evento. A concentração geral de

células na amostra pode permanecer não mudada entre a primeira e segunda medidas. As medidas podem ser tomadas em uma porção de sistema que um depósito tenha formado em e o depósito não contenha qualquer componente biológico significativo. As medidas podem ser tomadas em mais de uma pluralidade de localizações através do sistema e os índices comparam populações sistêmicas gerais.

[017]Pelo menos uma terceira medida do índice de terceira diversidade pode ser tomada subsequente à segunda medida e subsequente à remediação, e a eficácia da remediação é avaliada pela mudança nas concentrações relativas de pelo menos dois organismos como medido na terceira medida do índice de diversidade. A concentração geral das células na amostra pode permanecer não alterada entre as primeira e segunda medidas, a identidade do primeiro e segundo organismos não são conhecidas para causar quaisquer efeitos indesejados no equipamento de processamento ou produto final, e um biocida efetivo pode ser adicionado ao sistema para matar o primeiro e segundo organismos quando uma mudança limite é detectada. Um dos organismos pode ser capaz de formar esporos que são resistentes aos biocidas e quando a quantidade relativa deste organismo cresce em excesso do limite, o tratamento pode ser alvo à área do processo com células vegetativas para prevenir esporulação.

Breve Descrição dos Desenhos

[018]Uma descrição detalhada da invenção é de agora em diante descrita com referência específica sendo feita aos desenhos em que:

[019]FIG. 1 contém esses gráficos ilustrando a aplicação da invenção para rápida detecção de bactéria total (A), bactéria formadora de biofilme primário (A) e adaptativo (C) em depósitos de caixa de entrada coletados em um laminador de chapa livre de revestimento.

[020]FIG. 2 ilustra um gráfico da carga bacteriana total de falhas de chapas a partir de um laminador de chapa livre revestido (1-5), uma fábrica de tecido (6), e um

laminador de chapa livre não revestido (7) ao qual a invenção foi aplicado.

[021]FIG. 3 é um gráfico da carga bacteriana total das amostras de falha de chapa que a invenção foi aplicada.

[022]FIG. 4 ilustra gráficos de pizza denotando diversidade microbiana em amostras de DNA coletadas a partir de feltros de máquinas de três diferentes fábricas de papéis.

Descrição Detalhada da Invenção

[023]As seguintes definições são providas para determinar como termos utilizados neste pedido, e em particular como as reivindicações, são para serem construídas. A organização das definições é para conveniência somente, não é tencionada limitar quaisquer das definições para qualquer categoria particular.

[024] "Adaptador" significa um organismo que exibe algum nível de tolerância ao programa de biocontrole. Quando a competição microbiana do adaptador é reduzida por um biocida, este organismo adaptativo é capaz de crescer e pode formar um biofilme.

[025]"Biológico" significa uma composição de matéria em que pelo menos 10% da composição (por volume ou massa) compreende células a partir de um organismo.

[026]"Defeito" significa um atributo não desejado de um item associado com um processo industrial. Isto inclui, mas não é limitado a um ou mais tampões em um feltro, e tais atributos de folha de papel como furos, descoloração, listras, manchas, manchas translúcidas, e quaisquer combinações dos mesmos.

[027]"Feltro" significa um cinto feito de uma lã entrelaçada ou qualquer outra fibra em um processo de fabricação de papel que funciona como um transportador de materiais em que as fibras entrelaçadas definem uma pluralidade de lúmens através das quais água ou outros fluidos podem passar. Feltros podem também prover amortecimento entre rolo compressor e podem também ser um meio usado para re-

mover água a partir de materiais de fabricação de papel. Feltros incluem mas não são limitados a feltros inferiores, quadros de feltros inferiores, feltros de tecido úmido cilíndrico, feltros secadores, feltros permanentes, feltros de captação, feltros de sucção-captção, feltros superiores Harper e feltros superiores.

[028]"Oportunista" significa um organismo que cresce por decantar em biofilmes pré-estabelecidos, crostas, depósitos, ou outras colônias de organismos, e tendem a suplantam, substituir, ou coexistir junto com organismos pioneiros e/ou organismos oportunistas prévios.

[029]"Produto de Papel ou Folha de Papel" significa qualquer produto final de estrutura fibrosa formado de um processo de fazer papel tradicionalmente, mas não necessariamente, compreendendo fibras de celulose. Exemplos de tais produtos finais incluem, mas não são limitados a tecido facial, tecido de banho, guardanapo de mesa, papel de cópia, papel de impressão, papel de escrita, papel de anotação, jornal, cartolina, papel de pôster, papel sulfite, papelão e semelhantes.

[030]"Processo de fazer papel" significa um ou mais processos para converter materiais brutos em produtos de papéis e que incluem, mas não são limitados a um ou mais de tais passos como pulping, digestão, refinamento, secagem, caldeamento, pressão, crepagem, desidratação e braqueamento.

[031]"Análise PCR" significa análise da reação em cadeia polimerase.

[032]"Pioneiro ou Primário" significa um organismo que liga a uma superfície ou região limpa, assim iniciando biofilme, crosta, ou formação de depósito nesta superfície.

[033]"Plug" significa um sólido, semi-sólido, viscoso, e/ou outro depósito de material posicionado dentro dos lúmens de um feltro. Plugs podem inibir o fluxo de material através dos lúmens, e/ou podem impedir qualquer outra funcionalidade de um feltro.

[034]"Iniciador" significa uma composição de matéria, tipicamente uma fita curta de nucleotídeos, conhecida ser complementar a uma seção específica de DNA e serve como um ponto de partida para síntese de uma cadeia nucleotídica complementar ao DNA adjacente à seção específica de DNA.

[035]"Padrão" significa uma composição de matéria construída e arranjada para ligar a uma seção alvo de DNA e que pode ser facilmente detectada quando então ligada e então ser usado para indicar a presença ou ausência da seção alvo de DNA.

[036]"Análise qPCR" significa análise de reação de cadeia polimerase quantitativa.

[037]"Micro-organismos" significa qualquer organismo pequeno o suficiente para insinuar ele mesmo dentro, adjacente a, em cima de, ou ligado ao equipamento usado em um processo industrial (incluindo fabricação de papel), ele inclui mas não é limitado àqueles organismos tão pequenos que eles não podem ser vistos sem a ajuda de um microscópio, coleções ou colônias de tais pequenos organismos que podem ser vistos pelo olho nu, mas que compreendem um número de organismos individuais que são muito pequenos para serem vistos pelo olho nu, bem como um ou mais organismos que podem ser vistos pelo olho nu, ele inclui mas não é limitado a qualquer organismo cuja presença, em algumas formas impedem o processo industrial tal como formando plugs dentro de feltros e/ou causando defeitos dentro das folhas de papel.

[038]No evento que as definições acima ou uma descrição atestada em outro lugar neste pedido é inconsistente com um significado (explícito ou implícito) que é comumente usado, em um dicionário, ou estado em uma fonte incorporado por referência neste pedido, a aplicação e os termos da reivindicação em particular são entendidos ser construídos de acordo com a definição ou descrição neste pedido, e não de acordo com a definição comum, definição de dicionário, ou a definição que

foi incorporada por referência. Na luz do acima, no evento que um termo pode somente ser entendido se ele é construído por um dicionário, se o termo é definido pela Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 5a Edição, (2005), (Publicado por Wiley, John & Sons, Inc.) esta definição deve controlar como o termo é para ser definido nas reivindicações.

[039] Pelo menos uma modalidade da invenção é direcionada a um método de identificar uma infestação microbiológica por comparar o índice de diversidade corrente de pelo menos uma porção do sistema a um índice basal. Virtualmente nenhum sistema de processamento comercial é 100% livre de organismos microbiológicos. Instações do sistema de processamento sempre compreendem volumes grandes com muitas entradas através dos quais organismos podem entrar e conter numerosos nichos diferentes para os mesmos para colonizar os mesmos, de forma a ter algum tipo de população biológica. A partir de uma perspectiva comercial, entretanto, é muito preferível para um sistema ser populado com organismos benignos que ser populados com organismos nocivos tais como aqueles que impedem o processo, danos ao produto, ou perigos expostos às pessoas. Como um resultado usando um índice de diversidade é uma abordagem diagnóstica útil que correlaciona mudanças na população com mudanças a partir de efeitos benéficos a efeitos nocivos. Um método que corretamente identifica quais organismos estão presentes e onde eles estão, pode ajudar na seleção do remédio apropriado, na distribuição na localização ótima.

[040] Um índice de diversidade é um instantâneo da diversidade biológica dos organismos presentes em um sistema de processamento comercial. Índice de diversidade pode ser sistema amplo ou pode ser limitado a certas porções de um sistema de processamento. Por exemplo, por causa do ponto de convergência de muitas entradas ricas em fluido, a caixa de entrada de um processo de fabricação de papel é sempre altamente populada com micro-organismos e pode ser esperado ter

um índice de diversidade que varia amplamente ao longo do tempo. Em contraste a água fresca tratada que é usada no processo de fabricação de papel é quase livre de organismo, então uma mudança na diversidade e abundância de uns poucos organismos a uma rede de uma bactéria pode indicar um problema. Como um resultado, algumas vezes notando o índice de diversidade de uma seção particular proporcionando percepções que um sistema de índice de diversidade amplo não pode ser provido. Notando os tipos de mudanças na diversidade e onde eles são localizados influencia onde os pontos de alimentação para biocida devem ser localizados e como a população deve ser dirigida.

[041]Em pelo menos uma modalidade o índice de diversidade é usado para preventivamente evita um efeito microbiológico nocivo antes que ele ocorra. Porque existem tantos tipos diferentes de organismos que correspondem a problemas específicos em específico nos sistemas de processamento comercial, é algumas vezes eficiente focar na presença ou ausência ou proporção relativa de organismos alvos específicos. Por exemplo, alguns organismos são pioneiros e alguns são formadores de biofilme adaptativos. Um pioneiro cria um biofilme ou depósito de crosta onde não existia previamente nenhum, enquanto um formador de biofilme exibe resistência a um programa de tratamento. Se uma revisão do índice de diversidade mostra primeiro o filme ou crosta predominantemente compreendido de um organismo então depois sua composição mudou para um organismo diferente, pode indicar a transição de um pioneiro a um adaptador oportunístico, e o regime biocida pode ser modificado para um apropriadamente endereçar esta situação. Similarmente se um formador de filme primário tende a ganhar acesso ao sistema a partir de um mecanismo e o um adaptativo a partir de outro mecanismo propriamente identificando que tipo de organismo está presente ajuda a identificar as fontes de vetores da contaminação microbiana.

[042]Em pelo menos uma modalidade a análise da diversidade pode ser

usada para focar revisão de controle de qualidade dos produtos finais. Por exemplo, alguns organismos tais como fungos não causam impedimento significativo do processo por si mesmo, mas eles formam massas que tendem a se tornar embebidas nos produtos finais ou componentes de máquinas e assim causar defeitos indesejados, desidratação do feltro reduzida e eficiência mecânica reduzida. Um aumento na concentração dos fungos no índice de diversidade pode sugerir que escrutínio especialmente próximo do produto final para defeitos é apropriado.

[043]Em pelo menos uma modalidade a natureza da mudança no índice não é tão significativa como a taxa da mudança na diversidade. Por exemplo, se um dado índice de diversidade ao longo do tempo tende a mostrar uma diversidade de população relativamente estática, mas de repente é mudada, isto indica que alguma coisa significativa mudou no sistema. Isto pode significar que uma entrada de material pode ter um defeito que estimula mudança de população, ou uma peça do equipamento pode ter sido danificada ou estar em mal funcionamento, o que abre novos nichos para diferentes organismos. Como um resultado, análise do índice de diversidade pode ser usado para detectar problemas não biológicos nos sistemas de processo.

[044]Em pelo menos uma modalidade a mudança no índice de diversidade pode ser usado para detectar um problema iminente antes dele efetivamente se manifestar. Como mencionado previamente uma mudança no índice de diversidade pode indicar um material defeituoso ou danificado ou equipamento em mal funcionamento. Algumas vezes a mudança na diversidade pode ser detectada antes que outros efeitos indesejados ocorram (tais como perda de eficiência operacional ou produtos finais defeituosos) e identificação da causa da mudança na diversidade pode discutir um problema potencial antes de seus efeitos manifestarem em uma forma significativa ou dispendiosa. Similarmente, uma mudança na diversidade pode indicar que depósitos de crosta ou um biofilme ou outro problema induzido por orga-

nismo ocorrerá, mas o índice permitirá para o micro-organismo problemático ser removido antes que ele cause problemas associados. Algumas vezes a mudança rápida indica que uma espécie benigna que previamente bloqueou os esforços de colonização de um organismo nocivo não é mais potente e o organismo nocivo é agora livre para colonizar aquele nicho.

[045]Em pelo menos uma modalidade, a análise do índice de diversidade ocorre em uma situação onde a contagem de célula total dentro da região analisada permanece não carregada mas a composição dos micro-organismos muda. Em pelo menos uma modalidade, a mudança na diversidade corresponde a uma situação em que a contagem de célula total aumenta ou diminui.

[046]Em pelo menos uma modalidade, uma ou mais porções de um sistema de processamento são regularmente amostradas para seus índices de diversidade. As amostras podem ser indexadas por tempo e podem ser correlacionadas com outros eventos na instalação tais como ativação, desativação, estado de operação, taxa de produção, e ou temperatura, de certo equipamento, e/ou o uso de diferentes materiais, aditivos, ou químicos. Isto permite para o uso de diversidade biológica com outros meios de controle de qualidade na instalação. Uma mudança significativa na diversidade que corresponde a algum outro evento indica que o outro evento pode ter algum impacto positivo ou negativo inesperado no processo.

[047]Em pelo menos uma modalidade alguns efeitos induzidos por micro-organismos são conhecidos ocorrer após uma quantidade específica de tempo que tenha passado a partir do momento de contaminação. Como um resultado uma mudança no índice de diversidade pode ser usada para determinar quão longo leva para o organismo causar seus problemas associados. Estes métodos podem ser usados em ambos, como um diagnóstico (para encontrar como o organismo funciona) bem como uma ferramenta de otimização do custo. Otimização do custo pode ser alcançada por recebendo aviso avançado a partir da mudança de diversidade

que um problema ocorrerá dentro de um dado período usando o aviso avançado para compra ou uso de um remédio em um tempo quando ele tem um custo inferior ou disponibilidade superior que ele teria se ele fosse comprado como uma resposta repentina a uma emergência inesperada.

[048]Em pelo menos uma modalidade o índice de diversidade pode ser usado para detectar organismos formadores de esporos. Quando esses organismos estão na forma de esporos eles têm pouca ou nenhuma atividade metabólica e são altamente resistentes a biocidas. Leva uma grande quantidade de biocida para controlar organismos, uma vez que eles estão no estado de esporo e a probabilidade dos esporos levando o para o produto terminado se torna muito alta. Padrões de embalagem de Dairyman e líquidos são normalmente não para serem seguidos em uma situação onde esporos estão presentes. Em contraste, quando esses organismos estão em um estado vegetativo eles são susceptíveis a biocidas e são muito mais fáceis de controlar. Detecção de organismos formadores de esporos pelo método de índice de diversidade muda a foto do programa de biocontrole para prevenção da formação de esporos.

[049]Em pelo menos uma modalidade os resultados da análise do índice de diversidade são usados para aumentar o programa de biocontrole por determinar quanto, que tipo, e qual frequência, uma ou mais composições biocidas são adicionadas a uma ou mais localizações dentro de um sistema de processo comercial. Em pelo menos uma modalidade qualquer e todas das modalidades acima e abaixo são aplicadas a um sistema comercial tal como um sistema industrial incluindo mas não limitado a um sistema de processamento de água, um processo de fabricar papel, processo de despolpar, processo de processamento de alimento, processo de refinamento químico, processo de processamento de madeira, processo de filtração de água, processo de purificação de água, processo de síntese química, processos de revestimento, processos usando química orgânica, e quaisquer combinações dos

mesmos. Em pelo menos uma modalidade o índice de diversidade é usado para avaliar micro-organismos problemáticos encontrados em depósitos de máquinas, defeitos de papel, produtos finais, feltros etc. O método é baseado na análise de ácidos nucléicos em extratos de amostras.

[050]Em pelo menos uma modalidade a identificação dos constituintes do índice de diversidade é alcançada através de análise baseada em DNA envolvendo o uso de iniciadores PCR para detectar a presença, ausência e quantidade de micro-organismos. Patente Norte-Americana 5.928.875 descreve o uso de iniciadores PCR para detectar a presença ou ausência de bactéria formadora de esporos. Em pelo menos uma modalidade o iniciador é alvo para uma parte de uma fita de DNA que é altamente conservada entre um grupo de organismos. Como um resultado, detectar a presença desta parte particular de DNA é prova definitiva da presença de um organismo específico. Análise de PCR é de uso particular em análise de feltros e folhas de papel devido a dificuldade de correntemente identificar seus micro-organismos contaminantes por causa de sua ausência de organismos viáveis para métodos de plaqueamento tradicionais ou medidas de ATP.

[051]Em pelo menos uma modalidade a análise PCR envolve utilizando um ou mais dos métodos descritos em Article Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA com uma DNA Polimerase Termoestável, por Randall Saiki et al, Science, Volume 239, pp. 487-491 (1988). Em pelo menos uma modalidade a análise PCR envolve utilizando um ou mais dos métodos descritos em Article Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction, por Kary Mullis et al, Methods In Enzymology, Volume 155, pp. 335-350 (1987).

[052]Em pelo menos uma modalidade a análise PCR é uma análise qPCR como descrito no guia Trade Brochure qPCR, com prefácio feito por Jo Vandesompele (como baixado a partir do website <http://www.eurogentec.com/file-browser.html> em 19 de janeiro de 2012). Em pelo menos uma modalidade o método é uma análise

se qPCR quantitativa. Em pelo menos uma modalidade o método é uma análise qPCR qualitativa.

[053]Em pelo menos uma modalidade, a reação em cadeia de polimerase (PCR) é um método para sequências alvo de ácido nucléico (DNA ou RNA) e aumentando o número de cópias da sequência alvo para obter quantidades úteis de ácido nucléico para análise a jusante. Este método pode ser aplicado para a detecção de micro-organismos em uma variedade de amostras que incluem, mas não são limitadas a máquinas feltros, defeitos de folha, depósitos de máquinas etc.

[054]Em pelo menos uma modalidade, uma vez o DNA é extraído a partir da amostra, usando quaisquer dos kits de extração de DNA disponíveis comercialmente, ele pode ser analisado em tempo real usando uma abordagem PCR tal como uma abordagem PCR quantitativo. PCR quantitativo utiliza a mesma metodologia como PCR, mas ele inclui um componente quantitativo em tempo real. Nesta técnica, iniciadores são usados ter como alvo uma sequência de DNA de interesse baseada na identidade do organismo ou função de um gene específico. Alguma forma de detecção tal como fluorescência pode ser usada para detectar o DNA resultante ou "DNA amplicon". A mundaça na fluorescência é diretamente proporcional para a quantidade de DNA alvo. O número de ciclos requerido para alcançar a limite de fluorescência pré-determinada é comparada a um padrão que corresponde ao DNA alvo específico. Um padrão é tipicamente o gene alvo que é puro e de quantidade conhecida em concentrações que duram vários logs. O número de cópias de DNA alvo presente é calculado usando a curva padrão. O número de cópias por amostra é então usado para determinar o número de células por amostra.

[055]Em pelo menos uma modalidade um grupo iniciador é usado cujas sequências de DNA alvos a partir de bactéria usando uma abordagem conservadora para quantificar bacterica total. Em pelo menos uma modalidade um grupo iniciador é usado, cujos alvos são bactericas formadoras de biofilme primário, incluindo, mas

não limitados a *Meiothermus*, *Pseudoxanthomonas* e *Deinococcus*. Em pelo menos uma modalidade um grupo iniciador é usado para ter como alvo um formador de biofilme adaptativo que pertence a família *Sphingomonadacea* de bactéria. Em pelo menos uma modalidade o formador de biofilme adaptativo exibiu tolerância mais alta a programas de biocontrole baseados em oxidante comparados a outro biofilme e micro-organismo planctônicos. Em pelo menos uma modalidade o iniciador é usado para distinguir entre infestações fúngicas e bacterianas.

[056]Em pelo menos uma modalidade o método envolve distinção entre DNA no nível de domínio biológico. Em pelo menos uma modalidade o método envolve distinção entre DNA de Bacteria, Archaea e Eucaryota. Esses organismos têm grande diferença de DNA e um protocolo que foca na identificação do DNA do organismo no nível de domínio é vastamente o mais simples que determinações mais específicas. Porque com filtros, os organismos a partir de diferentes domínios são sempre melhores tratados diferentemente, já que uma forma simples de identificação pode ser usada para acuradamente identificar o melhor regime específico alvo ao contaminante particular. Em pelo menos uma modalidade o teste usado é tal que ele pode não distinguir entre organismos do mesmo domínio ou entre diferentes tipos de Bacteria, ou entre diferentes tipos de Archaea, ou entre diferentes tipos de Eucaryota.

[057]Em pelo menos uma modalidade mais que um iniciador é usado para identificar organismos que têm mais que uma sequência nucleotídica unicamente reconhecível. Em pelo menos uma modalidade a análise PCR é usada para detectar sequências genômicas associadas com enzimas únicas para ou quase únicas aos organismos específicos.

[058]Em pelo menos uma modalidade o método envolve detecção de um defeito e então utilização da análise PCR para propriamente analisar o índice de diversidade do defeito. Em pelo menos uma modalidade o método determina se o defeito é totalmente baseado biologicamente, totalmente baseado química-não biológica-

mente, ou resultando a partir de uma combinação de fontes baseadas química não biologicamente, mecânica e biologicamente. Em pelo menos uma modalidade o defeito é um ou mais tampões em um feltro. Em pelo menos uma modalidade o defeito é uma folha de papel tendo pelo menos uma ou mais de: um buraco, um buraco com um halo descolorido ao redor de pelo menos uma porção do mesmo, uma listra de descoloração, uma mancha, uma mancha translúcida, e quaisquer combinações dos mesmos.

[059]Em pelo menos uma modalidade um nível limite é metodologia usada para descontar falsos positivos. Algumas vezes análise PCR detecta traços de organismos que enquanto presentes não são causas de um defeito particular. Em pelo menos uma modalidade o método envolve descontar a presença de qualquer organismo detectado em uma concentração inferior que um nível pré-determinado conhecido para um ou mais organismos particulares. Em pelo menos uma modalidade o método envolve descontar a presença de qualquer organismo detectado no nível inferior que 10^4 células por grama (do defeito). Em pelo menos uma modalidade o método envolve descontar a presença de qualquer organismo detectado o nível inferior que 10^4 células por mL.

[060]Em pelo menos uma modalidade o método é capaz de detectar micro-organismos que podem ser de outra forma detectados por métodos anteriores da técnica. Por exemplo, em casos onde encrostamento é causado por uma infestação de organismos anaeróbicos ou redutores de sulfato, métodos tal como detecção de ATP podem não corretamente identificar a fonte de encrostamento como biológica como a quantidade de ATP produzida por um micro-organismo sob condições anaeróbicas é significativamente menor que sob condições aeróbicas. Então a fonte fount será identificada incorretamente e n abordagens químicas e não anti-biológicas podem ser usadas para tentar resolver o problema. Em outro exemplo, diferenciação de micro-organismos a partir da contaminação química em feltros usando aborda-

gens tradicionais tais como plaqueamento, detecção de ATP etc, é virtualmente impossível devido ao fato que essas amostras secam ou durante transporte e todos os organismos viáveis morrem. Utilizando a abordagem de DNA pode sempre indicar corretamente uma infestação biológica porque toda vida contém DNA.

[061]O índice de diversidade pode usar PCR tal como, mas não limitado ao qPCR, para a detecção de organismos totais tal como bactéria; espécies *Sphingomonas*, espécies *Erythrobacter*, espécies *Pseudomonas*; espécies *Burkholderia*; espécies *Haliscomenobacter*; espécies *Saprospira*; espécies *Schlegelela*; espécies *Leptothrix*; espécies *Sphaerotilus natans*; *Bacillus*; espécies *Anoxybacillus*; membros do filo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*; bactéria verde não redutora de sulfato, incluindo *Herpetosiphon*, membros do filo *Deinococcus-Thermus*, incluindo espécies *Meiothermus*; bactéria produtora de catalase, bactéria produtora de amilase, bactéria produtora de urease, bactéria nitrificante, fungos etc. Essas técnicas utilizam iniciadores e pares padrões que permitem para a detecção e quantificação de organismos alvos baseados em sequências conservadas. Os iniciadores das regiões alvo no genoma microbiano que são altamente conservados através da evolução, enquanto iniciadores para filo específico ou gênero alvo mais regiões variáveis do genoma.

[062]Sendo capazes de acuradamente quantificar um organismo de interesse presente em uma amostra faz possível expressar este organismo como uma porcentagem da carga bacteriana total na amostra. O índice de diversidade pode também ser expresso quantitativamente como a abundância relativa dos vários organismos alvos. O índice de diversidade para qualquer parte de um processo pode ser medido em tempos quando máquinas ou processos estão correndo bem, então criando uma linha basal. O índice de diversidade medida em tempos de máquina pobre ou desempenho de processamento pode então ser comparada para a linha basal para olhar para flutuações em populações microbianas e determinar que grupos bac-

terianos são responsáveis por problemas no processo. O índice de diversidade pode também ser quantificado para facilitar a comparação usando o cálculo do índice de diversidade de Shannon para comparar dados de monitoramento entre localizações de amostras ou relativo a uma linha basal. Estratégias de tratamento e pontos de alimentação podem então ser alteradas de acordo com o combate do problema.

[063]Um índice de diversidade baseado em quantificação de DNA mede a presença e diversidade de organismos em um processo, independente de sua viabilidade. Ácido ribonucléico (RNA), especificamente RNA mensageiro (mRNA), é uma molécula que é produzida somente por organismos vivos, e tem propriedades tais que, dependendo do alvo, são únicas a um filo específico ou gênero de bactéria. Amplificando sequências de mRNA que são únicas aos organismos listados acima se torna possível determinar quais bactérias estão presentes em suas formas viáveis. Detecção acurada de organismos viáveis podem então ser usados como uma ferramenta para avaliar a eficácia de estratégias de tratamento do processamento de água. Isto pode ser realizado por comparação do índice de diversidade ao índice de viabilidade.

[064]Este método pode quantificar a quantidade e tipo de bactéria viável presente em processamento de amostras. O método de reação de cadeia da polimerase (tempo real) quantitativo pode ser aplicado para detectar ácidos nucleicos ribossomais mensageiros (mRNA). mRNA é transcrito em DNA que é enviado para o ribossoma para servir como um diagrama para síntese protéica em um processo conhecido como tradução. mRNA é produzido somente por células vivas. RNA a partir de células vivas pode ser isolado com o uso de kits comercialmente disponíveis. Detecção de mRNA requer um passo extra na reação de cadeia de polimerase quantitativa. Transcriptase reversa é adicionada ao coquetel de reação para transcrever mRNA em seu DNA complementar (cDNA). Dois grupos de iniciadores são requeridos para este experimento. O primeiro tem como alvo o mRNA específico, enquanto

o segundo é usado para amplificar o cDNA resultante produzido pela reação de transcriptase reversa.

EXEMPLOS

[065]O acima mencionado pode ser melhor entendido por referência aos seguintes exemplos, que são apresentados para propósitos de ilustração e não são tencionados limitar o objetivo da invenção.

EXEMPLO #1

[066]Uma deposição persistente experimentada em laminador de chapa livre revestido em uma das máquinas da caixa de entrada, que foi acreditada ser a causa de defeitos no produto final. A caixa de entrada por si só sofreu a partir de um acúmulo de depósitos químicos e crescimentos fibrosos. Análise microscoscópica e química mostrou pouca ou nenhuma presença bacteriana dentro do acúmulo. Microorganismos foram assumidos ser a causa subjacente do problema. Entretanto, técnicas de monitoramento tradicionais (por exemplo, contagem de placa padrão e níveis de ATP) usadas para analisar processamento de amostras não indicaram níveis elevados de atividade microbiana. Especificamente os resultados indicaram não mais que 100 CFU/mL e não mais que 100 RLU (ATP).

[067]Amostras depositadas a partir da caixa de entrada foram analisadas ao longo do curso de vários meses usando técnicas qPCR para desenvolver um índice de diversidade. Resultados qPCR iniciais a partir da análise de depósitos da caixa de entrada exibiram altos níveis de carga microbiana, bem como densidades elevadas de formadores de biofilme pioneiros e adaptadores (Figura 1). A estratégia de tratamento foi aumentada com a adição de biocidas a ambos o despulpador e o silo partido. A taxa de alimentação do programa de biocontrole baseado em oxidante foi também aumentada. Análise de depósitos coletados um mês depois detectou pouca mudança na carga bacteriana total dos depósitos da caixa de entrada (Figura 1A). O número de formadores de biofilme pioneiro diminuiu um log, enquanto a densidade

de formadores de biofilme adaptativo diminuiu quatro logs (Figura 1B e 1C). A quantidade de depósitos da caixa de entrada e frequência de defeitos da chapa continuou a permanecer não alterada. Plaqueamento tradicional e análise de ATP do estoque e sistema de processamento de água indicaram pouca atividade biológica. Os valores de contagem de ATP e placa foram na média menos que 100 RLU e 100 unidades formadoras de colônia por grama (CFU/g), respectivamente.

[068]A estratégia de tratamento foi ainda otimizada através da adição de clo-ro não estabilizado e biocidas ao silo partido e o despoldador. Após implementação do último grupo de mudanças, amostras adicionais foram coletadas e analisadas. A carga bacteriana total do depósito mostrou uma diminuição de quase um log (Figura 1A). O grupo final de amostras de depósito mostrou uma diminuição de quase dois logs na densidade de formadores de biofilme primário (Figura 1B). Formadores de biofilme adaptativos permaneceram em níveis próximos do basal (Figura 1C). No-vamente, a despeito do controle melhorado da população microbiana, a frequência do defeito, a natureza dos defeitos, e deposição da caixa de entrada permaneceu não alterada.

[069]Falhas da chapa a partir deste laminador foram analisadas usando a mesma abordagem baseada em qPCR. É impossível determinar conteúdo bacteriano nas falhas usando plaqueamento tradicional e métodos ATP porque muitas das bactérias que podem ter sido presentes na falha são mortas pelas altas temperaturas da seção de secagem. Análise química não provê uma resposta definitiva a cerca da presença bacteriana na chapa como ela se baseia na coloração ninidrina. Esta abordagem é não específica e propensa aos resultados falso positivo e falso negativo. Análise DNA de buracos e chapas defeituosas a partir deste laminador detectou densidade bacteriana muito baixa (Figura 2, Amostras 1-5). Formadores de biofilme primário e adaptativo não foram detectados nos defeitos da chapa analisados a partir deste laminador. Então, lodo bacteriano não foi propavelmente contribuinte para

as falhas e problemas de qualidade neste laminador. Em comparação, um laminador sofrendo de deposição biológica significativa teve falhas contendo carga microbiana muito mais alta (Figura 2, Amostra 6). Além disso, espécies bacterianas similares foram identificadas nos depósitos e falhas. Coloração ninidrina desses defeitos resultou em uma reação positiva indicando a presença de micro-organismos. Em outro caso, bactérias foram detectadas em falhas na chapa em níveis exatamente acima da densidade mínima requerida para ser considerada um defeito biológico. Entretanto, a reação ninidrina foi negativa indicando que a falha não contém micro-organismos (Figura 2, Amostra 7). Exame qPCR quantitativo dos depósitos da caixa de entrada demonstrou reduções em ambos, formadores primários e adaptativos seguindo cada modificação para a estratégia de tratamento. O fato que houve uma diminuição drástica nesses organismos alvos e nenhuma diminuição na quantidade de frequência de deposição ou falha, indica que bactérias provavelmente são não responsáveis por problemas de falha neste sistema de máquina. Formadores de biofilme primário colonizam superfícies de máquinas colonizadas e criam um ambiente favorável para ligação e proliferação de outros tipos de organismos. Sem a presença desses organismos, bactérias podem ligar às superfícies das máquinas seguindo o depósito de debris químicos que podem servir como um bom meio de crescimento. É provável que aditivos químicos e fibras foram depositados dentro da caixa de entrada, resultando em um microambiente adequado para colonização microbiana. Desde que a análise das falhas das chapas revelou presença microbiana negligente, micro-organismos foram excluídos como a fonte primária de deposição na caixa de entrada e efeitos adversos na qualidade do produto. Esforços para melhorar o desempenho da máquina foram focados distante a partir do biocontrole e para melhor controle mecânico do sistema permitindo para condições operacionais e qualidade do produto melhoradas.

EXEMPLO #2

[070]Um laminador de chapa livre revestido utilizou um programa de biocontrole baseado em oxidante por vários anos. Controle de crescimento microbiano foi percebido como adequado; entretanto, houve uma oportunidade para ainda reduzir as falhas na chapa para eficiência de processamento melhorada. O programa foi implementado e otimizado em várias fases. Densidade bacteriana através do processo permaneceu baixa e uma redução na nsa falhas da chapa foi documentada. O número médio de quebras por dia diminuiu a partir de uma média de 1,2 quebras por dia para 0,42 quebras por dia.

[071]Aproximadamente dois anos depois a implementação do programa otimizada, foi observado que condições de processamento se tornaram mais variáveis e concentrações aumentadas de produtos de biocontrole foram requeridas para manter o mesmo nível de controle. Um sistema de vistoria usando ferramentas de monitoramento tradicional tal como contagem de placa e medidas de ATP, indicou que densidade bacteriana no sistema de processamento de água permaneceu baixo e nenhum ou pouco aumento foi observado na caixa de entrada e sistema de quebra. Entretanto, o laminador sofreu uma explosão severa de buracos e falhas. Enquanto técnicas de monitoramento tradicionais indicaram nenhuma mudança no desempenho do programa de biocontrole, o monitor de atividade online detectou aumento da atividade microbiana (Figura 3).

[072]Uma análise de índice de diversidade utilizando análise de qPCR dos depósitos de máquina e falhas da chapa confirmou a presença de formadores de biofilme pioneiro e adaptativo. A densidade total da bactéria total nos defeitos foi aproximadamente $1,8 \times 10^7$ células por grama (Figura 3). Esta evidência indica o papel de micro-organismo na falha e problemas de qualidade. A máquina passou por fervura cáustica após a qual, o monitor de atividade online demonstrou uma redução na atividade microbiana e um valor ORP mais estável, indicando desempenho de programa e resiliência melhorados. A quantidade de micro-organismos nos nas fa-

lhas das chapas diminuiu de 10^7 a 10^5 células/g seguindo a fervura (Figura 3). Isto confirma que qPCR pode detectar contribuição microbiana para falhas na chapa que não podem ser detectadas usando técnicas tradicionais. Em adição, qPCR pode ser usado para avaliar a eficácia do programa de biocontrole no produto final.

EXEMPLO #3

[073] Amostras de feltro a partir de fábrica de papel que foram experimentadas para problemas de desempenho, que manifestaram os mesmos como depósitos na máquina e falhas na chapa, foram analisadas usando qPCR. Cada amostra foi testada para a presença de micro-organismos. Uma vez que foi determinado que cada amostra continha altas quantidades de bactéria, as amostras foram então analisadas para a presença de formadores de biofilme adaptativo e primário, que incluem *Sphingomonadaceae fm.*, *Meiothermus*, *Geothermus*, e *Pseudoxanthomonas* que têm sido conhecidos por contribuir para problemas com eficiência de máquina e qualidade de produto. Ambos laminadores continham níveis normais de formadores de biofilme adaptativos, entretanto, laminador 1 teve duas vezes tantos formadores de biofilme primário quanto laminador 2 (Figura 4). O nível dos formadores de biofilme adaptativo foi determinado ser normal como seus níveis foram na variação que indicaram e é provável não contribuir para o problema. Índice de diversidade mostrou que o nível de formadores de biofilme pioneiro no laminador 1 foi em um nível perto do basal. Altos níveis de formadores de biofilme pioneiro no laminador 2 sugeriu formação de biofilme em feltros que leva ao tampão de feltro e reduziu a remoção de água a partir da chapa. A presença de biofilme nos feltros pode levar a deposição aumentada de outra matéria que pode então depositar novamente na chapa. Níveis elevados de formadores de biofilme pioneiro no laminador 1 sugerem que análise adicional de outras partes do processo tal como água para banho, aditivos, espaços de armazenamento etc, foi necessária para determinar onde esses organismos foram originados.

[074]O resultado desses exemplos demonstra que técnicas de plaqueamento convencional e resíduos oxidantes podem indicar dose de biocida adequada e controle de crescimento microbiano, enquanto deposição, defeitos e quebras permanecem prevalentes. Utilizando um índice de diversidade compreendendo métodos PCR e qPCR provêm informação mais acurada em relação ao crescimento microbiano e formação de biofilme em sistemas de água industrial. Essas estratégias permitem para rápida análise da contribuição de micro-organismos para formação de depósito e podem ser usadas para rapidamente determinar se depósitos contendo ou não micro-organismos estão contribuindo para as falhas.

[075]Um índice de diversidade baseado em qPCR permite a análise rápida de falhas de chapa para determinar a contribuição de micro-organismos para problemas de qualidade. Esta nova abordagem tem sido demonstrada permitir para um diagnóstico mais pró-ativo de problemas levando a eficiência de máquina melhorada e qualidade de produto.

[076]Enquanto esta invenção pode ser modalizada em muitas formas diferentes, é descrita aqui em detalhes específicos as modalidades preferidas da invenção. A presente revelação é uma exemplificação dos princípios da invenção e não é tencionada limitar a invenção às modalidades particulares ilustradas. Todas as patentes, pedidos de patentes, artigos científicos, e quaisquer outros materiais referenciados mencionados aqui são incorporados por referência em sua totalidade. Além disso, a invenção compreende qualquer combinação possível de algumas ou todas de várias modalidades descritas aqui e/ou aqui incorporadas. Em adição a invenção compreende qualquer combinação possível que também especificamente exclui qualquer uma ou algumas de várias modalidades aqui descritas e/ou aqui incorporadas.

[077]A revelação acima é tencionada ser ilustrativa e não exaustiva. Esta descrição irá sugerir muitas variações e alternativas a um versado na técnica. Todas

essas alternativas e variações são tencionadas ser inclusas dentro do objetivo das reivindicações onde o termo "compreendendo" significa "incluindo, mas não limitado a". Aqueles familiares com a técnica podem reconhecer outros equivalentes às modalidades específicas aqui descritas cujos equivalentes são também tencionados ser compreendidos pelas reivindicações.

[078]Todas as variações e parâmetros aqui revelados são entendidos compreender quaisquer e todas subvariações subordinadas aqui, e cada número entre os pontos finais. Por exemplo, uma variação atestada de "1 a 10" deve ser considerada incluir qualquer e todas sub-variações entre (e inclusive de) o valor mínimo de 1 e o valor máximo de 10; isto é, todas as sub-variações começando com um valor mínimo de 1 ou mais, (por exemplo, 1 a 6,1), e terminando com um valor máximo de 10 ou menos (por exemplo, 2,3 a 9,4, 3 a 8, 4 a 7), e finalmente a cada número 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 contido dentro da variação.

[079]Isto completa a descrição das modalidades preferidas e alternadas da invenção. Aqueles versados na técnica podem reconhecer outros equivalentes para a modalidade específica aqui, cujos equivalentes são tencionados ser compreendidos pelas reivindicações ligadas às mesmas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de endereçamento de uma infestação de micro-organismo em um sistema de processamento industrial, o método **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

tomar pelo menos uma primeira medida que identifica a concentração relativa de dois ou mais organismos presentes em pelo menos uma porção do sistema de processamento industrial,

tomar pelo menos uma segunda medida que identifica a concentração relativa de dois ou mais organismos presentes na pelo menos uma porção do sistema de processamento industrial, as identificações pelo menos parcialmente definindo um índice de diversidade subsequente, a pelo menos uma segunda medida tomada depois da(s) primeira(s) medida(s),

notar qualquer mudança relativa na concentração dos dois organismos,

se a concentração relativa de um dos organismos medidos excede uma quantidade limite pré-determinada, determinar se a mudança está associada com um efeito não desejado no sistema de processamento industrial, e

implementar um remédio para remediar o efeito não desejado,

em que indiferente da identidade do pelo menos um organismo, se suas concentrações relativas aumentam em relação à medida anterior por uma quantidade maior que o limite, mesmo se a população biológica geral permanecer a mesma, um tratamento biocida é adicionado ao sistema.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a primeira e segunda medidas são feitas por pelo menos um item selecionado a partir da lista consistindo em análise de DNA, análise de PCR, análise de qPCR, e qualquer combinação das mesmas.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a quantidade limite é 10^4 células por mL de fluido tomado a partir do sistema ou

10⁴ células por grama de um produto final do processo industrial ou de uma amostra sólida oriunda do processo industrial.

4. Método, de acordo com reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que ainda compreende a etapa de identificar se um dos organismos é um pioneiro e se um é um adaptador, se um é um pioneiro e se sua concentração aumenta por mais que o limite no índice subsequente, a remediação inclui aplicação de um regime biocida com alvo no pioneiro, se nenhum formador pioneiro é detectado a remediação inclui identificação e eliminação de um vetor não biológico que facilita a colonização dos micro-organismos.

5. Método, de acordo com reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que ainda compreende a etapa de identificar se um dos organismos é um pioneiro e se um é um oportunista, se um é um pioneiro e se sua concentração aumenta mais que o limite no índice subsequente, a remediação inclui aplicação de um regime biocida com alvo no pioneiro, se nenhum pioneiro é detectado a remediação inclui identificação e eliminação de um vetor não biológico que facilita a colonização dos micro-organismos.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que ainda compreende a etapa de correlacionar a mudança no índice de diversidade para outro evento que ocorreu no sistema industrial, o outro evento selecionado a partir da lista consistindo em: mudança da fonte de pelo menos um material de alimentação, mudança do tipo de pelo menos um material de alimentação, mudança da taxa de operação de pelo menos uma porção do sistema, e qualquer combinação destas, e revertendo o evento.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração geral de células na amostra permanece não alterada entre a primeira e a segunda medidas.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de

que as medidas são tomadas em uma porção de sistema que um depósito tem formado em e o depósito não contém qualquer componente biológico significativo.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que as medidas são tomadas em uma pluralidade de localizações através do sistema e os índices comparam sistemas de populações gerais.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos uma terceira medida do índice de diversidade é feita subsequente a segunda medida e subsequente a remediação e a eficácia da remediação é avaliada pela mudança nas concentrações relativas de pelo menos dois organismos como medida na terceira medida do índice de diversidade.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração geral de células na amostra permanece não alterada entre as primeira e segunda medidas, a identidade do primeiro e segundo organismos não é conhecida para causar quaisquer efeitos não desejados no equipamento de processamento ou produto final, e um biocida efetivo é adicionado ao sistema para matar o primeiro e segundo organismos quando uma mudança limite é detectada.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que os organismos são capazes de formar esporos que são resistentes aos biocidas e quando a quantidade relativa deste organismo cresce em excesso do limite, tratamento é alvejado na área do processamento com células vegetativas para prevenir esporulação.

13. Método de endereçamento de uma infestação de micro-organismo em um sistema de processamento industrial, o método **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

tomar pelo menos uma primeira medida que identifica a concentração relativa de pelo menos um organismo presente em pelo menos uma porção do sistema de processamento industrial,

determinar se a concentração do pelo menos um organismo excede um limite pré-determinado para este organismo,

se exceder, determinar se o organismo excedendo o limite é um adaptador ou é um pioneiro,

se for um adaptador, implementar uma estratégia de remediação que leva em consideração a resistência do organismo aos biocidas,

se for um pioneiro, implementar uma estratégia de remediação que utiliza uma dosagem inferior de biocida do que se o organismo fosse um adaptador.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que uma medida é também tomada determinando a população absoluta de todos os micro-organismos infestando o sistema de processamento industrial, e

determinando se a concentração do pelo menos um organismo excede um limite pré-determinado para aquele organismo relativo a população geral de micro-organismo,

se excedente, determinar se o organismo excedendo o limite é um adaptador ou é um pioneiro,

se for um adaptador, implementar uma estratégia de remediação que leva em consideração a resistência do organismo a biocidas,

se for um pioneiro, implementar uma estratégia de remediação que utiliza uma dose inferior de biocida do que se o organismo fosse um adaptador.

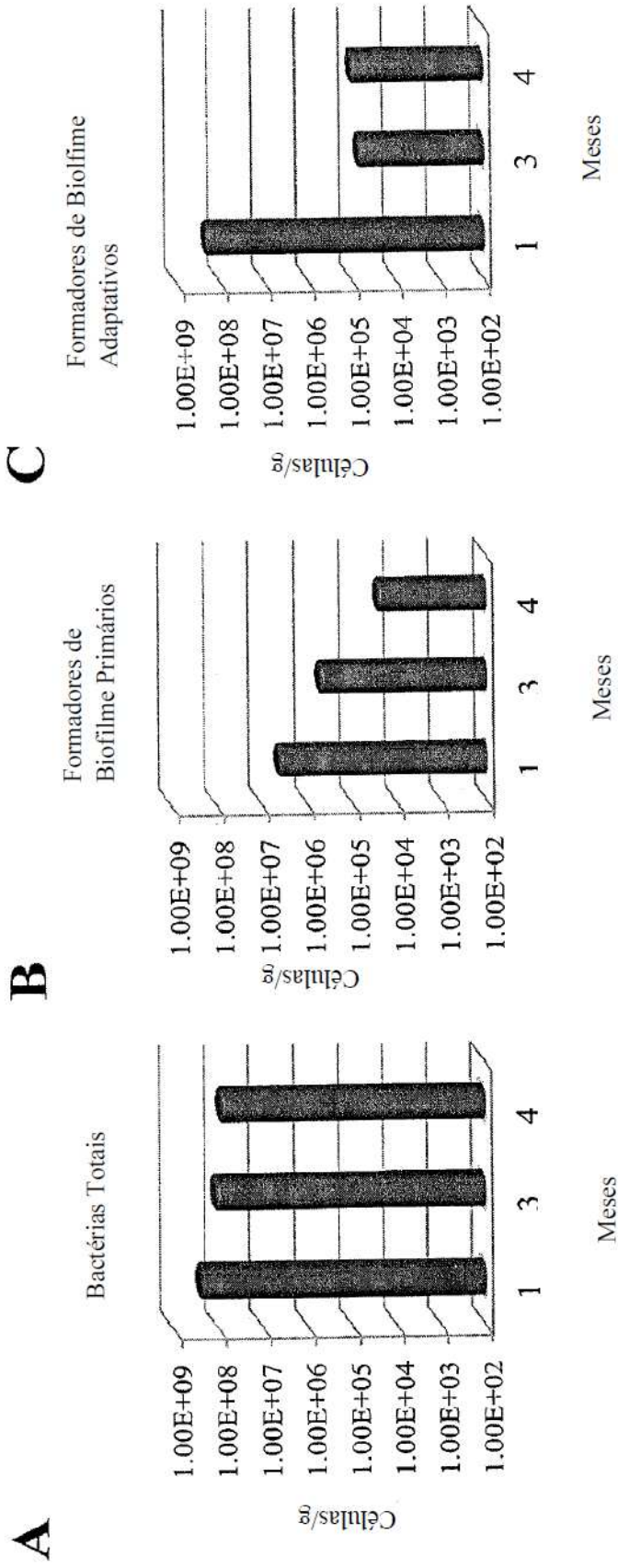


FIGURA 1

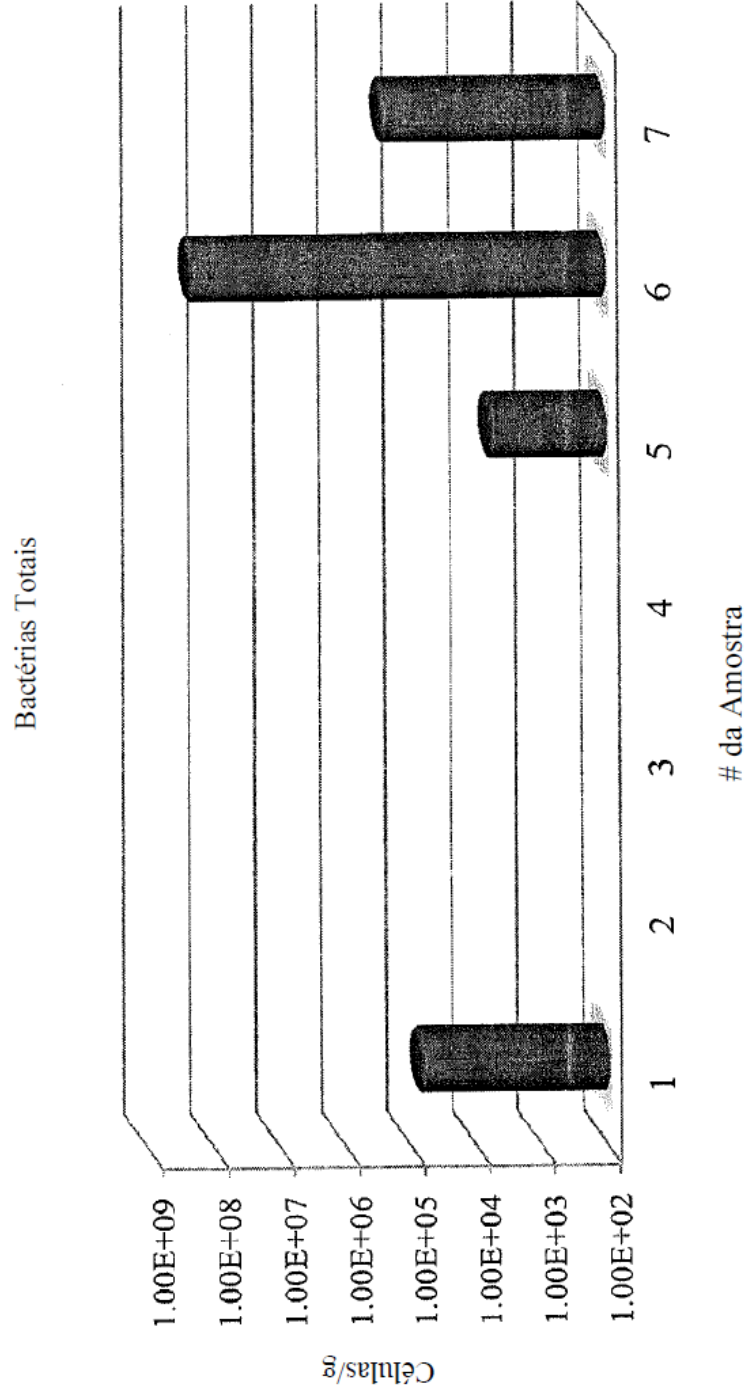


FIGURA 2

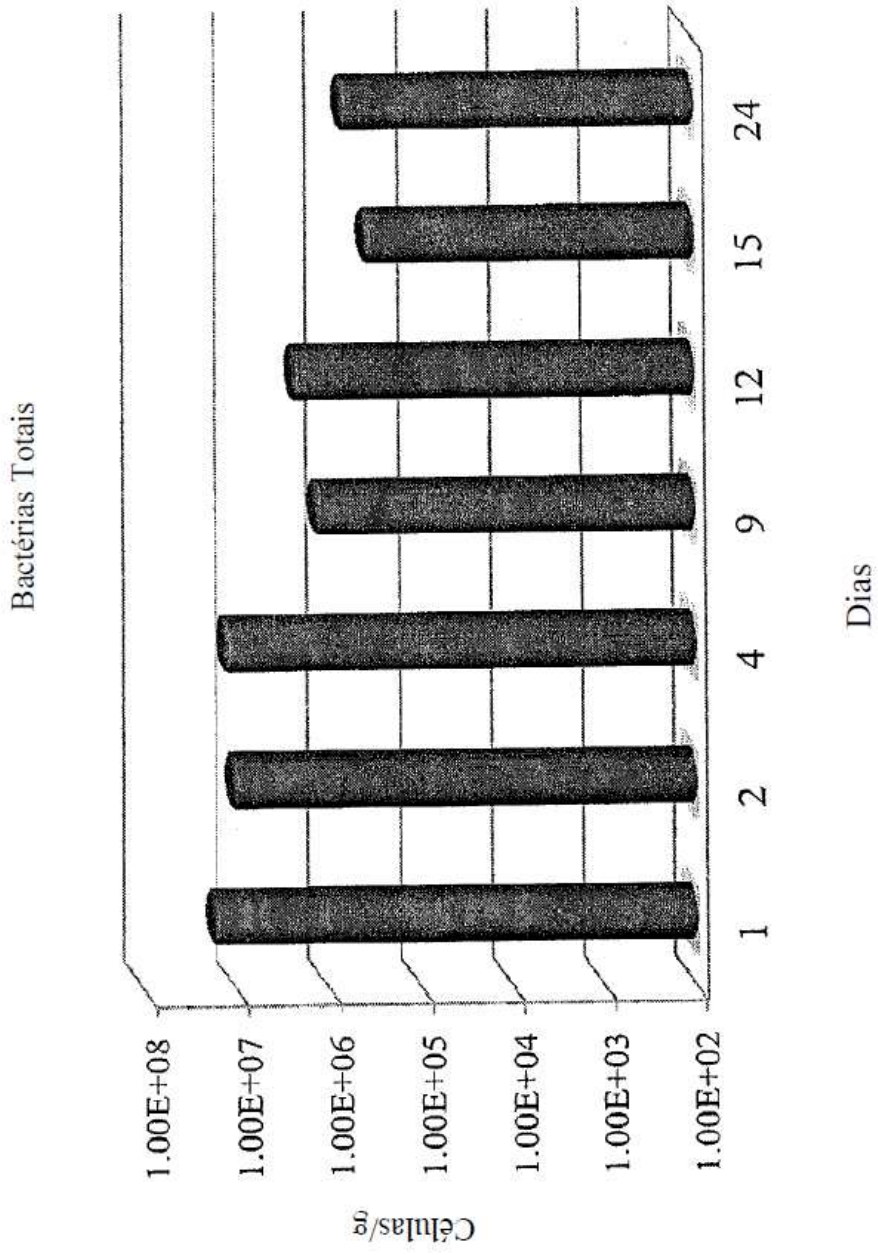


FIGURA 3

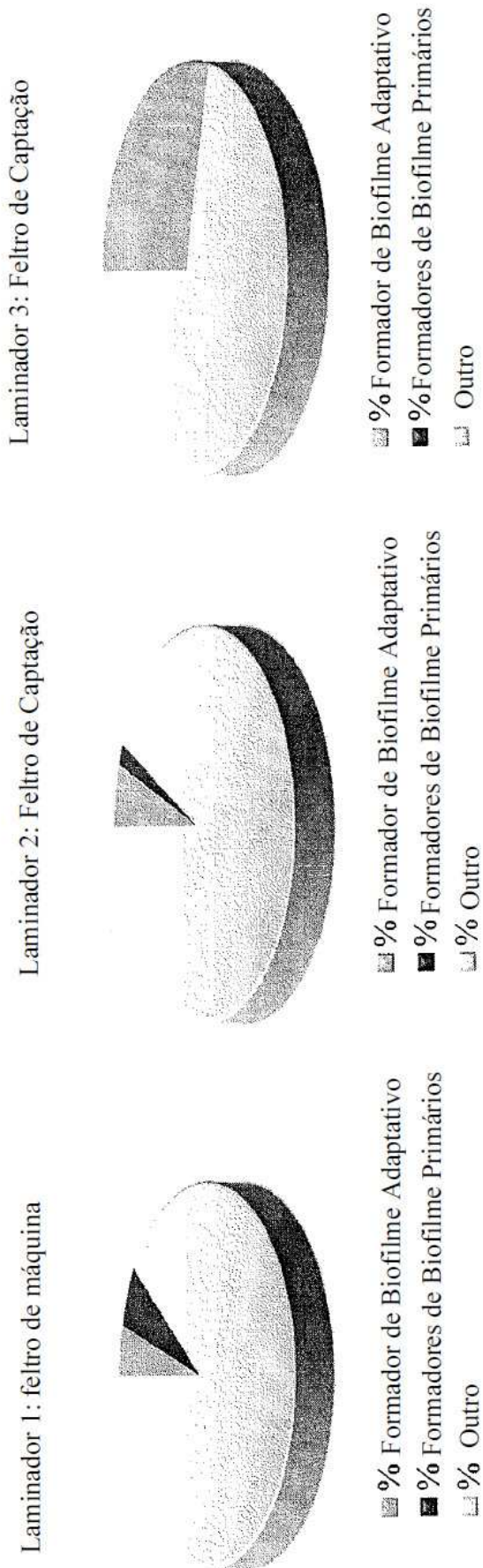


FIGURA 4