

Ispitivanje biorazgradljivosti papira s celuloznom pulpom slame žitarica

Dubravac, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:505102>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Dubravac

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, ožujak 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ EKOINŽENJERSTVO

Lucija Dubravac

**ISPITIVANJE BIORAZGRADLJIVOSTI PAPIRA S CELULOZONOM
PULPOM SLAME ŽITARICA**

ZAVRŠNI RAD

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Komentor: Izv.prof.dr.sc. Ivana Plazonić, Sveučilište u
Zagrebu Grafički fakultet

Članovi ispitnog povjerenstva:

izv.prof.dr.sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije

dr.sc. Martina Miloloža, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva
i tehnologije

dr.sc. Lidija Furač, viši predavač, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije

Zagreb, ožujak 2024.



Ovaj završni rad izrađen je u sklopu projekta „Otiskivanje, kvaliteta i uporabljivost podloga s ne-drvnim vlakancima“ (UIP-2017-05-2573) Hrvatske zaklade za znanost na Sveučilištu u Zagrebu Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.

ZAHVALA

Na početku ovog rada htjela bih se zahvaliti mentorici izv.prof.dr.sc. Dajana Kučić Grgić na vodstvu i podršci kroz izradu rada, savjetima, ažurnosti, te najviše od svega, ugodnoj radnoj atmosferi.

Veliko hvala i dr.sc. Martini Miloloži, ponajprije na prijateljskom pristupu i uvijek veseloj atmosferi u laboratoriju, a zatim na svim savjetima, trudu i strpljenju bez kojeg moje prvo eksperimentalno istraživanje ne bi bilo moguće.

Zahvaljujem se svim kolegama i prijateljima na veselju koje ste mi pružili tijekom studija i učinili ovo nezaboravnim dijelom života.

Najviše se zahvaljujem mojim roditeljima, na svojoj podršci i usmjeravanju kroz cijelo moje školovanje.

SAŽETAK

Prekomjerna uporaba sintetičkih materijala i posljedice njihove trajnosti u okolišu potaknula je razvoj novih, održivih materijala dobivenih iz lignocelulozne biomase. Celulozna vlakna dobivena iz slame žitarica imaju potencijal za različite primjene, uključujući proizvodnju papira i tekstila.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati biorazgradivosti i ekotoksičnosti neotisnutih i otisnutih papira s celuloznom pulpom slame žitarica. Pokus biorazgradnje papira proveden je u uzorku vrtnog tla s dodatkom suspenzije mješovite kulture bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i plijesni *Trichoderma* sp., pri čemu su praćeni gubitci u masi te promjene u strukturi papira optičkim mikroskopom. Dobiveni rezultati ukazuju da se papir na koji nije otisnuta boja bolje biorazgradio od otisnutog papira. Otisnuti i neotisnuti papiri nisu se pokazali ekotoksičnim prema vodenoj leći *Lemna minor*.

Ključne riječi: lignocelulozni materijali, slama žitarica, biorazgradljivost, ekotoksičnost

ABSTRACT

The excessive use of synthetic materials and their long-term impact on the environment have spurred the development of new, sustainable materials sourced from lignocellulosic biomass. Cellulose fibers obtained from cereal straw have emerged as a promising candidate for various applications, including paper and textile manufacturing.

This study aimed to assess the biodegradability and ecotoxicity of papers with cereal straw pulp, both printed and unprinted. Biodegradation experiments were conducted using a garden soil sample supplemented with a mixed culture of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and fungi *Trichoderma* sp. The experiments monitored mass losses and structural changes in the paper using a light microscope. The results indicate that unprinted paper exhibited better biodegradability compared to printed paper. Moreover, neither printed nor unprinted paper showed ecotoxic effects on *Lemna minor*.

Key words: lignocellulosic materials, wheat straw, biodegradability, ecotoxicity

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. Uvod..... | 1 |
| 2. Opći dio..... | 3 |
| 2.1. Lignocelulozni materijali..... | 3 |
| 2.1.1. Celuloza..... | 3 |
| 2.1.2. Hemiceluloza..... | 4 |
| 2.1.3. Lignin..... | 5 |
| 2.2. Celulozna vlakanca..... | 6 |
| 2.2.1. Sirovine za izdvajanje celuloznih vlakanaca..... | 7 |
| 2.2.2. Slama žitarica kao sirovina za izdvajanje celuloznih vlakanaca..... | 8 |
| 2.2.3. Izdvajanje celuloznih vlakanaca iz sirovine..... | 9 |
| 2.3. Biorazgradnja celuloze..... | 9 |
| 2.3.3. Mikroorganizmi uključeni u razgradnju celuloze..... | 11 |
| 2.3.4. Hidrolitički mehanizam razgradnje celuloze..... | 14 |
| 2.3.4. Oksidacijski mehanizam razgradnje celuloze..... | 15 |
| 2.4. Ekotoksikologija..... | 16 |
| 2.4.1. Test ekotoksičnosti na vodenoj leći..... | 18 |
| 3. Eksperimentalni dio..... | 20 |
| 3.1. Materijali..... | 20 |
| 3.1.1. Papir sa celuloznom pulpom slame žitarica..... | 20 |
| 3.1.2. Testni organizam za provedbu testa toksičnosti..... | 25 |
| 3.2. Mediji i kemikalije..... | 26 |
| 3.2.1. Hranjive podloge..... | 26 |
| 3.2.2. Fiziološka otopina..... | 26 |
| 3.2.3. Steinberg medij..... | 26 |
| 3.3. Mjerni instrumenti i oprema..... | 27 |
| 3.4. Metode rada..... | 27 |
| 3.4.1. Priprema papira..... | 27 |
| 3.4.2. Provođenje pokusa biorazgradnje papira u tlu..... | 27 |
| 3.4.3. Provođenje testa ekotoksičnosti papira primjenom <i>Lemna minor</i> | 28 |
| 4. Rezultati..... | 31 |
| 5. Rasprava..... | 39 |
| 6. Zaključak..... | 41 |
| 7. Literatura..... | 42 |
| 8. Popis oznaka i simbola..... | 50 |
| 9. Životopis..... | 51 |

1. Uvod

Papir te njegova proizvodnja je integralni dio ljudske povijesti kao sredstvo komunikacije, održavanja dokumenata i kreativne ekspresije. Proizvodnja papira se bazira na korištenju obnovljivih prirodnih materijala; najbolji od kojih su drvena i ne-drvena vlakanca te reciklirana vlakna [1]. Porast populacije te ekonomski razvoj u ovom stoljeću povećali su potrebu za raznim proizvodima dobivenih iz šuma, što je rezultiralo povećanom kompeticijom za sirovine u industriji papira [2]. Posljednjih godina prisutna su tri glavna problema u razvoju industrije papira; manjak resursa, onečišćivanje okoliša te razina tehničke opremljenosti [3]. Kao odgovor na razna pitanja o ekološkoj prihvatljivosti proizvodnje papira stvorio se jedan inovativni pothvat; korištenje ne-drvnih sirovina za proizvodnju papira. Ovaj obećavajući koncept uključuje istraživanje alternativnih sirovina poput poljoprivrednih ostataka, vlakana izdvojenih iz raznih biljaka te recikliranih materijala. Spomenute sirovine posjeduju širok spektar fizikalnih i optičkih svojstava koje se mogu iskoristiti za poboljšanje kvalitete papirnih proizvoda [4]. Tako su npr. nanočestice dobivene iz ne-drvnih sirovina pokazale kvalitetnija površinska svojstva kod krajnjeg proizvoda [5]. Iako je upotreba ne-drvnih vlakana za proizvodnju papira do nedavno bila koncentrirana u državama s ograničenom količinom zaliha drva, danas pokazuje rastući trend čak i u državama koje nemaju problema s količinom raspoložive drvene sirovine, upravo zbog ekoloških razloga [6]. Ne-drvena vlakanca mogu se podijeliti u dvije skupine: konvencionalne ne-drvene materijale i specijalizirana ne-drvena vlakanca [7]. Konvencionalni ne-drveni materijali najčešće služe kao zamjena za tvrdu drvenu građu zbog svoje izdržljivosti. Neki primjeri konvencionalnih ne-drvnih sirovina su: slama žitarice, šećerna trska, bambus s kraćom vrstom vlakana, stabljika kukuruza te travke. Druga skupina, specijalizirana ne-drvena vlakanca služe kao zamjena za meko drvo. Lan, bambus s dužom vrstom vlakana te konoplje i kenaf vlakna su samo neka od predstavnika specijaliziranih ne-drvnih vlakana [7]. Preokret prema korištenju ne-drvnih vlakana kao primarne sirovine u industriji papira seže dalje od samih ekoloških faktora, on predstavlja prilike za ekonomski rast i društveni utisak. Komponiranjem poljoprivrednih ostataka u proizvodnju papira potencijalno se otvaraju novi izvori prihoda za farmere te ruralne zajednice općenito, što je korak prema održivoj ekonomiji.

Veliki izazov predstavlja i toksičnost boja koje se koriste u otiskivanju papira, s obzirom na to da značajna količina otisnutog papira završava na odlagalištima otpada. Kada otisnuti papir završi na odlagalištima otpada, izložen je različitim faktorima kao što su vlaga, temperatura i razgradnja, što

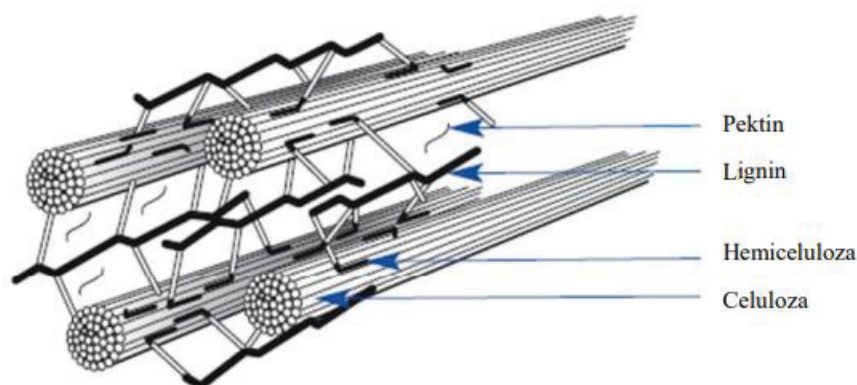
može dovesti do izluživanja toksičnih supstanci, poput teških metala i organskih tvari, iz boja. Ovo izluživanje može onečistiti tlo i vode, štetiti lokalnim ekosistemima i predstavljati rizik po zdravlje ljudi i životinja. Pored toksičnosti boja, i sami materijali od kojih je napravljen papir mogu imati značajan utjecaj na okoliš. Različite vrste papira pokazuju različite razine biorazgradljivosti, što ovisi o procesu proizvodnje samog papira, ali i o drugim čimbenicima poput dodataka i premaza, sastava vlakna, debljine i teksture, i uvjeta razgradnje. Održivi pristup otiskivanja papira uključuje cjelokupni lanac proizvodnje, od izbora materijala i boja do postupaka odlaganja i recikliranja. Sveobuhvatan pristup koji uzima u obzir ekološke, društvene i ekonomske faktore ključan je za stvaranje održivijeg sustava otiskivanja papira koji manje opterećuje okoliš i ljudsko zdravlje. U ovom radu ispitala se biorazgradljivost i ekotoksičnost otisnutog papira napravljenog od celulozne pulpe slame žitarica u usporedbi s neotisnutim novinskim papirom. Pokus biorazgradnje provodio se tijekom 4 tjedna, uz tjedno praćenje gubitka mase, a test ekotoksičnosti uzoraka papira ispitan je na vodenoj leći *Lemni minor*.

2. Opći dio

2.1. Lignocelulozni materijali

Pod pojmom lignocelulozni materijali podrazumijevaju se prirodni materijali sastavljeni od 3 glavne komponente: celuloza, hemiceluloza te lignin (prikazano na Slici 2.1.). Ovi materijali nalaze se u staničnim stijenkama drveća, trava te poljoprivrednih ostataka kao što su slama, kukuruzovina i bagasa, odnosno biomasa šećerne trske, a mogu se obraditi u važne bioproizvode poput biogoriva te biorazgradive plastike. Stanična stijenka u celuloznim vlaknima nije homogena, već je napravljena od primarne i sekundarne stijenke. Primarna stijenka sadrži 9-25% celuloznih mikrovlakana, 25-50% hemiceluloza te 5-25% lignina, dok sekundarna stijenka sadrži 40-80% celuloze, 10-40% hemiceluloze te 5-25% lignina [10].

S procijenjenih proizvedenih 200 milijardi tona godišnje, lignocelulozni materijali predstavljaju obilan izvor čiste, održive i obnovljive energije [11].

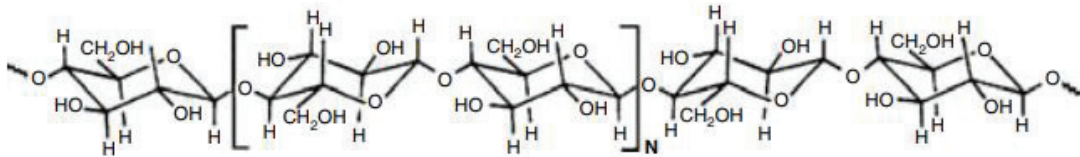


Slika 2.1. Struktura i sastav biljne stanice [12].

2.1.1. Celuloza

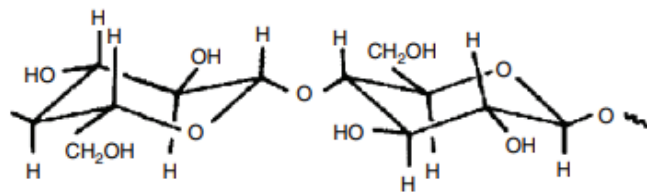
Celuloza je najrasprostranjeniji ugljikov spoj na Zemlji te je osnovna sirovina za proizvodnju papira. Složeni je ugljikohidrat sastavljen od dugih međusobno povezanih lanaca glukoze (Slika 2.2.) te kao takva je odgovorna za strukturalnu podršku i čvrstoću stanične stijenke. Sastoji se od linearnog lanca D-anhidroglukoze ($C_6H_{11}O_5$), jedinica međusobno povezanih β -(1-4)-glikozidnim vezama. Svaki monomer glukoze sastoji se od 3 hidroksilne skupine koje se pozicioniraju na C6 za primarne hidroksilne skupine, a na C2 i C3 za sekundarne hidroksilne skupine koje formiraju

intra- i intermolekularne vodikove veze odgovorne za mnogo fizikalnih svojstava i za kristalnu strukturu celuloze [13]. Celuloza se sastoji i od kristalnih i od amorfni domena. Raspored kristala u svakom prirodnom celuloznom vlaknu je drugačiji ovisno o njegovom izvoru, te im se zbog toga i mehanička svojstva razlikuju [14].



Slika 2.2. Parcijalna struktura celuloze [15].

Ponavljajuća jedinica celuloznog lanca je disaharid celobioza, čija je struktura vidljiva na Slici 2.3.



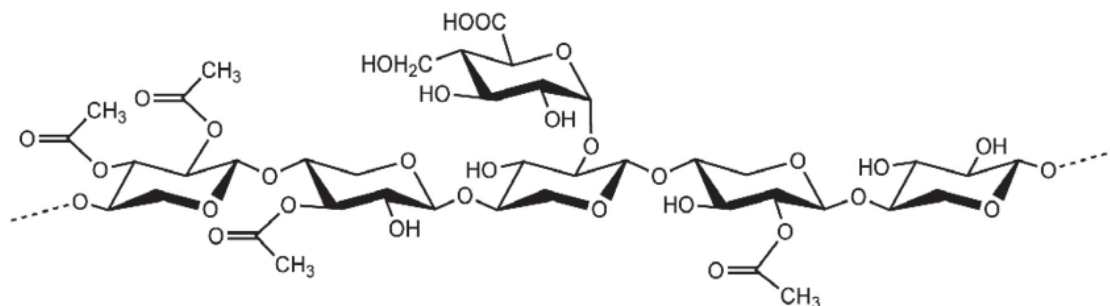
Slika 2.3. Kemijska struktura celobioze [15].

Faktori bitni za biorazgradnju celuloze su kristalna struktura i stupanj supstitucije celuloznih estera. Dokazano je da su i morfološka i kristalna struktura od ključne važnosti za proces biorazgradnje [16]. Esteri celuloze s nižim stupnjem supstitucije su lakše biorazgradivi od onih s višim stupnjem supstitucije [17]. Neka istraživanja pokušala su utvrditi postoji li utjecaj podrijetla celuloze na njenu biorazgradnju, no ovo područje zahtijeva daljnja istraživanja. U ispitivanju celuloznih vlakana tekstila, vještačka svila imala je najviši, a lan najnekonzistentniji stupanj biorazgradljivosti [18].

2.1.2. Hemiceluloza

Hemiceluloza je blisko povezana s celulozom te se zato često zajednički nazivaju holoceluloza. Strukturom je slična celulozi, te se vjeruje da služi kao sredstvo povezivanja celuloze i lignina [19]. Također je polisaharid koji gradi čvrstoću stijenke biljaka, a od glukoze se razlikuje u strukturi; ona je sastavljena od niza povezanih molekula ksiloze, na koje su kao ogranci vezani

drugi šećeri. Struktura je vidljiva na Slici 2.4. Hemiceluloza čini otprilike trećinu biomase stanične stijenke ovisno o vrsti biljke. Hemicelulozni lanac većim dijelom čine heksoze i pentoze te malim udjelom D-glukuronska i/ili D-galakturonska kiselina kao nosioci karboksilne skupine, no detaljne strukture većine drvenih hemiceluloznih vlakana još nisu određene, već su proučavani omjeri šećera navedenih polisaharida [20].



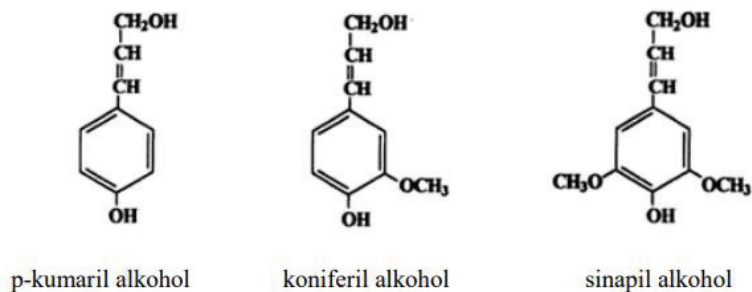
Slika 2.4. Kemijska struktura hemiceluloze [21].

Hemiceluloze se biorazgrađuju do monomernih šećera i octene kiseline. Često su klasificirane po djelovanju na određeni substrat. Ksilan je glavni ugljikohidrat pronađen u hemicelulozi. Njegova kompletna razgradnja zahtijeva zajedničko djelovanje raznih hidrolitičkih enzima [22]. Zbog važnih biotehnoloških eksploatacija ksilanaza, posebice u procesu izbjeljivanja i pulpiranja, pojavila su se mnoga istraživanja posljednjih godina [23]. Hemiceluloze se mogu koristiti za proizvodnju biorazgradivih filmova [24,25], a potencijalnu funkciju imaju i u medicini zbog svoje biokompatibilnosti i antikancerogenog djelovanja [26].

2.1.3. Lignin

Posljednja komponenta, lignin, je aromatični polimer sastavljen od amorfnih spojeva, a nalazi se uglavnom u sekundarnoj stijenci biljaka. Na slici 2.5. prikazane su tri osnovne monomerne jedinice koje se ponavljaju u molekuli lignina: p-kumaril alkohol, koniferil alkohol te sinapil alkohol, no više istraživanja je pokazalo da lignini sadržavaju mnogo više od navedenih jedinica [27]. Lignin služi kao „ljepilo“ između celuloznih vlakana te ih povezuje u vrlo čvrstu izvanstaničnu strukturu. Također omogućavaju hidrofobnost vaskularnom sustavu potrebnu za transport vode i otopina [28]. Lignin predstavlja problem u proizvodnji papira; u tiskovnim podlogama je nepoželjan, jer ih čini lomljivim te je podložan fotokemijskoj oksidaciji u obojeni

nusprodukt koji vremenom uzrokuje žućenje i gubitak izvorne boje tiskovne podloge. Za takav slučaj je najbolji primjer novinski papir [29].



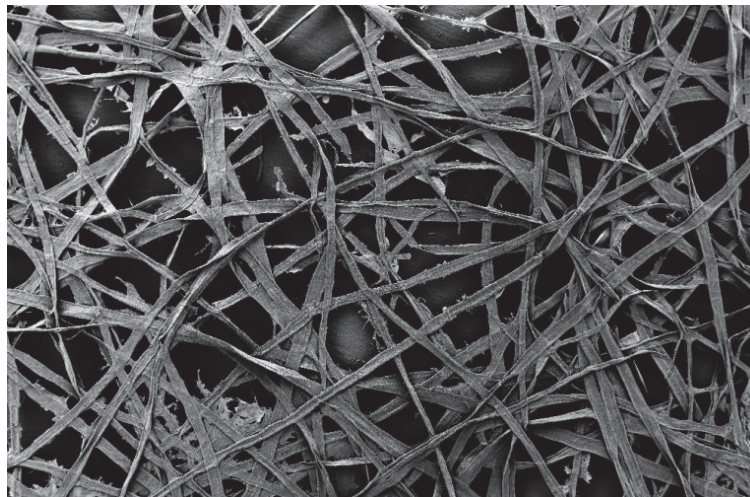
Slika 2.5. Osnovne monomerne jedinice u molekuli lignina [30]

Strukturalna kompleksnost te visoka molekulska masa lignina čine ga vrlo teškim za biorazgradnju. Izvanstanični, oksidativni i nespecifični enzimi koji mogu osloboditi jako nestabilne produkte koji zatim podilaze mnogim oksidativnim reakcijama, kataliziraju inicijalne korake biorazgradnje lignina. Ovakav proces naziva se „enzimatska eksplozija“ [31]. Generalno se može reći da je lignin biorazgradiv, ali doseg biorazgradnje uvelike ovisi o uvjetima i mikroorganizmima uključenim u biorazgradnju. Npr, istraživanje je pokazalo da lignin nije u potpunosti mineraliziran u kompostiranju, ali povišene temperature tijekom termofilne faze su ključne za bržu razgradnju lignoceluloze [32].

2.2. Celulozna vlakanca

Celulozna vlakanca (prikazana na Slici 2.6.) kao osnovna sirovina u proizvodnji papira se dijele na primarna (dobivene iz biljne sirovine) te sekundarna (reciklirana vlakanca dobivena od iskorištenih, otpadnih papira i kartona) [33]. Tradicionalna proizvodnja papira uvelike se oslanja na drvena vlakanca kao primarnu sirovinu, no uz rastuće ekološke brige i potrebe za održivim proizvodnjama porastao je interes za korištenje alternativnih sirovina, poput slame koja zadovoljava sve preduvjete za proizvodnju vlakancaca [34]. Količina celuloze u celuloznim vlakancima utječe na kvalitetu i primjenjivost vlakana. Na primjer, vlakna koja imaju visok stupanj koncentracije celuloze su primjenjivija u tekstilnoj i industriji papira, dok vlakna s visokim udjelom hemiceluloze više odgovaraju fermentacijskim procesima budući da se hemiceluloza može lako hidrolizirati [35]. Struktura celuloznih vlakana je takva da većina reagensa ne može

prodrijeti kroz njihovu površinu, te dobru otpornost na lužine no osjetljivija su na mineralne kiseline [36].



Slika 2.6. Celulozna vlakanca [38]

2.2.1. Sirovine za izdvajanje celuloznih vlakanaca

Osnovna sirovina za proizvodnju papira je celulozno vlakno, dobiveno kemijskim i mehaničkim obradama mnogobrojnih biljnih vrsta koje sadrže celulozu. Celuloza se zapravo ne proizvodi, ona se samo izdvaja od ostalih biljnih dijelova [37]. U proizvodnji papira potrebna su isključivo celulozna vlakna, što znači da se ostale komponente lignoceluloznog materijala ubrajaju u nepoželjne primjese, kao što je spomenuto u poglavlju 2.1.3. Najčešće korištena sirovina za izdvajanje celuloznih vlakanaca je i dalje drvo, specifično četinjače (bor, jela, smreka) i listače (bukva, hrast, kesten, topola itd.) [38,39]. Neka od alternativnih sirovina koja su istraživana uključuju ostatke žetve: slama žitarica, gomolji krumpira, rezanci šećerne repe, lan, konoplja, sojin temeljac, sojine ljuske, sojina slama, sirak vlakna, rižina slama kao i ostali ostaci usjeva kao što su kasava, vlakna banane, lišće ananasa, kukuruzne stabljike, kukuruzne ljuske, biomasa uljane palme, ljuske grožđa i bagasa [40-51]. Iako su i drvena i ne-drvena vlakanca građena od spomenuta tri osnovna elementa (celuloza, hemiceluloza i lignin), njihov udio u ne-drvnim vlakancima se uvelike razlikuje od istog u cjelovitom drvu. Sastav nekih od najčešćih prirodnih vlakanaca prikazan je u Tablici 2.1. Većina ne-drvnih biljnih vlakanaca mogu se razlikovati po većem sadržaju pepela i u njemu značajnom udjelu silicija, podjednakom sadržaju celuloze, ali manjem sadržaju lignina i većem sadržaju pentozana, odnosno hemiceluloze [52].

Tablica 2.1. Kemijski sastav nekih od najčešćih prirodnih vlakana [53]

| Sirovina | Primjer | Udio / % | | | |
|-----------------|------------------|----------|--------|-------|---------|
| | | Celuloza | Lignin | Pepeo | Silicij |
| Drvo | Četinjača | 40-45 | 26-34 | 7-14 | - |
| | Listača | 38-49 | 23-30 | 19-26 | - |
| Stabiljke slame | Pšenica | 29-35 | 16-21 | 26-32 | 4,5-9 |
| | Ječam | 31-34 | 14-15 | 24-29 | 5-7 |
| | Zob | 31-37 | 16-19 | 27-38 | 6-8 |
| Trska | Šećerna trska | 32-44 | 19-24 | 27-32 | 1,5-5 |
| | Bambus | 26-43 | 21-31 | 15-26 | 1,7-5 |
| Trava | Esperato | 33-38 | 17-19 | 27-32 | 6-8 |
| | Sabai | 22,0 | 23,9 | 6,0 | - |
| Srčika | Kenaf | 31-44 | 15-21 | - | 2,2 |
| | Juta | 45-53 | 21-26 | 18-21 | 2-5 |
| List | Američka agava | 60,8 | 8,8 | 17,3 | 1,1 |
| | Manila | 43-56 | 7-9 | 21-24 | 0,5 |
| Ljuska sjemena | Pročišćeni pamuk | 80-85 | - | 0,8-2 | - |

2.2.2. Slama žitarica kao sirovina za izdvajanje celuloznih vlakana

Slama žitarica predstavlja obećavajući izbor za proizvodnju papira u budućnosti. Održiva je sirovina, s obzirom da se radi o ostacima proizvodnje žita, te je dostupna širom svijeta u velikim količinama. Izdvajanje celuloznih vlakana iz slame žitarica je energetski, ekološki i ekonomski povoljniji proces od izdvajanja celuloznih vlakana iz drvnih materijala. Da bi jedno stablo dozrijelo za sječu potrebno je 30 do 50 godina, a iz njega se može dobiti oko 2,5 m³ drvene mase te se u konačnici dobije 750 kg celuloze. S druge strane, slama kao nusprodukt u proizvodnji žitarica je obilnija sirovina. Tijekom jedne godine nastane od 3,5 do 4 t slame po hektaru površine poljoprivrednog zemljišta od kojih je moguća proizvodnja od 1,4 do 1,6 t celuloze [34]. Potencijalne poteškoće koje se pronalaze u proizvodnji papira iz pulpe slame žitarica su sami procesi dobivanja pulpe, koji mogu biti otežani zbog veće količine neželjenih komponenata (poput lignina) te moguće onečišćivanje voda ukoliko se proces ne provodi pravilno [54]. Izbijeljena pulpa slame žitarica ima dobre strukturalne karakteristike; zadovoljavajuću svjetlinu, dobru mogućnost printanja itd., koje se mogu iskoristiti kako bi se proizveo širok raspon papirnih proizvoda poput papira za printanje, maramica i sanitarnih papira, bijelih ploča, papira na bazi folija itd. [55]. Budući da se radi o novom alternativnom izvoru sirovina za proizvodnju papira, daljnja istraživanja će vjerojatno poboljšati kvalitetu i izdržljivost papira s celuloznom pulpom

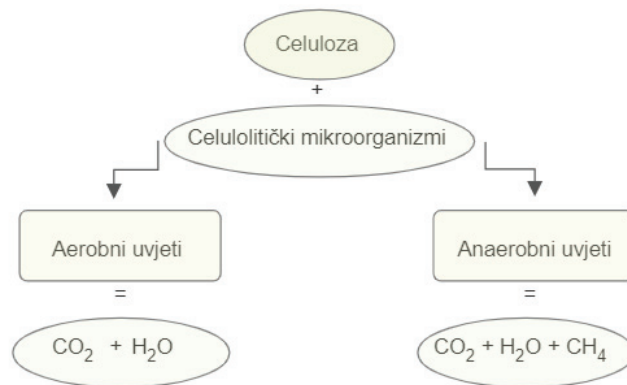
slame žitarica, kao i sami proces izdvajanja, koji predstavlja glavni problem u ekološkoj prihvatljivosti korištenja ove sirovine.

2.2.3. Izdvajanje celuloznih vlaknaca iz sirovine

Izdvajanje celuloznih vlaknaca iz sirovine obavlja se postupkom ekstrakcije. Celuloza zaostaje u procesu uklanjanja ostalih spomenutih gradivnih elemenata. Tijekom provođenja ekstrakcije necelulozne komponente postaju nestabilne, zbog čega ih je lako otkloniti relativno jednostavnim mehaničkim metodama, npr. ispiranjem [34]. Celuloza je kemijski neaktivna tvar, odnosno teško reagira s razrijeđenim kiselinama i lužinama i upravo se na tome temelje kemijske metode izdvajanja celuloznih vlaknaca iz drvene sirovine. Hidroliza sulfatnom kiselinom jedna je od najčešće korištenih metoda izdvajanja celuloznih vlaknaca iz sirovine [56], a odvija se uz kontroliranu toplinu, koncentraciju kiseline, temperaturu i vrijeme. Hidroliza celuloznih vlakana korištenjem mineralnih kiselina umjesto sulfatne kiseline, poput fosforne, klorovodične ili bromovodične kiseline predstavljaju obećavajuću alternativu na račun biokompatibilnosti i povećane termalne stabilnosti ekstrahiranih celuloznih vlaknaca [57]. Hidroliza kiselinama, visoko intenzivna ultrazvučna ekstrakcija i enzimatska hidroliza spadaju među atraktivnije ekološki prihvatljive metode za ekstrakciju celuloznih vlaknaca [58].

2.3. Biorazgradnja celuloze

Biorazgradnja je proces razgradnje složenih organskih tvari u jednostavnije oblike biološkim djelovanjem živih mikroorganizama bez ikakvih štetnih učinaka na prirodu [59]. Biorazgradnja celuloze, shematski prikazana na slici 2.6., postiže se pomoću celulolitičkih mikroorganizama, od kojih većinu čine bakterije i gljive. Celulolitički mikroorganizmi mogu uspostaviti sinergističke veze s ne-celulolitičkim vrstama u celuloznim otpadima, te upravo ta interakcija dovodi do kompletne biorazgradnje celuloze, otpuštajući ugljikov dioksid i vodu u aerobnim uvjetima, te ugljikov dioksid, metan i vodu u anaerobnim uvjetima [60].



Slika 2.7. Shematski prikaz biorazgradnje celuloze

Glavnu ulogu dakle u biorazgradnji celuloze imaju određene vrste bakterija i gljiva koji proizvode određene enzime. Razlog tomu je upravo kemijski neaktivna priroda celuloze.

Na biorazgradnju celuloze utječe niz faktora, neki od kojih su :

1. **Temperatura:** Razgradnja celuloze zbiva se u temperaturnom rasponu 0-65 °C, budući da i termofilni i psihofilni organizmi mogu razgraditi celulozu. Međutim, optimalni uvjeti su 25-30 °C.
2. **Raspoloživost minerala:** Količina minerala i hranjivih tvari prisutna u tlu je ključna za razgradnju celuloze, budući da su potrebni za stvaranje biomolekula poput celulaza i ostalih proteina.
3. **Prisutnost kisika:** Količina prisutnog kisika utječe i na brzinu i na mehanizam hidrolize ovisno o tome radi li se o anaerobnim ili aerobnim organizmima koji provode stvaranje enzima.
4. **pH:** Razgradnja celuloze je uspješnija u kiselijem tlu nego u alkalnom ili neutralnom tlu. U kiselijim uvjetima gljive su primarna grupa organizama uključenih u razgradnju celuloze, dok su bakterije dominantnije u neutralnim do alkalnim uvjetima u tlu.
5. **Prisutnost organske tvari:** Količina organske tvari prisutne u tlu povećava brzinu razgradnje celuloze, iz razloga što organska tvar služi kao substrat te omogućuje rast mikroorganizama.

6. **Prisutnost lignina:** Porastom količine lignina brzina razgradnje celuloze se smanjuje, budući da djeluje kao fizička pregrada, čime ograničava kontakt enzima koji razgrađuju celulozu i celuloze [61].

2.3.3. Mikroorganizmi uključeni u razgradnju celuloze


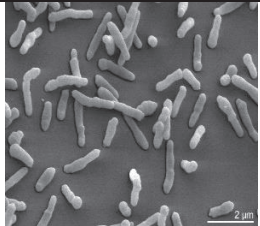

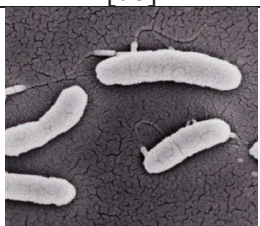
Mikroorganizmi koji provode razgradnju celuloze nazivaju se celulolitički mikroorganizmi. Takvi mikroorganizmi su sposobni proizvoditi enzime koji razgrađuju celulozu na jednostavnije šećere koji se onda koriste kao izvor energije. Enzimi koji omogućavaju hidrolizu β -1,4 veza celuloze nazivaju se celulaze. Gotovo je nemoguće da jedan enzim uspije provesti hidrolizu celuloze uzeći u obzir strukturu celuloze, odnosno enzim ne može vezati celulozu na mjesto supstrata [62]. Celuloza se dakle može u potpunosti probaviti isključivo kombinacijom enzima koji djeluju međusobno i istovremeno. Neki od tih enzima uključuju:

1. **Endoglukanaze:** Enzimi koji nasumično napadaju celulozni lanac i razdjeljuju β -1,4-glukozidne veze prisutne u molekuli. Njihova zadaća je skraćivanje dužine lanca celuloze kako bi ostali enzimi mogli djelovati na fragmente.
2. **Egzoglukanaze:** Enzimi koji hidroliziraju reducirajuće i nereducirajuće krajeve celuloznih lanaca. Njihov glavni produkt su spomenuti dimeri, celobioze.
3. **β -glukozidaze:** Enzimi koji zatim razgrađuju celobiozu i ostale skraćene lance celuloze u pojedinačne molekule glukoze, koje kasnije mikroorganizmi koriste kao izvor energije.
4. **Litičke polisaharid monoooksigenaze (LPMO):** Enzimi koji oksidiraju celulozu, čineći ju pristupačnijom drugim enzimima.
5. **Ksilanaze:** Enzimi zaduženi za razgradnju hemiceluloze.
6. **Celobijaze (β -glukozidaze):** Enzimi koji djeluju na jedinice celobioze (disaharide, trisaharide i ostale oligosaharide) i stvaraju monomerne jedinice.
7. **Oksidativne celulaze:** Enzimi koji depolimeriziraju celulozu u manje jedinice pomoću reakcija radikala.
8. **Celobiozne fosforilaze:** Enzimi slični celobijazama, osim što se hidroliza polimernih jedinica odvija u prisutstvu fosfora, a ne vode. Produkt djelovanja celobioznih fosforilaza su glukoza-1-fosfat i glukoza [63].

Glavni mikroorganizmi zaduženi za biorazgradnju celuloze su bakterije i gljive. Celulolitičke bakterije često proizvode celulaze u manjim količinama, zbog čega se razgradnja celuloze odvija

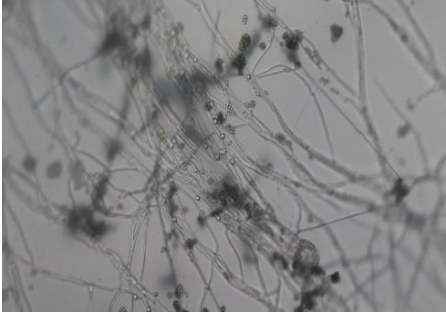
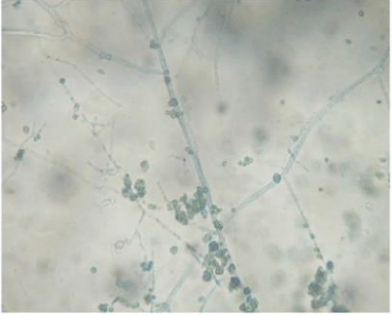
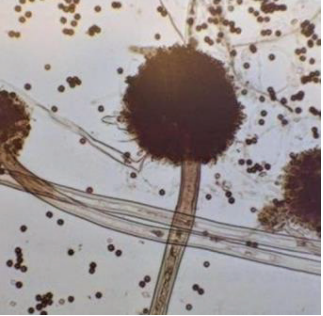
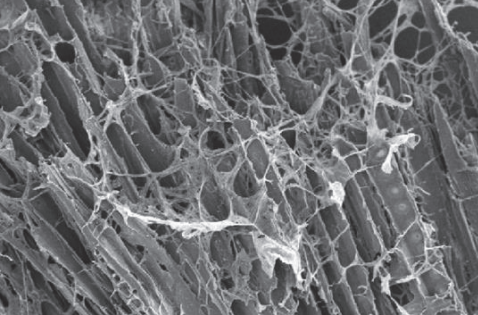
tkzv. „klasterima“ multienzimskih kompleksa. Otprilike 90-95% sveukupne aktivnosti celulolitičkih bakterija je proučavano u aerobnim uvjetima. Ostalih 10% uključuje raznovrsnu grupu bakterija koje djeluju anaerobno [64]. Osnovne karakteristike celulolitičkih bakterija prikazane su u Tablici 2.2.

Tablica 2.2. Neke od najčešćih celulolitičkih bakterija i njihove karakteristike

| Bakterija | Osnovne karakteristike | Utjecaj na celulozu | Prikaz |
|---------------------------------|---|---|---|
| <i>Clostridium thermocellum</i> | Gram pozitivna, anaerobna, štapićasta termofilna bakterija. | Proizvodi celulaze i ostale enzime koji se integriraju u izvanstanične enzimske komplekse celulosome, te ima sposobnost direktne proizvodnje etanola iz celulozne biomase [65]. |  [66] |
| <i>Cellulomonas fimi</i> | Gram pozitivna, aerobna, mezofilna štapićasta bakterija koja se nalazi u tlu. | Proizvodi više različitih celulaza te ima sposobnost razgraditi i hemicelulozu [67]. |  [68] |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Gram pozitivna, aerobna štapićasta bakterija koja se nalazi u tlu. | Proizvodi različite celulaze i jedna je od najaktivnijih celulolitičkih bakterija [69]. |  [70] |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Gram negativna, aerobna štapićasta bakterija koja se nalazi u slatkim vodama. | Pokazano da razgrađuje celulozu u temperaturnom rasponu 20-45 °C [71]. |  [72] |

Gljive spadaju među najaktivnije agente za biorazgradnju organskog materijala općenito, a posebice u slučaju celuloznog substrata. Najčešće vrste gljiva za biorazgradnju celuloze te njihove osnovne karakteristike prikazane su u Tablici 2.3.

Tablica 2.3. Neke od najčešćih vrsta gljiva za biorazgradnju celuloze i njihove karakteristike

| Gljiva | Osnovne karakteristike | Prikaz |
|---|---|--|
| <i>Trichoderma reesei</i> | Mezofilna i nitasta gljiva koja proizvodi niz enzima koji sudjeluju u biorazgradnji celuloze. |  <p>[73]</p> |
| <i>Trichoderma harzianum</i> (<i>Trichoderma</i> sp.) | Nitasta gljiva prisutna u gotovo svim vrstima tla, te je potencijalni kandidat za hidrolitičku proizvodnju enzima [74]. |  <p>[75]</p> |
| <i>Aspergillus niger</i> | Nitasta gljiva otporna na ekstremne temperature. Proizvodi razne celulaze, a koristi se u proizvodnji biogoriva [76]. |  <p>[77]</p> |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | Gljivica bijele truleži koja može razgraditi i celulozu i lignin [78]. |  <p>[79]</p> |

Određene vrste protozoa, poput termita i preživljača, u svom probavnom sustavu imaju celulozitičke mikroorganizme koji pomažu u razgradnji celuloze, poput:

- **termiti:** U svom probavnom sustavu imaju bakterije i bičaste protozoe, koji pomažu u razgradnji celuloze.
- **preživljači:** Imaju složeni želučani sustav koji sadrži celulozitičke mikroorganizme, uključujući bakterije, gljivice i protozoe, koji pomažu u probavi biljnih materijala (npr. krave, ovce).

Neki od primjera arheja su:

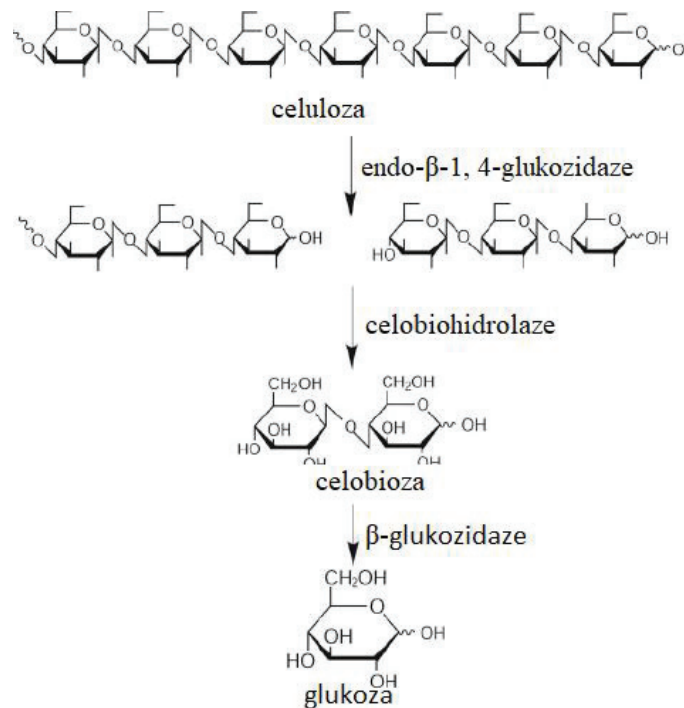
- *Methanoculleus marisnigri*: Metanogeni arheon za kojeg je otkriveno da proizvodi enzime celulaze i može razgraditi celulozu.
- *Methanoculleus thermophilus*: Termofilni arheon koji može razgraditi celulozu i proizvesti metan.

2.3.4. Hidrolitički mehanizam razgradnje celuloze

Hidrolitički mehanizam razgradnje celuloze odnosi se na kidanje glikozidnih veza između jedinica glukoze koje čine molekulu celuloze te je strukturno prikazan na slici 2.8.. Proučavan je kod gotovo svih aerobnih i anaerobnih mikroorganizmima uključujući *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Neurospora crassa*, and *Trichoderma reesei*. Ovaj proces igra važnu ulogu u kruženju ugljika na Zemlji i u recikliranju organskih materijala u okolišu. Postoje tri tipa hidrolitičkog mehanizma razgradnje celuloze:

1. **Mehanizam inverzije:** dva enzimska ostatka, tipično karboksilni ostaci, djeluju kao kiselina i baza. Nastaje napadom molekule vode na C1 ugljik glukoznog prstena u reakciji tipa Sn2, što kao rezultat ima inverziju konfiguracije na ugljiku C1.
2. **Mehanizam zadržavanja:** hidroliza se odvija mehanizmom u dva koraka, pri čemu svaki korak uključuje inverziju. Kao i u inverziji, uključena su dva enzimska ostatka gdje jedan djeluje kao nukleofil, dok drugi djeluje kao kiselina ili baza. U prvom koraku nukleofil napada anomerni centar, što dovodi do deprotonacije. Deprotonirani karboksilat tada djeluje kao baza u sljedećem koraku koja pomaže nukleofilnoj vodi u formiranju hidroliziranog produkta.

3. **Mehanizam glikozidaze:** u ovom slučaju, kidanje veze na C3 dovodi do formiranja ketona, nakon čega slijedi deprotonacija C2 popraćena eliminacijom glikozidnog kisika kataliziranom kiselinom i stvaranjem 1,2-nezasićenog intermedijera. Ova α - β -nezasićena vrsta podvrgava se bazno kataliziranom napadu vode kako bi se proizveo 3-keto derivat, koji se zatim reducira pomoću NADH kako bi se dovršio reakcijski ciklus [32].

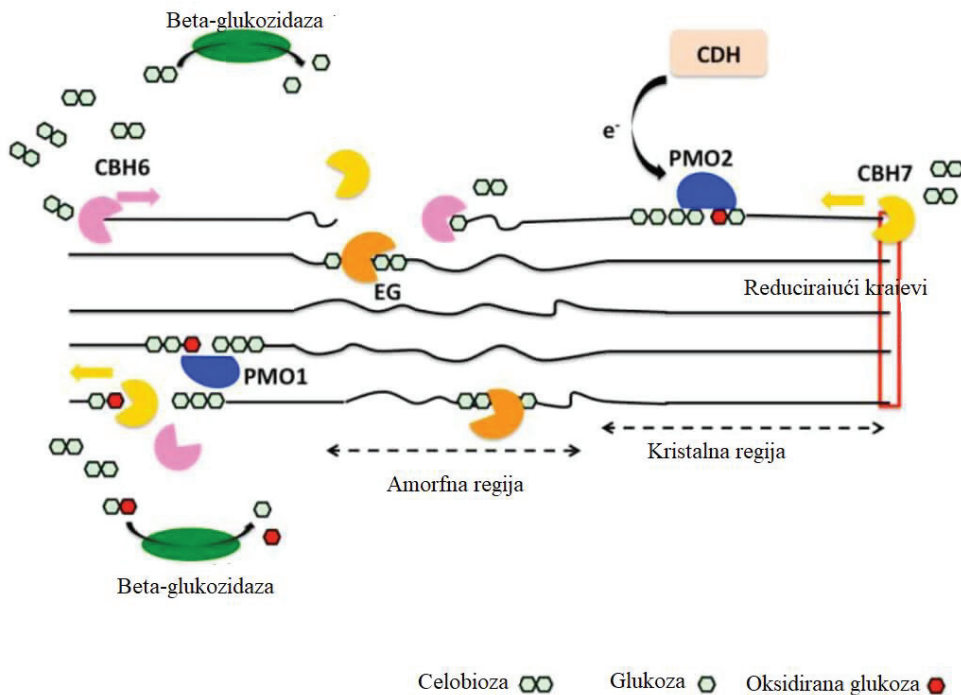


Slika 2.8. Hidrolitički mehanizam razgradnje celuloze [80]

2.3.4. Oksidacijski mehanizam razgradnje celuloze

Oksidacijski mehanizam razgradnje celuloze (shematski prikazan na Slici 2.9.) uključuje upotrebu reaktivnih kisikovih vrsta (ROH) za razgradnju celuloznih vlakana. Iako većina aerobnih bakterija razgrađuje celulozu istovremenim djelovanjem različitih celulaza, neki filtrati celulolitičke gljivične kulture bez stanica brže razgrađuju celulozu u atmosferi kisika nego u anaerobnim uvjetima. U ovom slučaju enzim celbioza dehidrogenaza (CDH) igra važnu ulogu. CDH oksidira slobodne krajeve stvorene endo-djelujućim celulazama i sprječava ponovnu kondenzaciju celuloznog lanca. Inhibicija proizvoda spriječena je uklanjanjem celbioze, budući da visoke

koncentracije ovog disaharida inhibiraju mnoge celulaze. CDH može proizvesti Fe^{2+} i H_2O_2 redukcijom Fe^{3+} i O_2 [81].



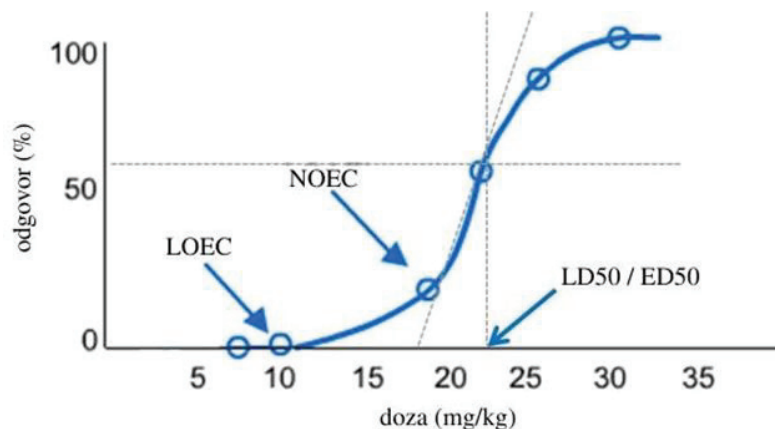
Slika 2.9. Shematski prikaz oksidacijskog mehanizma razgradnje celuloze [82]

2.4. Ekotoksikologija

Ekotoksikologija je znanost koja se bavi proučavanjem utjecaja onečišćujućih tvari i ostalih stresora na ekosustav i organizme koji žive u njemu. U kontekstu papira, ekotoksikologija analizira potencijalne ekološke učinke proizvodnje, uporabe i odlaganja papira na razne ekosustave, uključujući vodeni i kopneni okoliš. Danas se najčešće primjenjuje tzv. eksperimentalna ekotoksikologija gdje se u kontroliranim uvjetima određuje poveznica između izlaganja organizama kemikalijama i potencijalnog toksičnog efekta koji se na organizmima zapazio [83]. Osnovna podjela ekotoksikoloških testova je sljedeća: testovi toksičnosti na jednoj vrsti (npr. razni mikroorganizmi, alge, ribe, ptice, biljke), funkcionalni testovi toksičnosti (mjerjenje izravnog utjecaja na neku funkciju ekoustava, npr. mineralizacija ugljika ili dušika) te testovi toksičnosti na više vrsta (istraživanja utjecaja kemikalija na prirodne ili umjetne skupove ili na velike kompleksne zajednice) [83]. Testovi koji se izvode na jednoj vrsti funkcioniraju na principu odnosa doza-odgovor između potencijalnog toksikanta i biološkog efekta na ispitivanom organizmu.

Koncept ovog odnosa osniva se na izlaganju organizma povećanju testnog materijala i zatim opažanju njihovih odgovora tokom trajanja testa [84]. Nadalje, testovi se mogu provoditi direktno (*in vivo*) ili indirektno (*in vitro*). *In vivo* testiranje uključuje eksperimente provedene na živim organizmima, tipično na životinjama, u njihovom prirodnom okruženju. Cijeli organizam se tada koristi za proučavanje utjecaja neke kemikalije, što dozvoljava znanstvenicima koji provode eksperiment da promatraju interakcije ispitivane kemikalije sa raznim sustavima, uključujući adsorpciju, distribuciju, metabolizam i ekskreciju, što se ne može u potpunosti replicirati u drugim načinima testiranja [85]. Ovakvi testovi se zbog navedenih razloga koriste u pred kliničkim istraživanjima, specifično za razvoj lijekova te ispitivanja sigurnosti i učinkovitosti medicinskih terapija [86]. Iako ovi testovi doista daju široku sliku o utjecaju određene kemikalije ili spojeva kemikalija na organizam, iz etičkih razloga se danas koriste u manjoj mjeri. S druge strane, *in vitro* testovi se odnose na eksperimente provedene izvan živućeg organizma, tipično u laboratorijskom postavu. Uključuje korištenje izoliranih stanica, tkiva ili organa. Budući da su *in vitro* testovi fokusirani na izolirane komponente, često su izravniji, jeftiniji te vremenski isplativiji od *in vivo* testova [87]. Koriste se najčešće u ranim stadijima istraživanja, testiranju lijekova i razumijevanju osnovnih bioloških procesa. Također se koriste za toksikološka ispitivanja kemikalija, kozmetike i ostalih proizvoda prije nego što su testirani na ljudima ili životinjama [88].

Akutni testovi toksičnosti podrazumijevaju kratkotrajno izlaganje (sati do dani) organizma, i smrtnost je najčešća standardna varijabla, a koriste se i imobilizacija organizama, promjena u ravnoteži, ili u slučaju algi rast [89]. Završna točka akutnog testa toksičnosti je koncentracija toksikanta koja je pogubna za 50% organizama određene vrste unutar određenog vremenskog razdoblja, a definira se kao srednja letalna koncentracija LC_{50} , dok EC_{50} predstavlja koncentraciju koja ima određeni učinak (npr. imobilizaciju ili inhibiciju rasta) [90]. LOEC predstavlja najnižu dozu koja izaziva odgovor, dok NOEC predstavlja najvišu dozu koja ne izaziva odgovor [91]. Prema trajanju ovog procesa razlikuje se 24-satna LC_{50} , 96-SATNA- LC_{50} , i nadalje [92]. Izgled krivulje doza-odgovor prikazan je na Slici 2.10. s naznačenim parametrima.

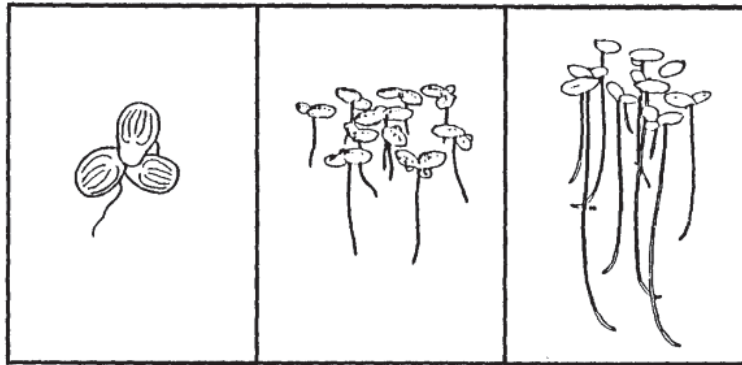


Slika 2.10. Primjer krivulje doza-odgovor s odgovarajućim parametrima [93]

Kronični testovi toksičnosti definiraju se kao testovi u trajanju minimalno 10% životnog vijeka testnog organizma [94]. Dok se kod kroničnih testova prati preživljavanje, subletalni efekti na parametre poput rasta (mase i/ili duljine) i mjera reproduktivnog uspjeha (npr. broja potomaka) su glavni fokus. Krajnje točke kroničnih testova toksičnosti uključuju nevidljive i najmanje vidljive efekte koncentracije koji predstavljaju najveću koncentraciju testnog materijala koji nema nikakav statistički značajan efekt na parametar odgovora [95].

2.4.1. Test ekotoksičnosti na vodenoj leći

Vodene leće su grupa plutajućih, cvjetajućih biljaka porodice *Lemnaceae*. Brzo su rastuće i široko rasprostranjene te lake za uzgoj i testiranje. Neka istraživanja predlažu da su vodene leće tolerantne na toksine prisutne u okolišu [96], međutim neka pokazuju da su jednako osjetljive kao druge akvatičke vrste [97]. Od standardnih vrsta koriste se *Lemna minor* i *Lemna gibba*., a proučavane su i sljedeće: *L. valdiviana*, *L. polyrrhiza*, *L. perpusilla*, *L. paucicostata*, *S. polyrrhiza*, *S. punctata*, i *S. oligorrhiza*.. Tri najrasprostranjenije vrste prikazane su na slici 2.11.. Od navedenih vrsta *L. gibba* se pokazala najotpornijom. Dok je rast *L. minor* potpuno inhibiran 10% ekstraktom destilata ugljena, potpuna inhibicija rasta *L. gibba* postignuta je tek s 15% ekstraktom [98]. Ova vodena leća korištena je za ispitivanje toksičnosti raznih spojeva poput acetonitrila i akrilonitrila [99], te većinski za određivanje toksičnosti raznih spojeva u vodi [100, 101]. Korištenje vodene leće *Lemne minor* za određivanje ekotoksičnosti papira zasada nije uobičajena praksa.



Slika 2.11. Slikoviti prikaz vodenih leća redom: *Spirodela polyhiza*, *Lemna minor*, *Lemna perpusilla* [102]

3. Eksperimentalni dio

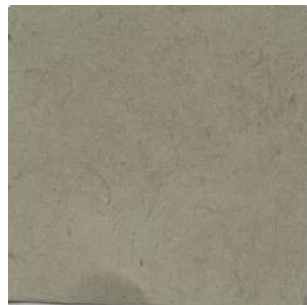
3.1. Materijali

3.1.1. Papir sa celuloznom pulpom slame žitarica

Prilikom provedbe pokusa biorazgradnje i testova ekotoksičnosti, korišteni su otisnuti i neotisnuti papiri s celuloznom pulpom slame žitarica.

U ovom radu korišteno je 10 različitih tipova papira s različitim masenim udjelima pulpe slame žitarica (pšenice (P), ječma (J) i tritikala (TR)) te pulpe recikliranih vlakana (N). U Tablici 3.1. mogu se vidjeti maseni omjeri ne-drvene i drvene sirovine korištene pri izradi uzoraka papira.

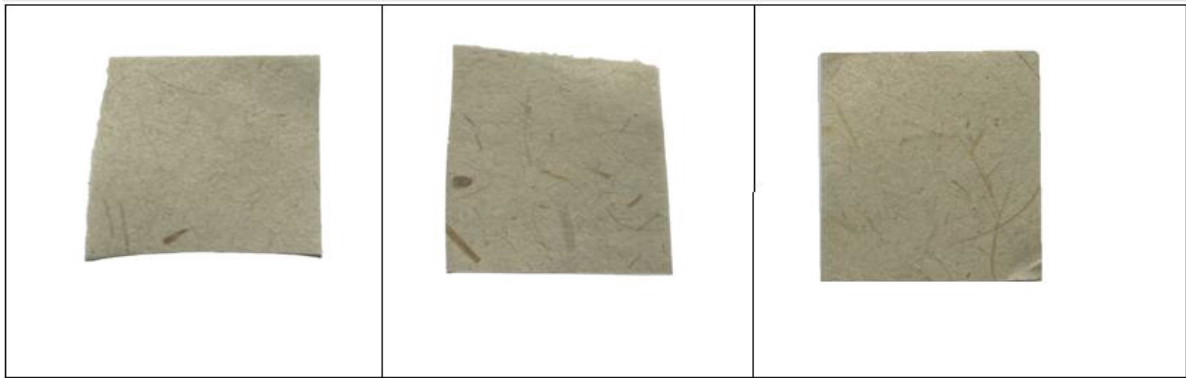
Ukupno je 10 uzoraka neotisnutih laboratorijski proizvedenih papira oznaka: N, 1NP, 2NP, 3NP, 1NJ, 2NJ, 3NJ, 1NTR, 2NTR, 3NTR, uz kontrolni uzorak K (komercijalni novinski papir), te 12 uzoraka digitalnom tehnikom otisnutih procesnim bojama (žuta, crna, cijan i magenta) papira s 10% pulpe slame žitarica: 1NP, 1NJ, 1NTR (Slike 3.1.-3.9.).



Slika 3.1. Kontrolni uzorak K (komercijalni novinski papir).



Slika 3.2. Neotisnuti uzorak N (laboratorijski novinski papir).



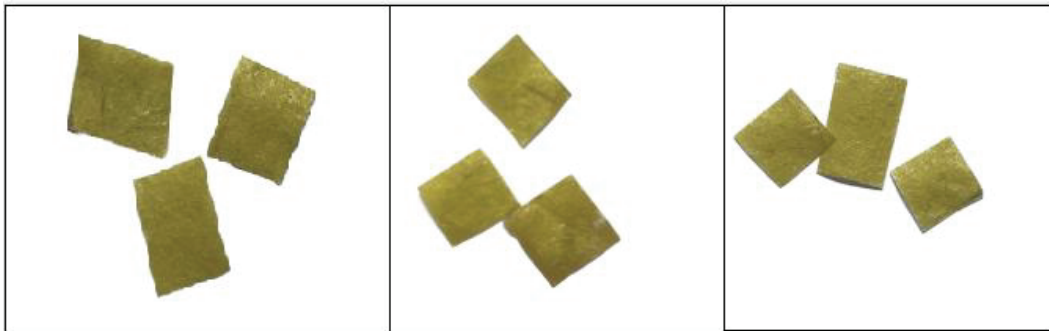
Slika 3.3. Neotisnuti laboratorijski uzorci papira s pulpom slame pšenice, redom: 1NP, 2NP, 3NP.



Slika 3.4. Neotisnuti laboratorijski uzorci papira s pulpom slame ječma, redom: 1NJ, 2NJ, 3NJ.



Slika 3.5. Neotisnuti laboratorijski uzorci papira s pulpom slame tritikala, redom: 1NTR, 2NTR, 3NTR.



Slika 3.6. Žuti otisci dobiveni digitalnom tehnikom tiska na papirima s 10% pulpe slame žitarica, redom: 1NP, 1NJ, 1NTR.



Slika 3.7. Crni otisci dobiveni digitalnom tehnikom tiska na papirima s 10% pulpe slame žitarica, redom: 1NP, 1NJ, 1NTR.



Slika 3.8. Cijan otisci dobiveni digitalnom tehnikom tiska na papirima s 10% pulpe slame žitarica, redom: 1NP, 1NJ, 1NTR



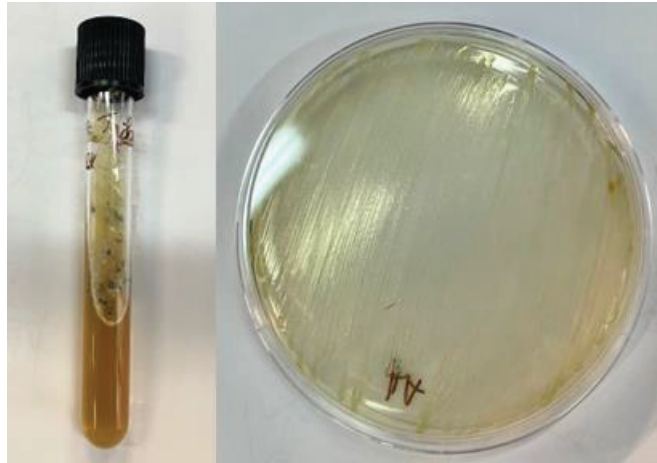
Slika 3.9. Magenta otisci dobiveni digitalnom tehnikom tiska na papirima s 10% pulpe slame žitarica, redom: 1NP, 1NJ, 1NTR

Tablica 3.1. Oznake korištene za laboratorijske uzorke papira te njihov sastav

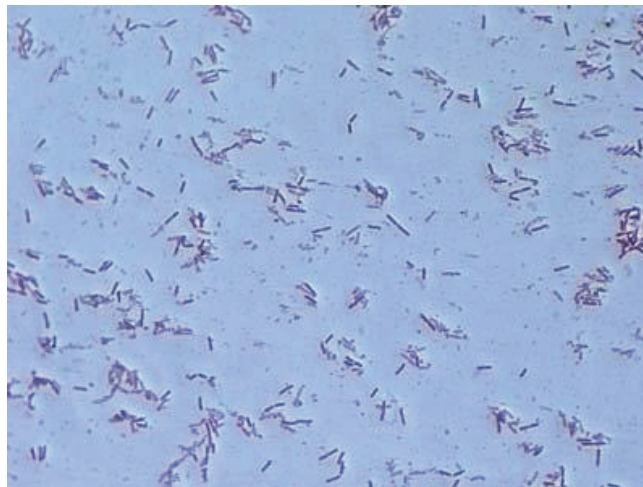
| Uzorak br. | Oznaka uzorka | Udio pulpe, % | |
|------------|---------------|----------------|----------------------|
| | | Slame žitarica | Recikliranih vlakana |
| 1 | N | 0 | 100 |
| 2 | 1NP | 10 | 90 |
| 3 | 2NP | 20 | 80 |
| 4 | 3NP | 30 | 70 |
| 5 | 1NJ | 10 | 90 |
| 6 | 2NJ | 20 | 80 |
| 7 | 3NJ | 30 | 70 |
| 8 | 1NTR | 10 | 90 |
| 9 | 2NTR | 20 | 80 |
| 10 | 3NTR | 30 | 70 |

3.1.2. Mikroorganizmi

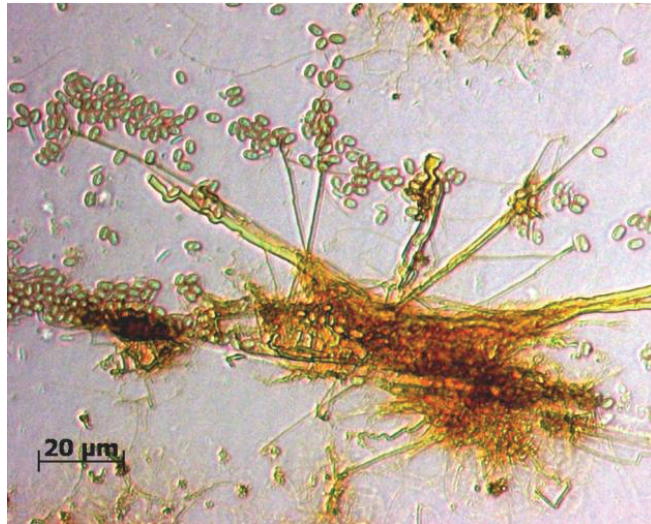
Pokus biorazgradnje celuloznih papira proveden je u tlu (uzorku vrtnje zemlje). U svrhu obogaćivanja tla mikroorganizmima, dodana je suspenzija mješovite kulture bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (mikroskopski prikazana na Slici 3.11.) i plijesni *Trichoderma* sp. (mikroskopski prikazane na slici 3.12.). Mikroorganizmi su izolirani iz biootpada dobivenog nakon provedbe procesa kompostiranja, a pohranjeni su u Zbirci mikroorganizama na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu (Slika 3.10.).



Slika 3.10. Prikaz izrasle kulture plijesni *Trichoderma* sp. (lijevo) na kosoj hranjivoj podlozi te izrasla kultura bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (desno) na hranjivoj podlozi u Petrijevoj zdjelici.



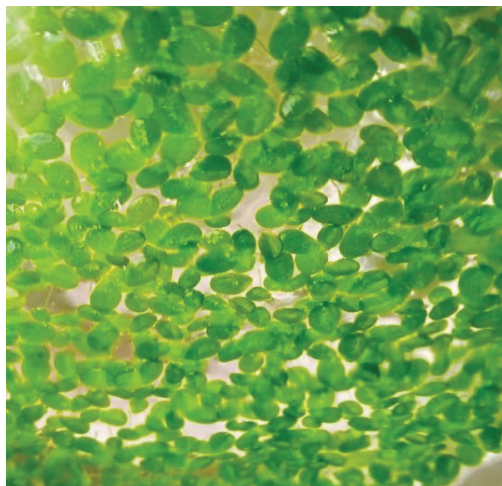
Slika 3.11. Mikroskopski prikaz kulture bakterije *Pseudomonas aeruginosa* [103]



Slika 3.12. Mikroskopski prikaz plijesni *Trichoderma* sp. [104]

3.1.2. Testni organizam za provedbu testa toksičnosti

Vodena leća *Lemna minor* (Slika 3.13.) korištena za provedbu pokusa ekotoksičnosti papira pohranjena je u zbirci organizama na Zavoda za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 3.13. Vodena leća *Lemna minor*.

3.2. Mediji i kemikalije

3.2.1. Hranjive podloge

Za uzgoj kulture pripremljen je hranjivi agar za uzgoj bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i sladni agar za uzgoj plijesni *Trichoderma* sp. prema uputama proizvođača (Biolife Manual, Ingraf, Italija 1991). Podloge su homogenizirane, zagrijane do vrenja i sterilizirane 15 minuta u autoklavu pri 121 °C i 1,1 atm.

3.2.2. Fiziološka otopina

Fiziološka otopina, 0,9%-tna, korištena je za pripremu suspenzije mješovite kulture korištene za obogaćivanje tla u pokusu biorazgradnje papira. 0,9 g se izvagalo za pripremu 100 mL fiziološke otopine, koja se prije upotrebe sterilizirala vlažnom sterilizacijom u autoklavu pri 1 atm, 121 °C tijekom 15 min.

3.2.3. Steinberg medij

Vodena leća *Lemna minor* uzgaja se u mineralnom mediju (Steinberg medij) koji se dobiva kombinacijom otopina prikazanih u Tablici 3.2. Priprema se u odmjernoj tikvici volumena 1 L koja se nakon dodatka odgovarajućih otopina nadopuni do vrha deioniziranom vodom. Na 1 L dodaje se 20 mL otopine 1, 2 i 3, te po 1 mL svake sljedeće otopine 4 – 8.

Tablica 3.2. Otopine potrebne za pripremu 1 L Steinberg medija korištenoga za uzgoj vodene leće *Lemna minor*.

| Otopina | Tvar | γ / g/L |
|---------|---|----------------|
| 1 | KNO ₃ | 17,50 |
| | KH ₂ PO ₄ | 4,50 |
| | K ₂ HPO ₄ | 0,63 |
| 2 | MgSO ₄ x 7H ₂ O | 5,00 |
| 3 | Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O | 14,75 |
| 4 | H ₃ BO ₃ | 0,12 |
| 5 | ZnSO ₄ x 7H ₂ O | 0,18 |
| 6 | NaMoO ₄ x 2H ₂ O | 0,44 |
| 7 | MnCl ₂ x 4H ₂ O | 0,18 |
| 8 | FeCl ₃ x 6H ₂ O | 1,50 |

3.3. Mjerni instrumenti i oprema

- Za sterilizaciju medija, fiziološke otopine, staklenog i metalnog posuđa korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija.
- Uzorci papira su vagani prije i nakon provedbe pokusa biorazgradnje na analitičkoj vagi KERN ALJ 220-4NM.
- Pokus biorazgradnje papira u tlu provodio se pri temperaturi od 58 °C u termostatu Termomedicinski aparati, Hrvatska.
- Nakon provedbe pokusa biorazgradnje papira u tlu, izvađeni papiri su sušeni u sušioniku Sterimatic ST-11, Instrumentaria, Hrvatska.
- Uzorci papira su mikroskopirani pomoću svjetlosnog mikroskopa (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan) opremljenog kamerom za snimanje mikrofotografija (Olympus DP 10 kamera).
- Test toksičnosti primjenom vodene leće *Lemna minor* provodio se u termostatu Liebherr, FKU 1800-20C/774, Njemačka pri 24 °C.
- Sastav klorofila vodene leće određivan je na spektrofotometru Hach, Model DR/2400, SAD pri valnim duljinama $\lambda = 664,2$ nm i $\lambda = 648,6$ nm.

3.4. Metode rada

3.4.1. Priprema papira

Za provedbu pokusa biorazgradnje papira, papiri su prvo usitnjeni škarama na komade veličine 2x2 cm (neotisnuti papiri) te 2x1 cm (otisnuti papiri). Od svake vrste papira pripremljeno je 5 uzoraka, od kojih je jedan bio kontrolni. Prije provedbe pokusa svi uzorci papira su izvagani. U svrhu lakšega izuzimanja i prepoznavanja papira, na papire je stavljen konac uz oznaku za svaku vrstu papira. Za provedbu testa ekotoksičnosti, papiri su dodatno usitnjeni na 6 komadića kako bi se poboljšao kontakt medija, papira i testnog organizma.

3.4.2. Provođenje pokusa biorazgradnje papira u tlu

Pokus biorazgradnje papira u tlu se provodio u posudama ispunjenima tлом. Tlo je izvagano u 3 posude, otprilike 1086 g u svaku posudu. Prije dodatka papira u tlo, tlo je obogaćeno mješovitom kulturom mikroorganizama. Nakon dodatka suspenzije mješovite kulture, tlo je dobro homogenizirano te su potom pripremljeni papiri dodani. U dvije posude stavljeno je po 8 tipova

papira (4 otisnuta i 4 neotisnuta) te u jednu posudu preostalih 7 (3 neotisnuta i 4 otisnuta). Dakle, od svakog tipa papira u posudi su bila 4 uzorka, namijenjena za praćenje razgradnje za 7., 14., 21., te 28. dan pokusa biorazgradnje (Slika 3.14.). Posude s uzorcima su prekrivene prozirnom folijom u svrhu održavanja vlažnosti tla, te su stavljene u termostat pri 58 °C. Tijekom svakog izuzimanja tlo se vlažilo po potrebi. Nakon što se uzorak papira izvadio, sušio se u sušioniku pri 40 °C te zatim vagao i mikroskopirao u svrhu praćenja promjena u masi i strukturi.



Slika 3.14. Posude s tlom i uzorcima papira tijekom provedbe pokusa biorazgradnje u termostatu pri 58 °C.

3.4.3. Provođenje testa ekotoksičnosti papira primjenom *Lemna minor*

Test ekotoksičnosti uzoraka papira (neotisnutih i otisnutih) provodio se primjenom vodene leće *Lemna minor*. Test se provodio u sterilnim Erlenmeyerovim tikvicama ukupnog volumena 100 mL uz radni volumen od 50 mL (Slika 3.15.). Svaka tikvica je sadržavala 50 mL mineralnog medija, 10 listića vodene leće *Lemna minor* i uzorak papira pripremljenoga, kao što je spomenuto u poglavlju 3.4.1. Postavljena je i kontrolna tikvica koja je sadržavala mineralni medij i 10 listića *Lemna minor* bez dodatka uzorka papira. Test se provodio tijekom 7 dana, a parametri koji su praćeni su: broj listova u svrhu određivanja specifičnog rasta *Lemna minor*, duljina korijenja *Lemna minor*, te sastav klorofila.



Slika 3.15. Prikaz testne tikvice za provedbu testa ekotoksičnosti koja je sadržavala mineralni medij, uzorak papira i vodenu leću *Lemna minor*.

3.4.4. Obrada rezultata

Specifični rast vodene leće *Lemna minor* određivao se prema sljedećoj formuli, jednačba 1 :

$$\mu = \frac{\ln(N_o) - \ln(N_t)}{t} \quad (1)$$

gdje je μ specifični rast *Lemna minor*, N_o početni broj listova *Lemna minor* (10), a N_t broj listova *Lemna minor* nakon vremena izloženosti t (7 dana).

Inhibicija rasta *Lemna minor* računala se s obzirom na specifični rast u kontrolnom uzorku i za uzorke papira, prema sljedećoj formuli, jednačba 2:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100 \quad (2)$$

gdje je $\%I_r$ inhibicija rasta *Lemna minor*, a μ_c specifični rast u kontrolnom uzorku.

Sastav klorofila a i b se računao pomoću izmjerenih absorbancija pri 664 nm i 648 nm prema sljedećim jednačbama 3 i 4:

$$C_a = 13,36 \times A_{664,2} - 5,19 \times A_{648,6} \quad (3)$$

$$C_b = 27,43 \times A_{648,6} - 8,12 \times A_{664,2} \quad (4)$$

Specifične koncentracije klorofila a i klorofila b dobivene su iz jednadžbi 5 i 6:

$$C_{SPa} = C_a \times \frac{V}{1000 \times m} \quad (5)$$

$$C_{SPb} = C_b \times \frac{V}{1000 \times m} \quad (6)$$

gdje C_a, C_b označavaju koncentraciju klorofila a/b izraženu u mg/L, V označava volumen 95%-tnog etanola u mL te m označava izvaganu masu *Lemna minor* u g.

Inhibicije nastajanja klorofila a, odnosno klorofila b računala se prema jednadžbi 7:

$$I = \frac{(C_s - C_c)}{C_s} \times 100\% \quad (7)$$

4. Rezultati

4.1. Određivanje biorazgradljivosti papira

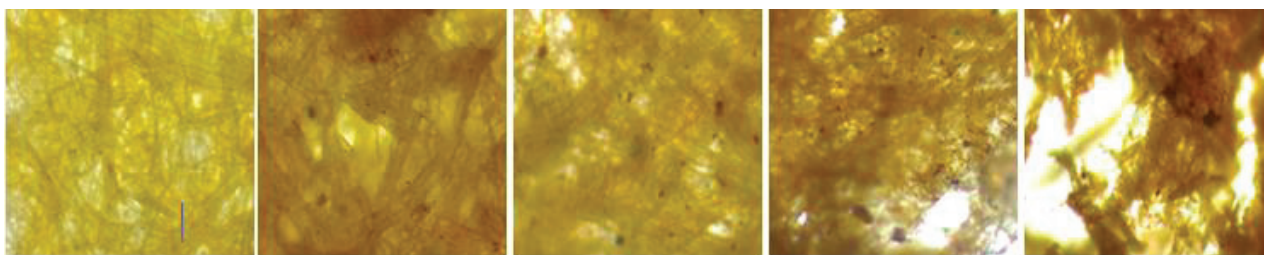
Postupkom opisanim u poglavlju 3.4.2. pripremljeni su uzorci papira te tlo, odnosno uzorak vrtno zemlje. Tijekom eksperimenta pratio se gubitak u masi te eventualne promjene u strukturi papira. Dobiveni rezultati promjene mase kroz 4 tjedna te postotak gubitka mase prikazan je u Tablici 4.1. za neotisnute te Tablici 4.2. za digitanom tehnikom otisnute uzorke papira. Promjene u strukturi papira za neotisnuti i otisnuti uzorak prikazan je mikrofotografijama (Slika 4.1. te Slika 4.2.). Nakupljanje zemlje u porama papira vidljivo je na mikrofotografijama Slika 4.3. za neotisnuti te Slika 4.4. za otisnuti uzorak papira.

Tablica 4.1. Promjene u masi neotisnutih papira te postotak biorazgradnje nakon 28 dana provedbe pokusa biorazgradnje.

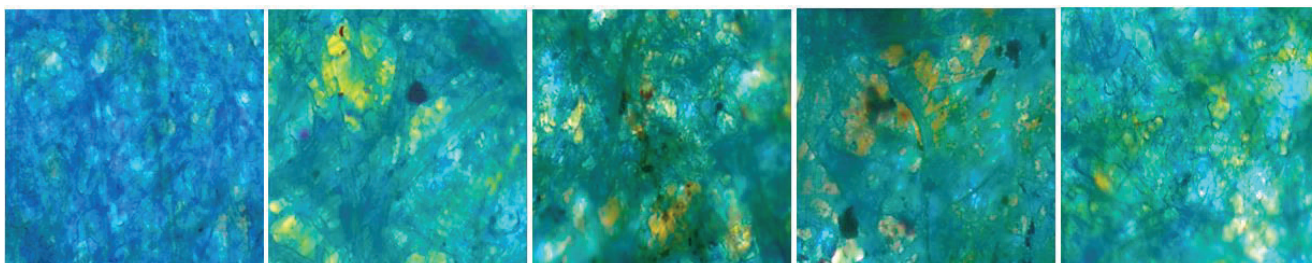
| UZORAK papira | <i>t</i> / d | <i>m</i> ₀ / g | <i>m</i> _t / g | % biorazgradnje |
|---------------|--------------|---------------------------|---------------------------|-----------------|
| K | 7 | 0,0166 | 0,0138 | 16,87 |
| | 14 | 0,0173 | 0,0124 | 28,32 |
| | 21 | 0,0178 | 0,0134 | 24,72 |
| | 28 | 0,0171 | 0,0137 | 19,88 |
| N | 7 | 0,0186 | 0,0175 | 5,91 |
| | 14 | 0,0182 | 0,0150 | 17,58 |
| | 21 | 0,0155 | 0,0124 | 20,00 |
| | 28 | 0,0168 | 0,0125 | 25,60 |
| 1NP | 7 | 0,019 | 0,0175 | 7,89 |
| | 14 | 0,0205 | 0,0151 | 26,34 |
| | 21 | 0,0174 | 0,0148 | 14,94 |
| | 28 | 0,0185 | 0,016 | 13,51 |
| 2NP | 7 | 0,0209 | 0,0123 | 41,15 |
| | 14 | 0,0242 | 0,0137 | 43,39 |
| | 21 | 0,0178 | 0,0104 | 41,57 |
| | 28 | 0,0195 | 0,0088 | 54,87 |
| 3NP | 7 | 0,0180 | 0,0147 | 18,33 |
| | 14 | 0,0180 | 0,0124 | 31,11 |
| | 21 | 0,0186 | 0,0134 | 27,96 |
| | 28 | 0,0184 | 0,0113 | 38,59 |
| 1NJ | 7 | 0,0195 | 0,0213 | -9,23 |
| | 14 | 0,0210 | 0,0204 | 2,86 |
| | 21 | 0,0198 | 0,0196 | 1,01 |
| | 28 | 0,0193 | 0,0173 | 10,36 |
| 2NJ | 7 | 0,0178 | 0,0157 | 11,80 |
| | 14 | 0,0181 | 0,016 | 11,60 |
| | 21 | 0,0187 | 0,0147 | 21,39 |
| | 28 | 0,0168 | 0,0134 | 20,24 |
| 3NJ | 7 | 0,0194 | 0,0164 | 15,46 |
| | 14 | 0,0178 | 0,0208 | -16,85 |
| | 21 | 0,0187 | 0,0123 | 34,22 |
| | 28 | 0,0178 | 0,0121 | 32,02 |
| 1NTR | 7 | 0,0183 | 0,0191 | 0,00 |
| | 14 | 0,0176 | 0,0161 | 8,52 |
| | 21 | 0,0182 | 0,0155 | 14,84 |
| | 28 | 0,0167 | 0,0168 | 0,00 |
| 2NTR | 7 | 0,0186 | 0,0157 | 15,59 |
| | 14 | 0,0182 | 0,0114 | 37,36 |
| | 21 | 0,0175 | 0,0155 | 11,43 |
| | 28 | 0,0196 | 0,0131 | 33,16 |
| 3NTR | 7 | 0,0171 | 0,0163 | 4,68 |
| | 14 | 0,0236 | 0,0171 | 27,54 |
| | 21 | 0,0166 | 0,0123 | 25,90 |
| | 28 | 0,016 | 0,0116 | 27,50 |

Tablica 4.2. Promjene u masi otisnutih papira s 10% pulpe slame žitarica (1NP, 1NJ, 1NTR) procesnim bojama *žuta*, *crna*, *cijan* i *magenta* te postotak biorazgradnje nakon 28 dana provedbe pokusa biorazgradnje.

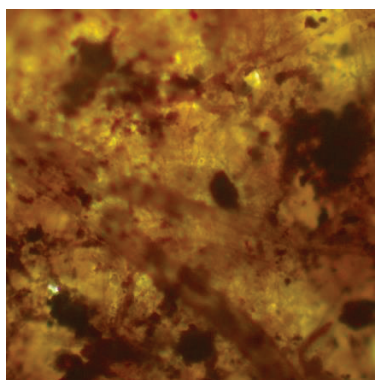
| UZORAK papira | t/ d | m ₀ / g | m/ g | % biorazgradnje |
|-------------------------------|------|--------------------|--------|-----------------|
| 1NTR Digitalni žuti otisci | 7 | 0,0115 | 0,0087 | 24,35 |
| | 14 | 0,0102 | 0,0071 | 30,39 |
| | 21 | 0,0096 | 0,0059 | 38,54 |
| | 28 | 0,0109 | 0,0079 | 27,52 |
| 1NP Digitalni žuti otisci | 7 | 0,0102 | 0,0092 | 9,80 |
| | 14 | 0,0098 | 0,0085 | 13,27 |
| | 21 | 0,0103 | 0,0070 | 32,04 |
| | 28 | 0,0104 | 0,0088 | 15,38 |
| 1NJ Digitalni žuti otisci | 7 | 0,0108 | 0,0102 | 5,56 |
| | 14 | 0,0113 | 0,0096 | 15,04 |
| | 21 | 0,0108 | 0,0078 | 27,78 |
| | 28 | 0,012 | 0,0095 | 20,83 |
| 1NTR Digitalni crni otisci | 7 | 0,0102 | 0,0104 | -1,96 |
| | 14 | 0,0098 | 0,0098 | 0,00 |
| | 21 | 0,009 | 0,0084 | 6,67 |
| | 28 | 0,01 | 0,01 | 0,00 |
| 1NP Digitalni crni otisci | 7 | 0,0113 | 0,0116 | -2,65 |
| | 14 | 0,0107 | 0,0100 | 6,54 |
| | 21 | 0,0103 | 0,0086 | 16,50 |
| | 28 | 0,0102 | 0,0096 | 5,88 |
| 1NJ Digitalni crni otisci | 7 | 0,0098 | 0,0101 | -3,06 |
| | 14 | 0,0096 | 0,0109 | -13,54 |
| | 21 | 0,0112 | 0,0096 | 14,29 |
| | 28 | 0,0099 | 0,0068 | 31,31 |
| 1NTR Digitalni cijan otisci | 7 | 0,0115 | 0,0102 | 11,30 |
| | 14 | 0,0126 | 0,0094 | 25,40 |
| | 21 | 0,0114 | 0,0095 | 16,67 |
| | 28 | 0,0139 | 0,0099 | 28,78 |
| 1NP Digitalni cijan otisci | 7 | 0,0106 | 0,0089 | 16,04 |
| | 14 | 0,0126 | 0,0080 | 36,51 |
| | 21 | 0,0109 | 0,0073 | 33,03 |
| | 28 | 0,0106 | 0,0078 | 26,42 |
| 1NJ Digitalni cijan otisci | 7 | 0,0111 | 0,0080 | 27,93 |
| | 14 | 0,0133 | 0,0080 | 39,85 |
| | 21 | 0,011 | 0,0043 | 60,91 |
| | 28 | 0,0111 | 0,0083 | 25,23 |
| 1NTR Digitalni magenta otisci | 7 | 0,0113 | 0,0099 | 12,39 |
| | 14 | 0,0105 | 0,0072 | 31,43 |
| | 21 | 0,0109 | 0,0076 | 30,28 |
| | 28 | 0,0116 | 0,0084 | 27,59 |
| 1NP Digitalni magenta otisci | 7 | 0,0124 | 0,0110 | 11,29 |
| | 14 | 0,014 | 0,0119 | 15,00 |
| | 21 | 0,0125 | 0,0106 | 15,20 |
| | 28 | 0,013 | 0,0095 | 26,92 |
| 1NJ Digitalni magenta otisci | 7 | 0,0131 | 0,0118 | 9,92 |
| | 14 | 0,0118 | 0,0102 | 13,56 |
| | 21 | 0,013 | 0,0100 | 23,08 |
| | 28 | 0,0118 | 0,0088 | 25,42 |



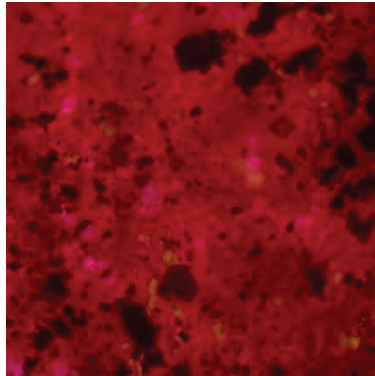
Slika 4.1. Mikrofotografije neotisnutog uzorka papira s 10% pulpe slame pšenice (1NP) u 0., 7., 14., 21. te 28. danu pokusa biorazgradnje snimljene optičkim mikroskopom pri povećanju $P = 400x$.



Slika 4.2. Mikrofotografije digitalnom tehnikom cijan bojom otisnutog uzorka papira s 10% pulpe slame pšenice (1NP) u 0., 7., 14., 21. te 28. danu pokusa biorazgradnje snimljene optičkim mikroskopom pri povećanju $P = 400x$.



Slika 4.3. Mikrofotografija neotisnutog uzorka papira s 10% pulpe slame tritikala (1NTR) u 21. danu provođenja pokusa biorazgradnje snimljene optičkim mikroskopom pri povećanju $P = 400x$.



Slika 4.4. Mikrofotografija digitalnom tehnikom magenta bojom otisnutog uzorka papira s 10% pulpe slame pšenice (1NP) u 21. danu provođenja pokusa biorazgradnje snimljene optičkim mikroskopom pri povećanju $P = 400\times$.

4.2. Test ekotoksičnosti papira primjenom *Lemne minor*

Postupkom navedenim u poglavlju 3.4.3. pripremljeni su uzorci papira, mineralni medij te listovi vodene leće *Lemne minor*. Tijekom eksperimenta pratio se rast u broju listova vodene leće, iz čijih su vrijednosti izračunati specifični rast te inhibicija rasta, prikazano u Tablici 4.3. Prosječna duljina korijena *Lemne minor* nakon 10 dana izloženosti svakim od uzoraka papira prikazana je u Tablici 4.4. Izmjerene vrijednosti absorbancije pri 648 te 664 nm uz izračunate vrijednosti sastava klorofila *a* i *b*, računane prema postupku opisanim u poglavlju 3.4.4. prikazane su u Tablici 4.5.

Tablica 4.3. Broj listova vodene leće *Lemne minor* nakon 7 dana izloženosti uzorcima papira te izračunati specifični rast i inhibicija rasta *Lemne minor*.

| Uzorak | Broj listova | Specifični rast | Inhibicija rasta |
|---------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|
| K | 27 | 0 | - |
| N | 32 | 0 | 0 |
| 1NP | 25 | 0 | 7,7483 |
| 2NP | 28 | 0 | 0 |
| 3NP | 26 | 0 | 3,7996 |
| 1NJ | 26 | 0 | 3,7997 |
| 2NJ | 33 | 0 | 0 |
| 3NJ | 32 | 0 | 0 |
| 1NTR | 28 | 0 | 0 |
| 2NTR | 37 | 0 | 0 |
| 3NTR | 29 | 0 | 0 |
| 1NP žuti | 32 | 0 | 0 |
| 1NJ žuti | 26 | 0 | 3,7997 |
| 1NTR žuti | 28 | 0 | 0 |
| 1NP crni | 33 | 0 | 0 |
| 1NJ crni | 30 | 0 | 0 |
| 1NTR crni | 38 | 0 | 0 |
| 1NP cijan | 27 | 0 | 0 |
| 1NJ cijan | 28 | 0 | 0 |
| 1NTR cijan | 29 | 0 | 0 |
| 1NP magenta | 39 | 0 | 0 |
| 1NJ magenta | 39 | 0 | 0 |
| 1NTR magenta | 28 | 0 | 0 |

Tablica 4.4. Prosječna duljina korijena vodene *leće* *Lemne minor* nakon 10 dana izloženosti uzorcima.

| Uzorak papira | Prosječna duljina korijena <i>Lemne minor</i> / mm |
|----------------------|---|
| K | 10,80 |
| N | 13,00 |
| 1NP | 11,25 |
| 2NP | 9,15 |
| 3NP | 9,50 |
| 1NJ | 12,65 |
| 2NJ | 13,65 |
| 3NJ | 16,50 |
| 1NTR | 11,55 |
| 2NTR | 15,40 |
| 3NTR | 12,15 |
| 1NP žuti | 11,75 |
| 1NJ žuti | 14,70 |
| 1NTR žuti | 10,90 |
| 1NP crni | 11,60 |
| 1NJ crni | 11,80 |
| 1NTR crni | 10,75 |
| 1NP cijan | 8,80 |
| 1NJ cijan | 13,10 |
| 1NTR cijan | 13,20 |
| 1NP magenta | 12,50 |
| 1NJ magenta | 10,00 |
| 1NTR magenta | 9,20 |

Tablica 4.5. Izračunate vrijednosti sastava klorofila *a* i klorofila *b*.

| Uzorak papira | <i>c_a</i> / mg/L | <i>c_b</i> / mg/L |
|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| K | 1,35 | 16,65 |
| N | 0,06 | 32,66 |
| 1NP | 23,91 | 45,86 |
| 2NP | 30,06 | 31,79 |
| 3NP | 22,02 | 59,19 |
| 1NJ | 27,63 | 51,06 |
| 2NJ | 5,67 | 51,92 |
| 3NJ | 8,38 | 55,78 |
| 1NTR | 17,54 | 60,09 |
| 2NTR | 15,51 | 47,02 |
| 3NTR | 19,23 | 55,85 |
| 1NP žuti | 25,76 | 46,49 |
| 1NJ žuti | 20,97 | 55,95 |
| 1NTR žuti | 26,73 | 53,41 |
| 1NP crni | 25,11 | 53,98 |
| 1NJ crni | 19,66 | 61,82 |
| 1NTR crni | 24,20 | 52,12 |
| 1NP cijan | 27,81 | 50,55 |
| 1NJ cijan | 26,74 | 50,59 |
| 1NTR cijan | 24,66 | 59,31 |
| 1NP magenta | 20,87 | 56,92 |
| 1NJ magenta | 22,74 | 54,67 |
| 1NTR magenta | 23,04 | 63,47 |

5. Rasprava

U provedenom se eksperimentu ispitivala biorazgradljivost te ekotoksičnost papira s celuloznom pulpom slame tri vrste žitarica. Način provedbe i praćeni pokazatelji detaljno su opisani u poglavlju 3., *Eksperimentalni dio*.

5.1. Analiza eksperimenta biorazgradljivosti

U eksperimentu je određivana biorazgradljivost papira u uzorku vrtnje zemlje uz pomoć suspenzija mješovite kulture bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i plijesni *Trichoderma* sp.. Biorazgradivost uzoraka ispitivala se 28 dana, a promjena masa prikazana je u tablicama 3.1. i 3.2.. Dio rezultata prikazuje sličan trend promjene mase, odnosno najveća promjena zbilja se u 1. tjednu, maksimum razgradnje postiže se u 2. ili 3. tjednu, te u 4. tjednu ne dolazi do značajne promjene. Najviši postotak biorazgradnje, 54,87%, uoćen je za neotisnuti uzorak papir s 20% pulpe slame pšenice (2NP), dok za crne digitalne otiske na papiru s 10% pulpe slame tritikala (1NTR) nije uočena biorazgradnja jer je postotak biorazgradnje u 4. tjednu iznosio 0,00% . Postotak razgradnje kontrolnog uzorka (komercijalnog novinskog papira) u 4.tjednu pokusa iznosio je 19,88%. Neotisnuti laboratorijski proizvedeni uzorci papira kod kojih je uoćen viši stupanj biorazgradnje su: N (25,60%), 2NP (54,87%), 3NP (38,59%), 2NJ (20,24%), 3NJ (32,02%), 2NTR (33,16%) te 3NTR (27,50%), dok su oni s nižim stupnjem sljedeći: 1NP (13,51%), 1NJ (10,36%) i 1NTR (0,00%). Dakle, kod čak 70% uzoraka neotisnutih uzoraka papira uočena je veća biorazgradljivost u odnosu na kontrolni uzorak (K). Također, da se primijetiti da je najmanja biorazgradljivost uočena kod uzoraka s manjim udjelom pulpe slame žitarica, a većim udjelom recikliranih vlakna. Sličan je slučaj i kod otisnutih uzoraka. Otisnuti uzorci s većom biorazgradljivosti u odnosu na kontrolni uzorak u 4. tjednu provedbe pokusa jesu: 1NTR Digitalni žuti otisak (27,52%), 1NJ Digitalni žuti otisak (20,83%), 1NJ Digitalni crni otisak (31,31%), 1NTR Digitalni cijan otisak (26,42%), 1NJ Digitalni cijan otisak (25,23%), 1NTR Digitalni magenta otisak (27,59%), 1NP Digitalni magenta otisak (26,92%) te 1NJ Digitalni magenta otisak (25,42%).,a oni s manjom: 1NP Digitalni žuti otisak (15,38%), 1NTR Digitalni crni otisak (0,00%) i 1NP Digitalni crni otisak (5,88%). Tijekom trajanja pokusa uzorci su mikroskopirani u svrhu praćenja promjena, te se na njima može uočiti narušena struktura uzorka, ili pak očuvanje iste kod uzoraka kod kojih nije uočena biorazgradnja. Zabilježen je i porast u određenim masama papira, što se može pripisati vrtnjoj zemlji koja je ušla u pore papira, što je vidljivo u mikrofotografijama uzoraka (Slika 4.3. i Slika 4.4.). Porast se

uglavnom zbivao u 3. i 4. tjednu, kada je zemlja ušla u pukotine papira. Takav je slučaj kod otisnutog uzorka 1NP cijan bojom kod kojeg je u 1. tjednu postignut postotak biorazgradnje od 16,04 %, u 2. tjednu od 36,51 %, nakon čega slijedi pad u postotku biorazgradnje u 3. i 4. tjednu pokusa od 33,03 % i 26,42 %. Otisnuti uzorci papira na površini imaju sloj boje što samu strukturu papira čini teže dostupnu mikroorganizmima, što je posebno izraženo kod crnih digitalnih uzoraka za čiju bi biorazgradnju trebalo dulje vrijeme od provedenoga u ovom istraživanju. Boja u otisnutim uzorcima papira također uzrokuje neravnomjernu biorazgradnju, s mogućom inicijacijom na mjestima gdje su prisutne pore ili pukotine u nanesenom sloju boje digitalnom tehnikom tiska [103]. Ovakvi rezultati podudaraju se s nekim prijašnjim istraživanjima, gdje otisak predstavlja problem kod biorazgradnje [104]. Razlog tomu može biti organski sastav tiskarskih boja korištenih u otiskivanju [105], te prisutnost željeza i bakra u tiskarskim bojama koje uzrokuju inhibiciju biorazgradnje [106].

5.2. Analiza testa ekotoksičnosti

U provedbi testa ekotoksičnosti određivana je inhibicija rasta te specifični rast listova *Lemne minor*. Iz tablice 4.4. može se primijetiti da većinski nije došlo do inhibicije rasta, odnosno uzorci papira nisu pokazali negativan utjecaj na rast vodene leće. Laboratorijski uzorci proizvedenih papira kod kojih je uočena inhibicija rasta su 1NP (7,7438), 3NP (3,7996), 1NJ (3,7997) te žutom bojom otisnuti uzorak papira s 10% pulpe slame pšenice (1NP) (3,7997). Prosječna duljina korijena *Lemne minor* kreće se oko istih vrijednosti za sve uzorke, odnosno nijedan uzorak ne pokazuje veće odstupanje od kontrolnog uzorka (K) koji iznosi 10,80 mm. Ovakvi rezultati mogu se pripisati tome da čestice papira koje plutaju u mineralnom mediju ostavljaju dovoljno prostora listovima vodene leće da neometano rastu. Iz Tablice 4.5. vidljivo je da sastav klorofila je ili nije narušen za svaki pojedini uzorak papira u odnosu na kontrolni uzorak, odnosno kod nekih uzoraka koncentracija klorofila *b* premašuje koncentraciju klorofila *a*. Razlog narušavanja sastava klorofila *a* i *b* može biti blokiranje sunčeve svjetlosti od strane čestica papira koje ili plutaju u mineralnom mediju ili se lijepe za korijen i listove *Lemne minor*.

6. Zaključak

Korištenje slame žitarica kao održive alternativne sirovine za proizvodnju papira nudi brojne ekološke i ekonomske prednosti. Sakupljanjem ovog obilnog poljoprivrednog nusprodukta možemo znatno smanjiti potražnju za tradicionalnom drvnom pulpom, čime bi se sačuvala šume i bioraznolikost. Također se smanjuje cjelokupni ugljični otisak papirne industrije. Međutim, kako bi se u potpunosti iskoristio potencijal ove sirovine, potrebna su daljnja istraživanja i tehnološki napredci.

Cilj eksperimenta je bio ispitati biorazgradljivost i ekotoksičnost papira s celuloznom pulpom slame tri vrste žitarica (pšenice, ječma i tritikala) unutar vremenskog perioda od 4 tjedna. Nakon provedbe pokusa i usporedbe rezultata s kontrolnim uzorkom papira (komercijalnim novinskim papirom iz pulpe recikliranih vlakana), može se zaključiti da su papiri načinjeni od celulozne pulpe slame žitarica generalno biorazgradljivi od komercijalnog novinskog papira. Najveći postotak biorazgradnje iznosio je 54,87% za neotisnuti uzorak 2NP, čak 34,99% viši od komercijalnog novinskog papira čija je biorazgradnja nakon 4. tjedna iznosila samo 19,88%. Papiri od celulozne pulpe slame žitarica također su netoksični, odnosno nije uočena znatna inhibicija rasta niti poremećaji u sastavu klorofila vodene leće *Lemna minor*.

Dobiveni rezultati potvrđuju teze o ekološkoj prihvatljivosti korištenja ne-drvnih vlakana za izradu papira, no radi se o relativno novim metodama čija će se svojstva i načini obrade zasigurno dalje istraživati.

7.Literatura

- [1] Bajpai, P., Non-wood Fiber Use in Pulp and Paper, u: Biermann's Handbook of Pulp and Paper, 3rd edition. Raw Material and Pulp Making, Elsevier, 10 (2018) 261-278.
- [2] Sutradhar, S., Sarkar, M., Nayeem, J., Jahan, M.S., Tian, C., Potassium hydroxide pulping of four non-woods, Bangladesh J. Sci. Ind. Res. 53(1) (2018) 1-6.
- [3] Liu, Z., Wang, H., & Hui, L. Pulping and Papermaking of Non-Wood Fibers, 1(2018) 4-5.
- [4] Alireza A., Nonwood fibers a potential source of raw material in papermaking, Journal of Macromolecular Science: Part D–Reviews in Polymer Processing, 45(10) (2006) 1133-1136.
- [5] Samyn, P., Barhoum, A., Engineered nanomaterials for papermaking industry, u: Fundamentals of Nanoparticles, Elsevier, 9 (2018) 245-277.
- [6] El-Sayed, A., Essam S., M., El-Sakhawy, Abdel-Monem, M., Non-wood fibers as raw material for pulp and paper industry, Nordic Pulp & Paper Research Journal, 35(2) (2020) 215-230.
- [7] Bajpai, P., Nonwood Fiber Use in Pulp and Paper, Editor(s): Pratima Bajpai, Biermann's Handbook of Pulp and Paper (3rd edition), Elsevier, 10 (2018) 261-278.
- [8] Bloemhof-Ruwaard, J. M., Wassenhove, L. V., Gabel, H. L., Weaver, P. M., An environmental life cycle optimization model for the European pulp and paper industry, Omega, Int. J. Mgmt Sci. 24(6) (1996) 615-629.
- [9] Ahmed, S., Hall, A.M., Ahmed, S.F., Comparative Biodegradability Assessment of Different Types of paper, Journal of Natural Sciences Research, 8 (2018) 9-20.
- [10] Bhatnagar A, Sain M., Processing of cellulose nanofiber-reinforced composites, Journal of Reinforced Plastics Composites, 24(12) (2005) 1259-68
- [11] Arhin, S. G., Cesaro, A., Di Capua, F., Esposito, G., Recent progress and challenges in biotechnological valorization of lignocellulosic materials: Towards sustainable biofuels and platform chemicals synthesis, Science of The Total Environment, 857(1) (2023)
- [12] <http://www.reverdy.uk.com/documentation/fibre-roughage> (pristup 19. srpnja 2023.)
- [13] Brinchi L., Cotana F., Fortunati E., Kenny J.M., Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: technology and applications, Carbohydr Polym, 94(1) (2013) 154-69.
- [14] Abdul Khalil H. P. S., Saurabh, C. K., Asniza, M., Tye, Y. Y., Fazita, M. R. N., Syakir, M. I., Fizree, H. M., Yusra, A. F. I., Haafiz, M. K. M., Kassim, M. A., Suraya N. L. M., Nanofibrillated cellulose reinforcement in thermoset polymer composites, Penang, Malaysia, In Woodhead

Publishing Series in Composites Science and Engineering, Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites, Woodhead Publishing, (2017) 1-24.

[15] Rowell, R.M., Pettersen, R., Han, J.S., Rowell, J.S., Tshabalala, M.A., Cell Wall Chemistry, u: Handbook of Wood chemistry and wood composites, edited by Rowell, R.M., SAD, 3 (2005) 43-84.

[16] Ciolacu, D. E., et al., Supramolecular Structure: A Key Parameter for Cellulose Biodegradation, Macromolecular Symposia 272 (2008) 136-142.

[17] Komarek, R. J. et al., Biodegradation of radiolabeled cellulose acetate and cellulose propionate, Journal of Applied Polymer Science, 50 (1993) 1739-1746.

[18] Park, C. H., et al., Biodegradability of cellulose fabric, Journal of Applied Polymer Science, 94 (2004) 248-253.

[19] Thomas, S., Paul, S. A., Pothan, L. A., Deepa, B., Natural fibres: structure, properties and applications, u: Kalia, S., Kaith, B. S., Kaur, I., Cellulose fibers: bio-and nano-polymer composites, Berlin: Springer (2011) 3-42.

[20] Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A., Xiong, G., Hemicellulose biosynthesis, Planta, 238(4), (2014) 627-642.

[21] Hu, L.S., Fang, X.Z., Du, M.H., Luo, F. and Guo, S.H., Hemicellulose-Based Polymers Processing and Application, American Journal of Plant Sciences, 11 (2020) 2069.

[22] Pérez, J., et al., Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview, International Microbiology 5 (2002) 53-63.

[23] Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M., Molecular and biotechnological aspect of xylanases, FEMS Microbiol Rev, 23 (1999) 411-456.

[24] Stipanovic, A. J., et al., Hemicellulose from biodelignified wood: A feedstock for renewable materials and chemicals, ACS Symposium Series 921 (2006) 210-221.

[25] Zhao, Y., et al., Hemicellulose-Based Film: Potential Green Films for Food Packaging, Polymers, 12 (2020)

[26] Liu, X., et al., Hemicellulose from Plant Biomass in Medical and Pharmaceutical Application: A Critical Review, Current Medicinal Chemistry, 26(14) (2019) 2430-2455.

[27] Boerjan, W., Ralph, J., Baucher M., Lignin biosynthesis, Annu Rev Plant Biol., 54 (2003) 519-546.

- [28] Vanholme, R., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. Lignin engineering, *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3) (2008) 278-285.
- [29] Plazonić, I., Slama žitarica kao alternativni izvor vlakana u izradi papira za novinski tisak, (2014) 17-23.
- [30] Roberts, J. C., *Chemistry of Paper*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK (1996).
- [31] Kirk T. K., Farrel, R. L., Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin, *Annu Rev Microbiol.*, 41 (1987) 465-505.
- [32] Tuomela, M., et al., Biodegradation of lignin in a compost environment: a review *Bioresource Technology*, 72 (2000) 169-183.
- [33] Petrić, D., Vusić, D., Geček, R., Kartoni: od proizvodnje do konačne primjene, *Tehnički glasnik* 6(2) (2012) 219-227
- [34] Kljajić, F., *Tehnologija celuloze i drvenjače*, Školska knjiga, Zagreb, (1984) str.155.
- [35] Reddy, N., Yang, Y., Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications, *TRENDS Biotechnol.*, 23(1) (2005) 22-7.
- [36] Khalil, H. A., Yusra, A. I., Bhat, A. H., Jawaid, M., Cell wall ultrastructure, anatomy, lignin distribution, and chemical composition of Malaysian cultivated kenaf fiber, *Ind Crops Prod*, 31(1) (2010) 113-21.
- [37] Opačić, I., *Kemijska prerada drveta*, Zagreb, (1967) str.353.
- [38] Zhang, L., Tsuzuki, T., Wang, X., Preparation and Characterization on Cellulose Nanofiber Film, *Materials Science Forum*, Pts 1-3. 654-656 (2010) 1760-1763.
- [39] K.Abe, S. Iwamoto, and H. Yano, *Biomacromolecules*, 8(10), (2007), 3276-8.
- [40] Alemdar, A., Sain, M., Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues—wheat straw and soy hulls, *Bioresource Technology*, 99 (2008) 1664-1671.
- [41] Reddy, N., Yang, Y., Natural cellulose fibers from soybean straw, *Bioresource Technology*, 100 (2009) 3593-3598.
- [42] Reddy, N., Yang, Y., Properties and potential applications of natural cellulose fibers from cornhusks. *Green Chemistry*, 7(4) (2005a) 190-195.
- [43] Reddy, N., Yang, Y., Structure and properties of high quality natural cellulose fibers from cornstalks. *Polymer* 46(15) (2005b) 5494-5500.
- [44] Reddy, N., Yang, Y., Preparation and characterization of long natural cellulose fibers from wheat straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(21) (2007a) 8570-8575.

- [45] Reddy, N., Yang, Y., Structural and properties of natural cellulose fibers obtained from sorghum leaves and stems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14) (2007b) 5569-5574.
- [46] Chen, X., Yu, J., Zhang, Z., Lu, C., Study on structure and thermal stability properties of cellulose fibers from rice straw, *Carbohydrate Polymers*, 85(1) (2011) 245-250.
- [47] Cherian, B.M., Leão, A.L., Souza, S.F., Thomas, S., Pothan, L.A., Kottaisamy, M., Isolation of nanocellulose from pineapple leaf fibers by steam explosion, *Carbohydrate Polymers*, 81(3) (2010) 720–725.
- [48] Bhattacharya, D., Germinario, L.T., Winter, W.T., Isolation, preparation and characterization of cellulose microfibrils obtained from bagasse, *Carbohydrate Polymers*, 73(3) (2008) 371-377.
- [49] Haafiz, M.K., Eichhorn, S.J., Hassan, A., Jawaid, M., Isolation and characterization of microcrystalline cellulose from oil palm biomass residue. *Carbohydrate Polymers*, 93(2) (2013) 628-634.
- [50] Lu, P., Hsieh, Y.L., Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from rice straw, *Carbohydrate Polymers*, 87(1) (2012b) 564-573.
- [51] Lu, P., Hsieh, Y.L., Cellulose isolation and core-shell nanostructures of cellulose nanocrystals from chardonnay grape skins. *Carbohydrate Polymers* 87(4), 2012a 2546-2553.
- [52] Abate, L., Joshi, A., Bachheti, R., Reis, C., Chandel, A., Agricultural Residues as Raw Materials for Pulp and Paper Production: Overview and Applications on Membrane Fabrication, *Membranes*, 13 (28) (2023) 1-17.
- [53] Rowell, R. M., Sanadi, A.R, Caulfield, D.F., Jacobson, R.E., Utilization of Natural Fibers in Plastic Composites: Problems and Opportunities, *Lignocellulosic Plastics Composites*, (1997), 23-51.
- [54] Zhongqiu, F., Xingye, A., Zhengbai, C., Haibing, C., Junwei, L., Liqin, L., Hongbin, L., A facile process for efficient extraction of lignin with controllable morphology from wheat straw based bio-mechanical pulping effluent, *Industrial Crops and Products*, Volume 201, 2023
- [55] Zhang, Q., Peng, J. J., Chen, L. H., Shen, Z. H., Manufacture of low density printing paper using wheat straw chemical pulp, *China Pulp & Paper*, 36(8) (2017) 30-34.
- [56] Brinchi, L., Cotana, F., Fortunati, E., Kenny, J., Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: technology and applications, *Carbohydr Polym*, 94(1) (2013) 154-169.

- [57] Yu, H., Qin, Z., Liang, B., Liu, N., Zhou, Z., Chen L., Facile extraction of thermally stable cellulose nanocrystals with a high yield of 93% through hydrochloric acid hydrolysis under hydrothermal conditions, *J Mater Chem A*, 1(12) (2013) 3938-3944.
- [58] Pirani, S., Hashaikeh, R., Nanocrystalline cellulose extraction process and utilization of the byproduct for biofuels production, *Carbohydr Polym*, 93 (2013) 357-363.
- [59] Tari, V. S., Kannan, K., *Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation*, u: *Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation*, Elsevier (2022) 547-557.
- [60] Be'guin, P., Aubert, J. P., The biological degradation of cellulose, *FEMS Microbiol Rev*, 13(1) (1994) 25-58.
- [61] Ogundero, V. W., Factors affecting growth and cellulose hydrolysis by the thermotolerant *Aspergillus nidulans* from composts, *Acta Biotechnol.*, 3 (1983) 65-72.
- [62] Wilson, D.B., Cellulases, *Encyclopedia of Microbiology* (3rd edition), Academic Press, (2009) 252-258.
- [63] Gupta, R., Mehta, G., Deswal, D., Sharma, S., Jain, K. K., Kuhad, R. C., & Singh, A. Cellulases and Their Biotechnological Applications, *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery* (2013) 89-106.
- [64] Coughlan, M. P. Mechanisms of cellulose degradation by fungi and bacteria. *Animal Feed Science and Technology* 32 (1991) 1-3.
- [65] Tafur Rangel, A. E., Croft, T., González Barrios, A. F. et al., Transcriptomic analysis of a *Clostridium thermocellum* strain engineered to utilize xylose: responses to xylose versus cellobiose feeding, *Sci Rep* 10 (2020).
- [66] <https://genome.jgi.doe.gov/portal/cloth/cloth.home.html> (pristup 18. srpnja 2023)
- [67] Duedu, K. O., French, C. E., Characterization of a *Cellulomonas fimi* exoglucanase/xylanase-endoglucanase gene fusion which improves microbial degradation of cellulosic biomass, *Enzyme Microb Technol.*, 93 (2016) 113-121.
- [68] <https://bacdiv.dsmz.de/strain/2354> (pristup 18. kolovoza 2023).
- [69] Kim, Y. K., Lee SC, Cho YY, Oh HJ, Ko YH. Isolation of Cellulolytic *Bacillus subtilis* Strains from Agricultural Environments. *ISRN Microbiol.*, 29 (2012).
- [70] https://www.researchgate.net/figure/Scanning-electron-microscopic-image-of-B-subtilis-168_fig1_30496684 (pristup 18. kolovoza 2023).

- [71] Mbarki, K., Fersi, M., Louati, I., Elleuch, B., Sayari, A., Biodegradation study of PDLA/cellulose microfibrils biocomposites by *Pseudomonas aeruginosa*, *Environmental Technology* (2019).
- [72] https://www.researchgate.net/figure/Scanning-electron-micrograph-of-Pseudomonas-aeruginosa-x10-000_fig2_266869622 (pristup 18. kolovoza 2023).
- [73] https://www.researchgate.net/figure/Trichoderma-reesei-Olympus-BX41-100x_fig2_331954260 (pristup 18. kolovoza 2023).
- [74] Rosolen R., Aono, A., Almeida, D. A., Filho, J. F., Horta, M. A. C., de Souza A. P., Network Analysis Reveals Different Cellulose Degradation Strategies Across *Trichoderma harzianum* Strains Associated With XYR1 and CRE1, *Frontiers in Genetics*, 13 (2022).
- [75] https://www.researchgate.net/figure/Phialides-and-phialospores-of-a-Trichoderma-harzianum-and-b-Trichoderma-viride-taken_fig1_345045423 (pristup 18. kolovoza 2023).
- [76] Kassim, E. A., Cellulase enzyme from *Aspergillus niger*, *Microbiol Immunol.*, 26(6) (1982) 449-54.
- [77] https://www.researchgate.net/figure/Aspergillus-niger-on-PDA-culture-and-slide_fig4_352889250 (pristup 18. kolovoza 2023).
- [78] Zhang, G., Dong, Y., Design and application of an efficient cellulose-degrading microbial consortium and carboxymethyl cellulase production optimization, *Front Microbiol.* (2022)
- [79] Lu, Y., Yan, L., Wang, Y., Zhou, S., Fu, J., Zhang, J., Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Journal of Hazardous Materials*, 165(1-3) (2009) 1091-1097.
- [79] Barbosa, F.C., Silvello, M.A., Goldbeck, R., Cellulase and oxidative enzymes: new approaches, challenges and perspectives on cellulose degradation for bioethanol production. *Biotechnol Lett*42, (2020) 875-884.
- [80] <https://www.onlinebiologynotes.com/cellulose-decomposition-microbial-decomposition-of-cellulose-> (pristup 24. kolovoza 2023).
- [81] Krusá, M., Henriksson, G., Johansson, G., Reitberger, T., & Lennholm, H. Oxidative cellulose degradation by cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*: A model compound study, *Holzforschung*, 59(3) (2005) 263-268.
- [82] Dimarogona, M., Topakas, E., Christakopoulos, P., Cellulose Degradation By Oxidative Enzymes, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3) (2012).

- [83] Tarazona, J. V., Ramos-Peralonso, M. J., *Ecotoxicology*. Encyclopedia of Toxicology (2014) 276-280.
- [84] Bidwell, J. R., *In vivo ecotoxicology models*, *An Introduction to Interdisciplinary Toxicology* (2020) 507–523.
- [85] Carney, E. W., Ellis, A. L., Tornesi, B., *Development and use of in vivo and in vitro endocrine assays in mammalian toxicology*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(1), (2011) 205-212.
- [86] Brown, R. P., Delp, M. D., Lindstedt, S. L., Rhomberg, L. R., Beliles, R. P., *Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models*, *Toxicology and Industrial Health*, 13(4-5) (1997) 407-484.
- [87] Hartung, T., *Toxicology for the twenty-first century*. *Nature*, 460(7252), (2009) 208-212.
- [88] Knight, A. W., Little, M. C., Houck, K. A., *A computational approach to identify potential adverse effects of drug candidates*, *Toxicological Sciences*, 152(1), (2016) 2-9.
- [89] Rand, G. M., Wells, P. G., McCarty, L. S., *Introduction to aquatic toxicology*, u: Rand G. M., ur., *Fundamentals of aquatic toxicology*, Washington, DC: Taylor & Francis; (1995) str.366.
- [90] Tarazona, J. V., Ramos-Peralonso, M. J., *Ecotoxicology*, Encyclopedia of Toxicology (2014) 276-280.
- [91] Newman, M. C., Zhao, Y., *Ecotoxicology Nomenclature: LC, LD, LOC, LOEC, MAC*, Encyclopedia of Ecology (2008) 1187-1193
- [92] *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th ed. APHA, AWWA, WPCF, Washington D.C. (1989.)
- [93] https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Toxicology_Dose_Descriptors.html (pristup 20. kolovoza 2023).
- [94] Suter II., G. W., *Ecological risk assessment*, Boca Raton, FL: Lewis Publishers (1993).
- [95] Newman, M. C., *Fundamentals of ecotoxicology*, Boca Raton, FL: CRC Press (2010) str.541.
- [96] Clark, J. R., Van Hassel, V. H., Nicholson, R. B., Cherry, D. S., and Calms, J. *Accumulation and depuration of metals by duckweed (Lemna perpusilla)*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 5 (1981) 87-96.
- [45] WUNCHENG WANG Water Quality Section, Illinois State Water Survey, Box 697, Peoria, Illinois 61652

- [97] WUNCHENG WANG Water Quality Section, Illinois State Water Survey, Box 697, Peoria, Illinois 61652
- [98] King, J. M., Coley, K. S., Toxicity of aqueous extracts of natural and synthetic oils to three species of Lemna, ASTM STP891 (1985) 302-309.
- [99] Tong, Z., Jin H. J., Use of duckweed (*Lemna minor* L.) growth inhibition test to evaluate the toxicity of acrylonitrile, sulphocyanic sodium and acetonitrile in China, *Environmental Pollution*, 98 (1997) 143-147.
- [100] Radić, Sandra, et al., Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters, *Ecotoxicology and environmental safety* 74(2) (2011) 182-7.
- [101] Ziegler, P. D., et al., Duckweeds for water remediation and toxicity testing, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 98 (2016) 1127-1154.
- [102] Correll, D. S., and Correll, H. B. Aquatic and wetland plants for Southwestern United States. EPA Water Pollution Control Research Series 16030 DNL. Environmental Protection Agency, Washington, DC (1972).
- [103] Abu-Lail, L., An atomic force microscopy study of bacterial adhesion to natural organic matter-coated surfaces in the environment [electronic resource] (2023).
- [104] US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Systematic Botany and Mycology Laboratory
- [105] Sridach, W., et al., Biodegradable barrier coating on paperboard; effects on biodegradation, recycling and incineration (2006).
- [106] Ahmed, S. M., et al., Comparative Biodegradability Assessment of Different Types of paper, *Journal of Natural Sciences Research*, 8 (2018) 9-20.
- [107] Alvarez, J. V. L., Larrucea, M. A., Bermudez, P. A., Chicote, B. L., Biodegradation of paper waste under controlled composting conditions, *Waste Management*, 29(1) (2009) 1514-1519.
- [108] Charest, M. H., Beauchamp, C. J., Composting of de-inking paper sludge with poultry manure at three nitrogen levels using mechanical turning: behaviour of physico-chemical parameters, *Bioresource Technology*, 81(1) (2001) 7-17.

8. Popis oznaka i simbola

ROH – reaktivne kisikove vrste

CDH - celobioza dehidrogenaza

EC₅₀ – efektivna koncentracija koja je izazivala na 50% populacije

ED₅₀ – efektivna doza koja je izazvala učinak na 50% populacije

LC₅₀ – letalna koncentracija koja je izazvala smrt kod 50% populacije

LD₅₀ – letalna doza koja je izazvala smrt kod 50% populacije

LOEC – najniža koncentracija tvari s vidljivim štetnim učinkom

NOEC – najviša koncentracija tvari bez vidljivog štetnog učinka

T – temperatura, °C

t – vrijeme, d(dan)

μ - specifični rast vodene leće *Lemna minor*

$\%I_r$ - postotak inhibicije rasta *Lemna minor*

μ_c - specifični rast u kontrolnom uzorku

C_a - koncentracija klorofila a, mg/L

C_b - koncentracija klorofila b, mg/L

V - volumen

m - masa, g

I - inhibicija nastajanja klorofila a, odnosno b

C_{SPa} - specifična koncentracija klorofila a

C_{SPb} - specifična koncentracija klorofila b

9. Životopis

Lucija Dubravac [REDACTED] Završila je XVI. Jezičnu gimnaziju u Zagrebu te 2018. godine upisuje prijediplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2023. sudjeluje na Studenskom kongresu o održivoj kemiji i inženjerstvu gdje je prezentirala svoj rad putem posterskog priopćenja. Radila je kao stručni suradnik u rješavanju problemskih zadataka za tvrtku Quizlet na područjima opće kemije, fizikalne kemije, analitičke kemije i organske kemije u razdoblju od ožujka 2021. do ožujka 2022. Od listopada 2022. godine radi kao stručni vodič u Tehničkom muzeju Nikola Tesla u Zagrebu. Stručnu praksu je odradila u hrvatskoj farmaceutskoj tvrtki Biognost u Zagrebu.