

**UNIVERZITET CRNE GORE**  
**Metalurško - tehnološki fakultet**



**MILORAD OSMAJIĆ**

**ISPITIVANJE SADRŽAJA TEŠKIH METALA U EKSTRAKTIMA PLODA  
KLEKE (*JUNIPERUS COMMUNIS*) NA PODRUČJU CRNE GORE**

**MASTER RAD**

**Podgorica, 2024. god.**

**UNIVERZITET CRNE GORE**  
**Metalurško - tehnološki fakultet**



**MILORAD OSMAJIĆ**

**ISPITIVANJE SADRŽAJA TEŠKIH METALA U EKSTRAKTIMA PLODA  
KLEKE (*JUNIPERUS COMMUNIS*) NA PODRUČJU CRNE GORE**

**MASTER RAD**

**Podgorica, 2024. god.**

## PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Milorad Osmajić

Datum i mjesto rođenja: 09.11.1998. godine; Nikšić

Institucija: Univerzitet Crne Gore - Podgorica

Naziv završenog osnovnog studijskog programa i godina završetka studija: Zaštita životne sredine, 2020. godine

## INFORMACIJE O MAGISTARSKOM RADU

Naziv studija: Zaštita životne sredine

Naslov rada: Ispitivanje sadržaja teških metala u ekstraktima ploda kleke (*Juniperus Communis*) na području Crne Gore

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

## UDK, OCJENA I ODBRANA MASTER RADA

UDK:

Datum prijave rada: 16.02.2023. godine

Datum prihvatanja teme: 07.04.2023. godine

Mentor: Prof. dr Biljana Damjanović Vratnica, redovni profesor

Komisija za ocjenu rada:

Prof. dr Nada Blagojević, MTF, predsjednik

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, mentor

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, MTF, član

Komisija za odbranu rada:

Prof. dr Nada Blagojević, MTF, predsjednik

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, mentor

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, MTF, član

Lektor: Autolektura

Datum odbrane:

UniverzitetCrneGore  
Metalurško-tehnološki fakultet

## IZJAVA O AUTORSTVU

Kandidat: **Milorad Osmajić**

Na osnovu člana 22. Zakona o akademskom integritetu, ja, dolje potpisani/potpisana

### IZJAVLJUJEM

Pod punom krivičnom i materijalnom odgovornošću da je master rad pod nazivom:

**“ ISPITIVANJE SADRŽAJA TEŠKIH METALA U EKSRAKTIMA PLODA KLEKE  
(*JUNIPERUS COMMUNIS*) NA PODRUČJU CRNE GORE ”**

Rezultat sopstvenog istraživačkog rada, da nijesam kršio/kršila autorska prava i koristio/koristila intelektualnu svojinu drugih lica i da je navedeni rad moje originalno djelo.

U Podgorici,

Potpis studenta

## **ZAHVALNICA**

Ogromnu zahvalnost zasluŹuje moja mentorka prof. dr Biljana Damjanović – Vratnica na predloŹenoj temi, pruŹenom znanju, pomoći prilikom izvođenja hemijskih analiza, velikoj pomoći i uloŹenom trudu prilikom izrade ovog master rada.

Takođe, Źelim da se zahvalim članovima komisije prof. dr Nadi Blagojević i prof. dr Vesni Vukašinović Pešić na pomoći i sugestijama.

Hvala dr SneŹani Vukanović i kolegici MApp Gordani Bošković na pomoći prilikom pripreme potrebnog materijala i izvođenja hemijskih analiza.

Eksperimentalni dio ove master teze rađen je u laboratorijama za Analitičku hemiju i Instrumentalne metode, na Metalurško – tehnološkom fakultetu u Podgorici.

Hvala mojoj porodici i prijateljima na pruŹenoj podršci.

# SADRŽAJ

<b>SAŽETAK .....</b>	<b>8</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>10</b>
<b>1. UVOD.....</b>	<b>12</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE.....</b>	<b>14</b>
2.1. Teški metali.....	18
2.2. Opšte karakteristike vrste <i>Juniperus communis</i> .....	21
2.3. Klasifikacija vrste <i>Juniperus</i> .....	24
2.4. Pregled dosadašnjih istraživanja o sadržaju teških metala u rodu <i>Juniperus</i> .....	27
2.5. Metode ekstrakcije fitohemikalija.....	31
<b>3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>34</b>
3.1. Uzorkovanje biljnog materijala.....	34
3.2. Potrebna oprema .....	36
3.3. Određivanje sadržaja teških metala u plodu kleke i ekstraktima ploda kleke dobijenih različitim metodama ekstrakcije .....	37
3.3.1. <i>Određivanje sadržaja teških metala u plodu kleke postupkom mokre digestije</i> .....	37
3.3.2. <i>Određivanje sadržaja teških metala u plodu kleke postupkom mineralizacije</i> .....	38
3.3.3. <i>Soxhlet ekstrakcija ploda kleke</i> .....	39
3.3.4. <i>Ultrazvučna ekstrakcija ploda kleke</i> .....	40
3.3.5. <i>Određivanje sadržaja teških metala u infuzu ploda kleke</i> .....	42
3.3.6. <i>Određivanje sadržaja teških metala u maceratu ploda kleke</i> .....	42
3.3.7. <i>Određivanje sadržaja teških metala AAS metodom</i> .....	43
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>44</b>
4.1. Rezultati određivanja sadržaja teških metala u plodu kleke dobijenim metodom mokre digestije.....	45
4.2. Rezultati određivanja sadržaja teških metala u plodu kleke dobijenih metodom mineralizacije .....	46
4.3. Rezultati određivanja sadržaja teških metala u infuzu ploda kleke .....	48
4.4. Rezultati određivanja sadržaja teških metala u maceratu ploda kleke.....	49

4.5. Rezultati određivanja sadržaja teških metala soxhlet ekstrakcijom.....	50
4.6. Rezultati određivanja sadržaja teških metala ultrazvučnom ekstrakcijom .....	52
4.7. Korelaciona analiza rezultata.....	54
4.8. Poređenje rezultata sa literaturnim podacima iz drugih studija.....	55
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>58</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>60</b>
<b>PRILOG.....</b>	<b>66</b>
<b>POPIS SLIKA .....</b>	<b>69</b>
<b>POPIS TABELA .....</b>	<b>69</b>
<b>POPIS GRAFIKONA.....</b>	<b>70</b>
<b>POPIS MAPA .....</b>	<b>70</b>

## SAŽETAK

U ovom master radu ispitan je plod kleke (*Juniperus communis*) i ekstrakti ploda kleke sa područja Crne Gore. Kleka (*Juniperus communis* L.) je zimzelena biljka, od davnina poznata po svojim ljekovitim osobinama i ima široku primjenu u raznim sferama života. Ljekovito bilje od davnina služi čovječanstvu u medicinske i terapijske svrhe. Danas se iz ljekovitih i biljaka sa aromom izdvajaju sastojci poput etarskih i masnih ulja, vitamini i mnogi drugi specifični sastojci, kao i druge aktivne materije. Biljne ekstrakte najčešće dobijamo tako što se odgovarajućom metodom i selektivnim rastvaračima izoluju ciljane bioaktivne materije najčešće iz suve biljne droge. Plod kleke je izvor bioaktivnih materija koji se koristi kao ljekovito sredstvo. Za ekstrakciju ploda kleke korišćene su: Soxhlet ekstrakcija, maceracija, ekstrakcija vreloom vodom (priprema infuza), ultrazvučna ekstrakcija. Analizirani su biljni uzorci sa pretpostavljenog čistog staništa, sa zagađenog područja (blizina Termoelektrane Pljevlja), kao i sa lokacije u blizini prometne saobraćajnice. U ekstraktima su određivani teški metali olovo i nikl, kao i esencijalni metali: cink, mangan, bakar i gvožđe.

Prinos ekstrakata kleke različitim metoda ekstrakcije kretao se od 1,0837 g do 5,283 g u odnosu na kg suve biljke. Pokazalo se da je sadržaj metala sa zagađenog i srednje zagađenog područja značajno veći od sadržaja metala u plodu i ekstraktima sa pretpostavljenog čistog staništa. Najveća koncentracija metala u plodu kleke zabilježena je u uzorku sa zagađenog područja, u okolini Termoelektrane Pljevlja. Koncentracija metala u plodu kleke kretala se: za cink od 1,070 do 1,613 ppm, bakar od 0,543 do 0,801 ppm, nikal od 0,070 do 0,119 ppm, mangan od 0,499 do 0,670 ppm, olovo od 0,350 do 0,557 ppm, gvožđe od 2,340 do 4,435 ppm.

Koncentracija metala u ekstraktima ploda kleke kretao se: za Soxhlet ekstrakciju: cink od 0,485 do 0,503 ppm, bakar od 0,185 do 0,210 ppm, nikal od 0,035 do 0,046 ppm, mangan od 0,162 do 0,260 ppm, olovo od 0,063 do 0,142 ppm, gvožđe od 0,987 do 1,766 ppm; za maceraciju: cink se kretao od 0,115 do 0,154 ppm, bakar od 0,010 do 0,071 ppm, nikal od 0,028 do 0,030 ppm, mangan od 0,130 do 0,215 ppm, olovo od 0,024 do 0,045 ppm, gvožđe od 0,530 do 0,692 ppm; za ekstrakciju vreloom vodom (infuz): cink se kretao od 0,152 do 0,181 ppm, bakar od 0,033 do 0,043 ppm, nikal od 0,006 do 0,008 ppm, mangan 0,144 do 0,255 ppm, olovo od 0,035 do 0,123 ppm, gvožđe od 0,547 do 0,709 ppm; za ultrazvučnu ekstrakciju: cink se kretao od 0,488 do 0,557 ppm, bakar od 0,125 do 0,176 ppm, nikal od 0,020 do 0,023 ppm, mangan od 0,147 do 0,263 ppm, olovo od 0,055 do 0,135 ppm, gvožđe od 0,712 do 0,890 ppm.

Rastvorljivost metala za metode ekstrakcije iznosile su: za Soxhlet ekstrakciju: cink 38,15 %, bakar 28,50 %, nikal 41,66 %, mangan 35,40 %, olovo 23,09 %, gvožđe 41,24 %; za maceraciju: cink 10,37 %, bakar 5,11 %, nikal 30,20 %, mangan 29,01 %, olovo 7,61 %, gvožđe 18,76 %; za ekstrakciju vreloom vodom (infuz): cink 12,53 %, bakar 5,40 %, nikal 7,29 %, mangan 31,43 %, olovo 18,09 % i gvožđe 18,91 %; za ultrazvučnu ekstrakciju: cink 39,78 %, bakar 22,07 %, nikal 21,87 %, mangan 33,50 %, olovo 21,66 %, gvožđe 25,23 %.



Koncentracija ispitanih metala u plodu kleke i dobijenim ekstraktima opada u sljedećem nizu Fe>Zn>Mn>Cu>Pb>Ni. Isti trend je i kod koncentracije metala u izolovanim ekstraktima ploda kleke. Pretpostavlja se da ekstrakti ploda kleke dobijeni metodom Soxhlet ekstrakcije imaju veći sadržaj teških metala u odnosu na ostale ispitivane metode ekstrakcije zbog dužeg vremena ekstrakcije i više temperature rastvarača. Kleka (*Juniperus communis*) je biljna vrsta za koju na našim prostorima nema mnogo studija, te stoga ovaj rad može poslužiti kao dobra podloga za dalje istraživanje ove biljke i produbljivanju cjelokupne teme o teškim metalima.

***Ključne riječi:*** Kleka, ekstrakcija, teški metali, spektrometrija.

## SUMMARY

In this master thesis, juniper fruit (*Juniperus communis*) and juniper fruit extracts from the area of Montenegro were examined. Juniper (*Juniperus communis* L.) is an evergreen plant, known since ancient times for its medicinal properties and widely used in various spheres of life. Medicinal plants have served mankind for medical and therapeutic purposes since ancient times. Today, ingredients such as essential and fatty oils, vitamins and many other specific ingredients, as well as other active substances, are extracted from medicinal and aromatic plants. Plant extracts are usually obtained by isolating the targeted bioactive substances, usually from dry herbal drugs, using the appropriate method and selective solvents. Juniper fruit is a source of bioactive substances that is used as a medicinal agent. For juniper fruit extraction, the following were used: Soxhlet extraction, maceration, extraction with hot water (infusion), ultrasonic extraction. Plant samples were analyzed from a presumed clean habitat, from a polluted area (near the Pljevlja Thermal Power Plant), as well as from a location near a traffic road. Heavy metals lead and nickel, as well as essential metals: zinc, manganese, copper and iron were determined in the extracts.

The yield of juniper extracts by different extraction methods ranged from 1.0837 g to 5.283 g in relation to kg of dry plant. It was shown that the metal content from the polluted and moderately polluted area is significantly higher than the metal content in the fruit and extracts from the assumed clean habitat. The highest metal content in juniper fruit was recorded in a sample from a polluted area, in the vicinity of the Pljevlja Thermal Power Plant. The concentration of metals in juniper fruit ranged: for zinc from 1.070 to 1.613 ppm, copper from 0.543 to 0.801 ppm, nickel from 0.070 to 0.119 ppm, manganese from 0.499 to 0.670 ppm, lead from 0.350 to 0.557 ppm, iron from 2.340 to 4.435 ppm.

The concentration of metals in juniper fruit extracts ranged: for Soxhlet extraction: zinc from 0.485 to 0.503 ppm, copper from 0.185 to 0.210 ppm, nickel from 0.035 to 0.046 ppm, manganese from 0.162 to 0.260 ppm, lead from 0.063 to 0.142 ppm, iron from 0.987 to 1.766 ppm; for maceration: zinc ranged from 0.115 to 0.154 ppm, copper from 0.010 to 0.071 ppm, nickel from 0.028 to 0.030 ppm, manganese from 0.130 to 0.215 ppm, lead from 0.024 to 0.045 ppm, iron from 0.530 to 0.692 ppm; for hot water extraction (infusion): zinc ranged from 0.152 to 0.181 ppm, copper from 0.033 to 0.043 ppm, nickel from 0.006 to 0.008 ppm, manganese from 0.144 to 0.255 ppm, lead from 0.035 to 0.123 ppm, iron from 0.547 to 0.709 ppm. ; for ultrasonic extraction: zinc ranged from 0.488 to 0.557 ppm, copper from 0.125 to 0.176 ppm, nickel from 0.020 to 0.023 ppm, manganese from 0.147 to 0.263 ppm, lead from 0.055 to 0.135 ppm, iron from 0.712 to 0.890 ppm.

The solubility of metals for the extraction methods were: for Soxhlet extraction: zinc 38, 15%, copper 28.50%, nickel 41.66%, manganese 35.40%, lead 23.09%, iron 41.24%; for maceration: zinc 10.37%, copper 5.11%, nickel 30.20%, manganese 29.01%, lead 7.61%, iron 18.76%; for hot water extraction (infusion): zinc 12.53%, copper 5.40%, nickel 7.29%, manganese 31.43%, lead 18.09% and iron 18.91%; for ultrasonic extraction: zinc 39.78%, copper 22.07%, nickel 21.87%, manganese 33.50%, lead 21.66%, iron 25.23%.

The concentration of the examined metals in the juniper fruit and the obtained extracts decreases in the following order: Fe>Zn>Mn>Cu>Pb>Ni. The same trend applies to the concentration of metals in isolated juniper fruit extracts. It is assumed that juniper fruit extracts obtained by the Soxhlet extraction method have a higher content of heavy metals compared to the other examined extraction methods due to the longer extraction time and higher temperature of the solvent. Juniper (*Juniperus communis*) is a plant species for which there are not many studies in our area, and therefore this work can serve as a good basis for further research on this plant and deepening the entire topic of heavy metals.

***Key words:*** *Juniper, extraction, heavy metals, spectrometry.*

## 1. UVOD

U 21. vijeku zagađenje životne sredine predstavlja veliki problem o kojem se sve više priča, ali malo toga radi, bar kada je riječ o području Balkana i Crne Gore. Jedna od važnih tema koje su vezane za degradaciju i uništavanje životne sredine predstavlja i prisustvo teških metala u životnoj sredini, što je posljedica ljudskog djelovanja. Kada se nađu u prirodi, teški metali utiču negativno na sve faktore u njoj, od flore, faune, vazduha, zemljišta, voda, pa do samog čovjeka. Pojam teški metali obuhvata metale čija je gustina veća od  $5 \text{ g/cm}^3$ . Svi ovi metali su neophodni za mnogobrojne procese u ljudskom organizmu, međutim u povećanim količinama ispoljavaju toksično djelovanje, kako za čovjeka, tako i za sve biljke i životinje.

Kleka (*Juniperus communis* L.) je zimzelena biljka, od davnina poznata po svojim ljekovitim osobinama i ima široku primjenu u raznim sferama života. Ljekovito bilje od davnina služi čovječanstvu u medicinske i terapijske svrhe. Danas se iz ljekovitih i biljaka sa aromom izdvajaju sastojci poput etarskih i masnih ulja, vitamini i mnogi drugi specifični sastojci, kao i druge aktivne materije. Biljne ekstrakte najčešće dobijamo tako što se odgovarajućom metodom i selektivnim rastvaračima izoluju ciljane bioaktivne materije najčešće iz suve biljne droge. Plod kleke je izvor bioaktivnih materija koji se koristi kao ljekovito sredstvo. Kleka se često koristi za pripremu čaja, koji se može piti radi poboljšanja probave, smanjenja nadutosti ili kao podrška mokraćnom sistemu. Klekin čaj može imati diuretski učinak. Ulje kleke može se koristiti za masažu kao sredstvo za opuštanje mišića i ublažavanje bolova. Koristi se za njegu kože, posebno kod problema poput celulita. Inhalacija pare s ekstraktom kleke može pomoći kod problema s dišnim sistemom, poput prehlade, kašlja ili za olakšavanje disanja kod sinusitisa. Ulje kleke često se koristi u aromaterapiji zbog svog osvježavajućeg mirisa, koji se pripisuje stimulativnim i umirujućim učincima. Dodavanje ekstrakta kleke u kupku može imati opuštajući učinak na tijelo i um, te pomoći kod reumatskih tegoba ili bolova u mišićima.

Treba istaći da, iako kleka ima svoje potencijalne ljekovite učinke, trebalo bi se konsultovati sa stručnjakom prije nego što se počne koristiti bilo koji oblik biljnih lijekova, posebno ako se već uzimaju drugi lijekovi ili imaju postojeći zdravstveni problemi.

Područja na kojima raste ova biljka mogu biti zagađena određenom količinom teških metala, kao što su zemljišta u okolini Termoelektrane u Pljevljima. Upravo sa tog područja, sa lokacije u blizini saobraćajnice i sa pretpostavljenog čistog područja izvršeno je uzorkovanje ove biljne vrste, kako bi se ispitalo u kojoj mjeri su teški metali prisutni u plodu kleke i njenim ekstraktima, u zavisnosti od udaljenosti izvora zagađenja. Ekstrakcijom plodova kleke sa ovih staništa želi se utvrditi u kojoj mjeri teški metali mogu uticati na kvalitet ekstrakta ploda biljke *Juniperus communis* L., zavisno od izvora zagađenja, blizine zagađivača, kao i tehnike ekstrakcije

bioaktivnih materija koja se koristi. Predmet ovog rada je ispitivanje sadržaja odabranih teških metala u plodu kleke i ekstraktima ploda kleke (*Juniperi fructus*).

## 2. PREGLED LITERATURE

Emisije različitih zagađivača uzrokuje višestruke ekološke posljedice u svim sferama ekosistema (voda, vazduh, zemljište, vegetacija). Zagađivači prvenstveno potiču iz industrijskih postrojenja, motornih vozila, kao i od sagorijevanja fosilnih goriva. Da bi primjenili neki postupak ili mjeru u cilju zaštite životne sredine, prvo se mora izvršiti analiza zagađivača. U literaturnom pregledu dati su neku primjeri istraživanja zagađenja biljnih vrsta teškim metalima.

Olovo, kao teški metal je glavni zagađivač životne sredine i svakodnevno ugrožava živi svijet. Za razliku od nekih organskih zagađivača, u životnoj sredini se ne može razgraditi. Olovo se obično zadržava u blizini površine tla a njegova akumulacija u zemljištu zavisi od sadržaja i vrste drugih metala, hemijskih reakcija, sadržaja organske materije i drugih faktora. Olovo ima sposobnost atmosferske distribucije na područjima oko izvora kontaminacije. Cilj istraživanja koju su radili Crnkčić i saradnici (2009) bio je praćenje prostorne distribucije olova u urbanom i ruralnom tlu na području Tuzle. Uzorci su uzeti sa dvadeset lokacija. Sadržaj olova je određen atomskom apsorpcionom spektroskopijom (AAS). Neki od osnovnih hemijskih parametara zemljišta (pH, sadržaj organske materije) su takođe određeni. Analizom karte prostorne distribucije detektovana su područja sa visokim sadržajem olova, posebno u blizini saobraćajnica. Zbog čega je zaključeno da je praćenje teških metala na ovom području veoma važno zbog visokog rizika za biljke, životinje i ljude zbog prisustva olova u zemljištu.

Povrće je bogato važnim hranljivim materijama, antioksidansima i metabolitima koji funkcionišu kao puferi za kisela jedinjenja stvorena tokom varenja. Povrće, s druge strane, može da apsorbuje i vitalne, nutritivne ali i toksične materije iz zemljišta. Postoji zabrinutost zbog uticaja na ljudsko zdravlje, uključujući pojavu tumora i oštećenje bubrega, koja je povezana sa konzumiranjem povrća kontaminiranog teškim metalima. Teški metali se unose preko korijena biljaka iz zagađenog zemljišta i ekološkog otpada, ulazeći u jestive dijelove biljnih tkiva ili se akumuliraju na površini povrća. U istraživanju koje su radili Manwani i saradnici (2022) teški metali poput Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb i Hg pronađeni su u visokim koncentracijama u povrću kao što su *Amaranthus tricolor* L., *Chenopodium album* L., *Spinacia oleracea*, *Coriandrum sativum*, *Solanum lycopersicum* i *Solanum melongena*. Zaključeno je da uzgajano povrće u područjima zagađenim opasnim metalima ili u blizini izvora zagađenja teškim metalima može akumulirati veće količine teških metala.

Potrošnja ratarskih usijeva kontaminiranih teškim metalima predstavlja glavni izvor ovih toksikanata u lancu ishrane. U studiji koju su radili Khan i saradnici (2008) ispitivani su zdravstveni rizici nastali zbog unosa prehrambenih proizvoda koje su navodnjavane otpadnom vodom iz fabrike koja u sebi sadrži teške metale. Rezultati su pokazali da postoji značajan broj teških metala koji zagađuje zemljište koje se navodnjava otpadnim vodama.

Koncentracije teških metala u biljnim vrstama uzgajanim na ovom zemljištu bile su značajno veće nego u biljnim vrstama uzgajanim u referentnom zemljištu i premašile su dozvoljene granice koje su postavili kineska Državna uprava za zaštitu životne sredine i Svjetska zdravstvena organizacija (SZO). Ova studija naglašava da i odrasli i djeca koji konzumiraju prehrambene usijeve uzgajane u zemljištima navodnjavanim otpadnim vodama unose značajnu količinu teških metala.

U istraživanju koje su sprovveli Shen i saradnici (2019) utvrđeno je da teški metali u lancu ishrane imaju štetan uticaj na zdravlje lokalnog stanovništva. Naime, dijagnosticirano je trovanje teškim metalima kod ovaca koje žive na pašnjacima u blizini topionice cinka u planinskoj oblasti Vumeng u Kini. Nivoi bakra, cinka, kadmijuma i olova u vodi za navodnjavanje, zemljištu, stočnoj hrani i životinjskim tkivima mjereni su u uzorcima uzetim iz okoline topionice i kontrolnim uzorcima. Utvrđena je i koncentracija metala u hrani (kukuruz, pirinač i pšenica), kao i u ljudskim tkivima (krv i kosa) dobijenih od lokalnog stanovništva. Koncentracije kadmijuma i olova bile su 177,82 i 16,61 puta veće u hrani odnosu na kontrolni uzorak, odnosno 68,71 i 15,66 puta veće u zemljištu nego u kontrolnom uzorku. Koncentracija metala u hrani (kukuruz, pirinač i pšenica) sa zagađenog zemljišta bio je značajno veći nego u kontrolnim uzorcima. Koncentracija kadmijuma i olova u tkivima oboljelih ovaca bio je značajno veći nego kod kontrolnih životinja, dok su koncentracije kadmijuma i olova u uzorcima tkiva lokalnog stanovništva bile više u poređenju sa kontrolnim uzorcima. Stoga je zaključeno da kontaminacija teškim metalima nanosi štetu ovcama, a takođe predstavlja značajan rizik za ljude koji žive blizu topionice cinka.

U istraživanju (Rashed, 2010) analizirana je jalovina iz rudnika zlata, u oblasti Allaki Vadi Asvan, Egipat. Jalovina, zemljište i samonikle biljke (*Acia Raddiena* i *Aerva javanica*) su uzorkovane i analizirane na toksične metale (Hg, Cd, Pb i As) i povezane teške metale (Cr, Ag, Ni, Au, Mo, Zn, Mn i Cu) korišćenjem ICP–MS- (induktivno spregnuta plazma - masena spektrometrija plazme), ICP–AES (induktivno spregnuta plazma - atomska emisiona spektroskopija) i CVAAS (atomska apsorpciona spektrometrija – tehnika hladne pare). Ova studija se bavila distribucijom i pokretljivošću ovih metala od jalovišta do okolnog zemljišta i divlje flore. Zaključeno je da su se Cr, Cu, Zn, Ni, Ag, Au, Mn, Hg, As, Ag, Au i Pb u zemljištu smanjuju kako se udaljenost od jalovine povećava. Biljka *Acia raddiena* je akumulirala As, Cd i Pb u većim količinama u poređenju sa biljkom *Aerva javanica*. Rezultati ove studije pokazuju da su zemljište, kao i biljke, u blizini jalovišta rudnika zlata sa visokim sadržajem teških metala, te da se biljke ne smiju koristiti za ispašu a zemljište za poljoprivredne aktivnosti. Akumulacija toksičnih metala u zemljištu je veoma važan problem za biljke, životinje i ljude.

Cilj istraživanja Sayadi i Rezai (2014) je bio da se ispita uticaj namjene zemljišta na sadržaj i distribuciju Pb, Cu, Ni, Cr, Zn i Cd na području grada Birjand, Iran. Proučavano je zemljište korišćeno za potrebe farme mlijeka, za poljoprivredne aktivnosti, kao put, kao i za potrebe stambeno-poljoprivrednog i obrazovnog centra.

Rezultati su pokazali da najveću koncentraciju Pb (166,64 mg/kg) ima zemljište u stambeno-putnoj upotrebi. Najveću koncentracija cinka (346,50 mg/kg) ima zemljište korišćeno za farmu mlijeka. Maksimalna koncentracija kadmijuma (8,57 mg/kg) bila je na zemljištu koje je korišćeno za stambeno-putnu infrastrukturu. Srednje koncentracije elemenata su pokazale visoke vrijednosti, što ukazuje da je zemljište korišćeno za farmu mlijeka kontaminirano i da će u bliskoj budućnosti koncentracija toksičnog metala biti iznad graničnih vrijednosti. Tako se ulazak toksičnih elemenata u ljudski lanac ishrane znatno povećava.

Koksovanje je proces termičke obrade ugljenika, obično na visokim temperaturama (oko 1000-1200 °C), u odsustvu vazduha ili kiseonika. Ovaj proces ima učestalu korist u rafinerijama nafte i metalurškim postrojenjima za proizvodnju koksa, čvrstog ugljeničnog materijala koji ima različite primjene. Koksovanje je važan proces jer omogućava pretvaranje ugljeničnih materijala u čvrste oblike koji se mogu koristiti u različitim industrijama. Takođe, koks ima visoku energetska gustinu, što ga čini efikasnim gorivom za visoko-temperaturne procese.

Koksovanje utiče na kvalitet životne sredine i predstavlja veliki rizik po ljudsko zdravlje jer se velike količine teških metala i metaloida emituju u životnu sredinu iz uglja tokom procesa koksovanja. U studiji Cao i saradnika (2014) proučavani su rizici po zdravlje djece i nivoi izloženosti As, Se i teškim metalima (Pb, Cd, Cr, Ni, Co, Zn, Cu, Mn, V i Sb) koji su prisutni u vodi, zemljištu, prašini, vazduhu i lokalno proizvedenoj hrani. Istraživanje je sprovedeno na osnovu uzorkovanja na terenu i anketa zasnovanih na upitnicima koje je popunjavalo lokalno stanovništvo sa područja najintenzivnije proizvodnje koksa u Kini. Uzorci ljudske krvi su prikupljeni i analizirani da bi se ukazalo na nivo izloženosti teških metala. Nekancerogeni rizici za djecu bile su koncentracije Mn, Pb, As i Sb u hrani, čiji su nivoi bili od tri do deset puta veći od prihvatljivih. Kancerogeni rizici za djecu bili su 30 do 200 puta veći od bezbjednog nivoa, što se može pripisati prisutnim koncentracijama Cr, As i Ni. Visoki rizici koji su detektovani u ovoj studiji su naveli na zaključak da se mora posvetiti mnogo više pažnje zdravlju djece koja žive u blizini pogona gdje se vrši koksovanje i da je važna kontrola bezbjednosti lokalno proizvedene hrane kao i procjena rizika po zdravlje lokalnog stanovništva.

Rezultati istraživanja i uticaja teških metala na biljke i njihove mehanizme je prikupljeno iz kineskih naučnih i univerzitetskih časopisa, uglavnom objavljenih u poslednjoj deceniji. Zaključeno je da teški metali negativno utiče na biljke i da dolazi do inhibicije rasta, oštećenja strukture, opadanja fizioloških i biohemijskih aktivnosti, kao i disfunkcije biljaka. Efekti i biodostupnost teških metala zavise od mnogih parametara, a to su uslovi životne sredine, vrste elementa, đubrenja, biljne vrste (Cheng, 2003).

Svrha istraživanja Kebira i Bouhadjera (2011) je bila da se utvrdi stepen kontaminacije zemljišta u blizini deponije industrijskog otpada teškim metalima Pb, Zn, Ni, Cu, Cd, Mn, Cr, Fe i As, kao kontaminacija biljaka koje rastu na i u blizini ovog područja. U radu je analiziran sadržaj teških metala u periodu od 2 godine u zemljištu kao i u biljkama na početku vegetacionog perioda. Mjerenje sadržaja teških metala vršena su na tri lokacije i u vegetativnim dijelovima biljaka tokom ljeta. Uzorci biljaka iz neposrednog okruženja deponije bili su kontaminirani visokim



koncentracijama Zn, Cd i Mn. Tri biljne vrste: grožđe, artičoka i paprika, posebno grožđe, ispunilo je neke od uslova da se svrsta u akumulatore metala i to: Zn, Cu, Cd i Fe, pa je samim tim otkriven zdravstveni rizik za lokalno stanovništvo.

Kontaminacija povrtarskih usijeva teškim metalima predstavlja veliku opasnost po zdravlje ljudi. U studiji Sour i saradnika (2019) ispitivani su uzorc izdanakia i korijena baštenske krese i slatkog bosiljka prikupljenih sa zemljišta zagađenih teškim metalima. Koncentracije kadmijuma (Cd), olova (Pb), nikla (Ni), arsena (As), hroma (Cr), kobalta (Co), bakra (Cu), mangana (Mn) i cinka (Zn) u biljnim tkivima određivani su atomskom apsorpcionom spektroskopijom. U drugoj studiji baštenska kresa je bila izložena određenim koncentracijama kadmijuma i olova u laboratorijskim uslovima, u hidroponskoj kulturi pijeska tokom 5 dana. Rezultati su pokazali da su koncentracije različitih teških metala u korijenu, posebno Cd, As, Ni, Co, Cu, Mn i Zn, ali ne i Pb, bile značajno veće od koncentracija njihovih izdanaka. Rezultati ove studije ukazuju na to da uprkos tome što mlade biljke imaju veći potencijal za usvajanje i akumulaciju teških metala, mala razlika u mladim i zrelim biljkama na zagađenim poljima ukazuje na posljedice dužeg perioda izlaganja zagađenom vazduhu i taloženju prašine koja sadrži visoke nivoe teških metala tokom biljnog rasta.

Teški metali su značajni zagađivači životne sredine, a njihova toksičnost je ozbiljan problem iz ekoloških, nutritivnih i toksikoloških razloga. Metali mogu uticati na niz fizioloških i biohemijskih procesa u biljkama i njihova toksičnost se mijenja u odnosu na vrstu biljaka, vrste metala, koncentracije metala i njegovog hemijskog oblika.

Očigledna je potreba za intenziviranjem istraživačkih programa za bolje razumijevanje toksičnosti teških metala, što je neophodno ako se želi postići efekat za poboljšanje dobrobiti biosfere (Ackova, 2018). Kontaminacija zemljišta i vode raznim teškim metalima kao što su olovo, srebro i kadmijum raste svakodnevno kao rezultat različitih aktivnosti, posebno industrijalizacije i urbanizacije. Olovo (Pb) je primjer teškog metala koji nije esencijalni element niti ima bilo kakvu ulogu u procesu ćelijskog metabolizma, ali se lako apsorbuje i akumulira u različitim dijelovima biljke. Unos olova je uglavnom regulisan veličinom čestica, pH vrijednošću i kapacitetom katjonske razmjene zemljišta, ali i drugim fizičkim i hemijskim parametrima.

Visoka koncentracija teških metala kao što je olovo može izazvati niz toksičnih simptoma kod biljaka: usporavanje rasta, negativni efekti na proces fotosinteze (hloroza), crnjenje korijena itd. Olovo ima sposobnost da u biljkama inhibira fotosintezu, remeti ishranu i ravnotežu vode, mijenja hormonski status i utiče na strukturu i propustljivost ćelijske membrane. Olovo nije esencijalni element za biljku, iako se akumulira u različitim dijelovima biljke i negativno utiče na različite fiziološke procese. Akumulacija olova u zemljištu inhibira klijanje sjemena i usporava

rast rasada, smanjuje procenat klijanja, indeks klijavosti, dužinu korijena/mladka, indeks tolerancije i suhu masu korijena i izdanaka (Nas i Ali, 2018).

## 2.1. Teški metali

Problem zagađivanja sredine teškim metalima ima globalni karakter. Iako u različitoj mjeri, on je svuda prisutan i specifičan za pojedine dijelove biosfere. Stoga, nakupljanje pojedinih elemenata, posebno teških metala sa pretežno toksičnim dejstvom može da izazove u biosferi nepoželjne promjene sa nesagledivim posljedicama. Biljke mogu da posjeduju i tolerantnost prema jednom metalu ili prema većem broju metala. Tolerantnost biljaka prema teškim metalima ima genetsku osnovu, ali može da bude modifikovana adaptacijom na uslove sredine (Kastori, 1983; Blagojević, 2003).

Biljke teške metale prvenstveno usvajaju iz zemljišta, a pri određenim uslovima i preko nadzemnih organa. Na usvajanje i nakupljanje teških metala utiče više faktora, npr. temperatura, intenzitet svjetlosti, kiselost zemljišta i mnogi drugi. Biljke se prema načinu nakupljanja teških metala mogu podijeliti na:

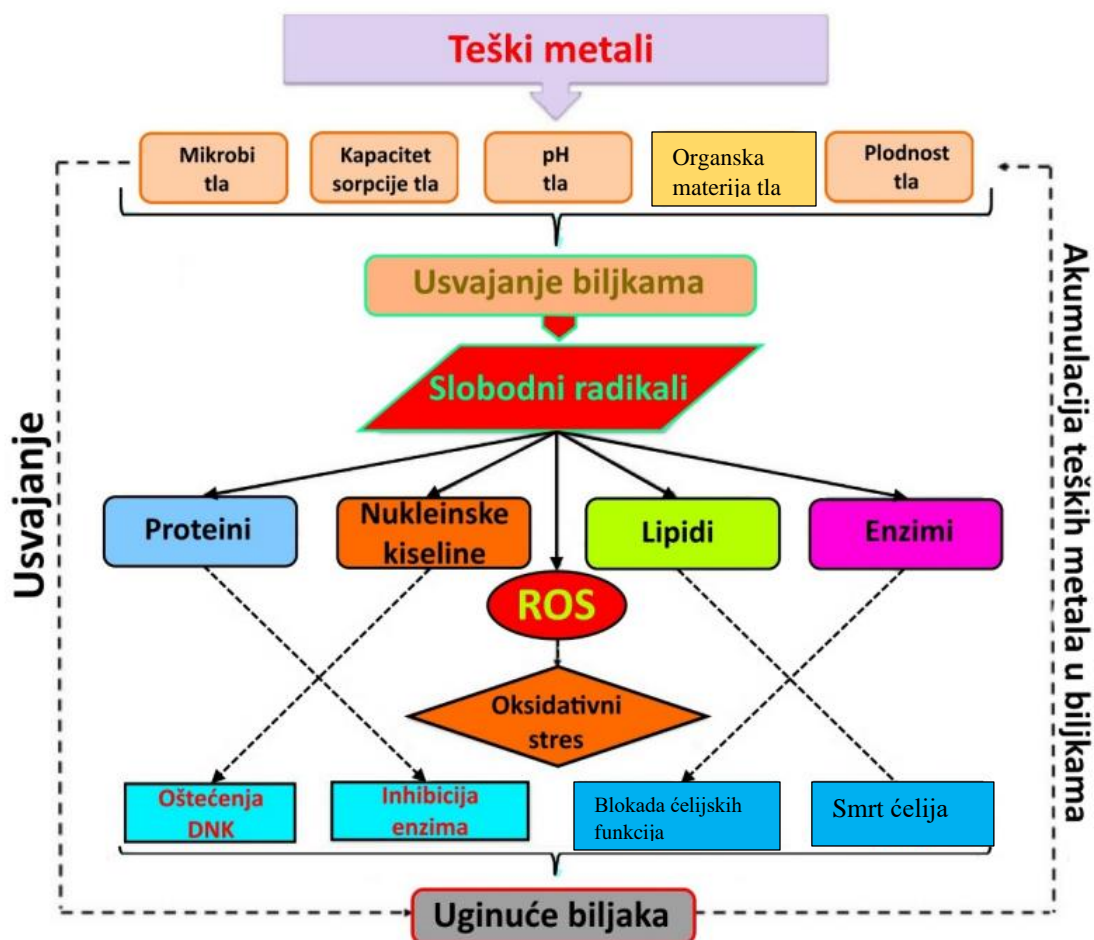
- Akumulatore – vrste koje u nadzemnim dijelovima nakupljaju značajne količine teških metala, nezavisno od njihovog udjela u zemljištu;
- Indikatore i one koje teške metale nakupljaju u malim količinama – kod njih usvajanje teških metala tačno odražava njihovu koncentraciju u spoljašnjoj sredini;
- Biljke u kojima je nivo teških metala u dijelu iznad zemlje uglavnom konstantan i nezavisan od prisustva metala u tlu (Kastori, 1995; Blagojević, 2003).

Olovo (Pb) - glavni izvori olova su motorna vozila. Mjerenjima u istraživanju (Borisov, 2008) je utvrđeno da se na 50 metara udaljenosti od autoputa kojim dnevno prolazi oko 10 000 vozila koncentracija olova u zemljištu se godišnje povećava za 3 mg/kg, što znači da će sadržaj ovog metala u zemljištu za 50 godina iznositi od 100 do 200 mg/kg zemljišta. Sadržaj olova pored autoputeva u biljkama i zemljištu može da iznosi i 100 mg/kg. Olovo, koje se nalazi u tlu, za biljke je najčešće teško pristupačno, tako da ga one usvajaju u relativno malim količinama.

Kontaminacija biljaka olovom pored autoputeva pretežno je površinska. Olovo se kao zagađivač javlja i iz drugih izvora, kao što su fabrike boja, prerada ruda, upotreba raznih pesticida i herbicida. Olovo je jedan od najrasprostranjenijih teških metala u tlu, veoma je toksičan za žive organizme. (Kastori, 1995; Kadović i Knežević, 2002).

Olovo nema biološku funkciju, ali može izazvati morfološke, fiziološke i biohemijske disfunkcije u biljkama. Biljke su razvile širok spektar mehanizama tolerancije koji se aktiviraju kao odgovor na izlaganje Pb. Pb utiče na biljke prvenstveno kroz njihov korijenov sistem. Korijen

biljke brzo reaguje i/ili sintezom i taloženjem kaloze, stvarajući barijeru koja sprečava ulazak Pb i njegovu sekvestraciju u vakuoli, praćenu promjenama u rastu korijena i obrascu grananja i/ili translokacijom Pb u nadzemne dijelove biljke u slučaju biljaka koje su hiperakumulatori (Fahr i saradnici, 2013). Način na koji biljke usvajaju teške metale iz zemljišta i prenose ih u svoje nadzemne organe prikazan je na slici 1.



*Slika 1. Mehanizam djelovanja i put toksičnosti metala u zemljištu i biljakama  
Izvor (Rascio i Navari-Izzo, 2011)*

Bakar (Cu) – jedinjenja na bazi bakra, kao npr.  $\text{CuSO}_4$ , koriste se kao fungicidi u voćarstvu, kao aditivi za stočnu hranu, dok se bakar koristi pri dobijanju mesinga, žice, raznih legura, bakarnih cijevi i slično. Što se tiče biljaka, negativan uticaj bakra na njihov rast javlja se pri koncentracijama bakra većim od 0,1 ppm (Kušan, 1967; Brkić i sar., 1999). Toksične količine bakra za biljke su oko 400 ppm i iznad, za životinje preko 1000 ppm (Brkić i sar., 1999; Blagojević, 2003). Bakar je esencijalni mikronutrijent za biljke jer učestvuje u nekoliko redoks reakcija i

strukturnoj konstituciji Fe-Cu klastera. Cu izaziva fiziološke i biohemijske poremećaje koji usporavaju rast biljaka. S obzirom na rastuću poljoprivrednu i industrijsku aktivnost kao glavnih izvora akumulacije Cu u prirodi, razumijevanje fizioloških i biohemijskih mehanizama toksičnosti Cu u biljkama predstavlja važan korak u selekciji tolerantnijih genotipova na stresove izazvane teških metalima (Cruz i saradnici, 2022).

Cink (Zn) - je sastavni dio cijevi koje čine vodovodne sisteme, pa se zato zapaža povećan sadržaj cinka u otpadnim vodama iz industrije. Cink je jako važan za biljni i životinjski svijet. Međutim, zabilježena je i njegova toksičnost, mada samo pri veoma visokim koncentracijama (Drinić, 2020).

Cink je prirodna komponenta zemljišta u kopnenim sredinama i vitalni je element za rast biljaka, jer obavlja važne funkcije u brojnim metaboličkim putevima. Međutim, potencijalno štetni nivoi Zn u zemljištu mogu dovesti do različitih promjena u biljkama kao što su usporena fotosinteza i brzina disanja, neuravnotežena mineralna ishrana i pojačano stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika. Zn ulazi u zemljište kroz različite izvore, kao što su trošenje stijena, šumski požari, vulkani, rudarske i topioničke aktivnosti, zatim preko stajnjaka, kanalizacionog mulja i primjene fosfatnih đubriva. Relativno mala razlika između esencijalnosti Zn i toksičnosti u biljkama skrenuo je pažnju naučne zajednice na njegove efekte na biljke i ključnu ulogu u održivosti poljoprivrede (Kaur i Garg, 2021).

Mangan (Mn) - se aktivno usvaja i brzo transportuje kroz biljke, gdje posebno mjesto zauzima pasivna apsorpcija. Biljkama je mangan neophodan, i njegova vjerovatno najvažnija funkcija je učešće u oksido-redukcionim reakcijama. Zbog brzog prenosa kroz biljku najviše ga ima u mladim organima biljaka, a slabije u korijenu i ksilemu (Kastori, 1983). Mangan je esencijalni element za biljke, učestvuje u nekoliko metaboličkih procesa, uglavnom u fotosintezi i kao koenzim antioksidant. Ipak, višak ovog mikronutrijenta je toksičan za biljke.

Fitotoksičnost Mn se manifestuje u smanjenju biomase i fotosinteze i biohemijskim poremećajima kao što je oksidativni stres. Istraživanja o toksičnosti Mn i translokaciji Mn iz zemljišta u biljne ćelije u obliku  $Mn^{2+}$  pokazala su njegov put u uslovima niskog pH i redoks potencijala u zemljištu (Stanković, 2016).

Kada je Mn unutar ćelija, takođe se primjećuju mehanizmi koji mogu da tolerišu ovu toksičnost, što je važno za razdvajanje ovog metala u različitim organelama biljnih ćelija izdanaka i lista. Ključna uloga antioksidativnih sistema u biljkama u odnosu na visoke količine Mn takođe je prijavljena kao odbrambeni mehanizam (Millaleo i saradnici, 2010).

Gvožđe (Fe) - je esencijalni element, neophodan u važnim biohemijskim, kao i fiziološkim procesima i najzastupljeniji oligoelement (0,006%). Biljke gvožđe usvajaju kao fero-jon, feri-jon

i sa helatima. Prisustvo gvožđa u zemljištu ima veliki uticaj na usvajanje drugih teških metala od strane biljnih vrsta (Kadović i Knežević, 2002; Blagojević, 2003). Gvožđe je četvrti element u zemljinj kori. O toksičnosti gvožđa se ne govori često u nauci o biljkama, iako uzrokuje ozbiljne morfološke i fiziološke poremećaje, uključujući smanjeni procenat klijanja, ometanje enzimske aktivnosti, nutritivni disbalans, oštećenje membrane hloroplasta. Takođe, nepovoljno djeluje na biomolekule, što dovodi do uginuća ćelija i indukuje strukturne promjene u fotosintetskom aparatu, što dovodi do usporavanja metabolizma ugljenika. Međutim, neke agronomske prakse kao što je remedijacija zemljišta hemikalijama, hranljivim materijama, kao i genetičke modifikacije sjemena mogu dati dobre rezultate u povećanju proizvodnje usijeva na zemljištu zagađenom Fe (Zahra i saradnici, 2021).

Nikal (Ni) - je metal koji se prirodno pojavljuje, ali antropogene aktivnosti kao što su industrijalizacija, upotreba đubriva, hemikalija i odlaganje kanalizacionog mulja su povećale njegovu koncentraciju u životnoj sredini do nepoželjnih nivoa. Nikal je neophodan za rast biljaka pri niskoj koncentraciji. Međutim, sadržaj nikla u životnoj sredini se povećava, pa je stoga važno razumjeti njegovu funkcionalnu ulogu i toksične efekte na biljke. Nikal utiče na razvoj biljaka i pozitivno i negativno, u zavisnosti od koncentracije prisutne u medijumu za rast. Nikal je neophodan za normalan rast, enzimske aktivnosti (npr. ureaza), metabolizam azota, unos gvožđa i specifične metaboličke reakcije. Sa negativne strane, nikal smanjuje klijavost sjemena, rast korijena i izdanaka, akumulaciju biomase i konačnu proizvodnju. Štaviše, nikal može da izazove hlorozu i nekrozu i inhibira različite fiziološke procese (fotosintezu, transpiraciju) i izaziva oksidativna oštećenja u biljkama. Prijetnja povezana sa uticajem nikla na biljke, životinje i ljude se povećava kako koncentracija nikla raste svakim danom u životnoj sredini, posebno u zemljištu. (Hassan i saradnici, 2019).

## 2.2. Opšte karakteristike vrste *Juniperus communis*

Kleka (*Juniperus*) je četinarska biljka iz porodice čempresa (*Cupressaceae*). Postoji od 50 do 67 vrsta ove biljke. Rasprostranjena je na cijeloj sjevernoj polulopti, od Arktika, južno do Afrike, pa sve do vrhova Centralne Amerike. Kleka raste na velikom dijelu sjeverne hemisfere, od Sjeverne Amerike, preko južnog Grenlanda, Evrope, istočne Azije do sjeverne Afrike, gdje postoje reliktna populacije. Raste po krševitim i kraškim terenima, na sunčanim i suvim mjestima (Hampe i Petit, 2010).

Vrste kleke se razlikuju, ima visokog drveća, kao i niskih žbunova sa duguljastim krivim granama. Kleka je zimzelena biljka sa igličastim lišćem. Šišarke ženske vrste su prepoznatljive, nalik strukturi poput "bobice" (slika 2), od 4 do- 27 mm dužine, sa jednim od dvanaest odvojenih tvrdoljuskastih sjemena. Obično imaju aromu i koriste se kao začim. Vrijeme sazrijevanja sjemena se razlikuje od vrste do vrste, od 6 do 18 mjeseci nakon oprašivanja (Ogren, 2015).



*Slika 2. Plod kleke (Juniperus communis)*

*Izvor (Kostova, 2005)*

Muške šišarke imaju sličnosti sa ostalim iz familije *Cupressaceae*. Nekoliko vrsta kleke cvjeta kada je jesenje doba godine, dok neke vrste stvaraju polen već početkom zime, do kasnog proljeća (Ogren, 2015). Neke vrste kleke (npr. *Juniperus chinensis*, *Juniperus virginiana*) imaju dvije klasifikacije listova: listovi koji se sade, i grančice mlađih stabljika koje imaju igličast tip lišća. Kada se mlado lišće pojavi na biljkama koje su zrele, ono se obično nalazi na sijenovitim staništima, uz lišće koje je odraslo na sunčanim staništima. Kod *J. communis* i *J. squamata* lišće je u potpunosti u obliku mladih iglica i ne sadrži ljestvice.

Kleke su golosjemenice i zavisno od vrste, sjeme sazrijeva od 1 do 3 godine. Nepropusna sjemenjača sprječava ulazak vode i razmjenu gasova, a embrion ima izraženu višestruku dormantnost sjemena (kada klijava sjeme, tj. sjeme sa sposobnošću da proklija i razvije se u biljku, ne uspijeva u povoljnim uslovima sredine). Jaka sjemenjača omogućava prolazak kroz crijevni trakt životinja tako da sjeme može da bude prenijeto na velike udaljenosti (Chamber i sar., 1999; Grbić, 2003). Primjer staništa biljke kleke na prostoru Crne Gore prikazan je na slici 3.





*Slika 3. Kleka na području Durmitora  
Izvor (Roganović, 2015)*

Kleka može da uspijeva u različitim okruženjima i može da služi kao ispaša za stoku (Rawat i Everson, 2012). Kleka je biljna vrsta poznata da kiša pogoduje njenom rastu i zato se javlja na otvorenom prostoru (Chamber i sar., 1999). Invazija kleke, koja se javlja zbog nedostatka stočne ispaše, utiče na promjenu cijelog ekosistema (Belsky, 1996).

Povećanje populacije kleke dovodi do smanjenja zastupljenosti drugih drvenastih vrsta. Posljedica povećanja populacije dovodi do smanjenja produkcije bobica (Miller i sar., 2000).

Ipak, ova redukciona faza ne vodi do smanjenja šansi preživljavanja nekih divljih životinja. Za manje sisare je važno da imaju mogućnost pristupa malim klekinim stablima (Bombaci i Pejchar, 2016; Gallo i sar., 2016).

### 2.3. Klasifikacija vrste *Juniperus*

Kleka kao biljka ima veliki broj vrsta u svome ciklusu, od kojih su sledeće:

1. Vrsta *Juniperus* - *Juniperus* u koju spadaju: *Juniperus communis* – obična kleka, *Juniperus conferta* – kleka u priobalnom tlu (slika 4), *Juniperus rigida* – kleka sa iglicama.



*Slika 4. Juniperus conferta*  
*Izvor (Ruter, 2018)*

2. Vrsta *Juniperus* - *Oxycedrus* (Slika 5).



*Slika 5. Primjer ploda vrste Juniperus oxycedrus*  
*Izvor (Mazza, 2020)*

3. Vrsta *Juniperus* - *Caryocedrus*, kojoj pripada *Juniperus drupacea* – kleka sirijska (slika 6).





*Slika 6. Sjeme šišarke vrste Juniperus drupacea  
Izvor (Turland, 2010)*

4. Vrsta *Juniperus Sabina*, kojoj pripada jedna od najčešćih vrsta kleke u svijetu – fenička borovica (slika 7).



*Slika 7. Plod vrste Juniperus phoenicea  
Izvor (Mazza, 2020)*

Svi dijelovi kleke (*Juniperus communis*) su ljekoviti, a naročito aromatični i gorkosladunjavi plodovi. Zeleni plodovi su neljekoviti, dok ljekovitost ispoljavaju sazreli ljubičasti plodovi kleke. Suše se na provjetrenom mjestu. Osušeni dijelovi čuvaju se na suvom mjestu. Plod u zavidnim količinama sadrži i smole, tanin, vosak, organske kiseline i njihove soli. Posjeduje i brojne minerale, a posebno kalcijum, kalijum, mangan, sumpor. U stotinu grama mladih klekinih izdanaka ima vitamina C - 97 miligrama (Zikri, 2020).

Kleka djeluje kao diuretic – koristi se protiv zadržavanja mokraće, kao i za dezinfekciju. Takođe njena uloga je i kao stomahik (utiče na poboljšanje apetita, varenja, smirivanju bolova i ublažavanju nadimanja – kao i kod ostalih disfunkcija gastroenterološkog trakta), dobra je protiv prehlade, nazeba, kašlja, kod artritisa, reumatizma i sličnih zglobnih bolova (Rudolf, 1983).

Plodovi kleke sadrže razne korisne hemijske materije. U hemijski sastav kleke ulaze: eterično ulje, flavonoidi i tanini. Plodovi kleke su bogati eteričnim uljem koji, kao glavne komponente, sadrži monoterpene terpinen-4-ol i sabinen. Kleka takođe sadrži flavonoide, koji su poznati po svojim antioksidativnim svojstvima. Tanini su prisutni u plodovima kleke i doprinose njihovom adstringentnom djelovanju. Ekstrakti ploda kleke imaju različite primjene, uključujući: aromaterapiju, u kuhinjskim potrebama i u lijekovite svrhe. Eterično ulje kleke ima učestalu korist u aromaterapiji zbog svog osvježavajućeg i opuštajućeg mirisa (Ferenčak, 2012).

Plodovi kleke se ponekad koriste kao začim u kulinarskim jelima i alkoholnim napicima, posebno u proizvodnji džina. Ekstrakti ploda kleke se koriste za ublažavanje problema sa probavom i kao antiseptik. Takođe, imaju i djelovanje na organizam kao što su diuretičko, probavno i antiseptičko djelovanje. Ekstrakti ploda kleke se često koriste za podsticanje izlučivanja mokraće, što pomaže u eliminaciji toksina iz organizma i podržava funkciju bubrega.

Kleka se koristi za ublažavanje problema sa probavom, kao što su nadimanje i grčevi. Ekstrakti ploda kleke mogu imati antiseptičko djelovanje (Crnkić i saradnici, 2009).

Treba spomenuti da ekstrakte ploda kleke treba koristiti s oprezom i prema uputstvima stručnjaka, jer mogu imati kontraindikacije i interakcije sa lijekovima. Takođe, uvijek se preporučuje konsultacija sa doktorom ili stručnjakom na polju farmacije prije korišćenja bilo kojeg prirodnog proizvoda u svrhu liječenja ili prevencije.

## 2.4. Pregled dosadašnjih istraživanja o sadržaju teških metala u rodu *Juniperus*

Od davnina kleka predstavlja izuzetno zanimljivu ljekovitu biljnu vrstu za proučavanje, a literaturi su prisutna i istraživanja o povezanosti teških metala sa klekom.

*Juniperus phoenicea* L. je važna aromatična ljekovita biljka koja pripada porodici Cupressaceae. Lišće i bobice se u Jordanu koriste za liječenje raznih bolesti kao što su dijabetes, reumatizam i kao sredstvo protiv dijareje. Zato su istraživači ispitivali i došli do zaključka da li *Juniperus phoenicea* L. akumulira teške metale (Fe, Mn, Zn, Cu, Pb, Cd) (Abu-Darwish i Ofir, 2014).

Cilj istraživanja (Binxhija i Ylli, 2021) je bio da se procjeni da li se *Juniperus communis* L. i *Juniperus oxicedrus* L. mogu koristiti kao ekološki indikatori. Obje vrste se široko koriste kao ljekovite biljke zbog svog terapijskog dejstva. U pet ispitivanih staništa pomenutih biljnih vrsta utvrđeno je da zemljište ima visok nivo gvožđa, olova, nikla i cinka, što je u većini slučajeva uzrokovalo i visok sadržaj ovih metala u lišću i u plodu obje vrste kleke.

U studiji Sevika i saradnika (2020) cilj je bio utvrditi promjenu akumulacije teških metala u nekim pejzažnim biljkama, pri tome uzimajući u obzir vrstu biljke i gustinu saobraćaja. U tu svrhu korišćeni su uzorci grana i listova od jedinki *Ligustrum vulgare* L., *Euonimus japonica* Thunb., *Biota orientalis* L., *Juniperus sabina* L., *Berberis thunbergii* DC., *Mahonia akuifolium* (Pursh) Nutt. i *Bukus sempervirens* L. Zanimljivo je da je koncentracija Pb bila veća u granama nego u listovima za sve biljne vrste.

Uticaj rudarskih aktivnosti na životnu sredinu su dobro poznati, posebno degradacija na lokaciji, ali su dugoročni efekti manje poznati. Zato je i ispitivan sadržaj žive u uzorcima više biljnih vrsta sa deponije rudnika Tlalpujahu, Michoacan, Meksiko, i okolnih šuma da bi se razumjela sudbina ovog elementa u lokalnom okruženju (Osuna-Vallejo i sar., 2019). Najveća koncentracija Hg je utvrđena kod vrste *Juniperus deppeana* ( $16,05 \pm 2,3$  ppm).

U istraživanju Fuentes a i saradnika (2007) ispitivane su četiri biljke, obično korišćene u ekološkoj restauraciji, *Pinus halepensis*, *Pistacia lentiscus*, *Juniperus okicedrus* i *Rhamnus alaternus*, uzgajane u hranljivim rastvorima koji sadrže niz koncentracija bakra, nikla i cinka. Utvrđeno je da se za sve četiri vrste, koncentracija teških metala povećava u biljkama sa povećanjem koncentracije rastvora i uvijek je veća u korijenu nego u izdancima.

Koncentracije pet metala (Cd, Cu, Mn, Fe, Zn) su određene u listovima drveća sakupljenim sa područja gdje se nalazi veliki rudnik uglja Ptolemais, Makedonija, Grčka (Sawidis i saradnici, 2001). Prosječan nivo metala u listovima drveća je u redosledu, Fe>Mn>Zn>Cu>Cd. Povišene

koncentracije su imali i *Pinus nigra* i *Juniperus arizona*, koji imaju hrapavu lisnu površinu. Interesantno je da su plodovi akumulirali manje teških metala od odgovarajućih listova.

*Juniperus virginiana*, dvodomna vrsta, ipitivana je kako bi se izvršila procjena stepena zagađenja teškim metalima i uticaja teških metala na status mineralnih hranljivih materija biljke (Severoglu i saradnici, 2015). Korišćene su standardne procedure i utvrđivanje koncentracije teških i esencijalnih elemenata (Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb i Zn). Zaključeno je da *J. virginiana* ima sposobnost da akumulira značajnu količinu metala i da je obrazac unosa mineralnih hranljivih materija izmjenjen zbog teških metala u biljci, što je pokazalo rizik od kontaminacije.

Svrha istraživanja Borisova (2008) bila je određivanje koncentracija teških metala Ni, Pb, Cd, Co, Zn, Cu i Mn u površinskim zemljištima rezervata Boatin, Bugarska. Uzorkovane su listovi i grančice *Juniperus sibirica* Burgsd., takozvane "patuljaste kleke". Rezultati su pokazali da je kleka akumulirala svaki od navedenih teških metala i u listovima i u grančicama, neke u većim, neke u manjim količinama. Najveću koncentraciju imao je mangan.

Da bi se istražila interakcija između nekoliko elemenata teških metala i biljaka, ispitani su listovi tri zimzelene vrste drveća — kineske kleke (*Juniperus chinensis* L.), zmajevje kleke (*Juniperus chinensis* L. 'Kaizuca') i kedra (*Cedrus deodara*). Listovi su sakupljeni sa raskrsnica glavnih puteva u urbanoj oblasti Tjendina, Kina. Zaključujno je da nivo teških metala u obje vrste kleke ima rang  $Mn > Zn > Cu > Cd$ , a vrijednost indeksa akumulacije metala (MAI) je najveća za zmajevju kleku (Liu i saradnici, 2021).

Svrha istraživanja Paske i saradnika (2017) je bila usvajanje procedure za određivanje sadržaja olova, kadmijuma, bakra, cinka, žive metodom atomske-apsorpcione spektrometrije i određivanje sadržaja toksičnih elemenata u sočivu, majčinoj dušici i kleki. Pronađeno je da plodovi kleke sadrže bakar u količini 6,10 mg/kg, kao i cink (11,42 mg/kg), što je manje od drugih ispitivanih biljaka.

U istraživanju Abualhasan i saradnika (2020) ispitivani su nasumično prikupljeni uzorci zelenog čaja i klekinog čaja i ispitana je koncentracija metala. Osamnaest uzoraka zelenog i klekinog čaja testirano je na kontaminaciju teškim metalima. Rezultati su pokazali da 7 uzoraka čaja od kleke sadrži toksične teške metale kao što su hrom (Cr) i olovo (Pb), a njihove koncentracije su bile iznad dozvoljenih granica propisane od strane Svjetske zdravstvene organizacije (SZO).

Živa (Hg) je zagađivač koji se može precizno izmjeriti u prstenovima drveća na jednostavan i pragmatičan način, korišćenjem postupka termalne dekompozicije, amalgamacije i ispitivanjem uzoraka atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom. Metoda je primijenjena na pet vrsta drveća: istočni crveni kedar (*Juniperus virginiana*), bor (*Pinus taeda*), kratkolisni bor (*Pinus echinata*), bijeli hrast (*Kuercus alba*) i lala topola (*Liriodendron tulipifera*). Koncentracije žive, u ovom istraživanju, nađene su u kedru (Arslan, 2020).

Kontaminacija zemljišta živom predstavlja potencijalni rizik po ljudsko zdravlje zbog konzumaciju voća i povrća, što je dokazano u istraživanju Kimakove i saradnika (2020). Cilj istraživanja je bio mjerenje koncentracije žive u dijelovima odabranih biljnih vrsta i drveća koje rastu u krugu od 100 metara od nekadašnjeg pogona za preradu rude. Što se tiče drveća, najveće koncentracije žive su nađene u grančicama kleke (*Juniperus communis*).

Predmet istraživanja (Atanasova i saradnici, 2001) bila je kleka (*Juniperus communis* L.) koja raste na i van rudnog nalazišta koja sadrži polimetale koji su izvor Fe, Ni, Pb, Co, Ag, Cu, Zn, V. Utvrđeno je da prisustvo Pb, Fe i Ni elemenata u zemljištu dovodi do njihovog unosa i akumulacije u izbojcima kleke, gdje su nađeni u visokim koncentracijama. Smanjen je intenzitet fotosinteze, indeks rasta, kao i sadržaj pigmenta izdanaka ovih biljaka. Odloženi rast i inhibirani fotosintetski parametri su simptomi koji pokazuju hormonske poremećaje u samoj biljci.

Kurbaniyazov i saradnici (2021) izvršili su vizuelnu procjenu vitalnog stanja odabranih drvenastih biljaka koje uspijevaju na zemljištu koji sadrži oko 30 teških metala (Cd, Cr, Hg, Pb, Jn, Mn, Ni, Co i dr.). Pokazano je da se različite biljne vrste razlikuju po sposobnosti akumulacije teških metala. Usporedno proučavanje karakteristika rasta i razvoja biljaka pokazalo je da su neke izložene drvenaste biljke promijenile naviku i da rastu kao nisko drveće i žbunje. Takve biljke uključuju *Fraxinus excelsior* L., *Fraxinus pensilvanica* March., *Salix alba* L., *Populus alba* L., *Ulmus pumila* L., *Juniperus communis* L. Utvrđeno je da se prilagođavanje biljaka na sušu i zaslanjenost zemljišta manifestuje u sporijem rasta, smanjenju visine biljaka, smanjenju brzine razvoja itd. Kao rezultat toga, drvenaste biljke dobijaju zakržljali oblik i smanjuje im se životni vijek.

U istraživanju Atanasova i saradnika (2004) upoređen je rast i sadržaj endogenih citokinina (CK) u listovima i plodovima kleke koje rastu na i van rudnog mjesta. Izbojci kleke sa rudnog nalazišta imali su veći sadržaj metala što je uzrokovalo usporen rast biljke.

Broj metala upotrijebljenih u industrijske svrhe – elektrotehnika, solarni paneli, baterije – značajno se povećao u posljednjih dvadeset godina. Neki od ovih metala su predmet geopolitičkog sukoba i smatraju se kritičnim jer ih njihova jedinstvena svojstva čine nezamjenljivim. Mnogi od ovih elemenata su slabo proučavani i njihovi biogeochemijski ciklusi i dalje postavljaju mnoga pitanja (Fehlauer i saradnici, 2022). Cilj ove studije je bila analiza prenosa nekih od ovih hemijskih elemenata iz zemlje u biljku i pokušaj razumijevanja puteva njihove translokacije.

U tu svrhu izabrano je geološko nalazište Jas Rouk (Francuska), jer je ovo alpsko područje prirodno bogato kritičnim i potencijalno toksičnim elementima kao što su As, Sb, Ba i Tl, a i stanište velikog broja raznovrsnih biljaka. Koncentracije elemenata su analizirane u površinskom sloju zemljišta u 12 odabranih vrsta alpskih biljaka uzorkovanih *in situ*.

Analize su otkrile akumulaciju rijetkih zemnih elemenata kod biljaka *Sakifraga paniculate*, selektivnu apsorpciju oksianiona kod *Hippocrepis comosa*, akumulaciju Tl kod vrsta *Biscutella laevigata* i *Galium corradifolium* i strategiju isključivanja od *Juniperus communis*. *Juniperus*

*communis*, poznat kao kleka, ima mehanizme koji mu omogućuju selektivnu apsorpciju materija iz okoline, omogućujući mu da se prilagodi specifičnim uslovima rasta. Ovo može biti važno za održavanje ravnoteže nutrijenata i sprječavanje unošenja štetnih materija. Ovi rezultati doprinose razumijevanju ponašanja kritičnih metala i metaloida V, As, I, Sb, Ce, Ba i Tl u životnoj sredini i mogu predstavljati dragocijene informacije za primjenu fitoremedijacije. Ispitivane su nadzemne koncentracije Cd i Zn u različitim biljkama za ispašu u tri faze vegetacije (Brekken i Steinnes, 2004). Biljke su sakupljene na prirodnom staništu izloženom ekstenzivnom atmosferskom taloženju teških metala. Koncentracije oba metala značajno su varirale među vrstama, takođe među morfološki sličnim vrstama koje rastu na istom tlu. Među istraživanim biljnim vrstama, vrste *Populus* i *Salix* bile su daleko najvažniji akumulatori Cd. Među biljnim vrstama kao akumulator Cd bila je i *Juniperus communis*. Sezonske varijacije u koncentracijama biljnih metala komplikuju procjenu izloženosti metalu životinjama kroz ishranu. Koristeći informacije o ishrani, grubo je procjenjen dnevni unos od 1–2 mg Cd za losa (*Alces alces*) u jesen.

Serpentinska tla imaju relativno visoke koncentracije potencijalno toksičnih elemenata (PTE), (kobalt, hrom, bakar, gvožđe, nikl), ali i generalno niske količine hranljivih materija. Često nose karakterističnu vegetaciju, sa specifičnom tolerancijom na PTE, a koristi se hemijska analiza zemljišta i biljaka za razumijevanje ekologije serpentina i povezanih opasnosti po životnu sredinu. U istraživanju Bini i saradnika (2017), vršeno je ispitivanje serpentina tla i serpentinofita iz različitih izdanaka u centralnoj Italiji, među kojima je i *Juniperus communis*. Elementi u tragovima u serpentinskoj vegetaciji se uglavnom akumuliraju u korijenu, ali neke biljne vrste (npr. *Alissum bertolonii*) su u stanju da (hiper)akumuliraju metale u nadzemnim dijelovima, bez karakterističnih znakova propadanja, zahvaljujući mehanizmu tolerancije na veoma visoke koncentracije metala.

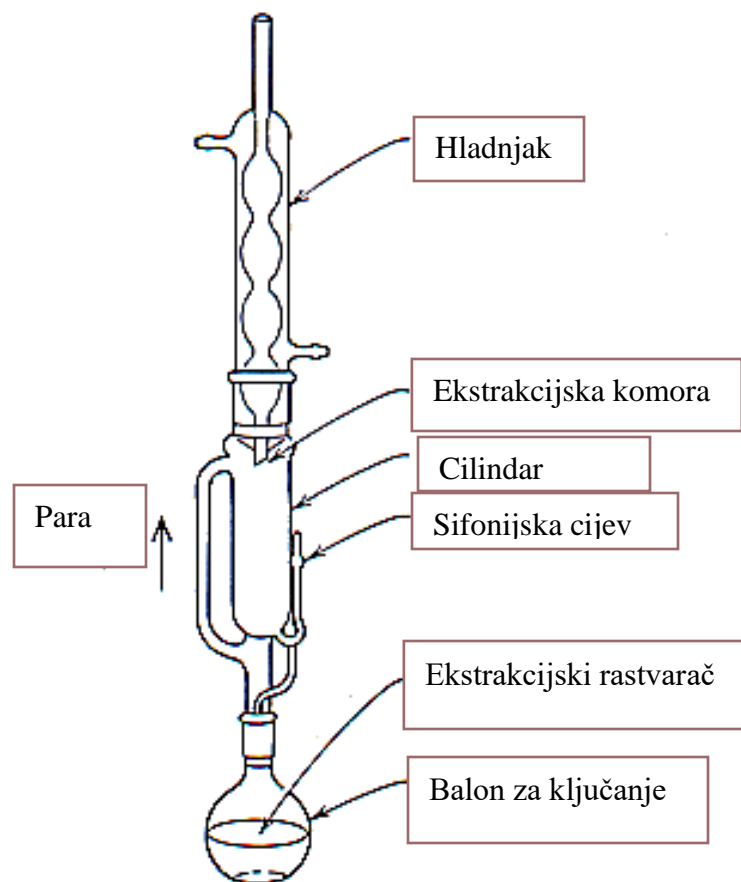
Cilj istraživanja Mussina i saradnika (2018) je proučavanje anatomskih i morfoloških promjena kleke u uslovima zagađenja životne sredine teškim metalima. Procjena uticaja nekih teških metala na kleku je izvršena nakon sadnje uzoraka sjemena u zemljište i dobijanja dobre klijavosti. Kleka je tretirana rastvorima teških metala u laboratoriji 4 mjeseca. Otkrivene su negativne anatomske i morfološke promjene: značajno povećanje debljine iglica, primjećena je uvećana debljina provodnog snopa i epidermisa, što, po svemu sudeći, pruža veću otpornost na zagađenje.

## 2.5. Metode ekstrakcije fitohemikalija

Procesima ekstrakcije se dobijaju značajne fitohemikalije iz aromatičnih i ljekovitih biljaka, koje se upotrebljavaju u farmaceutskoj, prehrambenoj i industriji parfema.

Ekstrakcija je način da se odvoji željena supstanca kada je pomiješana sa drugim supstancama. Smješa se dovodi u kontakt sa rastvaračem u kome je supstanca od interesa (analit) rastvorljiva, ali su ostale prisutne supstance nerastvorljive. U ekstrakciji se koriste dvije faze koje se ne miješaju (poput ulja i vode) da bi se supstanca odvojila iz jedne faze u drugu. Odabirom najprikladnije metode može se smanjiti potrošnja uzoraka i rastvarača (Borisov, 2008).

Soxhlet ekstrakcija - uglavnom se koristi za ekstrakciju lipofilnih jedinjenja, a prednosti Soxhlet ekstrakcij je to što se uzorak više puta ekstrahuje rastvaračem. Soxhlet aparat (slika 8) je složen i mnogo teži za rukovanje od ostalih uređaja za ekstrakciju. Ekstrakcija je dugotrajna, a zbog povišene temperature ekstrakcije dolazi do razgradnje termolabilnih supstanci (Castro i Priego-Capote, 2010). Koristi se za izdvajanje jedne ili više komponenti iz čvrste faze rastvaranjem u tečnoj fazi. Prednost ove metode jeste u činjenici da se velike količine droge mogu ekstrahovati sa mnogo manjom količinom rastvarača. Ovo utiče na veliku ekonomičnost u smislu vremena, energije i finansijskih inputa (Handa i saradnici, 2008; Popsavin i saradnici, 2018; Zhang i saradnici, 2018).



**Slika 8. Soxhlet aparatura**  
**Izvor (Ferenčak, 2012)**

Digestija podrazumijeva izlaganje smješe odabranog rastvarača i biljnog materijala temperaturama od oko 40 °C do 50 °C, pri čemu temperatura doprinosi efikasnosti ekstrakcije (Stanković, 2016). Digestija je oblik maceracije u kojoj se vrši zagrijavanje do 40 °C tokom procesa ekstrakcije i koristi se kada visoka temperatura nije poželjna. Time se povećava efikasnost rastvarača. U ovom procesu biljni materijal se tretira rastvaračima koji imaju nisku tačku ključanja, kako bi se povećala rastvorljivost slabo rastvorljivih materija (Handa i saradnici, 2008).

Maceracija je tehnika ekstrakcije bioaktivnih materija iz biljaka koja se izvodi na sobnoj temperaturi. Predstavlja jednokratnu ekstrakciju gdje se vrši ekstrakcija usitnjenog biljnog materijala uz natapanje biljnog materijala u posudi sa odgovarajućim rastvaračem na sobnoj temperaturi. Ova metoda ima prednost zbog mogućnosti smanjenja razgradnje termolabilnih bioaktivnih materija (Singh, 2007; Gupta, 2012; Poljarec, 2017).



Infuzi i dekokti koriste isti princip kao i maceracija. U ovim metodama izolovanja bioaktivnih materija iz biljnog materijala koristi se hladna ili vruća voda, u koje se biljni materijal potopi. Infuzi ili čajevi, pripremaju se od listova, cvjetova, cijelih nadzemnih djelova zeljaste biljke, a ponekad i od plodova. Hladni infuzi pripremaju se hladnom vodom i ostave preko noći. Kod pripreme ovakvih infuza potrebno je obratiti pažnju na čistoću i stabilnost, pogotovo ako se koriste biljke koje sadrže sluzi, a za koje se najčešće preporučuje ovaj način pripreme (Poljarec, 2017).

U procesu dekokcije aktivne materije iz biljaka se ekstrahuju vrućom vodom, tako što se osušena i/ili usitnjena biljka prelije zagrijanom vodom do ključanja i ostavi poklopljena 5 do 15 minuta. Talog se zatim odvoji od tečnosti (Dragović-Uzelac, 2016; Poljarec, 2017).

Ultrazvučna ekstrakcija je alternativna metoda ekstrakcije bioaktivnih supstanci iz biljnog materijala (slika 9) i predstavlja korišćenje ultrazvuka u opsegu od 20 kHz do 2000 kHz u procesu ekstrakcije. Mehanički efekat ultrazvučne akustične kavitacije povećava površinski kontakt između rastvarača i uzoraka, kao i propustljivosti ćelijskih zidova. Procedura je jednostavna a tehnologija relativno jeftina, može se koristiti i u maloj i u većoj skali prilikom fitohemijske ekstrakcije. Prednosti ove tehnike su smanjenje vremena ekstrakcije i smanjena potrošnja skupih rastvarača. Upotreba ultrazvučne energije više od 20 kHz može uticati na denaturaciju aktivnih fitohemikalija (Handa i saradnici, 2008; Azwanida, 2015).



*Slika 9. Aparat za ultrazvučnu ekstrakciju  
Izvor (Antiteck Life Sciences Limited, 2021 )*

### 3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

#### 3.1. Uzorkovanje biljnog materijala

Biljni materijal (plod kleke) je sakupljen sa 3 različita staništa: 500 metara sa istočne strane Termoelektrane Pljevlja, 300 metara od magistralnog puta Pljevlja-Žabljak i sa pretpostavljenog čistog staništa u selu Zabrđe, opština Pljevlja. Biljni materijal je čuvan u čistoj prostoriji i nije bio u dodiru sa isparljivim i praškastim materijalom koji je mogao uticati na promjenu sastava ploda kleke. Plod kleke je sakupljen u novembru 2022. godine, u period pune zrelosti. Uzorci su prikupljeni sa pretpostavljenog čistog staništa u selu Zabrđe, opština Pljevlja, 300 metara od magistralnog puta Pljevlja-Žabljak i 500 metara sa istočne strane Termoelektrane Pljevlja).

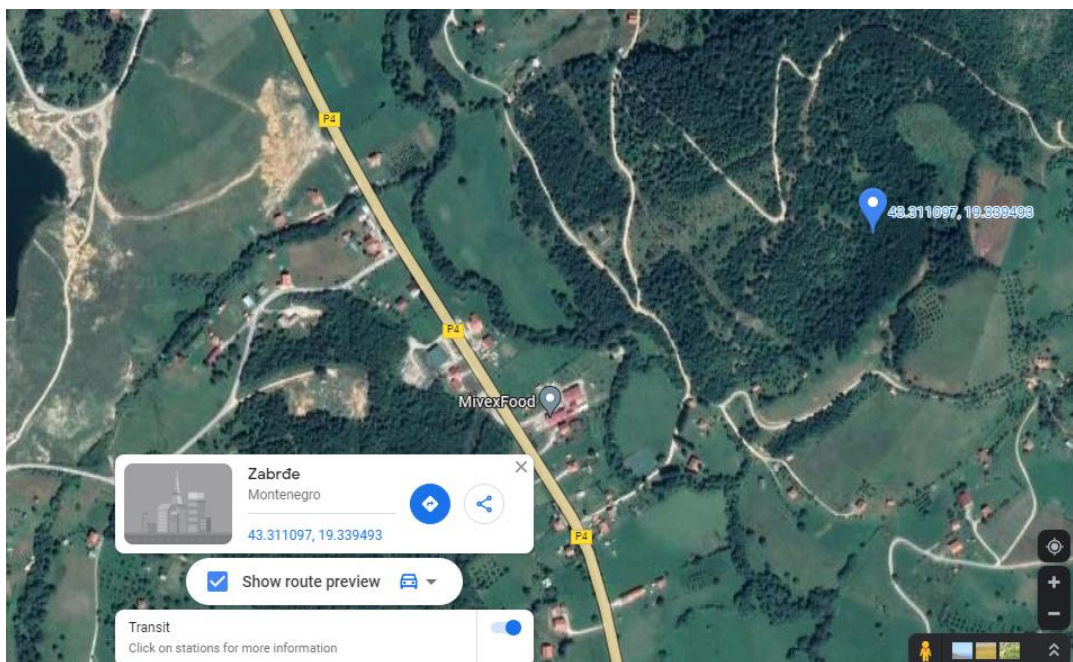
Uzorak 1 predstavlja uzorak koji je prikupljen sa pretpostavljenog čistog područja, u selu Zabrđe, opština Pljevlja (tabela 1, mapa 1), blizu kojeg se nalazi Borovničko jezero.

Uzorak 2 predstavlja uzorak koji je prikupljen sa pretpostavljenog srednjeg zagađenog područja, u okolini magistralnog puta (tabela 1, mapa 2).

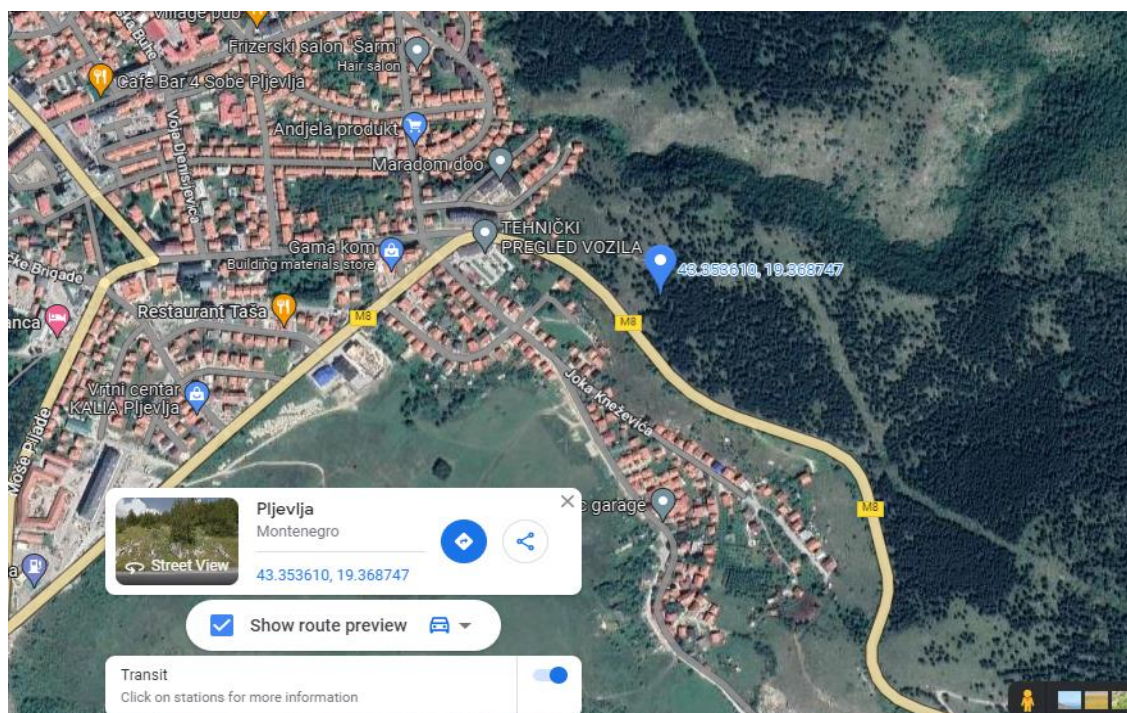
Uzorak 3 predstavlja uzorak koji je prikupljen sa pretpostavljenog zagađenog staništa, u okolini Termoelektrane Pljevlja (tabela 1, mapa 3).

*Tabela 1. Koordinate mjesta uzorkovanja ploda kleke*

	Geografska širina	Geografska dužina
Uzorak 1	43.311097	19.339493
Uzorak 2	43.353610	19.368747
Uzorak 3	43.334118	19.322243

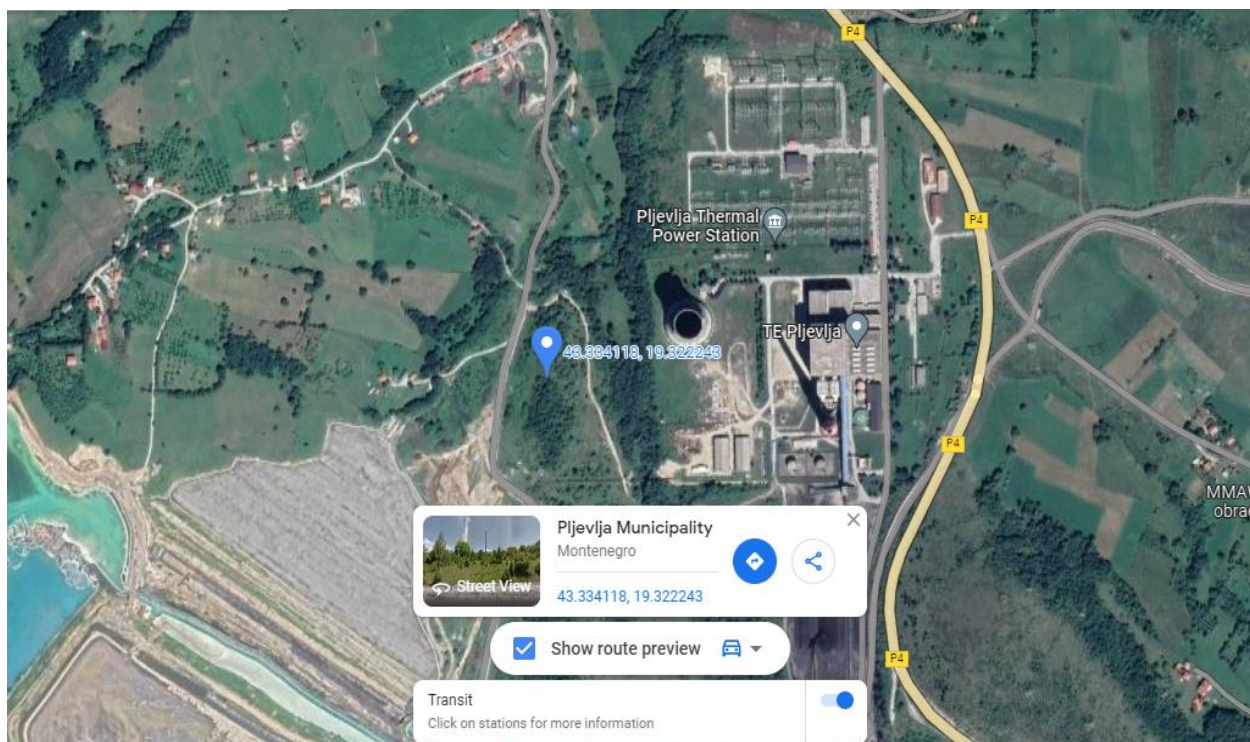


*Mapa 1. Mapa lokacije sa koje je uzorkovana biljna vrsta u selu Zabrdje, Pljevalja Izvor (Google maps)*



*Mapa 2. Mapa lokacije sa koje je uzorkovana biljna vrsta u blizini magistralnog puta Izvor (Google maps)*





*Mapa 3. Mapa lokacije sa koje je uzorkovana biljna vrsta u okolini Termoelektrane Pljevlja Izvor (Google maps)*

### 3.2. Potrebna oprema

Eksperimentalni dio master rada izvođen je u laboratoriji za Organsku hemijsku tehnologiju, laboratoriji za Analitičku hemiju i u laboratoriji za Instrumentalne analize na MTF-u u Podgorici. Pri vršenju analiza korišćena je sljedeća oprema:

- Blender,
- Soxhlet aparatura,
- Rešo,
- Ultrazvučno kupatilo Sonic,
- Peć za žarenje,
- Sušnica,
- Atomska apsorpcioni spektrometar Perkin Elmer PinAAcle 900 T.

Pri vršenju analiza korišćeni su sljedeći rastvori:

- Etanol,
- Hlorovodonična kiselina,
- Nitratna kiselina,
- Vodonik-peroksid.

### **3.3. Određivanje sadržaja teških metala u plodu kleke i ekstraktima ploda kleke dobijenih različitim metodama ekstrakcije**

Priprema uzoraka je najvažniji korak u analitičkom postupku pri bilo kojoj analizi. To je ograničavajući faktor u hemijskoj analizi jer je dugotrajan i potencijalno može dovesti do grešaka. Efikasna prethodna obrada uzorka je neizbježno potrebna jer se radi o sofisticiranom i veoma osjetljivom osjetljivom instrumentu. Stoga analitičari moraju da razviju i primjene odgovarajući protokol za pripremu uzorka koji obezbjeđuje da sastav uzorka ostane nepromijenjen, da se tokom rukovanja ne unose nečistoće, da nema smetnji, da se koncentracija analita može kvantifikovati precizno i tačno, kao i da je matrica uzorka kompatibilna sa analitičkom tehnikom. Tehnike ekstrakcije su najmoćnije oruđe u rukama tehnologa, analitičara i laboratorijskih praktičara (Samanidou, 2020).

#### ***3.3.1. Određivanje sadržaja teških metala u plodu kleke postupkom mokre digestije***

Odmjeri se po 2 g od sva tri samljevena uzorka ploda kleke. Princip se bazira na razgradnji uzoraka dodavanjem koncentrovane nitratne kiseline, kao i dodavanjem vodonik-peroksida. Nakon tog vremena vrši se uparavanje uzoraka do suva. Uzorci ostaju preko noći u sušnici na 30 °C i zatim se rastvaraju destilovanom vodom u normalnom sudu od 50 ml do crte, nakon čega su spremni za analizu.

Neophodno je da uzorci budu odmjereni izuzetno precizno, kao i u prethodnoj metodi. Metode vlažne digestije za elementarnu analizu uključuju hemijsku degradaciju matrica uzoraka u rastvoru, obično sa kombinacijom kiselina da bi se povećala rastvorljivost. Različiti tretmani kiselinom i fluksom se sprovode na visokim temperaturama u specijalno dizajniranim posudama koje pomažu da se minimizira kontaminacija uzorka supstancama u vazduhu, lokalnoj sredini i sa zidova posuda. Gubici iz uzorka u ovom postupku mogu nastati usljed adsorpcije na zidove posuda, isparenja i koekstrakcije. Upotreba zatvorenih sistema, gde je proces digestije potpuno izolovan od okoline, smanjuje i mogućnost kontaminacije i gubitak uzorka (Twyman, 2005).

Razgrađivanje uzoraka dodavanjem koncentrovane nitratne kiseline i vodonik peroksida vrši se u digestoru. Na samom početku uparavanja na vrhu se izdvaja para od svih pomiješanih materijala, nakon čega počinje intenzivniji i dinamičniji proces uparavanja. Kada je uparavanje jačeg intenziteta može da dođe do povećanja reaktivnosti rastvora, kao i do zamućivanja tečnosti. U tom slučaju dodaje se destilovana voda u cilju smanjenja reaktivnosti rastvora, i kako bi uparavanje moglo dalje nesmetano da se odvija. Ukoliko uzorci nisu dovoljno bistri posle faze uparavanja, neophodno je iste profiltrirati, nakon čega idu u sušnicu. Nakon faze sušenja, uzorci

se rastvaraju destilovanom vodom u normalnom sudu od 50 ml do crte i vrši se određivanje koncentracije metala AAS metodom.

### ***3.3.2. Određivanje sadržaja teških metala u plodu kleke postupkom mineralizacije***

Uzorci ploda kleke se melju u blenderu. Što su sitniji uzorci ploda kleke proces mineralizacije je bolji i potpuniji. Odmjereno je po 2 g samljevenog ploda kleke od sva 3 ispitivana uzorka, i stavljaju na žarenje u porcelanskom lončiću (3 sata na 450 °C.) Poslije žarenja dobija se pepeo bijele boje, i to je znak da je uzorak spreman za rastvaranje.

Pošto se ohladi u lončić se dodaje 5 ml HCl (6 mol/l). Rastvor se prenosi u normalnom sudu zapremine 50 mL, a lončić se ispere rastvorom HNO<sub>3</sub> (0,1 mol/l) koji se dodaje u isti normalni sud. Sud se dopuni do crte 0,1 mol/l rastvorom HNO<sub>3</sub>. Radni rastvori se prave od osnovnog rastvora i razređuju 0,1 mol/l rastvorom HNO<sub>3</sub>.

Ako je pepeo uzorka bijele boje (slika 10) ili svjetložut, dobijeni pepeo je spreman za rastvaranje. Ukoliko je pepeo uzorka siv ili sadrži nesagorjele čestice crne boje, uzorci se dorađuju spaljivanjem na plameniku, zagrijavanjem i sušenjem na rešou, kao i dodatnim spaljivanjem u peći za žarenje. Nakon spaljivanja pepeo se rastvara sa 5 ml HCl dok se ne rastvori, a potom se dopuni do crte 0,1 mol/l rastvorom HNO<sub>3</sub>. Rastvaranje se vrši za sva 3 uzorka i tako pripremljeni uzorci su spremni za analizu.



***Slika 10. Dobijanje pepela u postupku mineralizacije***

### 3.3.3. Soxhlet ekstrakcija ploda kleke

Soxhlet ekstrakcija - uglavnom se koristi za ekstrakciju lipofilnih jedinjenja, a prednosti Soxhlet ekstrakcije je to što se uzorak više puta ekstrahuje čistim rastvaračem. Ekstrakcija je dugotrajna, a zbog povišene temperature ekstrakcije dolazi do razgradnje termolabilnih supstanci (Castro i Priego-Capote, 2010).

Višekratna kontinuirana ekstrakcija ploda kleke vršena je u Soxhlet aparaturi sa 70% etanolom kao rastvaračem. 20 g usitnjenog ploda kleke se stavlja u hilznu, sipa se 70% etanol u Soxhlet aparaturu (slika 11), tako da hilzna sa biljnim materijalom bude natopljena rastvaračem. Ekstraktor se spoji sa balonom i u njega se ulije rastvarač. Zatim se postavi uspravni hladnjak sa kuglama. Ostavlja se preko noći i zatim se uključuje dovod vode za kondenzator i zagrijava rastvara u balonu pomoću grejnog tijela. Pri zagrijavanju, nastale pare rastvarača prolaze kroz bočnu cijev, kondenzuju se u hladnjaku i slivaju u ekstraktor. Kapi natapaju biljni materijal u hilznu i pri tome se vrši ekstrakcija. Tečnost se sakuplja u ekstraktoru sve dok njen nivo ne dostigne najvišu tačku cijevi. Tada tečnost počinje da sifonira u balon, noseći sa sobom ekstrahovanu supstancu. Ekstrakt se sakuplja u balonu, jer mu je isparljivost znatno manja od isparljivosti rastvarača. Nakon završetka ekstrakcije, ohlađeni rastvor se prenosi u čašu, a balon u kome je vršena ekstrakcija ispere se sa 70% etanolom (v/v) (3x10ml). Odmjeri se tara balona od 50 ml i u njemu sukcesivno uparava vodeno-etanolni ekstrakt na vakuum uparivaču. Balon sa uparenim ekstraktom ostavlja se u sušnici na 30 °C da se ekstrakt suši.



*Slika 11. Soxhlet aparatura*

U ovom master radu izvršeno je tri sifoniranja tečnosti preko natege za sva 3 biljna uzorka. Jedno sifoniranje u prosjeku traje oko 2 sata.

Uparavanje uzoraka u lončićima se smatra gotovim kada pokretanjem i pomjeranjem lončića, uzorci ostaju nepomični. Nakon uparavanja uzorci se ostavljaju u sušnici, nakon čega se rastvaraju destilovanom vodom u normalnom sudu od 50 ml do crte i vrši se određivanje koncentracije metala AAS metodom.

#### ***3.3.4. Ultrazvučna ekstrakcija ploda kleke***

Ultrazvučna ekstrakcija je jedna od novijih tehnika koje omogućavaju ekstrakciju željenih bioaktivnih materija iz ljekovitih i aromatičnih biljaka u kraćem vremenu. Prednosti ove metode su i jednostavnije rukovanje, niže temperature ekstrakcije i korišćenje manjih količina rastvarača. Prilikom korišćenja ultrazvuka, bubrenje ćelija je izazvano od strane kavitacije, i probijanje ćelijskih zidova, što omogućava poprilično velike difuzione brzine kroz ćelijski zid, i jednostavnije ispiranje sastojaka (Savić, 2014).

U današnje vrijeme ultrazvučno istraživanje se u velikoj mjeri povećalo zbog njegove moguće primjene u prehrambenoj industriji, kao i za modifikaciju prehrambenih proizvoda, i njihovu analizu. Ako je primjenjena visoka frekvencija, riječ je o ultrazvuku sa niskom energijom, a ukoliko je frekvencija niska, riječ je o ultrazvuku sa visokom energijom. Ultrazvuk niskog intenziteta djeluje u frekventnom opsegu od 2 MHz i više. On ne izaziva fizičke niti hemijske promjene, pa se podrazumijeva kao neinvazivna tehnika, dok je njena upotreba u svrhu analitičke tehnike kod određivanja sastava, viskoznosti, kontrolu pakovanja, koncentracije materije u hrani itd (Stanković, 2016).

U postupku ultrazvučne ekstrakcije ploda kleke u ovom master radu korićen je 70% etanol. Usitni se po 10 g od sva 3 uzorka ploda kleke, nakon čega se u ultrazvučnom kupatilu (slika 12), vrši ekstrakcija sa 50 ml rastvarača, 30 minuta na 50 °C. Dobijeni rastvor se profiltrira se u tarirani balon od 50 ml i uparava.





*Slika 12. Ultrazvučno kupatilo*

Uparavanje uzoraka, kao i u prethodnom slučaju mora biti postepeno, bez naglih promjena temperatura, koje može izazvati nekontrolisane temperature ključanja i moguće isparavanje teških metala. Ukoliko se to slučajno desi, neophodno je skinuti lončiče sa uzorcima, smanjiti temperaturu na rešou, i vratiti lončiče na uparavanje.

Prije faze sušenja, upareni uzorci se ostavljaju u peć za žarenje, nakon čega se sledeće jutro prenose u sušnicu na 30 °C. Nakon što se izvade iz sušnice, neophodno je provjeriti da li su se u potpunosti osušili. Ako to nije slučaj, neophodno je uzorke vratiti u sušnicu sve dok se potpuno ne osuše, kako bi bili spremni za rastvaranje i analizu. Nakon faze sušenja, uzorci se rastvaraju destilovanom vodom u normalnom sudu od 50 ml do crte i vrši se određivanje koncentracije metala AAS metodom.

### ***3.3.5. Određivanje sadržaja teških metala u infuzu ploda kleke***

Ekstrakcija vodom, pripremanje dekokta i infuze predstavlja dobijanje ekstrakta kuvanjem biljke u destilovanoj vodi i potapanjem biljke u toplu destilovanu. Metode kako se aromatične biljke i ljekovite biljne vrste najčešće koriste u tradicionalnoj medicini (Blagojević i sar., 2009).

Kod ove metode ekstragens je voda, način pripreme odgovara pripremi čajeva (WHO, 2011). Usitni se po 10 g od sva 3 uzorka, prelije se sa 150 ml proključale vode, pokrije se sahatnim staklom i ostavi se da ključa 2 minuta. Nakon tog vremena uklanja se posuda sa grejnog tijela, poklapa se i ostavlja da odstoji 30 minuta. Nakon tog vremena profiltrira se u tarirani balon od 50 ml i uparava se do suva. Filtriranje može da teče malo sporije, zavisno od ispitivane kako ne bi došlo biljke. Nakon što se svi uzorci profiltriraju do kraja, sledeća faza jeste uparavanje do suva. Rastvori ne smiju da ključaju nekontrolisano i potrebno ih je stalno nadgledati. Balon sa uparenim infuzom treba ostaviti u sušnicu na 30 °C da se infuz suši preko noći. Nakon faze sušenja, uzorci se rastvaraju destilovanom vodom u normalnom sudu od 50 ml do crte i vrši se određivanje koncentracije metala AAS metodom.

### ***3.3.6. Određivanje sadržaja teških metala u maceratu ploda kleke***

Maceracija predstavlja konvencionalnu i jednokratnu ekstrakciju propisano usitnjene droge sa odabranim rastvaračem na sobnoj temperaturi. Ekstrakcija se vrši po principu difuzije aktivnih jedinjenja u ekstrakcionu medijum (Drinić, 2020).

Za ovaj proces usitni se 10 g uzorka koji se sipa u čašu sa 50 ml rastvarača – vode. Nakon toga čaša stavlja se u vodeno kupatilo 30 minuta, temperatura 50 °C. Zatim se uzorci profiltriraju i kao kod ostalih metoda, neophodno je da cjelokupan materijal uzorka bude profiltriran kompletno, tako da sve što može prođe kroz filter papir. Filtriranje kod ove metode je veoma brzo. Neophodno je da filter papir bude dobro napravljen, da ne dođe do njegovog pucanja i mogućeg oticanja neprofiltriranog dijela materijala u čašu. U tom slučaju, neophodno je opet ponoviti proces filtriranja, uparavaju do suva i ostavljaju u sušnici na 30 °C preko noći. Nakon faze sušenja, uzorci se rastvaraju destilovanom vodom u normalnom sudu od 50 ml do crte i vrši se određivanje koncentracije metala AAS metodom.

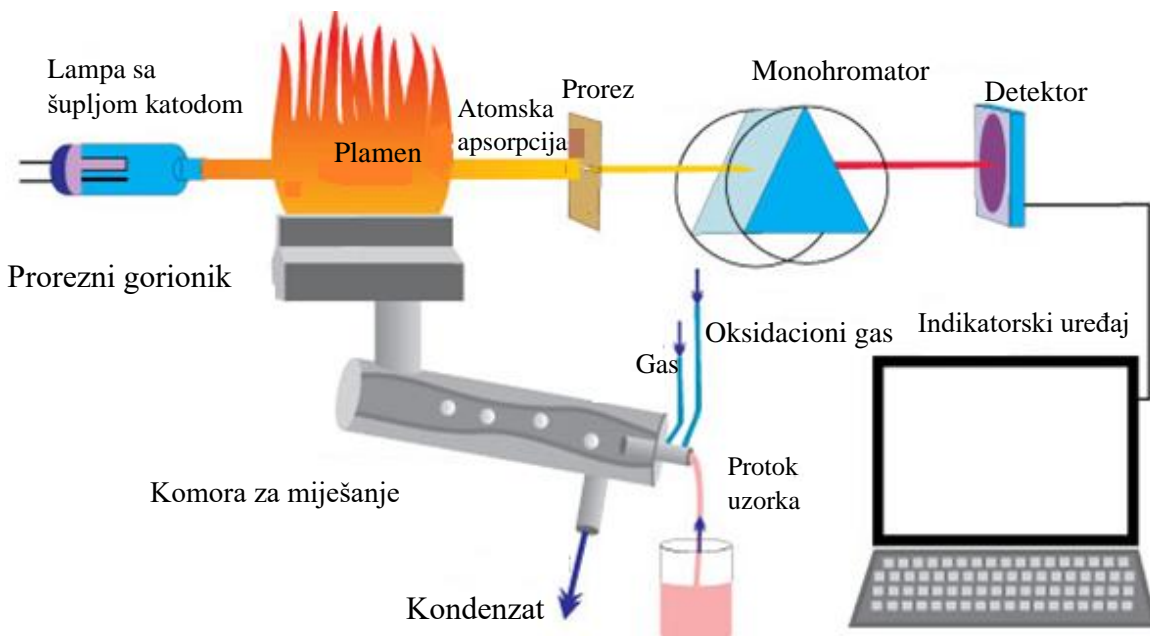
### **3.3.7. Određivanje sadržaja teških metala AAS metodom**

Atomska apsorpciona spektrometrijska metoda (slika 13) koristi se za brzo i vrlo reproduktivno određivanje elemenata, najčešće u rastvorima, ali i u čvrstim uzorcima različite prirode i porijekla (Mišović, 1994).

AAS metoda se definiše kao metoda za određivanje koncentracije nekog elementa u uzorku, mjerenjem apsorpcije zračenja u nastaloj atomskoj pari, stvorenoj od uzorka, na talasnoj dužini koja je specifična i karakteristična za određivani element. U ovoj metodi se koriste specijalni izvori zračenja koji daju emisione linije sa vrlo malim poluširinama zajedno sa monohromatorom koji služi sa izolovanje dijela spektra u kome se javlja emisiona linija i odgovarajuća apsorpciona linija odgovarajućeg elementa.

Izvor zračenja predstavlja lampa sa šupljom katodom. Plamen predstavlja najpogodniji način za dobijanje atomske plazme – sitno raspršene kapi rastvora u plamenu određene temperature, kroz plazmu se propušta svjetlost jedne od rezonantnih linija, karakterističnih za dati element. Atomizer je dio pomoću koga se tečni uzorak uvodi u plamen. Vazduh prolazi kroz kapilarnu cijev koja je direktno uronjena u tečni uzorak i povlači ga u vidu kapljica. Kao detektor u AAS se ranije koristila fotoćelija, dok se danas koriste fotomultiplikatori jer AAS detektuje relativno male energije koje fotoćelije, zbog nedovoljne osjetljivosti, nisu mogle registrovati (Mišović, 1994). Kao gorivo korišćen je acetilen – standardni, komercijalni. Kao oksidaciono sredstvo upotrijebljen je vazduh.

Slijepe probe su pripremljene kod svih uzoraka istovjetno, što znači da su dodate sve potrebne hemikalije u istom odnosu kao kod postupaka pripreme uzoraka, ali bez dodataka uzoraka. Na osnovu konstruisane kalibracione krive i očitanih vrijednosti apsorpcije određene su koncentracije teških metala: Pb, Ni, Cu, Zn, Fe i Mn.



*Slika 13. Šematski prikaz atomskog apsorpcionog spektroskopa*

*Izvor (Chemistry, 2019)*

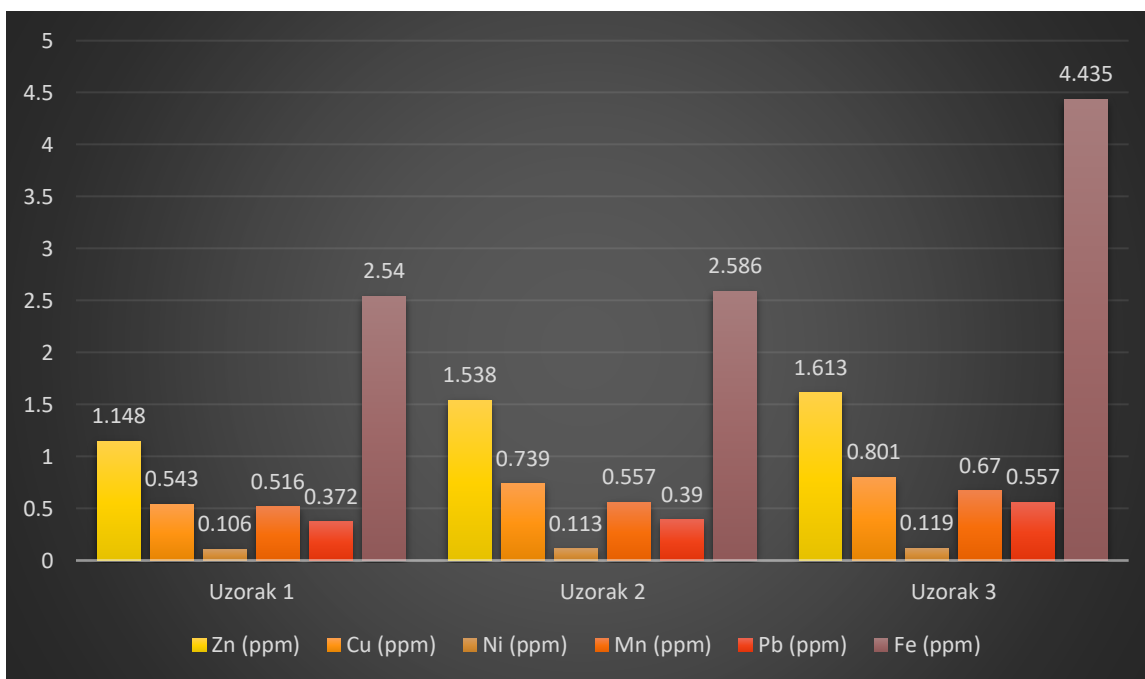
#### 4. REZULTATI I DISKUSIJA

Ciljevi ovog master rada su:

- Procijeniti u kojoj mjeri plod kleke (*Juniperi fructus*) može akumulirati teške metale u zavisnosti od mjesta uzorkovanja, tj. blizine poznatih izvora zagađivanja;
- Ispitati kako različite metode ekstrakcije (konvencionalna maceracija, maceracija potpomognuta ultrazvukom, Soxhlet ekstrakcija, ekstrakcija ključalom i toplom destilovanom vodom) utiču na sadržaj teških metala u dobijenim ekstraktima;
- ispitati koncentracije teških metala uzorkovanih plodova kleke sa staništa koja su različito izložena izvorima zagađenja, imajući u vidu ogroman problem koji teški metali mogu prouzrokovati u životnoj sredini, kao i na biljne vrste;
- Danas se koriste različite metode izolovanja biološki aktivnih materija, a u ovom radu cilj je ispitati koliko izbor metode ima uticaja na izolovanje teških metala.

#### 4.1. Rezultati određivanja sadržaja teških metala u plodu kleke dobijenim metodom mokre digestije

Mokra digestija uzoraka je metod za prevođenje komponenata iz kompleksnog matriksa u jednostavne hemijske forme. Izvođenje digestije se sprovodi dovođenjem energije - toplota; primjenom hemijskih reaganasa - kiseline; moguće je i kombinovanje ove dvije metode. Dobra strana ovog procesa je efikasnost za organske i neorganske susptance. Dolazi u velikom broju slučajeva do cjelokupnog uništavanja matrice uzorka, što pomaže u smanjivanju i/ili otklanjanju određenih materija. Rezultati analize koncentracije metala u plodu kleke dobijenih pomoću ove metode prikazani su u tabeli 2 (grafikon 1). Ispitivana je koncentracija metala u plodu koji su dobijeni po proceduri standardnoj u mnogim zemljama u kojima se primjenjuje ova metoda, tj. razgradnjom 2 g biljnog materijala koncentrovanom nitratnom kiselinom, kao i dodavanjem vodonik-peroksida.



*Grafikon 1. Sadržaj teških metala u uzorcima ploda kleke dobijenih metodom mokre digestije*

Iz dobijenih rezultata u grafikonu 1, uočava se da je u ispitivanim uzorcima plodova kleke najveći sadržaj gvožđa, a da su zastupljeni i cink i mangan. Sadržaj nikla u sva 3 uzorka je najmanji. Bakar i olovo su također zastupljeni u sva 3 uzorka ploda kleke. Hrom i kadmijum nisu detektovani pri ovoj analizi. Sadržaj cinka raste sa kretanjem od uzorka 1 (1,148 ppm), sa pretpostavljenog čistog područja, preko uzorka 2, koji je prikupljen sa srednje zagađenog područja, do uzorka broj 3 (1,613 ppm) koji je prikupljen u okolini Termoelektrane Pljevlja. Takođe, sadržaj bakra raste od uzorka 1 do uzorka 3 (0,543 ppm do 0,801 ppm), kao i sadržaj nikla, od 0,106 do 0,119 ppm.

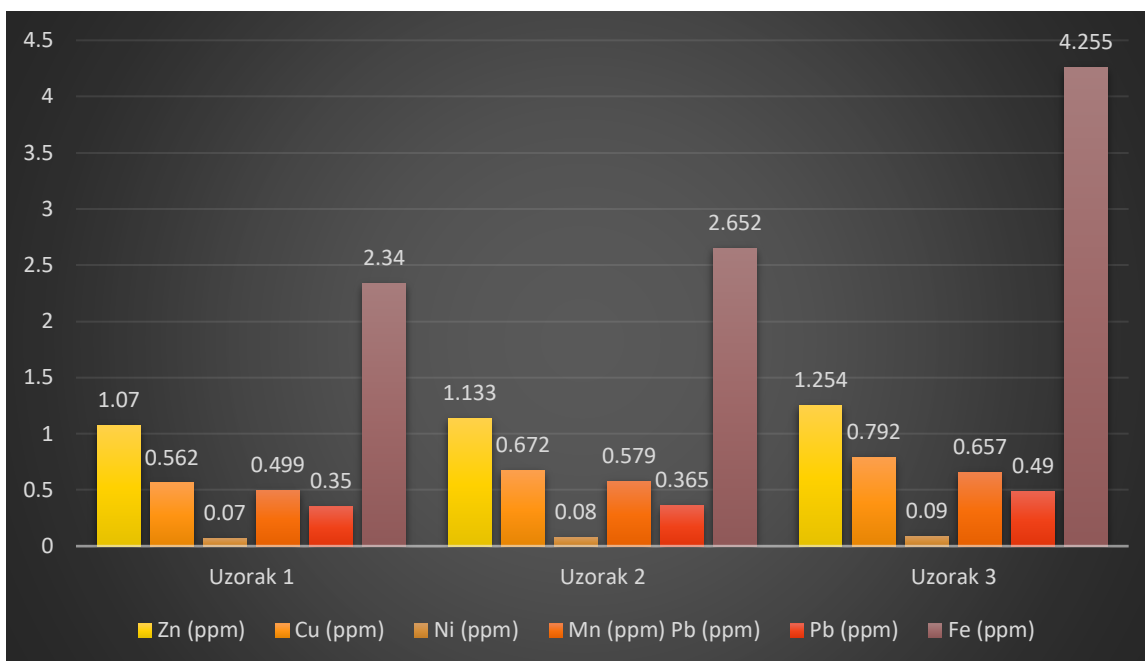
Sadržaj mangana raste od 0,516 ppm u uzorku 1, preko 0,557 ppm u uzorku 2, do 0,670 ppm u uzorku 3. Olovo je u prvom uzorku ploda kleke prisutno u količini od 0,372 ppm, u drugom uzorku je detektovano 0,390 ppm, dok je koncentracija u trećem uzorku ploda kleke 0,557 ppm. I na kraju gvožđe, koje je detektovano u najvećim količinama, od 2,540 ppm koliko iznosi u prvom uzorku, pa sve do 4,435 ppm u trećem uzorku. Dobijeni rezultati pokazuju da koncentracija metala u plodu kleke raste u od nezagađenog staništa, preko ploda kleke uzorkovane u blizini saobraćajnice, do najveće zagađenosti teškim metalima plodu kleke ubrane u blizini TE Pljevlja.

Veća zagađenost trećeg uzorka leži u činjenici da Termoelektrana Pljevlja redovno emituje određene količine polutanata i da, usljed dominantnih vjetrova u ovom području, ove štetne supstance dolaze do staništa sa kog je uzorkovan treći uzorak ploda kleke.

#### **4.2. Rezultati određivanja sadržaja teških metala u plodu kleke dobijenih metodom mineralizacije**

Mineralizacija predstavlja proces u kome se odmjerena masa uzorka žari u porcelanskom lončiću. Najbitniji korak kod ove metode jeste da se proces žarenja odradi kompletno, da uzorak poprimi bijelu boju u cjelosti. Metoda nije kompleksna, vremenski nije previše duga, karakteriše je preciznost u dobijanju rezultata.

Rezultati analize koncentracije metala u plodu kleke dobijenih metodom mineralizacije prikazani su u tabeli 3 (grafikon 2).



**Grafikon 2.** Sadržaj teških metala u uzorcima ploda kleke dobijenih metodom mineralizacije

Iz dobijenih rezultata u grafikonu 2, uočava se najveći sadržaj gvožđa, takođe, kao i u prvom slučaju potom slijede cink i bakar. Posle cinka i bakra, slijede mangan i olovo. Sadržaj cinka raste od 1,070 ppm koliko ima u prvom uzorku, do 1,254 ppm koliko ima u uzorku 3. Sadržaj bakra raste od 0,562 do 0,792 ppm. Sadržaj mangana se kreće od 0,499 do 0,657 ppm. Olovo raste od 0,350 do 0,490 ppm.

Koncentracija gvožđa u uzorcima ploda kleke raste od 2,340 ppm do 4,255 ppm,. I ovaj put, priprema biljnog materijala za ispitivanje sadržaja teških metala, zaključuje da zagađenost ploda kleke raste od prvog uzorka, preko staništa blizu magistralnog puta pored koga je uzorkovan drugi biljni materijal do ploda kleke koji je uzorkovan staništa u blizini TE Pljevlja.

Razlika u rezultatima između ove dvije metode pripreme uzorka ploda kleke za ispitivanje teških metala ukazuje da je poželjno koristi obje metode i uporediti dobijene rezultate, zbog mogućnosti greške u eksperimentalnom radu. Razlika između ove dvije metode je minimalna, na nivou greške.

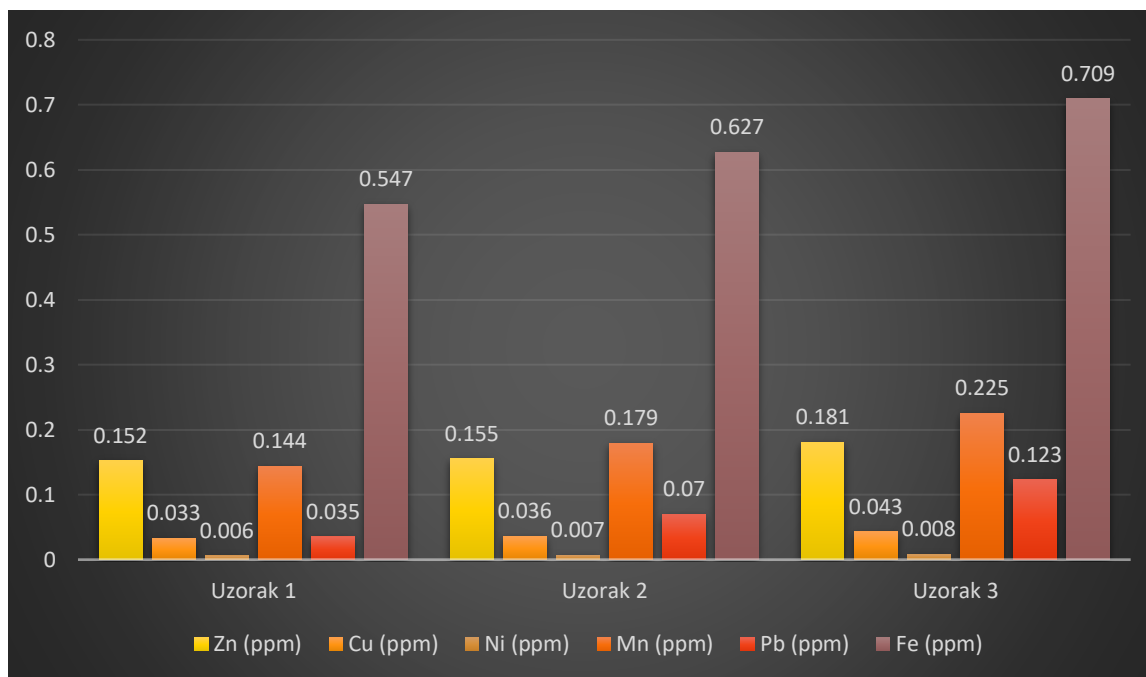
Dalje, dobijeni rezultati pokazuju na značajan uticaj lokalnih faktora i okoline na koncentraciju teških metala u biljnom materijalu. Rezultati pokazuju da je plod kleke uzorkovan u blizini Termoelektrane Pljevlja (TE Pljevlja) značajno više zagađen teškim metalima u poređenju sa plodom kleke uzorkovanim duž magistralnog puta i uzorkom koji nije direktno izložen emisijama iz TE Pljevlja.

### 4.3. Rezultati određivanja sadržaja teških metala u infuzu ploda kleke

Ovu metodu karakteriše način pripreme koji odgovara pripremi čajeva. Nije previše zahtjevna i kompleksna. Metoda ekstrakcije vrelom vodom (infuz) je često korišćena tehnika ekstrakcije u fitoterapiji za pripremu čajeva i biljnih napitaka. Infuza ekstrahuje različite bioaktivne materije iz biljaka, uključujući fenolne spojeve, flavonoide, eterična ulja, alkaloidi, vitamini i minerali, te druge korisne supstance. Ova biljna jedinjenja imaju različita dejstva i često su odgovorna za ljekovita svojstva biljaka. Infuz se koristi fitoterapiji, kao i u narodnoj medicini, za liječenje različitih zdravstvenih problema. Na primjer, čajevi od ljekovitih biljaka se često koriste za ublažavanje gastrointestinalnih smetnji, prehlada, nesanice, anksioznosti i drugih stanja.

Biljni čajevi i infuzi su takođe popularni zbog njihove hidratantne uloge i doprinose opštem blagostanju. U infuzima je važno analizirati sadržaj specifičnih komponenata ili teških metala u ekstraktima kako bi se utvrdilo da li su prisutne neželjene supstance.

Rezultati analize koncentracije metala u ekstraktima ploda kleke dobijeni pomoću metode pripreme infuza prikazani su u tabeli 4 (grafikon 3).



*Grafikon 3. Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom pripremom infuza*



Iz dobijenih rezultata u grafikonu 3, najveći sadržaj od svih elemenata ima gvožđe, koje se kreće od 0,547 do 0,709 ppm. Najmanji sadržaj ima nikal, koji se kreće od 0,006 do 0,008 ppm. Cink se kreće od 0,152 do 0,181 ppm. Drugi najmanji sadržaj posle nikla ima bakar, koji se kreće od 0,033 do 0,043 ppm. Treći najmanji sadržaj ima olovo, koje se kreće od 0,035 do 0,123 ppm. Mangan je približan sa cinkom, ima malo veći sadržaj, koji se kreće od 0,144 do 0,225 ppm.

Metode koje su korišćene za ispitivanje teških metala, metode mokre digestije i mineralizacije su metode koje pokazuju koliko ukupno uzorka ima u plodu kleke. Za ispitivanje srednje vrijednosti rastvorljivosti metala za primjenjenje metode ekstrakcije računa se srednja vrijednost za prve dvije metode, kao i srednja vrijednost sadržaja elemenata u dobijenim ekstraktima.

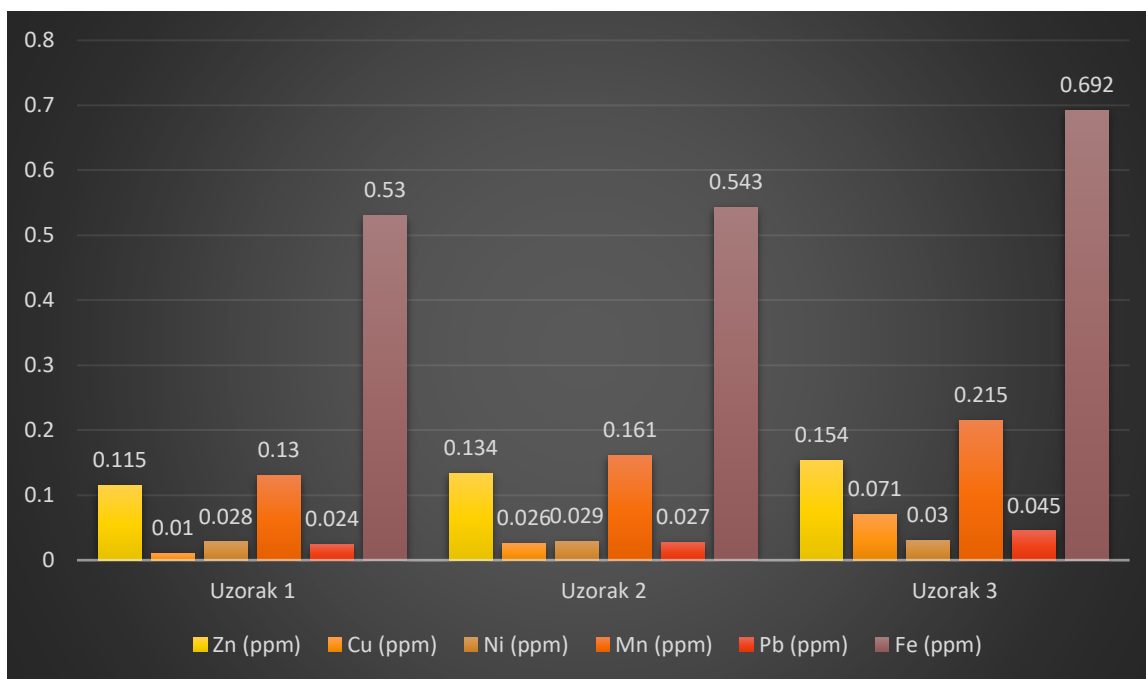
Srednje vrijednosti rastvorljivosti metala metodom ekstrakcije vodom (infuz) su: cink 2,53%, bakar 5,40%, nikal 7,29%, mangan 31,43%, olovo 18,09%, gvožđe 18,91%.

#### **4.4. Rezultati određivanja sadržaja teških metala u maceratu ploda kleke**

Maceracija je jedna od metoda ekstrakcije koja se koristi za izdvajanje bioaktivnih materija, uglavnom korisnih hemijskih supstanci, iz biljke. Maceracija je postupak u kojem se biljni materijal, poput sušenih ili svježih biljaka, potapa u odgovarajući rastvarač, obično alkohol (najčešće etanol) ili ulje, kako bi se ekstrahovali bioaktivni sastojci iz biljke.

Biljni materijal ostaje potopljen u rastvaraču tokom određenog vremena kako bi se dozvolilo da se bioaktivne supstance polako izluče u rastvarač. Maceracija se koristi za ekstrakciju različitih bioaktivnih materija iz biljaka, uključujući fenolna jedinjenja, flavonoide, tanine, etarska ulja, alkaloida, glikozide i druge bioaktivne supstance, dobijene maceracijom, često se upotrebljavaju u fitoterapiji i tradicionalnoj medicini za pripremu biljnih lijekova, tinktura i tonika. Maceracija je efikasan način da se izvuče širok spektar bioaktivnih jedinjenja iz biljaka, što može doprinjeti ljekovitim svojstvima preparata. Rastvarači koji se koriste u maceraciji, kao što je alkohol, takođe mogu produžiti rok trajanja i stabilnost ekstrakata.

Rezultati analize koncentracije metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom maceracije prikazani su u tabeli 5 (grafikon 4). Ispitivana je koncentracija metala u ekstraktima koji su dobijeni ključanjem uzoraka u ultrazvučnom kupatilu, nakon čega su uslijedile faze filtriranja, uparavanja i sušenja.



**Grafikon 4.** Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom maceracije

Iz dobijenih rezultata u grafikonu 4, najveći je sadržaj gvožđa u ekstraktima od svih ispitivanih elemenata u ovom master radu. Sadržaj gvožđa raste od 0,530 ppm do 0,692 ppm koliko iznosi u biljnom materijalu koji je uzorkovan sa staništa u okolini TE Pljevlja.

Sadržaj cinka u maceratima ploda kleke se kreće od 0,115 ppm u prvom uzorku do 0,154 ppm koliko iznosi u trećem uzorku. Sadržaj bakra u maceratima se kreće od 0,010 do 0,071 ppm. Mangan se kreće od 0,130 do 0,215 ppm. Olovo se kreće od 0,024 do 0,045 ppm koliko iznosi u trećem, najzagađenijem uzorku.

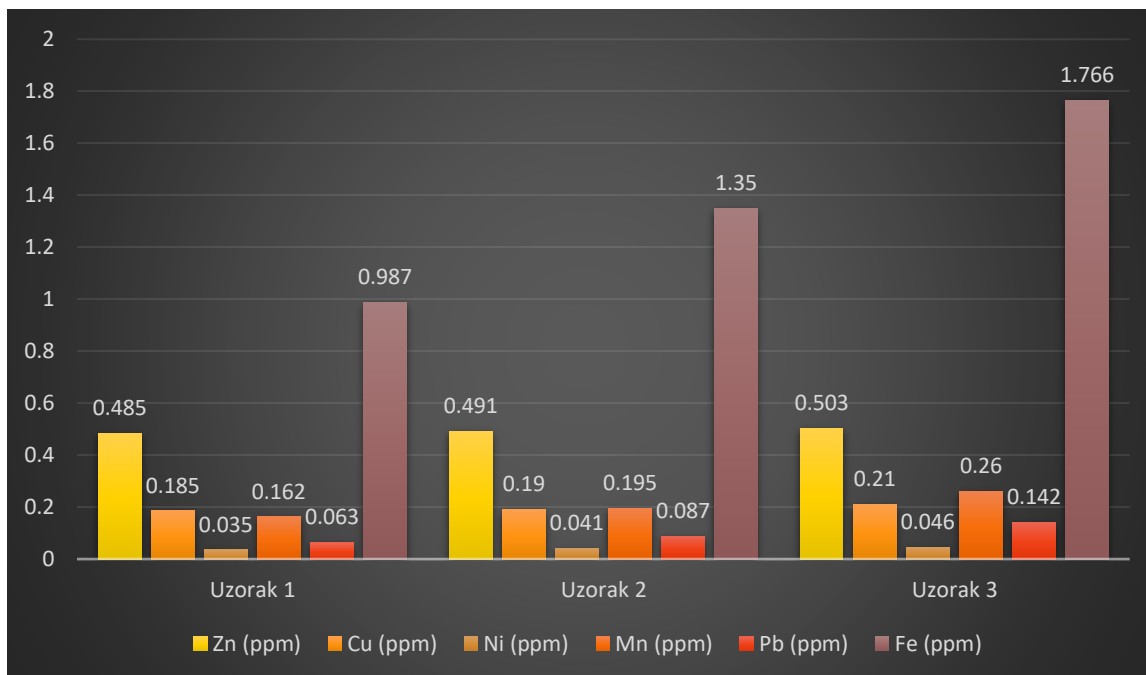
Rastvorljivost elementa metodom maceracije iznosi za: cink 0,37%, bakar 5,11%, nikal 30,2%, mangan 29,01%, olovo 7,61%, gvožđe 18,76%.

#### 4.5. Rezultati određivanja sadržaja teških metala Soxhlet ekstrakcijom

Ekstrakcija ovom metodom predstavlja proces prenošenja djelimično rastvorljivih komponenti čvrste supstance u tečnu fazu korišćenjem Soxhlet ekstraktora. Prednosti Soxhlet ekstraktora su: jednostavan i jasan dizajn, kontinuitet proizvodnog procesa, lakoća vizuelnog praćenja procesa, nizak protok rastvarača i mogućnost njegove ponovne upotrebe nakon uklanjanja

i destilacije. Nedostaci Soxhlet ekstrakcije su: upotreba velikih količina opasnih i zapaljivih tečnih organskih rastvarača, potencijalne toksične emisije tokom ekstrakcije, potreba za skupim rastvaračima visoke čistoće, kao i termolabilne supstance.

Rezultati analize koncentracije metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih pomoću Soxhlet ekstrakcije prikazani su u tabeli 6 (grafikon 5).



**Grafikon 5.** Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom Soxhlet ekstrakcije

Iz dobijenih rezultata u grafikonu 5, ekstrakti dobijeni ovom metodom imaju najveći sadržaj gvožđa od svih metoda ekstrakcija, što je prvenstveno uticaj dužeg vremena ekstrakcije i više temperature rastvarača. Sadržaj gvožđa u ekstraktima ploda kleke dobijenih Soxhlet ekstrakcijom kreće od 0,987 ppm u uzorku 1, preko 1,350 ppm u uzorku broj 2, pa sve do 1,776 ppm u uzorku 3, u blizini TE Pljevlja.

Sadržaj nikla je konstantno nizak, i tu nema previše odstupanja u odnosu na prethodne metode. Sadržaj nikla se kreće od 0,035 ppm pa sve do 0,046 ppm. Sadržaj cinka u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom Soxhlet ekstrakcije raste od 0,485 ppm u ekstraktu uzorka 1, do 0,503 ppm u ekstraktu iz uzorka 3. Sadržaj bakra je znatno uvećan u ekstraktima dobijenih

primjenom Soxhlet ekstrakcije u odnosu na metodu maceracije, i raste od 0,185 ppm koliko je izmjereno u ekstraktu iz uzorka 1 do 0,210 ppm u ekstraktu iz uzorka 3.

Sadržaj mangana se kreće od 0,162 ppm u ekstraktu dobijenom Soxhlet ekstrakcijom uzorka 1 i raste sve do 0,260 ppm u ekstraktu uzorka 3. Sadržaj olova je detektovan u ekstraktu uzorka 1 - 0,063 ppm, i raste u ekstraktu uzorka 2 - 0,087 ppm, pa sve do 0,142 ppm koliko iznosi u ekstraktu uzorka 3.

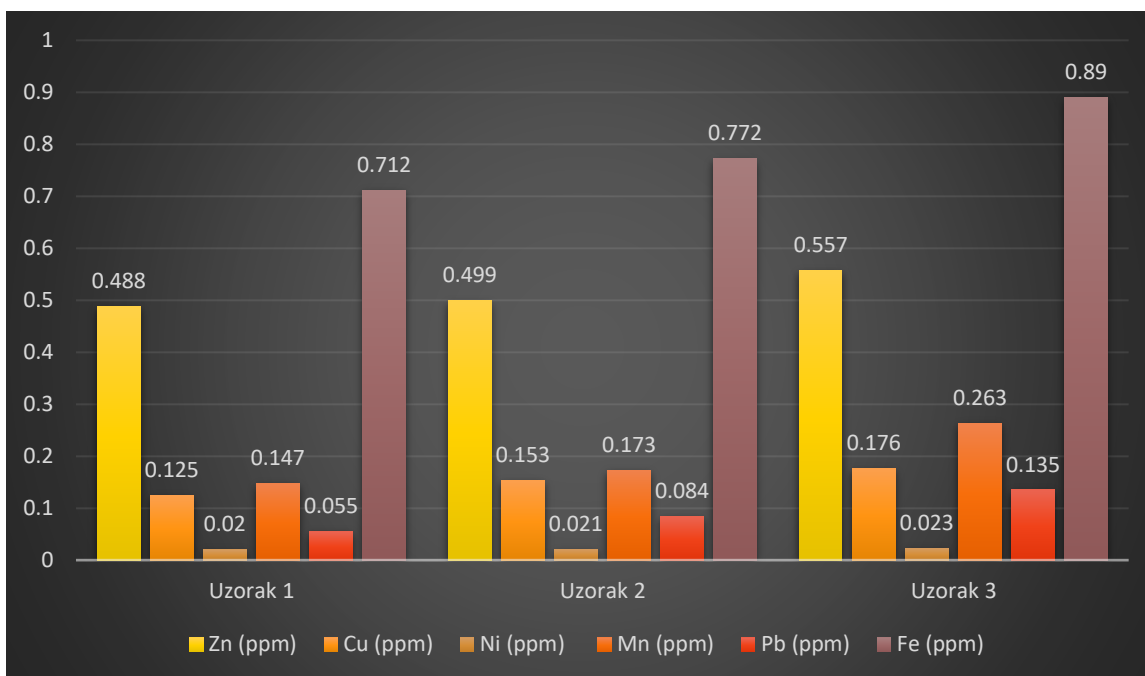
Rastvorljivost elemenata za Soxhlet ekstrakciju je za: cink 38,15%, bakar 28,50%, nikal 41,66%, mangan 35,40%, olovo 23,09 %, gvožđe 41,24 %.

#### **4.6. Rezultati određivanja sadržaja teških metala ultrazvučnom ekstrakcijom**

Ultrazvučna ekstrakcija je upotreba ultrazvučnog pritiska zračenja proizvedenog snažnim efektom kavitacije, efektom poremećaja, visokim ubrzanjem, funkcijom lomljenja i miješanja višestepenog efekta, povećanjem frekvencije i brzine molekulskog kretanja materijala, povećanjem penetracije rastvarača, povećanjem ciljne komponente u rastvaraču, koji vrše ekstrakciju.

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je inovativna tehnika, koja se smatra „čistom tehnologijom“ koja je postala interesantna poslednjih godina zbog svojih odličnih prednosti, uključujući upotrebu malih zapremina rastvarača, kratkog vremena ekstrakcije, niske ekonomičnosti. Nedostaci ove metode su: primjena ultrazvučnih talasa na tečne medije dovodi do stvaranja sila smicanja na površini matrice, izazivajući kasnije pucanje njenih struktura i ekstrakciju unutrašnjih jedinjenja u rastvaraču.

Rezultati analize koncentracije metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih pomoću metode ultrazvučne ekstrakcije prikazani su u grafikonu 6.



**Grafikon 6.** Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom ultrazvučne ekstrakcije

Iz dobijenih rezultata u grafikonu 6, može se konstatovati da je sadržaj gvožđa u dobijenim ekstraktima ploda kleke ubjedljivo najveći. Sadržaj gvožđa u ekstraktima dobijenih metodom ultrazvučne ekstrakcije se kreće od 0,712 ppm u uzorku 1 pa sve do 0,890 ppm za uzorak 3. Sadržaj nikla u ultrazvučnim ekstraktima se kreće 0,020 za uzorak 1, pa sve do 0,023 ppm za uzorak 3. Sadržaj cinka u ultrazvučnim ekstraktima se kreće od 0,488 ppm za uzorak 1 pa sve do 0,557 ppm za uzorak 3. Sadržaj bakra u ekstraktima dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom je 0,125 ppm za uzorak 1 i raste, tako da za uzorak 3 iznosi 0,176 ppm. Sadržaj bakra dobijen iz ekstrakata primjenom ove metode najpribližnji je sadržaju bakra dobijenom metodom Soxhlet ekstrakcije.

Sadržaj mangana je u ultrazvučnim ekstraktima raste od 0,147 ppm u uzorku 1 i raste do 0,263 ppm za uzorak 3. Sadržaj olova se kreće od 0,055 ppm u ekstraktu iz uzorka 1, preko 0,084 ppm za ekstrakt uzorka 2, do 0,135 ppm u ultrazvučnom ekstraktu uzorka 3. Kao i u svim prethodnim metodama može se utvrditi da zagađenost svakog elementa raste u ultrazvučnim ekstraktima sa prvog, preko drugog, i trećeg biljnog uzorka. Hrom i kadmijum su bili takođe ispitivani, ali su njihove koncentracije bile ispod granice detekcije instrumenta.

Rastvorljivost teških metala za metodu ultrazvučne ekstrakcije iznose: cink 39,78%, bakar 22,07%, nikal 21,87%, mangan 33,50%, olovo 21,66%, gvožđe 25,23%.

#### 4.7. Korelaciona analiza rezultata

U ovom master radu korišćena je korelaciona analiza kao metoda statističke analize. Korelaciona analiza je vršena između koncentracija metala u plodu kleke i sadržaja metala u ekstraktima dobijenim primjenjenim tehnikama ekstrakcije (infuz, maceracija, Soxhlet ekstrakcija i Ultrazvučna ekstrakcija).

Korelaciona analiza je rađena da se procijeni veza između dvije ispitivane promjenljive - varijable, pri čemu koeficijenti korelacije mogu biti pozitivni i negativni. Veza između dvije ispitivane promjenljive je veća što je koeficijent korelacije bliži broju 1 a kada je koeficijent korelacije bliži broju 0, veza između dvije promjenljive ne postoji ili je veoma slaba (Kara, 2009).

U tabeli 2 prikazani je stepen korelacije ukupnog sadržaja metala u plodu kleke i ekstrahovanih metala različitim metodama ekstrakcije.

Tabela 2. Stepen korelacije sadržaja metala u plodu kleke i ekstrahovanih metala različitim metodama ekstrakcije

Metal	Infuz ekstrakt	Macerat	Soxhlet ekstrakt	UZ ekstrakt
Zn	r=0.79355	r=0.971441	r=0.915161	r=0.825644
Cu	r=0.913724	r=0.896336	r=0.865347	r=0.99091
Ni	r=0.920443	r=0.829988	r=0.939665	r=0.829988
Mn	r=0.978453	r=0.9914	r=0.995017	r=0.999754
Pb	r=0.951206	r=0.99197	r=0.978357	r=0.962759
Fe	r=0.911411	r=0.99798	r=0.924161	r=0.970071

Iz tabele 2 uočeno je da je korelacija između svih ispitivanih metala i ekstrahovanih metala u svim ekstraktima veoma jaka ( $r > 0.91$ ), pri čemu je korelacioni faktor kod veze Zn-Infuz ekstrakt  $r=0.79355$ , Zn-UZ ekstrakt  $r=0.825644$ , Cu-macerat  $r=0.896336$ , i Cu-UZ ekstrakt  $r=0.829988$ .

#### 4.8. Poređenje rezultata sa literaturnim podacima iz drugih studija

Pretragom literature utvrđeno je da zakonska regulativa i generalne granice za sadržaj u medicinskim biljkama (čajne droge) nisu precizno definisane. Postoje samo opšta pravila, donešena od nekih institucija, koja regulišu ovu problematiku. Tako, Evropski farmaceutski standard (Ph. Eur Focus) propisuje dozvoljene sadržaje olova i kadmijuma za čajne droge: 10 mg/kg (10 ppm) i 4 mg/kg (4 ppm), redom. Njemačka asocijacija farmaceutskih proizvođača (BAH) propisala je dozvoljene koncentracije metala u ovim biljkama:

- Za olovo 10 mg/kg (10 ppm);
- Za kadmijum 1 mg/kg (1ppm);
- Za bakar 40 mg/kg (40 ppm).

Treba napomenuti da pH zemljišta ima značajnu ulogu pri apsorpciji olova u bilj, pri čemu se iz kiselih zemljišta usvaja znatno veća količina olova. Međutim, osjetljivost pojedinih biljnih vrsta na veće koncentracije olova je različita (Kastori, 1995). Prema dobijenim rezultatima iz svih tabela u ovom radu, zaključuje se da sadržaj olova ne prelazi dozvoljen sadržaj koji propisuje Ph. Eur Focus i BAH.

Grupa istraživača koja se bavila ovim problemom na našem području i isključivo radila sa žalfijom došla je do sljedećih rezultata (Brkić i sar., 1999; Veličković, 2003):

- Sadržaj olova u žalfiji je značajno varirao, i to više kod samoniklih nego kod gajenih;
- Pod normalnim smatra se sadržaj olova od 5 – 10 ppm, dok su vrijednosti od 30 – 300 ppm toksične. Iz prirodne flore nađen je samo jedan uzorak i to u Petrovcu na moru sa sadržajem od 33,4 ppm olova;
- Ostali uzorci imali su daleko ispod 10 ppm, gdje je prosječan sadržaj Pb kod spontane flore iznosio 7,4 ppm, a kod gajene žalfije 3,5 ppm.

Prema dobijenim rezultatima iz metoda koje su rađene u ovom radu, uočava se da je sadržaj olova u granicama dozvoljenog, tj. ne prelazi vrijednosti prosječnog sadržaja olova u spontanoj flori prema literaturnim podacima (7,4 ppm). Jugoslovenski pravilnik o kvalitetu čajeva (SL list SRJ br. 68. 1993), propisuje da kivanjem ili potapanjem biljne sirovine dobijeni ekstrakt može imati sadržaj Pb do 2 mg/kg (2ppm). Olovo koje je ispitivano u uzorcima u ovom radu, takođe ne prelazi dozvoljeni sadržaj koji propisuje Jugoslovenski pravilnik o kvalitetu čajeva.

Zagađivanje biljaka bakrom uzrokovano je primjenom bakarnih fungicida, naročito u slučajevima kad se ne poštuje kadenca, odnosno vrijeme koje mora proteći od primjene pesticida do upotrebe biljke. Njegova toksičnost se najviše ogleda na dejstvo mikroorganizama zato se koristi kao fungicid, a zna se da se soli bakra (oksidloridi i sulfati) same ili u mješavini sa drugim jedinjenjima koriste kao fungicidi. Međutim, uprkos njegovoj širokoj primjeni akutna trovanja

ovim supstancama nemaju većeg značaja, najčešće trovanja nastupaju prilikom oralnog unošenja rastvora bakar-sulfata. Pri tome, obično ne dolazi do sistemskih oštećenja, jer se najveći dio unijetog bakra odstrani povraćanjem koje nastupa odmah poslije unošenja otrova. Intezitet usvajanja bakra od strane biljke u najvećoj mjeri zavisi od koncentracije ovog metala u spoljašnjoj sredini. Na usvajanje bakra mogućnost uticanja ima prisustvo ostalih jona, pogotovo ako se u spoljašnjoj sredini nalaze u većoj koncentraciji. Biljke brže usvajaju bakar u obliku helatnog kompleksa nego u vidu jona (Blagojević, 2003). Prisustvo Pb u nekim biljnim uzorcima izaziva zabrinutost. Potrošnja materijala sa jednakim količinama Pb i drugih potencijalno toksičnih metala treba da bude regulisana, jer ovi metali imaju tendenciju da se postepeno bioakumuliraju u ljudskim tkivima (Carter, 2017).

U pogledu sadržaja bakra u žalfiji utvrđeni su uobičajeni nivoi ovog elementa u biljci. Njemačka asocijacija farmaceutskih proizvođača propisala je dozvoljenu koncentraciju za bakar za čajne droge 40 ppm, dok se u literaturnim podacima sadržaj bakra kreće kod samonikle flore od 5-17 ppm. Prema dobijenim rezultatima iz svih tabela u ovom radu, zaključuje se da sadržaj bakra ne prelazi dozvoljen sadržaj koji propisuje Ph. Eur Focus i BAH.

Cink je metal niske toksičnosti. Veliko nakupljanje metala može dovesti do nedostatka cinka u organizmu čovjeka. Cink ulazi u sastav enzimskih sistema i zahvaljujući tome, posredno ili neposredno utiče ili učestvuje u procesima disanja, metabolizma proteina, pa je neophodan za biljke. Na njegovo usvajanje od strane biljke može da utiče u značajnoj mjeri prisustvo drugih katjona, kao i ekološki činioci. Posebno se ističe temperatura. Smanjenjem temperature zemljišta smanjuje se i usvajanje cinka. Prema literaturnim podacima variranja sadržaja cinka nisu velika, a sadržaj cinka se kreće kod žalfije od 25-56 ppm. Sadržaj cinka, kao što je bio slučaj sa olovom i bakrom, ne prelazi dozvoljene granične vrijednosti za metode primjenjivane u ovom radu.

Na sadržaj gvožđa u velikoj mjeri utiče sadržaj rastvorljivih oblika ovih elemenata u zemljištu, takođe i pH vrijednosti zemljišta, kao i drugi faktori. Pretpostavlja se da su izvori zagađivanja biljnih vrsta i zemljišta gvožđem iz drumskog saobraćaja proizvodi korozije metalnih dijelova motornih vozila. Biljke mogu da usvajaju cijeli kompleks Fe-helata, kao i produkte njegovog razlaganja. Koju će od ove dvije mogućnosti biljke da koriste, zavisi od vrijednosti pH sredine, stepena obezbjeđenosti biljaka gvožđem, vrste helatnog kompleksa. Na usvajanje gvožđa utiče veliki broj faktora spoljašnje sredine. Visoka vrijednost pH sredine, povećan sadržaj fosfata i kadmijumovih jona smanjuju njegovo usvajanje u hranljivoj sredini. Ako dolazi do povećane vrijednosti pH dobre aeracije, dolazi do oksidacije  $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$  i taloženja Fe (III)-soli. Sadržaj gvožđa u suvoj materiji biljnih vrsta varira u širokom opsegu, od 50 do 1000 ppm.. U lišću ima najviše gvožđa, kada su u pitanju nadzemni organi. (Blagojević, 2003; ISO 9909, 1997). Sadržaj gvožđa, kao i za sve prethodno navedene elemente, na osnovu podataka iz svih tabela u ovom master radu ne prelazi dozvoljene granične vrijednosti za metode koje su ispitivane.

Uloga mangana u fiziološko-biohemijskim procesima biljaka zasniva se na njegovom visokom redoks-potencijalu i mogućnosti promjene valentnosti. Na osnovu njegove uloge u prometu materija biljke, s pravom se ubraja u teške metale najznačajnije u životu biljke. Količina



aktivnog mangana je utoliko veća ukoliko su redoks-potencijal i vrijednost pH zemljišta manji, tj. što su uslovi za redukcijske procese povoljniji. Mangan se adsorbira na površini korijena, odnosno u “prividno slobodnom prostoru” korijena, a zatim se aktivno, zavisno od metaboličkog procesa, prenosi u unutrašnjost ćelije (Blagojević, 2003).

Sadržaj mangana kod samonikle žalfije se prema literaturnim podacima kreće od 20 do 40 ppm (sa prosječnom vrijednošću od 35 ppm) (ISO 9909, 1997). Dakle, ni mangan koji je ispitivan u uzorcima iz ovog rada nije prisutan u koncentracijama većim od propisima dozvoljene.

U istraživanju (Abu-darwish & Ofir, 2014) ispitivan je sadržaj teških metala u plodu i ekstraktima biljne vrste *Juniperus phoenicea* L., koji su uzorkovani sa 2 staništa. Koncentracija metala u ekstraktima sa prvog staništa iznose: gvožđe 4,44-9,25 ppm, bakar 0,46-0,86 ppm, cink 0,60-10,01 ppm, mangan 2,84-10,01 ppm, olovo <0,01. Koncentracija metala u ekstraktima sa drugog staništa iznose: gvožđe 1,81-3,45 ppm, bakar 0,93-1,11 ppm, cink 0,32-0,34 ppm, mangan 4,19-4,53 ppm, olovo <0,01. Koncentracija metala u plodu sa prvog staništa iznose: gvožđe 168,07 ppm, mangan 11,29 ppm, cink 40,71 ppm, 31,51 ppm, olovo nije detektovano. Koncentracija metala u plodu sa drugog staništa iznose: gvožđe 190,11 ppm, mangan 6,60 ppm, cink 13,72 ppm, bakar 71,86 ppm, olovo nije detektovano. Na osnovu upoređivanja sadržaja teških metala, zaključuje se da je sadržaj teških metala iz ovog master rada znatno manji u odnosu na sadržaj teških metala iz gore navedene studije, i u plodu i u ekstraktima, osim u slučaju olova koje nije detektovano u pomenutom istraživanju.

U istraživanju Severoglu i saradnika (2015) biljna vrsta *Juniperus virginiana* L. je bila podvrgnuta ispitivanju na teške metale, zbog velike urbanizacije i industrijalizacije grada Biškeka, Kirgistan. Prosječne najveće i najniže akumulacije olova u dijelovima biljke sa više lokacija bile: su 26,58 mg/kg i 11,93 mg/kg; za gvožđe 227,94 mg/kg i 136,97 mg/kg; za mangan 19,28 mg/kg i 11,29 mg/kg; za cink 84,32 mg/kg i 17,53 mg/kg; za bakar koji je ispitivan u zemljištu na više lokacija prosječne najveće i najniže akumulacije od strane *Juniperus virginiana* L. bile su 66,38 mg/kg i 44,83 mg/kg. Na osnovu upoređivanja koncentracija metala, zaključuje se da je koncentracija metala iz ovog master rada znatno manja u odnosu na sadržaj teških metala iz gore navedene studije.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju vršene su ekstrakcije ploda kleke, sa teritorije Crne Gore, različitim tehnikama sa ciljem određivanja esencijalnih i toksičnih metala metodom AAS. Ekstrakcije koje su korišćene su maceracija, Soxhlet ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija vreloom vodom. Sadržaj metala u ispitivanim uzorcima kleke, kao biljnom materijalu, opada u nizu Fe>Zn>Mn>Cu>Pb>Ni. Najviše sadržaja od svih ispitivanih elemenata u uzorcima kleke ubjedljivo ima gvožđe, dok najmanji sadržaj od svih ispitivanih elemenata ima nikal. Kadmijum i hrom su bili ispitivani pri svakoj od gore navedenih metoda, ali nisu detektovani ni pri jednoj od njih, samim tim nisu uvrštani u rezultate. Posle gvožđa, cink i mangan su prisutni u značajnoj mjeri u ispitivanim uzorcima, bakra i olova takođe ima poprilično, ali dosta manje u odnosu na mangan i cink, dok je nikl skoro u svakoj metodi prisutan u veoma malim količinama.

Metode mokre digestije i mineralizacije su prije metoda ekstrakcija korišćene kako bi se utvrdilo koliko ukupno uzorka ima u plodu biljke. Nakon njih, upotrijebljene su metode ekstrakcije pomoću kojih se izvlači koncentracija teških metala, na osnovu prve dvije metode. Rezultati su za metodu mokre digestije pokazali sledeće: cink se kreće od 1,148 do 1,613 ppm; bakar od 0,543 do 0,801 ppm; nikal od 0,106 do 0,119 ppm; mangan od 0,516 do 0,670 ppm; olovo od 0,372 do 0,557 ppm, gvožđe od 2,540 do 4,435 ppm. Za metodu mineralizacije rezultati su pokazali sledeće: cink se kreće od 1,070 do 1,254 ppm; bakar od 0,562 do 0,792 ppm; nikal od 0,070 do 0,090 ppm; mangan od 0,499 do 0,657 ppm; olovo od 0,350 do 0,490 ppm; gvožđe od 2,340 do 4,255 ppm.

Rezultati za metode ekstrakcije su pokazali - Soxhlet ekstrakcija: cink se kreće od 0,485 do 0,503 ppm; bakar od 0,185 do 0,210 ppm; nikal od 0,035 do 0,046 ppm; mangan od 0,162 do 0,260 ppm; olovo od 0,063 do 0,142 ppm; gvožđe od 0,987 do 1,766 ppm; za maceraciju: cink se kreće od 0,115 do 0,154 ppm; bakar od 0,010 do 0,071 ppm; nikal od 0,028 do 0,030 ppm; mangan od 0,130 do 0,215 ppm; olovo od 0,024 do 0,045 ppm; gvožđe od 0,530 do 0,692 ppm; za ekstrakciju vreloom vodom (infuz): cink se kretao od 0,152 do 0,181 ppm, bakar od 0,033 do 0,043 ppm, nikal od 0,006 do 0,008 ppm, mangan 0,144 do 0,255 ppm, olovo od 0,035 do 0,123 ppm, gvožđe od 0,547 do 0,709 ppm; za ultrazvučnu ekstrakciju: cink se kretao od 0,488 do 0,557 ppm, bakar od 0,125 do 0,176 ppm, nikal od 0,020 do 0,023 ppm, mangan od 0,147 do 0,263 ppm, olovo od 0,055 do 0,135 ppm, gvožđe od 0,712 do 0,890 ppm.

Rastvorljivost metala za metode ekstrakcije iznosile su: za Soxhlet ekstrakciju: cink 38, 15 %, bakar 28,50 %, nikal 41,66 %, mangan 35,40 %, olovo 23,09 %, gvožđe 41,24 %; za maceraciju: cink 10,37 %, bakar 5,11 %, nikal 30,20 %, mangan 29,01 %, olovo 7,61 %, gvožđe 18,76 %; za ekstrakciju vreloom vodom (infuz): cink 12,53 %, bakar 5,40 %, nikal 7,29 %, mangan 31,43 %, olovo 18,09 % i gvožđe 18,91 %; za ultrazvučnu ekstrakciju: cink 39,78 %, bakar 22,07 %, nikal 21,87 %, mangan 33,50 %, olovo 21,66 %, gvožđe 25,23 %.

Najveću zagađenost imaju uzorci biljnog materijala koji su prikupljeni u okolini Termoelektrane Pljevlja, prvenstveno zbog emitovanja zagađujućih i štetnih materija koje biljka

akumulira i apsorbuje u svoje podzemne i nadzemne dijelove. Uzorci prikupljeni u okolini magistralnog puta imaju sljedeću najveću zagađenost posle uzoraka u blizini termoelektrane.

Može se konstatovati da ekstrakti dobijeni pomoću metode Soxhlet ekstrakcije imaju veću koncentraciju metala u poređenju sa druge tri metode ekstrakcije, zbog dužeg vremena ekstrakcije i više temperature rastvarača.

Korelaciona analiza pokazuje veoma jak i jak stepen korelacije između ispitivanih metala u plodu kleke sa različitim lokacija i metoda ekstrakcije primjenjenih u ovom master radu.

Ovo istraživanje je pokazalo da kleka može u značajnoj mjeri da apsorbuje teške metale kada se nalazi u zagađenoj sredini u kojoj se ispuštaju štetne materije i supstance. Generalno, posebno na našim prostorima veliki je deficit studija o ovoj biljnoj vrsti, koja ima mnogobrojne koristi i blagodeti za čovječanstvo od davnina. Dalja istraživanja mogu se usmjeriti na određivanje i praćenje koncentracija metala u različitim biljnim organima ove vrste, kao i uticaju vegetativnog ciklusa biljke na sadržaj teških metala.

## LITERATURA

1. Ackova D. G. (2018). Heavy metals and their general toxicity on plants. *Plant Science Today*, 5(1):14-18.
2. Atanasova L., Popov G., Pissarska M. (2001). Physiological characteristics of conifer (*Juniperus communis* L.) plants, growing on metalliferous site. *Forest Research Institute*. 2:216-221.
3. Atanasova L., Pissarska M., Popov G., Georgiev G. (2004). Growth and endogenous cytokinins of juniper shoots as affected by high metal concentrations. *Biologia Plantarum*. 48:157-159.
4. Azwanida, N.N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal and aromatic plants*, 4(3): 1-6.
5. Abu-Darwish M.S., Rivka O. (2014). Heavy metals content and essential oil yield of *Juniperus phoenicea* L. in different origins in Jordan. *Environmental Engineering and Management Journal*, 13(12): 3009-3014.
6. Abualhasan M. N., Nidal J., Mohammed H., Rama K., Eman K., Malak E., Al-Atrash M. (2020). Evaluation of heavy metal and microbial contamination in green tea and herbal tea used for weight loss in the Palestinian market. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020:7631562.
7. Arslan Z. (2020). Determination of metals in tree rings by ICP-MS using ash from a direct mercury analyzer. *Molecules Journal*, 25(9): 1-11.
8. Brekken A., Steinnes E. (2004). Seasonal concentrations of cadmium and zinc in native pasture plants: consequences for grazing animals. *Science of The Total Environment*. 326:(1-3), 181-195.
9. Borisov G. A. (2008). Heavy metal pollution in the Boatin reserve (Bulgaria). *Turkish Journal of Botany*, 32(2): 155-160.
10. Belsky A. J. (1996). Viewpoint: Western Juniper Expansion: Is It a Threat to Arid Northwestern Ecosystems? *Journal of Range Management*, 49(1): 53–59.
11. Bombaci S., Pejchar L. (2016). Consequences of pinyon and juniper woodland reduction for wildlife in North America. *Forest Ecology and Management*, 365: 34–50.
12. Binxhija L., Ylli A. (2021). Medical plants in different soils with heavy metals, *International Journal of Ecosystems and Ecology Science (IJEES)*, 11(3): 501-506.
13. Bini C., Maleci L., Wahsha M. (2017). Potentially toxic elements in serpentine soils and plants from Tuscany (Central Italy). A proxy for soil remediation. *CATENA*. 148(1): 60-66.
14. Blagojević B. (2003). Zagađena životna sredina i ljekovite bilje, Monografija, Fakultet zaštite na radu, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija.

15. Brkić D., Mihajlov M., Dražić S. (1999). Žalfija (*Salvia officinalis* L.), Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd, Srbija.
16. Blagojević N., Damjanović-Vratnica B., Vukašinović-Pešić V., Đurović D. (2009). Heavy metals content in leaves and extracts of wild-growing *Salvia officinalis* from Montenegro. Polish Journal of Environmental Studies. 18(2):167-173.
17. Bundesverband der Arzneimittel – Hersteller e. V., German Medicines Manufacturers Association, BAH. <https://www.bah-bonn.de/en/bah-bundesverband-der-arzneimittel-hersteller-ev/> (Pristupljeno: 11.12.2023.)
18. Crnkić A., Čatović B., Mazalović M., Micević S. (2009). Area of lead distribution in urban and rural soils in the region of Tuzla. Journal of environmental protection and ecology. 10 (4): 926-935.
19. Cheng S. (2003). Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. A state-of-the-art report with special reference to literature published in Chinese journals. Environmental science and pollution research international, 10(4): 256-64.
20. Chamber J.C., Vander Wall S.B., Schupp E.W. (1999). Seed and seedling ecology of pinon and juniper species in the pygmy woodlands of western North America. The Botanical Review, 65 (1): 1–38.
21. Cruz J. R. F., Ferreira R. L. C., Conceicao S. S., Lima E. U., Neto C. F. O., Galvao J. R., Lopes S. C., Viegas I. J. M. (2022). Copper toxicity in plants: nutritional, physiological, and biochemical aspects. Advances in Plant Defense Mechanism, IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.105212.
22. Chemistry. Stack Exchange. (2019). Why should AAS use element lamps? <https://chemistry.stackexchange.com/q/115895>.
23. Cao S., Xiaoli D., Xiuge Z., Jin M., Ting D., Nan H., Chengye S., Bin H., Fusheng W. (2014). Health risks from the exposure of children to As, Se, Pb and other heavy metals near the largest coking plant in China. The Science of the total environment, 472: 1001-9.
24. Carter KN (2017). The effects of bioaccumulation on the ecosystem. Sciencing [Internet]. <http://sciencing.com/effects-bioaccumulation-ecosystem-13721.html>.
25. Drinić Z. (2020). Ekstrakcija industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.), Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.
26. Dragović-Uzelac V. (2016). Nastavni materijal iz modula Začinsko i aromatsko bilje, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
27. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, European Pharmacopoeia Focus. <https://www.edqm.eu/en/focus> (Pristupljeno: 11.12.2023.)
28. Fuentes D., Disante K. B., Valdecantos A., Cortina J., Vallejo V. R. (2007). Sensitivity of Mediterranean woody seedlings to copper, nickel and zinc. Chemosphere, 66(3): 412-420.

29. Till F., Collin B., Angeletti B., Santaella C., Dentant C., Chaurand P., Levard C., Gonneau C., Borschneck D., Rose J. (2022). Uptake patterns of critical metals in alpine plant species growing in an unimpaired natural site. *Chemosphere*, 287(4): 1323-1335.
30. Fahr M., Laplaze L., Bendaou N., Hocher V., El - Mzibri M., Bogusz D., Smouni A. (2013). Effect of lead on root growth. *Frontiers in Plant Science*, 4: 175.
31. Ferenčak M. (2012). Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta, Diplomski rad, Fakultet Hemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
32. Grbić M. (2003). Dormantnost i klijanje semena – mehanizmi, klasifikacije i postupci, *Glasnik Šumarskog fakulteta*, 87: 25-49.
33. Gallo T., Stinson L. T., Pejchar L. (2016). Pinyon-juniper removal has long-term effects on mammals. *Forest Ecology and Management*, 377: 93–100.
34. Gupta A., Naraniwal M., Kothari V. (2012) Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 1(1): 8-26.
35. Hampe A., Petit R. (2010). Cryptic forest refugia on the roof of the world. *New Phytologist*, 185(1): 5–7.
36. Hassan M. U., Chattha M. U., Khan I., Chattha M. B., Aamer M., Nawaz M., Ali A., Khan M. A. U., Khan T. A. (2019). Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 12673-12688.
37. Handa S., Khanuja S.P., Longo G., Rakesh D.D. (2008). Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International centre for science and high technology. UNIDO, 21-25.
38. ISO 9909, 1997. International Organization for Standardization, Oil of Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.).
39. Khan S., Cao Q., Zheng Y. M., Huang Y. Z., Zhu Y. G. (2008). Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environmental Pollution*, 152(3): 686-692.
40. Kebir T., Bouhadjera K. (2011). Effects of Heavy Metals Pollution in Soil and Plant in the Industrial Area, West ALGERIA. *Journal of Korean Chemical Society*, 55(6): 1018-1023.
41. Kimakova T., Vargova V., Onačillova E., Cimbolakova I., Uher I., Harich P., Schuster J., Poračova J. (2020). Mercury accumulation in plants from contaminated arable lands in Eastern Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 27(1): 29-35.
42. Kurbaniyazov B.T., Saitova A.K., Kholova Sh. A., Safarov A.K., Safarov K.S. (2021). Features of contamination of trees and shrubs with heavy metals in the conditions of Nukus. *Psychology and education*. 58(2): 5733-5738.

43. Kastori R. (1983). Uloga elemenata u ishrani biljaka, Matica Srpska, Novi Sad, Srbija.
44. Kastori R. (1995). Zaštita agroekosistema, Feljton, Novi Sad, Srbija.
45. Kadović R., Knežević M. (2002). Teški metali u šumskim ekosistemima Srbije, Fakultet za šumarstvo, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.
46. Kaur H., Garg N. (2021). Zinc toxicity in plants: a review. *Planta*, 253(6) :129.
47. Kušan F. (1967). Ljekovito i drugo korisno bilje, Farmaceutsko-biohemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
48. Kara D. (2009). Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis, *Food Chemistry*, 114: 347-354.
49. Liu T., Zhang M., Wang Y., Tang L., Wang K., Shi F. (2021). The effect of different cleaning methods on needles for assessing the atmospheric heavy metal retention capacity of three coniferous trees. *Applied Sciences*, 11(4): 1668.
50. Luque de Castro M.D., Priego-Capote F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217: 2383-2389.
51. Mussina A. S., Baitasheva G. U., Kurmanbayeva M. S., Medeuova G. J., Maury A. A., Imanova E. M., Kurasbeva A. Z., Rachimova Z. S., Nurkeyev Y. S., Orazbayev K. (2018). Anatomical and morphological changes of the juniper under the influence of heavy metals in condition of man-induced load. *Israel Journal of Ecology and Evolution*, 64(1): 35-43.
52. Manwani S., Vanisree C.R., Jaiman V., Awasthi K. K., Yadav C. S., Sankhla M. S., Pandit P. P., Awasth G. (2022). Heavy metal contamination in vegetables and their toxic effects on human health. In book: *Sustainable Crop Production - Recent Advances* (Edited Meena V.S., Choudhary M., Yadav R.P., Meena S.K., Eds.), IntechOpen, 1-17.
53. Miller R. F., Svejcar T. J., Rose J. A. (2000). Impacts of western juniper on plant community composition and structure. *Journal of Range Management*, 53(6): 574–585.
54. Millaleo R., Reyes-Diaz M., Ivanov A. G., Mora M. L., Alberdi M. (2010). Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(4): 470-481.
55. Mišović J. i Ast T. (1994). Instrumentalne metode hemijske analize, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.
56. Nas F. S. i Ali M. (2018). The effect of lead on plants in terms of growing and biochemical parameters. *MOJ Ecology i Environmental Sciences*, 3(4): 265–268.
57. Ogren T. (2015). *The Allergy-Fighting Garden*. Berkeley, CA: Ten Speed Press, 131–133.
58. Osuna-Vallejo V., Saenz-Romero C., Escalera-Vasquez L., Barrera E., Lindig-Cisneros R. (2019). Total mercury in plant tissue from a mining landscape in western Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 19-24.

59. Paska M., Simonova I., Galuch B., Basarab I., Masliichuk O. (2017). Toxic elements in lentil, thyme and juniper in the composition of semi-smoked sausages using the method of Atomic-Absorption Spectrometry with atomization in flame. *EUREKA: Life Sciences*, 35-42.
60. Popsavin M., Vukojević N., Hranisavljević J. i sar. (2018). Praktikum iz hemije prirodnih proizvoda, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.
61. Poljarec K. (2017). Proizvodnja biljnih ekstrakata, Prehrambeno-biotehnički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
62. Pravilnik o kvalitetu čaja, mješavina čaja i instant čaja (1993). SL. List SRJ br. 68.
63. Rashed M. N. (2010). Monitoring of contaminated toxic and heavy metals, from mine tailings through age accumulation, in soil and some wild plants at southeast Egypt. *Journal of Hazardous Materials*, 178(1-3): 739-746.
64. Rawat Y. S. i Everson C. S. (2012). Ecological status and uses of juniper species in the cold desert environment of the Lahaul valley, North-western Himalaya, India. *Journal of Mountain Science*, 9(5): 676–686.
65. Shen X., Yongkuan C., Xiong K. (2019). The effect of heavy metal contamination on humans and animals in the vicinity of a zinc smelting facility. *PLOS ONE*, 14(10):e0207423. doi: 10.1371/journal.pone.0207423.
66. Sayadi M. H. i Rezaei M. R. (2014). Impact of land use on the distribution of toxic metals in surface soils in Birjand city, Iran. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 4(1): 18-29.
67. Souri M. K., Mansoure H., Tsehaye T. (2019). Plant growth stage influences heavy metal accumulation in leafy vegetables of garden cress and sweet basil. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 25(6).
68. Sevik H., Cetin M., Uzun - Ozel H., Ozel H. B., Mossi M. M. M., i Zeren - Cetin I. (2020). Determination of Pb and Mg accumulation in some of the landscape plants in shrub forms. *Environmental Science and Pollution Research*, 2423-2431.
69. Sawidis T., Chettri M. K., Papaioannou A., Zachariadis G., Stratis J. (2001). A study of metal distribution from lignite fuels using trees as biological monitors. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 27-35.
70. Severoglu Z., Ozyigit I. I., Dogan I., Kurmanbekova G., Demir G., Yalcin I. E., Kari G. K. (2015). The usability of *Juniperus virginiana* L. as a biomonitor of heavy metal pollution in Bishkek City, Kyrgyzstan. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 1104-1112.
71. Samanidou V. (2020). Extraction Techniques in Sample Preparation. In *Encyclopedia*.
72. Singh J.P. (2007). Maceration, percolation and infusion techniques of extraction of medicinal and aromatic plants (MAPs).



73. Stanković M. (2016). Ultrazvučna ekstrakcija fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti ekstrakata maline, Master rad, Prirodno – matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš, Srbija.
74. Savić Lj. (2014). Metode ekstrakcije biljnih materijala: Uporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida, Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, Beograd, Srbija.
75. Twyman R. M. (2005). Encyclopedia of analytical science, University of York, York, UK.
76. Veličković D. (2003). Vrsta roda žalfije – hemijski sastav i antimikrobno djelovanje, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.
77. Zahra N., Hafeez M. B., Shaukat K., Wahid A., Hasanuzzaman M. (2021). Iron toxicity in plants: Impacts and remediation. *Physiologia Plantarum*, 173(2).
78. Zhang Q.W., Lin L.G., Ye W.C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1): 20.

## PRILOG

**Tabela 3.** Sadržaj teških metala u uzorcima ploda kleke dobijenih metodom mokre digestije

Uzorak	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Ni (ppm)	Mn (ppm)	Pb (ppm)	Fe (ppm)
Uzorak 1	1,148	0,543	0,106	0,516	0,372	2,540
Uzorak 2	1,538	0,739	0,113	0,557	0,390	2,586
Uzorak 3	1,613	0,801	0,119	0,670	0,557	4,435

**Tabela 4.** Sadržaj teških metala u uzorcima ploda kleke dobijenih metodom mineralizacije

Uzorak	Zn	Cu	Ni	Mn	Pb	Fe
Uzorak 1	1,070	0,562	0,070	0,499	0,350	2,340
Uzorak 2	1,133	0,672	0,080	0,579	0,365	2,652
Uzorak 3	1,254	0,792	0,090	0,657	0,490	4,255

**Tabela 5.** Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom pripremom infuza

Uzorak	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Ni (ppm)	Mn (ppm)	Pb (ppm)	Fe (ppm)
Uzorak 1	0,152	0,033	0,006	0,144	0,035	0,547
Uzorak 2	0,155	0,036	0,007	0,179	0,070	0,627
Uzorak 3	0,181	0,043	0,008	0,225	0,123	0,709

**Tabela 6.** Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom maceracije

Uzorak	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Ni (ppm)	Mn (ppm)	Pb (ppm)	Fe (ppm)
Uzorak 1	0,115	0,010	0,028	0,130	0,024	0,530
Uzorak 2	0,134	0,026	0,029	0,161	0,027	0,543
Uzorak 3	0,154	0,071	0,030	0,215	0,045	0,692

**Tabela 7.** Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom Soxhlet ekstrakcije

Uzorak	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Ni (ppm)	Mn (ppm)	Pb (ppm)	Fe (ppm)
Uzorak 1	0,485	0,185	0,035	0,162	0,063	0,987
Uzorak 2	0,491	0,190	0,041	0,195	0,087	1,350
Uzorak 3	0,503	0,210	0,046	0,260	0,142	1,766

**Tabela 8 .** Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom ultrazvučne ekstrakcije

Uzorak	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Ni (ppm)	Mn (ppm)	Pb (ppm)	Fe (ppm)
Uzorak 1	0,488	0,125	0,020	0,147	0,055	0,712
Uzorak 2	0,499	0,153	0,021	0,173	0,084	0,772
Uzorak 3	0,557	0,176	0,023	0,263	0,135	0,890

## POPIS SLIKA

<b>Slika 1.</b> Akumulacija teških metala od strane biljaka.....	19
<b>Slika 2.</b> Plod kleke ( <i>Juniperus communis</i> ) .....	22
<b>Slika 3.</b> Kleka na području Durmitora.....	23
<b>Slika 4.</b> <i>Juniperus conferta</i> .....	24
<b>Slika 5.</b> Primjer ploda vrste <i>Juniperus oxycedrus</i> .....	24
<b>Slika 6.</b> Sjeme šišarke vrste <i>Juniperus drupacea</i> .....	25
<b>Slika 7.</b> Plod vrste <i>Juniperus phoenicea</i> .....	25
<b>Slika 8.</b> Soxhlet aparatura.....	32
<b>Slika 9.</b> Aparat za ultrazvučnu ekstrakciju .....	33
<b>Slika 10.</b> Dobijanje pepela u postupku mineralizacije .....	38
<b>Slika 11.</b> Soxhlet aparatura.....	39
<b>Slika 12.</b> Ultrazvučno kupatilo.....	41
<b>Slika 13.</b> Šematski prikaz atomskog apsorpcionog spektroskopa .....	44

## POPIS TABELA

<b>Tabela 1.</b> Koordinate mjesta uzorkovanja ploda kleke .....	34
<b>Tabela 2.</b> Stepem korelacije sadržaja metala u plodu kleke i ekstrahovanih metala različitim metodama ekstrakcije.....	54
<b>Tabela 3.</b> Sadržaj teških metala u uzorcima ploda kleke dobijenih metodom mokre digestije.....	67
<b>Tabela 4.</b> Sadržaj teških metala u uzorcima ploda kleke dobijenih metodom mineralizacije .....	67
<b>Tabela 5.</b> Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom pripremom infuza.....	67
<b>Tabela 6.</b> Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom maceracije .....	67
<b>Tabela 7.</b> Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom Soxhlet ekstrakcije .....	67
<b>Tabela 8.</b> Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom ultrazvučne ekstrakcije.....	68

## POPIS GRAFIKONA

<b>Grafikon 1.</b> Sadržaj teških metala u uzorcima ploda kleke dobijenih metodom mokre digestije .....	45
<b>Grafikon 2.</b> Sadržaj teških metala u uzorcima ploda kleke dobijenih metodom mineralizacije.....	47
<b>Grafikon 3.</b> Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom pripremom infuza.....	48
<b>Grafikon 4.</b> Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom maceracije .....	50
<b>Grafikon 5.</b> Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom Soxhlet ekstrakcije .....	51
<b>Grafikon 6.</b> Sadržaj teških metala u ekstraktima ploda kleke dobijenih metodom ultrazvučne ekstrakcije.....	53

## POPIS MAPA

<b>Mapa 1.</b> Mapa lokacije sa koje je uzorkovana biljna vrsta u selu Zabrdje, Pljevalja .....	35
<b>Mapa 2.</b> Mapa lokacije sa koje je uzorkovana biljna vrsta u blizini magistralnog puta ..	35
<b>Mapa 3.</b> Mapa lokacije sa koje je uzorkovana biljna vrsta u okolini Termoelektrane Pljevlja .....	36

