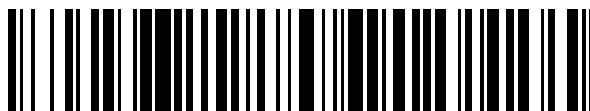


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 881**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/68 (2008.01)
C12N 15/11 (2006.01)
D21H 17/00 (2006.01)
D21H 21/04 (2006.01)
C12Q 1/689 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.01.2013 PCT/US2013/022845**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13112656**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2013 E 13741346 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2807268**

54 Título: **Detección y cuantificación de ácidos nucleicos para valorar la biomasa microbiana en los defectos del papel y en los fieltros de máquina**

30 Prioridad:

24.01.2012 US 201213374949

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

08.05.2019

73 Titular/es:

**NALCO COMPANY (100.0%)
1601 West Diehl Road
Naperville, IL 60563-1198, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 711 881 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

Detección y cuantificación de ácidos nucleicos para valorar la biomasa microbiana en los defectos del papel y en los fieltros de máquina

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere en términos generales a composiciones de materia, aparatos y métodos útiles para detectar e identificar microorganismos que causan o están presentes en los fieltros de máquina y en los defectos del papel.

Tal y como se describe, por ejemplo, en las patentes de los EE. UU. n.ºs 7,306,702 y 5,928,875, el papel se produce de una manera continua a partir de una suspensión fibrosa (pasta de pulpa) que suele estar hecha de agua y fibras de celulosa. Un procedimiento de fabricación de papel típico consiste en 3 etapas: formación, prensado y secado. En la etapa de formación, la pasta de pulpa diluida se dirige sobre una tela o entre 2 telas. La mayoría del agua se drena desde la pasta de pulpa, a través de la tela, lo que crea una banda de papel húmedo. En la etapa de prensado, la banda de papel entra en contacto con uno o por lo general más fieltros de máquina porosos que se utilizan para extraer la mayor parte del agua que queda en la banda. A menudo, el fieltro de captación es el primer fieltro con el que entra en contacto la banda de papel húmedo, que se utiliza para retirar de la tela la banda de papel, a través de un rodillo de captación por succión colocado por detrás del fieltro y, a continuación, se transporta la banda de papel al resto de la sección de prensado. A continuación, la banda de papel se suele hacer pasar a través de una o varias prensas, cada una de las cuales consiste en rodillos de prensa rotatorios y/o artículos estacionarios, tales como zapatas de prensa que están colocadas muy cerca unas de otras, con lo que forman lo que se suele denominar una línea de contacto de la prensa. En cada línea de contacto, la banda de papel entra en contacto con uno cualquiera o los dos fieltros de máquina, en donde se hace salir el agua de la banda de papel y entrar en el fieltro de la prensa mediante presión y/o vacío. En las líneas de contacto de la prensa con un solo fieltro, la banda de papel está en contacto con el rodillo de la prensa por un lado y con el fieltro por el otro. En las líneas de contacto de la prensa con doble fieltro, la banda de papel pasa entre los dos fieltros. Después de la sección de prensado, la banda de papel se seca para retirar el agua que le queda, normalmente por ondulaciones a través de una serie de tambores se secado calentados con vapor.

Los fieltros de máquina a menudo consisten en un tejido de lana o nilón que suele estar hecho de 1 a 4 capas individuales de filamentos dispuestos en un patrón de ligamento. Una malla o membrana polimérica extrudida también se puede incluir entre las una o varias capas de tejido de base. Las fibras para guata, con un diámetro más pequeño que los filamentos del tejido de base, están prendidas en la base a ambos lados, lo que da al fieltro una apariencia gruesa similar a una manta. Los fieltros de máquina están diseñados para incorporar con rapidez el agua desde la banda de papel en la línea de contacto y quedarse con el agua, de tal modo que no se reabsorba de vuelta hacia la hoja a medida que el papel y el fieltro salen de la línea de contacto de la prensa. Los fieltros de máquina suelen ser un cinturón que pasa por un bucle sin fin que circula continuamente entre las etapas de contacto de la hoja y las etapas de regreso. El agua empujada hacia el fieltro desde la banda de papel en la línea de contacto se suele retirar del fieltro con vacío durante la etapa de regreso del fieltro en lo que se denomina con frecuencia la caja Uhle.

Los sistemas de fabricación de papel utilizan varios materiales brutos que introducen microorganismos en el sistema de la máquina. Esto incluye fibras de madera virgen, fibra reciclada, agua dulce, almidón, colorantes y otros aditivos químicos. Los microorganismos proliferan en muchos o todos los entornos calientes ricos en nutrientes que se encuentran presentes dentro de los sistemas de fabricación de papel y dan lugar a diversas comunidades microbianas. El control inadecuado del crecimiento microbiano permite la formación de depósitos en la superficie que luego se desprenden, lo que conduce al taponamiento de filtros o de boquillas y a defectos (p. ej., manchas u orificios) o roturas en la hoja. Los microorganismos también pueden proliferar en los fieltros y en los tejidos de la máquina, lo que impacta negativamente en la retirada del agua y la eficacia de funcionamiento o de la máquina.

El crecimiento microbiano en los sistemas de fabricación de papel puede ser realmente perjudicial y costoso. El crecimiento de microorganismos en las superficies del equipo puede conducir a la formación de depósitos que se desprenden y contribuyen a los defectos de la hoja y a orificios. La contaminación de los tratamientos con aguas del rociador o del agua de tratamiento puede conducir al crecimiento de microbios en los fieltros, lo que suele dar lugar a la formación de tapones en los fieltros. A su vez, estos tapones provocan una serie de problemas, sobre todo una peor retirada del agua desde la banda de papel. El resultado final es que el crecimiento microbiano puede dar lugar a que sean necesarias demasiadas y costosas repeticiones de hervidos y limpiezas de los fieltros u otro equipo de fabricación de papel. Estos problemas pueden agravarse cuando se produce una determinación incorrecta de los microorganismos ya que esto puede dar lugar a un tratamiento que degrade adicionalmente la calidad del papel, que repercuta adicionalmente en el equipo del procedimiento, y/o que pueda incluso no controlar la infección microbiana subyacente. Además, la distinción incorrecta entre los problemas de origen biológico y los problemas de origen mecánico o químico puede dar lugar además a que se le dediquen unos recursos inadecuados, inútiles y posiblemente contraproducentes.

Se conocen una serie de métodos de la técnica anterior para identificar qué microorganismos están presentes en un sistema de fabricación de papel. Sin embargo, estos métodos son particularmente deficientes cuando se aplican a

hojas de papel o fieltros. Algunos de los métodos de la técnica anterior, tales como las patentes de los EE. UU. n.ºs 8,012,758, 7,981,679 y 7,949,432 detectan diferentes efectos en los líquidos del sistema de fabricación de papel producidos por los organismos microbiológicos vivos. Otros métodos, tales como la patente de los EE. UU. n.º 5,281,537, se basan en la obtención de una muestra del microorganismo vivo contaminante y hacerlo crecer más para realizar diferentes análisis. En el contexto de las hojas de papel y los fieltros, sin embargo, estos métodos son particularmente inadecuados puesto que, cuando se recogen las muestras de fieltro o de papel, ya no contienen suficientes (o ninguno) organismos vivos para cultivar, ni ninguno de los productos químicos que generan. De igual forma, en los artículos del sistema de fabricación de papel (tales como las hojas de papel y los fieltros) que actúan después de las secciones de calentamiento o de secado ya se habrán destruido todos los microorganismos causantes de los defectos una vez que ya han provocado los defectos. Los métodos alternativos que no se basan en la presencia de organismos vivos también tienden a ser deficientes porque producen positivos falsos. Por ejemplo, la ninhidrina (que se utiliza para detectar aminas primarias o secundarias) y la espectroscopia de RI a menudo producen positivos o negativos falsos porque detectan materiales que pueden tener orígenes no biológicos (tales como aditivos químicos o contaminación).

Así pues, está claro que tendrán una clara utilidad los métodos y composiciones nuevos para la identificación adecuada de los microorganismos presentes en los fieltros de máquina y en las hojas de papel.

Breve compendio de la invención

La invención se refiere a un método de identificación de una infección por microorganismos en el procedimiento de fabricación de papel de acuerdo con la reivindicación 1.

El artículo puede ser un fieltro. El defecto puede ser uno o varios tapones en el fieltro. El artículo puede ser una hoja de papel producida por el procedimiento de fabricación de papel y el defecto puede ser uno o varios orificios, discromía, rayas, manchas, manchas traslúcidas y cualquier combinación de los mismos sobre la hoja de papel. El método puede además comprender la etapa de registrar el organismo identificado en un formato que se pueda almacenar y/o transmitir. El método puede además comprender la etapa de llevar a cabo un programa biocida asociado a la remediación del microorganismo identificado. El análisis por PCR puede ser un análisis de qPCR. El umbral del análisis por PCR puede ser de 10^4 células por mililitro o de 10^4 células por gramo. El artículo puede estar tan desecado que en el artículo no haya organismos vivos de los que pudieron haber provocado el defecto.

Las condiciones del artículo pueden diferir tantísimo de los líquidos que el artículo encuentra durante el procedimiento de fabricación de papel, que los microorganismos que pueblan los artículos difieren de los encontrados en los líquidos, y la determinación de los pobladores de los líquidos producirá una identificación incorrecta de los microorganismos que provocan el defecto sobre el artículo. El método puede además comprender la etapa de aplicar suficientes clases de cebadores a las muestras del artículo, de tal manera que se puede determinar la presencia de cualquier organismo por encima del umbral. El método puede además comprender la etapa de identificar si el defecto no tiene origen biológico basándose en si el análisis por PCR no indica que ningún organismo supera el umbral. El método puede además comprender la etapa de aplicar un remedio para la contaminación química no biológica al procedimiento de fabricación de papel. El análisis por PCR puede determinar la cantidad de organismos que infectan la muestra. El artículo puede haber pasado a través de una sección de calor o secado del procedimiento de fabricación de papel antes de detectar el defecto y, por lo tanto, los microorganismos que provocan el efecto podrían haber sido destruidos.

Breve descripción de las figuras

A continuación, se describe una descripción detallada de la invención con referencia específica a las figuras en las que:

La figura 1 contiene tres gráficos que ilustran los resultados de las muestras a las que se les aplicó la invención.

En la figura 2 se ilustra un gráfico de la carga bacteriana total de las muestras a las que se les aplicó la invención.

En la figura 3 hay un gráfico de la carga bacteriana total de las muestras a las que se les aplicó la invención.

En la figura 4 se ilustra un diagrama circular que representa la variación de la diversidad microbiana en las muestras de ADN recogidas de los fieltros de máquina de dos fábricas de papel diferentes.

Descripción detallada de la invención

Las siguientes definiciones se dan a conocer para determinar cómo se han de interpretar los términos utilizados en esta solicitud y, en particular, las reivindicaciones. La organización de las definiciones es solo por comodidad y no se pretende que limite ninguna de las definiciones a ninguna categoría en concreto.

«Defecto» significa un atributo indeseado de un artículo que está asociado a un procedimiento de fabricación de papel. Incluye, pero sin limitarse a ellos, uno o varios tapones en un fieltro, y atributos de la hoja de papel tales como orificios, discromía, rayas, manchas, manchas traslúcidas y cualquier combinación de los mismos.

«Fieltro» significa una cinta hecha de lana entrelazada, o cualquier otra fibra utilizada en un procedimiento de

fabricación de papel, que funciona como un transportador de materiales, en donde las fibras entrelazadas definen numerosas luces a través de las cuales pueden pasar el agua u otros líquidos. Los fieltros también pueden proporcionar la amortiguación entre los rodillos de prensa y puede ser también un medio utilizado para retirar agua de los materiales de fabricación de papel. Los fieltros incluyen, pero sin limitarse a ellos, fieltros de la parte inferior, fieltros del tablero inferior, fieltros húmedos de tejido cilíndricos, fieltros de secado, fieltros sin fin, fieltros de captación, fieltros de captación por succión, fieltros Harper de la parte superior y fieltros de la parte superior.

«Papel producido u hoja de papel» significa cualquier producto final con estructura fibrosa formado de un procedimiento de fabricación de papel que comprende tradicionalmente, pero no necesariamente, fibras de celulosa. Los ejemplos de tales productos finales incluyen, pero sin limitarse a ellos, toallitas faciales, papel de baño, servilletas de papel, papel de imprenta, papel para impresora, papel para escribir, papel de libreta, papel de periódico, cartón, papel para carteles, papel para títulos, cartulina y similares.

«Procedimiento de fabricación de papel» significa uno o varios procedimientos para convertir materiales brutos en productos de papel y que incluye, pero sin limitación, una o varias de etapas, tales como conversión en pulpa, digestión, refinado, secado, calandrado, prensado, crespado, extracción de agua y blanqueo.

«Análisis por PCR» significa el análisis mediante una reacción en cadena de la polimerasa.

«Tapón» significa un depósito de material sólido, semisólido, viscoso y/o de otro tipo colocado dentro de la luz de un fieltro. Los tapones pueden inhibir el flujo de material a través de las luces y/o pueden deteriorar cualquier otra funcionalidad de un fieltro.

«Cebador» significa una composición de materia, típicamente una hebra corta de nucleótidos, que se sabe que es complementaria a segmentos específicos de ADN y sirven como punto de partida para la síntesis de una cadena nucleotídica complementaria al ADN adyacente al segmento específico de ADN.

«Sonda» significa una composición de materia construida y dispuesta para fijarse a un segmento deseado de ADN y que se puede detectar con facilidad cuando está fijado así y, gracias a ello, se utiliza para indicar la presencia o ausencia del segmento de ADN deseado.

«Análisis por qPCR» significa el análisis cuantitativo y/o cualitativo mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

«Microorganismos» significa cualquier organismo lo suficientemente pequeño para insinuarse por sí mismo dentro, adyacente a, en la parte superior de, o unido a, un equipo utilizado en un procedimiento de fabricación de papel, incluye, pero sin limitación, los organismos tan pequeños que no se pueden ver sin la ayuda de un microscopio, colecciones o colonias de tales organismos pequeños que se pueden ver a simple vista, pero que comprenden una serie de organismos individuales que son demasiado pequeños para observarse a simple vista, así como uno o varios organismos que se pueden observar a simple vista, incluye, pero sin limitarse a ellos, cualquier organismo cuya presencia, de algún modo, deteriora el procedimiento de fabricación de papel, tal como la formación de tapones dentro de los fieltros y/o la provocación de defectos dentro de las hojas de papel.

En el caso de que las definiciones anteriores o una descripción mencionada en cualquier lugar en esta solicitud sea incoherente con un significado (explícito o implícito) que se utiliza corrientemente o en un diccionario, se entiende en concreto que la solicitud y los términos de las reivindicaciones se han de interpretar de acuerdo con la definición o la descripción en esta solicitud, y no de acuerdo con la definición habitual o la definición del diccionario. En vista de lo anterior, en el caso de que un término sólo se pueda entender si se interpreta mediante un diccionario, si el término se define mediante la *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 5.^a edición, (2005) (publicada por Wiley, John & Sons, Inc.), esta definición deberá controlar cómo se define el término en las reivindicaciones.

Se da a conocer un método muy sensible y rápido de detección de los microorganismos localizados en hojas de papel y fieltros de máquina. El método incluye el análisis del ADN presente en los extractos de las muestras. Las muestras por sí mismas son fragmentos de un fieltro o de una hoja de papel. Estas mismas muestras están muy desecadas y contienen poca o ninguna muestra con vida de los microorganismos contaminantes. Algunos métodos de la técnica anterior del uso del análisis del ADN incluyen la solicitud de patente internacional WO 2004/042082 que describe un método *in situ* que utiliza sondas para determinar la presencia o la ausencia de un microorganismo. Sin embargo, los métodos *in situ* no son aplicables a las hojas de papel ni a los fieltros, ya que están secos cuando se toman las muestras. De igual forma, el método *in situ* implica la aplicación de las sondas durante la división celular de los microorganismos, lo que no es posible en las hojas de papel o en los fieltros con pocos o ningún organismo vivo en ellos. El análisis basado en el ADN puede implicar el uso de sondas.

El análisis del ADN implica el uso de cebadores de PCR para detectar la presencia o la ausencia de microorganismos. En la patente de los EE. UU. n.º 5,928,875 se describe el uso de cebadores de PCR para detectar la presencia o la ausencia de bacterias formadoras de esporas. El cebador puede dirigirse selectivamente hacia una parte de una hebra de ADN que está muy conservada entre un grupo de microorganismos. Como resultado, la detección de la presencia de esa parte concreta del ADN es la prueba definitiva de la presencia de un organismo específico. El análisis por PCR encuentra un uso particular 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 siembra en placa

tradicionales o para las mediciones de ATP.

El análisis por PCR puede implicar 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). El análisis por PCR puede implicar la utilización de uno o varios 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). El análisis por PCR puede ser un análisis por qPCR tal y como se describe en el folleto comercial *qPCR guide*, con prólogo de Jo Vandesompele (descargable de la página en internet <http://www.eurogentec.com/file-browser.html> el 19 de enero de 2012). El método puede ser un análisis cuantitativo por qPCR. El método puede ser un análisis cualitativo por qPCR.

Tal y como se ilustra en la figura 1, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método que actúa selectivamente sobre secuencias de ácido nucleico (ADN o ARN) e incrementa el número de copias de la secuencia destinataria para obtener cantidades útiles de ácido nucleico para los posteriores análisis. Este método se puede aplicar a la detección de microorganismos en una serie de muestras que incluyen, pero sin limitación, fieltros de máquina, defectos de la hoja, depósitos en la máquina, etc.

Tal y como se ilustra, una vez que se extrae el ADN de la muestra, con el uso de cualquiera de los kits de extracción de ADN disponibles en el mercado, se puede analizar en tiempo real con el uso del método de PCR, tal como el método de la PCR cuantitativa. La PCR cuantitativa utiliza la misma metodología que la PCR, pero incluye un componente cuantitativo en tiempo real. En esta técnica, los cebadores se utilizan para actuar selectivamente sobre una secuencia de ADN de interés basándose en la identidad del organismo o en la función de un gen específico. Para detectar el ADN resultante o el 'amplicón de ADN' se puede utilizar alguna forma de detección, tal como la fluorescencia. El cambio de la fluorescencia es directamente proporcional al cambio de cantidad del ADN destinatario. El número de ciclos necesarios para alcanzar el umbral de fluorescencia predeterminado se compara con un estándar que corresponde a la diana específica del ADN. Un estándar es típicamente el gen diana que está puro y en una cantidad conocida a concentraciones que abarcan varios logaritmos. El número de copias del ADN diana presente en la muestra se calcula con el uso de la curva estándar. El número de copias por muestra se utiliza a continuación para determinar el número de células por muestra.

Se puede utilizar un conjunto de cebadores que actúa selectivamente sobre las secuencias de ADN de bacterias con el uso de un método conservativo para cuantificar las bacterias totales. Se puede utilizar un conjunto de cebadores que actúa de manera selectiva y sobre todo sobre las bacterias formadoras de biopelícula, entre ellas *Meiothermus*, *Pseudoxanthomonas* y *Deinococcus*. Se puede utilizar un conjunto de cebadores para actuar selectivamente sobre una bacteria formadora de biopelícula adaptativa que pertenece a la familia de bacterias *Sphingomonadacea*. La bacteria formadora de biopelícula adaptativa puede mostrar mayor tolerancia a los programas de control biológico basados en oxidantes en comparación con otros microorganismos de biopelículas y planctónicos. El cebador se puede utilizar para diferenciar entre las infecciones fúngicas y las bacterianas.

Los fieltros de máquina entran y salen con frecuencia de los chorros del rociador y de las arquetas de líquido que contienen diferentes microorganismos de los cuales se pueden obtener con facilidad las muestras vivas. Sin embargo, el estado dinámico del fieltro (que cambia rápidamente de las condiciones húmedas a las secas, que pasa con rapidez por el aire y por los líquidos, y el sustrato blando que se dobla, flexiona y enrolla) a menudo significa que la población de microorganismos que habitan el fieltro diferirá de la que está presente dentro de los chorros del rociador y de las arquetas de líquido con los que entra en contacto. Como resultado, un análisis típico de los chorros del rociador y de las arquetas de líquido no identificará correctamente qué microorganismos están presentes dentro del fieltro. Un análisis por PCR de una muestra de fieltro que tiene en cuenta las clases de microorganismos que se sabe que son capaces de poblar los fieltros tiene en cuenta, no obstante, un análisis realmente exacto de las contaminaciones de los fieltros.

El análisis basado en el ADN de la muestra puede implicar que se pase por alto la posible presencia de microorganismos que se sabe que no pueblan los fieltros de máquina ni las hojas de papel del producto final. El método puede implicar la limitación de los cebadores utilizados a los asociados a los microorganismos que se sabe que pueblan los fieltros de máquina y/o las hojas de papel del producto final.

El método puede implicar la distinción entre los ADN a nivel de reino biológico. La vida biológica se puede clasificar de acuerdo con cinco reinos: monera, protista, vegetal, animal y de los hongos. Estos organismos tienen un ADN enormemente diferente, y un protocolo que se centre en la identificación del ADN del organismo a nivel de reino es inmensamente más simple que las determinaciones más específicas. Debido a los fieltros, los microorganismos de los diferentes reinos a menudo se tratan mejor de maneras diferentes, tal forma simple de identificación se puede utilizar para identificar de manera exacta el tratamiento específico que se dirigirá selectivamente mejor sobre el contaminante en concreto.

Se puede utilizar más de un cebador para identificar organismos que tienen más de una secuencia de nucleótidos reconocible y única. El análisis por PCR se puede utilizar para detectar secuencias de genomas asociadas a enzimas únicas o casi únicas de determinados organismos.

El método puede implicar la detección de un defecto y a continuación utilizar el análisis por PCR para asociarlo adecuadamente con el origen del defecto. El método puede determinar si el defecto tiene una base totalmente biológica, una base totalmente química no biológica, o es el resultado de una combinación de fuentes con una base química no biológica, mecánica y biológica.

- 5 El defecto puede ser uno o más tapones en un filtro. El defecto puede ser una hoja de papel que tiene al menos uno o varios de: un orificio, un orificio con un halo de otro color en torno al menos a una porción de él, una raya de otro color, una macha, una mancha translúcida y cualquier combinación de los mismos.

- 10 Un nivel umbral se puede utilizar desde el punto de vista metodológico para descontar los positivos falsos. Algunas veces, el análisis por PCR detecta trazas de organismos que, aunque estén presentes, no ocasionan ningún defecto en concreto. El método puede implicar el descuento de la presencia de cualquier organismo detectado a una concentración inferior que el nivel predeterminado conocido por uno o varios organismos en particular. El método puede implicar el descuento de la presencia de cualquier organismo detectado a un nivel por debajo de 10^4 células por gramo (del defecto). El método puede implicar el descuento de la presencia de cualquier organismo detectado a un nivel por debajo de 10^4 células por mililitro.

- 15 Los resultados del análisis se pueden utilizar para aumentar el programa de control biológico mediante la determinación de cuánto, qué clase y con qué frecuencia una o más composiciones biocidas se añaden a una o varias posiciones dentro de un sistema de fabricación de papel.

- 20 El método es capaz de detectar microorganismos que, si no, no se detectarían mediante los métodos de la técnica anterior. Por ejemplo, en los casos en los que el atorante tiene su origen en una infección de microorganismos anaerobios o reductores de sulfato, los métodos tales como la detección de potencial de oxidorreducción no identificarían correctamente la fuente del atorante como biológica y, por lo tanto, se sugeriría incorrectamente la aplicación de un método químico y no uno antibiológico. Sin embargo, la utilización del método del ADN indicaría correctamente siempre que la infección es biológica porque toda la vida contiene ADN.

- 25 El método se puede utilizar para valorar la diversidad microbiana. Esto puede incluir los microorganismos problemáticos que se hallan en los depósitos de la máquina, defectos de la hoja, productos acabados, filtros, etc. El método se basa en el análisis de ácidos nucleicos en los extractos de las muestras. Más específicamente, utiliza la PCR, tal como entre otras la qPCR, para la detección de organismos totales, tales como bacterias; especies de *Sphingomonas*; especies de *Erythrobacter*; especies de *Pseudomonas*; especies de *Burkholderia*, especies de *Halscomenobacter*; especies de *Saprosira*; especies de *Schlegelella*; especies de *Leptothrix*; *Sphaerotilus natans*;
30 especies de *Bacillus*; especies de *Anoxybacillus*; miembros del filo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*; bacterias verdes que no son del azufre, entre ellas *Herpetosiphon*, miembros del filo *Deinococcus-Thermus*, que incluye las especies de *Meiothermus*; bacterias productoras de catalasa, bacterias productoras de amilasa, bacterias productoras de ureasa, hongos, etc. Estas técnicas utilizan cebadores y parejas estándares que permiten detectar y cuantificar los microorganismos deseados basándose en las secuencias conservadas. Los cebadores se dirigen selectivamente a
35 las regiones del genoma microbiano que están muy conservadas a lo largo de la evolución, mientras que los cebadores específicos del filo o del género se dirigen selectivamente a las regiones más variables del genoma.

- La capacidad de cuantificar con exactitud un organismo de interés presente en una muestra hace que se pueda expresar ese organismo como un porcentaje de la carga bacteriana total en la muestra. Dado el gran número de organismos que se pueden detectar, se puede determinar una fotografía de la diversidad de la población microbiana en la muestra (figura 1). Esta fotografía se denomina el índice de diversidad. El índice de diversidad también se puede expresar cuantitativamente como la abundancia relativa de varios microorganismos deseados. El índice de diversidad para cualquier parte de un procedimiento se puede medir en los momentos en los que las máquinas o los procedimientos están funcionando bien, lo que crea una línea basal. El índice de diversidad medido en los momentos de un mal funcionamiento de la máquina o del procedimiento se puede comparar, entonces, con el nivel basal para
45 buscar fluctuaciones en las poblaciones microbianas y determinar qué grupos de bacterias son responsables de los problemas del procedimiento. El índice de diversidad también se puede cuantificar para facilitar la comparación mediante el uso del cálculo del índice de diversidad de Shannon para comparar los datos de seguimiento entre las localizaciones de las muestras o con respecto al nivel basal. Las estrategias de tratamiento y los puntos de alimentación se pueden alterar entonces en consonancia para combatir el problema.

- 50 Un índice de diversidad basado en la cuantificación del ADN mide la presencia y la diversidad de los organismos en un procedimiento, con independencia de su viabilidad. El ácido ribonucleico (ARN), en concreto el ARN mensajero (ARNm), es una molécula que se produce solo en los organismos vivos y tiene propiedades tales que, según la diana, son únicas para un filo o género de bacterias específico. Con la amplificación de las secuencias de ARNm que son únicas en los organismos enumerados más arriba, es posible determinar qué bacterias están presentes en su forma viable. La detección precisa de los organismos viables se puede utilizar entonces como una herramienta para la valoración de la eficacia de las estrategias de tratamiento de las aguas tratadas. Esto se puede llevar a cabo mediante
55 la comparación del índice de diversidad con el índice de viabilidad.

Este método cuantificaría la cantidad y el tipo de bacterias viables que están presentes en las muestras del procedimiento. El método de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (en tiempo real) se puede aplicar

para detectar los ácidos nucleicos ribosómicos mensajeros (ARNm). El ARNm es ADN transcrito que se envía al ribosoma para servir de guía para la síntesis de proteínas en un procedimiento conocido como traducción. El ARNm lo producen solo las células vivas. El ARN de las células vivas se puede aislar con el uso de kits disponibles en el mercado. La detección del ARNm requiere una etapa adicional en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. La transcriptasa inversa se añade a la mezcla de reacción para transcribir el ARNm en su ADN complementario (ADNc). Se necesitan dos conjuntos de cebadores para este experimento. El primero actúa selectivamente sobre el ARNm específico, mientras que el segundo se utiliza para amplificar el ADNc resultante producido por la reacción de la transcriptasa inversa.

Ejemplos

Lo anterior se podría entender mejor por referencia a los ejemplos que vienen a continuación, que se presentan con el propósito de ilustrar y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

En una fábrica de hojas de papel sin revestimiento se padeció el depósito persistente en una de las cajas de cabeza de máquina, que se creía que era la causa de los defectos en el producto final. Se supuso que los microorganismos eran la causa subyacente del problema. Sin embargo, las técnicas de seguimiento tradicionales (p. ej., recuentos estándares en placa y cantidad de ATP) no indicaban un aumento de los niveles de actividad microbiana.

Las muestras de los depósitos de las cajas de cabeza se analizaron durante el transcurso de varios meses mediante el uso de técnicas de qPCR. Los resultados iniciales de la qPCR a partir del análisis de los depósitos en las cajas de cabeza de máquina mostraban una gran cantidad de carga microbiana, así como una elevación de la densidad de microorganismos formadores de biopelícula primarios y adaptativos (figura 1). La estrategia de tratamiento se aumentó con la adición de biocidas tanto al desfibrador como al silo de papel averiado. También se incrementó el ritmo de alimentación del programa de control biológico basado en oxidantes. El análisis de los depósitos recogidos un mes después detectó pocos cambios en la carga bacteriana total de los depósitos de las cajas de cabeza de máquina (figura 1A). El número de microorganismos formadores de biopelícula primarios disminuyó un logaritmo, mientras que la densidad de los microorganismos formadores de biopelícula adaptativos disminuyó cuatro logaritmos (figuras 1B y 1C). La magnitud de los depósitos de las cajas de cabeza de máquina y la frecuencia de los defectos de la hoja de papel seguían sin cambiar. La siembra en placa tradicional y el análisis del ATP en el sistema de aguas de tratamiento y de reserva indicó poca actividad biológica. Los valores de ATP y de recuento en las placas estaban de promedio por debajo de 100 ULR y 100 unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g), respectivamente.

La estrategia de tratamiento se optimizó aún más mediante la adición de biocidas y cloro sin estabilizar al silo de papel averiado y al desfibrador. Después de la aplicación de la última serie de cambios, se recogieron más muestras y se analizaron. La carga bacteriana total del depósito mostró una disminución de casi un logaritmo (figura 1A). El conjunto final de muestras de depósitos mostró una disminución de casi dos logaritmos para la densidad de los microorganismos formadores de biopelícula primarios (figura 1B). Los microorganismos formadores de biopelícula adaptativos permanecieron en una cantidad casi basal (figura 1C). De nuevo, a pesar del mejor control de la población microbiana, la frecuencia de los defectos, la naturaleza de los defectos y los depósitos en las cajas de cabeza de máquina permanecían inalterados.

Los defectos de las hojas de esta fábrica de papel se analizaron con la misma estrategia basada en la qPCR. Es imposible determinar el contenido bacteriano de los defectos mediante el uso de la siembra en placa y los métodos de ATP tradicionales, ya que muchas de las bacterias que podían haber estado presentes en el defecto mueren por la elevada temperatura de la sección del secador. El análisis químico no da a conocer una respuesta definitiva sobre las bacterias presentes en la hoja, que se basa en la tinción con ninhidrina. Este método es inespecífico y propenso a los resultados positivos y negativos falsos. El análisis del ADN de los orificios y de los defectos de las hojas de esta fábrica de papel detectó una densidad bacteriana muy baja (figura 2, muestras 1 a 5). Los microorganismos formadores de biopelícula primarios y adaptativos no se detectaron en los defectos de las hojas analizadas para esta fábrica de papel. Por lo tanto, el lodo bacteriano no contribuía probablemente ni a los defectos ni a los problemas de calidad de esta fábrica. En comparación, una fábrica en la que se padecía un depósito biológico significativo tenía defectos que contenían una carga microbiana mucho más elevada (figura 2, muestra 6). Además, se identificaron especies bacterianas similares en los depósitos y en los defectos. La tinción con ninhidrina de estos defectos no dio lugar a ninguna reacción positiva, lo que indicaba la presencia de microorganismos. En otro caso, las bacterias se detectaron en defectos de las hojas en una cantidad justo por encima de la densidad mínima necesaria para considerarse un defecto biológico. No obstante, la reacción con ninhidrina dio negativo, lo que indicaba que el defecto no contenía microorganismos (figura 2, muestra 7). El examen cuantitativo por qPCR de los depósitos en las cajas de cabeza de máquina demostró que, después de cada modificación de la estrategia de tratamiento, se reducían tanto los microorganismos formadores de biopelícula primarios como los adaptativos. El hecho de que haya una disminución drástica de estos organismos diana y ninguna disminución en la cantidad de depósitos ni en la frecuencia de los defectos indicaba que las bacterias probablemente no eran las responsables de los problemas de los defectos en este sistema de máquinas. Los microorganismos formadores de biopelícula primarios colonizan las superficies de la máquina y crean un entorno favorable para la adhesión y la proliferación de otros tipos de microorganismos. Sin la presencia de estos microorganismos, las bacterias pueden adherirse a las superficies de la máquina siguiendo el depósito de desechos químicos que pueden servir como un buen medio de crecimiento. Es probable que los aditivos químicos y las fibras se depositen dentro de las cajas de cabeza de máquina, lo que da lugar a un microentorno idóneo

para la colonización microbiana. Ya que el análisis de los defectos en la hojas reveló una presencia microbiana desatendida, los microorganismos se descartaron como la fuente primaria de los depósitos en la caja de cabeza de máquina y de los efectos adversos en la calidad del producto. Los intentos de mejorar el funcionamiento de la máquina dejaron de centrarse en el control biológico y se dirigieron hacia un mejor control mecánico del sistema, para permitir una mejora de las condiciones operativas y de la calidad del producto.

En una fábrica de hojas de papel sin revestimiento se utilizó un programa de control biológico competitivo basado en oxidantes durante varios años. El control del crecimiento microbiano se percibió que era el adecuado; sin embargo, existía la posibilidad de reducir aún más las roturas de las hojas para mejorar la eficacia del procedimiento. Se implanto el programa y se optimizó en varias fases. La densidad bacteriana a lo largo del procedimiento permaneció baja y se documentó una reducción en las roturas de las hojas. El número medio de roturas por día disminuyó desde una media de 1,2 roturas al día a 0,42 roturas al día.

Aproximadamente dos años después de la aplicación del programa optimizado, se observó que las condiciones del procedimiento se habían vuelto más variables y que se requerían concentraciones crecientes de los productos de control biológico para mantener el mismo nivel de control. Un estudio del sistema mediante el uso de herramientas de seguimiento tradicionales, tales como recuento en placa y las mediciones de ATP, indicó que la densidad bacteriana en el sistema de aguas de tratamiento permanecía baja y no se observó ningún incremento, o bien este era pequeño, en la caja de cabeza de máquina y en el sistema de papel averiado. Sin embargo, en la fábrica de papel se estaba produciendo un brote grave de orificios y defectos. Mientras que las técnicas de seguimiento tradicionales no indicaban ningún cambio en el funcionamiento del programa de control biológico, la vigilancia de la actividad en línea detectó un incremento de la actividad microbiana (figura 3).

El análisis cuantitativo por qPCR de los depósitos de la máquina y de los defectos en las hojas confirmó la presencia de microorganismos formadores de biopelícula primarios y adaptativos. La densidad total de las bacterias en los defectos era aproximadamente de $1,8 \times 10^7$ células por gramo (figura 3). Esta prueba pone en evidencia el papel de los microorganismos en los defectos y en los problemas de calidad. La máquina se sometió a un hervido cáustico tras el cual la vigilancia de la actividad en línea mostró una reducción en la actividad microbiana y un valor de potencial de oxidorreducción más estable, lo que indica una mejora del rendimiento del programa y de la resiliencia. La cantidad de microorganismos en los defectos de las hojas disminuyó de 10^7 a 10^5 células/g después del hervido (figura 3). Esto confirma que la qPCR puede detectar la contribución microbiana a los defectos en las hojas que no se pueden detectar con el uso de las técnicas tradicionales. Además, la qPCR se puede utilizar para valorar la eficacia del programa de control biológico sobre el producto final.

Las muestras de fieltro de dos fábricas de papel que experimentaban problemas de funcionamiento, que se manifestaban como depósitos en la máquina y defectos en las hojas de papel, se analizaron por qPCR. A cada muestra se le analizó la presencia de microorganismos. Una vez que se determinó que cada muestra contenía una gran cantidad de bacterias, se analizó entonces en las muestras la presencia de microorganismos formadores de biopelícula adaptativos y primarios, que incluían la familia *Sphingomonadaceae*, *Meiothermus*, *Geothermus* y *Pseudoxanthomonas* que se sabe que contribuyen a dar problemas con la eficacia de la máquina y con la calidad del producto. Ambas fábricas de papel contenían una cantidad normal de microorganismos formadores de biopelícula adaptativos, aunque la fábrica 1 tenía el doble de microorganismos formadores de biopelícula primarios que la fábrica 2 (figura 4). La cantidad de microorganismos formadores de biopelícula adaptativos se determinó que era normal, ya que esta cantidad estaba en el margen que indicaba que es probable que no contribuyan al problema. La cantidad de microorganismos formadores de biopelícula primarios en la fábrica 2 estaba en un nivel casi basal. La elevada cantidad de microorganismos formadores de biopelícula primarios en la fábrica 2 sugería que en los fieltros se habían formado biopelículas, lo que conducía a taponamiento de los fieltros y a la reducción de la retirada de agua de la hoja de papel. La presencia de la biopelícula en los fieltros puede conducir a un incremento del depósito de otra materia que a continuación se puede volver a depositar en la hoja. La elevada cantidad de microorganismos formadores de biopelícula primarios en la fábrica 1 sugería que era necesario un análisis adicional de otras partes del procedimiento, tales como agua del rociador, aditivos, tinas de almacenamiento, etc., para determinar dónde se originaban estos organismos.

El resultado de estos ejemplos demuestra que las técnicas de siembra en placa convencionales y los residuos oxidantes pueden indicar una dosificación de biocidas adecuada y un control del crecimiento microbiano, mientras que prevalecen el depósito, los defectos y las roturas. La utilización de métodos por PCR y qPCR da a conocer una información más precisa en cuanto al crecimiento microbiano y a la formación de biopelículas en los sistemas de aguas industriales. Estas estrategias permiten un análisis rápido de la contribución de los microorganismos a la formación de depósitos y se pueden utilizar para determinar con rapidez si los depósitos que contienen microorganismos contribuyen o no a los defectos.

Las técnicas cuantitativas por qPCR permiten el 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 método permite un diagnóstico más proactivo de los problemas, lo que conduce a una mejora de la eficacia de la máquina y de la calidad del producto.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una infección por organismos formadores de biopelícula en un procedimiento de fabricación de papel, en donde el método comprende las etapas de:
- observar un defecto sobre un artículo asociado a un procedimiento de fabricación de papel,
- 5 llevar a cabo al menos un análisis por PCR en al menos una muestra tomada del artículo, el análisis por PCR con el uso de cebadores que se hibridan selectivamente con las secuencias nucleotídicas que se sabe que están asociadas a al menos un tipo de organismo,
- si se indica un resultado positivo, determinar si la medición de una concentración de microorganismos excede un umbral predeterminado,
- 10 si la concentración medida excede el umbral, se realiza al menos un análisis adicional por PCR para determinar los organismos específicos que están presentes en la muestra, en los que se realiza al menos un análisis adicional por PCR para determinar los organismos formadores de biopelícula primarios como organismos específicos,
- si la concentración medida de cada organismo específico detectado excede un umbral predeterminado, entonces ese defecto se debe al menos en parte a una infección de dicho organismo específico.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el al menos un análisis adicional por PCR se hace para determinar los organismos formadores de biopelícula primarios y adaptativos como organismos específicos.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que al menos un tipo de organismo es bacteria.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el artículo es un fieltro y el defecto es uno o varios tapones en el fieltro.
- 20 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el artículo es una hoja de papel producida mediante el procedimiento de fabricación de papel y el defecto es uno o varios orificios, discromía, rayas, manchas, manchas translúcidas, y cualquier combinación de los mismos en la hoja de papel.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende la etapa de grabar el organismo identificado en un formato que se puede almacenar y/o transmitir.
- 25 7. Un método para remediar una infección por microorganismos en un procedimiento de fabricación de papel, que comprende la identificación de un microorganismo formador de biopelícula de acuerdo con el método de la reivindicación 1, que además comprende la etapa de la realización de un programa biocida asociado a la remediación del organismo identificado.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el análisis por PCR es un análisis por qPCR.
- 30 9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el umbral del análisis por PCR es 10^4 células por mililitro o 10^4 células por gramo del artículo.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el artículo está tan desecado que sobre el artículo hay pocos o ningún organismo vivo de los que pudieron haber causado el defecto.
- 35 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el análisis por PCR determina la cantidad de organismos que infectan la muestra.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el artículo ha pasado a través de una sección de calentamiento o de secado del procedimiento de fabricación de papel antes de observar el defecto y, por lo tanto, se han destruido los organismos que han causado el defecto.

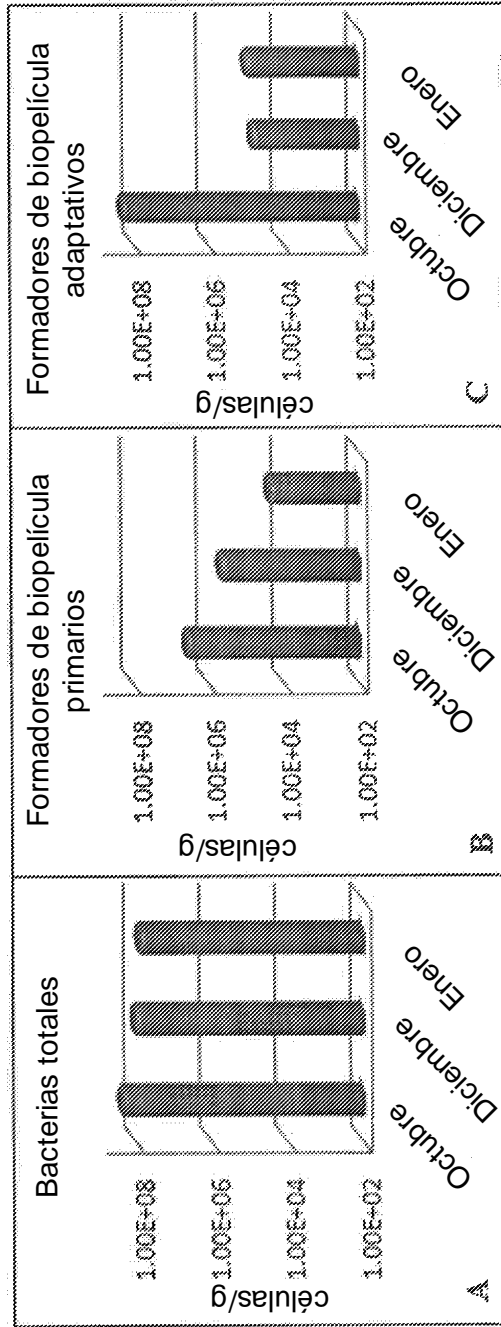


Figura 1

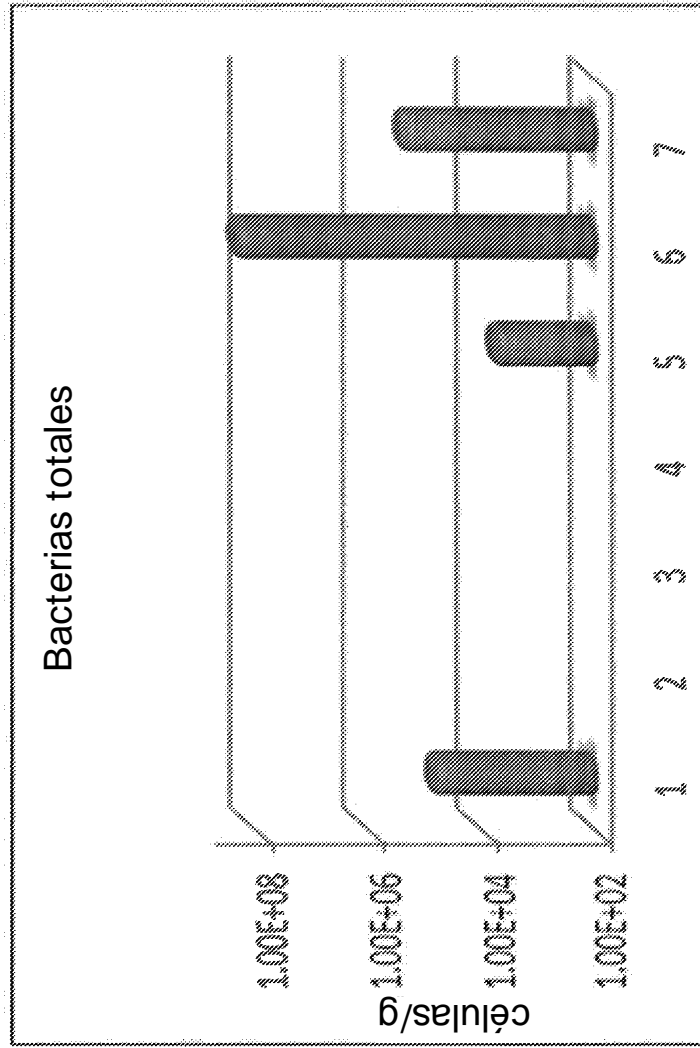


FIGURA 2

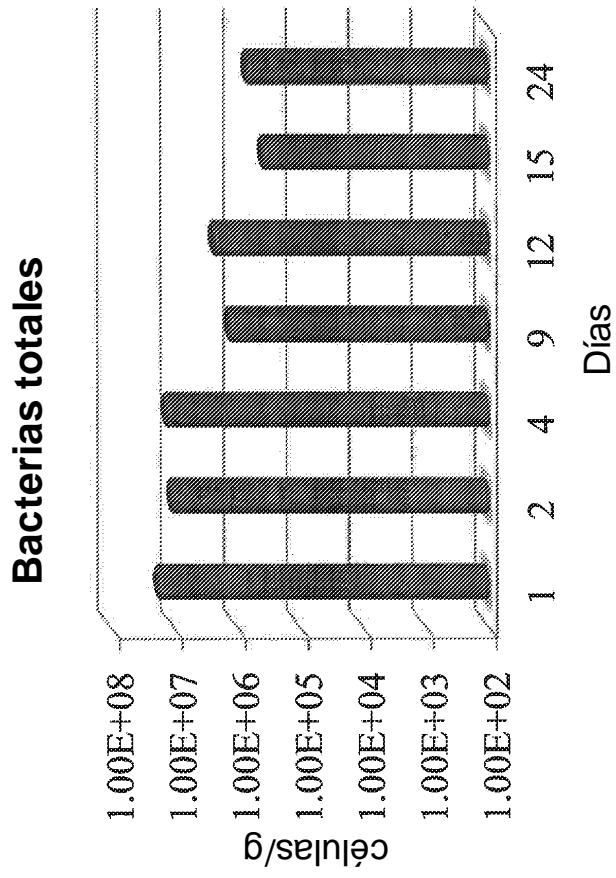


FIGURA 3

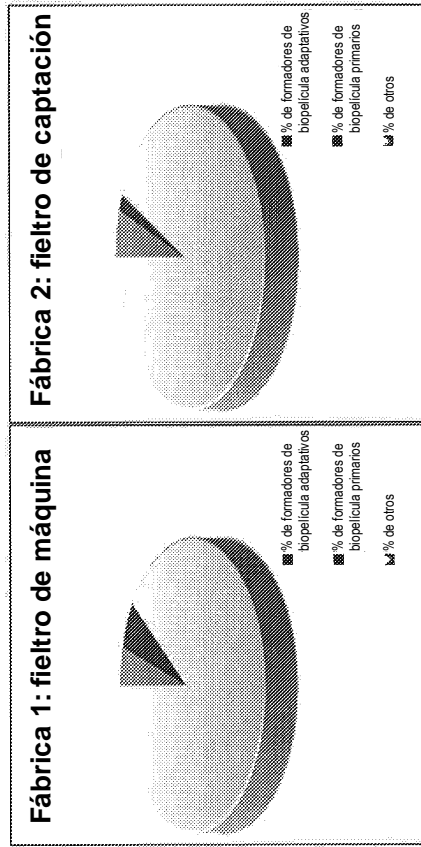


FIGURA 4