

ENKAPSULIRANI BIOCID ZA OBVLADOVANJE MIKROORGANIZMOV

DEVELOPMENT OF ENCAPSULATED BIOCIDAL AGENT FOR THE CONTROL OF MICROORGANISMS IN PAPERMAKING

Matej ŠUŠTARŠIČ¹, Ivan GRČAR², Barbara ŠUMIGA¹, Jan SLUNEČKO¹

IZVLEČEK

Mikroorganizmi vstopajo v krogotoke papirnega stroja preko vhodnih surovin, papirniških dodatkov ali procesnih vod. Procesne vode papirnega stroja pa kontaminirajo tudi mikroorganizmi v biofilmih in oblogah, ki so v težje dostopnih delih papirnega stroja. Iz biofilma se mikroorganizmi odlepljajo in se v ugodnih razmerah uspešno razmnožujejo v krogotokih ter kolonizirajo nove habitate papirnega stroja. V primerih, ko se prekomerno razmnožijo, lahko v procesu proizvodnje povzročajo težave ali pa kontaminirajo končni izdelek. Papirnice obvladujejo nastajanje težav z uporabo biocidnih sistemov, ki so lahko bioakumulativni in za okolje manj sprejemljivi. V zadnjem času pa sledijo sodobnim trendom uporabe naprednih tehnik kavitacije in enkapsuliranja aktivnih komponent za obvladovanje mikroorganizmov, tako v procesnih vodah kot na končnih izdelkih. V raziskavi smo preverili možnost uporabe oksidirajočega biocidnega sredstva Persana S15, okolju sprejemljivejšega biocidnega sredstva, za obvladovanje *Pseudomonas aeruginosa*. Odziv populacije v bioreaktorju smo primerjali z odzivom populacije v bioreaktorju, kjer biocida nismo dozirali. Poleg odziva populacije smo v obeh bioreaktorjih spremljali tudi osnovne kemijske parametre; koncentracijo kisika, pH vrednost in oksidoredukcijski potencial. Rezultati naše raziskave kažejo, da dodajanje Persana S15 v PPM koncentracijah bistveno ne spreminja kemijskih parametrov v primerjavi z bioreaktorjem, kjer biocida nismo dodajali, njegova učinkovitost v nizkih koncentracijah pa ga uvršča med kandidate za razvoj enkapsuliranega biocidnega sistema. Takšen biocidni sistem s tarčnim delovanjem bi lahko omogočil učinkovito obvladovanje mikrobioloških dejavnikov in to tudi pri težje dosegljivih delih papirnega stroja.

Ključne besede: proizvodnja papirja, mikrobiologija, obvladovanj, biocid Persan S 15, mikroorganizmi *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

*Microorganisms enter the circuits of the paper machine through raw materials, additives or water. Another way is through biofilms and deposits in the remote parts of the paper machine or parts that are difficult to reach. Microorganisms can detach from biofilms and successfully reproduce in favorable conditions of paper machine circuits. Afterwards, they colonize new habitats of the paper machine and if they multiply excessively, can cause problems in the paper production process or contaminate the final product. Paper mills manage the rise of microbiological problems by adding biocidal systems to the circuits, which can depress the reproduction of microorganisms on the one hand, but can be bioaccumulative and environmentally less acceptable on the other. In the field of microbial control, new trends which use environmentally more acceptable technologies, such as cavitation and encapsulation, have been emerging. The application of new technologies for the control of microorganisms in process waters is also an important trend in papermaking. In this study, we examined the possibility of using the oxidizing agent Persan S15 as an environmentally acceptable biocidal agent to control *Pseudomonas aeruginosa*. The response of the population in the bioreactor with Persan S15 was compared to the response of the population in the bioreactor where the biocide was not added. In addition to the population response, the basic chemical parameters were monitored in both bioreactors including oxygen concentration, pH value, and ORP potential. The results of our research show that the addition of Persan S15 to concentrations in ppm does not have significant influence on chemical parameters in comparison to the bioreactor without the addition of the biocide. The effectiveness of Persan S15 as a microbiological agent in low concentrations ranks it among candidates for the development of an encapsulated biocidal system. Such a targeted acting biocidal system could enable the effective control of microbiological factors in the parts of the paper machine that are difficult to reach.*

Keywords: papermaking, microbiology, biocidal agent Persan S 15, *Pseudomonas aeruginosa*

1 UVOD

V procesu proizvodnje papirja vstopajo mikroorganizmi preko vhodnih surovin (primarne, sekundarne surovine), dodatkov in vode [1]. V ugodnih pogojih papirnic (ustrezen pH, T, oksidoredukcijski potencial in hranila) se mikroorganizmi hitro razmnožujejo in zato lahko povzročajo težave v procesu proizvodnje [2] ali kontaminirajo končni izdelek [3, 4]. Razrast mikroorganizmov zato papirnice obvladujejo predvsem z dodajanjem različnih biocidnih sredstev in s čiščenjem procesnih voda [1, 2, 5].

Biocidna sredstva, uporabljena pri proizvodnji papirja, so lahko bioakumula-

tivna in se kopičijo v prehranski verigi. Vedno bolj omejujoča okoljska merila in zakonodajne zahteve, usmerjene v uporabo okolju sprejemljivih kemikalij in tehnologij, zahtevajo uporabo bolj naravnih sredstev, čemur sledijo tudi papirnice. Okoljski znak okoljska marjetica tako omejuje uporabo bioakumulativnih biocidnih sredstev, hkrati pa dovoljuje uporabo drugih – ne bioakumulativnih biocidov, kamor sodi tudi Persan S15 [5–8]. Zaradi zahtev po razvoju in uporabi okoljsko sprejemljivejših tehnologij, se iščejo nove smeri razvoja in uporabe dezinfekcijskih tehnologij, kakršni sta kavitacija in tehnologija enkapsuliranja [9, 14].

Mikrobiološka sestava papirniških združb je raznolika, zato je delovanje biocidnih sredstev odvisno od vrstne sestave mikroorganizmov, kemijsko-fizikalnih pogojev procesa proizvodnje, načina doziranja biocidnega sredstva, pritrjenosti/nepitrjenosti organizmov in vrste papirja [1, 2, 5]. Papirni stroj deluje kot ekosistem v malem [1], zato je spremljanje bioloških dejavnikov od vhodnih surovin do končnega izdelka največkrat nujno potrebno. Poleg vhodnih surovin so izvor okužb tudi mikroorganizmi v biofilmih in oblogah papirnega stroja, katerih obvladovanje je še posebej težavno zaradi težko dostopnih mest [9].

Za uspešno obvladovanje je zato pomemben razvoj tarčno specifičnih biocidnih sredstev s kontroliranim sproščanjem, ki dosežejo takšna mesta in omogočajo kontrolirano sproščanje aktivne snovi. Zadnje pomeni prednost pri obvladovanju mikrobioloških dejavnikov, saj je delovanje lokalno, z višjimi koncentracijami biocidne učinkovine in posledično tudi cenejše.

Velik poudarek pri razvoju novih biocidnih sistemov je zato potrebno nameniti lokalnemu spremljanju odziva populacije organizmov, vplivu dodane aktivne učinkovine na biološke dejavnike in spremembam osnovnih kemijskih parametrov. V naši raziskavi smo preverili uporabo biocidnega sredstva Persan S15 kot potencialno aktivno učinkovino za enkapsuliranje in uspešno obvladovanje mikrobiološke združbe.

Persan S15 (PS15) je okoljsko sprejemljivo biocidno sredstvo, saj vsebuje dezinfekcijski komponenti: perocetno kislino in vodikov peroksid, ki ju najdemo tudi v naravi. Perocetna kislina (PAA) je močno oksidacijsko sredstvo z odličnimi dezinfekcijskimi lastnostmi. Deluje v nizkih koncentracijah in na širok spekter, tako po Gramu pozitivnih kot po Gramu negativnih bakterij, plesni in kvasovk. Učinkovita je proti anaerobnim in sporulirajočim bakterijam, v nizkih koncentracijah pa učinkuje tudi na biofilme [10]. Zato se PAA uporablja za pripravo industrijskih hladilnih vod in v procesu proizvodnje papirja [10–12].

Osnovni princip delovanja peroksiocetne kisline (PAA) je raztrganje celične membrane. Peroksidna oz. peroksiacetatna ion naj bi oksidirala sulfidril -SH in žveplove S-S vezi v encimih in tako porušila pomemben del celične membrane. PAA moti kemiosmotsko funkcijo membranskega transporta, oksidira encime, s čimer slabi vitalne biokemične poti, aktivni transport skozi membrane in intracelične topnostne stopnje [13].

V raziskavi smo za modelni organizem izbrali bakterijo *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), ki je bila večkrat izolirana iz papirniških voda [14, 15], in je ena izmed neželenih vrst bakterij na končnem izdelku, zlasti pri materialih namenjenih osebni negi [3, 4]. Razen v vodah je bila prisotnost bakterije potrjena tudi v različnih papirniških oblogah, kar nakazuje na to, da njena prisotnost v mrtvih rokavih lahko povzroča bakterijsko kontaminacijo papirnega stroja [14]. Prav prisotnost bakterije, tako v vodah kot v oblogah, je bil razlog za izbor bakterije za modelni organizem študije. *P. aeruginosa* (PA) je ubikvitarana, Gram negativna, ravna do rahlo ukrivljena palčka, velikosti od 0,5–1x 1,5–5 µm s tipičnim respiratornim metabolizmom in kisikom kot končnim akceptorjem elektronov [18].

2 MATERIALI IN METODE

Bioreaktor

Uporabili smo dva bioreaktorja; bioreaktor slepa (B_2) in bioreaktor biocid (B_B). Oba bioreaktorja smo opremili z zračno črpalko, ki je omogočala stalen dotok zraka (kisika). Zrak smo vodili preko sterilizacijskega filtra z velikostjo por 0,22 µm.

Medij

Uporabili smo medij, pripravljen s kombinacijo gojišč Standard count agar (SCA) (Merck 1.01621.0500) in Cetrimide agar (Merck 1.05284.0500), v razmerju 1 : 1. Po sterilizaciji medija (121 °C, 25 minut) smo k 300 ml pripravljene gojišča dodali 1000 ml sterilne deionizirane vode in homogenizirali z mešanjem na magnetnem mešalu (600 obratov/min., 1,5 h, aseptični pogoji). Bioreaktorja smo inkubirali pri 37 °C.

Inokulum

Uporabili smo *P. aeruginosa* (ATCC 27853), namnožen na gojišču SCA (inkubacija 72 h, 37 °C). Maceracijo bakterije smo pripravili v raztopini Ringer (Merck 1.15525.0001). Število bakterij v inokulumu smo določili z direktnim štetjem pod mikroskopom. Založna raztopina biocida: pripravili smo 2500 PPM založne koncentracije biocida PS15.

Opis eksperimenta

V homogeni medij smo dodali bakterijo PA do končne koncentracije 10^5 bakterij/ml. Suspenzijo smo homogenizirali (aseptično) na laboratorijskem mešalu (30 minut, 600 obratov/min., sobna temperatura). Inokuliran medij smo nato prenesli v B_B in B_2 . Oba bioreaktorja smo ob sočasnem vpihovanju zraka inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo v B_B dodali založno raztopino PS15 ali sterilno raztopino Ringer in iz bioreaktorja odvzeli vzorec za izvedbo kemijskih in mikrobioloških meritev.

Mikrobiološka analitika

Po odvzemu vzorca iz bioreaktorja smo izvedli določitev ugotavljanja števila PA z uporabno standardnega gojišča SCA, po 48 h inkubacije na 37 °C.

Kemijska analitika

Po odvzemu vzorca smo izvedli določitev pH vrednosti, koncentracije kisika in oksidoredukcijskega (ORP) potenciala. Meritve smo opravili v treh ponovitvah, rezultat pa podali kot srednjo vrednost meritev. pH vrednosti smo določali po točki 7.3 standarda SIST ISO 6588-1:2013 pH vodnega ekstrakta.

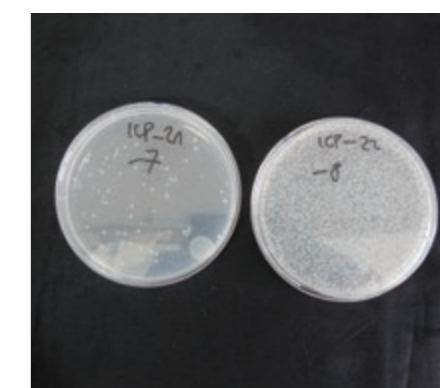
3 REZULTATI IN KOMENTAR

Temperatura, prisotnost kisika in hranil v mediju predstavljajo ugodne razmere za razvoj PA. Pogoji v bioreaktorju so podob-

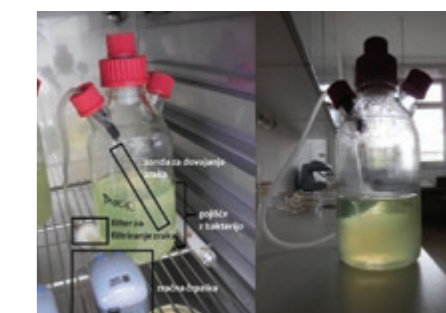
ni pogojem v papirnicah (pH, prisotnost kisika, ugodna temperatura), izoliran sistem bioreaktorja pa omogoča spremljanje razvoja številčnosti populacije mikroorganizma in spremljanje osnovnih kemijskih parametrov ob spreminjanju le enega dejavnika – dodatka biocida.

Dodatek biocidnega sredstva PS15 v B_B pomeni spreminjajoči dejavnik, ki vpliva na razvoj populacije. Ta bi se sicer razvijala podobno kot v B_2 , kjer biocid ni dodan. To nam je omogočilo spremljanje odziva populacije mikroorganizma v različnih fazah razvoja in vpliva dodatka PS15 na kemijske parametre.

Razvoj populacije mikroorganizma smo spremljali z uporabo števne metode na gojišču (Slika 1). Povečevanje biomase je bilo vidno kot sprememba motnosti gojišča že med eksperimentom, ob koncu pa kot posedena biomasa (Slika 2).



Slika 1: *P. aeruginosa* na gojišču SCA, 10.000.000x redčitev ICP 21 (B_B , 144 h po inokulaciji) in ICP-22 100.000.000x redčitev (B_2 , 144 h po inokulaciji)
Figure 1: *P. aeruginosa* on the SCA farm, 10,000,000 x dilution of ICP 21 (B_B , 144 h after inoculation) and ICP-22 100,000,000 x dilution (B_2 , 144 h after inoculation)



Slika 2: B_B (levo), posedena biomasa v B_B ob koncu eksperimenta (desno)
Figure 2: B_B (left), settled biomass in B_B at the end of the experiment (right)

Filtriranje zraka skozi laboratorijski filter z velikostjo por 0,22 µm, namenjeno sterilni filtraciji tekočin, ni preprečilo prehoda organizmov iz okolice v bioreaktor. Prisotnost neželenih organizmov smo prepoznali kot pojav netipičnih kolonij na gojišču. Prisotna je bila v obeh bioreaktorjih. Rezultati so zbrani v Preglednici 1.

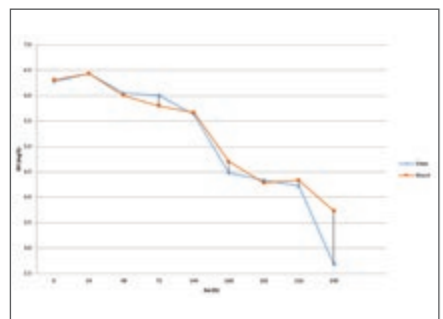
Preglednica 1: Vzorci neklejenega in različno površinsko klejenega celuloznega (C) in bombažno-celuloznega (BC) papirja

Table 1: Unsized and surface sized samples of cellulose (C) and cotton-cellulose (BC) paper

Čas (h)	Koncentracija biocida v mediju	Bioreaktor				
		pH (/)	T (°C)	O ₂ (mg/L)	redox (mV)	Pseudomonas aeruginosa (CFU/ml)
0	0 PPM	6,9	33,8	6,3	287,3	8,7 x 10 ⁶
	0 PPM	6,9	33,7	6,3	292,7	1,1 x 10 ⁷
24	2,5 PPM	8,1	33,2	6,4	197,0	9,7 x 10 ⁸
	0 PPM	8,1	33,6	6,4	203,0	1,6 x 10 ⁹
48	5,0 PPM	8,1	33,5	6,0	170,7	1,5 x 10 ¹⁰
	0 PPM	8,1	33,5	6,0	220,0	2,0 x 10 ¹⁰
72	10,0 PPM	8,1	33,5	5,8	192,3	9,2 x 10 ⁹
	0 PPM	8,2	33,4	6,0	225,7	2,2 x 10 ¹¹
144	10,0 PPM	8,3	33,4	5,7	138,3	1,2 x 10 ⁹
	0 PPM	8,5	32,9	5,6	162,3	1,4 x 10 ¹¹
168	25,0 PPM	8,4	32,9	4,7	115,7	4,2 x 10 ⁶
	0 PPM	8,4	32,8	4,5	129,0	3,1 x 10 ¹⁰
192	10,0 PPM	8,5	33,9	4,3	128,7	1,1 x 10 ⁶
	0 PPM	8,3	33,7	4,3	121,3	1,5 x 10 ¹¹
216	10,0 PPM	8,4	33,8	4,3	120,0	6,7 x 10 ⁷
	0 PPM	8,3	33,6	4,2	122,7	1,6 x 10 ¹¹
240	10,0 PPM	8,5	33,3	3,7	97,0	1,6 x 10 ⁸
	0 PPM	8,5	32,2	2,7	106,0	3,0 x 10 ¹⁰

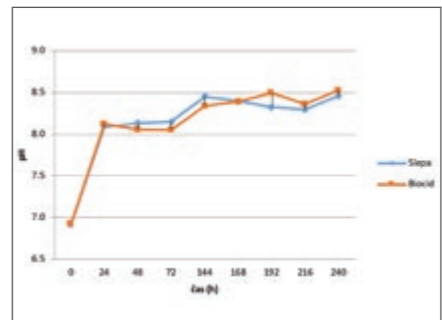
* dodana založna raztopina biocida PS15 (koncentracija 2500 ppm)
* added stock solution of the PS15 biocide (concentration of 2,500 ppm)

Koncentracija kisika je v času eksperimenta upadala v obeh bioreaktorjih (Slika 3). Začetna koncentracija kisika je bila v obeh bioreaktorjih nekoliko nad 6 mg O₂/l, ob koncu eksperimenta pa je v B₅ upadla na približno 2,5 mg O₂/l, v B₈ pa na 3,5 mg O₂/l. PA je fakultatívna aerobna bakterija, ki v prisotnosti kisika oksidira organske snovi do CO₂ in vode. Aerobni metabolizem je v primeru ugodnih pogojev okolja pri mikroorganizmih, ki lahko izbirajo metabolizem, favoriziran, saj jim omogoča sproščanje večjega deleža energije in posledično hitrejše razmnoževanje. S Slike 3 lahko razberemo, da je količina raztopljenega kisika v B₅ upadala hitreje, kar lahko pripišemo višji koncentraciji bakterij. Koncentracija bakterij v BS je bila od 48 h dalje višja kakor v B₈. Najvišjo razliko v številu smo opazili ravno v zadnji točki na koncu eksperimenta



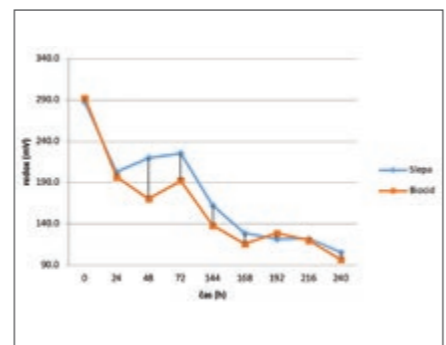
Slika 3: Količina kisika v odvisnosti od časa inkubacije
Figure 3: Oxygen quantity depending on incubation time

Vrednosti merjenja pH kažejo na premik nevtralne pH vrednosti gojišča na začetku eksperimenta (pH okoli 7) do bazične pH vrednosti (konec eksperimenta). V začetnih časovnih intervalih eksperimenta opazimo, da je pH vrednost v B₈ nižja od pH vrednosti v B₅ (Slika 4). Vzrokov za to je verjetno več. Eden je gotovo vpliv dodatka PS15, ki ima kisel značaj, prav tako pa na pH vrednost vpliva upad koncentracije kisika. Zadnji lahko povzroči spremembo metabolizma PA in povzroči nastajanje nepopolno oksidiranih snovi ter posledično zakisanje medija. Po 168 h inkubaciji opazimo spremembo trenda; pH v B₅ upade bolj kot v B₈. Razlago za to lahko iščemo v znatnem povišanju števila organizmov PA v BS, hitrejšem upadu kisika in spremembi metabolizma. Takšen trend ostane opazen do konca eksperimenta.



Slika 4: pH vrednost v odvisnosti od časa inkubacije in dodanega biocida
Figure 4: pH value depending on incubation time and added biocidetime

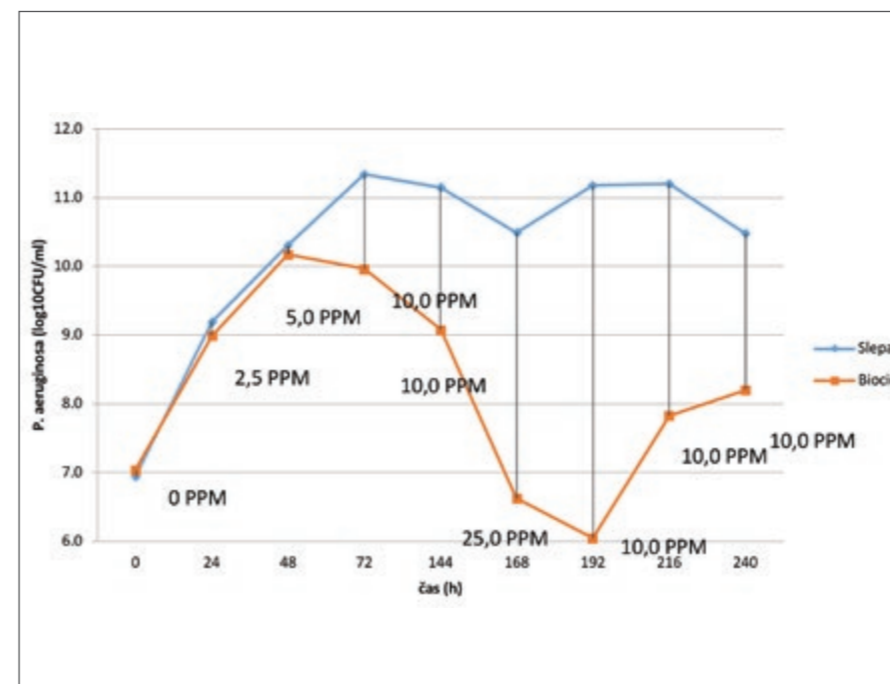
Oksidacijsko-redukcijske reakcije opišejo prenos elektronov med atomi, molekulami in ioni, medtem ko oksidoredukcijski potencial (ORP) opiše razpoložljivost prostih elektronov in oksidacijsko ali redukcijsko tendenco medija. Meritve ORP se zato uporabljajo pri ugotavljanju dezinfekcijskih učinkov, nitrifikacijskega procesa, korozije, pogojev za precipitacijo železa in mangana [19]. Zaradi zadnjega smo meritve ORP vključili tudi v našo raziskavo. ORP upada podobno kot kisik v obeh bioreaktorjih od začetka eksperimenta (Slika 5). Ves čas poteka eksperimenta je ORP pozitiven, kar nakazuje na oksidacijske razmere. Nižanje potenciala v obeh bioreaktorjih pa lahko iščemo v porabi kisika kot končnega akceptorja elektronov s strani PA, s tem pa nižanje koncentracije kisika kot oksidanta v mediju. Največje razlike v ORP smo opazili med B₅ in B₈ v časovni točki 48 h. Zanimivo je tudi to, da je ORP v B₈ ostajal nižji od ORP v B₅, čeprav smo v B₈ dodajali oksidirajočo komponento, ki bi morala zviševati ORP potencial. Vzroka za to nam ni uspelo ugotoviti.



Slika 5: ORP v odvisnosti od časa inkubacije in dodanega biocida
Figure 5: ORP depending on incubation time and added biocide

Številčnost PA med eksperimentom se spreminja. V začetnih fazah opazimo izjemno skokovito razmnoževanje mikroorganizma, ki smo ga prenesli s standardnega gojišča (Slika 6).

Tako v B₅ kot B₈ vidimo, da je organizem do točke 48 h (BB) oz. 72 h (B₅) v fazi eksponentne rasti oz. v t. i. log fazi. Lag faze, to je faza, v kateri se organizem prilagaja novim pogojem, pa nismo opazili [20]. Odsotnost lag faze lahko iščemo v gojitvenih pogojih, saj smo prenesli organizem iz gojišča z zelo podobno kemično sestavo, zato organizem ne potrebuje posebnega prilagajanja oz. je zadnje močno skrajšano. Po dodatku biocida v nizki koncentraciji 2,5 ppm oz. 5 ppm smo opazili, da se je populacija sicer zmanjšala, vendar se je eksponentna faza, v kateri se je organizem nahajal, nadaljevala. 72 h po inokulaciji smo opazili, da je število organizmov v bioreaktorju slepa doseglo plato oz.



Slika 6: Populacija PA v odvisnosti od časa inkubacije in dodanega biocida
Figure 6: PA population depending on incubation time and added biocide

t. i. stacionarno fazo, v kateri se število organizmov bistveno ne spreminja več [20]. Dodatek biocida do končne koncentracije 10 ppm povzroči zmanjšanje števila PA v primerjavi z B₅ za več kot 1 logaritmsko skalo. To pomeni, da je bilo organizmov v B₈ za več kot 95 % manj kot v B₅. Naslednji dodatek PS15 še dodatno zmanjša populacijo PA, tako da je bil upad števila organizmov od predhodne točke v B₈ za 90 %. V primerjavi z B₅ pa je populacija PA znašala manj kot 1 % populacije v B₅.

Najnižja številčnost PA je bila določena v B₈ po 192 h. Takrat je število PA v BS pomenilo samo še 0,001 % številčnosti PA v BS. Dodajanje PS15 v naslednjih točkah je omejilo hitrost naraščanja številčnosti PA, ne pa tudi samega trenda naraščanja populacije. Populacija se je povečala za skoraj dva logaritmska faktorja v 48 h, vendar je bila hitrost naraščanja v primerjavi z začetnimi točkami hitrosti naraščanja v BS bistveno počasnejša. Tam je bila hitrost skoraj 2 logaritmska faktorja v 24 h.

4 ZAKLJUČEK

Rezultati so pokazali, da Persan S15 učinkovito deluje na zmanjšanje številčnosti bakterije *P. aeruginosa*. Odziv populacije na dodano biocidno komponento je odvisen od pogojev, v katerih se nahaja populacija organizma in lokalno lahko povzroči zmanjšanje številčnosti *P. aeruginosa* že v koncentracijah do 10 ppm. Dodatek biocidnega sredstva nima bistvenega vpliva na spremembo koncentracije kisika v sistemu, pH vrednosti ali bistvenejših sprememb na ORP potencial ali pa so zadnje majhne in lokalno omejene.

ZAHVALA ACKNOWLEDGEMENTS

Raziskava je bila financirana s strani VAVČERJA POLY4EMI »Biodegradable microcapsules for disinfection of paper machine wet end«.

The research was funded by the Poly4EmI voucher "Biodegradable microcapsules for disinfection of paper machine wet end."

5 REFERENCE

[1] ŠUŠTARŠIČ, M. Papirni stroj – ekosistem v malem? Papir, 2011, št. 5, str. 26–29.
[2] IVANUŠ, A. Mikrobiološka problematika v papirni industriji, 2- kongres slovenskih mikrobiologov z mednarodno udeležbo, Bole-Hribovšek, V., Oceppek, M., Klun, N., str. 359–362, Portorož, september 1998
[3] ŠUŠTARŠIČ, M.. Mikrobiološke lastnosti toaletnih papirjev. Papir, 2015, št. 14, str. 32–35.
[4] IVANUŠ, A. Mikrobiološka kakovost papirja, kartona in lepenke. Papir, 1997, št. 3–4, str. 42–44
[5] IVANUŠ, A. Reševanje mikrobioloških težav na papirnih strojih. Papir, 2005, št. 2, str. 29–31
[6] ODLOČBA KOMISIJE z dne 9. julija 2009 o določitvi okoljskih meril za podeljevanje znaka za okolje Skupnosti tissue papirju za higienske namene uporabe. Dostopno na spletu: http://www.arso.gov.si/0%20agenciji/okoljski%20znaki/Ecolabel/2009_568_ES.pdf
[7] ROSSMORE, H.W. Handbook of biocide and preservative use. Peta izdaja. Houten: Springer-science Busines media, B.V., 1995, 83–85. str.
[8] RONING, C. Europe-wide analysis of paper mill microbial problems. Master of science, 2001, str. 34
[9] ŠUŠTARŠIČ, M., PETKOVŠEK, M.. Kavitation – tehnologija obvladovanja! mikrobioloških

dejavnikov tudi v papirni industriji? 7. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva, str. 130, V: VODOVNIK, M., KUŠAR, D., MARINŠEK-LOGAR, R., 20.–22. Bled, Slovenija. Ljubljana september 2017

[10] KALARI, M., NUUTINEN J., SALKINOJA – SALONEN, M.S. Mechanisms of biofilm formation in paper machine by *Bacillus* species: the role of *Deinococcus geothermalis*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2001, vol 27, str. 343–351

[11] BALDRY, M. G. C.: The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties ...; J. of Applied Bact., 1983, 54, 417–23.

[12] IVANUŠ, A., GRČAR, I.: Microbiology in Papermaking – Green Biocide Application; Madrid, 25–26 Oct. 2000; (COST E-17)

[13] FRASER J. A. L.: Peroxygens in environmental protection; Effluent and Water Treatment J., 1986.

[14] VIJAYALAKSHMI, V., SENTHILKUMAR, P., MOPHIN-KANI, K., SIVAMANI, S., SIVARAJASEKAR, N., VASANTHARAJ, S. Bio-degradation of Bisphenol A by *Pseudomonas aeruginosa* Pab1 isolated from effluent of thermal paper industry: Kinetic modeling and process optimization. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 2018, vol. 11, št. 1, str. 56–65

[15] HENDRY, G.S., JANHURST, S., HORSNELL, G. Some effects of pulp and paper wastewater on microbiological water quality of a river. Water Research, 1982, vol. 16, št. 7, str. 1291–1295

[16] KRAMER, J.F. Peracetic Acid: A New Biocide For Industrial Water Applications, 1997, NACE International, Conference Paper

[17] HOLT G., J., KRIEG R., N., SNEATH A. H., P., STALEY T., J., WILLIAMS T., S., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition, str. 94,151, 168, 428

[18] BOH PODGORNIK, B., ŠUMIGA, B., GOLJA, B., ŠUŠTARŠIČ, M., ŠUMIGA, B., RAVNIAK, D. Synthesis, coating and evaluation of antimicrobial microcapsules on paper. V: URBAS, R., PUŠNIK, N., Abstracts, 8th Conference on Information and Graphic Arts Technology, str. 121–122, Ljubljana, 7.–8. junij 2018.

[19] VONGVICHIANKUL, C., DEEBAO, J., KHONGNAKORN, W. Relationship between pH, Oxidation Reduction Potential (ORP) and Biogas Production in Mesophilic Screw Anaerobic Digester, PoglEnergy Procedia, 2017, vol 138, str. 877–882

[20] MAIER, R., M. Poglavlje 3: Bacterial Growth. V Environmental Microbiology, M. MAIER R. M., PEPPER CHARLES, L. I., GERBA, P., Elsevier Inc., London, 2009, str. 37–53

¹Inštitut za celulozo in papir,

²Belinka Perkemija, d. o. o.