

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 725**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/689

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2016 PCT/FI2016/050123**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016 WO16135387**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2016 E 16710256 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 3262187**

54 Título: **Método para monitorización cuantitativa de las endosporas en el entorno acuoso de una fábrica de papel o cartón**

30 Prioridad:

27.02.2015 FI 20155138

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

20.05.2020

73 Titular/es:

**KEMIRA OYJ (100.0%)
Energiakatu 4
00180 Helsinki, FI**

72 Inventor/es:

**RIIHINEN, KALLE;
LAURAEUS, MARKO;
KOLARI, MARKO y
AHOLA, JUHANA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 761 725 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

Método para monitorización cuantitativa de las endosporas en el entorno acuoso de una fábrica de papel o cartón

La presente invención se refiere a un método para monitorización cuantitativa de las endosporas en el entorno acuoso de una fábrica de papel o fábrica de cartón conforme a los preámbulos de las reivindicaciones adjuntas.

- 5 En los entornos acuosos de las fábricas de papel y cartón están presentes normalmente células bacterianas. El crecimiento bacteriano en el proceso se monitoriza y se limita comúnmente por utilización de diversas medidas, p. ej. alimentación de biocidas en los procesos. Sin embargo, ciertas células bacterianas forman endosporas, que son muy resistentes a los métodos típicos de destrucción de las bacterias, tales como calor, desinfectantes, biocidas químicos, desecación, luz ultravioleta y radiación ionizante. Las endosporas pueden persistir viables pero durmientes durante
- 10 periodos prolongados, incluso durante años, hasta que las condiciones externas se hacen favorables, después de lo cual tiene lugar la transformación, es decir germinación, de la endospora bacteriana.

- Especialmente en la producción de papel de seda y cartón de envasado de alimentos y/o bebidas, el nivel de higiene del producto final presenta interés especial. El producto acabado final no debería contener niveles altos de endosporas bacterianas, dado que las endosporas pueden contaminar los materiales que entran en contacto con el producto final, p. ej. artículos alimenticios que se envasan en el cartón de envasado del alimento o líquido. Por ejemplo, para el cartón de envasado de alimentos, que se utiliza para cajas de pizzas, vasos de café, etc., el contenido máximo de endosporas es típicamente <1000 CFU/g de cartón seco, y existen usos finales en los cuales el contenido máximo de endosporas permitido es <250 CFU/g de cartón seco.
- 15

- Las endosporas bacterianas se detectan tradicionalmente por utilización de métodos de cultivo convencionales, que consumen mucho tiempo. Los métodos de cultivo proporcionan típicamente resultados sólo al cabo de 48-72 horas después de la toma de muestras. Es comprensible que en la producción continua de papel o cartón este retardo no es óptimo. Por ejemplo, el ajuste de la distribución en el tiempo de un programa biocida de control de esporas frente a condiciones de proceso cambiantes no es posible, dado que los resultados de seguimiento del cultivo se obtienen sólo después del retardo especificado anteriormente. Esto hace innecesariamente complicada y difícil de optimizar la alimentación del biocida. Por tanto, existe necesidad de monitorización rápida de las endosporas bacterianas en los procesos acuosos de las fábricas de papel o cartón.
- 20
- 25

El documento US 2014/0155283 describe una microrred que utiliza el agente fluorescente de intercalación de DNA monoazida de propidio para bloquear selectivamente el DNA de las células muertas por la amplificación y su aplicación en la detección y enumeración de microbios viables en comunidades microbianas.

- 30 El documento US 2004/0014122 describe métodos para identificación sistemática de genes de esporulación en bacterias formadoras de esporas que comprenden amplificar una porción de un gen a partir de DNA celular total utilizando un iniciador y detección de la presencia del producto de amplificación. Una descripción similar se encuentra en el documento CN1307644.

- El documento US 2011/0318750 describe métodos para detección y cuantificación de endosporas bacterianas viables en una muestra.
- 35

El documento US 2012/0231961 describe métodos para detección de esporas en una muestra.

Un objeto de esta invención es minimizar o posiblemente incluso eliminar las desventajas existentes en la técnica anterior.

- Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método rápido y efectivo en costes para monitorización cuantitativa de endosporas bacterianas en el entorno acuoso de una fábrica de papel o cartón.
- 40

Estos objetos se alcanzan con la invención que tiene las características presentadas más adelante en las partes caracterizadoras de las reivindicaciones independientes.

Algunas realizaciones preferidas de la invención se presentan en las reivindicaciones dependientes.

- Un método típico conforme a la presente descripción para monitorización cuantitativa de endosporas bacterianas en el entorno acuoso de una fábrica de papel o cartón, comprende al menos los pasos siguientes:
- 45

- obtener al menos una primera muestra acuosa procedente del entorno acuoso,
 - destruir las bacterias en forma vegetativa existentes en la primera muestra por tratamiento adecuado, preferiblemente por calentamiento de la primera muestra a una temperatura elevada deseada,
 - añadir un agente de intercalación a la primera muestra tratada y permitir que el mismo interaccione con las bacterias destruidas, y
- 50

- determinar el nivel de endosporas en la primera muestra utilizando la reacción cuantitativa en cadena de polimerasa (qPCR).

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que por utilización de un método que comprende el paso de destrucción de las bacterias vegetativas, interacción con un agente de intercalación y reacción cuantitativa en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR), es posible obtener una determinación rápida del nivel de endosporas bacterianas en una muestra procedente de la producción de papel o cartón. El método de monitorización proporciona un resultado fiable de la determinación para el nivel de endosporas en el entorno acuoso de una fábrica de papel o cartón. El método conforme a la presente descripción proporciona por tanto una posibilidad de detectar rápidamente los estallidos de endosporas causados por cambios inesperados en las condiciones de proceso, tales como fluctuaciones pH o redox. De esta manera puede minimizarse la producción de productos de calidad deficiente, p. ej. papel o cartón de calidad para envasado. Además, es posible evitar la alimentación errónea de biocida al proceso, es decir alimentación de una dosis no mortal de biocida, que puede iniciar la formación de endosporas debido, p. ej., a estrés oxidante.

En el presente contexto, el término "endospora" se entiende como una estructura durmiente y no reproductiva formada por bacterias. Las endosporas comprenden DNA bacteriano y una parte de su citoplasma revestida por una cubierta exterior protectora. Las endosporas pueden germinar al estado metabólicamente activo, es decir estado vegetativo, en condiciones favorables.

Conforme a la presente descripción, al menos una primera muestra acuosa se obtiene o se toma del entorno acuoso de una fábrica de papel o cartón. El tamaño de la muestra está comprendido típicamente el intervalo de 10-100 ml, preferiblemente 20-30 ml, y normalmente la disponibilidad de la muestra no es un factor limitante. Como ejemplo, puede ocurrir que en ciertos procesos de fabricación de papel y cartón en los que se desea mantener el contenido total de endosporas a nivel muy bajo, tal como <1000 CFU/ml por utilización de dosis altas de biocida, puede utilizarse un tamaño de muestra de 100 ml. Por otra parte, en aguas de proceso en las que el contenido de células bacterianas puede encontrarse a nivel alto, es decir aproximadamente a un nivel de 10^8 CFU/ml, puede considerarse más práctico el tamaño de muestra de 25 ml.

La muestra puede comprender fibras y/o fibrillas celulósicas, y tener un contenido de sólidos de hasta 2-8% en peso. La muestra comprende también normalmente una diversidad de productos químicos y/o compuestos utilizados en la fabricación de papel o cartón, tales como almidón; partículas inorgánicas de carga; y polímeros sintéticos, tales como poliacrilamida.

En el comienzo del presente método, las bacterias en forma vegetativa se destruyen utilizando un tratamiento adecuado. El tratamiento adecuado puede ser un tratamiento físico en el que la muestra se somete por ejemplo a radiación, tal como UV o calor, o un tratamiento químico, en el que la muestra se somete a un biocida adecuado a un nivel de dosificación que destruye las bacterias en forma vegetativa pero no interfiere con el comportamiento del agente de intercalación durante los pasos de proceso subsiguientes. Conforme a una realización preferida, la primera muestra se calienta a una temperatura elevada deseada de al menos 60°C, preferiblemente de al menos 70°C, más preferiblemente al menos 75°C. La temperatura máxima utilizada es típicamente 100°C, preferiblemente 80°C. La muestra se mantiene a temperatura elevada durante al menos 10 minutos, preferiblemente al menos 15 minutos, más preferiblemente al menos 20 minutos. Dicho de otro modo, una manera preferible de destruir las bacterias en forma vegetativa es calentar la muestra a una temperatura en el intervalo de 75-80°C y mantener la muestra a esta temperatura elevada durante 15-60 minutos, preferiblemente durante 20-40 minutos. En la técnica se conocen diversos procesos de tratamiento térmico, tanto a la presión atmosférica normal como a presión más alta. En una realización preferida, el paso de tratamiento térmico es un paso fácil, rápido y práctico en condiciones de campo y/o condiciones industriales, pudiendo realizarse el mismo por utilización de un baño María a presión normal. El calentamiento de la primera muestra a la temperatura elevada definida anteriormente produce la pasteurización de la muestra y desintegra las células bacterianas vegetativas que están presentes en la muestra. Después del calentamiento, la muestra comprende células bacterianas vegetativas desintegradas, es decir muertas y destruidas, y típicamente endosporas bacterianas no afectadas.

Antes del paso de destrucción, preferiblemente por calentamiento, la primera muestra puede filtrarse opcional pero preferiblemente a fin de separar el material particulado sólido no deseado, tal como partículas sólidas, fibras, fibrillas o análogas, de la fase líquida de la muestra. Esta filtración preliminar para separación del material particulado sólido no deseado es típicamente rápida y se realiza p. ej. por medio de un embudo Buchner, utilizando un filtro con aberturas de aproximadamente 3 mm.

Conforme a una realización de la descripción, la primera muestra se filtra después del paso de destrucción, a fin de separar las células bacterianas vegetativas destruidas, así como las endosporas de la fase líquida de la muestra. La filtración puede realizarse utilizando un filtro con aberturas de p. ej. 0,4 µm. Las células bacterianas y las endosporas se recogen y/o se unen sobre el filtro, lo cual simplifica el procesamiento ulterior de la primera muestra tratada.

Se añade un agente de intercalación a la primera muestra tratada, preferiblemente después del paso de filtración descrito anteriormente, y se deja que el agente interaccione con las células bacterianas destruidas. Conforme a una realización de la invención, el agente de intercalación se selecciona de monoazida de propidio (PMA), monoazida de

etidio (EMA), bromuro de etidio, berberina, proflavina, daunomicina, doxorubicina y talidomida. El agente de intercalación preferido es monoazida de propidio (PMA). El agente de intercalación se añade preferiblemente a la primera muestra tratada en tal cantidad que todo el DNA de las células bacterianas destruidas interacciona con el agente de intercalación. Así, es posible garantizar que nada del DNA de las células bacterianas vegetativas se multiplica en el paso qPCR siguiente y que las mismas no producen señal alguna en el paso qPCR. Sin embargo, preferiblemente se evita un exceso exagerado innecesario de adición de agente de intercalación, dado que ello puede producir un riesgo de que el agente de intercalación se difunda en las endosporas y comience a interaccionar con el DNA de las mismas. Típicamente, el agente de intercalación se añade la muestra en una cantidad que proporciona una concentración de agente de intercalación de <100 µM, preferiblemente en el intervalo de 10-90 µM, más preferiblemente 25-75 µM, todavía más preferiblemente 40-60 µM.

La primera muestra se deja incubar en la oscuridad después de la adición del agente de intercalación. El tiempo de incubación está dentro del intervalo de 1-30 minutos, preferiblemente 2-10 minutos, más preferiblemente 4-6 minutos. La gente de intercalación es capaz de reticular covalentemente las dobles cadenas del DNA de las células bacterianas destruidas cuando se expone a luz azul intensa, que tenga preferiblemente una longitud de onda de aproximadamente 400-500 nm, a la temperatura entorno. La luz azul puede ser producida, por ejemplo, por utilización de un diodo fotoemisor, LED. El tiempo de exposición puede ser 1-30 minutos, preferiblemente 2-10 minutos, más preferiblemente 4-6 minutos.

Preferiblemente, la muestra no se seca antes de la adición del agente de intercalación. Esto significa que el método está preferiblemente exento de secado de la muestra. Preferiblemente, el retardo temporal entre el paso de destrucción y la adición del agente de intercalación es tan corto como sea prácticamente posible.

Después que se ha dejado interaccionar la primera muestra con el agente de intercalación, se determina el nivel de endosporas en la primera muestra utilizando la reacción cuantitativa en cadena de polimerasa, qPCR. El DNA de las endosporas se extrae y se multiplica utilizando qPCR. Un ejemplo de extracción adecuada de DNA para las células aisladas del material ha sido descrito por Rinttila et al., Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. J. Appl. Microbiol. 2004; 97(6):1166-1177. En el procedimiento ilustrativo, se añaden reactivos de lisis al tubo con cuentas de vidrio y se utiliza un batidor de cuentas FastPrep 3 veces a una velocidad de 6,5 m/s durante 1 minuto. Los tubos se incuban a 65°C durante 20 minutos, agitando vorticialmente con un Thermomixer cada 2 minutos. Se añaden 800 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:23:1), se mezcla y se centrifuga a 10.000 g durante 5 minutos. Se transfieren 600 µl de fase líquida a un tubo nuevo y se extrae con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se utilizan 270 µl de isopropanol 100% para precipitar el DNA y se retira el líquido después de centrifugación a 20.000 g a +4°C durante 15 minutos. El sedimento se lava 2 veces con 1 ml (-20°C) de EtOH 70% y se centrifuga con 20.000 g +4°C durante 5 minutos. Después de la centrifugación, el sedimento se seca en un desecador de vacío a +45°C durante 20 minutos y se disuelve en 45 µl de tampón Tris-EDTA a +55°C durante 1,5-2 horas. Métodos y procedimientos qPCR adecuados son conocidos como tales por una persona experta en la técnica y están disponibles comercialmente. Un ejemplo de un método qPCR adecuado ha sido descrito por Mäkinen, R. et al., Can. J. Microbiol. 59: 407-412 (2013). En el método ilustrativo, la cantidad de copias del gen rRNA 16S se mide con ABI SDS 7000 (Applied Biosystems, UK) utilizando SYBR Green I (Roche Diagnostics, Alemania) como el informador fluorescente. Una persona experta en la técnica posee conocimiento de otros procedimientos adecuados de extracción de DNA y/o qPCR.

Conforme a la invención, se obtiene o se toma al menos una segunda muestra acuosa del mismo entorno acuoso. Preferiblemente, la primera y la segunda muestra se toman al mismo tiempo, más preferiblemente tanto la primera como la segunda muestra proceden de una sola muestra original, que se ha dividido en primera, segunda, y posibles muestras sucesivas para determinación del nivel de endosporas en el entorno acuoso.

La cantidad de bacterias vegetativas, es decir células bacterianas vegetativas, se determina directamente a partir de la segunda muestra, preferiblemente después de un paso de prefiltración, utilizando la reacción cuantitativa en cadena de polimerasa, qPCR. La segunda muestra no se somete a paso de destrucción alguno, p. ej. por tratamiento térmico, o interacción con un agente de intercalación.

El nivel de endosporas determinado a partir de la primera muestra se compara luego con la cantidad determinada de células bacterianas vegetativas en la segunda muestra. De esta manera, es posible obtener información acerca de la cantidad total de células bacterianas vegetativas en el entorno acuoso de una fábrica de papel o cartón y su proporción respecto al nivel de endosporas en el mismo entorno.

Conforme a la invención, la información obtenida acerca de la cantidad total de células bacterianas vegetativas y la cantidad de endosporas se utiliza para el ajuste rápido del régimen de alimentación de biocida para control de las endosporas en la producción de la fábrica de papel o cartón. La información es apta para proporcionar conocimiento y comprensión valiosos acerca de las condiciones bacterianas del entorno acuoso en la fábrica de papel o cartón, conocimiento que puede utilizarse, por ejemplo, para determinación del régimen correcto de alimentación de biocida, para detectar áreas problemáticas del proceso, y/o para detectar niveles de esporas elevados y/o fluctuantes. Dicho de otro modo, conforme a una realización preferible de la invención, se alimenta al menos un biocida al entorno acuoso, y se determina la cantidad alimentada del biocida sobre la base del nivel de endosporas encontrado.

La presente invención hace posible el uso de biocidas eficaces, que pueden ser en caso contrario demasiado caros para uso continuo, dado que la dosificación y la distribución en el tiempo pueden determinarse exactamente basándose en la información acerca de la cantidad de esporas bacterianas y células bacterianas vegetativas en el proceso. El biocida puede ser, por ejemplo, un biocida oxidante o no-oxidante. Sobre la base de los resultados de la determinación obtenidos, las dosis de biocida en una o varias localizaciones críticas del proceso se ajustan a un nivel que reduce el nivel de endosporas en el papel/cartón producido a <1000 CFU/g de papel/cartón seco, o alternativamente <250 CFU/g de papel/cartón seco.

El tiempo total desde el comienzo del paso de destrucción al final del paso qPCR puede ser menor que 24 horas, preferiblemente 6-24 horas, más preferiblemente 7-9 horas. Esto significa que el seguimiento de la eficacia del biocida por utilización del presente método puede realizarse diariamente, o incluso varias veces al día. El método conforme a la invención se lleva a cabo preferiblemente in situ.

Conforme a una realización de la invención, el método se utiliza para monitorización de las endosporas de, p. ej., *Bacillus*, *Brevibacillus* y/o *Paenibacillus*, que se sabe crecen en las condiciones de proceso de una máquina de papel o cartón. Estos géneros son capaces de producir endosporas termotolerantes, que son resistentes al calor de la sección secadora de una máquina de papel o cartón. Por consiguiente, la presente invención proporciona una posibilidad satisfactoria de monitorizar el nivel de endosporas de estos géneros y comenzar una alimentación específica y correcta de biocida.

Conforme a una realización preferible de la invención, el método se utiliza para producción de papel o cartón de calidad para envasado de alimentos y/o líquidos. Típicamente, el gramaje del cartón de calidad para envasado puede ser 150-400 g/m², preferiblemente 200-360 g/m², más preferiblemente 240-300 g/m². Las calidades de papel y cartón para envasado de alimentos y/o líquidos están a menudo revestidas de polímero o laminadas con papel de aluminio para propiedades de barrera. Polímeros adecuados para revestimiento son, por ejemplo, poliolefinas, tales como polietileno o polipropileno; poli (alcohol vinílico); polivinilamina; poli (tereftalato de etileno); y poli(tereftalato de butileno).

Parte experimental

En los ejemplos no limitantes siguientes se describen algunas realizaciones de la invención.

Ejemplo 1

Esta prueba in situ se llevó a cabo en una máquina de papel alcalino, que produce cartón de envasado de alimentos de 3 capas, a fin de realizar un seguimiento de la eficiencia del programa biocida de control de esporas. Se realizaron dos tandas de toma de muestras, una por la mañana y otra por la tarde, en tres lugares del proceso; en las salidas de la torre de papel defectuoso, la torre de pulpa de abedul y la torre de pulpa de pino.

Primeramente, se filtró el primer litro de cada muestra de proceso utilizando un embudo Buchner con aberturas de poro de 3 mm a fin de separar fibras y sólidos de la muestra. Después de esto, el filtrado obtenido se dividió en 6 tubos Falcon de 50 ml; se trataron térmicamente 3 muestras paralelas durante 15 minutos a 80°C a fin de destruir las células bacterianas vegetativas, y 3 muestras paralelas se dejaron sin tratar. Después de esto, la totalidad de las 6 muestras paralelas se filtraron a través de papeles de filtro de 0,4 µm. Las muestras sometidas a tratamiento térmico y filtradas se tiñeron con PMA (50 µM, 1 ml) con 5 minutos de tiempo de contacto en la oscuridad seguido por exposición durante 5 minutos a luz LED azul. Después de esto, el DNA tanto de las muestras tratadas como de las muestras sin tratar se analizó utilizando un método de extracción del DNA y qPCR como sigue.

Resumidamente, se añadieron reactivos de lisis al tubo con cuentas de vidrio y se utilizó un batidor de cuentas FastPrep 3 veces a velocidad de 6,5 m/s durante 1 minuto. Los tubos se incubaron a 65°C durante 20 minutos, agitando vorticialmente con un Thermomixer cada 2 minutos. Se añadieron 800 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:23:1), se mezcló y se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos. Se transfirieron 600 µl de la fase líquida a un tubo nuevo y se extrajo con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se utilizaron 270 µl de isopropanol 100% para precipitar el DNA y se retiró el líquido después de centrifugación a 20.000 g a +4°C durante 15 minutos. El sedimento se lavó 2 veces con 1 ml (-20°C) de EtOH 70% y se centrifugó con 20.000 g +4°C durante 5 minutos. Después de la centrifugación, el sedimento se secó en un desecador de vacío a +45°C durante 20 minutos y se disolvió en 45 µl de tampón Tris-EDTA a +55°C durante 1,5-2 horas. El DNA se analizó con qPCR. La cantidad de copias del gen rRNA 16S se midió con ABI SDS 7000 (Applied Biosystems, UK) utilizando SYBR Green 1 (Roche Diagnostics, Alemania) como el informador fluorescente. Los genes totales rRNA 16S representan las bacterias totales, y los genes rRNA 16S de *Bacilli* las bacterias formadoras de endosporas. Como referencia, los recuentos totales de bacterias aerobias y esporas bacterianas se midieron utilizando métodos de cultivo convencionales (agar de recuento de placas, +45°C/+37°C, 2 días de incubación) en un laboratorio externo. Antes de la determinación de las esporas bacterianas, las muestras se pasteurizaron a +80°C durante 20 minutos. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Resultados para el Ejemplo 1

	Bacterias aerobias totales (muestras sin tratar)			Esporas bacterianas (muestras tratadas térmicamente y teñidas)	
	<u>Método de cultivo</u>	Método de la Invención		Método de cultivo	Método de la Invención
	CFU/ml	rRNA 16S total, genes/muestra	rRNA 16 S de Bacilli, genes/ml	CFU/ml	rRNA 16 S de Bacilli, genes/ml
Muestras de la mañana					
Torre de papel defectuoso	<100	$<5 \times 10^3$	$<2 \times 10^3$	<10	$<2 \times 10^3$
Pulpa de abedul	<100	6×10^3	5×10^3	<10	$<2 \times 10^3$
Pulpa de pino	<100	8×10^3	2×10^3	<10	$<2 \times 10^3$
Muestras de la tarde					
Torre de papel defectuoso	<100	$<5 \times 10^3$	$<2 \times 10^3$	<10	$<2 \times 10^3$
Pulpa de abedul	<100	2×10^4	4×10^3	<10	$<2 \times 10^3$
Pulpa de pino	<100	6×10^3	$<2 \times 10^3$	<10	$<2 \times 10^3$

Los resultados obtenidos del método de cultivo indican que el estado microbiológico del proceso se encontraba a un nivel satisfactorio durante el día de la toma de muestras, dado que los aerobios totales (<100 CFU/ml) y las endosporas (<10 CFU/ml) eran ambos inferiores al límite de detección. Además, no se encontraban genes de RNA 16S de Bacilli en las muestras tratadas térmicamente y teñidas, por lo que los resultados del método de la invención indican que no estaban presentes endosporas en el proceso durante el día de la toma de muestras. Esta situación microbiológica satisfactoria en el proceso se observó también en el cartón final; los recuentos de esporas aerobias en el cartón final eran inferiores a 250 CFU/g de cartón producido (resultados no presentados). Es interesante, que los resultados obtenidos de las torres de pulpa entrante mostraban algunos genes rRNA 16S de Bacilli (2×10^3 - 5×10^3), por lo que a la vez estas torres de pulpa contenían bacterias de Bacilli que pueden producir endosporas en condiciones de cultivo desfavorables, tal como en el caso de shock repentino de pH o redox. Así pues, el método de la invención descrito puede utilizarse eficazmente para monitorizar la calidad microbiológica de puntos críticos del proceso, y para detectar rápidamente, es decir dentro de una jornada de trabajo, la formación potencial de esporas. Esto hace posible una vía económicamente factible para ajustar el programa biocida de control de esporas, y minimizar eventualmente la producción de cartón contaminado con esporas, y finalmente menos reclamaciones para el fabricante del cartón.

Ejemplo 2

Se realizó una prueba de seguimiento microbiológico in situ en una máquina de papel alcalino que producía cartón para cajas plegables de 3 capas, a fin de realizar el seguimiento de la eficiencia del programa biocida actual contra las bacterias de formación de esporas en la torre de papel defectuoso. Se realizaron en total 6 tandas de toma de muestras de la salida de la torre de papel defectuoso.

Las muestras de proceso se manipularon y procesaron como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Los resultados obtenidos de la Tabla 2 muestran que la torre de papel defectuoso contenía muchas bacterias; los recuentos de bacterias aerobias totales variaban entre 5×10^6 – 1×10^7 CFU/ml, los genes totales rRNA 16S entre 5×10^7 – 3×10^8 y los genes rRNA 16S de Bacilli entre 1×10^6 – 4×10^7 durante los tres días de toma de muestras. Los resultados indican por tanto que se requerirían biocidas adicionales a fin de controlar eficazmente las bacterias totales y la población de Bacilli en la torre de papel defectuoso. Es interesante que la cantidad de genes rRNA 16S de Bacilli era alta (1×10^6 – 4×10^7) en todas las muestras sin tratar, lo que indicaba que estaban presentes en la torre de papel defectuoso muchas células vegetativas. Sin embargo, los genes rRNA 16S de Bacilli variaban acusadamente desde bajos (2×10^2) a altos (2×10^6) en las muestras tratadas térmicamente y teñidas, lo que indica que los niveles de esporas maduras en la torre de papel defectuoso fluctuaban. Es sabido que la tendencia a la esporulación de la población de Bacilli, es decir formación de nuevas esporas, está fuertemente regulada y es dependiente de las condiciones del

proceso. Los resultados obtenidos del cultivo tradicional no revelaban dicho potencial de esporulación, dado que los recuentos de esporas detectados variaban entre <10 y 300 esporas/ml. Utilizando el método de la invención descrito, es posible seguir el estado microbiológico en puntos críticos del proceso y detectar rápidamente, es decir dentro de una jornada de trabajo, la formación de nuevas esporas en el proceso. Esto hace posible un control eficaz y económicamente factible de las esporas en el proceso, una producción minimizada de cartón contaminado con esporas, y finalmente menos reclamaciones para el fabricante de cartón.

Tabla 2 Resultados para el Ejemplo 2.

	Bacterias aerobias totales (muestras sin tratar)			Endosporas bacterianas (muestras tratadas térmicamente y teñidas)	
	Método de cultivo	Método de la Invención		Método de cultivo	Método de la Invención
Toma de muestras de la Torre de Rotura	CFU/ml	rRNA 16S total genes/muestra	rRNA 16S de Bacilli genes/ml	CFU/ml	rRNA 16 S de Bacilli genes/ml
7 octubre, mañana	7×10^6	3×10^8	4×10^7	3×10^2	2×10^6
7 octubre, tarde	5×10^6	2×10^8	3×10^7	5×10^1	1×10^5
5 noviembre, mañana	8×10^6	1×10^8	2×10^6	2×10^1	6×10^4
5 noviembre, tarde	1×10^7	2×10^8	1×10^6	2×10^1	1×10^4
11 noviembre, mañana	6×10^6	5×10^7	1×10^6	<10	2×10^2
11 noviembre, tarde	5×10^6	9×10^7	9×10^6	2×10^1	1×10^3

Ejemplo 3

Este test de laboratorio se llevó a cabo a fin de evaluar la eficacia del biocida de control de esporas contra la población bacteriana auténtica en una muestra de papel defectuoso tomada de una máquina de papel alcalino que producía cartón de envasado de alimentos de 3 capas. La primera muestra de papel defectuoso se guardó como tal y la segunda muestra de papel defectuoso con una dosificación de 150 ppm de biocida de control esporas ensayado. El almacenamiento tuvo lugar a +45°C, sin mezcladura. Los recuentos de bacterias aerobias y esporas aerobias totales se determinaron utilizando métodos de cultivo convencionales (agar de recuento de placas, +45°C/+37°C, 2 días de incubación) al comienzo del test (sin tratar) y después de 3 días de tiempo de contacto (muestras tratadas y sin tratar), junto con medidas de pH y rédox.

Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 Resultados para el Ejemplo 3

	Comienzo del test				3 días de tiempo de contacto			
	Bacterias aerobias totales (CFU/ml)	Esporas bacterianas (CFU/ml)	pH	Rédox (mV)	Bacterias aerobias totales (CFU/ml)	Esporas bacterianas (CFU/ml)	PH	Rédox (mV)
Muestra de papel defectuoso sin tratar	3×10^7	<10	8,2	134	3×10^7	5×10^3	6,5	-107
Muestra de papel defectuoso tratada con biocida	ND	ND	ND	ND	<100	<10	7,3	83

Los resultados obtenidos muestran que ocurría un deterioro acusado en la muestra de papel defectuoso sin tratar

5 durante 3 días de tiempo de contacto; los recuentos totales de bacterias aerobias eran altos (3×10^7 CFU mg/ml) y el nivel de esporas aerobias aumentaba hasta 5×10^3 CFU/ml. Además, pH ($8,2 \rightarrow 6,5$) y rédox ($134 \text{ mV} \rightarrow 107 \text{ mV}$) disminuían acusadamente. Por el contrario, la dosificación de 150 ppm del biocida de control de esporas ensayado preservaba eficazmente la muestra de papel defectuoso; las bacterias aerobias totales (<100 CFU/ml) y las esporas bacterianas (<10 CFU/ml) se mantenían por debajo del límite de detección, y el pH (7,3) así como los valores rédox (83 mV) se mantenían a nivel satisfactorio. Así pues, los resultados indican que el biocida de control de esporas ensayado, a una dosis de 150 ppm, puede utilizarse para controlar la formación de nuevas esporas en el papel defectuoso. Basándose en la bibliografía y los resultados del propio laboratorio de los inventores (datos no presentados) se sabe que dicho tratamiento no es eficaz en la destrucción de esporas bacterianas maduras. Para un control eficaz de las esporas en el proceso de fabricación del papel, es por tanto más factible económicamente controlar la formación de nuevas esporas en el proceso que intentar destruir las esporas maduras.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para monitorización cuantitativa de endosporas bacterianas en un entorno acuoso de una fábrica de papel o cartón, comprendiendo el método al menos los pasos siguientes
- 5 - obtener al menos una primera muestra acuosa y al menos una segunda muestra acuosa procedente del entorno acuoso industrial,
- destruir las bacterias en forma vegetativa existentes en la primera muestra por un tratamiento adecuado, preferiblemente por calentamiento de la primera muestra a una temperatura deseada,
- añadir un agente de intercalación a la primera muestra tratada y dejar que el mismo interaccione con las bacterias destruidas,
- 10 - determinar el nivel de endosporas en la primera muestra utilizando la reacción cuantitativa en cadena de polimerasa (qPCR),
- determinar la cantidad de células bacterianas en forma vegetativa en la segunda muestra, y
- comparar el nivel de endosporas determinado de la primera muestra con la cantidad determinada de células bacterianas vegetativas en la segunda muestra y utilizar la información obtenida para ajuste del régimen de alimentación de biocida para control de las endosporas en el proceso de fabricación de papel o cartón.
- 15
2. Un método conforme a la reivindicación 1, caracterizado por alimentar al menos un biocida al entorno acuoso, y determinar la cantidad alimentada del biocida sobre la base del nivel de endosporas determinado.
3. Un método conforme a la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que la destrucción de las bacterias en forma vegetativa se realiza por calentamiento de la primera muestra a una temperatura deseada de al menos 60°C, preferiblemente de al menos 70°C, más preferiblemente al menos 75°C.
- 20
4. Un método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-3 anteriores, caracterizado por la filtración de la primera muestra antes del paso de destrucción, p. ej. por calentamiento, a fin de separar de la muestra el material particulado sólido.
5. Un método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-4 anteriores, caracterizado por que el agente de intercalación se selecciona de monoazida de propidio (PMA), monoazida de etidio (EMA), bromuro de etidio, berberina, proflavina, daunomicina, doxorubicina y talidomida, preferiblemente de monoazida de propidio (PMA).
- 25
6. Un método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-5 anteriores, caracterizado por añadir el agente de intercalación en una concentración <100 µM, preferiblemente en el intervalo de 10-90 µM, más preferiblemente 25-75 µM, todavía más preferiblemente 40-60 µM.
- 30
7. Un método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-6 anteriores, caracterizado por dejar que la primera muestra se incube en la oscuridad después de la adición del agente de intercalación durante 1-30 minutos, preferiblemente 2-10 minutos, más preferiblemente 4-6 minutos.
8. Un método conforme a la reivindicación 7, caracterizado por exponer la primera muestra incubada a luz que tiene una longitud de onda de aproximadamente 400-500 nm, durante 1-30 minutos, preferiblemente 2-10 minutos,
- 35 más preferiblemente 4-6 minutos.
9. Un método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-8 anteriores, caracterizado por que el tiempo total desde el comienzo del paso de destrucción al final del paso qPCR es menor que 24 horas, preferiblemente 6-24 horas, más preferiblemente 7-9 horas.
10. Un método conforme a la reivindicación 9, caracterizado por que las endosporas bacterianas son endosporas de *Bacillus*, *Brevibacillus* y/o *Paenibacillus*.
- 40
11. Uso de un método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para la producción de papel o cartón de calidad para envasado de alimentos y/o líquidos.
12. Uso conforme a la reivindicación 11, caracterizado por que el gramaje del cartón de calidad para envasado es 150-400 g/m², preferiblemente 200-360 g/m², más preferiblemente 240-300 g/m².