

Bioindikacija onesnaženosti okolja s fluoridi z uporabo čeljusti srnjadi (*Capreolus capreolus* L.): stanje in perspektive

Ida JELENKO¹, Andreja BIENELLI KALPIČ², Boštjan POKORNY³

Izvleček

Zaradi naraščajočih koncentracij fluoridov v okolju in njihove strupenosti so raziskovalci v zadnjih desetletjih razvili različne metode za ocenjevanje vpliva teh onesnažil na žive organizme. Za ugotavljanje izpostavljenosti in vplivov fluoridov na sesalce (predvsem parkljarje) se uporabljajo metode akumulacijske bioindikacije (t.j. določevanje vsebnosti fluoridov v kostnih tkivih, npr. čeljustih) in/ali metode odzivne bioindikacije (npr. makroskopsko določevanje stopnje zobne fluoroze kot specifične morfološke spremembe, ki kaže na vpliv izpostavljenosti fluoridom na tvorbo in razvoj sklenine v času zobne formacije). Primernost čeljusti prostoživečih prežvekovalcev (zlasti srnjadi) kot bioindikatorjev onesnaženosti potrjuje v preteklosti ugotovljeni obstoj močnih pozitivnih soodvisnosti med koncentracijami fluoridov v okolju in: (i) vsebnostjo fluoridov v čeljustih srnjadi/jelenjadi; (ii) stopnjo zobne fluoroze obeh omenjenih vrst. Uporaba čeljusti v bioindikacijske namene je primerna tudi z logističnega in stroškovnega vidika, saj se čeljusti parkljarjev v marsikateri državi sistematično zbirajo z namenom kognitivnega in kontroliranega upravljanja s populacijami. Zaradi tega so dostopne v velikem številu, praviloma z vsemi potrebnimi atributnimi in geografskimi podatki o posameznem uplenjenem osebk. Slednje omogoča izvedbo veliko-površinskih (a prostorsko zelo natančnih), cenovno ugodnih in zanesljivih biomonitoringov onesnaženosti okolja s fluoridi, ki smo jih leta 2008 uvedli tudi v Sloveniji.

Ključne besede: bioindikacija, srnjad, fluoridi, zobna fluoroza, spodnje čeljusti, kočniki

*Bioindication of fluoride pollution by the use of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) mandibles: situation and perspectives*

Abstract

Due to the increasing concentrations of fluorides in the environment, several bioindication methods for assessing the impact of fluoride pollution on living organisms have been developed in the last few decades. Studies of the exposure and impact of fluorides on mammals (primarily ungulates) are performed either as different methods of accumulative bioindication (i.e. determination of fluoride levels in bones, e.g. mandibles) and/or as methods of response bioindication (e.g. macroscopic assessment of the presence and severity of dental fluorosis as a specific morphologic change, which is the consequence of fluorides affecting the formation and development of the enamel in the time of tooth formation). Suitability of ungulates' (particularly roe deer) mandibles as a perfect biomonitoring tool for assessing the fluoride pollution has often been confirmed by the determination of strong positive correlations between fluoride concentrations in the environment and: (i) fluoride levels in mandibles of red/roe deer; (ii) severity of dental fluorosis in both deer species. A high potential of roe deer mandibles for bioindication purposes is stimulated by the fact that lower jaws of ungulates are often (in Slovenia they even must be) systematically collected with the purpose of cognitive management and control. Therefore, huge numbers of mandibles are available in Europe, equipped with all the needed individual (e.g. age, sex, health status) and geographical data (culling location). This enables large-scale (even national-wide, as seen in the case of Slovenia), but nevertheless spatially accurate environmental biomonitoring of fluoride pollution, in a reliable and cost effective way. Such biomonitoring programme started in Slovenia in 2008.

Key words: bioindication, roe deer, fluorides, dental fluorosis, mandible, cheek teeth

¹ I. J.: ERICo Velenje, Inštitut za ekološke raziskave d.o.o., Koroška 58, 3320 Velenje, ida.jelenko@erico.si

² mag. A. B. K.: Potoška vas 23a, 1410 Zagorje

³ doc. dr. B. P.: ERICo Velenje, Inštitut za ekološke raziskave d.o.o., Koroška 58, 3320 Velenje, bostjan.pokorny@erico.si

1 Uvod

1 Introduction

V zadnjih tridesetih letih je veliko pozornosti posvečene naraščanju koncentracij fluoridov v okolju in njihovemu vplivu na žive organizme, predvsem na prostoživeče živali (KARSTAD 1967, KAY 1975, NEWMAN / YU 1976, NEWMAN / MURPHY 1979, SHUPE *et al.* 1984, KIERDORF 1988, 1991, BOULTON / COOKE / JOHNSON 1994, KIERDORF / SHULTZ / KIERDORF 1994, KIERDORF *et al.* 1995, 1996a, 2000, KIERDORF / KIERDORF 2000a, 2000b, KIERDORF / KIERDORF / BOYDE 2000, SEDLÁČEK *et al.* 2001, TATARUCH / KIERDORF 2003). Večina raziskav zadeva prežvekovalce (predvsem družino jelenov – Cervidae), saj se je ta živalska skupina izkazala kot zelo dober bioindikator onesnaženosti okolja s fluoridi (KAY / TOURANGEAU / GORDON 1975, 1976, SUTTIE *et al.* 1987, WALTON / ACKROYD 1988, MACHOY / DABROWSKA / NOWICKA 1991, KIERDORF / KIERDORF / FEJERSKOV 1993, HELL / STANOVSKY / ZILINEC 1995, VIKØREN / STUVE 1996, VIKØREN / STUVE / FRØSLIE 1996, KIERDORF / KIERDORF / SEDLÁČEK 1996, 1999, KIERDORF *et al.* 1996b, 1997, KIERDORF / KIERDORF 1999a, 1999b, 2000a, 2000c, 2000d, 2001a, 2001b, 2002, 2003, 2005, 2006, ZAKRZEWSKA *et al.* 2005, ZEMEK *et al.* 2006, JELENKO / POKORNY 2009, JELENKO / JERINA / POKORNY 2010).

Fluoridi spadajo med nevarne snovi visoke prioritete (ATSDR 2009) in imajo izrazit škodljiv vpliv na živa bitja. Zaradi velike afinitete fluoridnih ionov do povezovanja s kalcijevimi ioni se kronični vplivi izpostavljenosti fluoridom najmočneje kažejo na okostju in zobeh; v slednjih prihaja do motenj v procesu formacije in mineralizacije (FEJERSKOV *et al.* 1994, AOBA / FEJERSKOV 2002, TATARUCH / KIERDORF 2003, BARTLETT *et al.* 2005, PIUS / VISWANATHAN 2008). V evropskem prostoru so bile zato v preteklosti narejene številne raziskave onesnaženosti okolja s fluoridi z uporabo zobovja (čeljusti) različnih vrst sesalcev. Zaradi največje izpostavljenosti (neposreden vnos s hrano rastlinskega izvora) se v primeru fluoridov kot bioindikatorske vrste najpogosteje uporabljajo prežvekovalci, še zlasti srnjad (*Capreolus capreolus* L.), občasno pa tudi jelenjad (*Cervus elaphus* L.) in damjaki (*Dama dama* L.).

Srnjad je ena ključnih vrst kopenskih ekosistemov Evrope, kjer je zaradi svojih ekoloških in sociobioloških značilnosti morda najprimernejša vrsta sesalcev za bioindikacijo onesnaženosti okolja (POKORNY 2003, TATARUCH / KIERDORF 2003). Najpomembnejše značilnosti vrste, ki opredeljujejo njeno veliko primernost za bioindikacijo kakovosti habitatov, so (zbrano v POKORNY 2003): velika sposobnost kopičenja strupenih snovi – posledica prehrane z rastlinskimi vrstami, ki so znane kot zelo dobri bioakumulatorji; pozitivna povezava

med vnosom strupenih snovi v ekosisteme in akumulacijo v tkivih srnjadi; standardizirane vzorčevalne in analitske metode lahko preprosto razvijemo; vrsta ni ogrožena in ima ekološki optimum skoraj povsod v Evropi; teritorialen način življenja z arealom aktivnosti, ki je praviloma bistveno manjši od 100 ha; ekološke in fiziološke značilnosti vrste so dobro poznane; relativno dolga življenjska doba in etično sprejemljivo vzorčenje v sklopu rednega odstrela živali.

Izjemnega pomena je tudi dejstvo, da je srnjad najpomembnejša lovsko-gospodarska vrsta v skoraj vseh evropskih državah (ANDERSEN / DUNCAN / LINNELL 1998). V Evropi je letno uplenjenih prek 2 milijona osebkov srnjadi (APOLLONIO / ANDERSEN / PUTMAN 2010), v Sloveniji pa je vsako leto iz lovišč izločenih (t.j. odstreljenih, povoženih ali kako drugače poginulih) med 35.000 in 45.000 osebkov (LZS 2009, statistični podatki lovskih organizacij iz baze ZGS). Z namenom natančnega evidentiranja in kategorizacije izločenih (uplenjenih) osebkov, vpogleda v njihovo spolno in starostno strukturo ter predvsem kontrole doseganja z lovsko-gojitvenimi načrti zastavljenih planov odzema se v Sloveniji, podobno pa tudi v nekaterih drugih srednjeevropskih državah, vsako leto na t.i. bazenskih pregledih zberejo vse leve spodnje čeljusti prostoživečih parkljarjev (vključno s srnjadjo), ki so bili v preteklem koledarskem letu izločeni iz lovišč. Vsaka posamezna čeljust je na nivoju lovišč označena z zaporedno številko odzema, ki omogoča sledljivost in neposredno povezavo z najpomembnejšimi atributnimi podatki o živali (spol, starost, telesna teža, zdravstveno stanje, datum izločitve, revir, natančna lokacija in kvadrant mesta izločitve). Le-ti so za posamezno lovišče zbrani v Evidenčni knjigi odstrelav velikih vrst divjadi, od leta 2004 dalje pa na državnem nivoju tudi v Osrednjem slovenskem registru velike lovne divjadi in velikih zveri (VIRJENT / JERINA 2004) oz. v elektronskih podatkovnih bazah Lisjak (za lovišča, ki jih upravljajo lovske družine) in X-Lov (za lovišča s posebnim namenom, ki jih upravlja Zavod za gozdove Slovenije).

Zaradi lahke dostopnosti vzorcev, še zlasti pa zaradi nekaterih vsebinskih vzrokov (glej nadaljevanje tega prispevka), je bioindikacija s pomočjo čeljusti srnjadi zelo učinkovita in cenovno ugodna metoda določanja onesnaženosti okolja z nekaterimi anorganskimi onesnažili z afiniteto do kopičenja v kostnih tkivih (*bone-seeking pollutants*), kot so npr. svinec in fluoridi. Izjemno pomembno je, da lahko z uporabo čeljusti ugotavljamo povezavo med izpostavljenostjo in odzivom osebkov (t.i. "dose-response" pristop), in sicer s hkratno uporabo metod akumulacijske bioindikacije (določitev vsebnosti onesnažil v čeljustih; KIERDORF *et al.* 1989, KIERDORF / KIERDORF 1999a, 2000a) ter odzivne bioindikacije (npr. določitev stopnje zobne fluoroze kot zgodnjega kazalnika izpostavljenosti fluoridom; KIERDORF / KIERDORF 1989, 1997, 1999b, 2000b, KIERDORF 1991, KIERDORF / KIERDORF / KREFTING 1991, KIERDORF / KIERDORF / FEJERSKOV 1993, VIKØREN / STUVE 1996, APPLETON *et al.* 1996, 2000, KIERDORF / KIERDORF

/ SEDLÁČEK 1999, ZEMEK *et al.* 2006, JELENKO / JERINA / POKORNY 2010). Tovrstno bioindikacijo onesnaženosti okolja s fluoridi smo v letu 2008 začeli zelo intenzivno izvajati tudi v Sloveniji. Za lažje razumevanje tematike in rezultatov, ki jih bomo slovenski znanstvenostrokovni javnosti podrobneje predstavili v prihodnje, v pričujočem preglednem prispevku predstavljamo nekatere najpomembnejše ugotovitve, ki kažejo na velik potencial čeljusti srnjadi kot zelo primerne bioindikacijskega pripomočka.

2 Fluoridi v okolju in njihov vnos v organizme

2 Fluorides in the environment and their intake into the organisms

Fluoridi so naravna sestavina biogeosfere in so razširjeni povsod v okolju; fluor je 13. najpogosteje zastopani element v zemeljski skorji (WHO 2002, WEINSTEIN / DAVISON 2004). Najpogosteje se pojavlja v obliki vodikovega fluorida (HF), brezbarvne, jedke tekočine oz. plina, ki je dobro topen v organskih topilih in vodi; v slednji tvori fluorovodikovo kislino ($\text{HF}_{(\text{aq})}$). Fluoridi se lahko v okolju pojavljajo tudi v trdni obliki, in sicer kot brezbarven, v vodi razmeroma netopen kalcijev fluorid (CaF_2) oz. brezbarven do bel, v vodi zmerno topen natrijev fluorid (NaF). Lahko so tudi v obliki žveplovega heksafluorida (SF_6), ki je brezbarven, inerten plin brez vonja, rahlo topen v vodi in močno topen v etanolu oz. bazah (WHO 2002).

Fluoridi v okolju so posledica naravnih geoloških procesov, kot so vulkanska aktivnost (NOTCUTT / DAVIES 1989, BELLOMO *et al.* 2007) in preperevanje kamnin oz. so del morskih aerosolov (GARROT *et al.* 2002, WHO 2002, WEINSTEIN / DAVISON 2004, OZSVATH 2009). K povišanim vsebnostim fluoridov v okolju zlasti pomembno prispevajo antropogeni viri; med slednjimi so najpomembnejši industrijska proizvodnja aluminija, železa, jekla, bakra in niklja, proizvodnja in uporaba umetnih gnojil, predelava fosfatne rude, proizvodnja fosforjevih kislin in fosforja, proizvodnja stekla, keramike ter produktov opekarske gline, proizvodnja lepil pa tudi delovanje termoelektarn, cementarn in naftnih rafinerij (zbrano v WHO 2002, WEINSTEIN / DAVISON 2004).

Fluoridi v ozračju so lahko v plinastem stanju oz. v obliki trdnih delcev in se z vetrovi prenašajo na daljše razdalje. Delci s premerom, večjim od 10 μm , se praviloma odložijo v neposredni bližini vira, medtem ko je transport manjših delcev oz. plinastih fluoridov odvisen predvsem od količine emisij, meteoroloških razmer, višine vira izpusta in reliefa (WHO 2002). Povprečne koncentracije fluoridov v ozračju so praviloma manjše od 0,1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Največje so v mestih oz. v bližini virov emisij, vendar praviloma ne

presegajo 2–3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (zbrano v WHO 2002). Iz atmosfere se fluoridi odstranijo z mokrim ali suhim depozitom oz. s hidrolizo (NOTCUTT / DAVIES 2001, WHO 2002).

Vsebnosti fluoridov v tleh znašajo med 20 $\mu\text{g}/\text{g}$ in 1.000 $\mu\text{g}/\text{g}$ in so odvisne od pH tal, vsebnosti gline ter organskih delcev (WHO 2002, KINNUNEN *et al.* 2003, OZSVATH 2009). Večina fluoridov v tleh je vezanih, tako da so večinoma nedostopni rastlinam (BELLOMO *et al.* 2007). Kljub temu lahko visoke vsebnosti fluoridov v tleh, nizek pH tal (najbolj pri pH 5,5), majhen delež gline in nizke vsebnosti organskih snovi povečajo delež topnih fluoridov, s čimer se poveča vnos v rastline (WHO 2002, BELLOMO *et al.* 2007, OZSVATH 2009). Najvišje vsebnosti fluoridov v rastlinah se praviloma pojavljajo v listih oz. zelenih delih rastlin in so posledica vstopa plinastih fluoridov v rastline skozi listne reže (FRANZARING *et al.* 2006, BELLOMO *et al.* 2007) oz. zračnega useda prašnih delcev na rastline (NOTCUTT / DAVIES 2001, KINNUNEN *et al.* 2003, FRANZARING *et al.* 2006).

Povišane vsebnosti fluoridov v okolju pomenijo veliko tveganje za izpostavljene organizme; še posebej problematična je kronična toksičnost fluoridov za sesalce, zaradi česar so fluoridi uvrščeni na seznam nevarnih snovi visoke prioritete (CERCLA list of priority hazardous substances; ATSDR 2009). Visoke vsebnosti fluoridov v telesu prostoživečih živali lahko povzročajo akutne ali kronične zastrupitve oziroma poškodbe, ki pa so odvisne od koncentracije fluoridov v okolju, njihove oblike (kemične sestave), časa izpostavljenosti organizma ter od občutljivosti oziroma tolerance izpostavljenega organizma. Najbolj očitna znaka izpostavljenosti sesalcev fluoridom sta zobna fluoroza (poškodbe zobovja) in osteofluoroza (poškodbe kostnega tkiva). Posledice škodljivih vplivov fluoridov pa se kažejo tudi kot draženje očne sluznice, poškodbe kože in centralnega živčnega sistema, bolečine v predelu trebuha ter težave z dihanjem (WHO 2002, WEINSTEIN / DAVISON 2004).

Vnos fluoridov v telo prostoživečih živali poteka predvsem z vnosom hranil in vode; zelo pomemben je tudi vnos z naključnim zaužitjem tal, medtem ko je vnos z dihanjem zanemarljiv (KAHAMA *et al.* 1997, GARROT *et al.* 2002, HARRISON 2005, KHANDARE / RAO 2006, FORDYCE *et al.* 2007, CHOUBISA 2008, VISWANATHAN *et al.* 2009, YANG *et al.* 2009). Po zaužitju fluoridov se manjši del le-teh prek ionske izmenjave veže v zobno tkivo. Večji del zaužitih fluoridov (cca. 50 %) se absorbira v kri (skozi želodec in tanko črevo), nato pa se izredno elektronegativni fluoridni ioni povezujejo s kalcitnimi ioni, zaradi česar se 97–99 % absorbiranih fluoridov na koncu kopiči v kostnih tkivih in zobovju (WHITFORD 1994, HARRISON 2005, OZSVATH 2009). Tako kosti kot zobje so zaradi pretiranega vnosa fluoridov v telo posledično porozni, raskavi in krhki (PIUS / VISWANATHAN 2008), zaradi česar prihaja do pogostih zlomov kosti, otrdelosti sklepov in deformacij oz. nenormalne obrabe zobovja (TATARUCH / KIERDORF 2003, BARTLETT *et al.*

2005, PIUS / VISWANATHAN 2008, OZSVATH 2009). Vsebnost fluoridov v kosteh se lahko v organizmih skozi čas tudi znižuje v primeru prenehanja dotoka dodatnih količin fluoridov v telo (WHITFORD 1994, WEINSTEIN / DAVISON 2004, HARRISON 2005, OZSVATH 2009).

Na absorpcijo fluoridov v samem telesu in njihovo akumulacijo v kostnih tkivih pa vpliva še vrsta drugih dejavnikov, in sicer: (i) starost osebkov (večji delež absorbiranih fluoridov se pojavlja pri mlajših osebkih zaradi intenzivne rasti kostnega tkiva); (ii) snov, v katero je vezan elementarni fluor; (iii) pH prebavnega trakta; (iv) koncentracije predvsem kalcija in aluminija, a tudi magnezija, bakra, cinka in molibdena v zaužitih snoveh oz. vodi; vsi naštetih ioni (razen molibdena) namreč zmanjšujejo absorpcijo fluoridov v kri (HARRISON 2005, KHANDARE / RAO 2006, PIUS / VISWANATHAN 2008, OZSVATH 2009). Fluoridni ioni se izredno hitro vežejo z ioni omenjenih elementov, z njimi tvorijo netopne snovi (predvsem kalcijev fluorid), ki se ne vežejo v kri, temveč se iz telesa v največji meri izločijo z uriniranjem (WHITFORD 1994, HARRISON 2005, PIUS / VISWANATHAN 2008, OZSVATH 2009). Pri jelenjadi in srnjadi je vnos fluoridov v organizem odvisen tudi od mobilnosti osebkov/vrst (različna obremenjenost s fluoridi v posameznih delih njihovega areala aktivnosti) in načina prehranjevanja, t.j. od vrstno specifične afinitete do različnih prehranskih virov (WEINSTEIN / DAVISON 2004, KHANDARE / RAO 2006).

3 Spodnje čeljusti prostoživečih prežvekovalcev kot bioindikator onesnaženosti okolja s fluoridi

3 *Deer mandibles as bioindicator of environmental pollution with fluorides*

Bioindikacija temelji na zaznavanju in merjenju različnih histoloških, morfoloških, kemijskih, fizioloških in/ali etoloških sprememb (odzivov) posameznih osebkov in/ali njihovih združb, ki jih lahko ustrezno ovrednotimo ter so povzročene zaradi izpostavljenosti različnim dejavnikom okoljskega stresa, npr. onesnažilom (ARNDT / NOBEL / SCHWEIZER 1987, MARKERT / BREURE / ZECHMEISTER 2003). Za relevantno in zanesljivo bioindikacijo onesnaženosti okolja morajo biti izbrani ciljni organi/tkiva dovolj občutljivi (npr. akumulacija in vplivi onesnažil nanje, kot so kopičenje in vplivi kadmija na ledvice ali fluoridov na kosti), merjeni odzivi pa specifični za določeno vrsto onesnažila ter odvisni od izpostavljenosti osebkov. Zaradi tega so spodnje čeljusti (s pripadajočim zobovjem) prežvekovalcev izredno primerne za bioindikacijo onesnaženosti okolja s fluoridi (npr. TATARUCH / KIERDORF 2003, KIERDORF / KIERDORF 1999b, 2000a, 2000b, ZEMEK *et al.* 2006).

Na zobovju se namreč povečane koncentracije fluoridov v okolju kažejo v makroskopsko vidnih in lahko prepoznavnih spremembah zobne sklenine, ki jih s skupnim izrazom imenujemo zobna fluoroza. Njeni simptomi so izredno specifični; ni znano, da bi katerikoli drug kemični agent ali drug stresni dejavnik povzročal podobne spremembe bodisi pri ljudeh, domačih ali prostoživečih živalih (HELL / STANOVSKY / ZILINEC 1995, AOBA / FEJERSKOV 2002, TATARUCH / KIERDORF 2003, KIERDORF *et al.* 2004, HARRISON 2005, BARTLETT *et al.* 2005, ZEMEK *et al.* 2006, CHOUBISA 2008). Poleg tega lahko čeljusti prostoživečih prežvekovalcev učinkovito uporabljamo tudi kot akumulacijske bioindikatorje, t.j. z meritvami vsebnosti fluoridov v sami kosti (KIERDORF *et al.* 1989, VIKØREN / STUVE / FRØSLIE 1996, KIERDORF / KIERDORF 2000a, SEDLÁČEK *et al.* 2001, ZAKRZEWSKA *et al.* 2005), ter tako spremljamo trende in prostorske razlike v onesnaženosti okolja s fluoridi, pa tudi neposredne odnose med izpostavljenostjo in odzivom osebkov (t.i. *dose-response pristop*).

3.1 Vsebnosti fluoridov v kostnih tkivih (čeljustih)

3.1 *Fluoride levels in mandibular bones*

Izmerjene vsebnosti fluoridov v skeletu različnih vrst sesalcev ponazarjajo kumulativno merilo vnosa teh onesnažil v organizem analiziranih živali, saj se 97–99 % v telo vnesenih in absorbiranih fluoridov odlaga ter kopiči v kosteh (WHITFORD 1994, MONTHERRAT CARRET *et al.* 1996, HARRISON 2005, PIUS / VISWANATHAN 2008); zaradi tega se določitev njihovih vsebnosti v okostju in kostnih tvorbah (npr. rogovju, spodnjih čeljustih) različnih vrst sesalcev pogosto uporablja za akumulacijsko bioindikacijo onesnaženosti okolja s fluoridi (npr. KIERDORF *et al.* 1996a, KIERDORF / KIERDORF / SEDLÁČEK 1996, KIERDORF / KIERDORF 1999a, POKORNY 2006, JELENKO / POKORNY 2009).

3.1.1 Vpliv starosti osebkov na vsebnost fluoridov v okostju

3.1.1 *Influence of animal age on fluoride content in skeleton*

Fluoridi se kopičijo v skeletu živali v teku njihovega celotnega življenja (KAY / TOURANGEAU / GORDON 1976, KIERDORF *et al.* 1989, 1995, 1996a, MACHOY *et al.* 1995, VIKØREN / STUVE / FRØSLIE 1996, HARRISON 2005). Vsebnosti fluoridov v kosteh sesalcev zato s starostjo živali praviloma naraščajo; dosedanje raziskave so tako npr. pokazale, da so vsebnosti fluoridov

v kostnih tkivih srnjadi v pozitivni korelaciji s starostjo živali (npr. WALTON / ACKROYD 1988, KIERDORF *et al.* 1989). Pri tem je zanimivo, da je koeficient korelacije pri samicah večji kot pri samcih (KIERDORF *et al.* 1989), kar je verjetno posledica vsakoletnega pomembnega odlaganja (izgube) fluoridov zaradi intenzivne akumulacije v rogovju srnjakov v obdobju njihove rasti (rogovje lahko tudi v zmerno onesnaženih območjih vsebuje >1.000 mg/kg fluoridov; POKORNY 2006). Naraščanje vsebnosti fluoridov v čeljustih je hitrejšje pri mlajših osebkih v primerjavi s starejšimi (npr. KIERDORF *et al.* 1989). Večja akumulacija fluoridov pri mlajših osebkih kaže na intenzivnejši sprejem fluoridov v času rasti skeleta, medtem ko je pri starejših osebkih sprejem fluoridov manjši in poteka le v procesu preoblikovanja kostnega tkiva (WHITFORD 1994, WEINSTEIN / DAVISON 2004, OZSVATH 2009). Do podobne ugotovitve so prišli tudi pri jelenjadi, pri kateri je privzem fluoridov v čeljusti večji pri mladih jelenih v primerjavi s starejšimi osebki (KIERDORF *et al.* 1996a). Zaradi izrazitega vpliva starosti na vsebnosti fluoridov v skeletu je zato v primeru akumulacijske bioindikacije z uporabo čeljusti prežvekovalcev vedno potrebno upoštevati (oceniti) tudi starost analiziranih osebkov.

3.1.2 Vsebnosti fluoridov v čeljustih – akumulacijska bioindikacija onesnaženosti okolja

3.1.2 Fluoride content in mandibles – accumulative bioindication of fluoride pollution

Določitev vsebnosti fluoridov v kosteh sesalcev iz istih habitatov skozi daljše časovno obdobje je dober pripomoček za rekonstrukcijo časovnih trendov v onesnaženosti okolja s fluoridi; tako so SUTTIE *et al.* (1987) ugotovili izrazit porast vsebnosti fluoridov v spodnjih čeljustih lokalne populacije belorepih jelenov (*Odocoileus virginianus*) po začetku delovanja velike topilnice aluminija v ZDA. Nasprotno je bil v Nemčiji v večjem številu območij ugotovljen upad vsebnosti fluoridov v lobanjskih kosteh srnjadi v zadnjih treh desetletjih, kar je posledica zmanjšanja emisij fluoridov v okolje (KIERDORF / KIERDORF 1999a); tako so bile v dveh industrijskih območjih (Porurje, območje zahodno od Kölna) ugotovljene očitne razlike v vsebnostih fluoridov v čeljustih srnjadi med obdobjem 1955–1989 (\bar{x} (SD) = 2.569 (1.509) mg/kg) in obdobjem 1990–1998 (\bar{x} (SD) = 542 (280) mg/kg); emisije fluoridov so se zmanjšale predvsem zaradi zamenjave energenta (uporaba plina namesto premoga) pri proizvodnji električne energije v 70-ih in 80-ih letih prejšnjega stoletja (KIERDORF / KIERDORF 2000a). Metoda omogoča retrospektivno ugotavljanje izpostavljenosti populacij fluoridom, ki je še posebej pomembno v območjih, kjer se fluoridi v anorganskih medijih merijo le občasno ali pa sploh ne.

Poleg določanja učinkovitosti sanacijskih ukrepov na večjih virih emisij (retrospektivno ugotavljanje sprememb v onesnaženosti okolja) so čeljusti parkljarjev tudi odličen kazalnik onesnaženosti okolja v prostorskem smislu, saj omogočajo dobre prostorske določitve onesnaženosti s fluoridi (KARSTAD 1967, KAY 1975, KAY / TOURANGEAU / GORDON 1975, NEWMAN / YU 1976, NEWMAN / MURPHY 1979, SHUPE *et al.* 1984, SUTTIE *et al.* 1987, KIERDORF 1988, 1991, MACHOY / DABROWSKA / NOWICKA 1991, GARROTT *et al.* 2002, ZAKRZEWSKA *et al.* 2005). Tako iz različnih industrijskih območij Evrope poročajo o velikih razlikah v vsebnostih fluoridov v čeljustih parkljarjev med območji, onesnaženimi in neonesnaženimi s fluoridi (preglednica 1). Na Norveškem so npr. ugotovili visoko značilne razlike v vsebnostih fluoridov v čeljustih srnjadi, ki je živela v neposredni bližini tovarne aluminija, in srnjadjo, ki ni bila izpostavljena industrijskim emisijam fluoridov (VIKØREN / STUVE / FRØSLIE 1996). Izredno povišane vsebnosti fluoridov so zabeležili v neposredni bližini tovarne aluminija na Slovaškem (HELL/STANOVSKY/ZILINEC 1995), kjer so izmerili do sedaj najvišje vsebnosti fluoridov v čeljustih srnjadi (max. = 13.311 mg/kg). O veliki obremenjenosti industrijskih območij s fluoridi poročajo tudi iz severne Šlezije (Češka), ki je izpostavljena izrazito povečanim emisijam fluoridov iz številnih termoeenergetskih objektov, kjer kot gorivo uporabljajo lokalni (s fluoridi bogat) rjavi premog (KIERDORF / KIERDORF / SEDLÁČEK 1996). Učinkovitost spodnjih čeljusti prostoživečih parkljarjev kot bioindikatorjev onesnaženosti okolja s fluoridi so dokazali tudi na zahodu Poljske, kjer so v čeljustih jelenjadi, uplenjene na industrijskem območju (v okolici topilnice aluminija in kemične tovarne), izmerili skoraj dvakrat višje vsebnosti fluoridov kot v čeljustih jelenjadi, uplenjene na kontrolnem območju (ZAKRZEWSKA *et al.* 2005). Podrobnejši pregled izmerjenih vsebnosti fluoridov v čeljustih srnjadi in jelenjadi iz različnih območij Evrope je podan v preglednici 1.

Čeljusti srnjadi/jelenjadi lahko poleg antropogenih vplivov kažejo tudi na obremenjenost s fluoridi, ki je posledica naravnih dejavnikov. V ZDA so v narodnem parku Yellowstone preučevali populaciji jelenjadi, ki živita na dveh ločenih območjih (GARROTT *et al.* 2002). Jelenjad iz osrednjega in zahodnega dela parka, ki je ostanek nekdanje vulkanske kaldere in kjer so geotermalni pojavi izredno številni (gejzirji, vroči izviri ipd.) ter so viri s fluoridi bogatih vod, ima bistveno višje vsebnosti fluoridov v čeljustih v primerjavi s populacijo jelenjadi, ki živi v severnem delu parka, kjer geotermalnih pojavov ni (preglednica 1).

V Sloveniji so bile vsebnosti fluoridov v čeljustih srnjadi doslej določene v treh območjih z večjimi lokalnimi viri emisij (okolica Kidričevega, Zasavje, Šaleška dolina) in v kontrolnem območju Zgornje Savinjske doline (JELENKO / POKORNY 2009). Najvišje vsebnosti so

Preglednica 1: Vsebnosti fluoridov v čeljustih srnjadi in jelenjadi iz različnih območij po svetu

Table 1: Fluoride content in mandibles of roe deer and red deer in different areas around the world

Lokacija / Location	Obdobje / Period	Starost živali (leta) / Age (years)	Vsebnost fluoridov (mg/kg suhe teže) / Fluoride content (mg/kg dry weight)			Ref.
			$\bar{a} \pm SD$	Min	Max	
Srnjad / Roe deer						
Nemčija / Germany						
North Rhine-Westphalia	1955–1998 (Porurje) 1983–1998 (Z od Kölna)	1 – 11	628 ± 303 484 ± 250	150 (leta 1997) /	5.724 (leta 1957) /	1
Baden-Wurttemberg	1979–1981	0,7 – 10	466 ± 142	/	/	2
Češka / Czech Rep.	1996	3,3 ± 1,9	3.078 ± 1.097	/	/	3
Anglija, Škotska / England, Scotland	1980–1985	1 – 6	173 ± 58 do 566 ± 164	/	5.547	4
Norveška / Norway						5
Ob tovarni aluminija / Near aluminium smelter	1990–1993	0 1 – 5	304 ± 448 1.855 ± 2.304	/ /	/ 8.696	
Kontrolno območje / Reference area		$\bar{a} = 3$	254	/	/	
Slovaška / Slovakia	1995	1 – 2 3+	1.042 ± 331 6.122 ± 2.799	/ /	/ 13.311	6
Jelenjad / Red deer						
Češko-Nemško mejno območje						
S Šlezija / North Bohemia	1985–1993	2 – 12	/	948	4.680	7
Kontrolno območje / Reference area		2 – 14	/	208	1.026	8
Harz Eibenstock Nejdek Karlovy Vary	1986–1993	$\bar{a} = 7$	540 883 1.244 2.754	/	/	9
Nemčija / Germany	1950-1997	3 – 14	2.078 ± 1.097	597	4.680	10
Saško Rudogorje / Saxonian Ore mountains						
Poljska						11
Ob kemični tovarni / Near chemical plant	1996-1997	1 – 2 6 – 8	201 633	/	/	
Ob termoelektrarni / Near thermal P. P.		1 – 2 6 – 8	172 372	/	/	
Kontrolno območje / Reference area		1 – 2 6 – 8	124 243	/	/	
ZDA (Yellowstone)						12
Ob geotermalnih pojavih / Area of geothermal activity	1996-1999	3 – 15	1.711	/	/	
Kontrolno območje / Reference area			257	/	/	

Reference: (1) – KIERDORF / KIERDORF 2000a; (2) – KIERDORF *et al.* 1989; (3) – KIERDORF / KIERDOR / SEDLÁČEK 1996; (4) – WALTON / ACKROYD 1988; (5) – VIKØREN / STUVE / FRØSLIE 1996; (6) – HELL / STANOVSKY / ZILINEC 1995; (7) – KIERDORF *et al.* 1996b; (8) – KIERDORF 1995; (9) – KIERDORF *et al.* 1996a; (10) – KIERDORF / KIERDORF 1999b; (11) – ZAKRZEWSKA *et al.* 2005; (12) – GARROTT *et al.* 2002.

Preglednica 2: Vsebnosti fluoridov v čeljustih srnjadi v Sloveniji (vir: JELENKO / POKORNY 2009)

Table 2: Fluoride content in roe deer mandibles in Slovenia

Lokacija / Location	Obdobje / Period	Starost (leta) / Age (years)	Vsebnost fluoridov (mg/kg suhe teže) / Fluoride content (mg/kg dry weight)		
			$\bar{a} \pm SD$	Min	Max
Okolica Kidričevega	2007	0,5	152 ± 75	60,1	329
		1	505 ± 384	112	2.066
		2–4	874 ± 436	97,9	2.020
		5+	980 ± 365	411	2.280
Šaleška dolina	1998–2007	0,5	82,5 ± 45	30,0	227
	1997–2008	1	155 ± 79	21,7	383
	1998–2007	2+	280 ± 158	61,5	1.020
Zasavje	2007	0,5	59,8 ± 59	30,5	268
		1	113 ± 104	54,0	477
		2–4	172 ± 87	58,6	330
		5+	515 ± 473	157	1.480
Zgornja Savinjska dolina	2007	0,5	31,8 ± 7,4	22,1	46,6
		1	62 ± 18	38,2	89,2
		2–4	138 ± 36	100	201
		5+	203 ± 40	158	270

bile izmerjene pri najstarejši starostni kategoriji (pet- in več letna srnjad), in sicer v okolici Kidričevega, kjer se nahaja topilnica aluminija kot največji vir emisij teh snovi v ozračje v Sloveniji; vsebnosti fluoridov v čeljustih srnjadi, odvzete iz Šaleške doline in Zasavja, so bile bistveno nižje in med sabo primerljive, medtem ko so bile vsebnosti izredno nizke pri srnjadi iz Zgornje Savinjske doline (preglednica 2).

3.2 Zobna fluoroza kot odzivni bioindikator onesnaženosti okolja s fluoridi

3.2 Dental fluorosis as a sensitive bioindicator of fluoride pollution

Dolgotrajen vnos večjih količin fluoridov v organizem ljudi ali živali lahko povzroči poškodbe kosti, t.j. osteofluorozo (WHO 2002, FORDYCE *et al.* 2007); najbolj očiten znak izpostavljenosti sesalcev povišanim okoljskim koncentracijam fluoridov je pojav zobnih poškodb oz. različnih patoloških sprememb zobovja, ki so znane s skupnim imenom zobna fluoroza (NEWMAN / YU 1976, SHUPE *et al.* 1984, HOROWITZ 1989, DEN BESTEN 1994, FEJERSKOV *et al.* 1994, AOBA / FEJERSKOV 2002, RICHTER *et al.* 2010). Slednja je bila zabeležena in natančno opisana pri ljudeh (npr. MONTHERRAT CARRET *et al.* 1996, KAHAMA *et al.* 1997, FORDYCE *et al.* 2007) in številnih udomačenih živalskih vrstah, kot so govedo (CHOUBISA 2008), ovce (BAARS *et al.* 1987), domači prašiči (KIERDORF *et al.* 2004) in kunci (PIUS / VISWANATHAN 2008). V zadnjih dveh desetletjih je bila zobna fluoroza intenzivno preučevana tudi pri prostoživečih

parkljarjih, npr. pri evropski srni – srnjadi *Capreolus capreolus* (KIERDORF / KIERDORF / FEJERSKOV 1993, VIKØREN / STUVE 1996, KIERDORF / KIERDORF / BOYDE 1997, KIERDORF / KIERDORF / SEDLÁČEK 1999, KIERDORF / KIERDORF 1999a, 2000b, APPLETON *et al.* 2000, ZEMEK *et al.* 2006; JELENKO / POKORNY 2009), navadnem jelenu *Cervus elaphus* (KIERDORF *et al.* 1996a, 1996b, VIKØREN / STUVE 1996, KIERDORF / KIERDORF / BOYDE 1997, KIERDORF / KIERDORF 1997, 1999b, 2000b, SCHULTZ *et al.* 1998, APPLETON *et al.* 2000), belorepem jelenu *Odocoileus virginianus* (SUTTIE *et al.* 1987) in divjem prašiču *Sus scrofa* (KIERDORF *et al.* 2000).

Zobna fluoroza je posledica negativnega vpliva fluoridnih ionov na formacijo zobnega tkiva zlasti sklenine, in sicer tako v začetnem kot tudi končnem stadiju oblikovanja zobovja (FEJERSKOV *et al.* 1994, AOBA / FEJERSKOV 2002, KIERDORF *et al.* 2004, BARTLETT *et al.* 2005). Fluoridni ioni se namreč vgradijo v kristalno strukturo sklenine, kar vpliva na proces mineralizacije v smislu spremembe ionske sestave tekočine, ki obdaja minerale. Prihaja do hipomineralizacije sklenine izpostavljenih zob, ki je predvsem posledica vpliva presežka fluoridov na stopnjo razgradnje matričnih proteinov in/ali na stopnjo odstranitve stranskih produktov tega procesa. Kakršenkoli vpliv na matrico sklenine povzroči zakasnitev rasti sosednjih kristalov v poznem stadiju formacije zobovja, kar se kaže v različni stopnji poroznosti sklenine tik pod površjem, ko se le-ta končno formira (AOBA / FEJERSKOV 2002). Takšna sklenina ima močno zmanjšano mehansko stabilnost; posledično prihaja do različnih sprememb na površju zob (HOROWITZ 1989, DEN BESTEN 1994, AOBA / FEJERSKOV 2002). Na makroskopskem nivoju so te spremembe dobro vidne in

se kažejo kot motnost, razbarvanost in pegavost sklenine, na njeni površini so vidne drobne poškodbe – luknjice; v hujših oblikah prihaja celo do popolne izgube le-te (zbrano v TATARUCH / KIERDORF 2003, KIERDORF *et al.* 2004, HARRISON 2005, CHOUBISA 2008). Zaradi manjše mehanske odpornosti prihaja do izrazito povečane (hitrejše) obrabe zobovja, močnega preoblikovanja (popačenja) in celo zlomov ter izpadov posameznih zob (KIERDORF / KIERDORF / FEJERSKOV 1993, KIERDORF *et al.* 1996a, 2004, KIERDORF / KIERDORF / SEDLÁČEK 1996, GARROTT *et al.* 2002), kar lahko povzroči skrajšanje pričakovane življenjske dobe fluoridom močno izpostavljenih populacij (SCHULTZ *et al.* 1998, WEINSTEIN / DAVISON 2004). Tako so npr. v že omenjeni raziskavi v ZDA ugotovili, da ima jelenjad, ki živi na območju vulkanske kaldere (geotermalna dejavnost je razlog za večje naravne koncentracije fluoridov v okolju), zaradi zelo močne zobne fluorozе povprečno ocenjeno življenjsko dobo 10-11 let; najvišja starost, ki jo osebkı dosežejo, pa ne presega 16 let. Nasprotno ima jelenjad, ki ni izpostavljena povečanim koncentracijam fluoridov v okolju, ocenjeno pričakovano življenjsko dobo okoli 16 let, najstarejši osebkı pa dosežejo starost 20-25 let. Prezgodnja smrtnost vpliva na 24-odstotno zmanjšanje populacijske rasti s fluoridi prizadete populacije jelenjadi (GARROTT *et al.* 2002).

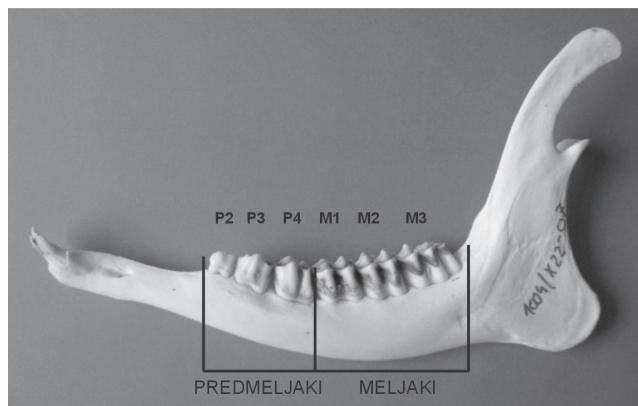
Makroskopske spremembe fluoroznih zob so opisane pri številnih vrstah (KARSTAD 1967, KAY / TOURANGEAU / GORDON 1975, NEWMAN / YU 1976, NEWMAN / MURPHY 1979, SHUPE *et al.* 1984, SUTTIE *et al.* 1987, BOULTON / COOKE / JOHNSON 1994, KIERDORF *et al.* 2000, 2004, CHOUBISA 2008). V zadnjih desetletjih so potekale predvsem v Evropi številne raziskave patoloških sprememb zobovja srnjadi in jelenjadi, ki so posledica onesnaženosti okolja s fluoridi oziroma njihovega vpliva na proces tvorbe zobovja obeh omenjenih vrst (npr. KIERDORF 1988, KIERDORF / KIERDORF 1989, 1997, APPLETON *et al.* 1996, 2000). Dobljeni rezultati so potrdili izjemno uporabnost in zanesljivost določanja razširjenosti in jakosti zobne fluorozе za bioindikacijo onesnaženosti okolja oziroma za pravočasno zaznavanje izpostavljenosti organizmov fluoridom (KIERDORF *et al.* 1996a, KIERDORF / KIERDORF / SEDLÁČEK 1996, VIKØREN / STUVE 1996, KIERDORF / KIERDORF 1999b, GARROTT *et al.* 2002, ZAKRZEWSKA *et al.* 2005, ZEMEK *et al.* 2006, JELENKO *et al.* 2008, JELENKO / POKORNY 2009, JELENKO / SAVINEK / POKORNY 2009, JELENKO / JERINA / POKORNY 2010).

3.2.1 Opredelitev metode

3.2.1 Definition of the method

Za oceno zobne fluorozе prostoživečih sesalcev so v Nemčiji razvili točkvalni sistem, ki temelji na pogostnosti in resnosti makroskopsko vidnih znakov fluorozе pri

cervidih (predstavniki družine jelenov) in glodalcih, in sicer z modifikacijo že obstoječega točkvalnega sistema za oceno zobne fluorozе pri govedu (KIERDORF / KIERDORF 1999b; KIERDORF / KIERDORF / SEDLÁČEK 1999, TATARUCH / KIERDORF 2003). Ocena temelji na makroskopskem pregledu spektra patoloških sprememb zobne sklenine stalnih kočnikov, ki so posledica izpostavljenosti živali fluoridom v času rasti zob. Stopnja zobne fluorozе se zaradi tega določa le na čeljustih srnjadi (jelenjadi) z dokončno razvitim zobovjem, t.j. pri odraslih živalih.



Slika 1: Spodnja čeljust evropske srne s popolnoma izraščnim stalnim zobovjem

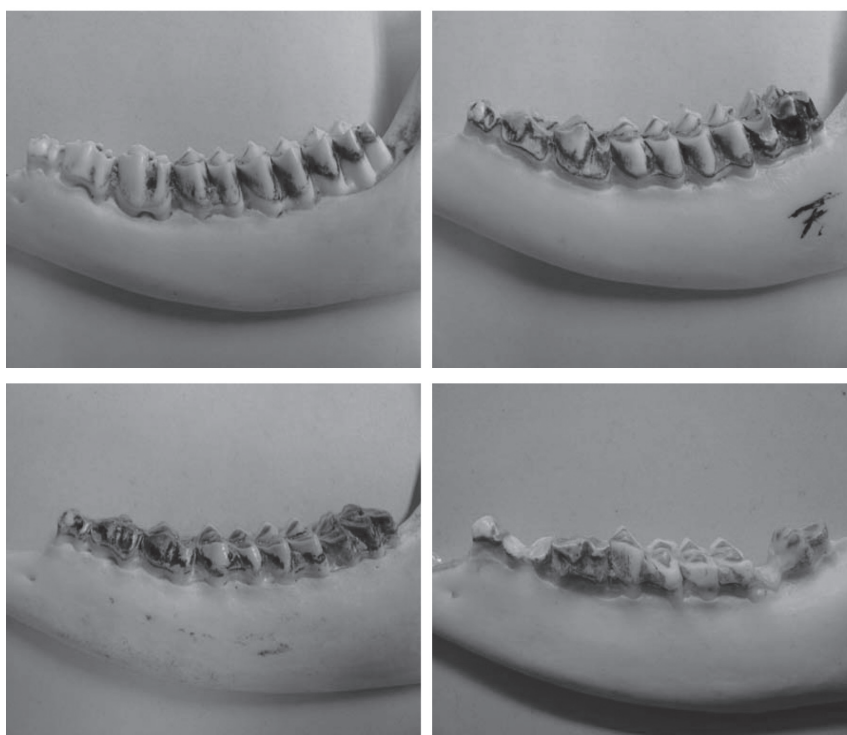
Figure 1: Roe deer mandible with grown permanent teeth

Sistem temelji na vrstilni merski skali, in sicer se v eno izmed šestih kategorij (0: nefluorozen zob; 5 močno poškodovan zob; preglednica 3) uvrsti vsak izmed šestih stalnih kočnikov, t.j. treh stalnih predmeljakov (P_2 – P_4 ; v splošni, t.j. lovski terminologiji se sicer praviloma, zaradi dejstva, da je pri srnjadi P_1 evlucijsko skoraj že izginil, kot predmeljaki pri srnjadi navajajo P_1 – P_3) in treh meljakov (M_1 – M_3). Vsota posameznih ocen za vseh šest kočnikov v eni izmed polovic spodnje čeljusti (levi ali desni) je indeks zobne poškodovanosti (DLI: *dental lesion index of fluorosis*; rang: 0 – 30). Zobovje se označi kot fluorozno, če je vsaj en zob točkovan z 1 ali več (KIERDORF / KIERDORF 1999b).

Preglednica 3: Točkovalni sistem za klasifikacijo zaradi fluoridov povzročene poškodovanosti stalnih predmeljakov in meljakov prežvekovalcev (KIERDORF et al. 1999)

Table 3: Scoring system for classification of fluoride induced lesions in permanent premolars and molars of ruminants

Kategorija poškodovanosti / damage category	Opis kategorije / characteristics of the category
0	Normalna (bela in prozorna) sklenina. Sklenina tvori razločne grebene na grizni ploskvi. Obraba zoba je fiziološko (starostno) povzročena. Nefluorozen zob. / <i>Normal white and translucent enamel. Enamel forms distinct ridges on occlusal surface. Physiological, i.e. age-related wear, unfluorosed.</i>
1	Zaznati je motnost in razbarvanje sklenine. Spremembe so omejene predvsem na koničaste dele zob, včasih pa so vidne tudi kot vodoravni pasovi na stranskem delu zob. / <i>Presence of enamel opacities and post eruptive enamel discoloration. Changes mainly confined to cuspal regions and sometimes present in the form of horizontal bands.</i>
2	Za celotno zobno krono je značilna motna in razbarvana sklenina. Zmanjšana je višina zob, pogosto izginejo tudi grebeni. / <i>Whole crown affected by enamel opacity and discoloration. A reduction in height or disappearance of enamel ridges is often discernible.</i>
3	Popolna izguba grebenov ima za posledico sploščitev grizne ploskve. Poškodbe površine sklenine so vidne na manj kot 5 % zobne krone. / <i>Complete loss of enamel ridges leads to a flattening of the occlusal surface. Occurrence of enamel surface lesions affecting up to 5% of the tooth crown.</i>
4	Patološko pospešena obraba zob ima za posledico nenormalno obliko zob. Poškodbe površine sklenine so vidne na 5 – 25 % zobne krone. / <i>Pathologically increased wear leading to abnormal tooth shape. Between 5% and 25% of the tooth crown exhibit enamel surface lesions.</i>
5	Neprepoznavna oblika zob zaradi njihove skrajno povečane obrabe. Zobje so zlomljeni ali popolnoma manjkajo. Več kot 25 % zobne krone ima poškodbe površine sklenine. / <i>Dysfunctional tooth shape due to grossly increased wear. Teeth may be fractured or completely lost due to periodontal breakdown. More than 25% of the tooth crown affected by enamel surface lesions.</i>



Slika 2: Ocenjevanje zobne fluoroze; zgoraj levo: nefluorozno zobovje, vsi zobje so normalno razviti in izkazujejo le fiziološko povzročeno obrabo – DLI = 0; zgoraj desno: P₂-P₄ ter M₃ izkazujejo stopnjo zobne fluoroze 2 (obarvanost zobovja in odsotnost brazd zaradi hitrejšje obrabe) – DLI = 8; spodaj levo: P₂-P₄ in M₃ izkazujejo stopnjo zobne fluoroze 3 (razjednost sklenine opazna na manj kot 5 % površine), M₂ izkazuje stopnjo 2 – DLI = 14; spodaj desno: P₂-P₄ ter M₃ izkazujejo maksimalno stopnjo zobne fluoroze (stopnja 5; razjednost sklenine vidna na več kot 25 % površine, deformacija zob) – DLI = 20 (foto: Ida Jelenko, 2009)

Figure 2: Dental fluorosis assessment; above left: unfluorosed teeth, all teeth are normally developed and demonstrate only physiological dental wear – DLI = 0; above right: P₂-P₄ and M₃ demonstrate damage category 2 (enamel opacities and discoloration, reduction in height and disappearance of enamel ridges) – DLI = 8; below left: P₂-P₄ and M₃ demonstrate damage category 3 (up to 5% of the tooth crown exhibit enamel surface lesions), M₂ demonstrates category 2 – DLI = 14; below right: P₂-P₄ and M₃ demonstrate the maximum damage category (category 5; more than 25% of the enamel surface is affected with lesions, teeth deformation) – DLI = 20

3.2.2 Vpliv časa formacije zobovja na stopnjo zobne fluoroze

3.2.2 Influence of the period of tooth formation on the dental fluorosis

Fluoridi lahko vplivajo na poškodbe zobovja le v obdobju formiranja sklenine oziroma rasti zobovja, zato je stopnja zobne fluoroze bioindikator pretekle izpostavljenosti osebkov povečanim koncentracijam fluoridov (KIERDORF / KIERDORF 1999b, HARRISON 2005). Ko se formacija zob (sklenine) konča, se namreč fluoridi vanje ne morejo več vgraditi; v nasprotju z ostalimi kostnimi tkivi se sklenina po njenem nastanku ne more na novo oblikovati, zato so patološke spremembe sklenine zaradi izpostavljenosti fluoridom trajne in kažejo na izpostavljenost živali v času oblikovanja le-te (TATARUCH / KIERDORF 2003). V primeru vnosa večjih količin fluoridov v organizem osebkov po končani formaciji stalnega zobovja so spremembe v smislu zobne fluoroze možne le na nivoji zobovine, ki se pri zdravih zobeh tvori skozi celotno življenje (PINDBORG 1970). Vendar je le-ta pokrita s sklenino, tako da teh sprememb pri okularnem ocenjevanju zobne fluoroze ne moremo zaznati.

Zelo značilna variabilnost v pogostnosti in jakosti zobne fluoroze med različnimi stalnimi zobmi srnjadi in jelenjadi je zato posledica časovnih razlik v formiranju sklenine in kron različnih zob med obema vrstama. Tako npr. makroskopske preiskave prvih meljakov (M_1) srnjadi v večini primerov ne kažejo kliničnih znakov sprememb zaradi izpostavljenosti fluoridom, kar je posledica dejstva, da se M_1 srnjadi začno formirati že pri plodu v maternici, formacija se nadaljuje po rojstvu in se konča že pri starosti dveh mesecev. V času formacije so M_1 srnjadi izpostavljeni majhnim vplivom fluoridov, saj placenta pomeni bariero za vnos fluoridov v telo mladiča; poleg tega se mladiči prvi mesec prehranjujejo izključno z materinim mlekom, ki ne vsebuje velikih količin teh onesnažil (RICHTER *et al.* 2010). Drugače je pri navadnem jelenu, pri katerem poteka formacija zobnih kron in sklenine M_1 skozi daljše obdobje in se zaključi šele pri starosti štirih mesecev; v primerjavi s srnjadjo je zato zobna fluoroza M_1 jelenjadi bistveno pogostejši pojav. Formacija zobne krone in sklenine drugih meljakov (M_2) srnjadi se začne istočasno kot formacija M_1 , poteka pa nekoliko dlje – do starosti štirih mesecev; posledično je stopnja fluoroze M_2 srnjadi bistveno večja, še večja pa je pri jelenjadi, pri kateri se formacija M_2 v celoti dogaja v času samostojnega hranjenja osebkov. Tretji meljak (M_3) in vsi trije stalni predmeljaki (P_2 – P_4) začno pri obeh vrstah rasti bistveno kasneje, t.j. v času intenzivnega prehranjevanja izključno z rastlinsko hrano (pri srnjadi od šestega do štirinajstega, pri jelenjadi od štirinajstega do osemnajstega meseca), zato je izpostavljenost fluoridom in posledično stopnja zobne fluoroze teh zob v primeru obeh vrst bistveno večja kot pri prvih in drugih meljaki. Upošteva se navedene razlike je pri uporabi različnih

živalskih vrst za bioindikacijo onesnaženosti okolja s fluoridi s pomočjo določanja zobne fluoroze potrebno upoštevati tako medvrstno variabilnost kot variabilnost med različnimi tipi zob.

Skladno s tem sta KIERDORF in KIERDORF (1999b) pri jelenjadi ugotovila večjo stopnjo zobne fluoroze pri stalnih predmeljaki ter drugem in tretjem meljaku, medtem ko je bil prvi meljak praviloma nepoškodovan ali pa je odseval majhno stopnjo zobne fluoroze (ne več kot 2); podobno je P_2 v primerjavi s P_3 in P_4 navadno kazal manjšo stopnjo zobne fluoroze. Ista avtorja (KIERDORF / KIERDORF 2000b) sta ugotovila tudi velike razlike v poškodovanosti homolognih zob srnjadi in jelenjadi iz istega območja (Saško Rudogorje). Pri srnjadi so največjo zobno fluorozo izražali P_3 , P_4 in M_3 (najpogostejši oceni 4 oz. 5); P_2 je najpogosteje izražal stopnjo 3 oz. 4, M_2 stopnjo 0 oz. 1, medtem ko je bil M_1 praviloma vedno (v 97 % primerov) nefluorozen. Pri jelenjadi je bila pri P_3 , P_4 in M_3 stopnja zobne fluoroze najpogosteje ocenjena z oceno 4 in je bila v deležu nekoliko manjša kot pri srnjadi, medtem ko je M_2 (ocena 4 oz. 5) izražal statistično pomembno večjo stopnjo in pojavnost zobne fluoroze kot pri srnjadi. Delež nefluoroznih M_1 je bil pri jelenjadi manjši, večji delež teh zob je izkazovalo stopnjo 1. Nasprotno je P_2 jelenjadi v povprečju izkazoval nekoliko manjšo stopnjo fluoroze, kot je bila določena pri srnjadi. Omenjene razlike med vrstama potrjujejo izreden vpliv obdobja formacije zob na pojavnost in jakost zobne fluoroze posameznih, funkcionalno sicer zelo primerljivih zob.

3.2.3 Zobna fluoroza kot metoda za določanje onesnaženosti okolja

3.2.3 Dental fluorosis as a method for assessment of the environmental pollution

Bioindikacija onesnaženosti okolja s fluoridi na osnovi določanja stopnje zobne fluoroze omogoča spremljanje tako prostorskih kot časovnih sprememb v onesnaženosti okolja s fluoridi. Upošteva se njene prednosti (velika dosegljivost vzorcev, cenovna ugodnost, možnost velikopovršinskega pristopa, a z dovolj veliko prostorsko ločljivostjo) omogoča vzpostavitev permanentnega monitoringa, ki je že ustaljena praksa v nekaterih evropskih državah (npr. Nemčija in Češka, v zadnjih letih pa tudi Slovenija).

Prvi pojavi zobne fluoroze pri predstavnikih iz družine jelenov so bili zabeleženi v šestdesetih/sedemdesetih letih prejšnjega stoletja, in sicer pri belorepem jelenu (KARSTAD 1967) ter mulastem jelenu (*Odocoileus hemionus*) v Združenih državah Amerike (KAY 1975, KAY / TOURANGEAU / GORDON 1975). V Evropi so o pojavu zobne fluoroze pri jelenjadi prvič poročali v letu 1991, in sicer v močno onesnaženem območju severne Šlezije na Češkem (ZEMEK 2006). Kasneje so v tej in sosednji

pokrajini (Saško Rudogorje, Nemčija) izvedli večje število sistematičnih raziskav (tako pri jelenjadi kot srnjadi), s katerimi so dokazali veliko uporabnost zobne fluoroze kot zanesljive in poceni metode odzivne bioindikacije onesnaženosti okolja s fluoridi (KIERDORF *et al.* 1996a, 1996b, KIERDORF / KIERDORF / SEDLÁČEK 1996, 1999, KIERDORF / KIERDORF 1999b, 2000b). Pojav močne zobne fluoroze spodnjih čeljusti obeh ciljnih vrst je bil namreč posledica izpostavljenosti fluoridom zaradi delovanja številnih termoenergetskih objektov na tem območju. Nadgradnjo so ZEMEK *et al.* (2006) izvedli na češki strani Rudogorja (severna Šlezija), kjer so poleg določitve obremenjenosti okolja s fluoridi na nivoju občin za pojasnitev vplivnih dejavnikov uporabili GIS-orodja in potrdili visoko značilno soodvisnost med stopnjo poškodovanosti gozdov, talnimi tipi in zračnim usedom žvepla ter stopnjo zobne fluoroze (izraženo s povprečnim indeksom zobne poškodovanosti – povprečen DLI) srnjadi kot ciljne bioindikatorske vrste. Slednji so rezultate ocene stopnje zobne fluoroze grafično ponazorili s karto, kjer so vsako od lovišč uvrstili v eno od 8 kategorij zobne fluoroze glede na povprečen DLI in ugotovili, da se močna zobna fluoroza najpogosteje pojavlja v obliki otokov v okolici številnih termoenergetskih objektov, ki obstajajo na tem območju. Pregled raziskav zobne fluoroze srnjadi in jelenjadi, ki se v Evropi opravlja predvsem v nemškem in češkem prostoru, je podan v preglednici 4.

V Sloveniji je bila stopnja zobne fluoroze ocenjena na čeljustih vse (!!!) odrasle srnjadi, odvzete iz vseh slovenskih lovišč v letu 2007 (JELENKO / POKORNY 2009). Izmed ocenjenih 14.591 čeljusti jih je 2.191 (15 %) izkazovalo vidne znake zobne fluoroze; povprečen DLI je znašal \bar{x} (SD) = 0,6 (1,7). Izrazito povečana stopnja zobne fluoroze je bila zaznana pri srnjadi v okolici Kidričevega (LD Boris Kidrič: \bar{x} (SD) = 7,8 (7,3); LD Jože Lacko – Ptuj: \bar{x} (SD) = 4,4 (4,8)), kjer je bila primerljiva z znanimi stopnjami zobne fluoroze srnjadi iz industrijsko onesnaženih območij Evrope (npr. ZEMEK *et al.* 2006). Z GIS-orodji je bilo ugotovljeno, da je oddaljenost od tovarne aluminija v Kidričevem daleč najpomembnejša spremenljivka, ki določa stopnjo zobne fluoroze srnjadi na celotnem območju vzhodne Slovenije (JELENKO / JERINA / POKORNY 2010).

3.3 Soodvisnost med vsebnostjo fluoridov v čeljustih in zobno fluorozo

3.3 Correlation between fluoride levels in mandibular bones and dental fluorosis

V preteklosti je bila večkrat preučevana tudi soodvisnost med vsebnostjo fluoridov v čeljustih kot merilom izpostavljenosti populacij in stopnjo zobne fluoroze teh populacij kot merilom njihovega odziva

(KIERDORF 1988, BOULTON / COOKE / JOHNSON 1994, KIERDORF *et al.* 1996a, 1996b, KIERDORF / KIERDORF / SEDLÁČEK 1996, VIKØREN / STUVE 1996, KIERDORF / KIERDORF 1999b; JELENKO / POKORNY 2009). V splošnem velja, da sta intenziteta in pogostnost zobne fluoroze praviloma v statistično visoko značilni pozitivni soodvisnosti z vsebnostmi fluoridov v čeljustih istih osebkov oziroma populacij (KIERDORF *et al.* 1996a). Tako so npr. v raziskavi fluoroznih čeljusti iz območja Saškega Rudogorja (Nemčija), ki je precej onesnaženo s fluoridi (emisije fluoridov na tem območju so bile ocenjene na 12.000 t letno; KIERDORF / KIERDORF 1999b), preučevali odnos med starostjo jelenov, vsebnostjo fluoridov v čeljustih (akumulacijska bioindikacija) in stopnjo zobne fluoroze kot odzivom osebkov v času razvoja zobne sklenine (*ibid.*). Dokazali so obstoj statistično značilne soodvisnosti med: (i) vsebnostjo fluoridov v čeljustih in stopnjo zobne fluoroze (DLI indeks); (ii) vsebnostjo fluoridov in maksimalno oceno stopnje zobne fluoroze enega zoba. Podobno smo pozitivno soodvisnost med vsebnostmi fluoridov v čeljustih srnjadi in DLI indeksom istih osebkov ugotovili tudi v Šaleški dolini (JELENKO / POKORNY 2009).

Visoka vsebnost fluoridov v čeljustih in pojav zobne fluoroze praviloma kažeta na velike koncentracije fluoridov v okolju. Vendar se omenjena kazalnika vedno ne ujemata. Fluoridi se namreč kopičijo v kostnem tkivu skozi celotno življenje osebkov, zato vsebnost fluoridov v kosteh predstavlja akumulacijo fluoridov iz okolja v celotnem času izpostavitve osebkov. Nasprotno so znaki zobne fluoroze posledica izpostavljenosti osebkov fluoridom le v času razvoja zobovja (t.j. v zgodnjem/mladostnem obdobju življenja). Zaradi tega močna soodvisnost med vsebnostjo fluoridov v kostnem tkivu in zobno fluorozo pomeni, da so bili osebki izpostavljeni visokim koncentracijam fluoridov v času zobne formacije, kasneje pa se izpostavljenost tej skupini onesnažil ni bistveno spremenila. Ko se proces oblikovanja zobovja zaključi, se fluoridi v zobnem tkivu namreč ne kopičijo več (in tudi nimajo več vpliva na njegov videz), vendar se še naprej akumulirajo v kosteh/čeljustih.

Do podobnih ugotovitev so prišli tudi v že omenjeni raziskavi jelenjadi na Češkem in v Nemčiji (KIERDORF *et al.* 1996a), kjer so ugotovili, da se pri jelenjadi, izpostavljeni velikim koncentracijam fluoridov le v času, ko je stalno zobovje že formirano, povišane vsebnosti fluoridov kažejo le v kostnem tkivu, ni pa poškodovanosti zobne sklenine v smislu nastanka zobne fluoroze. Do takšnih primerov prihaja, ko osebki po zaključenem izraščanju zob migrirajo iz neonesnaženega območja v območje, ki je s fluoridi močno onesnaženo. Vendar je v primeru uporabe srnjadi kot bioindikatorja onesnaženosti okolja treba poudariti, da do takšnih razlik v vsebnostih fluoridov in stopnji zobne fluoroze pri tej vrsti praviloma ne prihaja, saj gre za teritorialno vrsto, ki ni nagnjena k večjim migracijam, njen areal aktivnosti pa je praviloma manjši od 100 ha (SIMONIČ 1976, KRŽE 2000). Tudi zaradi tovrstnega (teritorialnega) načina življenja je srnjad v kopenskih ekosistemih ena

najprimernejših vrst za bioindikacijo onesnaženosti okolja z anorganskimi onesnažili, kot so npr. fluoridi.

Preglednica 4: Stopnja zobne fluorozе srnjadi in jelenjadi iz različnih območij

Table 4: Level of dental fluorosis of roe and red deer from different areas

Lokacija / Location	Obdobje / Period	Starost (leta) / Age (years)	Ocena zobne fluorozе / Assessment of dental fluorosis	Ref
Srnjad / Roe deer				
Češko-nemško mejno območje / Czech-German border area				1
Harz	1986-1993	$\bar{a} = 7$	Ni zobne fluorozе / No fluorosis	
Eibenstock			53 % rahla do zmerna fluorozа / 53% slight to moderate fluorosis	
Nejdek			78 % rahla do zmerna fluorozа / 78% slight to moderate fluorosis	2
Karlovy Vary			33 % rahla do zmerna fluorozа / 33% slight to moderate fluorosis 67 % izrazita fluorozа / 67% of severe fluorosis	
Saško Rudogorje in Severna Šlezija / Saxonian Ore mountains and North Bohemia	1992-1998	/	P ₂ : 3 (45 %) 4 (33 %) P ₃ , P ₄ : 4 (>60 %) 5 (25 %) M ₁ : 0 (97 %) M ₂ : 0 (59 %) 1 (41 %) M ₃ : 4 (44 %) 5 (48 %)	
Nemčija / Germany Saško Rudogorje / Saxonian Ore mountains	1995-1998	2+	DLI: $\bar{a} \pm SD = 5,7 \pm 6,2$; Max: 23	3
Češka / Czech Rep. Severna Šlezija / North Bohemia	1995-1998	2 – 12	DLI: $\bar{a} \pm SD = 8,1 \pm 6,5$ Max: 21	4
Slovenija Okolica Kidričevega / Kidričevo area	2007	2+	DLI: $\bar{a} \pm SD = 4,7 \pm 5,3$ Max: 20	5
Šaleška dolina / Salek Valley	1997-2007		DLI: $\bar{a} \pm SD = 0,9 \pm 2,1$ Max: 15	
Slovenija / Slovenia	2007		DLI: $\bar{a} \pm SD = 0,6 \pm 1,7$ Max: 30	
Jelenjad / Red deer				
Nemčija / Germany Saško Rudogorje / Saxonian Ore mountains	1950-1997	3 – 14	DLI Me: 9 Min: 2, Max: 25	6
Češko-nemško mejno območje / Czech-German border area				2
Saško Rudogorje in Severna Šlezija / Saxonian Ore mountains and North Bohemia	1992-1998	/	P ₂ : 2 (37 %) 3 (47 %) 4 (45 %) M ₁ : 0 (58 %) 1 (40 %) M ₂ : 4 (34 %) 5 (27 %) M ₃ : 4 (42 %)	
ZDA / USA (Yellowstone) Ob geotermalnih pojavih / Area of geothermal activity	1996-1999	12 – 15	78 % vzorcev z ocenjeno zobno fluorozо / 78% of samples with dental fluorosis od tega 53 % vzorcev z izrazito zobno fluorozо / 53% samples with severe dental fluorosis	7
Kontrolno območje / Reference area			ni zobne fluorozе / no dental fluorosis	

Reference: (1) – KIERDORF *et al.* 1996a; (2) – KIERDORF / KIERDORF 2000; (3) – KIERDORF / KIERDORF / SEDLÁČEK 1999; (4) – ZEMEK *et al.* 2006; (5) – JELENKO / POKORNY 2009; (6) – KIERDORF / KIERDORF 1999b; (7) – GARROTT *et al.* 2002.

4 Zaključek

4 Conclusion

Čeljusti smjaji so zelo primeren pripomoček za ocenjevanje onesnaženosti okolja s fluoridi, in sicer tako v smislu akumulacijske bioindikacije (določanje vsebnosti fluoridov v čeljustih) kot v smislu odzivne bioindikacije (ocenjevanje zobne fluoroze).

Vsebnosti fluoridov v čeljustih praviloma naraščajo s starostjo živali; kot takšne so kazalnik izpostavljenosti osebkov tem onesnažilom skozi celotno življenjsko obdobje. Nasprotno zobna fluoroza (skup anatomsko-morfoloških sprememb, ki nastanejo kot posledica delovanja fluoridov na proces tvorbe zob) kaže na izpostavljenost osebkov v zgodnjem življenjskem obdobju, t.j. med formacijo zobovja. Poleg vsebinskih vzrokov (npr. sočasno ugotavljanje izpostavljenosti in odzivov osebkov, t.j. *dose-response* pristop) je ena najpomembnejših prednosti uporabe čeljusti smjaji/parkljarjev v bioindikacijske namene njihova izjemna primernost z logističnega in stroškovnega vidika. Čeljusti parkljarjev se namreč v marsikateri državi sistematično zbirajo z namenom kognitivnega in kontroliranega upravljanja s populacijami, zato so dostopne v velikem številu, praviloma opremljene z vsemi potrebnimi atributnimi in geografskimi podatki o posameznem uplenjenem osebku, kar omogoča izvedbo cenovno ugodnih veliko-površinskih biomonitoringov onesnaženosti okolja s fluoridi, kakršne smo v zadnjih letih vpeljali tudi v Sloveniji.

5 Summary

In the last 30 years, many efforts were put into determination of the toxic impact of fluorides on living beings, especially wildlife. Therefore, many studies of the exposure and impact of fluorides on mammals (mainly ungulates) have been carried out, especially in polluted areas in central Europe.

Fluorides are natural compounds of the geosphere and are the 13th most abundant element in the earth crust. They derive from natural sources such as volcanic activity, bedrock weathering, or are a part of marine aerosols. Anthropogenic activity, such as aluminium smelting, iron, steel, copper or nickel production, production and use of fertilizers, glass, brick and ceramic production, and combustion of fossil fuels, can significantly contribute to increased fluoride concentrations in the environment. These increased concentrations of fluorides have a negative influence on organisms due to their toxicity; and therefore are listed in the CERCLA list of priority hazardous substances (ATSDR). Because of the high affinity of fluoride ions to calcium, their chronic toxic impact on mammals reflects

mostly on skeleton and/or teeth; in the latter, the formation and mineralization process is being disturbed.

Research of the impact of fluorides on animals was mainly carried out on ungulates (especially cervids), which have proven to be exceptionally good bioindicator of the environmental pollution with this group of pollutants. Indeed, in Europe roe deer is very often used as a target bioindicator species, since it is one of the most important hunting species with the pan-European distribution. Moreover, their mandibles are often systematically collected in different countries with the purpose of cognitive management and control, and are therefore accessible also for the research purposes.

Bioindication of the fluoride pollution may be carried out either as methods of accumulative bioindication (i.e. determination of skeletal fluoride levels, e.g. in mandibles) and/or as methods of response bioindication (e.g. macroscopic assessment of dental fluorosis as a specific morphologic change of the tooth enamel).

Measurement of the fluoride levels in mandibles is a reliable tool for the assessment of the cumulative intake of fluorides into the organisms during their entire life. Consequently, this may be a useful method for the assessment of the temporal and geographical changes in the environment. Its use is especially important in areas where fluoride load is measured rarely or is not measured at all. Finally, this method is very important also as a tool for the assessment of the efficiency of the remediation measures.

The result of the impact of fluorides on the formation and development of the enamel during tooth formation is the so-called dental fluorosis. It covers a spectrum of different enamel changes, such as opacities or discoloration of the teeth, different pitting and corrosion on the surface of the enamel, and in severe cases even the break down of the teeth. Fluorosed teeth wear down faster; consequently, the expected life span of the animals can be significantly shortened.

For the assessment of dental fluorosis, a scoring system for cervids has been developed on the basis of a similar scoring system for domestic animals (i.e. cattle, sheep). Each of three premolars and three molars (all permanent teeth) are classified with one of the numeric value ranged from 0 (no fluorosis) to 5 (increasing intensity of fluorosis). The sum of all six scores delineates the DLI (dental lesion index) and ranges from 0 to 30.

In contrast to fluoride levels in mandibles, which accumulate during the whole life of the organism, dental fluorosis is a consequence of the fluoride impact on enamel only in the time of tooth formation; therefore, fluorosis is the bioindication method for assessing the very exact past fluoride pollution. With the assessment of dental fluorosis we can, the same as with the fluoride levels, measure temporal and geographical changes in the environment, but it is a faster and cheaper method. By the assessment

of dental fluorosis it is very important to take into account the type of the tooth (because their formation can last from some months to more than a year and therefore the impact of fluorides is different); similarly, huge differences between different species (i.e. roe deer and red deer) are also highly expected.

Suitability of the ungulate (particularly roe deer) mandibles as pollution bioindicators was confirmed in the past with the determination of the strong positive correlation between the fluoride concentrations in the environment and: (i) fluoride levels in the mandibles of red/roe deer; (ii) dental fluorosis of both mentioned species.

Moreover, the use of mandibles for bioindication purposes is suitable also from the logistic and financial point of view, since mandibles are often systematically collected in different countries with the purpose of cognitive management and control. Therefore, they can be available in huge numbers with all the needed attribute and geographical data of each specific animal. The latter enables the realization of the vast-area environmental biomonitoring of fluoride pollution, which recently started in Slovenia as well.

6 Zahvala

6 Acknowledgements

Raziskava, ki je omogočila tudi nastanek pričujočega prispevka, je bila v okviru projekta »Čeljusti srnjadi kot kazalec kakovosti življenjskega okolja in pripomoček za upravljanje s populacijami« podprta s strani Javne agencije Republike Slovenije za raziskovalno dejavnost (št. projekta L7-0026) ter Termoelektrarne Šoštanj (št. pogodbe 85-08-VSO).

7 Viri

7 References

- ANDERSEN, R. / DUNCAN, P. / LINNELL, J. D. C. (ur.), 1998. The European roe deer: The biology of success.- Oslo, Scandinavian University press, 376 s.
- AOBA, T. / FEJERSKOV, O., 2002. Dental Fluorosis: Chemistry and Biology.- *Crit Rev Oral Biol Med*, 13,2: 155-170.
- APOLLONIO, M. / ANDERSEN, R. / PUTMAN, R. (ur.), 2010. European ungulates and their management in the 21st century.- Cambridge, New York, Cambridge University Press, 618 s.
- APPLETON, J. / CHESTER, J. / KIERDORF, U. / KIERDORF, H., 1996. The structure of dentine in the teeth of red and roe deer after chronic exposure to environmental fluoride.- *J Dent Res*, 75: 1173.
- APPLETON, J. / CHESTERS, J. / KIERDORF, U. / KIERDORF, H., 2000. Changes in the structure of dentine from cheek teeth of deer chronically exposed to high levels of environmental fluoride.- *Cells Tissues Organs*, 167: 266-272.
- ARNDT, U. / NOBEL, W. / SCHWEIZER, B., 1987. Bioindikatoren: Möglichkeiten, Grenzen und neue Erkenntnisse.- Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer, 388 s.
- ATSDR, 2009. CERCLA list of priority hazardous substances.- Agency for toxic substances and disease registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/> (25.11.2009).
- BAARS, A. J. / VAN BEEK, H. / SPIERENBURG, T. J. / DE GRAAF, G. J. / BEEFTINK, W. G. 1987. Fluoride pollution in a salt marsh: movement between soil, vegetation, and sheep. *BECT*, 39: 945-952.
- BARTLETT, J. D. / DWYER, S. E. / BENIASH, E. / SKOBE, Z. / PAYNE-FERREIRA, T. L., 2005. Fluorosis: A New Model and New Insights.- *J Dent Res*, 84: 832-836.
- BELLOMO, S. / AIUPPA, A. / D'ALESSANDRO, W. / PARELLO, F., 2007. Environmental impact of magmatic fluorine emission in the Mt. Etna area.- *JVGR*, 165: 87-101.
- BOULTON, I. C. / COOKE, J. A. / JOHNSON, M. S., 1994. Fluoride accumulation and toxicity in wild small mammals.- *Environ Pollut*, 85: 161-167.
- CHOUBISA, S. L., 2008. Dental fluorosis in domestic animals.- *Curr Sci*, 95,12: 1674-1675.
- DEN BESTEN, P. K., 1994. Dental fluorosis: its use as a biomarker. *Advances in Dental tissue effects of fluoride.- Adv Dent Res*, 8: 105-110.
- FEJERSKOV, O. / LARSEN, M. J. / RICHARDS, A. / BAEUM, V., 1994. Dental tissue effects of fluoride.- *Adv Dent Res*, 8: 15-31.
- FORDYCE, F. M. / VRANA, K. / ZHOVINSKY, E. / POVOROZNUK, V. / TOTH, G. / HOPE, B. C. / ILJINSKY, U. / BAKER J., 2007. A health risk assessment for fluoride in Central Europe.- *Environ Geochem Health*, 29:83-102.
- FRANZARING, J. / HRENN, H. / SCHUMM, C. / KLUMPP, A. / FRANGMEIER, A., 2006. Environmental monitoring of fluoride emissions using precipitation, dust, plant and soil samples.- *Environ Pollut*, 144: 158-165.
- GARROTT, R. A. / EBERHARDT, L. L. / OTTON, J. K. / WHITE, P. J. / CHAFFEE, M. A., 2002. A Geochemical Trophic Cascade in Yellowstone's Geothermal Environments.- *Ecosystems*, 5: 659-666.
- HARRISON, P. T. C., 2005. Fluoride in water: a UK perspective.- *J Fluorine Chem*, 126: 1448-1456.
- HELL, P. / STANOVSKY, M. / ZILINEC, M., 1995. Dentalfluorose des Rehwildes in der Region einer slowakischen Aluminiumfabrik.- *Z Jagdwiss*, 41: 117-125.
- HOROWITZ, H. S., 1998. Fluoride and enamel defects.- *Adv Dent Res*, 3,2: 143-146.
- JELENKO, I. / POKORNY, B., 2009. Čeljusti srnjadi kot bioindikator onesnaženosti okolja in pripomoček za upravljanje s populacijami. DP-20/02/09.- Velenje, ERiCo Velenje, 111. s.
- JELENKO, I. / SAVINEK, K. / POKORNY, B., 2009. Roe deer mandibles as a bioindicator of environmental pollution with fluorides: a case study from the Šalek Valley, Slovenia. V: 9th European Roe Deer Congress, Edinburgh, 6th-11th July, 2009. Abstracts for scientific sessions, s. 21.
- JELENKO, I. / JERINA, K. / POKORNY, B., 2010. Vplivi

- okoljskih dejavnikov na pojavljanje in prostorsko razporeditev zobne fluoroze pri srnjadi (*Capreolus capreolus* L.) v vzhodni Sloveniji.- Zb Gozd Lesar, 92:21-32.
- JELENKO, I. / SAVINEK, K. / BIENELLI-KALPIČ, A. / POLIČNIK, H. / POKORNY, B., 2008. Srnjad kot kazalnik kakovosti življenjskega okolja, s poudarkom na ugotavljanju onesnaženosti okolja s fluoridi z določitvijo zobne fluoroze spodnjih čeljusti. V: POKORNY, B. / SAVINEK, K. / POLIČNIK, H. (ur.). Povzetki: prispevki: 1. slovenski posvet z mednarodno udeležbo o upravljanju z divjadjo: srnjad. Velenje, Erico, s. 38-41.
- KAHAMA, R. W. / KARIUKI D. N. / KARIUKI H. N. / NJENGA L. W., 1997. Fluorosis in children and sources of fluoride around Lake Elementaita region of Kenya.- Fluoride, 30,1: 19-25.
- KARSTAD, L., 1967. Fluorosis in deer (*Odocoileus virginianus*).- Bull Wildlife Disease Assoc, 3: 42-46.
- KAY, E., 1975. Fluoride distribution in different segments of the femur, metacarpus and mandible of mule deer.- Fluoride, 8: 92-97.
- KAY, E. / TOURANGEAU, P. C. / GORDON, C. C., 1975. Industrial fluorosis in wild mule and whitetail deer from western Montana.- Fluoride, 8: 182-191.
- KAY, E. / TOURANGEAU, P.C. / GORDON, C.C., 1976. Populational variation in fluoride parameters in wild ungulates from the western United States.- Fluoride, 9: 73-90.
- KHANDARE A. L. / RAO G. S., 2006. Uptake of Fluoride, Aluminium and Molybdenum by Some Vegetables from Irrigation Water.- J Hum Ecol, 19,4: 283-288.
- KIERDORF, U., 1988. Untersuchungen zum Nachweis immissions-bedingter chronischer Fluoridintoxication beim Reh (*Capreolus capreolus* L.).- Z Jagdwiss, 34: 192-204.
- KIERDORF, U., 1991. A study of dental fluorosis in roe deer *Capreolus capreolus* L. V: BOBEK, K. / PERZANOWSKI, K. / REGELIN, W. (ur.). Global Trends in Wildlife Management.- Krakow, Warszawa, Swiat Press, s. 385-388.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H., 1989. A scanning electron microscopic study on surface lesions in fluorosed enamel of roe deer (*Capreolus capreolus* L.).- Vet Pathol, 26: 209-215.
- KIERDORF, H. / KIERDORF, U., 1997. Disturbances of the secretory stage of amelogenesis in fluorosed deer teeth: a scanning electron-microscopic study.- Cell Tissue Res, 289: 125-135.
- KIERDORF, H. / KIERDORF, U., 1999a. Reduction of fluoride deposition in the vicinity of a brown coal-fired power plant as indicated by bone fluoride concentrations of roe deer (*Capreolus capreolus*).- Bull Environ Contam Toxicol, 63: 473-477.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H., 1999b. Dental fluorosis in wild deer: its use as a biomarker of increased fluoride exposure.- Environ Monit Assess, 57: 265-175.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H., 2000a. Temporal and geographical variation in skeletal fluoride content of roe deer (*Capreolus capreolus*) from industrialized areas in Germany.- Comp Biochem Physiol, 126: 61-68.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H., 2000b. Comparative analysis of dental fluorosis in roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*): interdental variation and species differences.- J Zool, 250: 87-93.
- KIERDORF, H. / KIERDORF, U., 2000c. Roe deer antlers as monitoring units for assessing temporal changes in environmental pollution by fluoride and lead in a German forest area over a 67-year period.- Arch Environ Contam Toxicol, 39: 1-6.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H., 2000d. The fluoride content of antlers as an indicator of fluoride exposure in red deer (*Cervus elaphus*): A historical biomonitoring study.- Arch Environ Contam Toxicol, 38: 121-127.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H., 2001a. Fluoride concentrations in antler bone of roe deer (*Capreolus capreolus*) indicate decreasing fluoride pollution in an industrialized area of Western Germany.- Environ Toxicol Chem, 20,7: 1507-1510.
- KIERDORF, H. / KIERDORF, U., 2001b. Reconstruction of temporal trends in environmental pollution with fluorine and lead in the region Iserlohn/Hemer CM, (Markischer Kreis, Germany) by analyses of roe deer antlers.- Z Jagdwiss, 47,3: 201-210.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H., 2002. Assessing regional variation of environmental fluoride concentrations in western Germany by analysis of antler fluoride content in roe deer (*Capreolus capreolus*).- Arch Environ Contam Toxicol, 42: 99-104.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H., 2003. Temporal variation of fluoride concentration in antlers of roe deer (*Capreolus capreolus*) living in an area exposed to emissions from iron and steel industry, 1948-2000.- Chemosphere, 52: 1677-1681.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H., 2005. Antlers as biomonitors of environmental pollution by lead and fluoride: A review.- Eur J Wildl Res, 51: 137-150.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H., 2006. Roe and red deer antlers as bioindicators of pollution of deer habitats by lead and fluoride.- Vet arhiv, 76: 117-129.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H., BOYDE, A., 2000. Structure and mineralization density of antler pedicle bone in red deer (*Cervus elaphus* L.) exposed to different levels of environmental fluoride: a quantitative backscattered electron imaging study.- J Anatom, 196: 71-83.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H., FEJERSKOV, O., 1993. Fluoride-induced developmental changes in enamel and dentine of European roe deer (*Capreolus capreolus* L.) as a result of environmental pollution.- Arch Oral Biol, 38: 1071-1081.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H. / KREFTING, E.R., 1991. Elektronenstrahl_Mikrosonden-Untersuchung des Fluorgehaltes und der Fluorverteilung in Schmelz und Dentin fluorotischer und nicht fluorotischer backenzähne des Rehes (*Capreolus capreolus* L.). Z Jagdwiss, 37: 232-239.
- KIERDORF, H. / KIERDORF, U. / SEDLÁČEK, F., 1996. Biomonitoring der Fluoridbelastung des Lebensraumes von Wildwiederkäuern aus Immissionsgebieten Nord-böhmens (Tschechische Republik).- Z. Jagdwiss, 42: 41-52.
- KIERDORF, H. / KIERDORF, U. / SEDLÁČEK, F., 1999. Monitoring regional fluoride pollution in the Saxonian Ore mountains (Germany) using the biomarker dental fluorosis in roe deer (*Capreolus capreolus* L.).- Sci Total Environ Contam, 232: 159-168.
- KIERDORF, U. / SCHULTZ, M. / KIERDORF, H., 1994. Licht-

- und rasterelectronenmicroscopische Untersuchungen an Schmelzhypoplasien fluorotischer Rehzähne.- Z Jagdwiss, 40: 175-184.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H. / ERDELEN, M. / KORSCH, J. P., 1989. Mandibular fluoride concentration and its relation to age of roe deer (*Capreolus capreolus* L.).- Compar Biochem Physiol, 94: 783-785.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H. / ERDELEN, M. / MACHOY, Z., 1995. Mandibular bone fluoride accumulation in wild red deer (*Cervus elaphus* L.) of known age.- Comp Biochem Physiol, 110: 229-302.
- KIERDORF, H. / KIERDORF, U. / SEDLÁČEK, F. / ERDELEN, M., 1996a. Mandibular bone fluoride levels and occurrence of fluoride induced dental lesions in populations of wild red deer (*Cervus elaphus*) from central Europe.- Environ Pollut, 93: 75-81.
- KIERDORF, U. / KIERDORF, H. / SEDLÁČEK, F. / FEJERSKOV, A. O., 1996b. Structural changes in fluorosed dental enamel of red deer (*Cervus elaphus* L.) from a region with severe environmental pollution by fluorides.- J Anat, 188: 183-195.
- KIERDORF, U. / RICHARDS, A. / SEDLÁČEK, F. / KIERDORF, H., 1997. Fluoride content and mineralization of red deer (*Cervus elaphus*) antlers and pedicles from fluoride polluted and uncontaminated regions.- Arch Environ Contam Toxicol, 32: 222-227.
- KIERDORF, H. / KIERDORF, U. / RICHARDS, A. / SEDLÁČEK, F., 2000. Disturbed enamel formation in wild boars (*Sus scrofa* L.) from fluoride polluted areas in Central Europe.- Anat Rec, 259: 12-24.
- KIERDORF, H. / KIERDORF, U. / RICHARDS, A. / JOSEPHSEN K., 2004. Fluoride-induced alterations of enamel structure: an experimental study in the miniature pig.- Anat Embryol, 207: 463-474.
- KINNUNEN, H. / HOLOPAINEN, T. / RÄISÄNEN, M. L. / KÄRENLAMPI, L., 2003. Fluoride in birch leaves, ground vegetation, litter and humus in the surroundings of a fertilizer plant and apatite mine in siilinjärvi, eastern Finland.- Boreal Environment Research, 8: 185-192.
- KRŽE, B., 2000. Srnjad: biologija, gojitev, ekologija.- Ljubljana, Lovska zveza Slovenije, Zlatorogova knjižica, 271 s.
- LZS, 2009. Statistični podatki lovskih organizacij Slovenije za obdobje 1961 – 2006. Lovska zveza Slovenije (neobjavljeno).
- MACHOY, Z. / DABROWSKA, E. / NOWICKA, W. 1991. Increased fluoride content in mandibular bones of deer living in industrialized regions of Poland.- Environ Geochem Health, 13: 161-163.
- MACHOY, Z. / DABROWSKA, E. / SAMULJO, D. / OGONSKI, T. / RACZYNSKI, J. / GEBECZYNSKA, Z., 1995. Relationship between fluoride content in bones and the age in European elk (*Alces alces* L.).- Comp Biochem Physiol, 111: 117-120.
- MARKERT, B. A. / BREURE, A. M. / ZECHMEISTER, H. G. (ur.), 2003. Bioindicators & biomonitors: principles, concepts and applications.- Amsterdam, Elsevier Science, 997 s.
- MONTHERRAT CARRET, L. / PERRAT MABILON, B. / BARBEY, E. / BOULOC, R. / BOIVIN, G. / MICHELET, A. / MAGLOIRE, H., 1996. Chemical and X-ray analysis of fluoride, phosphorus, and calcium in human foetal blood and hard tissues.- Arch oral Biol, 41,12: 1169-1178.
- NEWMAN, J. R. / YU, M. H., 1976. Fluorosis in black-tailed deer.- J Wildl Dis, 12: 39-41.
- NEWMAN, J. R. / MURPHY J. J., 1979. Effects of fluoride on black-tailed deer.- Fluoride, 12: 129-135.
- NOTCUTT, G. / DAVIES, F., 1989. Accumulation of volcanogenic fluoride by vegetation: Mt. Etna, Sicily.- JVGR, 39: 329-333.
- NOTCUTT, G. / DAVIES, F., 2001. Environmental accumulation of airborne fluorides in Romania.- Environ Geochem Health, 23: 43-51.
- OZSVATH, D. L., 2009. Fluoride and environmental health: A review.- Rev Environ Sci Biotechnol, 8: 59-79.
- PINDBORG, J.J., 1970. Pathology of the Dental Hard Tissues. Copenhagen, Munksgaard, 445 s.
- PIUS, A. / VISWANATHAN, G., 2008. Determination of calcium dose for minimizing fluoride bioavailability in rabbits.- Curr Sci, 95,6: 770-773.
- POKORNY, B., 2003. Notranji organi in rogovje srnjadi (*Capreolus capreolus* L.) kot bioindikatorji onesnaženosti okolja z ioni težkih kovin. Doktorska disertacija.- Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, 193 s.
- POKORNY, B., 2006. Historical biomonitoring of environmental pollution with lead and fluorides in the Šalek Valley with the aid of roe deer antlers.- Zb Gozd Lesar, 80: 65-80.
- RICHTER, H. / KIERDORF, U. / RICHARDS, A. / KIERDORF, H., 2010. Dentin abnormalities in cheek teeth of wild red deer and roe deer from a fluoride-polluted area in Central Europe.- Ann Anat, v tisku.
- SCHULTZ, M. / KIERDORF, U. / SEDLÁČEK, F. / KIERDORF, H., 1998. Pathological bone changes in the mandibles of wild red deer (*Cervus elaphus*) exposed to high environmental levels of fluoride.- J Anat, 193: 431-442.
- SEDLÁČEK, F. / ZEMEK, F. / HERMAN, M. / KIERDORF, H. / KIERDORF, U., 2001. Fluoride load on ecosystems in western part of Krusne hory Mts. Determined by bioindication.- Ekologia, 20,1: 70-79.
- SHUPE, J. L. / OLSEN, A. E. / PETERSON H. B. / LOW, J. B., 1984. Fluoride toxicosis in wild ungulates.- JAVMA, 185: 1295-1300.
- SIMONIČ, A., 1976. Srnjad – biologija in gospodarjenje.- Ljubljana, Lovska zveza Slovenije, Zlatorogova knjižica, 606 s.
- SUTTIE, J. S. / DICKIE, R. / CLAY, A. B. / NIELSEN, P. / MAHAN, W. E. / BAUMANN, D. P. / HAMILTON, R. J., 1987. Effects of fluoride emissions from a modern primary aluminium smelter on a local population of white-tailed deer (*Odocoiles virginianus*).- J Wildl Diseases, 23: 135-143.
- TATARUCH, F. / KIERDORF, H., 2003. Mammals as biomonitors. V: MARKERT, B. A., BREURE, A. M. / ZECHMEISTER, H. G. (ur.). Bioindicators & biomonitors: principles, concepts and applications.- Amsterdam, Elsevier Science, s. 737-772.
- VIKØREN, T. / STUVE, G. / FRØSLIE, A., 1996. Fluoride exposure in cervids inhabiting areas adjacent to aluminium smelters in Norway: I. Residue levels.- J Wildl Dis, 32: 169-180.
- VIKØREN, T. / STUVE, G., 1996. Fluoride exposure in cervids inhabiting areas adjacent to aluminium smelters in Norway:

- II. Fluorosis.- J Wildl Dis, 32: 181-189.
- VIRJENT, Š. / JERINA, K., 2004. Osrednji slovenski register velike lovne divjadi in velikih zveri v sklopu novega lovsko-informacijskega sistema.- Lovec, 86: 280–281.
- VISWANATHAN, G. / JASWANTH, A., GOPALAKRISHNAN, S. / SIVA ILANGO S. 2009. Mapping of fluoride endemic areas and assessment of fluoride exposure.- Sci Total Environ, 407,5: 1579-1587.
- YANG, X. Y. / YAMADA, M. / TANG, N. / LIN, J. M. / WANG, W. / KAMEDA, T. / TORIBA, A. / HAYAKAWA, K., 2009. Long-range transport of fluoride in East Asia monitored at Noto Peninsula, Japan.- Sci Total Environ, 407,16: 4681-4686.
- WALTON, K. C. / ACKROYD, S. 1988. Fluoride in mandibles and antlers of roe and red deer from different areas of England and Scotland.- Environ Pollut, 54: 17-27.
- WEINSTEIN, L. H. / DAVISON, A. 2004. Fluorides in the Environment. Effects on Plants and animals.- Cambridge, CABI Publishing, 287 s.
- WHITFORD, G.M., 1994. Intake and metabolism of fluoride.- Adv Dent Res, 8,1: 5-14.
- WHO, 2002. Fluorides. Environmental Health Criteria 227. <http://www.inchem.org/documents/> (20.12.2009).
- ZAKRZEWSKA, H. / MACHOY-MOKRZYNSKA, A. / MATERNY, M. / GUTOWSKA, I. / MACHOY, Z., 2005. Estimation of fluoride distribution in the mandible and teeth of the red deer (*Cervus elaphus* L.) from industrially polluted areas in Poland.- Arch Oral Biol, 50,3: 309-316.
- ZEMEK, F. / HERMAN, M. / KIERDORF, H. / KIERDORF, U. / SEDLÁČEK, F., 2006. Spatial distribution of dental fluorosis in roe deer (*Capreolus capreolus*) from North Bohemia (Czech Republic) and its relationships with environmental factors.- Sci Total Environ, 370,2-3: 491-505.

