

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 959**

51 Int. Cl.:

D21H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2004 PCT/FI2004/000654**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.0005 WO05045132**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2004 E 04798263 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 1687481**

54 Título: **Un método para supervisar la presencia de microorganismos formadores de biopelícula en la industria del papel**

30 Prioridad:

06.11.2003 FI 20031614

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.08.2017

73 Titular/es:

**KEMIRA OYJ (100.0%)
PORKKALANKATU 3
00180 HELSINKI, FI**

72 Inventor/es:

**KOLARI, MARKO;
SALKINOJA-SALONEN, MIRJA y
HATUNEN, TERHI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 629 959 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un método para supervisar la presencia de microorganismos formadores de biopelícula en la industria del papel

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para supervisar la presencia de microorganismos formadores de biopelícula en la industria de la elaboración de papel y cartón con el fin de determinar la necesidad de un agente antibiopelícula en el proceso. Además, se provee también un kit de montaje para el método.

Antecedentes de la invención

10 Los procesos para la elaboración de papel y cartón contienen aguas de proceso tibias (por ejemplo, de 45°C a 60°C) que son ricas en nutrientes biodegradables y tienen un pH beneficioso (por ejemplo, un pH de 4 a 9) lo que proporciona, así, un ambiente apropiado para el desarrollo de microorganismos. Los microbios del proceso muestran un desarrollo formador de biopelícula, es decir, unido a la superficie, y un desarrollo de libre flotación, es decir, planctónico. Varios problemas en la industria del papel están causados por las biopelículas, es decir, por capas limosas, que se desarrollan sobre las superficies de los equipos del proceso y que se pueden arrancar de las superficies. La bioincrustación de las superficies de las máquinas y los aglomerados/biopelículas sueltos pueden 15 causar graves perturbaciones en el proceso: reducción del flujo de agua; bloqueo de filtros, tamices, etc.; deterioro de la calidad del producto final, por ejemplo, causando orificios o manchas de color en el producto final; o roturas en toda la banda de papel. Las biopelículas son difíciles de eliminar de las superficies del equipo del proceso y con frecuencia, se requiere del uso de productos químicos muy agresivos.

20 Para controlar el desarrollo microbiano, por ejemplo, se han agregado biocidas a las aguas de proceso. Los microbios planctónicos han sido controlados eficazmente con los biocidas; sin embargo, el uso de biocidas aún no ha resuelto todos los problemas de las biopelículas en las máquinas para elaborar papel o cartón. Existen varias razones para ello, por ejemplo, se desarrolla una amplia variedad de microbios en el proceso de elaboración del papel y ahora, también se sabe que las bacterias que se desarrollan en una biopelícula son generalmente más resistentes a los biocidas que los microbios planctónicos.

25 Uno de los inventores de la presente, Kolari, M. ha investigado recientemente los formadores de biopelícula en la industria del papel y del cartón en "Attachment Mechanisms and Properties of Bacterial Biofilms on Non-Living Surfaces", Dissertationes Biocentri Viikki Universitatis Helsingiensis 12/2003, tesis de doctorado, Universidad de Helsinki, Finlandia. En el estudio, se identificaron formadores de biopelícula y se investigaron sus interacciones.

30 Por consiguiente, se descubrió que los procesos comprendían diferentes tipos de microorganismos formadores de biopelícula: formadores de biopelícula primaria que son capaces de adherirse a superficies limpias y formadores de biopelícula secundaria que luego pueden adherirse a las biopelículas primarias. Al parecer, los formadores de biopelícula primaria son un requisito previo para una colonización exitosa en superficie de otros varios microbios en máquinas para papel y cartón. Por ejemplo, la *Deinococcus geothermalis* es un formador de biopelícula primaria y las cepas de varias especies de *Bacillus* se adhieren a las biopelículas primarias de esta bacteria. Kolari, M. et al. en "Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology" (2003) 30, páginas 225 a 238, describen más bacterias 35 formadoras de biopelícula primaria. Modificado por los últimos datos no publicados, los microorganismos relevantes formadores de película primaria reconocidos hasta el momento son: la especie *Deinococcus geothermalis*; género *Meiothermus*, tales como la especie *M. silvanus* o *M. ruber*, género *Azospirillum*; género *Burkholderia*, tales como *B. multivorans* o *B. cepacia*; género *Porphyrobacter*, tal como *P. cryptus*; género "*Rubellimicrobium*"; y género 40 *Thermomonas*, tales como *T. haemolytica* o *T. hydrothermalis*. Los formadores de biopelícula primaria son, de forma habitual, moderadamente termófilos, algunos con temperaturas máximas de desarrollo tan altas como 67°C, y la mayoría de las cepas que muestran el desarrollo más rápido a temperaturas de 45°C a 55°C. Sin embargo, no se analizó cómo superar el problema con las biopelículas en la industria del papel.

45 Tal como se ha mencionado con anterioridad, en el contexto de la formación de una capa limosa en máquinas para papel y cartón, al parecer, los formadores de biopelícula son los microbios más perjudiciales y su prevención mejoraría el funcionamiento de las máquinas del proceso y así, su productividad. Con ese propósito, la solicitante de la presente ha descrito en las últimas solicitudes de patentes FI 20021986 y FI 20021987, un nuevo tipo de agentes antibiopelícula, que son de origen vegetal y pueden ser usados para prevenir la formación de la biopelícula y/o la eliminación de la biopelícula ya formada en un proceso de elaboración de papel o cartón.

50 El uso eficaz de los biocidas o dichos agentes antibiopelícula requeriría de un método de supervisión eficaz. En la industria del papel, el método típico de supervisión para el desarrollo microbiano es el cultivo de una muestra de aguas de proceso en laboratorio. Sin embargo, dichos métodos de cultivo consumen tiempo y son complicados, es decir que llevan varios días y requieren, entre otras cosas, del uso de diversos medios de desarrollo para aislar e identificar distintos tipos de microbios en una muestra. Además, se sabe que el desarrollo microbiano en laboratorio depende del medio de cultivo, así, parte de los microbios presentes en una muestra son con frecuencia incapaces 55 de desarrollarse bajo condiciones de laboratorio. Además, la supervisión se enfoca típicamente en los microbios de libre flotación. Hacen falta métodos eficaces para supervisar los efectos de agentes antibiopelícula en los microbios de formación de biopelícula. Por lo tanto, se usan convencionalmente, por ejemplo, los biocidas para una inhibición

no selectiva de todos los microbios en el proceso, por lo que con frecuencia se requiere de grandes cantidades de biocidas.

5 El documento FI 95597 de la solicitante de la presente describe un dispositivo que se puede usar en laboratorio o que puede ser llevado al proceso del papel para producir una biopelícula en sus láminas. La biopelícula se forma con cultivos puros de levadura o colocando el dispositivo en las aguas de proceso. El desarrollo se analiza mediante el recuento del número de células de levadura por cm^2 utilizando métodos convencionales en placa. Según se mencionó con anterioridad, el método en placa consume tiempo tanto para identificar los microbios perjudiciales como para detectar, por ejemplo, un biocida adecuado. Además, puede suceder que una parte de los microbios de la biopelícula no se desarrolle en el medio de cultivo.

10 Los documentos de EE.UU. 6326190 y EE.UU. 6410256 describen un método en donde se forma una biopelícula bacteriana sobre una superficie de una pluralidad de protuberancias dispuestas en un dispositivo y se determina la sensibilidad de la biopelícula frente a agentes antibacteriales. Sin embargo, en dichos métodos, la biopelícula se formó mediante la técnica convencional lenta, es decir, mediante el uso de cultivos puros cultivados en laboratorio, en un dispositivo de laboratorio específico.

15 Shapira et al. describieron en el documento de EE.UU. 5 349 874 un método para supervisar la formación de biopelícula en superficies de sistemas acuáticos. Se mantuvo una muestra de agua en un aparato específico y se recolectaron las bacterias de la superficie del estudio del ensayo triturándolas y mezclándolas con arena fina. Después de las etapas de separación y disolución, se detectaron las bacterias mediante la técnica de extensión en placa.

20 La patente europea EP 1 350 431 presentó otro planteamiento en donde se analizaron microbios de diferentes sistemas acuáticos, por ejemplo, del proceso de fabricación del papel. Se recolectó la capa limosa, se extendió, cultivó y se produjeron cepas aisladas. Luego, se trituraron las células de estas cepas y se aisló el ADN, se polimerizó, purificó y secuenció. Se identificaron las bacterias por su información genética y se buscó un agente antimicrobiano adecuado mediante bases de datos, lo que hace que este método dependa de la disponibilidad de la información necesaria.

25 Por consiguiente, en la industria del papel, existe la necesidad de contar con métodos más eficaces para supervisar la formación de la capa limosa.

Objeto de la invención

30 El objeto de la presente invención es el de proporcionar otro método de detección para la industria del papel que permita un medio eficaz y rápido para supervisar el estado microbiológico en un proceso de elaboración de papel o cartón.

Otro objeto de la invención es el de proporcionar un método de detección que pueda ser usado para supervisar selectivamente microbios formadores de biopelícula perjudiciales para la industria del papel, y que pueda ser usado para detectar el agente antibiopelícula que sea el más activo frente a las biopelículas desarrolladas bajo las condiciones del proceso.

35 Otro objeto de la invención es el de proporcionar un kit de montaje que es muy viable para que pueda llevarse a cabo el método de detección de la invención en el lugar del proceso.

Breve descripción del dibujo

40 La Figura 1 representa una realización preferida del dispositivo de muestreo y del dispositivo de tratamiento/cultivo de la invención usados en el ejemplo.

Descripción detallada de la invención

45 Los inventores ahora han descubierto que puede formarse una biopelícula *in situ* en el proceso de elaboración de papel o cartón sobre una superficie de un dispositivo de muestreo y que puede analizarse la biopelícula formada sobre ella, si se desea, directamente desde dicha superficie respecto de la presencia y la cantidad de formadores de biopelícula perjudicial, especialmente de formadores de biopelícula primaria. De esta manera, en la presente invención, la biopelícula formada *in situ* ya no necesita ser retirada de la superficie del muestreador.

50 Además, los inventores han desarrollado un método de detección para la biopelícula formada sobre la superficie del muestreador, que es más rápido que los métodos basados en el cultivo que se usan en la actualidad y que puede ser usado para detectar la aparición de los formadores de biopelícula actuales en el lugar de proceso en particular, y para seleccionar el agente antibiopelícula más eficaz y una concentración efectiva frente a dicha biopelícula en ese lugar.

El método de detección ahora desarrollado puede ser usado para supervisar la necesidad de un agente antibiopelícula en un proceso de elaboración de papel o cartón, entre otras cosas, si se necesita cualquier agente antibiopelícula, si se necesita otra adición del mismo y/o de las cantidades eficaces/óptimas del agente

antibiopelícula a ser agregadas.

Las características distintivas de la invención son las definidas en las reivindicaciones 1 y 11.

Por consiguiente, la invención proporciona un método de detección para supervisar el desarrollo microbiano en un proceso de elaboración de papel o cartón para determinar la necesidad de un agente antibiopelícula en el proceso, comprendiendo el método las etapas de:

(a) someter un dispositivo de muestreo que comprende una pluralidad de protuberancias elongadas apoyadas sobre un soporte en la línea de proceso durante un período de tiempo, por ejemplo, de 3 horas a 7 días, preferiblemente de 12 horas a 3 días, para permitir que dichos microorganismos formen una biopelícula *in situ* en dicho proceso sobre la superficie del muestreador,

(b) tratar la superficie del muestreador con dicha biopelícula formada sobre la misma, en soluciones de uno o más agentes antibiopelícula de ensayo en una o más concentraciones, durante un período de tiempo, por ejemplo de 10 minutos a 4 horas, preferiblemente de 1 a 2 horas, a la temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y 65°C, por ejemplo de 35°C a 65°C, preferiblemente de 40°C a 60°C, más preferiblemente próxima a la temperatura del sitio de muestreo de la línea de proceso, tal como de 40°C a 60°C en un dispositivo de tratamiento dotado con una pluralidad de cavidades, dispuestas para recibir una protuberancia del dispositivo de muestreo en cada una de sus cavidades, luego

(c) poner en contacto la superficie del muestreador con dicha biopelícula sobre la misma, con un medio de desarrollo líquido en las cavidades de un dispositivo de cultivo dotado con una pluralidad de cavidades que contienen la solución de desarrollo, una protuberancia en cada cavidad, durante un período de tiempo, por ejemplo, de 8 a 48 horas, preferiblemente de 8 a 24 horas, más preferiblemente de 16 a 20 horas, a la temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y 65°C, por ejemplo de 35°C a 65°C, preferiblemente de 40°C a 60°C, más preferiblemente próxima a la temperatura de proceso del sitio de muestreo de la línea de proceso, tal como de 40°C a 60°C,

(d) retirar la solución de desarrollo y, en caso de que la biopelícula esté en su lugar sobre la superficie del muestreador, también el muestreador de las cavidades de dicho dispositivo de cultivo, realizar una tinción de los microorganismos formadores de biopelícula adheridos a las paredes de las cavidades mediante el uso de un agente de tinción, y detectar cualitativa y/o cuantitativamente la presencia o ausencia de una biopelícula adherida a las paredes de las cavidades.

En lo que respecta a los términos empleados, "proceso de elaboración de papel o cartón" y "línea de proceso" de la manera usada en la presente, cubren las líneas de proceso de los procesos de fabricación en húmedo para materias primas de papel y la pasta de papel, el proceso de elaboración de la pasta de papel, el proceso de secado de la pasta de papel, el proceso actual de elaboración de papel o cartón y su equipo, incluso las máquinas para papel y cartón. Se entiende que las máquinas para papel y cartón comprenden tanto el extremo húmedo con una sección de tamices como la sección de secado.

El dispositivo de muestreo se puede colocar en cualquier lugar de las líneas de proceso, incluyendo la parte del extremo final húmedo de las máquinas para papel o cartón y el extremo seco de las líneas de proceso. Además, el ambiente de exposición del dispositivo de muestreo puede ser cualquier medio de proceso incluyendo aguas de proceso, suspensiones de pasta de papel, aguas de circulación y residuales, materias primas, reactivos y productos intermedios, etc. El dispositivo se puede sumergir en las corrientes líquidas o puede ser llevado a una zona de salpicaduras en la línea de proceso.

Además, el dispositivo de muestreo puede comprender medios para fijarlo, por ejemplo, a la superficie del equipo de elaboración de papel, por ejemplo, en un recipiente de aguas de proceso de una máquina para papel. Alternativamente, los sitios de muestreo de la línea de proceso pueden estar dotados con un medio de montaje, en donde el dispositivo de muestreo puede ser fijado durante el período de formación de biopelícula sobre la superficie del mismo. El tiempo requerido para que se forme la biopelícula sobre la superficie del dispositivo en el proceso depende del lugar en la línea de proceso y del tipo de proceso, y por consiguiente, puede ser seleccionado por un experto en la técnica. Por ejemplo, cuando el dispositivo está en la sección de tamices de una máquina para papel neutro, el tiempo de exposición es de 12 a 48 horas, según la limpieza de la máquina, es decir, desde la última detención y lavado.

Después de retirar el muestreador del proceso, la superficie expuesta a la formación de biopelícula puede ser opcionalmente enjuagada o lavada para retirar todo el material suelto.

En una realización preferida de la invención, la biopelícula formada se somete a la etapa de tratamiento (b) y a la etapa de cultivo (c) mientras está en el lugar, es decir, adherida a la superficie del muestreador.

El método comprende la etapa de tratamiento (b) con uno o más agentes antibiopelícula de ensayo para la selección del agente antibiopelícula más eficaz en una concentración ventajosa.

La etapa de tratamiento (b) se realiza, preferiblemente, sumergiendo la superficie del muestreador con la biopelícula sobre el mismo en una solución o soluciones que contiene(n) el uno o más agentes antibiopelícula de ensayo. El tratamiento puede efectuarse en un dispositivo de tratamiento dotado con una pluralidad de cavidades cargadas con una solución que comprende el agente antibiopelícula de ensayo. El agente antibiopelícula de ensayo se disuelve en la solución que es, preferiblemente, un medio de desarrollo líquido, agua esterilizada y/o aguas de proceso. Preferiblemente, el tratamiento se efectúa agitando el dispositivo de tratamiento en un agitador convencional, por ejemplo entre 150 y 250 rpm, durante un período de tiempo y a una temperatura como por ejemplo la definida con anterioridad. Después de la etapa de tratamiento, se lava bien la superficie por ejemplo, con agua estéril. Preferiblemente, también se proporciona una muestra de referencia desde el mismo sitio de muestreo que se trata con la misma solución pero en ausencia de cualquier agente antibiopelícula de ensayo.

En el presente método, se someten a ensayo uno más agentes antibiopelícula de ensayo en diversas concentraciones para analizar su eficacia comparada con los formadores de biopelícula presentes en el proceso supervisado y para determinar la concentración útil/óptima del agente a ser usado en ese sitio de proceso. En caso de varios agentes antibiopelícula/concentraciones, pueden usarse varios dispositivos de muestreo que fueron mantenidos en el mismo sitio de la línea de proceso, cada muestreador para un agente y para una concentración. Más preferiblemente, el dispositivo de muestreo está dotado con una pluralidad de superficies separadas, mediante el cual cada superficie separada puede ser tratada en la etapa (b) con un agente antibiopelícula y una concentración, y también cultivada por separado en la etapa (c). Además, en la etapa (b), uno o más de los dispositivos o de las superficies se dejan típicamente sin tratar con el agente antibiopelícula de ensayo, como muestras de referencia, es decir, tratadas simplemente con la solución. La etapa de tratamiento (b) de la invención proporciona información fiable sobre la eficacia de los agentes antibiopelícula ensayados respecto de las biopelículas perjudiciales en el proceso, dado que el ensayo apunta a los formadores de biopelícula en su modo de desarrollo de biopelícula, es decir, en la biopelícula en predesarrollo.

Después de la etapa de tratamiento (b), pueden enjuagarse o lavarse las biopelículas tratadas antes de la etapa de cultivo (c). El cultivo de las biopelículas tratadas se realiza en un dispositivo de cultivo con cavidades llenas con un medio de desarrollo líquido, preferiblemente sumergiendo dicha superficie del muestreador con la biopelícula tratada sobre la misma en dicha solución. El tiempo y la temperatura usados en la etapa de cultivo son, por ejemplo, los definidos con anterioridad. En una realización preferida, la etapa de cultivo se efectúa con agitación, por ejemplo, con un agitador convencional, por ejemplo de 150 a 260 rpm, dado que se descubrió que la agitación es muy beneficiosa para la formación de biopelícula. El agitador puede estar dispuesto adecuadamente con un medio de calentamiento para proporcionar la temperatura deseada. La etapa (c) se usa para formar una biopelícula en las paredes del dispositivo, que puede teñirse en la etapa (d) siguiente para detectar cuantitativa y/o cualitativamente la presencia o ausencia de formadores de biopelícula en el sitio de muestreo de la línea de proceso. El método comprende la etapa de tratamiento (b), por lo que, esta etapa muestra el alcance de los microbios formadores de biopelícula que sobrevivieron a través de la etapa de tratamiento del agente de antibiopelícula.

Por consiguiente, después de la etapa de cultivo, la solución de desarrollo y, en caso de que se trate la biopelícula en su lugar, es decir, mientras está adherida a la superficie del muestreador, en la etapa (b) y en la etapa (c) siguiente, también el muestreador son retirados en la etapa (d) de la cavidad del dispositivo de cultivo, la cavidad es opcionalmente lavada, preferiblemente con agua estéril, para retirar cualquier material suelto, y se somete a tinción a cualquier microorganismo formador de biopelícula adherido a las paredes de la cavidad, y la presencia y/o intensidad de la formación de color en la cavidad se detecta cualitativamente, por ejemplo en forma visual, o cuantitativamente, por ejemplo por espectrofotometría, de una forma conocida. El o los agentes de tinción adecuados incluyen cualquier agente convencional adecuado para teñir las biopelículas, tales como:

- tintes generales para identificar biomasa, tales como cristal violeta o safranina,
- tintes para identificar el número de células, tales como anaranjado de acridina, bromuro de etidio, DAPI, SYTO16 u otros tintes de ácidos nucleicos,
- tintes de viabilidad para las células microbianas, tales como LIVE/DEAD™, CTC o varios compuestos de tetrazolio,
- tintes fluorescentes de función específica, tales como sustratos de enzimas fluorescentes para detectar la actividad de degradación del almidón, la actividad de la quitinasa, la actividad de la estearasa, la actividad hidrolizante del éster lípido o la actividad de la fosfatasa.

En una realización preferida del método de la invención, el dispositivo de muestreo comprende una pluralidad de protuberancias elongadas apoyadas, es decir conectadas, sobre un soporte, por el que, al incluirse en el proceso, la biopelícula se forma de manera similar sobre cada superficie de las protuberancias. El material de las protuberancias puede ser, por ejemplo, acero inoxidable, plásticos, tales como poliestireno, o cerámicas, preferiblemente acero inoxidable. En dicha realización, también se proporciona el dispositivo de tratamiento opcional con una pluralidad de cavidades para dichas soluciones que contienen uno o más agentes antibiopelícula de ensayo en una o más concentraciones, un agente antibiopelícula de ensayo y una concentración en cada cavidad, y para dicha solución sin el agente antibiopelícula de ensayo (= para la referencia), de manera que las protuberancias de dicho

muestreador puedan ser sumergidas en dichas cavidades, una protuberancia en cada cavidad, después de retirar el muestreador del sitio de muestreo de la línea de proceso. En dicha realización, el dispositivo de cultivo también comprende una pluralidad de cavidades que contienen la solución de desarrollo, de manera que las protuberancias de dicho muestreador, opcionalmente tratado en la etapa (b), puedan ser sumergidas en dicha solución en las cavidades del dispositivo de cultivo, una protuberancia en cada cavidad.

La biopelícula formada sobre la superficie de las protuberancias es sorprendentemente suficiente para el método de la invención y tiene el beneficio adicional de que no se requiere la eliminación de la biopelícula de las protuberancias, lo que simplifica y acelera la supervisión. Un beneficio mayor de la presente realización simple de usar de la invención es que pueden someterse a ensayo varios agentes antibiopelícula diferentes simultáneamente para analizar una pluralidad de biopelículas similares previamente desarrolladas bajo verdaderas condiciones de proceso.

Además, con la presente invención, los formadores de biopelícula actuales de un sitio de muestreo de la línea de proceso pueden ser sometidos a ensayo para analizar los agentes antibiopelícula en su estado de desarrollo de biopelícula actual, por lo que pueden obtenerse resultados más fiables respecto de la eficacia de los agentes antibiopelícula sometidos a ensayo.

Dicho dispositivo de muestreo preferido puede ser cualquier sistema en donde las protuberancias elongadas estén fijadas por un extremo sobre un soporte, preferiblemente sobre un soporte plano. El tamaño del muestreador no está limitado y puede variar según el lugar de muestreo elegido en el proceso y el sistema de ensayo. En otra realización preferida, el dispositivo de muestreo comprende una pluralidad de espigas o clavijas dispuestas en hilera y fijadas por un extremo sobre una placa de soporte; y el dispositivo de tratamiento de la etapa (b) y el dispositivo de cultivo de la etapa (c) son placas dotadas con una pluralidad de pocillos dispuestos en hilera y adaptados para recibir una espiga o clavija prominente en un pocillo de manera que cada espiga/clavija del dispositivo de muestreo se apoye en cada pocillo de la placa del dispositivo de tratamiento y cultivo. Preferiblemente, los dispositivos de muestreo son tapas dotadas con hileras de espigas/clavijas fijadas permanentemente sobre las mismas, de manera que las tapas puedan ser usadas junto con, por ejemplo, placas de múltiples pocillos disponibles en el mercado, tales como placas de 6, 12 o 24 pocillos, preferiblemente placas de 12 pocillos, tales como placas de poliestireno de 12 pocillos, como el dispositivo de tratamiento (b) y el dispositivo de cultivo (c). Naturalmente, es deseable elegir un número e hileras de pocillos de las placas de tratamiento y cultivo que se correspondan con el número e hileras de espigas/clavijas de la tapa para que, cuando se coloque la tapa sobre la placa de múltiples pocillos, cada espiga/clavija se apoye en un pocillo de la placa. Así, durante la etapa de tratamiento y cultivo, un extremo de las espigas/clavijas queda sumergido en el medio líquido presente en los pocillos de la placa mientras que el otro extremo queda fijo en la tapa.

Se ha descubierto que el dispositivo de muestreo, por ejemplo la tapa con las espigas/clavijas, es muy beneficioso para la producción de biopelícula *in situ* en el proceso de elaboración de papel o cartón. Y también se ha descubierto que no se necesita ninguna cubierta/recubrimiento para el muestreador de la invención en el proceso sino que el muestreador puede ser colocado y las protuberancias pueden quedar expuestas tal como están en el proceso, de modo que las protuberancias están en contacto directo con las condiciones de proceso, por ejemplo, con las salpicaduras o las corrientes de aguas de proceso.

El desarrollo de la biopelícula por parte de los formadores de biopelícula primaria en el dispositivo de muestreo puede ser detectado incluso dentro de las 12 a las 48 horas. La eficacia de los agentes antibiopelícula frente a las biopelículas previamente desarrolladas puede aparecer incluso en 18 horas. Así, el presente método permite reaccionar rápidamente ante cualquier cambio en el desarrollo de la biopelícula dentro del proceso y también ante cualquier situación problemática ya producida debido a dicho microorganismo respecto de los métodos de la técnica anterior.

Por consiguiente, en una realización preferida, se efectúa una supervisión continua en uno o más lugares del proceso, por lo que la acción requerida, por ejemplo la necesidad de agregar o de agregar nuevamente el agente antibiopelícula, el tipo y su cantidad efectiva, puede ser determinada sin ningún retardo indebido evidente cuando se usan métodos de la técnica anterior. Por las mismas razones, puede optimizarse la adición de agentes antibiopelícula y, por ejemplo, se pueden prever interrupciones serias en el proceso y así, evitarlas.

Opcionalmente, las protuberancias del muestreador pueden ser usadas como punto de partida para aislar los microbios formadores de biopelícula primaria. Opcionalmente, las protuberancias del muestreador también pueden ser teñidas y se puede cuantificar la biopelícula desarrollada durante la exposición a las condiciones de proceso.

La invención también proporciona un kit de montaje para supervisar la presencia de microorganismos formadores de biopelícula en un proceso de elaboración de papel o cartón y para determinar la necesidad de un agente antibiopelícula en el proceso, y opcionalmente, para la selección del agente antibiopelícula más eficaz. El kit de montaje comprende al menos una combinación de:

(i) un dispositivo de muestreo que comprende una pluralidad de protuberancias elongadas conectadas a un soporte que permiten que dichos microorganismos formen una biopelícula *in situ* en dicho proceso sobre la superficie del muestreador,

(ii) un dispositivo de tratamiento que comprende una placa dotada con una pluralidad de cavidades dispuestas para

recibir una protuberancia del dispositivo de muestreo en cada cavidad del mismo,

(iii) un dispositivo de cultivo que comprende una placa dotada con una pluralidad de cavidades dispuestas para recibir una protuberancia del dispositivo de muestreo en cada cavidad del mismo,

(iv) un agitador para agitar el dispositivo de tratamiento y/o de cultivo,

5 (v) un detector para detectar la presencia o ausencia de cualquier microbio teñido adherido a las cavidades del dispositivo de cultivo, y

(vi) reactivos que comprenden:

(a) uno o más agentes antibiopelícula de ensayo adecuados para la industria del papel, en una o más disoluciones, para uso en el dispositivo de tratamiento de (ii),

10 (b) un medio de desarrollo líquido, para uso en el dispositivo de cultivo de (iii),

(c) agente de tinción para uso en la detección de la presencia o ausencia de cualquier microorganismo formador de biopelícula adherido a las cavidades del dispositivo de cultivo con un detector de (v), y

(d) opcionalmente, una solución de lavado, tal como agua estéril.

15 Preferiblemente, el kit de montaje comprende (i) dicho muestreador que es una tapa dotada con una pluralidad de espigas o clavijas en hileras fijas por un extremo sobre la tapa, (ii) el dispositivo de tratamiento y (iii) el dispositivo de cultivo, ambos dotados con placas de múltiples pocillos con una pluralidad de pocillos en hilera, en las que las espigas/clavijas del muestreador se apoyan en los pocillos de la placa de tratamiento y cultivo, una espiga/clavija en cada pocillo, cuando se coloca la tapa del muestreador en la placa de tratamiento o cultivo. Dichos dispositivos se han descrito con anterioridad.

20 Además, en una realización (ii), los pocillos de la placa de tratamiento son prellenados con una solución de uno o más agentes antibiopelícula, en una o más concentraciones, en un medio de desarrollo líquido o agua esterilizada, un agente antibiopelícula de ensayo en cada pocillo, y al menos un pocillo es prellenado con un medio de desarrollo o agua esterilizada sola (pocillo de referencia), y (iii) los pocillos de la placa de cultivo son prellenados con un medio de desarrollo líquido, en donde los pocillos son sellados con una tapa desmontable, por ejemplo de papel de aluminio.

25 "Agente antibiopelícula", de la forma usada en la presente, significa, en general, cualquier agente que inhiba o evite el desarrollo de un microorganismo. El agente antibiopelícula preferido es adecuado para la inhibición del modo de desarrollo de biopelícula de microorganismos formadores de biopelícula que se produce en la industria del papel, y más preferiblemente, los formadores de biopelícula primaria en la industria del papel, por ejemplo, *Deinococcus geothermalis* y/o los otros formadores de biopelícula primaria mencionados con anterioridad. Entre los ejemplos de
30 agentes antibiopelícula se incluyen los productos químicos biocidas disponibles en el mercado tales como 2,2-dibromo-3-nitropropionamida (DBNPA) y bistiocianato de metileno (MBT), y también, los agentes antibiopelícula de origen vegetal, compuestos puros y extractos, tales como los mencionados en las solicitudes de patentes FI 20021986 y FI 20021987 mencionadas con anterioridad, preferiblemente compuestos fenólicos, por ejemplo, galato de octilo y galato de laurilo, betulina y flavonoles, por ejemplo, pentahidroxi flavona y trihidroxi flavona. La expresión
35 "agente antibiopelícula de ensayo", de la forma usada anteriormente, significa un agente antibiopelícula, por ejemplo un compuesto, una mezcla de dos o más agentes antibiopelícula, por ejemplo cualquier combinación de compuestos a ser sometidos a ensayo y usados juntos, o un extracto, por ejemplo, un extracto vegetal. El agente antibiopelícula de prueba es disuelto, preferiblemente, en una solución acuosa tal como se ha descrito con anterioridad.

40 El medio de desarrollo es una solución y puede ser seleccionada, por ejemplo, entre soluciones de desarrollo acuosas disponibles en el mercado adecuadas para los microbios, especialmente formadores de biopelícula, más particularmente para formadores de biopelícula primaria, que se presentan en la industria del papel, tales como caldo R2 (disponible en el mercado, por ejemplo, a través de Difco), y a partir de aguas de proceso de máquinas para papel o cartón esterilizadas que preferiblemente contienen nutrientes añadidos.

45 La parte o la totalidad de los reactivos puede estar en un recipiente de múltiples dosis, por ejemplo en una botella, o en un recipiente de dosis unitaria, o puede ser prellenado en las cavidades de dichos dispositivos como se ha mencionado con anterioridad.

El o los agentes de tinción adecuados para el kit de montaje incluyen cualquier agente convencional adecuado para teñir las biopelículas, tales como las mencionadas con anterioridad. Asimismo, puede proporcionarse un reactivo, por ejemplo etanol, para disolver el tinte de las cavidades, si el kit de montaje es para determinaciones cuantitativas.

50 El kit de montaje puede comprender, además, por ejemplo, un agitador adecuado para agitar las placas de tratamiento y/o cultivo, agitador que puede estar dotado, preferiblemente, con un sistema de calentamiento para incubar las placas, por ejemplo, durante la etapa de tratamiento y/o cultivo. Asimismo, puede incluirse un detector en el kit de montaje, tal como un lector de placa de múltiples pocillos para mediciones de absorbancia o fluorescencia. El tipo de detector depende del método de tinción usado para los microbios de la biopelícula. También pueden

incluirse pipetas en el kit de montaje.

Ejemplo

5 En este experimento, se usa una realización del dispositivo de muestreo de la invención para ilustrar el método de la invención con el fin de determinar el efecto de varios agentes antibiopelícula en la inactivación de biopelículas formadas en una máquina para papel.

10 En esta realización, el dispositivo de muestreo comprende 12 clavijas de acero inoxidable fijadas por un extremo a una tapa de acero inoxidable. La tapa con las clavijas se presenta en la Figura 1 junto con una placa de tratamiento con 12 pocillos adaptados para recibir las clavijas cuando se coloca la tapa sobre la placa. Se diseñó la tapa en forma adecuada de manera que sea complementaria con las placas de poliestireno de 12 pocillos disponibles en el mercado.

15 Se sumergen tres tapas del muestreador en el compartimento estanco del filtrado transparente de una máquina para papel fino neutro y se deja suspendido sumergido en dicho filtrado a la temperatura de 52°C de las aguas de proceso, durante 68 horas. Luego, se retiran las muestras, se las enjuaga una vez con agua corriente esterilizada y se coloca cada tapa en una placa de tratamiento de 12 pocillos de manera que las clavijas con las biopelículas formadas *in situ* en el proceso sobre la superficie de las mismas queden sumergidas en la solución del tratamiento dentro de los pocillos, cada clavija en un pocillo, mientras son soportadas en un extremo por la tapa.

20 Cada pocillo de una placa de tratamiento contiene 3,5 ml de agua corriente esterilizada sola (muestras de referencia) o 3,5 ml de agua corriente esterilizada junto con un agente antibiopelícula en una concentración de 1 ppm a 50 ppm (sustancia activa). El volumen máximo de los pocillos es usado de manera que casi toda la longitud de las clavijas quede expuesta a los agentes antibiopelícula (la solución del tratamiento). Los agentes antibiopelícula de ensayo son BCDMH (bromo-cloro-5,5-dimetil hidantoína), una mezcla de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona, THPS (sulfato de tetrakis(hidroxi-metil)fosfonio), DBNPA (2,2-dibromo-2-cianoacetamida), glutaraldehído, MBT (metileno-bis(tiocianato)), BNPD (bromo-2-nitropropan-1,3-diol), todos ellos disponibles en el mercado.

25 La etapa de tratamiento de antibiopelícula se lleva a cabo incubando las placas con la tapa sobre ellas mantenidas sin cambio a 52°C durante 2 horas. Después de la etapa de tratamiento, se retiran las tapas de la placa y se las enjuaga tres veces con agua corriente esterilizada y luego se coloca sobre las placas de cultivo de 12 pocillos, que son similares a las placas de tratamiento, pero los pocillos contienen 2,5 ml de caldo R2 estéril (Difco). Las placas de cultivo (placa + tapa con las clavijas sumergidas en los pocillos) se agitan a 250 rpm, a 52°C, durante 17 horas.

30 Finalmente, se retiran las clavijas y el medio de desarrollo de los pocillos, se enjuagan los pocillos una vez con agua corriente y se tiñen los microbios adheridos a las paredes de los pocillos con safranina. La cantidad de biopelícula producida por los microbios que sobrevivieron a la etapa de tratamiento con los agentes antibiopelícula se evalúan visualmente.

35 Por consiguiente, en este experimento, DBNPA, BCDMH, THPS y glutaraldehído pueden eliminar o suprimir la biopelícula de las clavijas de manera que no se forme ninguna biopelícula nueva durante la etapa de cultivo. Sin embargo, después del tratamiento de la biopelícula en las clavijas con la mezcla de isotiazolonas, MBT o BNPD, la biopelícula tratada aún es capaz de formar biopelícula nueva durante la etapa de cultivo en la superficie de las paredes de los pocillos del dispositivo de cultivo. La prevención de un desarrollo adicional de la nueva biopelícula en la etapa de cultivo con la menor de las concentraciones de agente antibiopelícula se logra con 5 ppm de DBNPA.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia de microorganismos formadores de biopelícula en un proceso de elaboración de papel o cartón para determinar la necesidad de un agente antibiopelícula en el proceso, caracterizado por las etapas que comprenden:
 - 5 (a) someter un dispositivo de muestreo que comprende una pluralidad de protuberancias elongadas apoyadas sobre un soporte en la línea de proceso durante un período de tiempo para permitir que dichos microorganismos formen una biopelícula *in situ* en dicho proceso sobre la superficie del muestreador,
 - (b) tratar la superficie del muestreador con dicha biopelícula formada sobre el mismo en soluciones de uno o más agentes antibiopelícula de ensayo en una o más concentraciones, durante un período de tiempo en un dispositivo de
 10 tratamiento dotado con una pluralidad de cavidades, dispuestas para recibir una protuberancia del dispositivo de muestreo en cada cavidad del mismo, luego
 - (c) poner en contacto la superficie del muestreador con dicha biopelícula sobre el mismo con un medio de desarrollo líquido en las cavidades de un dispositivo de cultivo dotado con una pluralidad de cavidades que contienen la solución de desarrollo, una protuberancia en cada cavidad, durante un período de tiempo,
 - 15 (d) retirar la solución de desarrollo y el muestreador de las cavidades de dicho dispositivo de cultivo, realizar una tinción de los microorganismos formadores de biopelícula adheridos a las paredes de las cavidades mediante el uso de un agente de tinción, y detectar cualitativamente y/o cuantitativamente la presencia o ausencia de microorganismos formadores de biopelícula adheridos a las paredes de las cavidades.
2. El método según la reivindicación 1, caracterizado por que, después de la formación de la biopelícula, dicha
 20 superficie del muestreador es (b) tratada con la solución del agente antibiopelícula de ensayo para la selección del agente antibiopelícula más eficaz.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que
 - (a) se somete un dispositivo de muestreo en la línea de proceso durante un período de 12 horas a 3 días,
 - 25 (b) se efectúa la etapa de tratamiento con la solución de un agente antibiopelícula de ensayo durante un período de por ejemplo 10 minutos a 4 horas, preferiblemente de 1 a 2 horas, entre la temperatura ambiente y 65°C, preferiblemente a la temperatura próxima a la temperatura de proceso del sitio de muestreo de la línea de proceso, tal como de 40°C a 60°C, luego
 - (c) se efectúa la etapa de cultivo, preferiblemente con agitación, en un medio de desarrollo líquido en una cavidad
 30 de un dispositivo de cultivo durante un período de por ejemplo 8 a 48 horas, preferiblemente de 8 a 24 horas, a la temperatura entre la temperatura ambiente y 65°C, por ejemplo de 35°C a 65°C, preferiblemente próxima a la temperatura de proceso del sitio de muestreo de la línea de proceso, tal como de 40°C a 60°C.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque (b) el tratamiento se
 35 lleva a cabo en un dispositivo de tratamiento dotado con cavidades que se llenan con soluciones que comprenden uno o más agente(s) antibiopelícula de ensayo y un medio de desarrollo líquido, agua esterilizada y/o aguas de proceso sumergiendo dicha superficie del muestreador en dichas soluciones.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la etapa (c) se lleva a
 cabo en un dispositivo de cultivo dotado con cavidades que se llenan con el medio de desarrollo líquido sumergiendo dicha superficie del muestreador en dichas soluciones.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que en la etapa (d) las
 40 cavidades son opcionalmente lavadas después de retirar el muestreador y las soluciones de desarrollo de las cavidades del dispositivo de cultivo y la intensidad de la formación del color en las cavidades se detecta cualitativamente o cuantitativamente.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que (a) el dispositivo de
 45 muestreo comprende una pluralidad de protuberancias elongadas conectadas a un soporte, por el que, al incluirse en el proceso, la biopelícula se forma sobre la superficie de las protuberancias.
8. El método según la reivindicación 7, caracterizado por que (b) el dispositivo de tratamiento está dotado con
 una pluralidad de cavidades que contienen una solución que comprende uno o más agentes antibiopelícula de ensayo en una o más concentraciones, un agente antibiopelícula de ensayo en una concentración en cada cavidad,
 50 y dicha solución sin ningún agente antibiopelícula de ensayo como referencia, y por que las protuberancias de dicho muestreador retiradas de la línea de proceso se sumergen en dicha solución en las cavidades, una protuberancia en cada cavidad.
9. El método según la reivindicación 7 u 8, caracterizado por que (c) el dispositivo de cultivo comprende una
 pluralidad de cavidades que contienen el medio de desarrollo líquido, y por que las protuberancias de dicho

muestreador, tratado en la etapa (b), son sumergidas en dicha solución de desarrollo en las cavidades del dispositivo de cultivo, una protuberancia en cada cavidad.

5 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el dispositivo de muestreo comprende una pluralidad de espigas o clavijas dispuestas en hilera y fijas por un extremo sobre una placa de soporte y el dispositivo de tratamiento de la etapa (b) y el dispositivo de cultivo de la etapa (c) son placas de múltiples pocillos dotadas con una pluralidad de pocillos dispuestos en hilera y adaptados para recibir una espiga prominente en un pocillo de manera que cada espiga del dispositivo de muestreo se apoye en cada pocillo de la placa del dispositivo de tratamiento y cultivo.

10 11. Un kit de montaje para detectar la presencia de microorganismos formadores de biopelícula según el método de la reivindicación 1 en un proceso de elaboración de papel o de elaboración de cartón, y para determinar la necesidad de un agente antibiopelícula en el proceso, y opcionalmente para la selección del agente antibiopelícula más eficaz, que comprende al menos una combinación de:

15 (i) un dispositivo de muestreo que comprende una pluralidad de protuberancias elongadas conectadas a un soporte que permite que dichos microorganismos formen una biopelícula *in situ* en dicho proceso sobre la superficie del muestreador,

(ii) un dispositivo de tratamiento que comprende una placa dotada con una pluralidad de cavidades dispuestas para recibir una protuberancia del dispositivo de muestreo en cada cavidad del mismo,

(iii) un dispositivo de cultivo que comprende una placa dotada con una pluralidad de cavidades dispuestas para recibir una protuberancia del dispositivo de muestreo en cada cavidad del mismo,

20 (iv) un agitador para agitar el dispositivo de tratamiento y/o de cultivo, y

(v) un detector para detectar la presencia o ausencia de cualquier microorganismo formador de biopelícula adherido a las cavidades del dispositivo de cultivo,

(vi) reactivos que comprenden:

25 (a) uno o más agentes antibiopelícula de ensayo adecuados para la industria del papel, en una o más diluciones, para uso en el dispositivo de tratamiento de (ii),

(b) un medio de desarrollo líquido, para uso en el dispositivo de cultivo de (iii),

(c) agente de tinción para uso en la detección de la presencia o ausencia de cualquier microorganismo formador de biopelícula adherido a las cavidades del dispositivo de cultivo con un detector (v).

30 12. El kit de montaje según la reivindicación 11, caracterizado por que comprende (i) un muestreador dotado con una pluralidad de espigas en hileras fijas por un extremo sobre una tapa y (ii) el dispositivo de tratamiento y (iii) el dispositivo de cultivo, ambos dotados con placas de múltiples pocillos con una pluralidad de pocillos en hilera, donde las espigas del muestreador se apoyan en los pocillos de la placa de tratamiento y cultivo, una espiga en cada pocillo, cuando se coloca la tapa del muestreador en la placa de tratamiento o cultivo.

35 13. El kit de montaje según la reivindicación 11 o 12, caracterizado por que (ii), los pocillos de la placa de tratamiento se llenan con una solución de uno o más agentes antibiopelícula de ensayo, a una o más concentraciones, en un medio de desarrollo líquido o agua esterilizada, un agente antibiopelícula de prueba en cada pocillo, y por que al menos un pocillo se llena con un medio de desarrollo o agua esterilizada sola, y (iii) los pocillos de la placa de cultivo se llenan con un medio de desarrollo líquido, y por que los pocillos son sellados con una tapa desmontable.

40 14. El uso del método de detección según las reivindicaciones 1 a 10 o del kit de montaje según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, para supervisar el proceso de elaboración de papel o cartón para determinar la necesidad de un agente antibiopelícula en el proceso, y para la selección del agente antibiopelícula más eficaz.

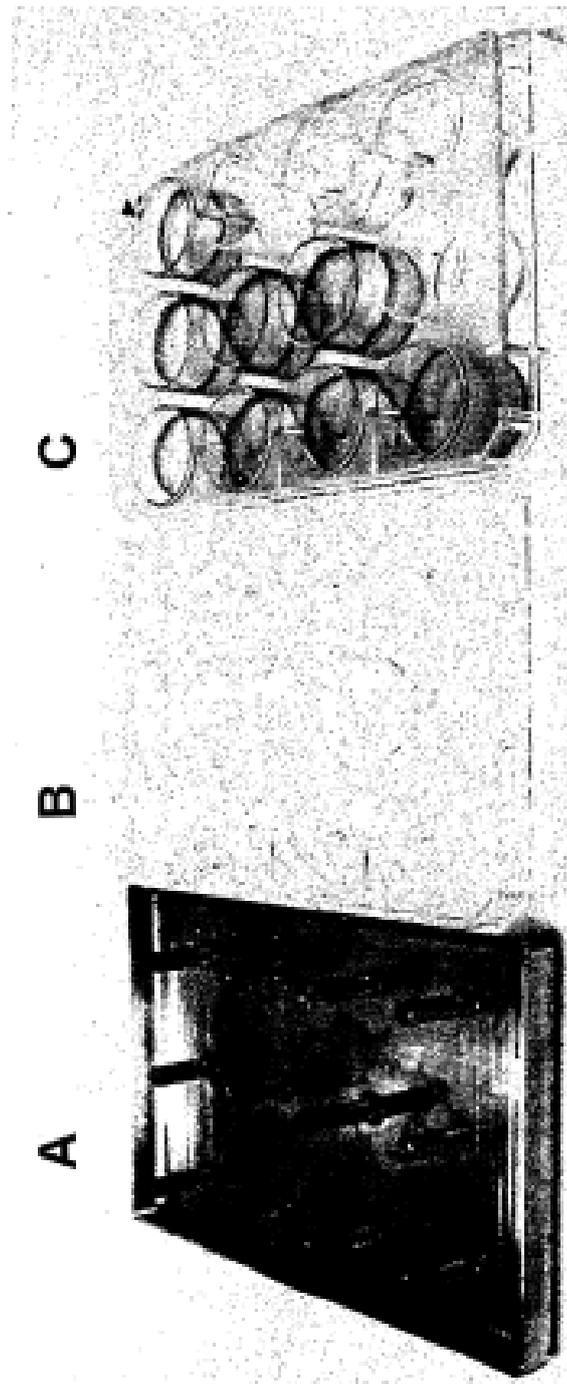


Figura 1