

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 264**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/02** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12Q 1/22** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2013 PCT/US2013/050896**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14015044**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2013 E 13819640 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2875145**

54 Título: **Un método para construir un índice de diversidad de microorganismos en muestras de proceso**

30 Prioridad:

**17.07.2012 US 201213550748**

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

**21.03.2018**

73 Titular/es:

**NALCO COMPANY (100.0%)  
1601 West Diehl Road  
Naperville, IL 60563, US**

72 Inventor/es:

**RICE, LAURA E. y  
LUND, LILIYA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 660 264 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 construir un índice de diversidad de microorganismos en muestras de proceso

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere en general a métodos útiles en la detección, identificación y tratamiento de microorganismos presentes en sistemas de procesos comerciales.

10 La presencia y el crecimiento de ciertos microorganismos en los sistemas de procesos comerciales es un desafío continuo. Muchas de las diversas etapas de los sistemas de procesos comerciales contienen una variedad de condiciones que tienen diferentes cantidades de agua, nutrientes, calor, refugio, sustratos de anclaje, condiciones químicas y/o ausencia de depredadores que a menudo funcionan como nichos ambientales adecuados para la colonización de todo tipo de microorganismos. El crecimiento de la población por estos microorganismos a menudo plantea una serie de problemas, que incluyen la degradación de las funciones del proceso y la contaminación de los productos finales.

15 Uno de estos problemas es la formación de depósitos de costras inducida por los microorganismos. Las costras son la acumulación sobre una superficie de un elemento presente en un sistema de proceso comercial de una composición sólida rígida que comprende material orgánico y/o inorgánico depositado. Las costras pueden ser secreciones y/o colonias de los propios microorganismos. En particular, las costras pueden incluir o consistir en la acumulación de uno o más tipos de organismos que portan una carcasa dura y/o quitina y/o organismos de coral. Las costras pueden tener muchos impactos negativos en los sistemas, tales como la disminución de la eficiencia operativa, la falla prematura del equipo, la pérdida de productividad, la pérdida de calidad del producto y el aumento de los riesgos relacionados con la salud. Lo peor de todo es que la costra debe eliminarse físicamente mediante raspado u otros medios físicos, y esto requiere costosas paradas o el desmontaje de parte o la totalidad del sistema de proceso.

25 Otro problema que plantean los microorganismos es debido a la formación de biopelículas. Las biopelículas son capas de materiales orgánicos que comprenden microorganismos o sustancias exopoliméricas secretadas por los microorganismos que ayudan a la formación de comunidades microbianas. Las biopelículas pueden crecer en las superficies de los equipos de proceso, así como también en los depósitos de fluidos. Estas biopelículas son ecosistemas complejos que establecen un medio para concentrar nutrientes y ofrecer protección para el crecimiento. Las biopelículas pueden acelerar la formación de costras, la corrosión y otros procesos de incrustación. Las biopelículas no solo contribuyen a la reducción de las eficiencias del sistema, sino que también proporcionan un entorno excelente para la proliferación microbiana de otros microorganismos, incluidos los organismos patógenos. Por lo tanto, es importante que las biopelículas y otros procesos de ensuciamiento se reduzcan en la mayor medida posible para maximizar la eficiencia del proceso y minimizar los riesgos relacionados con la salud de dichos patógenos.

35 Varios factores contribuyen a la extensión de la contaminación biológica y rigen la respuesta apropiada. La temperatura del agua; el pH del agua; los nutrientes orgánicos e inorgánicos, las condiciones de crecimiento tales como las condiciones aeróbicas o anaeróbicas y, en algunos casos, la presencia o ausencia de luz solar, etc. pueden jugar un papel importante. Estos factores también ayudan a decidir qué tipos de microorganismos pueden estar presentes en el sistema acuoso y cuál es la mejor manera de controlar a esos microorganismos. La identificación adecuada del microorganismo también es crucial para responder adecuadamente. Las diferencias con respecto a si los microorganismos son plantas, animales u hongos, o si son planctónicos o sésiles, determinan cómo de efectivos serán los diversos biocontroles. Debido a que los diferentes microorganismos inducen problemas diferentes, una identificación adecuada es crucial para remediar adecuadamente los efectos microbianos no deseados. Finalmente, debido a que los problemas causados químicamente no se pueden remediar con biocidas, también es necesario identificar qué problemas tienen orígenes no biológicos.

45 Las técnicas estándar típicamente usadas para monitorear sistemas de proceso incluyen las técnicas de conteo de placa estándar. Estas técnicas requieren largos períodos de incubación y no proporcionan una información adecuada para el control proactivo y la prevención de problemas relacionados con el crecimiento microbiano. Más recientemente, se han utilizado las mediciones de trifosfato de adenosina (ATP) como un medio de control proactivo. Sin embargo, los reactivos son costosos y se toman pequeños volúmenes de grandes sistemas acuosos. Si bien es posible cuantificar la actividad microbiana en una muestra con el uso del ensayo de ATP, la reacción es incapaz de discriminar entre el ATP producido por un tipo de microorganismo en comparación con otro y no detecta organismos que sean viables pero inhibidos. Otra desventaja es que este método no puede usarse para determinar la contribución microbiana a los defectos de hoja porque la mayoría de los organismos no son viables después de la exposición al calor de la sección de secado. La recopilación de datos también es poco frecuente, lo que genera importantes lagunas en los datos. Por lo tanto, este enfoque proporciona una información limitada sobre el estado de los microorganismos en el sistema de interés. Además, estos enfoques se usan generalmente para controlar las bacterias planctónicas. Aunque en algunos casos, las superficies pueden ser limpiadas y analizadas para cuantificar las bacterias de la biopelícula, estos enfoques son muy tediosos y lentos.

Las sondas de oxígeno disuelto (OD) se han usado para medir la actividad microbiana en fluidos, ya que es bien sabido que la actividad microbiana y el metabolismo aeróbico conducen a una disminución en las concentraciones de oxígeno disuelto. Las patentes de Estados Unidos 5.190.728 y 5.282.537 describen un método y aparato para controlar el ensuciamiento en aguas comerciales que utilizan mediciones de OD. Sin embargo, el enfoque requiere el uso de adiciones de nutrientes para diferenciar las incrustaciones biológicas de las no biológicas y no se menciona cómo se refresca la sonda para las mediciones posteriores después de que la superficie de la sonda se haya ensuciado. Además, el enfoque descrito requiere de un medio de suministro continuo de oxígeno.

La sonda de OD electroquímica estándar de estilo Clark tiene muchas limitaciones, tales como: interferencias químicas (H<sub>2</sub>S, pH, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, SO<sub>4</sub>, Cl<sup>-</sup>, Cl<sub>2</sub>, ClO<sub>2</sub>, MeOH, EtOH y varias especies iónicas), calibración frecuente y reemplazo de membrana, respuesta lenta y desviaciones de lectura, choque térmico y requisitos de alto flujo a través de las membranas. Un nuevo tipo de sonda de oxígeno disuelto, comercializada recientemente por varias compañías (por ejemplo, HACH, Loveland, CO), supera casi todas estas limitaciones para que el OD pueda medirse en línea en aguas de proceso. Esta nueva sonda de OD (LOD) se basa en la disminución de la fluorescencia de por vida, donde la presencia de oxígeno acorta la vida de fluorescencia de un fluoróforo excitado. El fluoróforo se inmoviliza en una película en la superficie del sensor y se proporciona una excitación con un LED azul. Las patentes de los Estados Unidos 5.698.412 y 5.856.119 describen un método para monitorear y controlar la actividad biológica en fluidos en los que se mide la OD en combinación con pH y/o ORP (potencial de oxidación-reducción) para medir las transiciones en el comportamiento metabólico, específicamente relacionado con la reducción de nutrientes/sustrato.

Las técnicas convencionales de recubrimiento y los residuos oxidantes pueden indicar una dosificación adecuada de biocidas y el control del crecimiento microbiano, mientras que la deposición, los defectos y los cortes siguen siendo prevalentes. Existe una clara necesidad de proporcionar una información más precisa sobre el crecimiento microbiano y la formación de biopelículas en los sistemas industriales. Las técnicas de PCR cuantitativa permiten un análisis rápido de los defectos de hoja, filtros, muestras de agua de proceso, etc. para determinar la contribución de los microorganismos a los problemas de calidad. Se ha demostrado que este nuevo enfoque permite un diagnóstico más proactivo de los problemas que conducen a la mejora de la eficiencia de la máquina y la calidad del producto.

Por lo tanto, está claro que existe una clara utilidad en los nuevos métodos y composiciones para la identificación apropiada de microorganismos presentes en sistemas de procesos comerciales. La técnica descrita en esta sección no pretende constituir una admisión de que cualquier patente, publicación u otra información a la que se haga referencia en este documento sea "Técnica anterior" con respecto a esta invención, a menos que se designe específicamente como tal. Además, esta sección no debe interpretarse en el sentido de que se realizó una búsqueda o de que no existe otra información pertinente tal como se define en 37 CFR § 1.56 (a).

Además de la técnica anterior mencionada anteriormente, el documento WO 2013/112656 A1, que constituye la técnica anterior para la presente invención de acuerdo con el Artículo 54 (3) EPC, describe un método para identificar microorganismos específicos presentes en una porción particular de un proceso de fabricación de papel detectando y cuantificando muestras de ADN del proceso. Sin embargo, dicho documento no revela cómo implementar y optimizar una estrategia para remediar los efectos no deseados asociados con la presencia de microorganismos en el proceso.

Además, Piasecka et al. (A. Piasecka et al., "Analysis of the microbial community structure in a membrane bioreactor during initial stages of filtration", *Biofouling*, 28:2, 225-238, 2012) muestran el análisis de la estructura de la comunidad microbiana en un biorreactor de membrana durante las etapas iniciales de la filtración. Sin embargo, este documento no describe cómo implementar una estrategia para remediar los efectos negativos de la presencia de microorganismos en el reactor.

#### Breve resumen de la invención

La invención se refiere a un método para tratar una infestación de microorganismos en un sistema de proceso industrial según la reivindicación 1. Realizaciones preferidas de la invención se exponen en las reivindicaciones dependientes.

La primera y la segunda medición se pueden realizar mediante al menos un elemento seleccionado de la lista que consiste en análisis de ADN, análisis de PCR, análisis de qPCR y cualquier combinación de los mismos. La cantidad umbral puede ser 100 células por ml de fluido tomado del sistema o 100 células por gramo de un producto final del proceso industrial, u otras muestras sólidas tomadas del proceso que incluyen, pero no se limitan a, filtros.

Independientemente de la identidad de al menos un organismo, si sus concentraciones relativas aumentan con respecto a la medición anterior en una cantidad mayor que el umbral incluso si la población biológica global permanece igual, se puede agregar un tratamiento biocida al sistema.

El método puede comprender además el paso de correlacionar el cambio en el índice de diversidad con otro evento que ocurrió en el sistema industrial, el otro evento seleccionado de la lista que consiste en: cambiar la fuente de al menos un material de alimentación, cambiar el tipo de al menos un material de alimentación, cambiar la tasa de funcionamiento de al menos una porción del sistema, y cualquier combinación de los mismos, e invertir el evento. La

concentración global de células en la muestra puede permanecer sin cambios entre la primera y la segunda medida. Las mediciones pueden tomarse en una porción del sistema sobre la que se ha formado un depósito y el depósito no contiene ningún componente biológico significativo. Las mediciones se pueden tomar en una pluralidad de ubicaciones en todo el sistema y los índices comparan las poblaciones generales del sistema.

- 5 Al menos una tercera medición del índice de diversidad puede tomarse después de la segunda medición y después de la remediación y la eficacia de la remediación se evalúa mediante el cambio en las concentraciones relativas de al menos dos organismos, medidas en la tercera medición del índice de diversidad. La concentración global de células en la muestra puede permanecer inalterada entre la primera y la segunda medida, no se sabe que la identidad del primer y segundo organismo cause efectos no deseados en el equipo de proceso o el producto final, y se puede agregar un biocida eficaz al sistema para matar el primer y segundo organismo cuando se detecta un cambio de umbral. Uno de los organismos puede ser capaz de formar esporas que sean resistentes a los biocidas y, cuando la cantidad relativa de ese organismo crece por encima del umbral, el tratamiento puede dirigirse al área del proceso con células vegetativas para evitar la esporulación.

Breve descripción de los dibujos

- 15 A continuación se describe una descripción detallada de la invención, haciendo referencia específica a los dibujos en los que:

La Fig. 1 contiene tres gráficos que ilustran la aplicación de la invención para la detección rápida de bacterias totales (A), primarias (B) y adaptativas (C) formadoras de biopelículas en depósitos de la caja de entrada recogidos en un molino de hojas libres revestido.

- 20 La Fig. 2 ilustra un gráfico de la carga bacteriana total de defectos de hoja de un molino laminar libre revestido (1-5), un molino de tejido (6) y un molino laminar libre no recubierto (7) al que se aplicó la invención.

La Fig. 3 es un gráfico de la carga bacteriana total de muestras de defectos de hoja a las que se aplicó la invención.

La Fig. 4 ilustra gráficos circulares que indican la diversidad microbiana en muestras de ADN recogidas de fieltros de máquina de tres fábricas de papel diferentes.

- 25 Descripción detallada de la invención

Las siguientes definiciones se proporcionan para determinar cómo se deben interpretar los términos utilizados en esta aplicación y, en particular, cómo se deben realizar. La organización de las definiciones es solo por conveniencia y no tiene la intención de limitar ninguna de las definiciones a ninguna categoría en particular.

- 30 "Adaptador" significa un organismo que exhibe cierto nivel de tolerancia al programa de control biológico. Cuando la competencia microbiana del adaptador se ve reducida por un biocida, este organismo adaptativo puede florecer y formar una biopelícula.

"Biológico" significa una composición de materia en la que al menos el 10% de la composición (en volumen o masa) comprende células de un organismo.

- 35 "Defecto" significa un atributo no deseado de un elemento asociado con un proceso industrial. Incluye, pero no está limitado a, uno o más tapones en un fieltro, y tales atributos de hojas de papel como agujeros, decoloración, rayas, manchas, manchas translúcidas y cualquier combinación de los mismos.

- 40 "Fieltro" significa una correa hecha de lana entretejida o cualquier otra fibra utilizada en un proceso de fabricación de papel que funciona como un transportador de materiales en el que las fibras entretejidas definen una pluralidad de lúmenes a través de los cuales puede pasar agua u otros fluidos. Los fieltros también pueden proporcionar amortiguación entre los rodillos de presión y también pueden ser un medio utilizado para eliminar el agua de los materiales de fabricación de papel. Los fieltros incluyen, entre otros, fieltros inferiores, fieltros de la parte inferior de la tabla, fieltros húmedos de tejido cilíndrico, fieltros más secos, fieltros sinfín, fieltros de recolección, fieltros de succión, fieltros superiores Harper y fieltros superiores.

- 45 "Oportunista" significa un organismo que prospera al instalarse en biopelículas, costras, depósitos u otras colonias de organismos preestablecidas, y tiende a suplantar, desplazar o convivir junto con organismos pioneros y/u organismos oportunistas previos.

- 50 "Producto de papel o lámina de papel" significa cualquier producto final de estructura fibrosa formada de un proceso de fabricación de papel tradicionalmente, pero no necesariamente, que comprende fibras de celulosa. Los ejemplos de tales productos finales incluyen, pero no se limitan a, pañuelos faciales, pañuelos de baño, servilletas, papeles de copia, papeles de impresora, papeles para escribir, papeles para cuaderno, periódicos, cartón, papeles para carteles, papeles de cartulina, y similares.

"Proceso de fabricación de papel" significa uno o más procesos para convertir materias primas en productos de papel y que incluye pero no está limitado a uno o más de tales pasos como despulpado, digestión, refinación,

secado, calandrado, prensado, crespado, deshidratación y blanqueo.

"Análisis de PCR" significa análisis de reacción en cadena de la polimerasa.

"Pionero o primario" significa un organismo que se adhiere a una superficie o región limpia, iniciando así la formación de biopelículas, costras o depósitos en esa superficie.

5 "Tapón" significa un depósito de material sólido, semisólido, viscoso y/u otro colocado dentro de los lúmenes de un fieltro. Los tapones pueden inhibir el flujo de material a través de los lúmenes y/o pueden dañar cualquier otra funcionalidad del fieltro.

10 "Cebador" significa una composición de materia, típicamente una cadena corta de nucleótidos, que se sabe que es complementaria a secciones específicas de ADN y que sirve como punto de partida para la síntesis de una cadena de nucleótidos complementaria al ADN adyacente a la sección específica de ADN.

"Sonda" significa una composición de materia construida y dispuesta para unirse a una sección específica de ADN y que puede detectarse fácilmente cuando está unida y de ese modo usarse para indicar la presencia o ausencia de la sección específica de ADN.

"Análisis de qPCR" significa análisis cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa.

15 "Microorganismos" significa cualquier organismo lo suficientemente pequeño como para presentarse dentro, adyacente, encima o unido al equipo utilizado en un proceso industrial (incluida la fabricación de papel); incluye, pero no se limita a, aquellos organismos tan pequeños que no pueden ser vistos sin la ayuda de un microscopio, colecciones o colonias de organismos tan pequeños que se pueden ver a simple vista pero que comprenden una cantidad de organismos individuales que son demasiado pequeños para ser vistos a simple vista, así como uno o  
20 más organismos que se pueden ver a simple vista; incluye, pero no se limita a, cualquier organismo cuya presencia, de alguna manera, perjudique el proceso industrial, tal como formando tapones dentro de los fieltros y/o causando defectos dentro de las hojas de papel.

25 En el caso de que las definiciones anteriores o las descripciones expuestas en otras partes de esta solicitud no sean coherentes con el significado (explícito o implícito) que se usa comúnmente, en un diccionario, o indicado en una fuente incorporada como referencia en esta solicitud, se entiende que la solicitud y, en particular, los términos que se reivindican, se construyen de acuerdo con la definición o descripción de esta solicitud, y no de acuerdo con la definición común, las definiciones del diccionario o las definiciones que se incorporaron como referencia. A la luz de lo anterior, en el caso de que un término solo pueda ser entendido si es interpretado por un diccionario, si el término es definido por la Enciclopedia Kirk-Othmer de Tecnología Química, 5ª Edición, (2005), (Publicado por Wiley, John & Sons, Inc.) esta definición prevalecerá respecto a cómo se definirá el término en las reivindicaciones.  
30

Al menos una realización de la invención se refiere a un método para identificar una infestación microbiológica comparando el índice de diversidad actual de al menos una parte del sistema con un índice de referencia. Prácticamente ningún sistema de proceso comercial está 100% libre de organismos microbiológicos. Las instalaciones del sistema de proceso a menudo abarcan grandes volúmenes con muchas entradas a través de las  
35 cuales los organismos pueden ingresar y contener numerosos nichos diferentes para que colonicen, por lo que siempre tienen algún tipo de población biológica. Desde un punto de vista comercial, sin embargo, es preferible que un sistema esté poblado de organismos benignos que estar poblado de organismos nocivos, tales como los que perjudican el proceso, dañan el producto o representan un peligro para las personas. Como consecuencia, el uso de un índice de diversidad es un enfoque de diagnóstico útil que correlaciona los cambios en la población con los  
40 cambios de efectos benignos a efectos nocivos. Un método que identifique correctamente qué organismos están presentes y dónde están, puede ayudar a seleccionar el remedio adecuado y a desplegarlo en la ubicación óptima.

Un índice de diversidad es una instantánea de la diversidad biológica de los organismos presentes en un sistema de proceso comercial. Los índices de diversidad pueden ser de todo el sistema o pueden estar limitados a ciertas partes de un sistema de proceso. Por ejemplo, debido a que es el punto de convergencia de muchas entradas de fluidos  
45 ricos, la caja de entrada de un proceso de fabricación de papel a menudo está altamente poblada de microorganismos y se espera que tenga un índice de diversidad que varíe ampliamente con el tiempo. En contraste, el agua dulce tratada que se usa en el proceso de fabricación de papel está casi libre de organismos, por lo que un cambio en la diversidad y la abundancia de algunos organismos a una serie de bacterias indicaría un problema. Como consecuencia, a veces al observar el índice de diversidad de una sección en particular proporciona  
50 información que el índice de diversidad de todo el sistema no proporciona. La observación de los tipos de cambios en la diversidad y dónde se ubican, influye en dónde deberían ubicarse los puntos de alimentación del biocida y cómo debe abordarse la población.

En al menos una realización, el índice de diversidad se usa para evitar de manera preventiva un efecto microbiológico nocivo antes de que ocurra. Debido a que hay tantos tipos diferentes de organismos que corresponden a problemas específicos en sistemas de procesos comerciales específicos, a veces es eficiente  
55 enfocarse en la presencia o ausencia o la proporción relativa de organismos específicos dirigidos. Por ejemplo, algunos organismos son pioneros y otros son formadores de biopelículas adaptativos. Un pionero crea un biopelícula

o depósito de la costra donde antes no existía ninguno, mientras que un formador de biopelícula adaptativo exhibe resistencia a un programa de tratamiento. Si la revisión del índice de diversidad muestra primero que la película o costra predominantemente comprendía un organismo y luego su composición cambia a un organismo diferente, esto podría indicar la transición de un pionero a un adaptador oportunista y el régimen de biocida puede modificarse para abordar de manera apropiada esta situación. De forma similar, si un formador de película primario tiende a introducirse al sistema desde un mecanismo y el adaptador desde otro mecanismo entonces la identificación adecuada de qué tipo de organismo está presente ayuda a identificar las fuentes del vector de la contaminación microbiana.

En al menos una realización, el análisis de diversidad puede usarse para abordar la revisión del control de calidad de los productos finales. Por ejemplo, algunos organismos, tales como algunos hongos, no causan un deterioro significativo del proceso en sí, pero forman masas que tienden a incrustarse en los productos finales o en los componentes de las máquinas y causar defectos no deseados, una menor deshidratación del fieltro y una menor eficiencia mecánica. Un aumento en la concentración de hongos en el índice de diversidad sugeriría especialmente que es apropiado un escrutinio minucioso del producto final para determinar los defectos.

En al menos una realización, la naturaleza del cambio en el índice no es tan significativa como la velocidad del cambio en la diversidad. Por ejemplo, si un índice de diversidad dado a lo largo del tiempo tiende a mostrar una diversidad de población relativamente estática pero que cambia repentinamente, esto indica que algo significativo ha cambiado en el sistema. Esto podría significar que una entrada de material puede estar produciendo un defecto que estimula el cambio de población, o que una pieza del equipo puede haberse dañado o funciona incorrectamente, lo que genera nuevos nichos para diferentes organismos. Como consecuencia, el análisis del índice de diversidad puede usarse para detectar problemas no biológicos en los sistemas de proceso.

En al menos una realización, el cambio en el índice de diversidad puede usarse para detectar un problema que se avecina antes de que éste realmente se manifieste. Como se mencionó anteriormente, un cambio en el índice de diversidad puede indicar un material defectuoso o un equipo dañado o que no funciona bien. A veces el cambio en la diversidad puede detectarse antes de que ocurran otros efectos no deseados (tales como la pérdida de eficiencia operativa o productos finales defectuosos) y la identificación de la causa del cambio en la diversidad puede descartar un problema potencial antes de que sus efectos se manifiesten de manera significativa o costosa. De manera similar, un cambio en la diversidad puede indicar que se producirá un depósito de costra o una biopelícula u otro problema inducido por el organismo, pero el índice permite eliminar el microorganismo problemático antes de que cause los problemas asociados. A veces, el cambio rápido indica que una especie benigna que anteriormente bloqueaba los esfuerzos de colonización de un organismo nocivo ya no es potente y el organismo nocivo ahora es libre de colonizar ese nicho.

En al menos una realización, el análisis del índice de diversidad se produce en una situación en la que el recuento total de células dentro de la región analizada permanece inalterado pero la composición de los microorganismos cambia. En al menos una realización, el cambio en la diversidad corresponde a una situación en la que el recuento total de células aumenta o disminuye.

En al menos una realización, una o más porciones de un sistema de proceso se muestrean regularmente para determinar su índice de diversidad. Las muestras pueden indexarse en el tiempo y pueden correlacionarse con otros eventos en la instalación, tales como la activación, desactivación, estado de funcionamiento, tasa de producción y/o temperatura de ciertos equipos y/o el uso de diferentes materiales, aditivos o productos químicos. Esto permite el uso de la diversidad biológica como otro medio de control de calidad en la instalación. Un cambio significativo en la diversidad que corresponde a algún otro evento indica que el otro evento puede tener algún impacto positivo o negativo inesperado en el proceso.

En al menos una realización, se sabe que se producen algunos efectos inducidos por microorganismos después de que haya transcurrido una cantidad específica de tiempo desde el momento de la contaminación. Como consecuencia, se puede usar un cambio en el índice de diversidad para determinar cuánto tiempo lleva al organismo causar los problemas asociados. Este método se puede usar como un diagnóstico (para averiguar cómo funciona el organismo) así como una herramienta de optimización de costos. La optimización de costos se puede lograr recibiendo una advertencia anticipada del cambio de diversidad de que un problema ocurrirá dentro de un marco de tiempo dado usando la advertencia avanzada para comprar o usar una solución en un momento en que tiene un costo menor o mayor disponibilidad de la que tendría si fuera comprado como una respuesta repentina a una emergencia inesperada.

En al menos una realización, el índice de diversidad puede usarse para detectar organismos formadores de esporas. Cuando estos organismos están en forma de esporas, tienen poca o ninguna actividad metabólica y son altamente resistentes a los biocidas. Se necesita una gran cantidad de biocida para controlar los organismos una vez que se encuentran en estado de esporas y la probabilidad de que las esporas lleguen al producto final se vuelve muy alta. Es probable que no se cumplan las normas de envasado de lácteos y líquidos en una situación en la que haya esporas. En contraste, cuando estos organismos se encuentran en estado vegetativo, son susceptibles a los biocidas y son mucho más fáciles de controlar. La detección de organismos formadores de esporas mediante el método del índice de diversidad cambia el enfoque del programa de control biológico con la prevención de la

formación de esporas.

En al menos una realización, los resultados del análisis del índice de diversidad se usan para aumentar el programa de control biológico determinando cuánto, qué tipo y con qué frecuencia, una o más composiciones biocidas se agregan a una o más ubicaciones dentro de un sistema de proceso comercial. En al menos una realización, cualquiera y todas las realizaciones anteriores y siguientes se aplican a un sistema comercial tal como un sistema industrial que incluye, pero no se limita a, un sistema de agua de proceso, proceso de fabricación de papel, proceso de fabricación de pulpa, proceso de procesamiento de alimentos, proceso de refinado químico, proceso de procesamiento de la madera, proceso de filtración de agua, proceso de purificación de agua, proceso de síntesis química, procesos de recubrimiento, procesos que utilizan la química orgánica y cualquier combinación de los mismos. En al menos una realización, el índice de diversidad se usa para evaluar microorganismos problemáticos encontrados en depósitos de máquinas, defectos de hojas, productos terminados, fieltros, etc. El método se basa en el análisis de los ácidos nucleicos en los extractos de las muestras.

En al menos una realización, la identificación de los constituyentes del índice de diversidad se logra mediante un análisis basado en el ADN que implica el uso de cebadores de PCR para detectar la presencia, ausencia y cantidad de microorganismos. La patente de Estados Unidos 5.928.875 describe el uso de cebadores de PCR para detectar la presencia o ausencia de bacterias que forman esporas. En al menos una realización, el cebador está dirigido hacia una parte de una cadena de ADN que es altamente conservadora entre un grupo de organismos. Como consecuencia, la detección de la presencia de esa parte particular del ADN es una prueba definitiva de que existe la presencia de un organismo específico. El análisis por PCR es de particular uso en el análisis de fieltros y hojas de papel debido a la dificultad de identificar correctamente sus microorganismos contaminantes porque carecen de organismos viables para los métodos de recubrimiento tradicionales o mediciones de ATP.

En al menos una realización, el análisis de la PCR implica la utilización de uno o más de los métodos descritos en el artículo "Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase", de Randall Saiki et al., Science, Volumen 239, págs. 487-491 (1988). En al menos una realización, el análisis de la PCR implica la utilización de uno o más de los métodos descritos en el artículo "Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction", de Kary Mullis et al., Methods In Enzymology, Volumen 155, págs. 335-350 (1987).

En al menos una realización, el análisis de la PCR es un análisis de qPCR como se describe en la guía del Folleto Comercial de la qPCR, prologado por Jo Vandesomepele (descargado del sitio web <http://www.eurogentec.com/file-browser.html> el 19 de enero de 2012). En al menos una realización, el método es un análisis qPCR cuantitativo. En al menos una realización, el método es un análisis qPCR cualitativo.

En al menos una realización, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método para reconocer las secuencias de ácido nucleico (ADN o ARN) y aumentar el número de copias de la secuencia diana para obtener cantidades útiles de ácido nucleico para el análisis descendente. Este método se puede aplicar a la detección de microorganismos en una variedad de muestras que incluyen, pero no se limitan a, fieltros de máquina, defectos de hojas, depósitos de máquinas, etc.

En al menos una realización, una vez que se extrae el ADN de la muestra, usando cualquiera de los kits de extracción de ADN disponibles comercialmente, se puede realizar el análisis en tiempo real usando un enfoque PCR, tal como un enfoque de PCR cuantitativa. La PCR cuantitativa utiliza la misma metodología que la PCR, pero incluye un componente cuantitativo en tiempo real. En esta técnica, se usan cebadores para reconocer a una secuencia de ADN de interés basada en la identidad del organismo o la función de un gen específico. Se puede usar alguna forma de detección, tal como la fluorescencia, para detectar el ADN o "amplicón de ADN" resultante. El cambio en la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN objetivo. El número de ciclos requeridos para alcanzar el umbral de fluorescencia predeterminado se compara con un estándar que corresponde al objetivo del ADN específico. Un estándar es típicamente el gen objetivo que es puro y de cantidad conocida a concentraciones que abarcan varios logaritmos. El número de copias del ADN objetivo presente en la muestra se calcula utilizando la curva estándar. El número de copias por muestra se usa entonces para determinar el número de células por muestra.

En al menos una realización, se usa un conjunto de cebadores que reconoce secuencias de ADN de bacterias usando un enfoque conservador para cuantificar las bacterias totales. En al menos una realización, se usa un conjunto de cebadores que reconoce bacterias primarias formadoras de biopelículas, que incluyen, pero no se limitan a, *Meiothermus*, *Pseudoxanthomonas* y *Deinococcus*. En al menos una realización, se usa un conjunto de cebadores para reconocer a un formador de biopelícula adaptativo que pertenece a la familia de bacterias *Sphingomonadacea*. En al menos una realización, el formador de biopelículas adaptativo exhibe una mayor tolerancia a los programas de control biológico basados en oxidantes en comparación con otros microorganismos de biopelículas y planctónicos. En al menos una realización, el cebador se usa para distinguir entre infestaciones fúngicas y bacterianas.

En al menos una realización, el método implica distinguir entre ADN a nivel del dominio biológico. En al menos una realización, el método implica distinguir entre ADN de bacterias, arqueas y eucariotas. Estos organismos tienen ADN

muy diferente y un protocolo que se enfoque en identificar al ADN del organismo a nivel de dominio es mucho más simple que otras determinaciones más específicas. Debido a que con los filtros, los organismos de diferentes dominios a menudo se tratan mejor de forma diferente, una forma de identificación tan simple se puede utilizar para identificar con precisión el régimen específico mejor dirigido al contaminante en particular. En al menos una realización, la prueba utilizada es tal que no distinguiría entre organismos del mismo dominio o entre diferentes tipos de bacterias, o entre diferentes tipos de arqueas, o entre diferentes tipos de eucariotas.

En al menos una realización, se usa más de un cebador para identificar organismos que tienen más de una secuencia de nucleótidos única y reconocible. En al menos una realización, el análisis de PCR se usa para detectar secuencias de genoma asociadas con enzimas únicas o casi únicas para organismos específicos.

En al menos una realización, el método implica detectar un defecto y luego utilizar el análisis de PCR para analizar adecuadamente el índice de diversidad del defecto. En al menos una realización, el método determina si el defecto está totalmente basado en fuentes biológicas, totalmente en fuentes químicas no biológicas, o es el resultado de una combinación de fuentes biológicas no químicas, mecánicas y biológicas. En al menos una realización, el defecto es uno o más tapones en un filtro. En al menos una realización, el defecto es una hoja de papel que tiene al menos uno o más de: un agujero, un agujero con un halo descolorido alrededor de al menos una porción de él, una mancha de decoloración, una mancha, una mancha translúcida y cualquier combinación de los mismos.

En al menos una realización, un nivel de umbral es una metodología utilizada para descontar falsos positivos. A veces, el análisis PCR detecta trazas de organismos que, si bien están presentes, no son la causa de algún defecto en particular. En al menos una realización, el método implica descontar la presencia de cualquier organismo detectado a una concentración inferior a un nivel predeterminado conocido para uno o más organismos particulares. En al menos una realización, el método implica descontar la presencia de cualquier organismo detectado a un nivel inferior a  $10^4$  células por gramo (del defecto). En al menos una realización, el método implica descontar la presencia de cualquier organismo detectado a un nivel inferior a  $10^4$  células por ml.

En al menos una realización, el método es capaz de detectar microorganismos que de otro modo no serían detectados por los métodos de la técnica anterior. Por ejemplo, en casos donde el ensucio está causado por una infestación de organismos anaeróbicos o reductores de sulfato, métodos tales como la detección de ATP no identificarían correctamente la fuente de contaminación como biológica ya que la cantidad de ATP producido por un microorganismo en condiciones anaeróbicas es significativamente menor que bajo condiciones aeróbicas. Por lo tanto, la fuente de contaminación se identificará incorrectamente y se usará un enfoque químico y no biológico para tratar de resolver el problema. En otro ejemplo, la diferenciación de microbios de la contaminación química en filtros usando enfoques tradicionales tales como el revestimiento, la detección de ATP, etc. es virtualmente imposible debido al hecho de que estas muestras se secan durante el transporte y todos los organismos viables mueren. Utilizar el enfoque de ADN siempre indicaría correctamente una infestación biológica porque toda forma de vida contiene ADN.

El índice de diversidad puede usar PCR tal como, pero sin limitación, qPCR para la detección de organismos totales tales como bacterias; Especies de Sphingomonas; Especies de Erythrobacter; Especies de Pseudomonas; Especies de Burkholderia; Especies de Haliscomenobacter; Especies de Saprospira; Especies de Schlegelella; Especies de Leptothrix; Sphaerotilus natans; Especies de Bacillus; Especies de Anoxybacillus; miembros del filo Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides; bacterias verdes no sulfuradas, incluidas Herpetosiphon, miembros del filo Deinococcus-Thermus, incluidas las especies de Meiothermus; bacterias productoras de catalasa, bacterias productoras de amilasa, bacterias productoras de ureasa, bacterias nitrificantes, hongos, etc. Estas técnicas utilizan cebadores y pares de patrones que permiten la detección y cuantificación de organismos diana basándose en secuencias conservadas. Los cebadores reconocen regiones en el genoma microbiano que están altamente conservadas a través de la evolución, mientras que los cebadores para filos o géneros específicos reconocen regiones más variables del genoma.

Ser capaz de cuantificar con precisión un organismo de interés presente en una muestra permite expresar ese organismo como un porcentaje de la carga bacteriana total en la muestra. El índice de diversidad también se puede expresar cuantitativamente como la abundancia relativa de varios organismos diana. El índice de diversidad para cualquier parte de un proceso puede medirse en momentos en que las máquinas o los procesos funcionan bien, creando así una línea de base. El índice de diversidad medido en momentos de un mal rendimiento de la máquina o del proceso se puede comparar entonces con la línea base para detectar fluctuaciones en las poblaciones microbianas y determinar qué grupos bacterianos son responsables de los problemas en el proceso. El índice de diversidad también se puede cuantificar para facilitar la comparación utilizando el cálculo del índice de diversidad de Shannon para comparar datos de monitoreo entre ubicaciones de muestra o en relación con una línea base. Las estrategias de tratamiento y los puntos de alimentación se pueden modificar en consecuencia para combatir el problema.

Un índice de diversidad basado en la cuantificación del ADN mide la presencia y diversidad de organismos en un proceso, independientemente de su viabilidad. El ácido ribonucleico (ARN), específicamente el ARN mensajero (ARNm), es una molécula producida solo por organismos vivos, y tiene propiedades tales que, dependiendo del objetivo, son exclusivas de un filo específico o género de bacterias. Al amplificar secuencias de ARNm que son

exclusivas de los organismos enumerados anteriormente, es posible determinar qué bacterias están presentes en su forma viable. La detección precisa de organismos viables se puede utilizar entonces como una herramienta para evaluar la eficacia de las estrategias de tratamiento de las aguas de proceso. Esto se puede lograr mediante la comparación del índice de diversidad con el índice de viabilidad.

- 5 Este método cuantificará la cantidad y el tipo de bacterias viables presentes en las muestras de proceso. El método de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (en tiempo real) se puede aplicar para detectar ácidos nucleicos ribosómicos mensajeros (ARNm). El ARNm es un ADN transcrito que se envía al ribosoma para servir como modelo para la síntesis de proteínas en un proceso conocido como traducción. El ARNm es producido solo por células vivas. El ARN de las células vivas se puede aislar con el uso de kits disponibles comercialmente. La detección de ARNm requiere un paso adicional en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. La transcriptasa inversa se agrega al cóctel de reacción para transcribir el ARNm en su ADN complementario (ADNc). Se requieren dos conjuntos de cebadores para este experimento. El primero reconoce al ARNm específico, mientras que el segundo se usa para amplificar el ADNc resultante producido por la reacción de la transcriptasa inversa.

### Ejemplos

- 15 Lo anterior se puede entender mejor mediante la referencia a los siguientes ejemplos, que se presentan con fines ilustrativos y que no pretenden limitar el alcance de la invención.

#### Ejemplo N° 1

20 Un molino de papel cuché experimentó una deposición persistente en una de las cajas de la máquina, que se creía que era la causa de defectos en el producto final. La caja misma sufría de una acumulación de depósitos químicos y crecimientos fibrosos. El análisis microscópico y químico mostró poca o ninguna presencia bacteriana dentro de la acumulación. Se suponía que los microorganismos eran la causa subyacente del problema. Sin embargo, las técnicas de monitorización tradicionales (por ejemplo, el recuento de placas estándar y los niveles de ATP) utilizadas para analizar las muestras de procesos no indicaban niveles elevados de actividad microbiana. Específicamente, los resultados indicaron no más de 100 CFU/ml y no más de 100 RLU (ATP).

25 Las muestras de depósito de la caja de entrada se analizaron en el transcurso de varios meses utilizando técnicas de qPCR para desarrollar un índice de diversidad. Los resultados iniciales de qPCR del análisis de los depósitos de la caja de entrada mostraron altos niveles de carga microbiana, así como densidades elevadas de formadores de biopelícula adaptables y pioneros (Figura 1). La estrategia de tratamiento fue aumentada con la adición de biocidas tanto para el despulpador como para el silo quebrado. La velocidad de alimentación del programa de biocontrol basado en oxidantes también se incrementó. El análisis de los depósitos recogidos un mes más tarde detectó pocos cambios en la carga bacteriana total de los depósitos de la caja de entrada (Figura 1A). El número de formadores de biopelícula pioneros disminuyó en una unidad logarítmica, mientras que la densidad de los formadores de biopelículas adaptativas disminuyó cuatro unidades logarítmicas (Figura 1B y 1C). La cantidad de depósitos en la caja de entrada y la frecuencia de los defectos en las hojas continuaron sin cambios. El revestimiento tradicional y el análisis de ATP del sistema de agua de proceso y de almacenamiento indicaron poca actividad biológica. Los valores de ATP y de recuento de placas promediaron menos de 100 RLU y 100 unidades formadoras de colonias por gramo (CFU/g), respectivamente.

40 La estrategia de tratamiento se optimizó aún más mediante la adición de cloro no estabilizado y biocidas al silo y al despulpador. Después de la implementación del último conjunto de cambios, se recolectaron y analizaron más muestras. La carga bacteriana total del depósito mostró una disminución de casi una unidad logarítmica (Figura 1A). El conjunto final de muestras de depósito mostró una disminución de casi dos unidades logarítmicas en la densidad de los formadores de biopelícula primarios (Figura 1B). Los formadores de biopelícula adaptivos se mantuvieron en niveles casi de fondo (Figura 1C). De nuevo, a pesar del control mejorado de la población microbiana, la frecuencia de defectos, la naturaleza de los defectos y la deposición de la caja de entrada permanecieron sin cambios.

45 Los defectos de las hojas de este molino se analizaron usando el mismo enfoque basado en qPCR. Es imposible determinar el contenido bacteriano en los defectos utilizando los métodos tradicionales de recubrimiento y ATP porque muchas de las bacterias que pudieron haber estado presentes en el defecto son eliminadas por las altas temperaturas de la sección de secado. El análisis químico no proporciona una respuesta definitiva sobre las bacterias presentes en las hojas ya que depende de la tinción con ninhidrina. Este enfoque es inespecífico y es propenso a resultados falsos positivos y falsos negativos. El análisis de ADN de los agujeros y los defectos de las hojas de este molino detectó una densidad bacteriana muy baja (Figura 2, Muestras 1-5). No se detectaron formadores de biopelícula primarios y adaptativos en los defectos de las hojas analizados de este molino. Por lo tanto, el flujo bacteriano probablemente no estaba contribuyendo a los defectos y problemas de calidad en este molino. En comparación, un molino que sufría una deposición biológica significativa tenía defectos que contenían una carga microbiana mucho más alta (Figura 2, Muestra 6). Además, se identificaron especies bacterianas similares en los depósitos y defectos. La tinción con ninhidrina de estos defectos dio como resultado una reacción positiva que indicaba la presencia de microorganismos. En otro caso, se detectaron bacterias en defectos de hojas en niveles justo por encima de la densidad mínima requerida para ser considerado un defecto biológico. Sin embargo, la reacción de ninhidrina fue negativa, lo que indicaba que el defecto no contenía microorganismos (Figura

2, Muestra 7). El examen qPCR cuantitativo de los depósitos de la caja de entrada demostró reducciones en los formadores de biopelícula primarios y adaptativos después de cada modificación a la estrategia de tratamiento. El hecho de que hubo una disminución drástica en estos organismos objetivo y de que no hubo ninguna disminución en la cantidad de deposición o frecuencia de defectos, indica que es probable que las bacterias no sean responsables de los problemas defectuosos en este sistema de máquina. Los formadores de biopelículas primarios colonizan las superficies de las máquinas y crean un ambiente favorable para la unión y proliferación de otros tipos de organismos. Sin la presencia de estos organismos, las bacterias pueden unirse a las superficies de la máquina después de la deposición de desechos químicos que pueden servir como un buen medio de crecimiento. Es probable que los aditivos químicos y la fibra se estén depositando dentro de la caja de entrada, lo que da como resultado un microambiente adecuado para la colonización microbiana. Dado que el análisis de los defectos de las hojas reveló una presencia microbiana escasa, se descartaron los microorganismos como la principal fuente de deposición en la caja de entrada y los efectos adversos sobre la calidad del producto. Los esfuerzos para mejorar el rendimiento de la máquina se centraron lejos del control biológico y hacia un mejor control mecánico del sistema, lo que permitió mejorar las condiciones operativas y la calidad del producto.

#### 15 Ejemplo 2

Un molino de papel cuché utilizó un programa competitivo de biocontrol basado en oxidantes durante varios años. El control del crecimiento microbiano se percibió como adecuado; sin embargo, hubo una oportunidad de reducir aún más los cortes de hoja para mejorar la eficiencia del proceso. El programa fue implementado y optimizado en varias fases. La densidad bacteriana durante todo el proceso se mantuvo baja y se documentó una reducción en los cortes de la hoja. El número promedio de cortes por día disminuyó de un promedio de 1,2 cortes por día a 0,42 cortes por día.

Aproximadamente dos años después de la implementación del programa optimizado, se observó que las condiciones del proceso se habían vuelto más variables y que se requerían concentraciones crecientes de productos de control biológico para mantener el mismo nivel de control. Una estudio del sistema utilizando herramientas de monitoreo tradicionales tales como recuentos de placas y mediciones de ATP, indicó que la densidad bacteriana en el sistema de agua de proceso se mantuvo baja y no se observó ningún aumento o solo un aumento pequeño en la caja de entrada y en el sistema de rotura. Sin embargo, el molino sufría un severo brote de agujeros y defectos. Si bien las técnicas de monitoreo tradicionales no indicaban cambios en el rendimiento del programa de control biológico, el monitor de la actividad en línea detectó un aumento de la actividad microbiana (Figura 3).

Un análisis del índice de diversidad que utiliza el análisis de qPCR de los depósitos de la máquina y los defectos de las hojas confirmó la presencia de formadores de biopelícula pioneros y adaptativos. La densidad de las bacterias totales en los defectos fue de aproximadamente  $1,8 \times 10^7$  células por gramo (Figura 3). Esta evidencia indica el papel de los microorganismos en los problemas de defectos y calidad. La máquina se sometió a una purga cáustica después de lo cual, el monitor de la actividad en línea demostró una reducción en la actividad microbiana y un valor de ORP más estable que indicaba un mejor rendimiento y resistencia del programa. La cantidad de microorganismos en los defectos de las hojas disminuyó de  $10^7$  a  $10^5$  células/g después de la purga (Figura 3). Esto confirma que la qPCR puede detectar la contribución microbiana a los defectos de las hojas que no pueden detectarse utilizando técnicas tradicionales. Además, la qPCR se puede usar para evaluar la eficacia del programa de control biológico en el producto final.

#### 40 Ejemplo 3

Se analizaron muestras de fieltro de dos molinos de papel que estaban experimentando problemas de rendimiento, que se manifestaron como depósitos en la máquina y defectos de las hojas, utilizando qPCR. Cada muestra se analizó para determinar la presencia de microorganismos. Una vez que se determinó que cada muestra contenía grandes cantidades de bacterias, las muestras se analizaron entonces para determinar la presencia de formadores de biopelículas adaptativos y primarios, que incluían Sphingomonadaceae fm., Meiothermus, Geothermus y Pseudoxanthomonas que se sabe que contribuyen a los problemas con la eficiencia de la máquina y la calidad del producto. Ambos molinos contenían niveles normales de formadores de biopelículas adaptativos, sin embargo, el molino 1 tenía el doble de formadores primarios de biopelícula que el molino 2 (Figura 4). Se determinó que el nivel de formadores de biopelícula adaptativos era normal, ya que sus niveles estaban en el intervalo que indicaba que probablemente no contribuían al problema. El índice de diversidad mostró que el nivel de los formadores de biopelículas pioneros en el molino 2 estaba en un nivel cercano al de fondo. Los altos niveles de formadores de biopelículas pioneros en el molino 2 sugirieron la formación de biopelícula en fieltros, lo que condujo a una obstrucción del fieltro y a una menor eliminación del agua de la lámina. La presencia de biopelícula en los fieltros puede conducir a una mayor deposición de otra materia que luego puede depositarse en la lámina. Niveles elevados de formadores de biopelículas pioneros en el molino 1 sugirieron que se necesitaban análisis adicionales de otras partes del proceso como el agua de ducha, aditivos, arquetas de almacenamiento, etc. para determinar de dónde provenían estos organismos.

El resultado de estos ejemplos demuestra que las técnicas de electrodeposición convencionales y los residuos oxidantes pueden indicar una dosificación adecuada de biocidas y el control del crecimiento microbiano, mientras que la deposición, los defectos y las roturas siguen siendo prevalentes. La utilización de un índice de diversidad que

comprende los métodos de PCR y qPCR proporciona una información más precisa sobre el crecimiento microbiano y la formación de biopelículas en sistemas de aguas industriales. Estas estrategias permiten un análisis rápido de la contribución de los microorganismos a la formación de depósitos y pueden utilizarse para determinar rápidamente si los depósitos que contienen microorganismos contribuyen a los defectos.

- 5 Un índice de diversidad basado en qPCR permite un análisis rápido de los defectos de las hojas para determinar la contribución de los microorganismos a los problemas de calidad. Se ha demostrado que este nuevo enfoque permite un diagnóstico más proactivo de los problemas que conducen a la mejora de la eficiencia de la máquina y la calidad del producto.

- 10 Se entiende que todos los intervalos y parámetros descritos en este documento abarcan cualquiera y todos los subintervalos subsumidos en el mismo, y cada número entre los puntos finales. Por ejemplo, se debe considerar que un intervalo establecido de "1 a 10" incluye cualquiera y todos los subintervalos entre (y que incluyen) el valor mínimo de 1 y el valor máximo de 10; es decir, todos los subintervalos que comienzan con un valor mínimo de 1 o más, (por ejemplo, de 1 a 6,1) y que finalizan con un valor máximo de 10 o menos (p.ej. de 2,3 a 9,4, de 3 a 8, de 4 a 7), y finalmente a cada número 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 contenido dentro del intervalo. (por ejemplo 2,3 a 9,4, 3 a 8, 4 a 7), y finalmente a cada número 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 contenido dentro del intervalo.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para tratar una infestación de microorganismos en un sistema de proceso industrial, comprendiendo el método los pasos de:
- 5 tomar al menos una primera medición que identifica la concentración relativa de dos o más organismos presentes en al menos una porción del sistema de proceso industrial,
- tomar al menos una segunda medición que identifica la concentración relativa de dos o más organismos presentes en al menos una porción del sistema de proceso industrial, definiendo las identificaciones al menos parcialmente un índice de diversidad subsecuente, la al menos una segunda medición tomada más tarde que la(s) primera(s) medida(s),
- 10 observar cualquier cambio relativo en la concentración de los dos organismos,
- si el cambio relativo en la concentración de uno de los organismos medidos excede una cantidad umbral predeterminada, determinar si el cambio está asociado con un efecto no deseado en el sistema de proceso industrial, e
- implementar un remedio para remediar el efecto no deseado,
- 15 comprendiendo el método además el paso de identificar si uno de los organismos es pionero frente a un adaptador o un oportunista, si uno es un pionero y su concentración aumenta más que el umbral en el siguiente índice, el remedio incluye la aplicación de un régimen biocida dirigido al pionero, si no se detectan pioneros el remedio incluye la identificación y eliminación de un vector no biológico que facilita el asentamiento de los microorganismos.
- 20 2. El método de la reivindicación 1 en el que la primera y la segunda medición se realizan mediante al menos un elemento seleccionado de la lista que consiste en análisis de ADN, análisis de PCR, análisis de qPCR y cualquier combinación de los mismos.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la cantidad umbral es de  $10^4$  células por ml de fluido tomado del sistema o de  $10^4$  células por gramo de un producto final del proceso industrial o de una muestra sólida de los procesos industriales.
- 25 4. El método de la reivindicación 1 que comprende además el paso de correlacionar el cambio en el índice de diversidad con otro evento que ocurrió en el sistema industrial, consistiendo el otro evento seleccionado de la lista en: cambiar la fuente de al menos un material de alimentación, cambiar el tipo de al menos un material de alimentación, cambiar la tasa de funcionamiento de al menos una parte del sistema, y cualquier combinación de los mismos, e invertir el evento.
- 30 5. El método de la reivindicación 1, en el que la concentración global de células en la muestra permanece sin cambios entre la primera y la segunda medidas.
6. El método de la reivindicación 1 en el que las mediciones se toman en una parte del sistema sobre la que se ha formado un depósito y el depósito no contiene ningún componente biológico significativo.
- 35 7. El método de la reivindicación 1, en el que las mediciones se toman en una pluralidad de ubicaciones en todo el sistema y los índices comparan las poblaciones globales del sistema.
8. El método de la reivindicación 1, en el que al menos una tercera medición del índice de diversidad se toma después de la segunda medición y después del remedio y la eficacia del remedio se evalúa mediante el cambio en las concentraciones relativas de al menos dos organismos como se mide en la tercera medición del índice de diversidad.
- 40

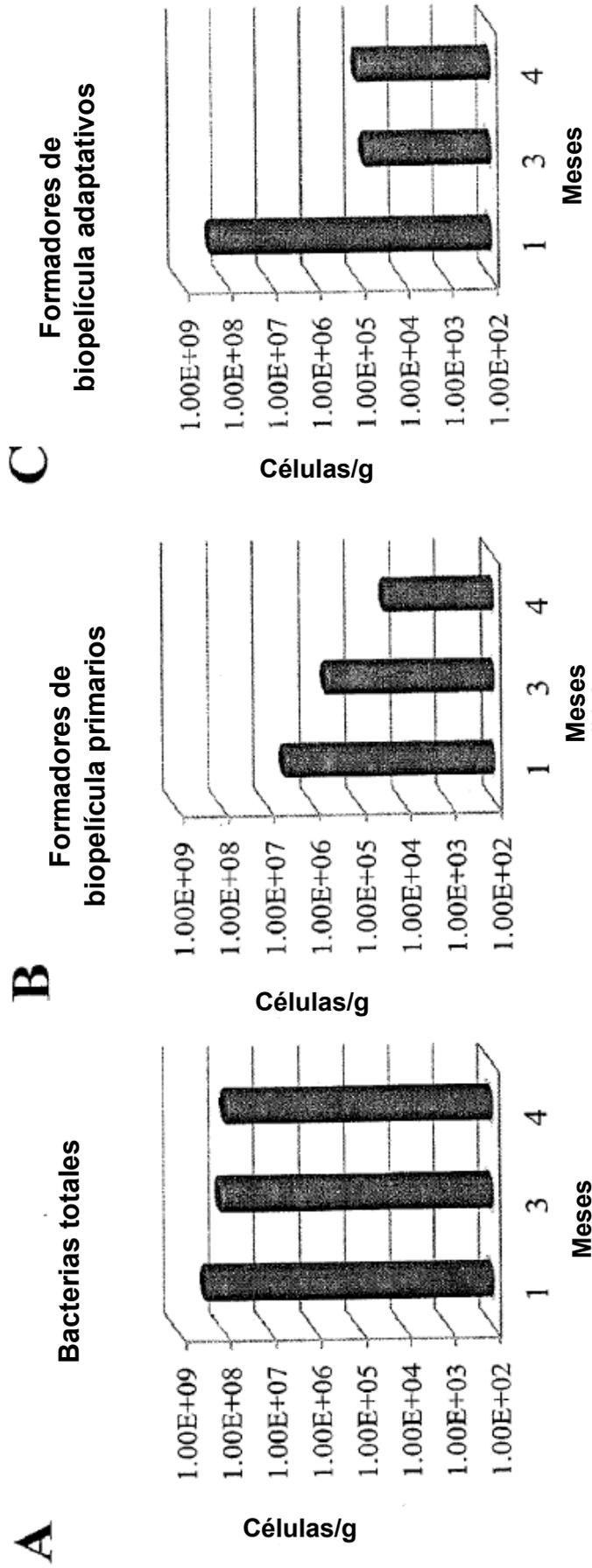
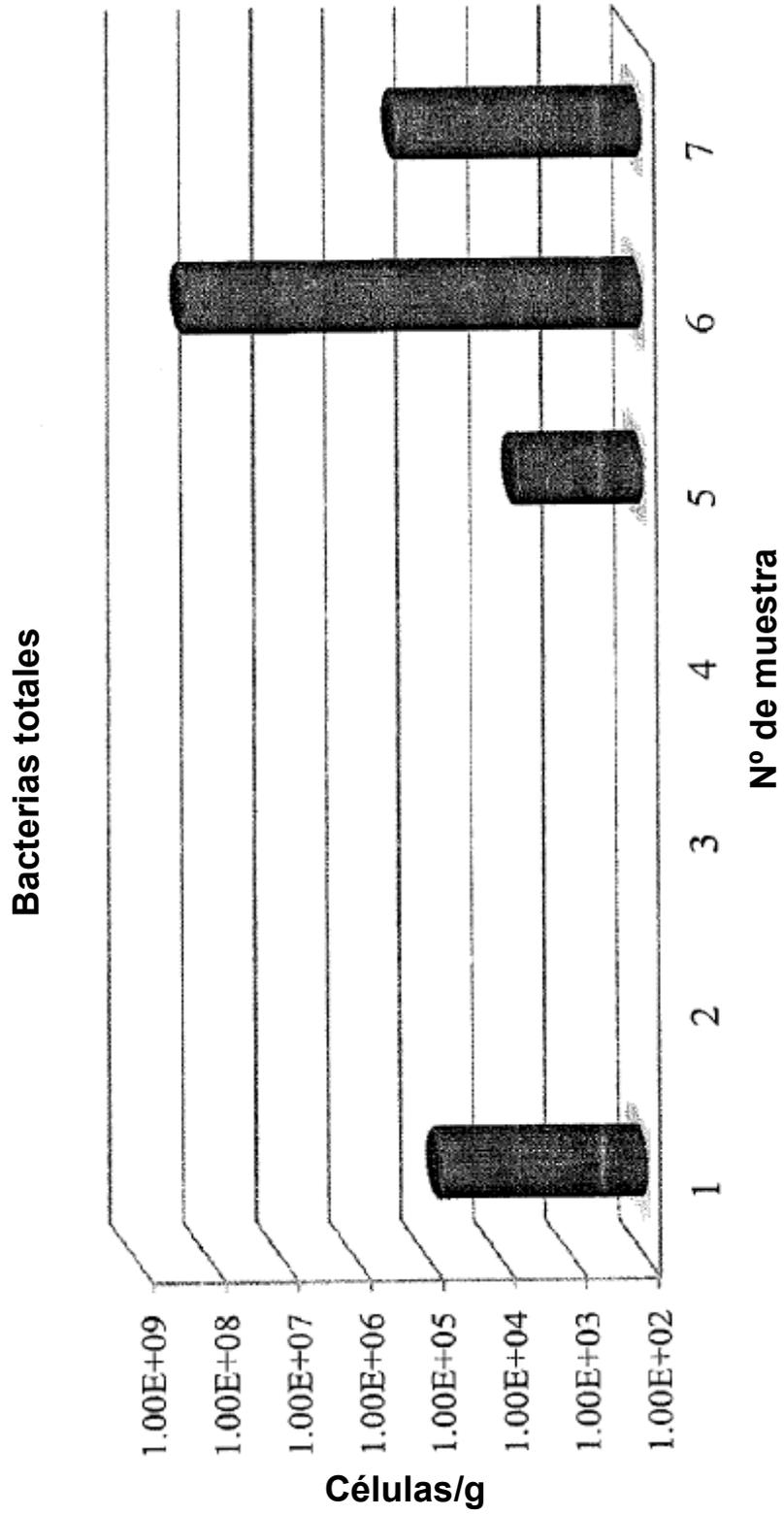
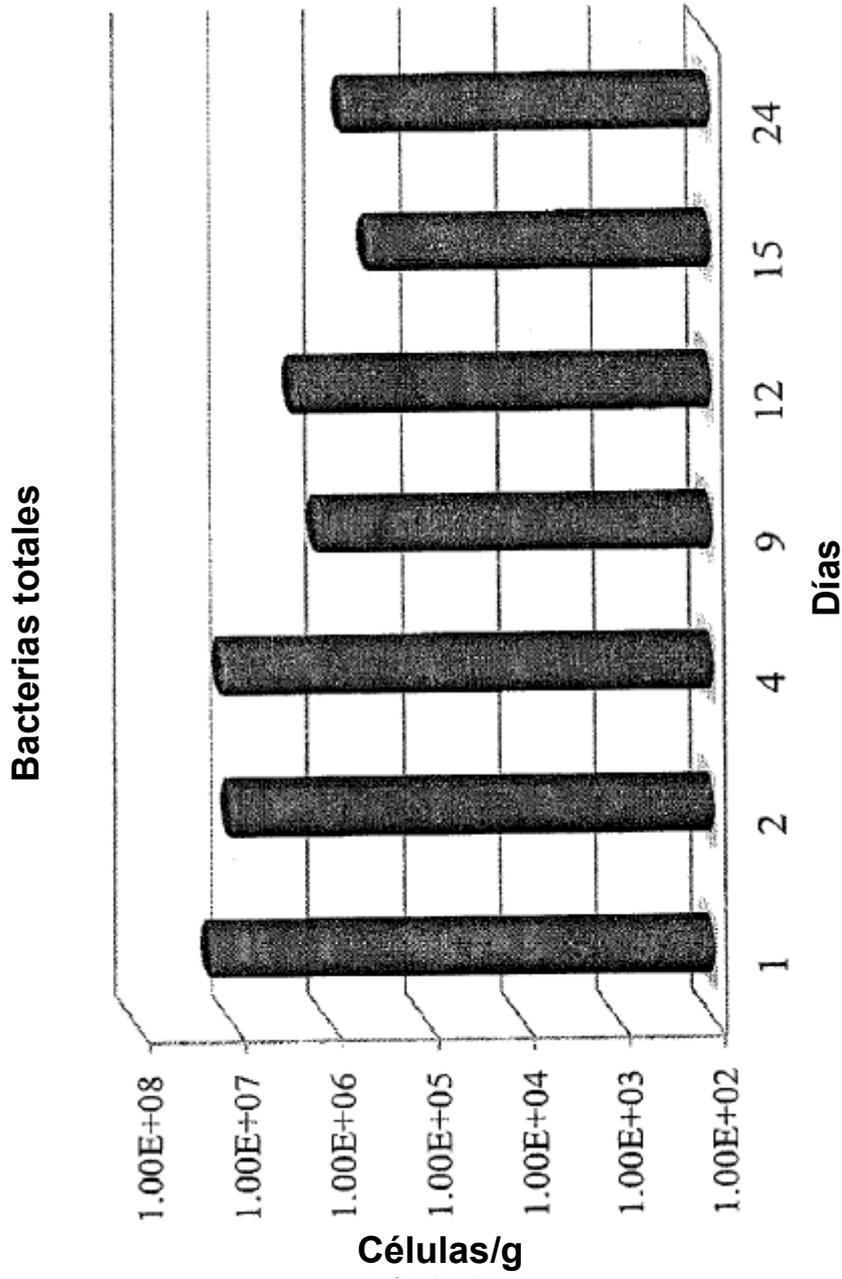


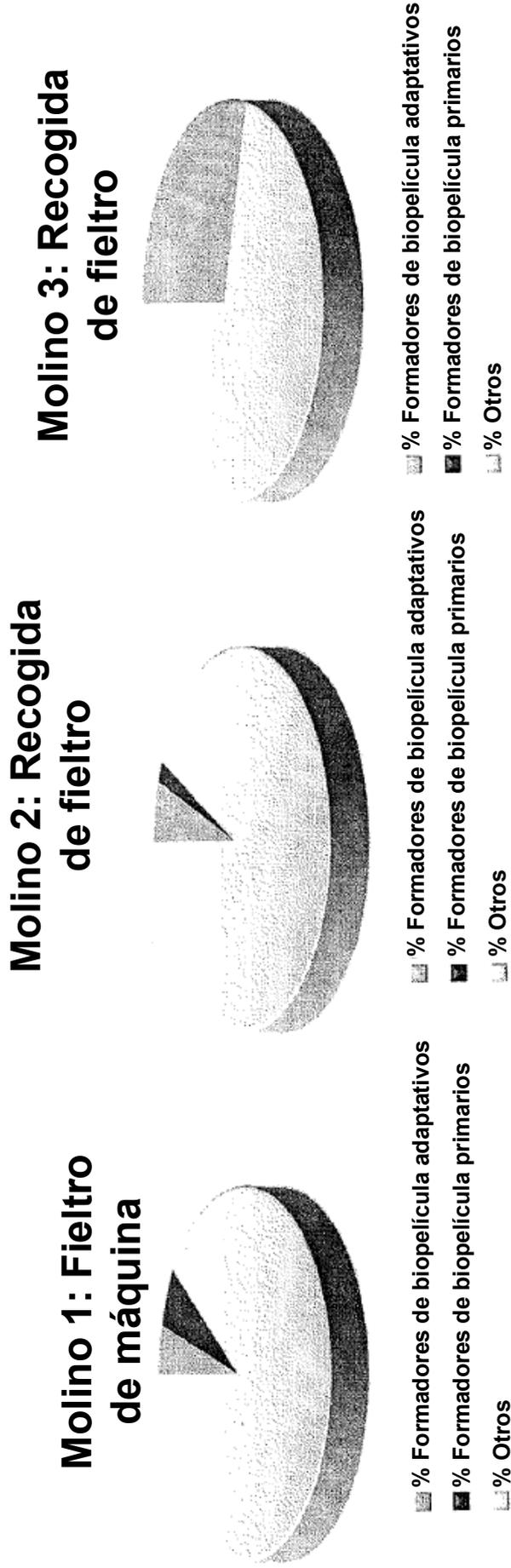
FIGURA 1



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**