IZPOSTAVLJENOST FLUORU PREKO NEKATERIH NARAVNIH IN ANTROPOGENIH VIROV

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija, maj 2015

Komisija za oceno doktorske disertacije:

prof. dr. Milena Horvat, predsednica, Institut »Jožef Stefan«

prof. dr. Venčeslav Kaučič, član, Kemijski inštitut Ljubljana

prof. dr. Boris Žemva, član, Institut »Jožef Stefan«

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Alenka Koblar

IZPOSTAVLJENOST FLUORU PREKO NEKATERIH NARAVNIH IN ANTROPOGERNIH VIROV

Doktorska disertacija

EXPOSURE TO FLUORINE THROUGH SOME NATURAL AND ANTHROPOGENIC SOURCES

Doctoral Dissertation

Mentorica: doc. dr. Maja Ponikvar-Svet

Ljubljana, Slovenija, maj 2015

Kazalo

Povzetek ..... **IX**

Abstract ..... **XI**

Seznam kratic ..... **XIII**

1 Uvod **1**
1.1 Fizikalne in kemijske lastnosti fluora 1
1.2 Fluor v okolju 2
1.2.1 Naravni in antropogeni viri fluora 2
1.2.1.1 Atmosfera 2
1.2.1.2 Voda 3
1.2.1.3 Zemlja 3
1.3 Vpliv antropogenih virov na povišane vsebnosti fluora v zemlji 3
1.4 Esencialnost fluora 4
1.5 Toksičnost fluora 6
1.6 Primeren dnevni vnos fluora 8
1.7 Najpomembnejši viri fluora za človeka 9
1.7.1 Pitna voda 9
1.7.2 Hrana in napitki 10
1.7.3 Sredstva za nego zob in ustne votline 11
1.7.4 Drugi fluorirani pripravki 12
1.8 Rastline, ki privzemajo fluor 12
1.8.1 Privzemanje fluora iz zraka oziroma zemlje 12
1.8.1.1 Dejavniki, ki vplivajo na dostopnost fluora rastlinam 13
1.8.1.2 Prehajanje fluora iz zemlje v rastlino 13
1.8.2 Čajevec 14
1.8.2.1 Proizvodnja čaja 15
1.8.2.2 Poraba in način priprave 15
1.8.2.3 Zdravilni učinki 15
1.8.2.4 Vrste čaja 16
1.8.2.4.1 Vrste čaja glede na obliko pakiranja 16
1.8.2.4.2 Vrste čaja glede na stopnjo fermentacije 17
1.8.2.5 Privzemanje fluora in vsebnost fluorida v čajnih listih in čajnih poparkih 18
1.8.3 Fitotoksičnost fluora 19
1.8.3.1 Morfološke in fiziološke spremembe 19
1.9 Rast rastlin na onesnaženi zemlji 20
1.9.1 Biomonitoring in bioindikatorji fluora 20
1.9.2 (Hiper)akumulacija in fitoremediacija 21
1.10 Določanje fluora 22

1.10.1 Analizne metode za določanje fluora 22
1.10.2 Priprava vzorcev na analizo 25
1.10.2.1 Določanje fluora 25
1.10.2.2 Določanje fluorida 25

2 Namen 27

3 Materiali in metode 29
3.1 Reagenti in referenčni materiali 29
3.2 Aparature 29
3.3 Postopki 30
3.3.1 Izbira reprezentativnih vzorcev 30
3.3.1.1 Pravi čaji 30
3.3.1.2 Zeliščni čaji 33
3.3.1.3 Zemlja, koruzni listi, koruzne metlice in zelišča iz s fluorom (ne)obremenjenega okolja 33
3.3.1.4 Lončni poskus – gojenje kopriv na substratu, onesnaženem z NH_4F 35
3.3.2 Priprava vzorcev 37
3.3.2.1 Določanje biomase in vlage substrata 37
3.3.2.2 Določanje pH 38
3.3.2.3 Določanje fluorida 38
3.3.2.4 Določanje fluora 38
3.3.3 Določanje morfologije kopriv 39
3.3.4 Določanje fitoremediacijskih sposobnosti 39
3.3.5 Določanje fluorida s fluoridno ionsko selektivno elektrodo (F-ISE) 39
3.3.6 Statistična analiza 40

4 Rezultati in razprava 41
4.1 Zagotavljanje sistema kakovosti meritev 41
4.2 Pravi čaji 43
4.2.1 Vsebnost fluora v čajnih listih in vsebnost fluorida v čajnih poparkih 43
4.2.2 Učinkovitost sproščanja fluora v čajne poparke 45
4.2.3 Vpliv temperature vode in časa namakanja na učinkovitost sproščanja fluora 46
4.2.4 Učinkovitost sproščanja fluorida pri pripravi zaporednih poparkov 46
4.2.5 Prispevek pitja čajev k dnevnemu vnosu fluora v človeški organizem 48
4.3 Učinek plinastih fluoridov na vsebnost fluora v zemlji, koruzi in zeliščih 51
4.3.1 Vsebnost fluora v zemlji in koruzi iz okolice Talum d. d. in čistega okolja 51
4.3.2 Vsebnost fluora v zeliščih iz okolice Talum d. d. in čistega okolja 52
4.4 Lončni poskus s koprivo 56
4.4.1 Substrat 57
4.4.2 Morfologija kopriv po zaključku lončnega poskusa 60
4.4.3 Vsebnost fluora v koprivi po zaključku lončnega poskusa 65
4.4.4 Bioakumulacijski in translokacijski faktorji koprive 68
4.4.5 Fitoremediacijski potencial koprive 70

5 Zaključki 71

6 Zahvale 75

7 Literatura in viri 77

Bibliografija..... 91

Kazalo slik 93

Kazalo tabel..... 95

Povzetek

Fluor je eden izmed najpogostejših elementov v zemeljski skorji in predstavlja neizogiben del človekovega življenja. Fluor, v obliki fluorida, se že vrsto let uporablja za preprečevanje in zaviranje zobnega kariesa. Primeren dnevni vnos fluora iz vseh virov naj bi bil 0,05 mg kg telesne mase^{-1} za vse starosti višje od 6 mesecev. Pri tem odmerku naj namreč še ne bi prišlo do pojava neželenih stranskih učinkov, ki so povezani s fluorom; pojav zobne fluoroze pri otrocih ali kostne fluoroze tako pri otrocih kot odraslih. Meje med koristnimi in škodljivimi učinki fluora pa so ozke. Zobno fluorozo so opazili že pri dnevnih odmerkih, ki so nižji oziroma le za malenkost presegajo primeren dnevni odmerek fluorida, to je 0,03–0,04 in 0,05–0,07 mg kg telesne mase^{-1}. Najpomembnejši viri fluora za človeka so pitna voda, napitki, sredstva za nego zob in ustne votline s fluoridi ter hrana. V nekaterih, predvsem industrijskih področjih, so pomembni tudi drugi antropogeni viri fluorida.

Med napitki, ki lahko vsebujejo večje vsebnosti fluora, izstopa pravi čaj. Čajevec (*Camelia sinensis*) je edina doslej znana rastlina, ki lahko privzema fluor iz zemlje in ga akumulira v nadzemnih delih rastline. Med pripravo čajnih poparkov se fluor sprošča v poparke v obliki fluorida, zato lahko uživanje pravega čaja znatno prispeva k dnevnemu vnosu fluora. Da bi ugotovili, kako smo preko pitja pravega čaja fluoru izpostavljeni Slovenci, smo določili vsebnosti fluora v čajnih listih in fluorida v čajnih poparkih nekaterih najbolj pogosto uživanjih pravih čajih. Vsebnosti fluora v čajnih listih so bile med 53 in 435 mg kg^{-1}, v poparkih pa med 0,31 in 3,55 mg l^{-1}. Učinkovitost sproščanja fluora iz črnih, oolong in zelenih čajev je bila v primeru enkratnih poparkov 55–90 % in v primeru ponavljajočih poparkov 74–100 %; vrsta čaja in oblika pakiranja čaja na sproščanje fluora nista vplivala. Sproščanje je bilo manj učinkovito le pri Pu'erh čajih; 21–38 % v primeru enkratnih in 37–59 % v primeru ponavljajočih poparkov. Ocena izpostavljenosti fluoru preko pitja pravega čaja je pokazala, da je mogoče z zaužitjem petih skodelic čaja (1 liter) v organizem vnesti 9–101 % primernega dnevnega vnosa fluora (preračunano na osebo z maso 70 kg). Če se vnosu fluora s čajem prišteje tudi vnos s hrano, lahko celoten vnos predstavlja 25–175 % primernega dnevnega vnosa v nefluoriranih področjih in 35–210 % v fluoriranih področjih. Kroničen vnos tako visokih odmerkov fluora je že mogoče povezati s pojavom s fluorom povezanih stranskih učinkov na zdravje.

Slovenci smo tradicionalno znani kot porabniki zeliščnih čajev, zato smo preverili, kakšne so vsebnosti fluora v nekaterih komercialnih zeliščnih čajih in njihovih poparkih. Vsebnost fluora v analiziranih čajih je bila, z izjemo kamilice (29 mg kg^{-1}), koprive (16 mg kg^{-1}), hibiskusa (13 mg kg^{-1}) in mete (12 mg kg^{-1}), nižja od vsebnosti fluora v večini rastlin (< 10 mg kg^{-1}). Ne glede na različno učinkovitost sproščanja fluora iz zeliščnih čajev (12–89 %), pa poparki zeliščnih čajev niso vsebovali več kot 0,052 mg l^{-1} fluorida. Dnevni vnos fluora s pitjem zeliščnih čajev je tako zanemarljiv.

Glede na povišane vsebnost fluora, predvsem v kamilici in koprivi, smo preverili, katero od zelišč, ki se lahko uporabljajo za pripravo čajev, bi lahko privzemalo večje količine fluora. Pri vzorčenju zelišč smo se osredotočili na okolico talilnice aluminija Talum d. d. v Kidričevem, kjer so v letu 2005 na okoliški koruzi opazili nekrotične spremembe tkiva, ki so bile značilne za spremembe tkiva, ki jih na rastlinah povzroča

fluorid. V vzorcih koruznih metlic in listov so bile vsebnosti fluora močno povišane in so presegale največjo dovoljeno vsebnost v živalski krmi (30 mg kg^{-1}). Z namenom raziskati vpliv fluora v zemlji na vsebnost fluora v rastlinah smo raziskavo nadaljevali v letu 2010. V okolici Talum d. d. smo odvzeli vzorce koruznih listov, zelišč za pripravo zeliščnih čajev in vzorce zemlje. Pridobili smo tudi vzorce iz neobremenjenega okolja. V vseh vzorcih smo določili vsebnosti fluora. Vsebnosti fluora v koruznih listih, odvzetih leta 2010, je bila v obremenjenem statistično pomembno nižja kot v letu 2005, hkrati pa tudi statistično pomembno višja (14–28 mg kg^{-1}) od vsebnosti v koruznih listih iz neobremenjenega okolja (6–9 mg kg^{-1}). Rezultati so potrdili domnevo, da so bile nekrotične spremembe koruze leta 2005 res posledica izpusta plinastih fluoridov. Pokazali so tudi, da je koruza do določene mere zmožna privzemanja fluora iz zemlje. Določitve vsebnosti fluora v nekaterih zeliščih, ki se uporabljajo za pripravo čaja, nabranih na vplivnem območju Talum d. d., so pokazale povišane vsebnosti fluora v koprivi. Vsebnosti fluora v koprivah s področij v smeri vetra oziroma iz smeri vetra, 71–100 mg kg^{-1} *vs.* 10–28 mg kg^{-1}, so bile statistično pomembno različne. Na vsebnost fluora v koprivi sta imela največji vpliv vsebnost fluorida v zemlji in smer vetra, manjši pa je bil vpliv vsebnosti fluora v zemlji in pH zemlje.

Glede na visoke vsebnosti fluora, določene v komercialnem koprivnem čaju in koprivah z vplivnega območja Talum d. d., smo raziskali akumulacijske sposobnosti koprive za fluor. Izvedli smo lončni poskus gojenja koprive na substratu, onesnaženem z dodatkom amonijevega fluorida (0–600 mg NH_4F kg^{-1} substrata), ki je zagotovil vir fluora v obliki fluorida. Opazovali smo vpliv dodanega NH_4F na pH substrata in na vsebnosti fluorida v substratu, morfološke spremembe kopriv oziroma odziv kopriv na stres ter vpliv dodanega NH_4F na maso korenin, listov in stebel oziroma na vsebnost fluora v koreninah, listih in steblih koprive. Spremembe v vsebnostih fluorida in v pH vrednostih substrata med poskusom, glede na stopnje onesnaženja substrata z NH_4F, je mogoče opisati s sigmoidno krivuljo. Med pH vrednostnimi substrata in kontrolnimi substrati ni bilo statistično pomembnih razlik. Vsebnosti fluorida v substratu, kjer so rasle koprive, so bile statistično pomembno nižje (8–22 %), kot v kontrolnih substratih. Statistično pomembno nižje vsebnosti fluorida v substratih v primerjavi s kontrolnimi substrati, je mogoče pripisati privzemanju fluorida s strani koprive. Vsebnosti fluora v koprivi so bile do 19-krat višje, kot so običajne vsebnosti fluora v večini rastlin. Največ fluora se je akumuliralo v listih (110–235 mg kg^{-1} oziroma 54–158 μg $rastlino^{-1}$), manj pa v koreninah (60–217 mg kg^{-1} oziroma 24–122 μg $rastlino^{-1}$) in steblih (15–43 mg kg^{-1} oziroma 4–14 μg $rastlino^{-1}$). Tako vsebnosti kot mase fluora v listih, koreninah in steblih glede na stopnjo onesnaženosti substrata z NH_4F (oziroma glede na vsebnost F^- v substratu) se prilegajo polinomom tretje stopnje. Sposobnost rasti in cvetenja ter posledično razmnoževanje koprive skupaj z bioakumulacijskim faktorjem, višjim od 4,7, in translokacijskim faktorjem, višjim od 1,4 pri vseh stopnjah onesnaženja substrata z NH_4F, potrjujejo, da je kopriva akumulator fluora, ki jo je mogoče uporabljati tudi kot pasivni bioindikator. Ocena fitoremediacijskega potenciala je pokazala, da ima kopriva visok potencial za fitoremediacijo po mehanizmu fitoekstrakcije s fluoridi onesnaženih zemelj. Na območju enega hektara je mogoče iz vrhnje plasti zemlje (≈ 20 cm), z uporabo kopriv, v samo 75 dneh odstraniti 0,36–0,77 kg fluorida. To je več, kot so običajne najnižje vsebnosti fluorida (≈ 0,13 kg) in med 4,6–9,9 % najvišjih vsebnostih fluorida (≈ 7,8 kg) v zgornjih plasteh normalnih zemelj.

Abstract

Fluorine is one of the most abundant elements in the earth's crust, and as such is an inevitable part of a person's life. Fluorine, in the form of fluoride, is used in prevention of dental caries. The adequate intake (AI) of fluorine from all sources is set at 0,05 mg day^{-1} kg body weight; this intake is recommended for all ages over 6 months because that high intakes are associated with no known, unwanted health effects; development of dental fluorosis in children or skeletal fluorosis in both children and adults. There is a narrow margin between beneficial and harmful effect; dental fluorosis was observed even at daily intakes lower (0.03–0.04 mg kg^{-1}) or a little higher (0.05–0.07 mg kg^{-1}) than AI. Major sources of fluorine for humans are drinking water, beverages and dentifrices. Daily intake from food can be also of concern. In some environments, especially in industry districts, some other anthropogenic sources are of concern.

Tea is one of the beverages, which can contain higher fluorine contents. Tea plant (*Camellia sinensis*) is the only plant known to take up fluorine from the soil and accumulate it in the leaves, from where it is easily released, in the form of fluoride, during infusion. Contribution of tea to the daily fluorine intake can be therefore significant. Fluorine levels in tea leaves and fluoride levels of tea infusions of some commercially available teas in Slovenia were determined. Fluorine levels were 53–435 mg kg^{-1}, while fluoride levels of tea infusions ranged between 0.31 and 3.55 mg l^{-1}. There were no significant differences in leaching efficacies of fluorine between black, oolong and green teas; efficacies, as determined for continuous and repeated infusions, were 55–90 % and 74–100 %, respectively. Leaching efficacy of fluorine from pu'erh tea was significantly lower; 21–38 % for continuous infusions and 37–59 % for repeated infusions. Consumption of five tea cups (1000 ml) represents 9–101 % of daily AI (for an adult person weighting 70 kg). If to this also intake from food is added, 25–175 % daily AI in nonfluoridated and 35–210 % of daily AI in fluoridated areas can be reached. Chronic exposure to that high fluorine levels can be already associated with fluorine related health effects.

Slovenians are known as consumers of higher amounts of herbal teas. Fluorine contents in some commercially available herbal teas and their infusions were determined. The contents of fluorine determined were, with the exception of chamomile (29 mg kg^{-1}), nettle (16 mg kg^{-1}), hibiscus (13 mg kg^{-1}) and mint (12 mg kg^{-1}), lower than fluorine contents in most plants (< 10 mg kg^{-1}). Although different leaching efficacies of fluorine were observed (12–89 %), fluoride levels in tea infusions were not higher than 5.2 mg l^{-1}, which makes a contribution to the daily intake of fluorine minor.

In view of the increased fluorine contents, in particular in chamomile and nettle, it was decided to investigate, whether any herbs used for preparing tea infusions can uptake higher quantities of fluorine. Surrounding of aluminum smelter Talum d. d. near Kidričevo was chosen as experimental environment. Necrotic changes of the maize typical for injuries caused by gaseous fluorides were observed in autumn of 2005 in the surrounding of Talum d. d. Determined fluorine levels in male flowers heads and in the leaves were significantly higher than allowed contents of fluorine in animal fodder (30 mg kg^{-1}).

The study was continued in the year 2010 with the aim to investigate the influence of fluorine in the soil on the contents of fluorine in plants. For this purpose the samples of the soil, maize leaves and of tea herbs grown in the vicinity of Talum d. d. were taken. Samples from uncontaminated environment were also obtained. The contents of fluorine determined in maize laves were significantly lower than in 2005, but at the same time significantly higher than in the samples from uncontaminated environment (14–28 mg kg^{-1} *vs.* 6–9 mg kg^{-1}). This testifies that necrotic changes of the maize, as observed in the year 2005, were caused by uncontrolled release of gaseous fluorides and also that the maize is able to take up some fluorine from the soil.

The contents of fluorine determined in herbs from the vicinity of Talum d. d. showed increased contents of fluorine in nettle; the contents of fluorine determined in the nettle grown in the area of the dominant wind were significantly higher than contrary to dominant wind direction, 71–100 mg kg^{-1} and 10–28 mg kg^{-1}, respectively. Fluorine contents in the nettle have been shown to be dependent mostly on fluoride contents in the soil and on wind direction, while fluorine contents in the soil and its pH have smaller effect.

In view of the increased contents of fluorine determined in commercially available nettle tea, and in nettle grown in the vicinity of Talum d. d., it was decided to investigate accumulation properties of the nettle for fluorine. Accumulation properties were studied in a pot experiment; nettles were left grown on commercially available substrate contaminated with addition of ammonium fluoride (0–600 mg NH_4F kg^{-1} substrate), which provided a source of fluorine in the form of fluoride. The effect of NH_4F to the pH of the substrate and to the fluoride contents of substrate were monitored. Morphological changes of the nettles, stress syndrome response of the plants and the impact of added NH_4F to the masses of roots, stems and leaves were observed. Accumulation of fluorine in roots, leaves and stems were also examined. Changes in fluoride contents of the substrate and its pH in the dependence on the NH_4F contents of substrates can be best described by sigmoidal fit.

There were no statistically significant differences in pH values between samples and controls, while fluoride levels of substrates where nettles were grown, were statistically significantly lower (8–22 %) than of controls (substrates without plants), which can be explained by uptake of fluoride from the substrate by nettles.

The contents of fluorine in the nettle were 19-times higher than fluorine levels in most plants. The higher levels were determined in leaves (110–235 mg kg^{-1} *vs.* 54–158 μg $plant^{-1}$), followed by roots (60–217 mg kg^{-1} *vs.* 24–122 μg $plant^{-1}$) and stems (5–43 mg kg^{-1} *vs.* 4–14 μg $plant^{-1}$). Both, masses and contents of fluorine in leaves, stems and roots, can be with respect to the NH_4F contents of the substrate, fitted to the polynomial function of degree three.

The ability of the nettle to grow and flower (and to multiply) together with bioaccumulation factor higher than 4.7 and translocation factor higher than 1.4, through the entire investigated treatment range of substrate with NH_4F, testify that nettle is fluorine accumulator, which can be used as a passive fluorine bioindicator. An estimation of phytoremediation potential discovered that nettle has a promising potential in fitoremediation of fluoride polluted soil according to the mechanism of fitoextraction. As estimated, by using nettle, it is possible to remove from the top layer of soil (≈ 20 cm) of 1 ha between 0.36 and 0.77 kg of fluoride in only 75 days. This is higher than are usual the lowest contents of fluoride in the soil (≈ 0.13 kg) and 4.6–9.9 % of the highest contents of fluoride (≈ 7.8 kg) in the top layer of soil.

Seznam kratic

ACGIH	=	ang. American Conference of Governmental Industrial Hygienists
AI	=	ang. adequate intake, primeren vnos
Al	=	aluminij
ARRS	=	Agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije
ARSO	=	Agencija Republike Slovenije za okolje
ATSDR	=	ang. The Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BAF	=	bioakumulacijski faktor
CBS	=	citrate buffer solution
CDTA	=	diaminociklohеksatetraocetna kislina
CFC	=	klorofluorokarboni
CRM	=	certificiran referenčni material
DRI	=	ang. dietary reference intakes
EAR		ang. estimated average requirement, ocenjen povprečni vnos
E^0	=	standardni redoks potencial
ECB	=	ang. The European Chemicals Bureau
EFSA	=	ang. European Food Safety Authority
EU	=	ang. European Union, Evropska skupnost
EVM	=	ang. Expert Group on Vitamins and Minerals
F	=	celotni fluor
F^-	=	prosti fluor oziroma fluorid
FAOstat	=	ang. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Mednarodna organizacija za hrano
FDA	=	ang. The Food and Drug Administration
FF	=	ang. flowering factor, faktor cvetenja
F-ISE	=	fluoridna ionsko-selektivna elektroda
IAEA	=	ang. International Atomic Energy Agency, Mednarodna agencija za jedrsko energijo
IE_1	=	ionizacijska energija
IPCS	=	ang. International Programme on Chemical Safety (WHO)
IUPAC	=	ang. The International Union of Pure and Applied Chemistry, Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo
K.Š.	=	koordinacijsko število
LOD	=	ang. limit of detection, meja zaznavnosti
LOQ	=	ang. limit of quantification, meja kvantitativne določitve
MKA	=	ang. multiple known addition method, metoda večkratnega standardnega dodatka
NIST	=	ang. National Institute of Standards and Technology, Nacionalni inštitut za standarde in tehnologijo
OF	=	ang. outgrowth factor, faktor izrasti
RDA		angl. recommended dietary allowances, priporočen dnevni vnos
r_{cov}	=	kovalentni radij
r_v	=	van der Waalsov radij
RS	=	Republika Slovenija
RSD	=	relativni standardni odmik
TF		translokacijski faktor
TISAB	=	ang. total ionic strenght adjustment buffer
SCHER	=	ang. Scientific Committee on Health and Environmental Risks of the European Community
S. D.	=	ang. standard deviation, standardni odmik
USEPA	=	ang. The United States environmental protection agency
USDA	=	ang. Unitet States department of agriculture
WHO		ang. World Health Organization, Svetovna zdravstvena organizacija

χ^P = elektronegativnost po Paulingu,

1 Uvod

1.1 Fizikalne in kemijske lastnosti fluora

Element fluor z atomsko maso 18,998 je bledo rumen plin, ki sodi v skupino halogenov. Je kemijsko najbolj reaktiven element z enim samim oksidacijskim stanjem (–1). Glavni razlog za veliko reaktivnost je razmeroma majhna energija vezi – atoma se zaradi bližine treh neveznih elektronskih parov odbijata, zato potekajo reakcije s fluorom hitro in burno. Têrmin fluor (F) se uporablja za poimenovanje elementa v katerikoli obliki in têrmin fluorid za poimenovanje prostega anorganskega fluorida ($F^–$), na katerega se odziva fluoridna ionskoselektivna elektroda (F-ISE). Elementarni fluor je prvi izoliral Moissan leta 1886 z elektrolizo z uporabo platinskih elektrod iz razredčene raztopine kalijevega fluorida v brezvodnem vodikovem fluoridu (Greenwood & Earnshaw, 1997). Najpomembnejše fizikalne in kemijske lastnosti fluora so prikazane v tabeli 1.

Tabela 1: *Fizikalne in kemijske lastnosti fluora*.

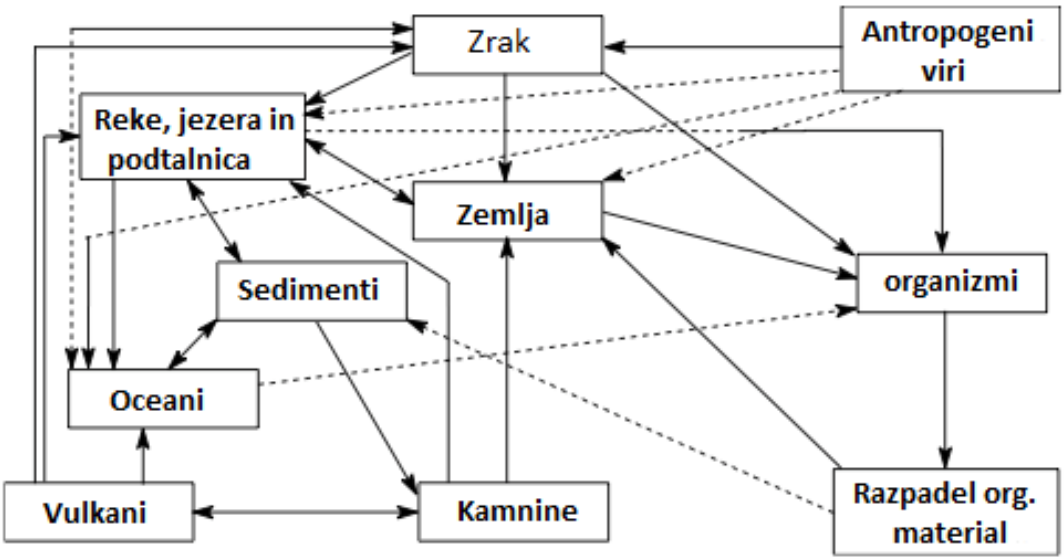
Lastnost	
Simbol	F
Vrstno število	9
Elektronska konfiguracija	[He] $2s^2$ $2p^5$
Atomska masa	18,998
Tališče (°C)	– 220
Vrelišče (°C)	– 188
Standardni redoks potencial, E^0 (V)	2,87
Ionizacijska energija, IE_1 (kJ $mol^{–1}$)	1681
Kovalentni radij, r_{cov} (pm)	71
Ionski radij (za ion $X^–$ v trdnem stanju s K.Š. 6) (pm)	133
Van der Waalsov radij, r_v (pm)	135
Elektronegativnost po Paulingu, χ^P	4,0

Fluor je močan oksidant. Direktno reagira z vsem elementi, razen z dušikom (N_2) in nekaterimi lažjimi žlahtnimi plini. Tvori tako ionske kot kovalentne spojine. Majhnost in visoka elektronegativnost fluoridnega liganda, šibka energija vezi v fluoru (F_2) in tvorba zelo močnih vezi fluoridnega liganda z drugimi elementi so poglaviten razlog, da fluor reagira z večino elementov periodnega sistema že pri sobni temperaturi. Ker je fluor bolj elektronegativen od kisika, ne tvori oksidov, ampak kisikove fluoride. Edina oksokislina fluora (HOF) je pri sobni temperaturi nestabilna. Z ostalimi halogeni tvori medhalogenske spojine, tvori pa tudi polihalogenidne anione. Fluoridni ion zaradi prisotnosti prostih elektronskih parov reagira kot Lewisova baza in tvori z močnimi Lewisovimi kislinami kompleksne ione, z organskimi snovmi pa reagira kot nukleofil (Atkins & Jones, 2008; Brenčič, Lazarini, & Žot, 1997; Greenwood & Earnshaw, 1997).

1.2 Fluor v okolju

1.2.1 Naravni in antropogeni viri fluora

Fluora v naravi zaradi velike reaktivnosti ni mogoče najti v prostem stanju oziroma v elementarni obliki, ampak le vezanega v spojine. Najpomembnejši naravni viri fluorida so preperevanje in raztapljanje mineralov, bogatih s fluorom, in sproščanje plinastih fluoridov z vulkanskimi izbruhi (0,06–6 Mt leto^{-1}) ter morskimi aerosoli (20 kt leto^{-1}) (Coleman, Mascarenhas, & Rumsby, 2005; Symonds, Rose, & Reed, 1988). Med antropogenimi viri fluorida prevladujejo izpusti pri izgorevanju premoga ter izpusti procesnih vod in odpadkov iz različnih industrijskih procesov; jeklarska industrija, proizvodnja aluminija, bakra in niklja, proizvodnja in uporaba fosfatnih gnojil, steklarska, opekarska in keramična industrija, industrija lepil in drugi. Kroženje fluorida v naravi je prikazano na sliki (Slika 1).



Slika 1: *Kroženje fluorida v naravi*; polne puščice predstavljajo neposreden vpliv, črtkane pa posreden. Slika povzeta po WHO (2002).

1.2.1.1 Atmosfera

Iz različnih naravnih in antropogenih virov se v atmosfero sproščajo fluoridi v obliki plinastih (večinoma HF, CF_4, C_2F_6 in SiF_4) in prašnih delcev (Na_3AlF_6, $Na_5Al_3F_{14}$, CaF_2, AlF_3 in NaF) (WHO, 2002). Pomemben antropogen vir fluora v atmosferi so tudi CFC spojine (klorofluoroogljiki). Razporeditev v atmosferi je odvisna predvsem od jakosti izpustov, podnebnih dejavnikov, topografije in od njihove velikosti in reaktivnosti (Davis, 1972; Low & Bloom, 1988).

Vsebnost fluorida v zraku je navadno nižja od 0,1 μg m^{-3}, v bližini antropogenih virov pa vsebnosti navadno ne presegajo 2–3 μg m^{-3} (WHO, 2002).

Emisije plinastih fluoridov iz antropogenih virov onesnaževanja so v Sloveniji nadzorovane na podlagi krovnega dokumenta »Uredba o emisiji snovi v zrak iz nepremičnih virov onesnaževanja« (Uradni list RS, št. 31/2007, uredba 1697) in ustreznih poddokumentov – uredb, ki prepisujejo mejne vrednosti emisij fluora oziroma fluora v obliki HF v zrak. Uredba o emisiji snovi v zrak iz nepremičnih virov onesnaževanja omejuje mejno koncentracijo fluora in njegovih spojin, izraženih kot HF, na 3 mg m^{-3} (Uradni list RS, št. 31/2007, uredba 1697). Emisija iz naprav za proizvodnjo aluminija z

elektrolitskim postopkom naj ne bi presegala 1 mg m^{-3} (Uradni list RS, št. 34/2007, uredba 1839 in Uradni list RS, št. 73/1994, uredba 2608).

1.2.1.2 Voda

Vsa voda vsebuje fluorid vsaj v sledovih, vsebnost pa je odvisna tako od naravnih (vrsta in poroznost kamnin in zemlje, preko katerih teče voda, razpoložljivost in topnost fluoridnih mineralov, čas zadrževanja, temperatura, pH in prisotnosti drugih elementov, ki lahko vežejo fluorid), kot tudi od antropogenih dejavnikov (ATSDR, 2003).

Vsebnosti fluorida v morski vodi so običajno višje od vsebnosti v sladki vodi in se gibljejo med 0,8 in 1,5 mg l^{-1} (ATSDR, 2003; WHO, 1994). V neonesnaženih tekočih sladkih vodah so vsebnosti med 0,01 in 0,3 mg l^{-1}(ATSDR, 1993; WHO, 2002). Povišane vsebnosti fluorida v vodi je pričakovati predvsem ob vznožjih višjih gora ter na področjih, kjer je bilo nekoč morje. Prav tako poročajo o povišanih vsebnostih na področjih iz vulkanskih in granitnih kamnin ter na področju iz gnajsa (WHO, 2006). Zaradi večjega vpliva kamnin je običajno več fluorida tudi v podtalnici. Na področjih z visokimi vsebnostmi naravno prisotnega fluorida so lahko vsebnosti fluorida v površinskih vodah višje od 1 mg l^{-1}, pri izvirih in v gejzirjih pa tudi do 50 mg l^{-1} (WHO, 2002).

Pitna voda predstavlja enega najpomembnejših virov fluora za človeka. Zaradi nizkih vsebnosti fluorida v nekaterih virih pitne vode in z namenom preprečevanja kariesa pitno vodo v nekaterih področjih fluorirajo.

1.2.1.3 Zemlja

Zemlja ima pomembno vlogo v kroženju fluora, saj predstavlja vir fluora tako rastlinam in živalim kot tudi človeku. Na vsebnost fluora v zemlji najbolj vpliva sestava kamnin. Povečane vsebnosti so lahko tudi posledica posedanja antropogenih virov plinastih fluoridov in večletne uporabe umetnih fosfatnih gnojil.

Fluor, v kombinaciji s halogeni v obliki halidov, sestavlja približno 0,065 % zemeljske skorje in je po pogostosti nahajanja na 13. mestu (O'Donnell, 1975). Med najpomembnejšimi minerali so fluorit (CaF_2), kriolit (Na_3AlF_6), topaz ($Al_2(SiO_4)F_2$) in apatit ($Ca_5(PO_4)_3(OH,F,Cl)$). Vsebnost fluora v zemlji je precej različna, in sicer od manj kot 100 mg kg^{-1} do nekaj tisoč mg kg^{-1} (Kabata-Pendias, 2001), povprečna vsebnost pa je med 100 in 600 mg kg^{-1} (Davison & Weinstein, 2006).

Kljub visokim vsebnostim fluora v določenih tipih zemlje je samo 0,05–0,5 % le-tega prisotnega v obliki fluorida (Álvarez-Ayuso, Giménez, & Ballesteros, 2011; Koblar, Tavčar, & Ponikvar-Svet, 2011). Fluorid je edina oblika fluora, ki jo ljudje, rastline in živali lahko privzemajo. Na vsebnost fluorida v zemlji najbolj vplivajo razpoložljivost in topnost fluoridnih mineralov, prisotnost gline in organskega materiala, pH, ionska moč, ter prisotnost ionov aluminija, kalcija ali železa, s katerimi lahko fluorid tvori netopne komplekse (Barrow & Ellis, 1986; Larsen & Widdowson, 1971; Omueti & Jones, 1977; Peek & Volk, 1985).

1.3 Vpliv antropogenih virov na povišane vsebnosti fluora v zemlji

V okolici tovarn, v katerih med proizvodnim procesom prihaja do emisij plinastih fluoridov, so lahko vsebnosti fluora in fluoridov v zemlji in vodi povečane. Do povečanja prihaja zaradi posedanja trdih delcev (večinoma AlF_3, Na_3AlF_6, CaF_2), izpiranja plinastih fluoridov in razgradnje rastlinskega materiala onesnaženega s plinastimi fluoridi (Polomski, Flühler, & Blaser, 1982). Skjelkvåle (Skjelkvåle, 1994) poroča o 10-krat višji koncentraciji fluorida v vodi v bližini tovarne aluminija v primerjavi z običajnimi vsebnostmi; na oddaljenosti 5 km so te vrednosti primerljive z ozadjem. Poročajo tudi o povišani vsebnosti fluora v zemlji v oddaljenosti kar do 30 km v smeri vetra od tovarne

aluminija (Arnesen, Abrahamsen, Sandvik, & Krogstad, 1995) .

Tudi fosfatna gnojila vsebujejo dokaj visok delež fluora, saj fosfatna ruda vsebuje v povprečju 3–4 % fluora. Pri pripravi fosfatnih gnojil se 45–60 % tega fluora sprosti v hlapni obliki, 30–45 % ga ostane v trdni obliki v sadri, 5–10 % pa ga ostane kot nečistoča v končnem gnojilu (Denzinger, König, & Krüger, 1979). Dolgoletna uporaba fosfatnih gnojil tako prispeva k dvigu vsebnosti fluora in fluorida v zemlji. Največ ga ostane v zgornjih nekaj centimetrih zemlje, povišane pa so tudi vsebnosti v nižjih plasteh zemlje (do 50 cm). Stevens & McLaughlin (1999) sta poročala, da je uporaba fosfatnih gnojil v zadnjih 50 letih povzročila 3–4-kratno zvišanje vsebnosti fluora v površinski plasti zemlje. Po podatkih iz literature (Loganathan, Hedley, Wallace, & Roberts, 2001), je v Novi Zelandiji dolgotrajna (do 40 let) nekontrolirana uporaba fosfatnih gnojil (2–15 kg fluora ha^{-1} $leto^{-1}$) povzročila dvig vsebnosti fluora v površinski plasti zemlje za več kot 100 mg kg^{-1}.

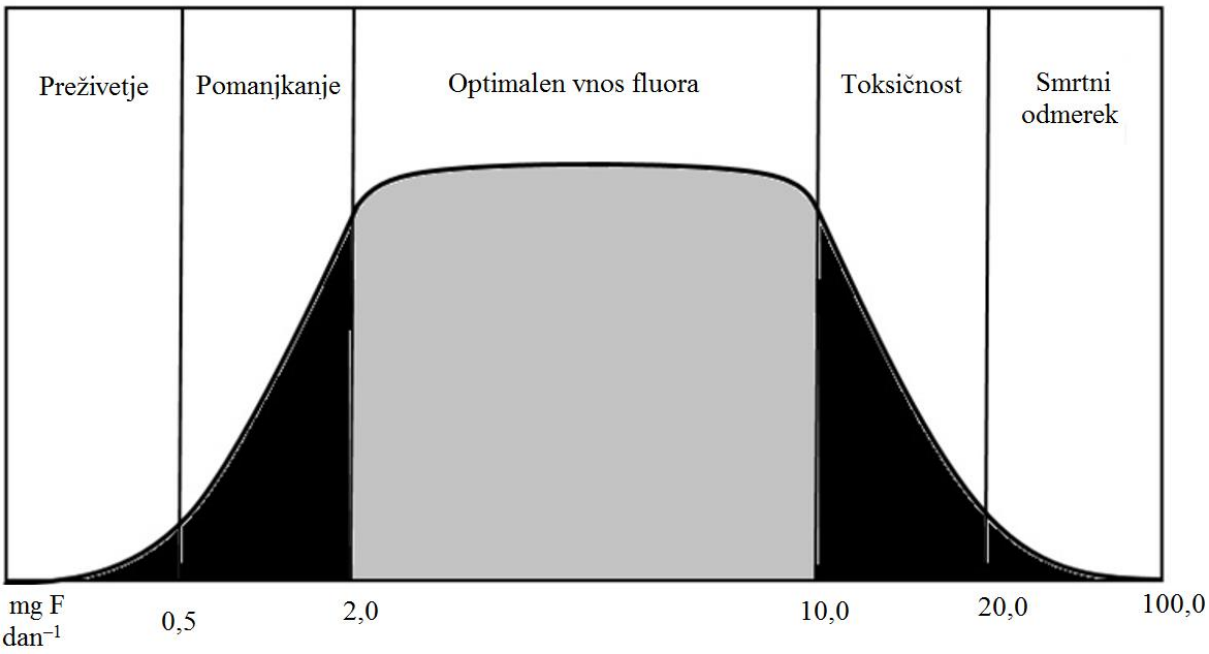
Večina rastlin ne privzema večjih količin fluora iz zemlje, zato večinoma ne predstavljajo povečanega tveganja za rastlinojede živali. Po direktivah Evropske komisije (2002/32/EC, 2002; 2005/87/EC, 2005) je najvišja dovoljena vsebnost fluora v krmi 30 mg kg^{-1}.

Rastlinojede pašne živali, vključno z govedom in ovcami, lahko med pašo, predvsem v deževnem obdobju, zaužijejo tudi večje količine zemlje (Field & Purves, 1964; Healy, 1967, 1968; Healy & Ludwig, 1965). Govedo naj bi med pašo zaužilo povprečno 700 g zemlje dan^{-1}, 350 g dan^{-1} poleti in 1200 g v deževnem obdobju (Healy, 1968), ovce pa naj bi v povprečju zaužile 300 g zemlje dan^{-1} (Healy & Drew, 1970). Kroničen vnos takih količin fluora že lahko povzroči razvoj fluoroze (Loganathan et al., 2001). Iz okolice opekarne v Veliki Britaniji so tako poročali o fluorozi pri domačih živalih (Fuge & Andrews, 1988). Iz srednje Evrope pa poročajo o povišani vsebnosti fluora v kosteh in rogovju srnjadi (Kierdorf & Kierdorf, 2000; Machoy, Dabkowska, & Nowicka, 1991).

1.4 Esencialnost fluora

Fluor za rastline ni esencialen element, njegova esencialnost za človeka in živali pa je vprašljiva in je v zadnjem stoletju sprožala številne polemike.

Esencialnost elementov v sledovih je pravzaprav klasičen primer potrebe po hranilih, ki so potrebna za preživetje organizma. Bertrand (1912) je za primer fluora prikazal prehajanje organizma preko več stopenj, od primanjkljaja, do presežka, s povečevanje dnevnega odmerka fluora (slika 2).



Slika 2: *Odziv na dnevni odmerek fluora*: Ocenjeno glede na specifične potrebe organizma, podano v mg fluora dan^{-1}. Slika povzeta po Bertrand (1912).

Definicija esencialnosti se je z leti spreminjala, razvijala in dopolnjevala. Po definiciji iz leta 1978 (Iyengar, Kollmer, & Bowen, 1978) se nek element obravnava kot esencialen v primeru, da;

- organizem brez tega elementa ne more niti rasti niti se razmnoževati,
- funkcije tega elementa v organizmu ni mogoče nadomestiti z nobenim drugim elementom, ter
- element ima neposreden vpliv na organizem in je vključen v njegov metabolizem.

Če se upošteva vse tri trditve, fluora ni mogoče obravnavati kot esencialen element. Kasneje, ko sta Underwood in Mertz (1987) definirala esencialnost kot dosledno in ponovljivo oslabitev fizioloških funkcij zaradi pomanjkanja določenega elementa, je bil fluor zaradi dokazanih pozitivnih vplivov na zdravje zob in integriteto kosti vključen med potencialno esencialne elemente (Underwood & Mertz, 1987).

Kot je razvidno iz zgodnejših definicij esencialnosti, je bil starejši pristop osnovan na principu »ločevanja«. Hrana je bila ločena v komponente, vsako komponento in njen učinek na delovanje organizma pa se je nato obravnavalo posebej. Novejši pristop je naravnan celostno. Namesto da bi se hrano ločevalo v komponente, skuša: (1) upoštevati medsebojne interakcije posameznih komponent hrane, (2) upoštevati odziv na določen odmerek in (3) ne več ločevati komponent/elementov na esencialne in toksične, temveč upoštevati njihov celoten učinek na zdravje. Leta 1996 je tako Strokovni svet Svetovne zdravstvene organizacije, Mednarodne organizacije za hrano in Mednarodne agencije za jedrsko energijo sprejel naslednjo definicijo esencialnosti: »Element je za organizem esencialen, kadar se izpostavljenost elementu pod določeno mejo dosledno izraža v zmanjšanju fiziološko pomembne funkcije, oziroma je integralen del organske strukture, ki je pomembna za delovanje življenjsko pomembnih funkcij organizma.« Odpornost proti zobnemu kariesu je bila tako definirana kot življenjsko pomembna funkcija, istočasno pa je bil fluor definiran tudi kot toksičen element s potencialno esencialno funkcijo pri nizkih koncentracijah (WHO/FAO/IAEA, 1996). Najnovejša priporočila fluora ne obravnavajo več kot esencialnega (EFSA, 2013), med drugim tudi zato, ker ni na voljo raziskav na ljudeh, kjer bi dokazali obstoj očitnih kliničnih znakov, ki bi bili posledica pomanjkanja fluora v organizmu. Hrano brez fluora je namreč težko oziroma

celo nemogoče zagotoviti. Zato je tudi težko ovrednotiti, kakšen naj bi bil priporočen ali primeren dnevni vnos (WHO, 1996). Ne glede na to, ali je fluor obravnavan kot esencialen element ali ne, pa naj bi bil še vedno obravnavan kot element, ki je v primernem dnevnem odmerku koristen pri zaščiti pred zobnim kariesom (EFSA, 2013).

1.5 Toksičnost fluora

Fluor ima z zdravstvenega vidika nasprotujoči si vlogi v človeškem telesu. Po eni strani ima v nizkih odmerkih pomembno vlogo pri zaščiti pred zobno gnilobo. Do 80. let prejšnjega stoletja je veljalo, da naj bi fluorid vgrajen v zobno sklenino izboljšal trdnost zob ter vplival na njihovo odpornost na kisline (Kidd, Thylstrup, Fejerskov, & Bruun, 1980). Prav tako naj bi zniževal pojavnost kariesa in luknjic v zobeh, saj zavira metabolizem sladkorja ustnih bakterij (Hamilton, 1990). V 80. letih prejšnja stoletja so Fejerskov, Thylstrup in Larsen (1987) predstavili novo paradigmo, po kateri naj bi fluorid pripomogel pri zaviranju in preprečevanju zobne gnilobe preko topičnega učinka na de- in remineralizacijo, ki potekata na meji med zobno površino in ustnimi tekočinami. Za doseganje najboljših kariostatičnih učinkov je tako priporočena topična in ne sistemska uporaba fluorida (Aoba, Fejerskov, 2002). Po drugi strani kroničen vnos višjih odmerkov povzroči nasprotni učinek; pojav zobne fluoroze pri otrocih ali/in kostne fluoroze tako pri otrocih kot odraslih. Poleg tega je bila v raziskavah toksičnost fluorida, ki vodi do celične smrti, apoptoze in/ali nekroze, dokazana za različne vrste celic *in vitro* in *in vivo* (Barbier, Arreola-Mendoza, Del Razo LM, 2010; Agalakova in Gusev, 2012).

Biološki odziv človeškega organizma na vnos fluora je odvisen predvsem od dnevnega odmerka in trajanja izpostavitve. Vplivajo pa tudi drugi dejavniki, ki so povezani s prehranskim statusom človeka, z delovanjem njegovih ledvic in interakcijami fluora z ostalimi prisotnimi elementi (Krishnamachari, 1987). Večina, kar 99 %, zaužitega fluora se zaradi velike afinitete do kalcija kopiči v zobeh in kosteh (EFSA, 2005), preostanek pa je porazdeljen med kri in mehka tkiva. Vsebnosti fluora v kosteh in zobovini (dentinu) so tako pravzaprav biomarkerji izpostavljenosti človeka fluoru preko daljšega časovnega obdobja, medtem ko na vsebnost fluora v zobni sklenini vpliva le razpoložljivost fluora v fazi izraščanja zob (do 7. oziroma 8. leta starosti) (EFSA, 2005).

Zobna fluoroza (slika 3) in kostna fluoroza (slika 4) sta največkrat posledica večjega vnosa fluora s pitno vodo (γ_F > 1 mg l^{-1}), predvsem v tropskih področjih, zaradi večjih potreb po pitju ter na področjih onesnaženih z antropogenimi viri fluoridov.

Najhujšo obliko kostne fluoroze pripisujejo dnevnemu vnosu 15–20 mg fluorida prek daljšega obdobja (20 let) s pitjem vode z vsebnostjo fluorida, višjo od 4 mg L^{-1} (EFSA, 2005).



Slika 3: *Zobna fluoroza:* Fotografija dr. Hardy Limebacik in dr. Iain Pretty (dostop http://fluoridealert.org/issues/fluorosis/).

Pojavnost in oblika zobne fluoroze sta odvisna od vnosa fluorida preko daljšega časovnega obdobja. Posledica je zmanjšana vsebnost mineralov v sklenini zaradi povišanega vnosa fluorida v času izraščanja zob. Blaga oblika fluoroze, ki jo je mogoče zlahka spregledati, se kaže predvsem kot večja odpornost proti kariesu. Pri zmerni obliki pride do pojava tankih belih črt in lis na sklenini in nastanka majhnih jamic. Pri tem se lahko bele lise združijo, kar povzroči propad vrhnjega dela sklenine. Pri hujši obliki je vsebnost proteinov v sklenini povišana, kar povzroči večjo poroznost in rjavo obarvanje zob zaradi privzemanja barve iz hrane (Horowitz, 1989).



Slika 4: *Kostna fluoroza*: Prizadene tako otroke kot odrasle (dostop http://bestmeal.info/food/fluoridation.shtml).

Kostna fluoroza je glede na resnost poškodb razvrščena v več stopenj. Za predklinično stopnjo, ki je lahko asimptomatska, je značilno povečanje kostne gostote, ki ga je mogoče zaznati z radiografijo. Z nadaljnjim vgrajevanjem fluorida v kosti se razvijeta I. in II. stopnja klinične kostne fluoroze; pojavijo se bolečine, okorni sklepi, osteoskleroza kompaktnih in poroznih kosti, kostni izrastki in kalcifikacija vezi. Za III. stopnjo klinične kostne fluoroze, ki se imenuje tudi ohromitvena kostna fluoroza (ang. crippling skeletal fluorosis), so med drugim značilni omejena gibljivost sklepov, deformacije okostja, huda kalcifikacija vezi, propadanje mišic in nevrološki simptomi zaradi poškodb živčevja, ki so posledica ukrivljanja hrbtenjače. Vsem stopnjam je skupna motena ali pomanjkljiva mineralizacija kosti, pogosta pa je tudi osteomalacija (EFSA, 2005; Kaminsky, Mahoney, Leach, Melius, & Miller, 1990).

Drugi neželeni stranski učinki dolgotrajnih prekomernih vnosov fluorida vključujejo alergijske reakcije, oslabelo delovanje ledvic, ponavljajoče se izpahe in zvine sklepov, prirojene napake, raka… (Marshall, 1990; Smith, 1985; WHO, 2002).

Akutna izpostavljenost visokim vnosom fluora lahko povzroči slabo počutje, bruhanje, abdominalne bolečine, glavobol, pretirano močenje, komo, srčno kap, dihalno stisko in celo smrt.

Smrtni odmerek fluora za človeka naj bi bil 40–80 mg kg^{-1} telesne mase oziroma 5–10 g NaF (EFSA, 2005).

1.6 Primeren dnevni vnos fluora

Glede na to, da povečane vsebnosti fluora v telesu povzročajo fluorozo, je bilo potrebno podati priporočila za največji še varen vnos fluora.

V primeru fluorida ni na voljo dovolj podatkov, ki bi omogočali definiranje ocenjene

povprečne potrebe (angl. Estimated average requirement, EAR). Ta je definirana kot količina hranila, za katero ocenjujejo, da pokrije z nekim kazalcem določeno potrebo, polovice zdravih posameznikov določenega spola in starostne skupine. EAR služi za določitev priporočenega dnevnega vnosa (angl. Recommended dietary allowances, RDA), ki je definiran kot povprečna količina hranila, ki je zadostna, da pokrije potrebe po hranilu skoraj vseh (97–98 %) posameznikov določenega spola in starostne skupine. Namesto RDA se za fluor uporablja primeren vnos (angl. Adequate intake, AI), ki je osnovan na eksperimentalno določenih ocenah povprečnega vnosa hranila v skupini zdravih posameznikov (DRI, 1997).

Ustrezen kazalec za določitev primernega dnevnega vnosa fluorida je tako njegova učinkovitost za preprečevanje kariesa. **Primeren dnevni vnos fluora iz vseh virov naj bi bil 0,05 mg kg telesne mase^{-1} za vse osebe starejše od 6 mesecev**, saj naj bi zagotavljal visoko stopnjo zaščite pred zobno gnilobo, hkrati pa naj ne bi bil povezan s pojavom katerihkoli znanih stranskih učinkov na zdravje (DRI, 1997; EFSA, 2013). Na podlagi podatkov in raziskav, ki so trenutno na voljo, je težko ugotoviti, ali je trenutno priporočeni primeren dnevni vnos fluorida res primeren oziroma ali je prenizek ali previsok. Meje med koristnimi in škodljivimi učinki fluorida so namreč zelo ozke, saj so zobno fluorozo opazili že pri nižjih dnevnih vnosih od primernega (0,03–0,04 mg kg telesne mase^{-1}) oziroma pri vrednostih, ki le malenkost presegajo primeren dnevni vnos (0,05–0,07 mg kg telesne mase^{-1}) (Baelum, Fejerskov, Manji, & Larsen, 1987; Burt, 1992; Fejerskov, Stephen, Richards, & Speirs, 1987). Poleg tega so tudi raziskave, kjer je ocenjen celoten dnevni vnos fluora iz vseh virov, zelo redke in večinoma starejšega datuma.

1.7 Najpomembnejši viri fluora za človeka

Najpomembnejši viri fluora za človeka so pitna voda, napitki, hrana (predvsem tista pripravljena s fluorirano vodo) ter sredstva za nego zob in ustne votline s fluoridi. V nekaterih evropskih državah za kuhanje uporabljajo fluorirano sol (Avstrija, Nemčija, Nizozemska, Francija, Švica, Češka, Španija in Grčija (K. K. Cheng, Chalmers, & Sheldon, 2007; Marthaler, 2005; SCHER, 2010). Za otroke je lahko pomemben vir fluora tudi fluorirano mleko (EFSA, 2005; WHO, 2009).

1.7.1 Pitna voda

Vsa voda vsebuje fluor vsaj v sledovih. Po priporočilih Svetovne zdravstvene organizacije (WHO, 2006) naj bi bila spodnja meja za vsebnost fluorida v pitni vodi 0,5 mg l^{-1}, zgornja meja pa 1 mg l^{-1}. To naj bi bila tako imenovana »optimalna« koncentracija, ki je povezana z visoko zaščito pred kariesom in z nizko pojavnostjo lažjih oblik zobne fluoroze. Mejna vrednost za fluorid v pitni vodi v Sloveniji je v skladu z Direktivo Sveta EU 98/83/EC (Council, 1998) in Pravilnikom o pitni vodi (Uradni list RS, št. 19/2004, uredba 865, stran 2155) omejena na 1,5 mg l^{-1}.

Vsebnost fluorida v pitni vodi članic Evropske skupnosti je večinoma nizka ter se zaradi različnih geografskih značilnosti precej razlikuje tako med državami kot tudi znotraj držav (0,1–5,8 mg l^{-1}); na primer vsebnosti fluorida v naravnih pitnih vodah na Irskem so < 0,01–5,8 mg l^{-1}, na Finskem 0,1–3,0 mg l^{-1} in v Nemčiji 0,1–1,1 mg l^{-1} (SCHER, 2010). Slovenija sodi med države z zelo nizko naravno vsebnostjo fluorida v pitni vodi, saj so vsebnosti nižje od 0,1 mg l^{-1}.

Zaradi nizkih naravnih vsebnosti v številnih državah pitno vodo fluorirajo. Običajno poteka fluoriranje vode z dodajanjem kalijevega (KF) ali natrijevega fluorida (NaF), oziroma heksafluorosilicijeve kisline (H_2SiF_6) ali njene soli. Prve poskuse fluoriranja so

izvedli že leta 1945, in sicer v ameriških mestih Newburgh in Grand Rapids. V primeru, da splošno fluoriranje vode ni bilo mogoče, so vodo fluorirali v šolah. Center za nadzor in preventivo bolezni v Združenih državah Amerike (ZDA), kjer je v letu 2006 več kot dve tretjini prebivalstva živelo na področjih s fluorirano pitno vodo, je fluoriranje pitne vode označil kot enega od desetih največjih dosežkov za javno zdravstvo v ZDA v 20. stoletju. Večina evropskih držav se za fluoriranje vode ni odločila, zato je delež fluorirane vode v Evropi zelo nizek. Del prebivalstva živi na področjih s fluorirano vodo le na Irskem (74 %), v Veliki Britaniji (9 %), Španiji (3 %) in na Portugalskem (1 %) (K. K. Cheng et al., 2007; SCHER, 2010).

Točnih podatkov o vnosu fluora v človeško telo tako s pitjem vodovodne kot ustekleničene vode ni na voljo, je pa SCHER podala ocenjene vrednosti za različne scenarije. Podatki so zbrani v tabeli 2 (SCHER, 2010).

Tabela 2: *Ocenjene vrednosti vnosa fluorida v človeško telo s pitjem vodovodne vode*. Ocenjene vrednosti se nanašajo na pubertetnike, starejše od 15 let, in odrasle osebe.

Scenarij	Zaužita voda (ml dan^{-1})	Vsebnost F^- (mg l^{-1})	Vnos F^- z vodo (mg dan^{-1})
Povprečna poraba vode v članicah Evropske skupnosti (EU) in povprečna vsebnost F^- v vodi	1321	0,1	0,13
Največja poraba vode (97,5-ti percentil) in predpisana vsebnost 0,8 mg l^{-1} F^- (Irska)	3773	0,8	3,02
Največja poraba vode (97,5-ti percentil) in najvišja dovoljena vsebnost 1,5 mg l^{-1} F^- (EU)	3773	1,5	5,66
Največja zabeležena zaužita količina vodovodne vode (97,5-ti percentil) in najvišja koncentracija 3,0 mg l^{-1} F^- (Finska)	2800	3,0	8,40

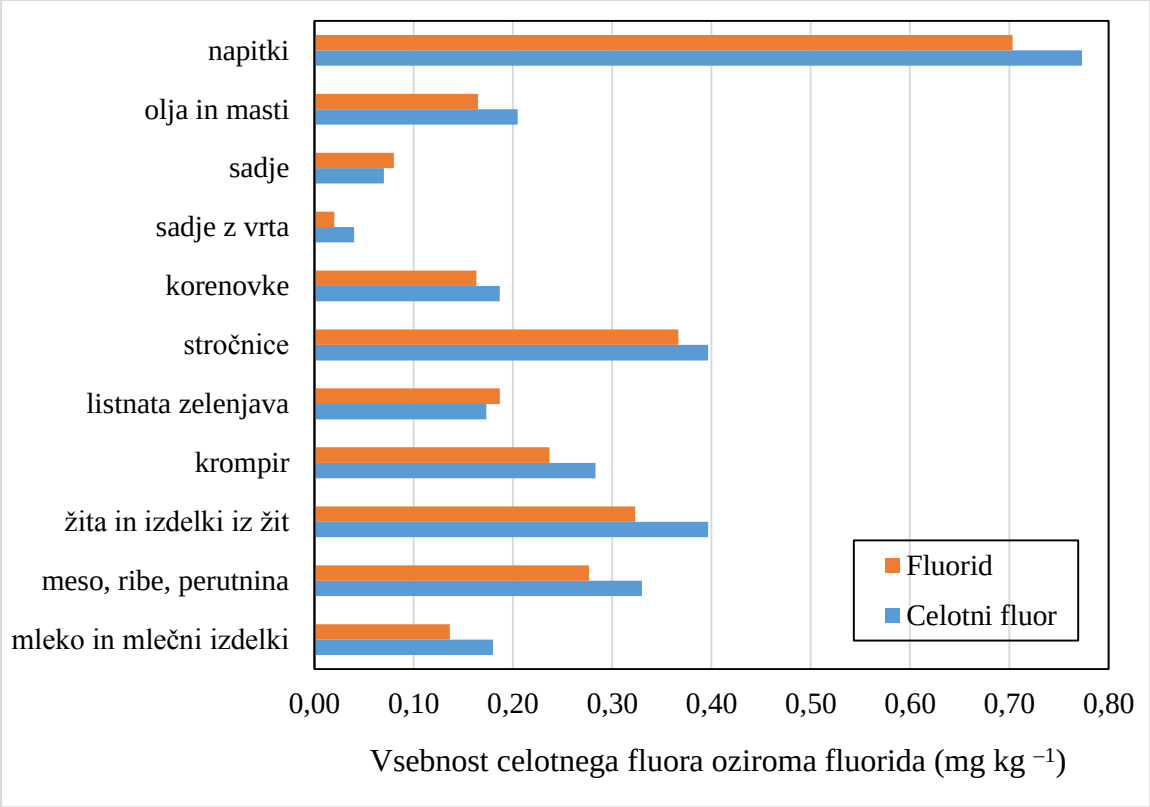
1.7.2 Hrana in napitki

Vsa hrana vsebuje fluor vsaj v sledovih. Običajno se vsebnosti gibljejo med 0,1 in 0,5 mg kg^{-1} (EFSA, 2013), v primeru, da je hrana pripravljena s fluorirano vodo, pa so te vrednosti lahko bistveno višje.

Rezultati raziskav, v katerih so poročali o vsebnostih fluora v različnih vrstah hrane, se precej razlikujejo tako med vrstami kot tudi znotraj enake vrste hrane (Ponikvar, 2008). Najverjetnejši razlogi za to so razlike v izvoru in pogojih rasti, vrsta in količina uporabljenih gnojil in pesticidov, postopek predelave in vsebnost fluorida v vodi uporabljeni med predelavo. Do razlik lahko pride tudi zaradi različnih načinov priprave vzorca za analizo in uporabe različnih analiznih metod; večina opravljenih raziskav je starejšega datuma in ne vključuje uporabe certificiranih referenčnih materialov kot dela sistema zagotavljanja kakovosti.

Povprečne vsebnosti fluora in fluorida v nekaterih vrstah hrane, ki smo jih ocenili na osnovi rezultatov več raziskav (Singer & Ophaug, 1986; Singer, Ophaug, & Harland, 1980; Taves, 1983), ki so bile izvedene na področjih s fluorirano oziroma nefluorirano

vodo, so prikazane na sliki 5.



Slika 5: *Vsebnost fluora in fluorida v nekaterih vrstah hrane*. Povprečne vrednosti so ocenjene iz rezultatov treh raziskav (Singer & Ophaug, 1986; Singer et al., 1980; Taves, 1983).

Rezultati, prikazani na sliki 5, kažejo, da so vsebnosti fluora praviloma višje kot vsebnosti fluorida. Največ fluora vsebujejo žita in izdelki iz žit, stročnice ter meso, ribe in morski sadeži (Singer & Ophaug, 1986; Singer et al., 1980; Taves, 1983; USDA, 2005). O povišanih vsebnostih fluora v mesu, pri katerem kosti odstranjujejo mehansko, je poročalo več avtorjev, med drugimi tudi Fein in Cerklewski (2001).

Najvišje vsebnosti fluora so bile določene v konzerviranih sardelah in inčunih, kjer kosti ne odstranijo, ter v večini morskih sadežev in rib (EVM, 2001; Rocha, de la Fuente, et al., 2013; Rocha, Rojas, et al., 2013b). Iz tega razloga je tudi razmerje med fluorom in fluoridom največje v skupini mesa, rib in perutnine. Glede na to, da predstavljajo rezultati povprečje raziskav, opravljenih na področjih s fluorirano oziroma nefluorirano vodo, so tudi vsebnosti fluorida v napitkih relativno visoke. V skupino napitkov je namreč vključen tudi pravi čaj, ki lahko vsebuje večje vsebnosti fluora, ki se med pripravo čajnih napitkov zlahka sprosti.

Ocenjene vrednosti za vnos fluora v človeško telo s hrano z 2500 kcal naj bi bile približno 1,1 mg za nefluorirana področja in 2,1 mg za fluorirana področja (Ponikvar, 2008). Slovenija sodi med nefluorirana področja; povprečni ocenjeni vnos fluora s hrano z 2500 kcal je bil 1,5 mg (Ponikvar, Stibilj, & Žemva, 2007).

1.7.3 Sredstva za nego zob in ustne votline

Zobne kreme, vodice in geli za površinsko uporabo vsebujejo precej visoke vsebnosti F, med 230–12300 μg g^{-1}. Najpogosteje so v uporabi fluorirane zobne kreme, kjer se kot vir fluora navadno uporablja natrijev fluorid. Zobne kreme za odrasle vsebujejo 900–1500 μg g^{-1} fluorida (≈ 0,10 %) (Whitford, 1987). Otroške zobe kreme vsebujejo manj fluorida, večinoma med 250 in 500 μg g^{-1} (Davies et al., 2002; Newbrun, 1992). Ustne vode za

domačo uporabo navadno vsebujejo med 230 in 1000 μg g^{-1}, površinski geli za domačo uporabo do 5000 μg g^{-1} in profesionalni geli do 12300 μg g^{-1} fluorida (Whitford, 1987; WHO, 1994).

Tveganje za izpostavljenost povečanim vnosom fluorida je večje v primeru, da se pripravke za nego ust in ustne votline pogoltne, kar predstavlja težavo predvsem pri otrocih mlajših od 7 let. Ti lahko zaradi slabo razvitega požiralnega refleksa pogoltnejo med 10 in 100 % zobne kreme (Barnhart, Hiller, Leonard, & Michaels, 1974; Hargreaves, Ingram, & Wagg, 1972; Naccache et al., 1990; Simard et al., 1988). Vnos je odvisen še od količine in vsebnosti fluorida v uporabljeni zobni kremi. Pri 4 leta starih otrocih lahko tako zobna krema predstavlja med tretjino in polovico celotnega dnevnega vnosa fluora (2,3 oziroma 3,6 mg fluorida) (Richards & Banting, 1996). Organizacija FDA je zato uvedla zahtevo po priporočilih na ovojnini zobnih krem (uporabljena količina kreme v velikosti graha, prisotnost staršev ob uporabi otrok) (ATSDR 2003).

1.7.4 Drugi fluorirani pripravki

Zdravniška društva v nekaterih državah z nizko vsebnostjo fluorida v pitni vodi, za zaščito pred kariesom priporočajo tudi fluoridne dodatke v obliki tabletk, kapljic ali pastil. Vsebnost fluorida v teh dodatkih je navadno 0,25 mg, 0,50 mg ali 1,00 mg, dodaja pa se večinoma v obliki natrijevega fluorida (Whitford, 1987). Uporaba tabletk naj bi bila zaradi posteruptivnega delovanja smiselna le pri otrocih, starih od tri do šest let, ter pri šolskih otrocih, pa še to le v primeru, da je tabletka polizana in ne pogoltnjena.

Že leta 1955 so v Švici, Nemčiji in Franciji razvili tudi sheme fluoriranja kuhinjske soli za domačo uporabo (Marthaler, 2005). Fluorirana sol naj bi namreč imela podobne učinke, kot fluorirana voda oziroma sredstva za nego ust in ustne votline s fluoridom, vendarle je kvantitativnih podatkov o kariostatičnem delovanju fluorirane soli le malo. Fluorirana sol za domačo uporabo navadno vsebuje 200–250 mg kg^{-1} fluorida, največkrat v obliki kalijevega fluorida (EFSA, 2005).

Med fluorirane pripravke spada tudi fluorirano mleko oziroma mlečni izdelki, ki vsebujejo 1–5 mg l^{-1} fluorida, običajno okrog 2,5 mg l^{-1}. Za uporabo fluoriranega mleka so se odločili le na določenih področjih znotraj Bolgarije, Čila, Peruja, Rusije, Kitajske, Tajske in Velike Britanije. Glavna prednost fluoriranega mleka v primerjavi s fluorirano vodo je, da je odločitev za uživanje lahko individualna. Otroci 200 ml takega mleka navadno zaužijejo v šoli (EFSA, 2005; WHO, 2009).

1.8 Rastline, ki privzemajo fluor

Fluor ni esencialen element za rastline. Njegova vsebnost v rastlinah je običajno nižja od 10 mg kg^{-1} (Davison & Weinstein, 2006) in je odvisna od geografskih značilnosti rastišča, bližine antropogenih virov fluora ter akumulacijskih sposobnosti rastline.

1.8.1 Privzemanje fluora iz zraka oziroma zemlje

V okoljih, kjer je povečan izpust plinastih fluoridov v ozračje, naj bi rastline večino fluorida privzele preko listnih por. Na privzemanje, poleg vsebnosti fluorida v zraku in sestave zraka, vplivajo še čas izpostavitve, vremenski pogoji, struktura in vrsta vegetacije ter pogoji rasti. Poročali so o povezavi med stopnjo poškodb listov in vsebnostjo HF v zraku (Vike, 1999; Weinstein & Davison, 2004).

Povezavo med vsebnostjo fluora v rastlinskih listih in vsebnostjo fluora v zemlji na področjih s povečanimi emisijami plinastih fluoridov je težko določiti, saj naj bi bilo privzemanje fluora iz zemlje zanemarljivo (Arnesen, 1997; Braen & Weinstein, 1985).

Kljub temu so poročali o raziskavah, kjer so povezavo med vsebnostjo fluora v rastlinah in vsebnostjo fluora v zemlji potrdili oziroma ovrgli (Horntvedt, 1995; neznan, 1994; Sidhu, 1976).

Na področjih, kjer je vsebnost plinastih fluoridov v zraku zanemarljiva, je povezavo med vsebnostjo fluorida v zemlji in vsebnostjo fluorida v listih lažje določiti. V namen raziskav so bile poleg paradižnika, koruze in šentjanževke (Bar-Yosef & Rosenberg, 1988; Fornasiero, 2003) uporabljene tudi številne druge rastline; med drugimi tudi sadike javorja in pasja trava (Braen & Weinstein, 1985), detelja in trave (Arnesen, 1997), špinača (S. K. Jha, Nayak, & Sharma, 2008) ter čebula (S. K. Jha, Nayak, & Sharma, 2009).

Stevens, McLaughlin in Alston (1998) (Stevens, McLaughlin, & Alston, 1998b) poročajo o sigmoidnem modelu privzemanja fluorida iz vode, medtem ko drugi poročajo o linearnem modelu privzemanja fluorida iz zemlje (S. K. Jha et al., 2008, 2009; Ruan, Ma, Shi, & Han, 2003).

1.8.1.1 Dejavniki, ki vplivajo na dostopnost fluora rastlinam

Največji vpliv na privzemanje fluora iz zemlje ima njegova mobilnost v zemlji, na prehajanje fluora iz zemlje preko korenin v liste pa vpliva tudi mobilnost kalcija v zemlji. Večja mobilnost kalcija v zemlji povzroči večje kopičenje fluora na in v koreninah zaradi tvorbe CaF_2 (Ramagopal, Welkie, & Moller, 1969), zato je fluora posledično manj tudi v listih (Brennan, Leone, & Daines, 1950).

Mobilnost fluora v zemlji je odvisna od vrste in pH zemlje ter vsebnosti fluora v njej (Pickering, 1985). Na dostopnost fluora rastlinam, živalim in človeku v največji meri vplivata tvorba trdnih netopnih spojin z anorganskimi snovmi in absorpcija na organske spojine. Fluor v suspenziji zemlje lahko tako teoretično obstaja kot fluorid ali pa tvori različne topne komplekse z aluminijem, silicijem, borom ali vodikom (Stevens, McLaughlin, & Alston, 1998a).

Topnost fluorovih kompleksov v zemlji je v veliki meri odvisna od pH. Najnižja je topnost pri pH 6,0–6,5. Topnost se poveča pri pH < 6 zaradi tvorbe $[AlF]^{2+}$ in $[AlF_2]^{+}$ kompleksov in pri pH > 6,5 zaradi desorpcije fluorida kot posledice odboja bolj negativno nabitih površin (Wenzel & Blum, 1992).

Kljub temu, da je hitrost privzemanja s strani rastlin za nekatere topne fluorove komplekse celo večja kot privzemanje fluorida ($HF > [AlF]^{2+} = [AlF_2]^{+} > AlF_3 = [AlF_4]^{-} = F^{-}$), pa je zaradi vpliva pH zemlje še vedno večina fluora privzetega v obliki fluorida (MacLean, Hansen, & Schneider, 1992; Stevens et al., 1998a, 1998b; Takmaz-Nisancioglu & Davison, 1988).

1.8.1.2 Prehajanje fluora iz zemlje v rastlino

V kolikor je v zemlji prisoten fluor v obliki fluorida, lahko ta s pasivno difuzijo prehaja v korenine, kjer se zadržuje v zunajceličnem prostoru. Celične stene imajo namreč konstanten naboj, ki spodbuja ali omejuje izključitev negativno nabitega fluorida na mestih, kjer bi lahko prečkal endodermis, ki tako deluje kot pregrada za prehajanje fluorida v prevodni sistem (Takmaz-Nisancioglu & Davison, 1988); fluor v listnih režah in razpokah je najverjetneje posledica prehajanja fluorida skozi slabše razviti endodermis na konicah korenin in na mestih izraščanja stranskih korenin (Davison, Takmaz-Nisancioglu, & Bailey, 1985; Takmaz-Nisancioglu & Davison, 1988). Na podlagi tega je mogoče sklepati, da je vsebnost fluora v listih odvisna tudi od količine vode, ki jo rastlina porabi za rast in preživetje. Vpliv količine porabljene vode na vsebnost fluora v listih pa sta preučevala Bar-Yosef in Rosenberg že leta 1988.

Rastline običajno ne privzemajo večjih količin fluora iz zemlje. Vseeno pa obstajajo nekatere rastline, ki lahko privzemajo in akumulirajo manjše količine fluora. Med drugimi

so to poganjki javorja in pasja trava (Braen & Weinstein, 1985), detelja in nekatere trave (Arnesen, 1997; Stevens, McLaughlin, Randall, & Keerthisinghe, 2000), špinača (S. K. Jha et al., 2008), čebula (S. K. Jha et al., 2009) in šentjanževka (Fornasiero, 2003). Edina doslej znana rastlina, ki je sposobna akumulirati večje količine fluora v nadzemnih delih rastline, je čajevec (*Camellia sinensis*). Fluor na površini listov čajevca (1–10 nm) je vezan v obliki AlF_3, v sledovih pa tudi v obliki MgF_2 in CaF_2 (Cai et al., 2014).

Nekatere vrste Dichapetalum (*Dichapetalum cymosum*, tako imenovani strupeni list, nizek prostran grm iz severnih območij Južne Afrike) privzemajo fluorid iz zemlje in tvorijo natrijev ali kalijev fluoroacetat (Grobbelaar & Marion Meyer, 1990; Quin & Clark, 1947; Tannock, 1975; Vickery & Vickery, 1972), zaradi česar so močno strupene in povzročajo pogine živali, ki se nevede hranijo z njimi. Za primerjavo so v tabeli 3 podani podatki o vsebnosti fluora v nekaterih rastlinah, ki so sposobne privzemanja in akumuliranja fluora.

Tabela 3: *Vsebnost fluora v nekaterih rastlinah, ki lahko akumulirajo fluor*.

Rastlina	Vsebnost fluora (mg kg^{-1})
Ječmenova trava	do 130
Pasja trava	do 130
Ljuljka	50
Kislica	do 45
Bodljika	do 200
Podzemna detelja	do 180
Detelja	> 30
Špinača	24–220
Čebula	16–109 (listi), 16–54 (čebulica)
Šentjanževka	10–80
Čajevec (*Camellia sinensis*)	navadno 100 do > 1000
Dichapetalum cimosum	250 (sveži listi) do > 1200
Dichapetalum. D. braunii	8000 (semena) (O'Hagan et al., 1993)

Med rastlinami, ki lahko privzemajo fluor, so tudi nekatera zelišča, ki jih uporabljamo za pripravo zeliščnih čajev (npr. šentjanževka), ki so tradicionalna pijača tako v Sloveniji, kot v številnih drugih evropskih državah. Vsebnost fluora v večini zelišč je sicer nizka in večinoma ne presega 10 mg kg^{-1} (Emekli-Alturfan, Yarat, & Akyuz, 2009; Jurdi, Said, & Al Kouatly Kambris, 2001; Malinowska, Inkielewicz, Czarnowski, & Szefer, 2008).

1.8.2 Čajevec

Čaj je osvežilna brezalkoholna pijača, ki je zaradi dokazanih blagodejnih učinkov na človeško telo (Chacko, Thambi, Kuttan, & Nishigaki, 2010; Higdon & Frei, 2003; Kuroda & Hara, 1999) poleg vode najpogosteje zaužita pijača na svetu. Količine popitega čaja na svetu so precej višje od popite kave, vina, piva ali gaziranih pijač. Pitje čaja predstavlja v veliko deželah del vsakodnevne rutine, mnogi ga uživajo kot vsakodnevno osvežilno pijačo, spet drugi ga pijejo zaradi njegovega terapevtskega učinka.

Uživanje čaja v večjih količinah lahko predstavlja tveganje za zdravje, saj je čajevec znan kot rastlina, ki v svojih listih akumulira fluor. Ta se med pripravo čajnih poparkov sprosti v obliki fluorida in je tako človeškemu telesu zlahka dostopen. Zaradi visoke vsebnosti fluora v nekaterih pravih čajih, predvsem takšnih v obliki opek, prihaja v nekaterih regijah s tradicijo pitja čaja do zobne in kostne fluoroze tako pri otrocih kot pri odraslih (Cao et al., 1996; Cao, Zhao, & Liu, 1997; Cao et al., 2003; Johnson, Kearns, Doran, Khoo, & Wermers, 2007).

1.8.2.1 Proizvodnja čaja

Čajevec je zimzelena grmičasta rastlina, ki dozori v sedmih letih in ne presega višine dveh metrov. Najbolje uspeva v tropskem in subtropskem pasu s temperaturo 15–25 °C, visoko relativno vlažnostjo (80–90 %) in visoko letno količino padavin (1500–2000 mm). Pomembne so tudi lastnosti zemlje (pH 4,5–6,5) in naklon plantaž (10–20 °) (Chan, 1978). S pravilnim gojenjem je mogoče grme čajevca obirati tudi do 100 let (Carr & Stephens, 1992). Obiranje poteka večinoma trikrat letno (aprila, v začetku poletja in sredi jeseni) in je v veliki meri strojno. Določene kvalitetnejše vrste čaja, zaradi zagotavljanja ustrezne kvalitete še vedno obirajo ročno.

Po podatkih FAOstat-a iz leta 2011, največ čaja pridelajo v azijskih državah, med katerimi prevladujejo Kitajska s 35 % svetovne proizvodnje, Indija (21 %), Kenija (8 %), Šrilanka (7 %), Turčija (5 %), Vietnam (4 %) in Indonezija (3 %). Nekaj čaja pridelajo tudi v Južni Ameriki (Argentina in Brazilija) ter na bližnjem vzhodu (Iran in Turčija). Večina Evrope je za gojenje čajevca prehladne, tistih nekaj plantaž, npr. na Portugalskem, pa ne prispeva bistvenega deleža k svetovni proizvodnji. Letna proizvodnja čaja v letu 2012 je bila podobna kot leta 2011, in sicer blizu 4000 milijonov kilogramov.

1.8.2.2 Poraba in način priprave

Povprečna letna svetovna poraba znaša kar dobrih 43 litrov čaja na osebo. Od tega se največ popije črnega čaja (76–78 %), manj pa zelenega (20–22 %) in oolong (2 %) čaja (Wu & Wei, 2002). Po podatkih FAOstat–a iz leta 2010 so v Evropi največji porabniki čaja Britanci s povprečno porabo čaja 1,9 kg oseba^{-1} leto^{-1}. Povprečje za Evropsko skupnost je 0,48 kg oseba^{-1} leto^{-1}. Povprečna poraba pravega čaja je v Sloveniji, tudi zaradi tradicije pitja zeliščnih čajev, precej nizka (0,039 kg oseba^{-1} leto^{-1}). V zadnjih letih je, verjetno tudi zaradi dokazanih blagodejnih učinkov, hiter porast uživanja čaja opazen tudi pri nas.

Čajne poparke lahko pripravljamo na različne načine. Najpogostejši način priprave je nekaj minutno namakanje majhne količine čaja (približno 2 g) v manjši količini vrele vode (približno 200 ml). Ob tem je potrebno poudariti, da nekatere vrste čajev terjajo pripravo čajnih poparkov z vodo z nižjo temperaturo. Predvsem pri pripravi zelenega čaja naj temperatura ne bi presegala 70 °C, saj lahko previsoka temperatura prepreči delovanje zdravilnih učinkovin. Iste čajne liste se lahko uporabi tolikokrat, dokler imajo poparki še kaj barve in okusa. Ponekod namakajo čajne liste v večji količini (1 liter ali več) tople vode tudi do nekaj ur. Na nekaterih področjih s tradicijo pitja čaja v opeki le-tega namakajo v vodi tudi po cel dan (Cao et al., 1995; Fung, Zhang, Wong, & Wong, 1999).

1.8.2.3 Zdravilni učinki

Čajni listi vsebujejo veliko taninov, alkaloidov, proteinov in aminokislin, encimov, ogljikovih hidratov, vitaminov (B, C, E) ter mineralov in elementov, kot so Al, Ca, Na, Mg, K, Mn, Cr, Fe, Co, Ni, Zn in Cd, ki se med pripravo čajnih poparkov z različno učinkovitostjo sproščajo v poparke (Cabrera, Artacho, & Giménez, 2006; Chacko et al., 2010).

Zdravilne učinke čajnih poparkov pripisujejo večinoma visoki vsebnosti fenolov (K. S. Khan & Mukhtar, 2007). Največ fenolov vsebujeta beli in zeleni čaj. Razlikovanje med belim in zelenim čajem, tako kot je to mogoče pri zelenem in črnem čaju na osnovi razmerja med fenoli in katehini, ni mogoče, saj so vsebnosti zelo podobne (K. S. Khan & Mukhtar, 2007). Dobro raziskani so zdravilni učinki tako belega kot zelena čaja (Chacko et al., 2010). Poparki obeh vrst naj bi imeli pomembno vlogo pri preprečevanju srčno-žilnih bolezni in nekaterih oblik raka, pri vzdrževanju zdravja ustne votline, delovali naj bi protibakterijsko, protivirusno in protivnetno, povečevali naj bi kostno gostoto in imeli

pomembno vlogo v delovanju živčevja. Večjo porabo zelenega v primerjavi z belim čajem lahko najverjetneje pripišemo cenejšemu proizvodnemu postopku in lažji dostopnosti zelenega čaja. Naraščajoč trend porabe zelenega čaja je dandanes tudi rezultat reklamnih oglasov, ki mu pripisujejo pozitiven učinek pri zmanjševanju in ohranjanju telesne mase.

1.8.2.4 Vrste čaja

1.8.2.4.1 Vrste čaja glede na obliko pakiranja

Čaje lahko razdelimo glede na obliko (pakiranje), v katerem se prodajajo. V večini trgovin je največja izbira čajev pakiranih v čajne vrečke, saj so zaradi preproste uporabe najbolje prodajani. Čaj je na voljo tudi v obliki granul. V specializiranih prodajalnah s čaji se lahko čaje kupi tudi v razsulu, poleg tega pa je mogoče dobiti tudi čaje, stisnjene v opeko. Različne oblike čaja so prikazane na sliki 6.



Slika 6: *Vrste čaja glede na obliko pakiranja, v kateri se prodajajo*. Spredaj sta čaj v razsulu in čaj v filter vrečki, zadaj pa čaj, stisnjen v opeko.

Različne oblike pakiranja čaja vsebujejo različno kvalitetne čajne liste (Cao et al., 2006), kar vpliva na kvaliteto čajnih poparkov. Poročali so o povezavi med vsebnostjo fluora in kvaliteto čaja ter predlagali vsebnost fluora v čaju kot pokazatelj kvalitete čaja (Lu, Guo, & Yang, 2004). Čaji z višjo vsebnostjo fluora imajo namreč nižjo vsebnost polifenolov in aminokislin. Značilnosti različnih oblik čaja so predstavljene v tabeli 4.

Tabela 4: *Značilnosti različnih vrst čaja glede na obliko pakiranja*.

Oblika čaja	Značilnosti
Čaji v razsulu	Najbolj kvalitetni čaji; vsebujejo mlade čajne liste z ohranjeno obliko, vidni so tudi lističi in popki.
Granuliran čaj	Vsebuje obdelane liste in popke. Zaradi mehanske obdelave se nekoliko izgubi prvotna oblika.
Čajne vrečke	Najmanj kvaliteten čaj; vsebuje zdrobljene čajne liste. Čajne vrečke dobro zamaskirajo vsebino, zato proizvajalci za njihovo proizvodnjo največkrat uporabijo manj kvalitetne starejše čajne liste in vejice. Večkrat so dodane tudi različne arome.
Opeke (kocke, potice)	Največkrat je pripravljen iz listov in vejic starejših dreves, kvalitetnejše opeke pa lahko vsebujejo tudi mlade lističe in popke. Izhodni material se lahko med stiskanjem poškoduje. Barva in okus se ohranita dlje časa. Zaradi specifičnega postopka obdelave (Cao, Zhan, & Liu, 2001) ima drugačne lastnosti od drugih pakiranj čaja, kar vpliva na hitrost sproščanja fluora.

1.8.2.4.2 Vrste čaja glede na stopnjo fermentacije

Listi čajevca začnejo, če jih po trganju ne posušijo dovolj hitro, kmalu veneti in oksidirati. Klorofil razpada, pride pa tudi do sproščanja taninov, ki dajejo čaju grenak okus. Vsi ti procesi, poleg vrste lističev (mladi ali stari listi in popki), bistveno vplivajo na končen okus, barvo, aromo in vsebnost zdravilnih učinkovin. V tabeli 5 je prikazana razvrstitev čajev glede na stopnjo fermentacije (Cabrera et al., 2006; McKay & Blumberg, 2002; Willson, 1999; Yamamoto, Juneja, Chu, & Kim, 1997).

Tabela 5: *Vrste čaja glede na stopnjo fermentacije*. Postopek pridelave določene vrste.

Vrsta čaja	Postopek obdelave
Črni čaj	Fermentiran čaj Postopek obdelave poteka v več korakih: venenje listov pri nižji temperaturi, valjanje, fermentacija in sušenje pri višji temperaturi, s čimer se ustavi fermentacijo.
Pu-erh čaj	Fermentiran čaj iz lističev starejših dreves Postopek pridelave je podoben kot pri črnih čajih, le da pride do fermentacije takoj po žetvi. Čajne liste in vršičke namočijo s paro in jih pri nekoliko višji temperaturi pustijo fermentirati v prisotnosti termofilnih mikroorganizmov. Fermentacija poteka daljše časovno obdobje, kar bistveno vpliva na barvo in okus čaja. Večinoma pu'erh čaje stisnejo v opeke (kocke, potičke), ali pa zavijejo v liste pomela in pustijo starati v zemlji.
Oolong čaj	Delno fermentiran čaj Listi so pred sušenjem podvrženi delni fermentaciji.
Zeleni čaj	Nefermentiran čaj Liste takoj po obiranju toplotno obdelajo s paro, ki deaktivira encim polifenoloksidazo, zaradi česar ne pride do oksidacije. Sledi postopek svaljkanja, pri čemer pride do rezanja in zvijanja čajnih listov.
Rumeni čaj	Nefermentiran čaj Proizvajajo ga podobno, kot zeleni čaj, le da je postopek sušenja daljši.
Beli čaj	Nefermentiran čaj Pripravljajo ga s posebnim postopkom pridelave, v katerem so uporabljeni le mladi lističi in popki.

1.8.2.5 Privzemanje fluora in vsebnost fluorida v čajnih listih in čajnih poparkih

Vsebnost fluora v čajnih listih je odvisna od vsebnosti fluora v zemlji plantaž in v okoliškem zraku ter od starosti čajnih listov. Starejši čajni listi lahko vsebujejo do 7-kratno vsebnost fluora v zemlji, med-tem ko je vsebnost fluorida v listih lahko do 1000-krat višja od vsebnosti fluorida v zemlji (Fung et al., 1999) .

Dostopnost in privzemanje fluora s strani čajevca je odvisno od značilnosti zemlje plantaž, to je vsebnosti gline, pH, prisotnosti fluorida vezanega v pozitivno nabitih kompleksih, ter od vsebnosti ionov kalcija, železa, aluminija in fosforja. Večina fluora naj bi rastlina privzela iz zemlje v obliki fluorida (preko ionskih kanalčkov), po rastlini pa naj bi potoval večinoma v kompleksih z aluminijem (Nagata, Hayatsu, & Kosuge, 1993; Ruan & Wong, 2001; Wong, Fung, & Carr, 2003).

V čajih, proizvedenih iz mladih čajnih listov, je vsebnost fluora običajno med 26–808 mg kg^{-1}, medtem ko lahko čaji v opeki zaradi vsebnosti starih čajnih listov, vsebujejo tudi več 1000 mg kg^{-1} (Fung et al., 1999; Lu et al., 2004; Shu, Zhang, Lan, & Wong, 2003; Xie, Chen, Sun, Guo, & Yin, 2007). Vsebnosti fluorida v čajnih poparkih različnih vrst čajev so različne in se gibljejo med 0,29 in 6,01 mg l^{-1} (Cao et al., 2004; Cao et al., 2006; Emekli-Alturfan et al., 2009; Malinowska et al., 2008). Za določitev učinkovitosti sproščanja fluora iz čajnih listov v poparke, je potrebno določiti tako vsebnosti fluora v

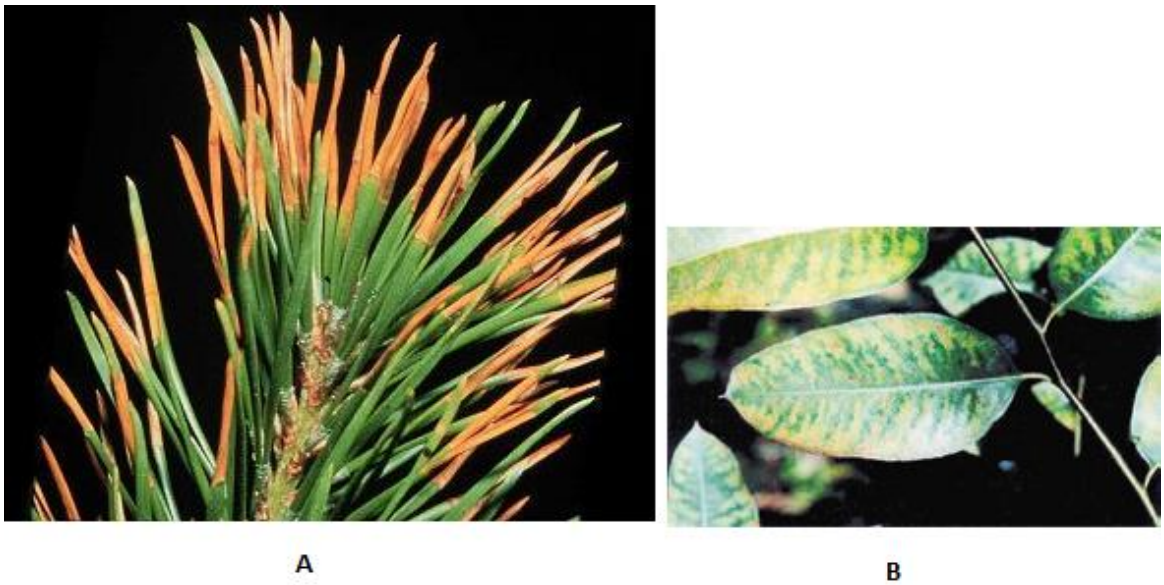
čajnih listih kot tudi vsebnosti fluorida v poparkih. Raziskave, kjer bi bili opravljeni obe določitvi, so redke in se večinoma osredotočajo samo na čaj v razsulu in čaj, stisnjen v opeke (Fung et al., 1999).

1.8.3 Fitotoksičnost fluora

Poškodbe rastlin s fluoridi v okolici industrije z znatnimi izpusti plinastih fluoridov niso redkost. Značilni simptomi so morfološke spremembe listov, ki so največkrat vidne kot nekroze konic in robov listov, pri čemer je meja med nekrotičnim in zdravim tkivom jasno vidna (Fornasiero, 2001). Morfološke spremembe zaradi akumulacije fluora iz zemlje so enake spremembam zaradi akumulacije iz zraka (Klumpp, Domingos, & Pignata, 2000).

1.8.3.1 Morfološke in fiziološke spremembe

Fluorid prehaja v listih preko transpiracijskega sistema do konca listnih žil in skozi celične stene na robove listov, kjer se akumulira. V primeru povečane akumulacije fluora, pride do poškodb celičnih sten, vsebina celice izteče in ta propade. Ko se poškodovani del lista posuši, se pojavijo značilne rumeno-rjave, rjave oziroma črne lise (Slika 7 A). Poškodovani del lahko tudi odpade in povzroči deformacijo oblike listov. Pri nižji stopnji akumulacije pride do raztezanja celične stene in poškodb, ki se kažejo kot zvijanje listov. Fluor lahko prodre tudi v kloroplast, kjer reagira z magnezijem in razbije molekulo klorofila. Posledica je razbarvanje (rumene lise) področij med listnimi žilami (Slika 7 B) (Davison & Weinstein, 2006). Najhujše poškodbe se pojavijo na popolnoma razvitih listih srednje starosti, medtem ko stari listi in razvijajoči se listi niso tako dovzetni in se poškodbe, v obliki nekroz na konicah pojavijo le redko (Weinstein & Alscher-Herman, 1982).



Slika 7: *Morfološke spremembe rastlin zaradi akumulacije fluora*: Nekroza na konicah razvijajočih se iglic bora, *Pinus contorta* (A), ter robna in medžilna kloroza listov *Eucalyptus globulus* (B) (Leonard. H. Weinstein & Davison, 2003).

Akumulacija fluora lahko upočasni ali zavre rast rastlin tudi brez nastanka vidnih poškodb, saj vpliva na številne membranske funkcije, aktivnost encimov in ostalih metabolnih procesov (Mackowiak, Grossl, & Bugbee, 2003; Miller, 1992; Shupe & Olson, 1983; Yang & Miller, 1963). Najpogosteje vpliva na fotosintezo (Parry, Schmidt,

& Gutteridge, 1984; Zwiazek & Shay, 1988c), respiracijo (Yu & Miller, 1967) ter metabolizem ogljikovih hidratov (Miller, Yu, & Pushnik, 1983; Zwiazek & Shay, 1988b), nukleotidov (Miller et al., 1983) in lipidov (Zwiazek & Shay, 1988a). Fluor vpliva tudi na količino vode v rastlini, saj ob vezavi na korenine vpliva na privzemanje vode (Kamaluddin & Zwiazek, 2003; Zwiazek & Shay, 1988b).

1.9 Rast rastlin na onesnaženi zemlji

Kljub temu, da so nekatere težke kovine za rastline esencialne, jih je večina pri višjih koncentracijah toksičnih, saj v rastlini povzročijo tvorbo prostih radikalov, kar povzroči oksidativni stres v rastlini, ali pa vplivajo na delovanje pomembnih encimov in pigmentov (Henry, 2000). V splošnem lahko določeno rastlino glede na sposobnost preživetja v prisotnosti težkih kovin (in tudi fluora) razdelimo v tri skupine: izločevalec, indikator in akumulator.

V primeru, da je rastlina izločevalec, vsebuje mehanizme, ki preprečujejo prehajanje kovine (fluora) v nadzemne dele in s tem omejujejo zadrževanje kovine (fluora) na korenine. Indikatorji aktivno akumulirajo in tolerirajo kovino (fluor) v nadzemnih delih in tako odražajo vsebnost kovine (fluora) v zemlji oziroma okolju. (Hiper)akumulatorji akumulirajo kovine (fluor) v nadzemnih delih rastline, v katerih je vsebnost kovine (fluora) bistveno višja od vsebnosti v zemlji (Ghosh & Singh, 2005).

1.9.1 Biomonitoring in bioindikatorji fluora

Plinasti fluoridi v zraku (večinoma HF in SiF_4) lahko, predvsem v bližini vira (naravni ali antropogeni viri), povzročijo številne poškodbe tako na rastlinah kot tudi na drugih organizmih. Pri rastlinah so za poškodbe najbolj dovzetni mladi listi in iglice, občutljivost pa se razlikuje tako med vrstami kot tudi znotraj iste vrste. Opaziti je mogoče, da je določena rastlina v nekem okolju občutljiva, spet v drugem pa relativno tolerantna. Razlog so predvsem podnebne in genetske razlike ter edafski faktorji (Posthumus, 1983; Weinstein & Davison, 2003).

Najboljši bioindikatorji plinastih fluoridov so tiste rastline, ki so najbolj občutljive in hitro razvijejo značilne vidne spremembe listov (Arndt, Nobel, & Schweizer, 1987). Z opazovanjem sprememb na listih, ki so izrasli v različnih časih rastne sezone, je mogoče zaznati tudi večkratno izpostavitev in približen čas trajanja izpostavitve (Weinstein, Davison, & Arndt, 1999).

Rastline, ki se lahko uporabijo za biomonitoring fluoridov v zraku, morajo poleg tega, da lahko akumulirajo fluor, izražati tudi druge fiziološke, biokemične, histološke ali genetske spremembe tkiv (Weinstein & Davison, 2003). Glede na izražene spremembe lahko rastline razdelimo v štiri skupine (Borsdorf, 1960):

- zelo občutljive (vidne spremembe tudi pri veliki oddaljenosti od vira onesnaženja),
- občutljive,
- delno občutljive in
- neobčutljive (brez sprememb ali manjše spremembe tudi tik ob viru).

Večino rastlin, kot na primer lilije, tulipani, frezije in nekatere dvokaličnice (Lorenzini, 2000), pa tudi šentjanževka (Fornasiero, 2001), azaleja, ciklama, zajčja deteljica in številna drevesa (jablana, hruška, sliva, večina iglavcev), obravnavamo kot na fluor občutljive (Sikora & Chappelka, 1996). Na fluor neobčutljive rastline so prej izjema kot pravilo.

Za aktivni in pasivni biomonitoring fitotoksičnosti fluoridov v zraku so bile predlagane različne rastline (Franzaring, Klumpp, & Fangmeier, 2007; Horntvedt, 1997; Vike, 2005), največkrat pa so uporabili lišaje (F. Davies, 1982, 1986; Perkins & Millar, 1987; Perkins,

Millar, & Neep, 1980).

Težave pri biomonitoringu predstavljajo poškodbe, ki so lahko le posledica različnih biotskih (bakterije, virusi, glive) in abiotskih (T, veter, voda) dejavnikov.

1.9.2 (Hiper)akumulacija in fitoremediacija

Po definiciji, ki je bila sprejeta za akumulacijo težkih kovin v rastlinah, je hiper(akumulator) rastlina, ki lahko akumulira določeno kovino v nadzemnih delih (Baker & Brooks, 1989). Vsebnosti določene kovine v hiperakumulatorjih so vsaj 2–3-krat višje od vsebnosti v ostalih rastlinah iz neonesnaženega okolja (McGrath & Zhao, 2003). Znanih je preko 400 hiperakumulatorskih rastlin iz 45 družin; od tega je kar 87 vrst iz 11 rodov družine *Brassicaceae* (križnice). Pomembnejše družine so še *Fabaceae* (metuljnice), *Euphorbiaceae* (mlečkovke), *Asteraceae* (nebinovke), *Lamiaceae* (ustnatice) in *Scrophulariaceae* (črnobinovke) (Dushenkov, 2003; Salt, Smith, & Raskin, 1998). Med najbolj znanimi hiperakumulatorji težkih kovin sta *Thlaspi caerulescens* (gozdni mošnjak) in *Brassica juncea* (indijska gorčica).

Edina doslej znana rastlina, ki je sposobna akumulirati večje količine fluora v nadzemnih delih rastline, je čajevec. Nekaj fluora lahko privzemajo tudi poganjki javorja in pasja trava (Braen & Weinstein, 1985), detelja in nekatere trave (Arnesen, 1997; Stevens et al., 2000), špinača (S. K. Jha et al., 2008), čebula (S. K. Jha et al., 2009) in šentjanževka (Fornasiero, 2003).

Hiperakumulacijo se lahko ovrednoti z bioakumulacijskim faktorjem (ang. Bioaccumulation factor, BAF) in s translokacijskim faktorjem (ang. Translocation factor, TF). BAF se uporablja kot merilo učinkovitosti rastline pri odstranjevanju kovin iz zemlje, medtem ko je TF merilo za učinkovitost prenosa kovine iz korenin v liste oziroma nadzemne dele rastline (Freytag, 1986).

Glede na to, da je fluor rastlinam večinoma dostopen le v obliki fluorida (Davison, 1983), se podaja BAF kot razmerje med vsebnostjo fluora v nadzemnih delih rastline in vsebnostjo fluorida v zemlji oziroma substratu.

$$\mathrm{BAF} = \frac{w(\mathrm{F})_{\mathrm{listi+stebla}}}{w(\mathrm{F}^-)_{\mathrm{zemlja}}} \qquad (1)$$

V primeru akumulacije fluora se TF podaja kot razmerje med vsebnostjo fluora v nadzemnih delih rastline in vsebnostjo fluora v koreninah:

$$\mathrm{TF} = \frac{m(\mathrm{F})_{\mathrm{listi+stebla}}}{m(\mathrm{F})_{\mathrm{korenine}}} \qquad (2)$$

V splošnem velja, da naj bi bili vrednosti TF in BAF večine rastlin < 1, medtem ko sta vrednosti TF in BAF hiperakumulatorjev > 1 oziroma >> 1 (Freytag, 1986).

Že leta 1983 je bila predstavljena ideja o uporabi hiperakumulatorjav pri selektivnem odstranjevanju oziroma recikliranju (fitoremediaciji) onesnažil v zemlji (Chaney, 1983). Fitoremediacija je metoda za fiksacijo ali odstranjevanje onesnažil iz onesnaženih sedimentov s pomočjo rastlin in z njimi povezanih mikroorganizmov. Zaradi številnih prednosti, med katerimi so najbolj pomembne uporaba na mestu samem (lat. *in situ*), ter stroškovna in ekološka sprejemljivost, je koncept fitoremediacije kmalu postal znanstveno in komercialno zelo zanimiv (Freytag, 1986; Salt et al., 1995). Dandanes se raziskuje in uporablja za namene dekontaminacije sedimentov in različnih tal ter za čiščenje odpadnih voda (Sharma, Padley, 2014).

Razlikujemo med različnimi mehanizmi fitoremediacije: fitoekstrakcija, rizofiltracija,

fitostabilizacija, fitotransformacija, fitovolatilizacija, fitostimulacija in rizosferna bioremediacija. Med pogosteje uporabljanimi mehanizmi so fitoekstrakcija, rizofiltracija in fitostabilizacija. Pri fitoekstrakciji se rastline uporabijo za prenos in zadrževanje onesnažil v nadzemnih delih rastlin, ki jih je mogoče odstraniti s splošno uporabnimi kmetijskimi tehnikami, na primer žetjem. Rizofiltracija je uporabna za odstranjevanje onesnažil iz vode, saj pride do akumulacije onesnažil v koreninah. Pri fitostabilizaciji pa se onesnažil ne odstrani; rastline se uporabi le za transformacijo in stabilizacijo onesnažil v tleh v obliki, ki je manj strupena.

Rastline, ki imajo oba, BAF in TF, večja od ena (BAF in TF > 1) se lahko potencialno uporabljajo v fitoekstrakciji, rastline z BAF večjim od ena in TF manjšim od ena (BAF > 1 in TF < 1) pa imajo večji potencial pri fitostabilizaciji (Subhashini, Swamy, & Krishna, 2013). V primeru rizofiltracije je najbolje, da sta oba, tako TF kot BAF, bistveno nižja od ena (<< 1, tem nižje, tem bolje) (Dushenkov, Kumar, Motto, & Raskin, 1995).

Učinkovitost fitoremediacije je odvisna tudi od drugih lastnosti rastlin, pri čemer imajo pomemben vpliv predvsem hitrost rasti, biomasa in gostota posaditve. Za fitoremediacijo so uporabne tudi nižje rastline z nizko stopnjo akumulacije, vendar z globokimi koreninami in veliko produkcijo biomase.

Za fitoremediacijo s fluorom onesnažene zemlje oziroma vode so bile predlagane naslednje vrste: *Camellia japonica* (japonska kamelija), *Pittosporum tobira* (navadni topljivec, grm), *Saccharum officinarum* (sladkorni trst) (del Socorro Santos-Díaz, Zamora-Pedraza, & Potosí, 2010), *Fraxinus pennsylvanica*, *Liriodendron tulipifera* (navadni tulipanovec), *Taxodium distichum (močvirski taksodij),* različne vrste vrbe *Salix Willow hybrid, Salix nigra, Salix Viminalis* L (Kang et al., 2008; Telesiński et al., 2011), bodičasto grmovje, *Prosopis juliflora* (Saini, Khan, Baunthiyal, Sharma, 2012) ter nekatera druga listnata drevesa (Wang-Cahill & Fields, 2007) in rastline (Asada, Parkpian, & Horiuchi, 2006). S šentjanževko so opravili tudi poljski poskus (Fornasiero, 2003).

1.10 Določanje fluora

1.10.1 Analizne metode za določanje fluora

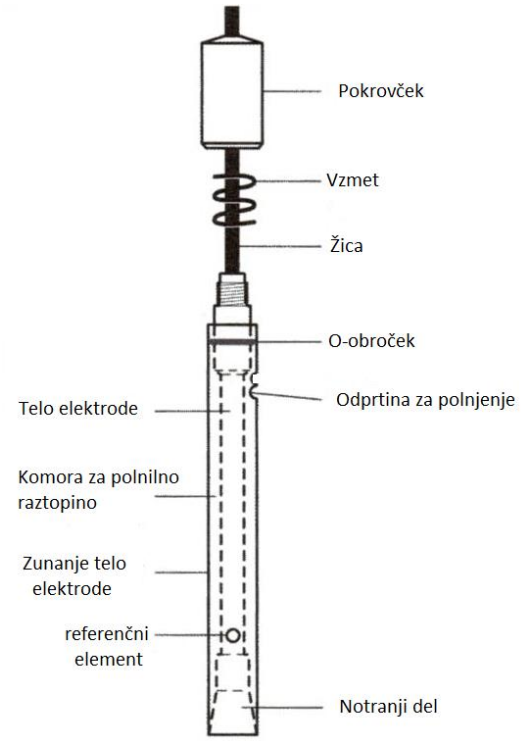
V literaturi so opisane številne metode za določanje fluora v različnih vrstah vzorcev. Klasične, volumetrične in gravimetrične metode so izpodrinile instrumentalne metode, predvsem ionska kromatografija in fluoridna ionskoselektivna elektroda (F-ISE). Poleg teh se pogosto uporabljajo še ionska in plinska kromatografija (Haldimann & Zimmerli, 1993; Michigami, Kuroda, Ueda, & Yamamoto, 1993) ter molekulska absorpcijska spektrometrija z aluminijevim monofluoridom (Chiba, Tsunoda, Haraguchi, & Fuwa, 1980; Tsunoda, Fujiwara, & Fuwa, 1977). Redkeje se uporabljajo nekatere druge metode, kot so encimatske (Marcos & Townshend, 1995), katalitske (Klockow, Auffarth, & Kopp, 1977), polarografske (Guanghan, Qiongling, Xiaogang, Tong, & Xin, 1999) in voltametrične metode (Wang & Grabarić, 1990), atomska emisijska spektrometrija z mikrovalovi inducirano helijevo (Gehlhausen & Carnahan, 1989) ali induktivno sklopljeno plazmo (Manzoori & Miyazaki, 1990), elektrotermična atomska absorpcijska spektrometrija (Cobo, Gomez, Camara, & Palacios, 1993), masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (Bayón, Garcia, Alonso, & Sanz-Medel, 1999), radioaktivacijska analiza (Bayón et al., 1999), s protoni inducirana gama emisija (Paik et al., 1997), bližnja infrardeča spektroskopija ali nevtronska aktivacijska analiza (T. P. Cheng et al., 1997).

F-ISE, ki sta jo leta 1966 dizajnirala Frant in Ross (Frant & Ross, 1966), predstavlja danes verjetno najenostavnejšo, najpogosteje uporabljano in najbolj zanesljivo metodo za

določanje fluorida v vodnih vzorcih (Pihlar, 2011). Njene prednosti so predvsem selektivnost in široko linearno območje delovanja. S F-ISE je mogoče koncentracijo fluorida v vzorcu določati z direktno potenciometrijo ali s potenciometrično titracijo.

Membrana F-ISE je iz monokristala fluoridov redkih zemelj, npr. LaF_3, NdF_3 ali PrF_3, njeno prevodnost pa je mogoče povečati z dopiranjem z Eu^{2+}. Membrana je diskaste oblike in je zalepljena v telo elektrode iz epoksidne smole. Nizek topnostni produkt LaF_3 ($\approx 10^{-29}$) omogoča uporabo elektrode v širokem koncentracijskem območju tudi v prisotnosti ligandov, ki tvorijo z La^{3+} stabilne komplekse (Crosby, Dennis, & Stevens, 1968).

Potencial fluoridne elektrode se meri proti zunanji referenčni elektrodi, lahko pa je referenčna elektroda kombinirana s fluoridno elektrodo v t. i. kombinirano ISE. Konstrukcija kombinirane F-ISE (Orion, model 96-09) je prikazana na sliki 8.



Slika 8: *Shema kombinirane F-ISE* (Orion, model 96-09).

Izmerjeni potencial elektrode je odvisen od aktivnosti (koncentracije) fluorida v raztopini in je podan z Nernstovo enačbo.

$$E = E' - k \cdot \log a_F \qquad (3)$$

E… izmerjeni potencial elektrode (mV)
E'… potencial referenčne elektrode (mV)
k… naklon elektrode (približno 57 mV DEC^{-1})
a_F… aktivnost prostega fluorida v raztopini

Aktivnost je povezana s koncentracijo fluorida v analizirani raztopini preko aktivnostnega koeficienta (γ).

$$a_F = \gamma_F \cdot c_F \qquad (4)$$

a_F… aktivnost prostega fluorida v raztopini (mol l^{-1})

γ… aktivnostni koeficient fluoridnega iona
c_F… koncentracija F^- v raztopini (mol l^{-1})

Aktivnostni koeficient iona v raztopini je močno odvisen od ionske moči raztopine, ki je odvisna od koncentracije in naboja vseh ionov v raztopini;

$$\mu = \frac{1}{2}\sum_i c_i z_i \qquad (5)$$

μ… ionska moč raztopine (mol l^{-1})
c_i… koncentracija iona i (mol l^{-1})
z_i… naboj ion i

Aktivnostni koeficient je konstanten in premosorazmeren s koncentracijo v primeru, da je ionska moč ozadja visoka in konstantna glede na koncentracijo merjenega iona. Odziv elektrode sledi Nernstovi enačbi pri koncentraciji fluorida od 1 mol l^{-1} do manj kot 10^{-5} mol l^{-1}. Uporaben odziv elektrode je do približno 10^{-6} mol l^{-1}, vendar je v veliki meri odvisen od pH (Crosby et al., 1968).

Odzivni čas elektrode je odvisen od koncentracije fluorida v raztopini. Po IUPAC je definiran kot čas, ki je potreben, da elektroda doseže vrednost potenciala, ki je 1 mV od ravnotežne vrednosti potenciala v primeru, da se aktivnost določevalnega iona nenadoma spremeni in je zelo odvisen od eksperimentalnih pogojev. Pri F-ISE je odzivni čas od nekaj sekund do ene ure, pri vsebnosti fluorida v raztopini 10^{-6} mol l^{-1} v ustreznem pH območju (Bailey, 1980).

Največji vpliv na točnost in natančnost določitev imajo ionska moč raztopine, pH, ioni, ki lahko motijo določitev in temperatura (Frant & Ross, 1968; Orion, 1999; Rice, 1983). Ionska moč raztopine vpliva na aktivnostni koeficient, zato jo je potrebno pred meritvijo uravnati oziroma izenačiti ionsko moč standardov in vzorcev. Primeren pH za določanje fluorida je med 5 in 7; pri pH < 5 prihaja do protoniranja (tvorba HF ali HF_2^-), pri pH > 7 pa do izpodrivanja F^- z OH^-. Pri pH 10, v primeru koncentracije fluorida 10^{-2} mol l^{-1}, ni napake v določitvi fluorida, pri koncentraciji fluorida 10^{-4} mol l^{-1} je relativna napaka meritve že do 10 %, pri nižjih koncentracijah pa je napaka lahko še večja (Crosby et al., 1968).

Ioni, kot so Al^{3+}, Fe^{3+}, pa tudi Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zr^{4+}, Th^{4+} in U^{4+}, lahko tvorijo komplekse z F^-, zato jih je potrebno pred meritvijo kompleksirati.

Sprememba temperature vpliva na naklon krivulje. Sprememba temperature za 1 °C povzroči v primeru koncentracije fluorida 10^{-3} mol l^{-1} 2 % (absolutno) napako določitve, zato je potrebno vzorce, standarde, vodo in pufer hraniti pri konstantni temperaturi, najbolje pri 25 °C (Rice, 1983).

Izenačenje ionske moči standardov in vzorcev, dekompleksiranje fluoridnega iona oziroma kompleksiranje motečih ionov (predvsem železa in aluminija) ter uravnavanje pH raztopine je mogoče doseči z uporabo TISAB (ang. Total Ionic Strenght Adjustement Buffer, TISAB) pufrov. TISAB pufer se vzorcem in standardom dodaja v enakih, ustrezno velikih alikvotih, ki se jih navadno določi eksperimentalno. Pri tem je izbira pufra odvisna od vrste in sestave vzorca.

F-ISE omogoča le določanje prostega, nevezanega fluoridnega iona. Vzorce, ki vsebujejo fluor vezan v komplekse ali netopne spojine, je potrebno pred analizo razklopiti.

1.10.2 Priprava vzorcev na analizo

1.10.2.1 Določanje fluora

Pred določanjem vsebnosti celotnega fluora je največkrat potreben popoln razklop vzorca, med katerim se fluor, vezan v različne organske ali anorganske komplekse, sprosti v obliki fluoridnega iona. V primeru uporabe neselektivnih analiznih metod je potrebno pred analizo še ločiti fluorid od morebiti prisotnih motečih ionov.

Pri klasični destilaciji po Willard-Winter-ju, ki je bila uvedena leta 1933, sta hkrati potekla razklop vzorca in ločba motečih ionov (Willard & Winter, 1933). Ta tehnika in njene modifikacije (Andersson & Gelin, 1967b; Pietzka & Ehrlich, 1953; Wade & Yamamura, 1965) so v sredini 20. stoletja omogočile izvedbo številnih raziskav. Vendar pa so metode destilacije zamudne, izvedba je težavna, ločba v prisotnosti kovin, ki tvorijo s fluoridom močne komplekse, nezadovoljiva, velika pa je tudi poraba vzorca (Andersson & Gelin, 1967a). Z uvedbo F-ISE so metode destilacije postale zgodovinskega pomena, nadomestile pa so jih hitrejše, učinkovitejše in enostavnejše metode razklopa, pri katerih je tudi poraba vzorca manjša. Največkrat se uporabljajo sežig v prisotnosti kisika v zaprtem avtoklavu (Levaggi, Oyung, & Feldstein, 1971; Venkateswarlu, 1975), odprt sežig (Esala, Vuori, & Niinistö, 1983; Singer & Armstrong, 1959; Singer & Ophaug, 1977), razklop s talinami z alkalijskimi hidroksidi ali karbonati (Bock, 1979; Eyde, 1982; Galloway, Shoaf, & Skaggs, 1975; Kjellevold, Bjorvatn, & Julshamn, 2001; Ponikvar et al., 2007; Sager, 1987), pirohidroliza (Bock, 1979; Dressler, Pozebon, Flores, Paniz, & Flores, 2002; Inkielewicz & Krechniak, 2003; Ponikvar & Liebman, 2006; Warf, Cline, & Tevebaugh, 1954), poročali pa so tudi o mikrovalovnem razklopu (Grobler & Louw, 1998; Rocha, Rojas, et al., 2013a).

Razklop v prisotnosti kisika poteka v zaprtem avtoklavu, ostanek po sežigu pa se absorbira v absorpcijsko raztopino, navadno NaOH (Levaggi et al., 1971; Venkateswarlu, 1975).

Suh sežig poteče termično v odprti posodi iz inertnega materiala ob prisotnosti »fiksirnih« reagentov, kot sta $Ca_3(PO_4)_2$ ali MgO (Esala et al., 1983; Singer & Armstrong, 1959; Singer & Ophaug, 1977).

Za pripravo alkalnih talin se najpogosteje uporabljata alkalijska hidroksida KOH in NaOH. Razklop običajno poteče v posodicah iz niklja ali srebra (Bock, 1979; Fabbri & Donati, 1981; Sager, 1987). Za pripravo alkalnih talin, navadno v posodicah iz platine, se uporablja tudi alkalijske karbonate, Li_2CO_3, Na_2CO_3 ali K_2CO_3 oziroma ekvimolarnih mešanic, katerih temperatura tališča je nižja; najbolj pogosta je uporaba $KNaCO_3$ (Devey, 1989; Thomas & Gluskoter, 1974).

Pri pirohidrolizi poteče ob razklopu vzorca tudi ločba fluorida od ionov, ki lahko motijo določitev. Razklop poteče pri temperaturah med 800 in 1200 °C v toku pregrete vodne pare, vlažnega kisika ali vlažnega zraka. Nastaja hlapni HF, ki se absorbira v alkalno raztopino (Berns & van Der Zwaan, 1972; Clements, Sergeant, & Webb, 1971; Nardozzi & Lewis, 1961; Newman, 1968). Za povečanje učinkovitosti razklopa se lahko doda akcelerator; U_3O_8 kot akcelerator je nadomestila uporaba WO_3 (Nicholson & Duff, 1981).

Za razklop vzorcev so predlagali tudi kislinski mikrovalovni razklop. Postopek je v primerjavi s klasičnimi postopki razklopa hitrejši, zaradi uporabe zaprtega sistema ne prihaja do izgub lahkohlapnih komponent, možno pa ga je tudi avtomatizirati (Grobler & Louw, 1998; Rocha, Rojas, et al., 2013a).

1.10.2.2 Določanje fluorida

Za določanje fluorida, to je tistega fluora, na katerega se odziva F-ISE brez predhodnega razklopa vzorca, so v literaturi opisani različni postopki. Najbolj pogosto se uporablja

ekstrakcija z vodo, ki jo je že leta 1965 opisal Brewer (Brewer, 1965). Metodo ekstrakcije z vodo so kasneje s številnimi modifikacijami uporabili v več raziskavah določanja fluorida v zemlji (Arnesen, 1997; Chhabra, Singh, & Abrol, 1980; Grewal, Kumar, & Kuhad, 1996; Haidouti, 1991; S. K. Jha, Nayak, Sharma, Mishra, & Sharma, 2008; Lori, 1987; Vike, 2005). Pogosto se uporablja tudi kislinska ekstrakcija bodisi z 1 M HCl (Eyde, 1983) bodisi s perklorovo ($HClO_4$) ali ocetno kislino. Za ekstrakcijo fluorida iz zemlje se lahko uporablja tudi $CaCl_2$ (Adriano & Donner, 1982; Arnesen, 1997; Arnesen et al., 1995).

2 Namen

Fluor je v naravi zelo razširjen element in je posledično neogiben del biosfere. Človeku, rastlinam in živalim je na voljo v obliki fluorida, ki je tista oblika fluora, ki jo organizmi lahko privzemajo. S prehajanjem v rastlino vstopa fluor v prehransko verigo in tako vpliva na rastlinojedce in na človeka.

Fluor je zaradi pozitivnih učinkov na zdravje zob in ustne votline obravnavan kot koristen element za človeka. Žal lahko pride že pri kroničnih dnevnih odmerkih, ki so le malenkost nižji ali višji od primernega dnevnega odmerka (0,05 mg dan^{-1} kg telesne mase^{-1}), do pojava zobne fluoroze pri otrocih, ali kostne fluoroze tako pri otrocih, kot odraslih.

Človek zaužije največ fluora oralno, vnos preko dihalnih poti ali preko kože pa je v običajnih razmerah zanemarljiv. Najpomembnejši viri fluora za človeka so pitna voda, napitki, hrana (predvsem tista, pripravljena s fluorirano vodo) ter sredstva za nego zob in ustne votline s fluoridi. V nekaterih evropskih državah uporabljajo za kuhanje fluorirano sol, ponekod pa otroci, navadno v vrtcu ali šoli, prejemajo tudi fluorirano mleko. Pomemben vir fluora so lahko tudi antropogeni viri fluora, predvsem individualna kurišča ali izpusti iz industrijskih procesov.

Oralni vnos fluora z vodo, sredstvi za nego zob in ustne votline s fluoridi, fluorirano soljo ali mlekom je razmeroma lahko oceniti, saj so vsebnosti fluora vnaprej poznane in deklarirane na ovojnini. Več težav je z napitki in hrano, katerih vsebnosti niso vnaprej poznane. Med napitki izstopa pravi čaj. Čajevec (*Camellia sinensis* L.) namreč v večjih količinah privzema fluor iz zemlje in ga akumulira v nadzemnih delih. Med pripravo poparkov se fluor iz listov sprosti v poparke v obliki fluorida. Uživanje pravega čaja, še posebej večjih količin, lahko tako znatno prispeva k dnevnemu vnosu fluora. Prvi sklop doktorskega študija smo posvetili raziskavam učinkovitosti izluževanja fluora iz pravega čaja v čajne poparke, pri čemer smo želeli tudi ugotoviti, kako stopnja fermentacije in oblika pakiranja čaja vplivata na vsebnost fluorida v čajnih poparkih. Poleg ocene dnevnega vnosa fluora s pitjem pravega čaja smo naredili tudi oceno vnosa fluora s čajem in hrano za področja z nefluorirano oziroma fluorirano vodo.

Pomemben delež k dnevnemu vnosu fluora lahko prispeva tudi hrana. Viri fluora v hrani so njegovo privzemanje tako iz naravnih kot tudi iz antropogenih virov. Zaradi dolgoletnega posedanja tako plinastih kot prašnih delcev s fluorom so vsebnosti fluora v zemlji lahko povišane, prihaja pa lahko tudi do spiranja zemlje in s tem do prehajanja fluora v vodo, ter naprej v rastline in prehransko verigo. V letu 2005 so bile v okolici talilnice aluminija Talum d. d. v Kidričevem opažene nekrotične spremembe na koruzi. Določene vsebnosti fluora v listih koruze so bile precej višje od dovoljene vsebnosti fluora v živalski krmi (30 mg kg^{-1}) (Uradni list RS, št. 20/1996, pravilnik 1147), kar je bilo pripisano nekontroliranemu izpustu plinastih fluoridov v ozračje. Edina elektrolizna peč v Talum d. d. brez čistilne naprave je bila konec leta 2007 ustavljena. Vsebnosti fluora v okoliških rastlinah po tem letu zato ne bi smele presegati vsebnosti fluora v večini rastlin (do 10 mg kg^{-1}). Drugi sklop svojih raziskav smo tako posvetili primerjavi vsebnosti fluora v vzorcih listov koruze in v vzorcih zemlje, odvzetih leta 2005, s tistimi, ki smo jih odvzeli leta 2010. Opravili smo tudi primerjavo s koruzo iz čistega (neobremenjenega) okolja.

V zadnjem, tretjem sklopu raziskav smo se osredotočili na iskanje primernih bioindikatorjev za spremljanje obremenjenosti okolja s fluorom. V literaturi poročajo o različnih rastlinah, kot so špinača, čebula, detelja in nekatere vrste trave, ki sicer lahko privzemajo fluor, vendar v precej manjših količinah kot čajevec. Ker smo Slovenci znani kot uživalci zeliščnih čajev smo preverili, kakšne so vsebnosti fluora v zeliščih, ki se uporabljajo za pripravo čajev, in vsebnosti fluorida v zeliščnih poparkih. Zanimalo nas je, tudi ali se vsebnost fluora v zeliščih iz obremenjenega okolja razlikuje od tistih iz okolja, neobremenjenega z viri plinastih fluoridov. Glede na to, da je navadna kopriva (*Urtica dioica* L.) zelo razširjena rastlina, ki lahko v večjih količinah privzema in akumulira težke kovine iz zemlje in bi potencialno lahko privzemala tudi fluor, smo izvedli še lončni poskus s koprivo. Pri poskusu smo gojili koprivo na substratu onesnaženem z NH_4F. Osredotočili smo se na akumulacijo, vzorec privzemanja fluora v rastlino in oceno možnosti uporabe koprive kot bioindikatorja, bioakumulatorja in kot fitoremediatorja področij, obremenjenih z antropogenimi viri fluora.

Tekom raziskovalnega dela smo preverili in ovrednotili naslednje hipoteze, ki omogočajo: oceno celodnevnega vnosa fluora s čajem oziroma s čajem in hrano, primerjavo z antropogenimi viri fluora obremenjenega in neobremenjenega okolja ter oceno možnosti uporabe koprive kot bioindikatorja za spremljanje onesnaženosti okolja s fluoridi oziroma za fitoremediacijo zemlje onesnažene s fluoridi.

Hipoteza 1: Kvaliteta čajnih listov in oblika pakiranja čaja bistveno vplivata na vsebnost fluora v čajih.

Hipoteza 2: S pitjem večjih količin pravega čaja je mogoče prekoračiti primeren dnevni vnos fluora.

Hipoteza 3: Vsebnost fluora v koruzi v bližini antropogenega vira plinastih fluoridov je po postavitvi čistilne naprave dimnih plinov bistveno nižja.

Hipoteza 4: Smer vetra v bližini antropogenih virov plinastih fluoridov pomembno vpliva na vsebnost celotnega fluora in prostega fluorida v zemlji in rastlinah.

Hipoteza 5: Vsebnost fluora v rastlinah iz okolja, neobremenjenega s fluorom, je bistveno nižja od vsebnosti v obremenjenem okolju.

Hipoteza 6: Navadna kopriva (*Urtica dioica* L.) lahko akumulira fluor v nadzemnih delih rastline, zato lahko služi kot bioakumulator, bioindikator in fitoremediator na področjih, obremenjenih s fluorom.

3 Materiali in metode

3.1 Reagenti in referenčni materiali

Vsi uporabljeni reagenti so bili kvalitete p.a. ali emsure. Vse raztopine smo pripravili z dvakrat destilirano vodo. Pri določanju fluora smo med celotnim poskusom uporabljali laboratorijski pribor iz polietilena.

Raztopino NaOH (w = 50 % in C = 0,1 mol l^{-1}) smo pripravili z raztapljanjem zrn reagenta (Carlo Erba) v vodi.

Standardni raztopini NaF (C = 0,050 mol l^{-1} in γ = 100,0 mg l^{-1}) smo pripravili z raztapljanjem soli v vodi in kalibracijsko raztopino NaF (γ = 5,0 mg l^{-1}) s primernim razredčenjem standardne raztopine (γ = 100,0 mg l^{-1}).

Raztopine NH_4F (γ = 79,5, 159, 318, 477, 636, 795, 954 mg l^{-1}) smo pripravili z raztapljanjem soli NH_4F (Merck) v vodi.

Za pripravo alkalnih talin smo uporabili trden $NaKCO_3$ (Merck), pri pirohidrolizi pa trden WO_3 (Fluka). Vzorce smo po razklopu nakisali s koncentrirano H_2SO_4 (Merck).

Pufer CBS smo pripravili po postopku, opisanem v literaturi (Peters & Ladd, 1971). Za pripravo dveh litrov pufra smo v vodi raztopili 35,3 g diaminocikloheksantetraocetne kisline - CDTA (Merck). Za lažje raztapljanje smo dodali toliko NaOH (w = 50 %), da se je sol popolnoma raztopila. Nato smo dodali še 600 g trinatrijevega citrata dihidrata (Merck) in 120 g NaCl (Merck). Ko se je raztopina zbistrila, smo jo prenesli v 2000 ml stekleno merilno bučo, uravnali pH s koncentrirano HCl (Merck) na 6,0 in dopolnili z vodo do oznake.

Puferske raztopine (pH = 4,000 in pH = 7,000) za kalibracijo pH elektrode, smo pripravili z raztapljanjem vsebine kapsul (Carlo Erba) v 100 ml vode.

Pravilnost in natančnost določitev vsebnosti F^- v raztopinah smo preverili z uporabo standardne raztopine fluorida (Orion) z masno koncentracijo γ = (100 ± 0,5) μg ml^{-1}.

Postopek za določanje celotnega fluora v rastlinskih vzorcih smo preverili s standardnim referenčnim materialom NIST SRM-2695 (Fluor v rastlinju), ki je sestavljen iz standarda z visoko (277 ± 27) mg kg^{-1} in standarda z nizko (64,0 ± 8,4) mg kg^{-1} vsebnostjo fluora. Določitev fluora v vzorcih zemlje in substrata smo preverili z uporabo referenčnega materiala BCR CRM 461 (Fluor v glini) in lastnega referenčnega materiala RM (Fluor v zemlji) (Ponikvar & Liebman, 2006), ki vsebujeta (568 ± 10) mg kg^{-1} oziroma (844 ± 33) mg kg^{-1} fluora.

3.2 Aparature

Za potenciometrično določanje fluorida smo uporabljali Orion 960 Autochemistry System s kombinirano fluoridno ionsko selektivno F-ISE (Thermo, Orion model 96-09) s senzorjem temperature za prilagajanje strmine elektrode in avtomatskim razpršilnikom. Aparatura je prikazana na sliki 9.



Slika 9: *Thermo, Orion model 96-09.*

pH vzorcev smo izmerili z digitalnim voltmetrom (Iskra pH meter MA 5740) s temperaturnim senzorjem (Pt 100) in kombinirano pH elektrodo (ProMinent, Dulcotest PHEX-112-SE). Elektrodo smo kalibrirali pri pH = 4,00 in pH = 7,00.

Vzorce smo sušili v laboratorijskem sušilniku (Thermo, T 6) in homogenizirali ter mleli v ahatnem mlinu. Za sejanje smo uporabili sito (Retsch) s premerom por 0,25 mm.

Za tehtanje smo uporabljali analitsko tehtnico (Mettler, AT201) z natančnostjo tehtanja ± 0,00003 g in laboratorijsko tehtnico (Mettler, PB3002) z natančnostjo tehtanja ± 0,1 g.

3.3 Postopki

3.3.1 Izbira reprezentativnih vzorcev

3.3.1.1 Pravi čaji

Za analizo smo izbrali nekatere najbolj prodajane prave čaje v Sloveniji. Čaje v filter vrečkah in granulah smo kupili v Mercatorju, Sparu ali Hoferju, prave čaje v razsulu pa v čajni hiši CHA. Za primerjavo smo pridobili še nekaj čajev v razsulu iz Kitajske in Turčije. Nekateri izmed analiziranih čajev so predstavljeni na sliki 10.



Slika 10: *Nekateri izmed analiziranih komercialno dostopnih črnih, oolong, zelenih in pu'erh čajev*.

Podatki o čajih (vrsta čaja, tržno ime in blagovna znamka, izvor surovine, oblika, mesto nakupa) so podani v tabeli 6.

Tabela 6: *Podatki o analiziranih čajih* (vrsta čaja, tržno ime in blagovna znamka, izvor surovine, oblika, mesto nakupa).

Vrsta čaja	Tržno ime, blagovna znamka	Izvor surovine	Oblika	Mesto nakupa
Črni čaji	Sir Winston black tea, Sir Winston	Ni podatka	granule	Mercator
	Earl Grey, Milford	Ni podatka	vrečke	Mercator
	Classic English breakfast tea, Twinings	Šrilanka, Kenija, Indija	vrečke	Mercator
	Earl Grey, 1001 cvet	Šrilanka, Indonezija, Indija	vrečke	Mercator
	Indijski črni čaji, 1001 cvet	Indija (Assam)	vrečke	Mercator
	Earl Grey, Mr Perkins	Ni podatka	vrečke	Hofer
	Črni čaj, Darjeeling	Indija (Darjeeling)	vrečke	Mercator
	Turški črni čaj	Turčija	razsulo	tržnica v Turčiji
	Keemun, CHA	Kitajska (Anhui)	razsulo	Čajna hiša CHA
	English breakfast, CHA	Šrilanka, Kenija, Indija	razsulo	Čajna hiša CHA
	Assam TGFOP1, CHA	Indija (Assam)	razsulo	Čajna hiša CHA
	Yunnan, CHA	Kitajska (Yunnan)	razsulo	Čajna hiša CHA
Oolong čaji	Formosa, CHA	Tajvan	razsulo	Čajna hiša CHA
	Mladi oolong tea	Kitajska (Guizhou)	razsulo	tržnica na Kitajskem
Zeleni čaj	Zeleni čaj, Spar	Ni podatka	vrečke	SPAR
	Zeleni čaj, Sir Winston	Ni podatka	vrečke	Mercator
	Earl Grey Green, Twinings	Kitajska (NA)	vrečke	Mercator
	Zeleni čaj, 1001 Cvet	Kitajska (NA)	vrečke	Mercator
	Mao Feng, CHA	Kitajska (NA)	razsulo	Čajna hiša CHA
	Green tea, Hotel Park	Kitajska (Guizhou)	razsulo	tržnica na Kitajskem
	Mladi zeleni čaj	Kitajska (Guizhou)	razsulo	tržnica na Kitajskem
Pu'erh čaji	Pu'erh, Teekane	Kitajska (Yunnan)	vrečke	Mercator
	Pu'erh, CHA	Kitajska (Yunnan)	razsulo	Čajna hiša CHA
	Pu'erh čaj v opeki	Ni podatka	opeka	Čajna hiša CHA

3.3.1.2 Zeliščni čaji

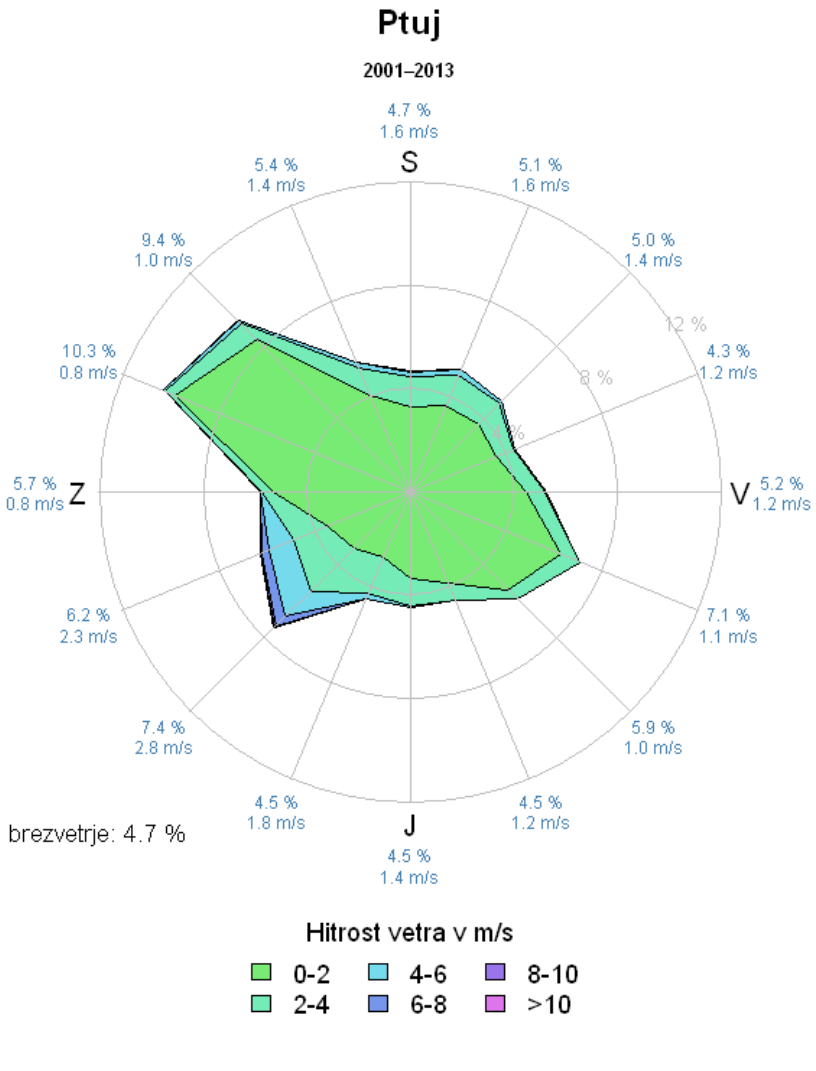
Izbrane zeliščne čaje bezgovega cvetja (1001 Cvet), lipe (1001 Cvet), kamilice (1001 Cvet), šipka (1001 Cvet), mete (1001 Cvet), koprive (Mogota), hibiskusa (1001 Cvet) in žajblja (1001 Cvet) smo kupili v Mercatorju ali Sparu. Analizirani čaji so predstavljeni na sliki 11.



Slika 11: *Komercialno dostopni zeliščni čaji, izbrani za analizo.*

3.3.1.3 Zemlja, koruzni listi, koruzne metlice in zelišča iz s fluorom (ne)obremenjenega okolja

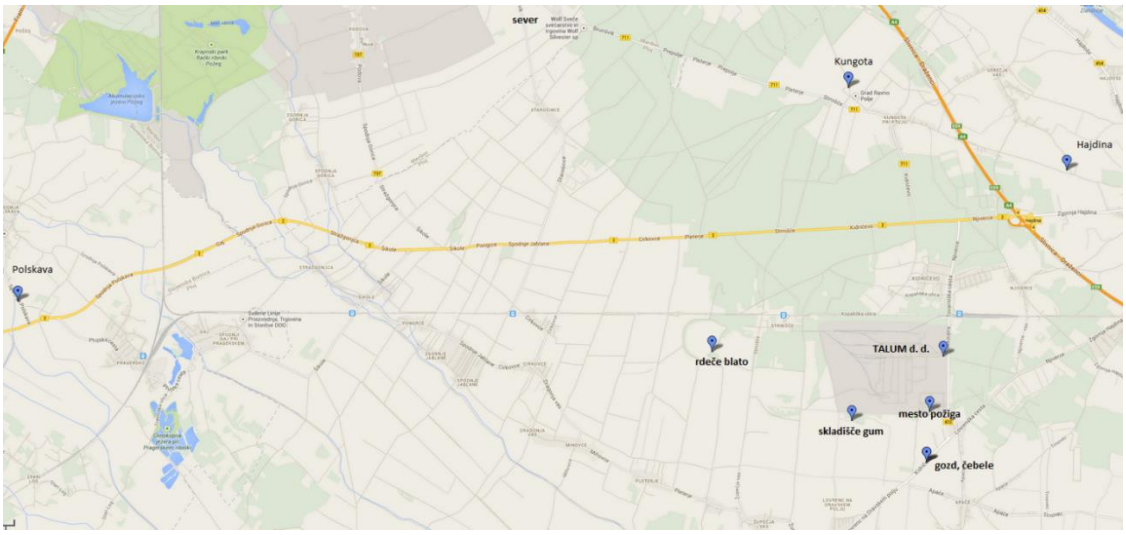
V okolici talilnice aluminija Talum d. d. na Kidričevem pri Ptuju smo leta 2005 odvzeli vzorce koruznih listov in metlic ter zemlje (globina 0–20 cm) približno 500 m v smeri in iz smeri vetra. Odvzemna mesta so bila določena na osnovi rože vetrov, predstavljene na sliki 12 (ARSO, 2014).



Slika 12: *Roža vetrov za področje Ptuja*. Dostop http://meteo.arso.gov.si/uploads/probase/www/climate/table/sl/by_variable/wind/Ptuj.html.

Za primerjavo okolja, obremenjenega s plinastimi viri fluorida, in čistega okolja (ozadje) smo odvzeli še vzorce koruznih listov, metlic in zemlje v bližini Slovenske Bistrice.

Ponoven odvzem vzorcev smo izvedli leta 2010. Vzorčili smo na istih mestih, kot leta 2005 in dodali še nekaj novih mest. Odvzeli smo vzorce zelišč, koruznih listov in zemlje. Za primerjavo smo odvzeli še vzorce iz čistega okolja iz Bukovškega polja v Selški dolini pri Škofji Loki. Mesta vzorčenja v okolici talilnice aluminija Talum d. d. so prikazana na sliki 13, medtem ko so zračne oddaljenosti vseh vzorčnih mest od Talum-a prikazane v tabeli 7.



Slika 13: *Mesta vzorčenja*. Na sliki so prikazana mesta vzorčenja v letu 2010 v okolici talilnice aluminija Talum d. d. na Kidričevem pri Ptuju.

Tabela 7: *Zračna oddaljenost vzorčnih mest od talilnice aluminija Talum d. d.*

Mesto vzorčenja	GPS Koordinata	Zračna oddaljenost od Talum-a (km)
Mesto požiga	N46,23,252 W15,47,582	1,05 južno
Gozd, čebele	N46,22,936 W15,47,554	1,61 južno
Skladišče gum	N46,23,315 W15,46,803	1,63 jugo-zahodno
Hajdina	N46,25,088 W15,48,934	2,77 severo-vzhodno
Rdeče blato	N46,23,725 W15,45,576	2,97 zahodno
Kungota	N46,25,656 W15,46,834	3,47 severno
Polskava	N46,24,103 W15,38,470	12,09 zahodno
Ljubljana	N46,02,559 W14,29,294	108 jugo-zahodno
Razori	N46,05,137 W14,42,417	112 jugo-zahodno
Bukovško polje	N46,21,291 W14,23,152	118 zahodno
Smoleva	N46,13,405 W14,09,830	127 zahodno
Ojstri vrh	N46,20,212 W14,17,134	130 zahodno

3.3.1.4 Lončni poskus – gojenje kopriv na substratu, onesnaženem z NH_4F

Izbira in onesnaženje substrata

Kot rastni medij smo uporabili komercialno dostopen substrat za setev in pikiranje (Cvetal, Agroruše d. o. o.) sestavljen iz presejanih specialnih šot z dodanim koloidnim kompleksom za uravnavanje vlažnosti in zračnosti substrata. Lastnosti substrata so podane v tabeli 8.

Tabela 8: *Lastnosti komercialno dostopnega substrata za setev in pikiranje* (Cvetal, Agroruše d. o. o.).

Lastnost	
pH v H_2O[a]	6,3
w(vlažnost) (%)[a]	58,5
Gostota (g l^{-1})[a]	364
w(organski material v suhem substratu) (%)[a]	51,0
γ(glinenih materialov) (kg m^{-3})[a]	15
Prevodnost (μS cm^{-1})[a]	275
w(vlažnost) (%)[b]	52,9 ± 0,3
w(F) (mg kg^{-1} suhega substrata)[b]	197 ± 14
w(F^-) (mg kg^{-1} suhega substrata)[b]	3,9 ± 0,2
w(Al) (g kg^{-1} suhega substrata)[b]	21,0 ± 0,9

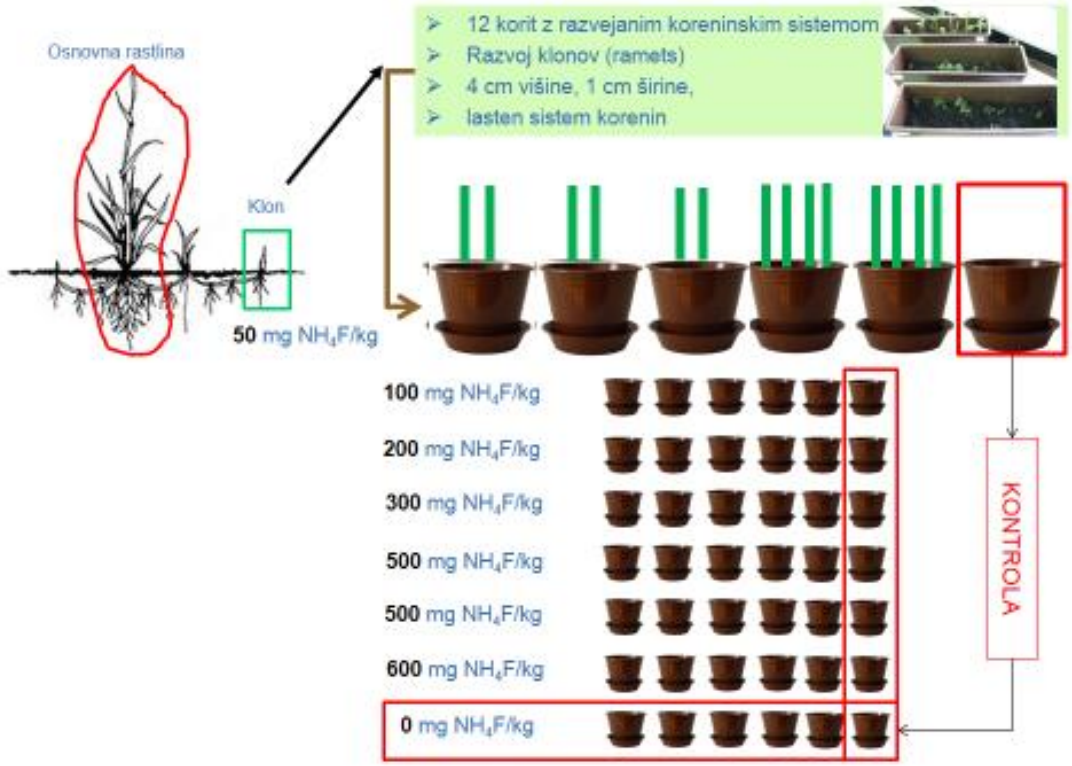
[a] Po navedbi proizvajalca.
[b] Določeno v našem laboratoriju.

Substrat (*m* = 6 kg) smo kontaminirali z raztopinami z različnimi koncentracijami NH_4F tako, da so bile končne vsebnosti NH_4F v substratu 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 in 600 mg kg^{-1}. Substrat brez dodanega NH_4F je služil kot kontrola optimalne rasti. Substrat z enako vsebnostjo NH_4F smo enakomerno porazdelili v 6 lončkov (*d* = 17 cm, *V* = 2,6 l).

Pridobitev in zasaditev rastlin

Koprive smo pridobili iz naravnega okolja, ki je bogato s hranili in neobremenjeno z antropogenimi viri fluorida (Razori, Slovenija). Koprive smo razmnožili z razvejanjem korenik, ki smo jih posadili v 12 plastičnih korit (*V* = 10 l) z neonesnaženim substratom in pustili rasti, dokler niso iz korenik pognale nove rastline, kloni (klon/ramet– genetsko identični posamezniki). Ko so te dosegle višino (4 ± 1) cm, smo koreninski sistem izkopali in ga razrezali na (1 ± 0,3) cm dolge segmente. Vsak tak segment je vseboval novo razvito rastlino z lastnim koreninskim sistemom.

Klone koprive smo sprali z destilirano vodo in zasadili. Da bi preprečili vpliv gostote zasaditve na izrast, smo uporabili dve gostoti zasaditve; tri lončke z dvema klonoma in dva lončka s štirimi kloni. Lonček, ki ni vseboval klonov, je služil kot kontrolni substrat. S kontrolnim substratom smo želeli preveriti, ali na morebitne izgube fluora v substratu vplivajo poleg privzemanja fluora v rastlino tudi drugi dejavniki. Shema poskusa (priprava lončkov z onesnaženim substratom in načrt zasaditve kopriv) je prikazana na sliki 14.



Slika 14: *Shema poskusa*: priprava lončkov z onesnaženim substratom in zasaditev rastlin.

Lončke smo postavili na laboratorijski pult poleg okna in koprive pustili rasti 75 dni (med februarjem in majem 2011). Rast je potekala v kontroliranih pogojih pri temperaturi (21 ± 1) °C in relativni vlažnosti zraka (40 ± 10) %. Rastline smo dvakrat tedensko zalili z 250 ml destilirane vode in preostanek vode v podstavku vrnili v lončke. Lončke smo ob vsakem zalivanju naključno prerazporedili po pultu.

Odvzem vzorcev

Iz vsakega lončka smo pred in po zaključku poskusa odvzeli vzorec substrata ($m \approx 100$ g). Rastlinam smo po koncu poskusa izmerili višino in prešteli liste, izkopali iz substrata, jih previdno sprali z destilirano vodo, osušili in ločili na posamezne dele; listi, stebla in korenine.

3.3.2 Priprava vzorcev

Čaje, pakirane v filter vrečkah, smo odprli, stresli skupaj in dobro premešali. V primeru čaja, stisnjenega v opeko, smo del opeke grobo zdrobili, zmešali in zmleli v ahatnem mlinu.

Vzorce rastlin, zemlje in substrata smo na analizo pripravili s sušenjem pri (60 ± 1) °C do konstantne mase. Vse vzorce smo zmeli v ahatnem mlinu, zemljo in substrat pa smo dodatno presejali še skozi sito.

3.3.2.1 Določanje biomase in vlage substrata

Posamezne dele rastlin, iz vsakega lončka posebej, smo po sušenju stehtali. Za določanje vlage substrata smo odtehtali 100 g vzorca in ga pri (60 ± 1) °C sušili do konstantne mase.

3.3.2.2 Določanje pH

Zemlja in substrat

pH zemlje smo določili v suspenziji, pripravljeni z mešanjem 30 g zemlje in 30 g vode (GTM-24, 2007).

3.3.2.3 Določanje fluorida

Pravi čaj

V filter vrečko (Tee-Filter Grösse 3, drogerija DM) smo odtehtali 1 g čaja.

Poskus z vrelo ($T \approx 100$ °C) destilirano vodo: Pri neprekinjenem postopku namakanja smo čaj prelili s 100 ml vode in namakali 5 minut. Filter vrečko s čajem smo nato odstranili in infuzijo ohladili na sobno temperaturo. Izvedli smo še poskus z 10, 30 oziroma 60 minutnim namakanjem. Pri ponavljajočem (zaporednem) namakanju smo filter vrečko s čajem prelili s 100 ml vode. Filtrat I smo pridobili tako, da smo vrečko s čajem po dveh sekundah odstranili. Isto vrečko smo prestavili v čisto čašo, jo ponovno prelili s 100 ml vode in pustili namakati 5 min (filtrat II). Postopek smo ponovili še 2-krat in pridobili filtrata III in IV.

Poskus z vodo s sobno ($T \approx 22$ °C) temperaturo: Filter vrečke s čajem smo prelili z vodo in pustili namakati 1, 3, 6, 24 oziroma 48 ur.

Zeliščni čaj

V filter vrečko (Tee-Filter Grösse 3, drogerija DM) smo odtehtali 2 g čaja, prelili s 100 ml vrele ($T \approx 100$ °C) destilirane vode in namakali 5 minut. Filter vrečko s čajem smo nato odstranili in infuzijo ohladili na sobno temperaturo.

Zemlja in substrat

Suspenzijo po določanju pH smo prefiltrirali skozi filter papir (črni trak, 5891) (Watman / Schleicher & Schull) in filtrat uporabili za določanje vsebnosti fluorida v zemlji.

3.3.2.4 Določanje fluora

Čaj, zeliščni čaj, rastlinski vzorci in substrat

V lonček iz platine smo v odvisnosti od pričakovane vsebnosti fluora odtehtali 1–2 g vzorca (čaj, zelišča, koruza ali substrat) in dodali (0,5 ± 0,1) ml NaOH ($w = 50$ %). Vzorec smo posušili do suhega na peščeni kopeli. Preostanku smo dodali trden $KNaCO_3$ in talili z uporabo modificiranega Bunsenovega gorilnika do nastanka taline brez trdnih ostankov. Ohlajeno talino smo kvantitativno prenesli v 100 ml bučko. Pred določanjem fluorida, smo vzorec raztopili in nakisali na pH 2–3 z dodatkom konc. H_2SO_4 ter dopolnili z destilirano vodo do oznake. Shema postopka je predstavljena na sliki 15.



Sušenje vzorcev na peščeni kopeli | Priprava taline s $KNaCO_3$ | Vzorci pred nevtralizacijo

Slika 15: *Postopek priprave vzorcev na analizo*.

Zemlja

V ladjico iz platine smo odtehtali 100 mg zemlje, dodali 50 mg WO_3 in dobro premešali (Ponikvar & Liebman, 2006). Ladjico smo postavili v reakcijsko cev iz platine in segrevali (t = 30 min) v toku pregrete vodne pare ($T \approx 1100$ °C, Φ_V = 0,5–1,0 ml min^{-1}). Destilat smo absorbirali v 20 ml NaOH (C = 0,1 mol l^{-1}) v 100 ml polietilenski bučki. Po končanem razklopu smo bučko dopolnili do oznake z destilirano vodo.

3.3.3 Določanje morfologije kopriv

Ob zaključku rasti (t = 75 dni) smo pred izkopom rastlin is substrata, določili faktor izrasti (ang. Outgrowth factor, OF), faktor cvetenja (ang. Flowering factor, FF), velikost rastlin, število listov in pojav razbarvanja/nekroz listov. Faktor izrasti je definiran kot razmerje med številom klonov, razvitih do rastline, in številom vseh posajenih klonov.

$$\mathrm{OF} = \frac{n_{\text{kloni razviti do rastlin}}}{n_{\text{posajeni kloni}}} \tag{6}$$

Faktor cvetenja je definiran kot razmerje med številom cvetočih rastlin in številom klonov, razvitih do rastlin.

$$\mathrm{FF} = \frac{n_{\text{število cveto čvetrastlin}}}{n_{\text{kloni razviti do rastlin}}} \tag{7}$$

Za določitev biomase smo vsako rastlino pred in po sušenju stehtali, stehtali pa smo tudi posamezne dele rastlin.

3.3.4 Določanje fitoremediacijskih sposobnosti

Fitoremediacijske sposobnosti smo določili z izračunom translokacijskega faktorja (enačba 1) in bioakumulacijskega faktorja (enačba 2).

3.3.5 Določanje fluorida s fluoridno ionsko selektivno elektrodo (F-ISE)

Za določanje vsebnosti fluorida smo uporabljali metodo večkratnega standardnega dodatka z odštevanjem slepe vrednosti (Ponikvar et al., 2007).

Najprej smo določili slepo vrednost sistema. V 50 ml bučko smo odpipetirali 2,0 ml kalibracijske raztopine NaF, dodali 25 ml CBS pufra in dopolnili z destilirano vodo do oznake. V tako pripravljeni raztopini smo določili vsebnost fluorida. Opravili smo vsaj šest ponovitev in določili povprečje. Povprečje je sistem med meritvami vzorcev samodejno odšteval.

Vzorce smo pripravili tako, da smo ustrezen alikvot vzorca prenesli v 50 ml bučko, dodali 2,0 ml kalibracijske raztopine NaF, 25 ml CBS pufra in dopolnili z destilirano vodo do oznake in prenesli v čašo.

Za zmanjšanje spominskega učinka smo elektrodo pred vsako meritvijo namakali 5 minut v destilirani vodi. Nato smo jo sprali z destilirano vodo in osušili. Pred začetkom meritve smo jo, da je dosegla stabilen potencial, namakali še 5 minut v vzorcu.

Celoten postopek določitve fluora oziroma fluorida, vključno s pripravo vzorca, smo za vsak vzorec ponovili najmanj dvakrat, najmanj dvakrat pa smo ponovili tudi postopek merjenja.

3.3.6 Statistična analiza

Povprečja meritev smo primerjali s *t*-testi (primerjava povprečij dveh skupin meritev z različnim standardnim odmikom, primerjava povprečja vzorcev z znano vrednostjo, primerjava povprečij dveh vzorcev) in z enosmerno analizo variance v povezavi s Fisherjevim LSD testom. Intervale zaupanja smo računali pri stopnji tveganja 0,05.

4 Rezultati in razprava

4.1 Zagotavljanje sistema kakovosti meritev

Rastline navadno vsebujejo manj kot 10 mg kg^{-1} fluora (Davison & Weinstein, 2006). Povprečne vsebnosti fluora v zemlji so 100–600 mg kg^{-1} (Davison & Weinstein, 2006), od tega je 0,05–0,5 % v obliki fluorida (Álvarez-Ayuso et al., 2011; Koblar et al., 2011).

F-ISE je selektivna, ima široko linearno območje delovanja ter omogoča doseganje nizkih mej zaznavnosti (ang. Limit of detection, LOD) in določljivosti (ang. Limit of quantification, LOQ). Ob tem zagotavlja tudi pravilne in natančne rezultate meritev. Za določanje vsebnosti fluorida v naših vzorcih smo uporabljali F-ISE z metodo večkratnega standardnega dodatka z odštevanjem slepe vrednosti, ki omogoča doseganje nižje LOD (Ponikvar et al., 2007), kot je LOD elektrode, kot jo navaja proizvajalec (≈ 0,02 mg l^{-1}) (Orion, 1999). Pri tej metodi v raztopino vzorca dodajamo kalibracijsko raztopino, z dodatkom katere dosežemo, da elektroda deluje v linearnem območju. Pred začetkom meritev dnevno določimo slepo vrednost, ki predstavlja signal ozadja in vključuje vse reagente, ki jih pred meritvijo dodamo k vzorcu (kalibracijska raztopina, CBS pufer in voda) in jo nato, kot povprečje vsaj šest meritev, med meritvijo odštevamo.

Z namenom določitve LOD in LOQ smo naredili dvanajst zaporednih meritev slepih vrednosti in izračunali standardni odmik (S. D.) razlik med povprečno vrednostjo in vrednostjo vsake meritve. Izračunana LOD in LOQ metode sta bila 0,007 mg l^{-1} oziroma 0,024 mg l^{-1} in omogočata določanje vsebnosti fluora v vzorcih, ki vsebujejo vsaj 0,36 oziroma 1,2 mg kg^{-1} ($m_{\text{vzorca}} \approx 5$ g, $V_{\text{alikvot vzorca}} \approx 20$ ml).

Reagenti, ki jih uporabljamo med postopkom priprave vzorca na analizo, bi lahko znatno prispevali k slepi vrednosti. Zato smo opravili poskus, pri katerem smo poleg kalibracijske raztopine dodali k merjeni raztopini še reagente, ki se uporabljajo za pripravo vzorcev: (1) reagente, potrebne za razklop (razklop s $KNaCO_3$ alkalno talino ali razklop s pirohidrolizo) in raztapljanje oziroma uravnavanje pH vzorcev, ali (2) infuzijo, pripravljeno s prazno filter vrečko za čaj. Med rezultati meritev slepe vrednosti brez oziroma z reagenti uporabljenimi za pripravo vzorcev ni bilo statistično pomembnih razlik. V nadaljevanju smo vse analize izvajali brez dodajanja reagentov, uporabljenih med postopkom priprave vzorca, k raztopini za določanje slepe vrednosti.

Celotne postopke za določanje fluora v rastlinah in zemlji smo preverili z uporabo referenčnih materialov. Rezultati določitev so zbrani v tabeli 9.

Tabela 9: *Rezultati določitev fluora v referenčnih materialih*.

Vzorec	*n*	$w(F)_{certificiran}$ (mg kg^{-1})[a]	$w(F)_{določen}$ (mg kg^{-1})[b]
SRM 2695, visoka vsebnost	4	277 ± 27	285 ± 13
SRM 2695, nizka vsebnost	3	64,0 ± 8,4	67 ± 3
BCR CRM 461	2	568 ± 10	565 ± 5
Hišni RM	5	844 ± 33[c]	825 ± 7

[a] Merilne negotovosti so podane za 95 % interval zaupanja.
[b] Povprečje več meritev ± standardni odmik (S. D.).
[c] Določeno po razklopu s pirohidrolizo (Ponikvar & Liebman, 2006).

Določene vrednosti so se dobro ujemale s certificiranimi vrednostmi in potrjujejo, da so predlagane metode razklopa in meritev primerne za pravilno in natančno določanje fluora v rastlinskih vzorcih oziroma v vzorcih zemlje.

Ponovljivost metode za določanje fluora v pravih čajih in fluorida v poparkih pravih čajev smo preverili tako, da smo opravili šest analiz vzorcev črnega čaja (Sir Winston), indijskega črnega čaja (1001 Cvet), črnega čaja Yunnan (CHA), mladega oolong čaja, zelenega čaja (SPAR) in pu'erh čaja (CHA). Ponovljivost, izražena z relativnim standardnim odmikom (RSD), je bila nižja ali enaka ± 6 %.

Ponovljivost metode za določanje fluora v zeliščih oziroma zeliščnih poparkih smo določili z več določitvami vseh preiskovanih komercialnih zeliščnih čajev. Zaradi širokega območja vsebnosti fluora v zeliščih (3,7–28,9 mg kg^{-1}), nizkih vsebnosti fluorida v poparkih (2,0–5,2 mg kg^{-1}) in majhnih odteht je bilo široko tudi območje ponovljivosti 1–28 % v zeliščih oziroma 15–35 % v poparkih.

Ponovljivost določitev vsebnosti fluora v substratu in koprivi oziroma fluorida v substratu smo določili z več ponovitvami analiz enega vzorca substrata in enega vzorca listov in stebel pri vsaki stopnji onesnaženja substrata z NH_4F. Ponovljivost določitev je bila nižja ali enaka ± 8 %.

4.2 Pravi čaji

Čajevec lahko iz zemlje privzema fluor, ki se kopiči v listih, ter se med pripravo čajnega poparka zlahka sprosti. V večini raziskav poročajo le o določanju vsebnosti fluora v čaju, ne pa tudi v čajnih poparkih. Raziskave, kjer so določili oba, so redke in se osredotočajo predvsem na čaj v razsulu in čaj, stisnjen v opeko (Fung et al., 1999). Bolje bi morala biti raziskana tudi vsebnost fluorida v čajnih poparkih, saj je fluor v obliki fluorida človeškemu organizmu zlahka dostopen. Z namenom ugotovitve, kakšna je kvaliteta pravih čajev, ki jih najpogosteje uživamo v Sloveniji, smo določili vsebnosti fluora v čaju oziroma fluorida v čajnih poparkih in raziskali, kakšna je učinkovitost sproščanja fluora. Pri tem smo čaje razlikovali glede na stopnjo fermentacije in glede na obliko, v kateri se čaji prodajajo.

4.2.1 Vsebnost fluora v čajnih listih in vsebnost fluorida v čajnih poparkih

V izbranih vzorcih smo določili vsebnost fluora v čajih in vsebnost fluorida v čajnih poparkih. Za pripravo poparkov smo izbrali dva pogostejša načina priprave. Pri neprekinjenem namakanju, ki je tudi najpogostejši način priprave čajev in je običajno naveden na ovojnini, smo čaj prelili z vrelo vodo in pustili namakati (t = 5 min). Pri ponavljajočem (zaporednem) namakanju smo uporabili način, ki ga uporabljajo predvsem prebivalci s področij tradicionalnega pitja čaja. Čajne liste smo oprali tako, da smo filter vrečko s čajem prelili z vrelo vodo in jo takoj nato (t = 2 s) odstranili. Isto vrečko smo prestavili v novo posodo, prelili z vodo in namakali (t = 5 min); postopek smo večkrat ponovili. Določene vsebnosti fluora v čaju in vsebnosti fluorida v poparkih, pripravljenih z enkratnim oziroma ponavljajočim namakanjem, so zbrane v Tabeli 10.

Tabela 10: *Vsebnost fluora v čajnih listih različnih vrst čaja in vsebnost fluorida v čajnih poparkih, pripravljenih z enkratnim oziroma ponavljajočim namakanjem.*

		$w(F^-)$ (mg l^{-1})[a]					
		Enkratno namakanje	Ponavljajoče namakanje				
			t = 2 s	t = 5 min			
Tržno ime, blagovna znamka	**w(F) (mg kg^{-1})**	**t = 5 min**	**Poparek I**	**Poparek II**	**Poparek III**	**Poparek IV**	**Skupaj**
Črni čaji							
Black tea, Sir Winston	250 ± 2	2,25 ± 0,07	0,30 ± 0,01	1,71 ± 0,05	0,34 ± 0,03	0,13 ± 0,01	2,48 ± 0,05
Earl Grey, Milford	435 ± 6	3,55 ± 0,10	1,13 ± 0,13	2,64 ± 0,04	0,47 ± 0,09	0,16 ± 0,04	4,34 ± 0,13
Classic English breakfast tea, Twinings	388 ± 9	3,06 ± 0,10	0,59 ± 0,02	2,48 ± 0,05	0,57 ± 0,01	0,18 ± 0,01	3,82 ± 0,02
Earl Grey, 1001 cvet	337 ±2	2,69 ± 0,08	0,99 ± 0,07	1,59 ± 0,03	0.,31 ± 0,06	0,12 ± 0,02	3,01 ± 0,07
Indijski črni čaj, 1001 cvet	302 ± 9	2,59 ± 0,06	0,73 ± 0,02	1,67 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,15 ± 0,01	2,95 ± 0,02
Earl Grey, Mr Perkins	293 ± 8	2,49 ± 0,12	0,70 ± 0,03	2,05 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,06 ± 0,03	3,02 ± 0,04
Črni čaj, Darjeeling	185 ± 2	1,39 ± 0,11	0,18 ± 0,03	1,08 ± 0,03	0,29 ± 0,04	0,06 ± 0,02	1,62 ± 0,04
Turški črni čaj	190 ± 3	1,47 ± 0,01	0,40 ± 0,02	1,08 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,11 ± 0,01	1,88 ± 0,02
Keemun, CHA	117 ± 5	0,82 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,61 ± 0,04	0,19 ± 0,02	0,07 ± 0,03	0,97 ± 0,05
English breakfast, CHA	126 ± 5	0,84 ± 0,04	0,05 ± 0,02	0,83 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,08 ± 0,03	1,17 ± 0,03
Assam TGFOP1, CHA	109 ± 6	0,87 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,73 ± 0,05	0,17 ± 0,03	0,06 ± 0,02	1,07 ± 0,07
Yunnan, CHA	68 ± 4	0,56 ± 0,03	0,09 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,67 ± 0,02
Oolong čaji							
Formosa, CHA	197 ± 3	1,34 ± 0,11	0,21 ± 0,06	1,01 ± 0,12	0,38 ± 0,06	0,17 ± 0,02	1,77 ± 0,06
Mladi oolong čaj	123 ± 4	0,74 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,67 ± 0,07	0,26 ± 0,05	0,08 ± 0,03	1,16 ± 0,04
Zeleni čaji							
Zeleni čaj, SPAR	293 ± 9	1,60 ± 0,10	0,12 ± 0,01	1,43 ± 0,03	0,41 ± 0,09	0,21 ± 0,03	2,17 ± 0,01
Zeleni čaj, Sir Winston	269 ± 1	1,79 ± 0,06	0,38 ± 0,03	1,55 ± 0,03	0,35 ± 0,01	0,15 ± 0,02	2,43 ± 0,03
Earl Grey Green, Twinings	238 ± 9	1,63 ± 0,07	0,30 ± 0,02	1,39 ± 0,04	0,37 ± 0,03	0,19 ± 0,02	2,26 ± 0,03
Zeleni čaj, 1001 Cvet	238 ± 9	1,40 ± 0,02	0,28 ± 0,02	1,14 ± 0,02	0,53 ± 0,02	0,15 ± 0,02	2,10 ± 0,02
Mao Feng, CHA	126 ± 7	0,92 ± 0,03	0,15 ± 0,06	0.67 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,10 ± 0,01	1,13 ± 0,06
Zeleni čaj, Hotel Park	91 ±1	0,61 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,67 ± 0,03	0,20 ± 0,03	0,07 ± 0,02	1,00 ± 0,01
Mladi zeleni čaj	53 ± 3	0,44 ± 0,02	0,11 ± 0,04	0,26 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,55 ± 0,04
Pu'erh čaji							
Pu'erh, Teekane	215 ± 9	0,55 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,55 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,14 ± 0,02	1,04 ± 0,03
Pu'erh, CHA	83 ± 6	0,33 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,50 ± 0,02
Pu'erh oolong čaj v opeki, CHA	235 ± 8	0,50 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,90 ± 0,01

[a] Rezultati predstavljajo povprečje več določitev ± S. D.

Rezultati analiz so pokazali velike razlike v vsebnostih fluora v čajnih listih (53–435 mg kg^{-1}) in vsebnostih fluorida v čajnih poparkih, pripravljenih z enkratnim namakanjem (0,33–3,55 mg l^{-1}). Razlike med povprečnimi vsebnostmi fluora v črnih, zelenih, oolong in pu'erh čajih niso bile statistično pomembne. Prav tako ni bilo statistično pomembnih razlik med povprečnimi vsebnostmi fluorida v čajnih poparkih črnih, zelenih in oolong čajih, med tem ko so bile povprečne vsebnosti fluorida v čajnih poparkih pu'erh čajev statistično pomembno nižje.

Po pričakovanjih je imela oblika pakiranja čaja večji vpliv na vsebnosti fluora in fluorida, kot stopnja fermentacije. Vsebnost fluora v čaju iz čajnih vrečk (185–435 mg kg^{-1}) je bila v povprečju približno 2,5-krat višja od vsebnosti v čajih, kupljenih v razsulu (53–197 mg kg^{-1}). Podobno velja za vsebnosti fluorida v čajnih poparkih. Najmanj fluorida so vsebovali poparki čajev, ki jih kupimo v razsulu (0,33–1,47 mg l^{-1}). Vsebnost fluorida v poparkih čajev, pripravljenih iz filter vrečk, je bila statistično pomembno višja (0,55–3,55 mg l^{-1}). Na osnovi teh rezultatov je mogoče sklepati, da vsebujejo čajne vrečke bistveno manj kvaliteten izhodni material. Čajne vrečke namreč zamaskirajo vsebino, zato jih proizvajalci večinoma napolnijo z zmletimi starejšimi listi čajevca, ki zaradi daljše rasti vsebujejo več fluora.

Zaradi pomanjkanja raziskav, kjer bi v isti raziskavi primerjali vsebnosti fluorida v čajnih poparkih z vsebnostmi fluora v čajnih listih in zaradi različnih načinov priprave čajnih poparkov, je rezultate različnih raziskav težko primerjati. Ne glede na to, pa so določene vsebnosti fluora v čajnih listih in fluorida v čajnih poparkih v naši raziskavi primerljive z ugotovitvami drugih avtorjev (Cao et al., 2004; Emekli-Alturfan et al., 2009; Fung et al., 1999; Lu et al., 2004; Malinowska et al., 2008; Shu et al., 2003; Xie, Chen, Sun, Guo, & Yin, 2007; Xie, Chen, Sun, Guo, YYin, et al., 2007), v katerih so se avtorji osredotočili le na določeno vrsto čajev, ali pa so določali vsebnost fluora v čajnih listih ali vsebnost fluorida v čajnih poparkih.

4.2.2 Učinkovitost sproščanja fluora v čajne poparke

Učinkovitost sproščanja fluora ($w(F^{-}/F)$) je definirana kot razmerje med vsebnostjo fluorida v čajnem poparku in vsebnostjo fluora v čaju, uporabljenem za pripravo. Izkazalo se je, da se v prvih petih minutah iz črnih čajev v povprečju sprosti 67–90 % , iz oolong čajev 60–68 % in iz zelenih čajev 55–84 % fluora. Pri tem ni bilo statistično pomembnih razlik v učinkovitosti sproščanja med črnimi, oolong in zelenimi čaji. Statistično pomembno nižjo učinkovitost sproščanja v primerjavi z ostalimi čaji smo opazili le v primeru pu'erh čajev. V prvih petih minutah se je iz pu'erh čajev v povprečju sprostilo samo 21–38 % fluora, za kar je verjetno razlog drugačen proizvodnji postopek pu'erh čajev.

Primerjava naših rezultatov učinkovitosti sproščanja iz različnih vrst čajev in rezultatov, ki jih je objavil Fung s sodelavci (1999), je pokazala primerljivo učinkovitost sproščanja fluora v čajne poparke iz pu'erh čajev, učinkovitosti sproščanja iz črnih, zelenih in oolong čajev, določene v naši raziskavi, pa so znatno višje. Nižje vsebnosti fluorida v čajnih poparkih v raziskavi, ki jo je opravil Fung s sodelavci (1999), je mogoče pripisati visokim vsebnostim aluminija v čajnih poparkih. Vsebnosti aluminija v čajnih listih so namreč visoke, med 600 in 1200 mg kg^{-1}(Müller, Anke, & Illing-Günther, 1998; Ščančar, Stibilj, & Milačič, 2004), v čajnih poparkih pa med 0,5 in 5 mg l^{-1} (Müller et al., 1998). Povišane vsebnosti aluminija lahko ob uporabi TISAB pufra z nizkimi vsebnostmi soli za vezavo ionov aluminija motijo določitev fluorida z ionskoselektivno elektrodo. Rezultati določitev vsebnosti fluorida v čajnih poparkih so zato lahko prenizki (Chaudhri, Nadeem, Chaudhri, & Jabbar, 2007; Ponikvar, Pihlar, & Žemva, 2002).

V primeru razlikovanja čajev glede na obliko pakiranja smo ugotovili, da ni statistično

pomembnih razlik v učinkovitosti sproščanja. Iz čaja v čajnih vrečkah se v petih minutah sprosti 55–86 % fluora, iz čajev v razsulu pa 60–83 %.

4.2.3 Vpliv temperature vode in časa namakanja na učinkovitost sproščanja fluora

Vpliv temperature in časa namakanja čaja za pripravo čajnega poparka smo preverili na primeru zelenega čaja (SPAR) kot modelnega čaja. Rezultati analiz so podani v tabeli 11.

Tabela 11: *Vpliv temperature vode in časa namakanja na učinkovitost sproščanja fluora iz zelenega čaja (SPAR)*.

T (°C)	*t* (min)	*w*(F^-/F) (%)[a]
100	5	55 ± 2
	10	61 ± 3
	30	65 ± 1
	60	69 ± 2
22	60	45 ± 4
	180	57 ± 2
	360	61 ± 3
	1440	68 ± 1
	2880	73 ± 2

[a] Rezultati predstavljajo povprečje več določitev ± S. D.

Rezultati določitev so pokazali, da čas namakanja vpliva na učinkovitost sproščanja fluora; po eni uri se sprosti več kot dve tretjini fluora. Hitrost sproščanja fluora je manjša, če čajne liste namakamo pri nižji temperaturi (sobna temperatura). V eni uri se sprosti nekaj manj kot polovica fluora, v 24 urah pa se sprosti več kot dve tretjini fluora, kar je primerljivo z učinkovitostjo sproščanja po 1 uri v primeru prelitja z vrelo vodo.

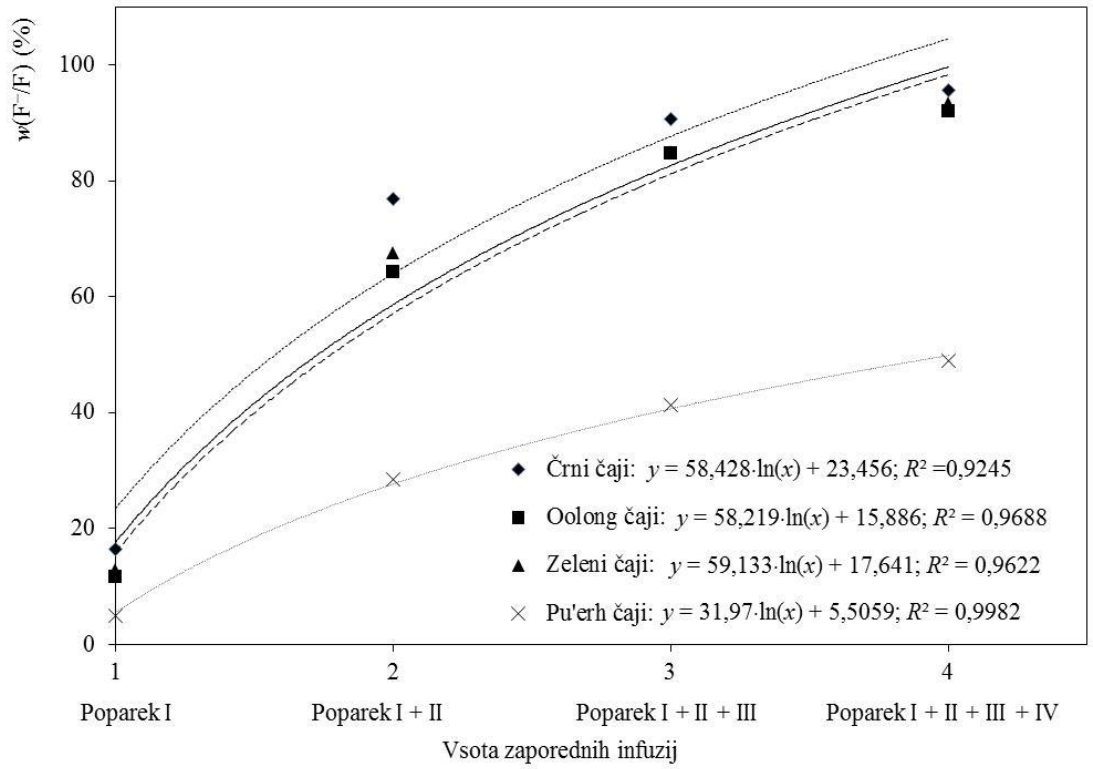
4.2.4 Učinkovitost sproščanja fluorida pri pripravi zaporednih poparkov

Rezultati določitev fluorida v čajnih poparkih, pripravljenih z zaporednim namakanjem, so prav tako zbrani v tabeli 10.

V primeru razlikovanja čajev glede na stopnjo fermentacije smo že v poparku I, ko smo čajne vrečke prelili z vrelo vodo in jih takoj odstranili (t = 2 s), določili presenetljivo visoke koncentracije fluorida. Iz črnih čajev se sprosti 4–29 %, iz oolong čajev 11–12 %, iz zelenih čajev 4–21 % in iz pu'erh čajev 4–8 % fluora.

Najvišje koncentracije fluorida so vsebovali drugi poparki (Poparek II), koncentracije v naslednjih poparkih (Poparek III in Poparek IV) pa so hitro padle. Vsote učinkovitosti sproščanja v posameznih vrstah čaja so pokazale, da je v vseh štirih poparkih skupaj prisotna velika večina fluora; iz črnih čajev se sprosti 83–103 %, iz oolong čajev 90–94 % ter iz zelenih 74–110 % fluora. Iz pu'erh čajev se sprosti manj fluora in sicer 39–60 %.

Učinkovitost sproščanja fluora pri pripravi zaporednih poparkov glede na stopnjo fermentacije čaja je grafično predstavljena na sliki 16.

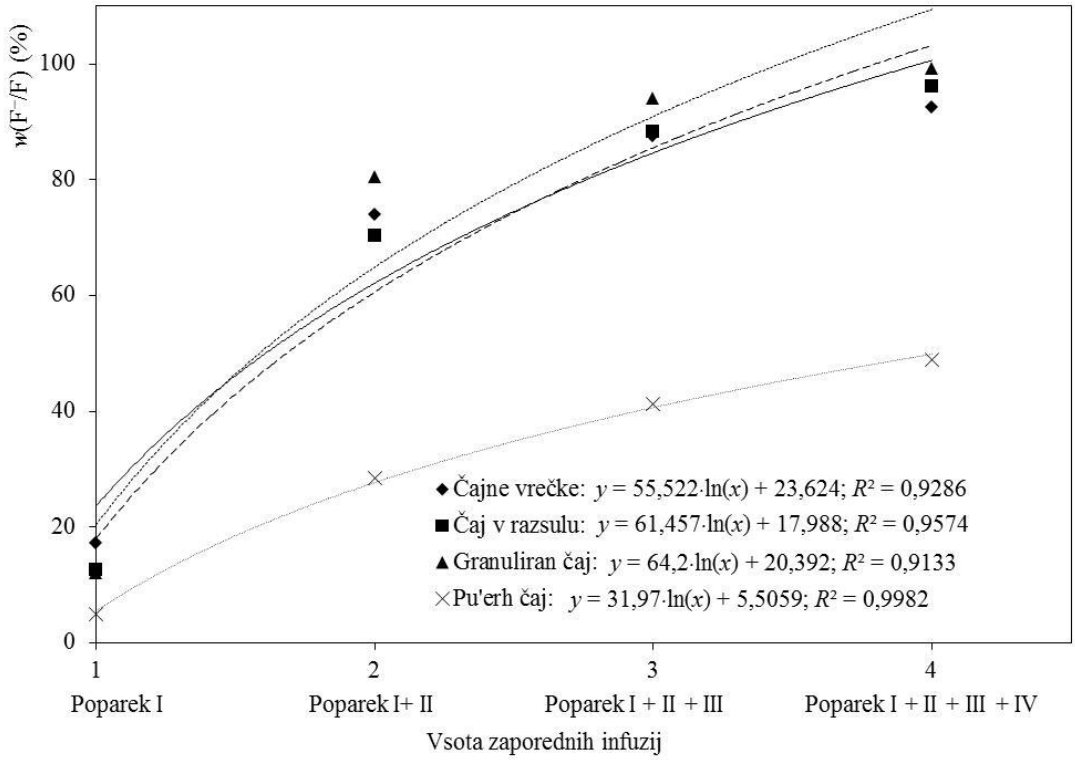


Slika 16: *Učinkovitost sproščanja fluora pri pripravi zaporednih poparkov različnih vrst čaja glede na stopnjo fermentacije*.

Učinkovitost sproščanja fluora pri pripravi zaporednih poparkov, je glede na stopnjo fermentacije čaja mogoče opisati z logaritemskimi enačbami. Pri tem predstavlja *x*-os vsoto zaporednih poparkov in *y*-os povprečne vsote učinkovitosti sproščanja fluora v zaporedne poparke. Vrednosti kvadrata regresijskega koeficienta (R^2) so med 0,9245 in 0,9982, primerljiva učinkovitost sproščanja fluora iz črnih, oolong in zelenih čajev pa je razvidna tudi iz podobnih naklonov krivulj in primerljivih sečiščih *y* osi.

Primerjava učinkovitosti sproščanja fluora v posamezne poparke z rezultati Funga in sodelavcev (1999) je pokazala, da so učinkovitosti sproščanja fluora iz črnih, oolong in zelenih čajev, kot smo jih določili v naši raziskavi, znatno višje, četudi smo pripravili manj poparkov (štiri in ne pet). Učinkovitost sproščanja iz pu'erh čajev je primerljiva. Vzrok je tudi v tem primeru najverjetneje uporaba TISAB pufra s premajhno kapaciteto za vezavo ionov aluminija.

Učinkovitost sproščanja po posameznih poparkih smo preverili tudi glede na obliko pakiranja čaja. Pri tem smo se osredotočili na čaje, pakirane v čajne vrečke, na čaje, kupljene v razsulu in granuliran čaj. Pu'erh čaje smo zaradi ugotovljenih drugačnih lastnosti sproščanja fluora ne glede na obliko pakiranja obravnavali posebej. Tudi oolong čaje smo, zaradi majhne dostopnosti, saj so v večini trgovin bolj izjema kot pravilo, izločili. Učinkovitost sproščanja fluora pri pripravi zaporednih poparkov glede na obliko pakiranja čaja, je grafično predstavljena na sliki 17.



Slika 17: *Učinkovitost sproščanja fluora pri pripravi zaporednih poparkov različnih vrst čaja glede na obliko pakiranja.*

Tudi učinkovitost sproščanja fluora pri pripravi zaporednih poparkov je, pri razlikovanju glede na obliko pakiranja čaja, mogoče opisati z logaritemskimi enačbami, kjer *x*-os predstavlja vsoto zaporednih poparkov in *y*-os povprečne vsote učinkovitosti sproščanja fluora v zaporedne poparke. R^2 vrednosti so med 0,9133–0,9982. Nakloni krivulj in sečišča *y*-osi, kot smo jih izračunali za čaje v filter vrečkah, v razsulu in granuliran čaj, so podobni kar kaže na podobne učinkovitosti sproščanja. Ponovno je bila nižja učinkovitost zabeležena v primeru pu'erh čaja.

Rezultati naših analiz so v nasprotju z ugotovitvami Malinowska et al. (2008), kjer so samo na osnovi določitev fluorida v čajnih poparkih (vsebnost fluora v čajnih listih ni bila določena) sklepali, da je učinkovitost sproščanja fluora iz čajev v razsulu bistveno nižja od učinkovitosti sproščanja fluora iz čajev v filter vrečkah. Koncentracija fluorida v čajnih poparkih je namreč odvisna od vsebnosti fluora v izhodnem materialu, ki je, zaradi vsebnosti manj kvalitetnejših čajnih listov najvišja v primeru čaje,v kupljenih v filter vrečkah. Izhodni material za pripravo čajev v filter vrečkah in granuliran čaj naj bi bil enak (Cao et al., 2006), zato lahko trditev, da je končna koncentracija fluorida v poparku odvisna od vsebnosti fluora v izhodnem materialu, posplošimo tudi na granulirane čaje. O učinkovitosti sproščanja fluora v čajne poparke iz posameznih vrst čaja glede na stopnjo fermentacije ali obliko pakiranja lahko tako govorimo le v primeru določitve obeh, tako fluora v čajnih listih kot fluorida v čajnih poparkih.

4.2.5 Prispevek pitja čajev k dnevnemu vnosu fluora v človeški organizem

Na osnovi pridobljenih podatkov o vsebnosti fluorida v čajnih poparkih in objavljenih ocenah o dnevnem vnosu fluora s hrano iz fluoriranih in iz nefluoriranih področij (Ponikvar et al., 2007; Ponikvar et al., 2008) smo ocenili dnevni vnos fluora v človeški organizem s hrano in čaji. Pri tem smo čaje razlikovali glede na obliko pakiranja ter

dodali pu'erh čaj kot posebno skupino. Zaradi velikih razlik v vsebnosti fluora v hrani iz različnih geografskih področij in vprašljive točnosti podatkov iz starejših raziskav, smo uporabili več načinov podajanja ocen. Najbolj zanesljivi so podatki v stolpcih 2500 kcal hrana in 2500 kcal hrana Slovenija, kjer so zbrani podatki novejših raziskav s področij, kjer pitje pravih čajev ni tradicionalno in tako nima večjega prispevka k dnevnemu vnosu fluora. Ocene za dnevni vnos fluora so zbrane v tabeli 12.

Tabela 12: *Ocenjen dnevni vnos fluora za odraslo osebo s pitjem čaja (5 skodelic), ter s pitjem čaja in s hrano*. Podana so območja povprečij.

	Vnos (F) (mg)			
	Čaj[a]	**Vsa literatura[b]**	**2500-kcal hrana[c]**	**2500-kcal hrana (Slovenija)[d]**
		Nefluorirano področje (čaj in hrana)		
Filter vrečke	1,39–3,55 (povprečje 2,20)	1,95–5,05 (povprečje 3,30)	1,97–5,11 (povprečje 3,28)	2,12–6,05 (povprečje 3,70)
Čaj v razsulu	0,44–1,47 (povprečje 0,86)	1,00–2,97 (povprečje 1,96)	1,05–3,03 (povprečje 1,93)	1,17–3,97 (povprečje 2,36)
Pu'erh čaj	0,31–0,55 (povprečje 0,45)	0,87–2,05 (povprečje 1,55)	0,89–2,11 (povprečje 1,53)	1,04–3,05 (povprečje 1,96)
Granuliran čaj	2,81	2,81–3,75 (povprečje 3,35)	0,89–3,81 (povprečje 3,33)	2,98–4,75 (povprečje 3,75)
		Fluorirano področje (čaj in hrana)[e,f]		
Filter vrečke	1,39–3,55 (povprečje 2,20)	2,29–7,35 (povprečje 4,30)		
Čaj v razsulu	0,44–1,47 (povprečje 0,86)	1,34–5,27 (povprečje 2,96)		
Pu'erh čaj	0,31–0,55 (povprečje 0,45)	1,21–4,35 (povprečje 2,55)		
Granuliran čaj	2,81	3,15–6,05 (povprečje 4,35)		

[a] V primeru zaužitja petih skodelic čaja (1000 ml).
[b] Vsa literatura: 0,56–1,50 mg (povprečje 1,10 mg).
[c] 2500 kcal hrana: 0,58–1,56 mg (povprečje 1,08 mg).
[d] 2500 kcal hrana (Slovenija): 0,73–2,50 mg (povprečje 1,50 mg).
[e] Vsa literatura: 0,9–3,8 mg (povprečje 2,10 mg).
[f] Fluorirana voda , $\gamma(F^-) = 0{,}5–1{,}3$ mg l^{-1}.

Ocena dnevnega vnosa fluora s čajem oziroma hrano je pokazala, da lahko pitje pravih čajev bistveno prispeva k dnevnemu vnosu fluora v človeški organizem. Prispevek je večji v primeru uživanja večjih količin čaja slabše kvalitete, kot je na primer čaj, pakiran v filter vrečke. Primeren dnevni vnos fluora iz vseh virov za vse osebe starejše od šest mesecev naj bi bil 0,05 mg kg telesne mase^{-1}. Posameznik z maso 70 kg, lahko z zaužitjem petih skodelic čaja na dan (1000 ml) doseže in celo preseže to priporočilo; v primeru čaja, kupljenega v filter vrečkah, doseže 40–101 %, v primeru čaja, kupljenega v razsulu, 13–42 %, v primeru granuliranega čaja 64 % in v primeru pitja pu'erh čaja 9–16 % primernega dnevnega vnosa fluora.

Ocenjen skupni dnevni vnos fluora s čajem in hrano za nefluorirana področja je 25–144 % primernega dnevnega vnosa, če upoštevamo vse literaturne podatke, 30–146 % primernega dnevnega vnosa, če upoštevamo hrano z 2500 kcal oziroma 30–173 % primernega dnevnega vnosa, če upoštevamo podatke iz raziskave, opravljene pri nas. Na področjih s fluorirano vodo je vnos fluora zaradi uporabe fluorirane vode, za pripravo hrane in kuhanje, višji. Ocenjeni dnevni vnos lahko doseže tudi do 210 % primernega dnevnega vnosa.

4.3 Učinek plinastih fluoridov na vsebnost fluora v zemlji, koruzi in zeliščih

Plinasti fluoridi, predvsem HF in SiF_4, so približno 1–3-krat bolj toksični, kot so nekatera druga onesnažila (na primer ozon, peroksiacetilnitrat, klor ali klorid). Že majhni izpusti plinastih fluoridov v ozračje lahko povzročijo poškodbe rastlin. Povod za našo raziskavo so bile poškodbe koruze, ki so jih jeseni 2005 opazili na poljih v okolici talilnice aluminija Talum d. d. v Kidričevem. Poškodbe so bile na videz enake nekrotičnim poškodbam, ki jih povzročajo plinasti fluoridi.

4.3.1 Vsebnost fluora v zemlji in koruzi iz okolice Talum d. d. in čistega okolja

Jeseni, leta 2005, so iz Kidričevega, kjer se nahaja talilnica aluminija Talum d. d., poročali o poškodbah koruze. Poškodbe so bile na videz podobne nekrotičnim spremembam rastlinskega tkiva, ki nastanejo zaradi ožiga s plinastimi fluoridi. Z namenom ugotovitve, ali bi bil vzrok za poškodbe lahko nekontroliran izpust plinastih fluoridov, smo v okolici Talum d. d. odvzeli vzorce koruznih listov, koruznih metlic in zemlje. Vzorce smo odvzeli na različnih razdaljah v smeri vetra in iz smeri vetra. Vpliv vetra smo ovrednotili s faktorji: 1 (v smeri vetra), 0,5 (iz smeri vetra) in 0 (veter nima vpliva). Enake vzorce smo odvzeli še v Slovenski Bistrici, v okolju, neobremenjenem z izpusti plinastih fluoridov. Rezultati analiz so zbrani v tabeli 13.

Tabela 13: *Vsebnosti fluora v koruznih metlicah in listih koruze ter zemlji iz okolice Talum d. d. in v čistem okolju*.

Vzorčno mesto	Vpliv vetra	Razdalja (km)	w(F) (mg kg^{-1})[a]		
			Koruzne metlice	Koruzni listi	Zemlja
Mesto požiga	1	1,05	1392 ± 26	159 ± 3	844 ± 33
V nasprotni smeri vetra	0,5	0,5	130 ± 6	59 ± 2	614 ± 6
Slovenska Bistrica	0	15	8,0 ± 1,0	6,0 ± 0,5	454 ± 11

[a] Rezultati predstavljajo povprečje več določitev ± S. D.

Rezultati analiz so pokazali močno povečane vsebnosti fluora v koruznih metlicah in listih v okolici Talum d. d. V smeri vetra so bile vsebnosti fluora v metlicah več kot 100-krat višje in iz smeri vetra več kot 10-krat višje, kot je bila vsebnost fluora v metlicah iz neobremenjenega okolja, ki je bila primerljiva naravnim vsebnostim fluora v rastlinah (do 10 mg kg^{-1}). Močno so bile povečane tudi vsebnosti fluora v listih; v primerjavi z neobremenjenim okoljem so bile vsebnosti fluora v koruznih listih na področju v smeri vetra več kot 20-krat višje, iz smeri vetra pa 10-krat. Določene vsebnosti so presegale najvišjo dovoljeno vsebnost fluora v živalski krmi (30 mg kg^{-1}), ki jo predpisujeta direktivi Evropske komisije (2002/32/EC, 2002; 2005/87/EC, 2005). Z analizami smo potrdili našo domnevo, da je do poškodb koruze prišlo zaradi nenadzorovanega izpusta plinastih fluoridov v ozračje. V primeru zemlje, ni mogoče sklepati, ali je vsebnost celotnega fluora posledica naravnih nihanj fluora v zemlji, oziroma ali je posledica onesnaženja s fluoridi ne glede na to, da naj bi bil tip zemlje v smeri vetra in iz smeri vetra podoben in da so bile določene vsebnosti fluora v zemlji iz neobremenjenega okolja statistično pomembno nižje.

Zadnje peči elektrolize B v Talum d. d. so bile leta 2007 ustavljene, podjetje pa je pridobilo okoljevarstveno dovoljenje za obratovanje naprave, ki lahko povzroča onesnaževanje okolja večjega obsega. Da bi preverili kakšen je (bil) vpliv talilnice na okolje, smo v poznem poletju leta 2010, na več mestih v okolici talilnice in v čistem okolju ponovno odvzeli vzorce koruznih listov in zemlje. Rezultati analiz so zbrani v tabeli 14.

Tabela 14: *Vsebnosti fluora v koruznih listih in fluora ter fluorida v zemlji v okolici Talum d. d. in v čistem okolju*.

Vzorčno mesto	Vpliv vetra	Razdalja (km)	Koruzni listi[a]	Zemlja[a]	
			w(F) (mg kg^{-1})	*w*(F) (mg kg^{-1})	*w*(F^-) (mg kg^{-1})
Mesto požiga	1	1,05	27,7 ± 1,9	877 ± 23	2,5 ± 0,4
Skladišče gum	1	1,63	14,4 ± 1,5	859 ± 32	2,3 ± 0,3
Hajdina	0,5	2,77	6,5 ± 1,6	528 ± 19	2,2 ± 0,1
Kungota	0,5	3,47	5,9 ± 1,8	608 ± 28	1,2 ± 0,1
Polskava	0,5	12,09	8,9 ± 1,4	668 ± 18	2,6 ± 0,3
Bukovško polje	0	150	7,8 ± 1,2	368 ± 10	2,1 ± 0,1

[a] Rezultati predstavljajo povprečje več določitev ± S. D.

Primerjava vsebnosti fluora, določenih v vzorcih koruznih listov, odvzetih v letu 2010, s tistimi, ki so bili odvzeti v letu 2005, je pokazala statistično pomembno nižje vsebnosti fluora v koruznih listih, odvzetih leta 2010. Kljub temu je vsebnost fluora v koruznih listih, ki so bili odvzeti v smeri vetra, še vedno statistično pomembno višja (14–28 mg kg^{-1}) od vsebnosti v koruznih listih, ki so bili odvzeti izven smeri vetra oziroma v neobremenjenem okolju (6–9 mg kg^{-1}). Vzrok temu bi lahko bila povečana vsebnost fluora v zemlji zaradi večletnega posedanja plinastih fluoridov iz ozračja. Zaključiti je mogoče, da: (1) so bile nekrotične spremembe koruze v letu 2005 res posledica izpusta plinastih fluoridov in (2) je koruza do določene mere zmožna privzemanja fluora iz zemlje.

4.3.2 Vsebnost fluora v zeliščih iz okolice Talum d. d. in čistega okolja

Slovenci smo znani kot porabniki zeliščnih čajev, zelišča pa pogosto uporabljamo tudi kot samostojne jedi in začimbe, zato lahko znatno prispevajo tudi k dnevnemu vnosu fluora v človeško telo. Zelišča lahko uporabimo tudi kot potencialne bioindikatorje onesnaženja s fluoridi. Največja prednost njihove uporabe je, da so navadno lahko dostopna, njihova rast je hitra, na majhnem področju pa lahko navadno pridobimo več različnih zelišč. Z

namenom ugotovitve, katera zelišča bi lahko potencialno akumulirala fluor v svojih nadzemnih delih, smo najprej določili vsebnosti fluora in fluorida v nekaterih komercialno dostopnih zeliščnih čajih. Rezultati so predstavljeni v tabeli 15.

Tabela 15: *Vsebnosti fluora in fluorida v nekaterih komercialno dostopnih zeliščnih čajih*.

Vrsta čaja	$w(F)$ (mg kg^{-1})[a]	$w(F^-)$ (mg kg^{-1})[a]	$w(F^-/F)$ (%)
Bezeg	3,7 ± 0,9	3,3 ± 1,0	89
Šipek	5,5 ± 0,1	2,8 ± 1,0	51
Žajbelj - 1	8,9 ± 2,5	2,0 ± 0,6	22
Žajbelj - 2	9,0 ± 0,7	5,2 ± 0,9	58
Lipa	10,7 ± 1,7	3,0 ± 0,5	28
Meta	12,2 ± 1,2	2,1 ± 0,8	17
Hibiskus	12,6 ± 0,5	4,0 ± 0,6	32
Kopriva	15,7 ± 2,3	2,7 ± 0,7	17
Kamilica	28,9 ± 2,9	3,4 ± 0,8	12

[a] Rezultati predstavljajo povprečje več določitev ± S. D.

Iz rezultatov analiz je razvidno, da je bila vsebnost fluora v zeliščih nizka. Štirje od analiziranih čajev so vsebovali pod 10 mg kg^{-1}, v petih čajih pa so bile vsebnosti rahlo povišane, od tega največ v koprivi in kamilici, 15,7 oziroma 28,9 mg kg^{-1}. Poparki zeliščnih čajev so vsebovali med 2,0 in 5,2 mg kg^{-1} fluorida. Učinkovitost sproščanja je med 12 % (kamilica) in 89 % (bezeg). Glede na to, da se zeliščni čaji navadno pripravljajo kot 1 % (m/V) poparki, je dnevni vnos fluora s pitjem zeliščnih čajev zanemarljiv in ne predstavlja tveganja za zdravje.

Z namenom ugotovitve, ali lahko katero od zelišč za pripravo čajev v okolju, obremenjenem s fluorom, akumulira fluor, smo v okolici Talum d. d. odvzeli vzorce različnih zelišč in zemlje, na kateri so zelišča rasla. Vzorci so bili odvzeti pozno poleti, zato raznolikost ni bila tako velika kot v primeru komercialno dostopnih čajev. Največ je bilo odvzetih vzorcev koprive, saj je kopriva razširjena podeželska rastlina, ki raste od zgodnje pomladi do pozne jeseni in jo je zato v okolju lahko najti. V vseh vzorcih zelišč in zemlje smo določili vsebnosti fluora in fluorida, zemlji pa smo dodatno izmerili še pH, saj naj bi bila vsebnost fluora v rastlinah odvisna od pH zemlje (Bar-Yosef & Rosenberg, 1988) (tabela 16).

Tabela 16: *Vzorčna mesta, vsebnosti fluora in fluorida v vzorcih zelišč, vsebnosti fluora in fluorida v zemlji ter pH zemlje.*

Vzorčno mesto	Oddaljenost od Talum d d. (km)	Vpliv vetra	Rastlina			Zemlja		
				w(F) (mg kg^{-1})[a]	*w*(F^-) (mg kg^{-1})[a]	*w*(F) (mg kg^{-1})[a]	*w*(F^-) (mg kg^{-1})[a]	pH[a]
(1) gozd, čebele	1,61	1	Šipek	5,6 ± 0,5	< LOD	719 ± 31	3,5 ± 0,1	7,34 ± 0,04
(1) gozd, čebele	1,61	1	Rman	7,0 ± 0,5	< LOD	719 ± 31	3,5 ± 0,1	7,34 ± 0,04
(1) gozd, čebele	1,61	1	Bezeg	9,0 ± 0,3	< LOD	719 ± 31	3,5 ± 0,1	7,34 ± 0,04
(1) gozd, čebele	1,61	1	Kopriva	100,0 ± 1,9	7,2 ± 0,6	719 ± 31	3,5 ± 0,1	7,34 ± 0,04
(2) skladišče	1,63	1	Kopriva	70,5 ± 3,9	7,2 ± 1,7	859 ± 32	2,3 ± 0,3	5,72 ± 0,19
(3) rdeče blato	2,97	1	Šipek	7,2 ± 0,1	< LOD	1058 ± 70	4,0 ± 0,3	7,66 ± 0,04
(4) Hajdina	2,77	0,5	Rman	7,4 ± 0,5	< LOD	528 ± 19	2,6 ± 0,1	7,74 ± 0,03
(4) Hajdina	2,77	0,5	Kopriva	28,2 ± 2,0	2,1 ± 0,3	528 ± 19	2,6 ± 0,1	7,74 ± 0,03
(5) Kungota	3,47	0,5	Kamilica	10,0 ± 0,3	< LOD	608 ± 28	1,2 ± 0,1	6,77 ± 0,06
(5) Kungota	3,47	0,5	Rman	6,1 ± 0,7	< LOD	608 ± 28	1,2 ± 0,1	6,77 ± 0,06
(5) Kungota	3,47	0,5	Kopriva	9,8 ± 1,0	2,8 ± 0,2	608 ± 28	1,2 ± 0,1	6,77 ± 0,06
(5) Kungota	3,47	0,5	Šentjanževka	3,2 ± 0,1	< LOD	608 ± 28	1,2 ± 0,1	6,77 ± 0,06
(6) Polskava	12	0,5	Šentjanževka	7,8 ± 0,6	< LOD	668 ± 18	2,2 ± 0,3	6,71 ± 0,01
(7) Razori	112	0	Kopriva	13,0 ± 0,8	1,9 ± 0,4	451 ± 3	1,1 ± 0,0	7,36 ± 0,01
(8) Smoleva	127	0	Kopriva	8,9 ± 1,7	2,6 ± 0,1	880 ± 17	0,8 ± 0,1	7,78 ± 0,03
(9) Ojstri vrh	130	0	Kopriva	6,4 ± 1,4	3,3 ± 0,9	615 ± 14	1,1 ± 0,2	6,72 ± 0,11

[a] Rezultati predstavljajo povprečje več določitev ± S. D.

Iz rezultatov, zbranih v tabeli, je razvidno, da je bila vsebnost fluora v zeliščih iz okolice Talum d. d. nižja od 10 mg kg^{-1}. Izjema je bila kopriva (*Urtica dioica* L.), kjer so bile določene vsebnosti fluora statistično pomembno višje. Statistično pomembne so bile tudi razlike med vsebnostmi fluora v koprivah s področij v smeri vetra oziroma iz smeri vetra, 71–100 mg kg^{-1} *vs.* 10–28 mg kg^{-1}. Vsebnosti fluora v koprivah iz čistega okolja so bile primerljive naravnim vsebnostim fluora v rastlinah (do 10 mg kg^{-1}). Vsebnosti fluorida v zeliščnih poparkih so bile nižje od 7 mg kg^{-1}.

Rezultati določitev vsebnosti fluora in fluorida v zemlji kažejo, da je vsebnost obeh višja na področjih v smeri vetra in na večji oddaljenosti od vira ne glede na to, da naj bi bil tip zemlje enak; velja za področje v smeri vetra 1,63–2,97 km. Ugotovitve se ujemajo z literaturnimi podatki. Dässler in Grumbach (1967) sta v zelo vlažnih pogojih na oddaljenosti 1–2 km od vira onesnaženja v zraku določala fluorid in zaključila, da je lahko vsebnost fluorida na večjih oddaljenostih (7–8 km) celo višja kot v neposredni bližini vira onesnaženja (Dässler & Grumbach, 1967). Primerjava vsebnosti fluora in fluorida v zemlji iz čistega in obremenjenega okolja je pokazala, da so vsebnosti fluora podobne, vsebnosti fluorida v zemlji iz čistega okolja pa je bistveno nižja. Iz tega lahko zaključimo, da so povišane vsebnosti fluorida v zemlji iz okolice Talum d. d. posledica izpustov plinastih fluoridov v okolje.

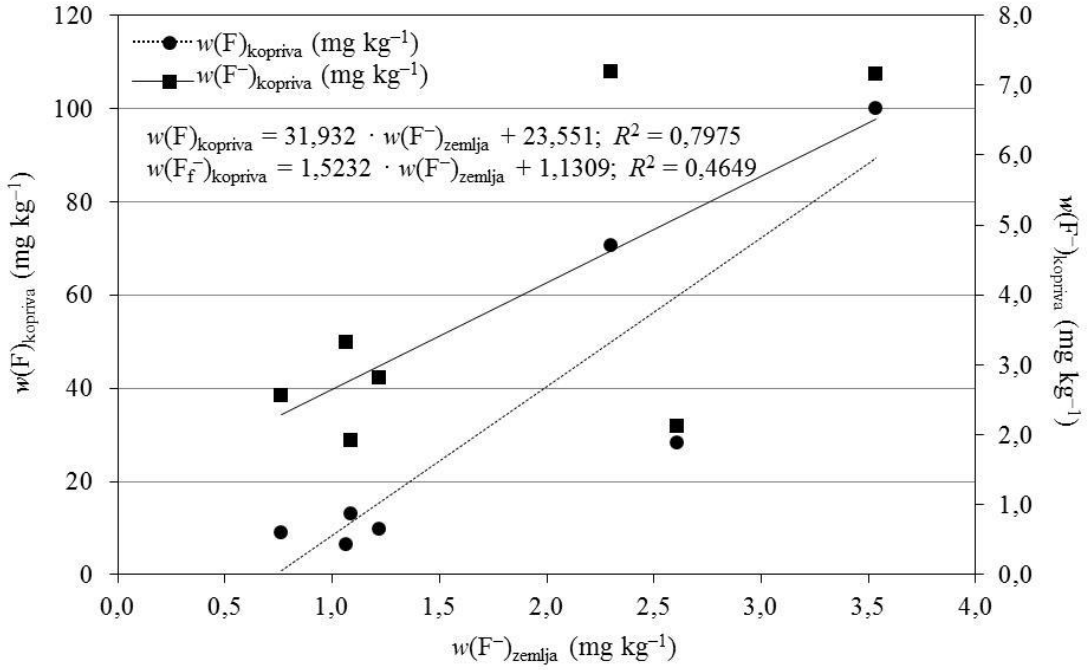
V nadaljevanju smo, da bi ugotovili, kako so posamezne spremenljivke medsebojno odvisne, izračunali korelacijske koeficiente za posamezne pare spremenljivk, ki so zbrani v tabeli 17.

Tabela 17: *Korelacijski koeficienti za posamezne pare spremenljivk*: $w(F)_{kopriva}$, $w(F^-)_{kopriva}$, $w(F)_{zemlja}$, $w(F^-)_{zemlja}$, pH_{zemlja} *in vpliv vetra*.

	$w(F)_{kopriva}$	$w(F^-)_{kopriva}$	$w(F)_{zemlja}$	$w(F^-)_{zemlja}$	pH	Vpliv vetra
$w(F)_{kopriva}$	1					
$w(F^-)_{kopriva}$	0,909	1				
$w(F)_{zemlja}$	0,373	0,574	1			
$w(F^-)_{zemlje}$	0,893	0,682	0,081	1		
pH	–0,265	–0,577	–0,305	–0,040	1	
Vpliv vetra	0,885	0,838	0,342	0,848	–0,445	1

Rezultati v tabeli kažejo, da sta vsebnosti fluora in fluorida v koprivi najbolj odvisni od vsebnosti fluorida v zemlji, velik vpliv pa ima tudi smer vetra. Manjši je vpliv vsebnosti fluora v zemlji in pH zemlje. Medsebojna odvisnost ostalih spremenljivk je nizka, z izjemo medsebojne odvisnosti med smerjo vetra in vsebnostjo fluora oziroma fluorida v zemlji.

Glede na visoko medsebojno odvisnost med vsebnostjo fluora oziroma fluorida v koprivi in vsebnostjo fluorida v zemlji smo z linearno regresijsko analizo izračunali medsebojno odvisnost spremenljivk. Rezultati analize so grafično predstavljeni na sliki 18.



Slika 18: *Vsebnost fluora oziroma fluorida v koprivi v odvisnosti od vsebnosti fluorida v zemlji*.

Izračun odvisnosti vsebnosti fluora v koprivi od vsebnosti fluorida v zemlji, pri poljskem poskusu, z linearno regresijsko analizo je pokazal sorazmerno dobro odvisnost, kar je razvidno tudi iz vrednosti R^2 = 0,7962. Vsebnost fluora v koprivi ni odvisna od vsebnosti fluora v zemlji; R^2 = 0,4649.

Rezultate smo ovrednotili še z multivariantno regresijsko analizo, pri čemer smo kot spremenljivke obravnavali vse parametre, ki smo jih med poskusom ovrednotili:

$$w(F)_{kopriva} = 135{,}477 + 15{,}069 \cdot w(F^-)_{kopriva} - 0{,}034 \cdot w(F)_{zemlja} + 16{,}977 \cdot pH + 17{,}931 \cdot \text{Vpliv vetra};\ R^2 = 0{,}9867,\ R'^2 = 0{,}9205 \quad (8)$$

Tako R^2 kot R'^2, ki predstavlja R^2, prilagojen številu meritev, sta visoka in kažeta na odvisnost vsebnosti fluora v koprivi od vseh obravnavanih spremenljivk. Na osnovi rezultatov lahko zaključimo, da kopriva lahko privzema fluorid iz zemlje in ga akumulira v tkivih. Pri tem je najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na privzemanje, vsebnost fluorida v zemlji, kar je v skladu z ugotovitvami za nekatere druge rastline (Bar-Yosef & Rosenberg, 1988). Pokazali smo tudi, da imajo na vsebnost fluora v koprivi v bližini antropogenih virov onesnaženja s plinastimi fluoridi, poleg vsebnosti fluorida v zemlji vpliv tudi vsebnost fluora v zemlji, pH zemlje in smer vetra; pH zemlje vpliva na razpoložljivost fluorida v zemlji, veter pa na vsebnost plinastih fluoridov v zraku.

4.4 Lončni poskus s koprivo

Navadna kopriva (*Urtica dioica* L.) je zelo razširjena trajnica z relativno visoko letno produkcijo biomase (Taylor, 2009). V večjih količinah iz zemlje akumulira težke kovine (Cu, Zn, Pb, Cd, Hg, Cr) (Alvarez & Illman, 2005; Otte & Wijte, 1993; Shams et al., 2010). Predlagana je bila za uporabo v biomonitoringu (Gjorgieva, Kadifkova-Panovska, Bačeva, & Stafilov, 2011; Murphy, Coudert, & Barker, 2000) in fitoremediaciji (Codling & Rutto, 2014; Edwards, MacLeod, & Lester, 1998; K. S. Khan & Joergensen, 2006; Notten, Oosthoek, Rozema, & Aerts, 2005).

Določitve vsebnosti fluora v zeliščih iz okolice Talum d. d. so pokazale statistično

pomembno višje vsebnosti fluora v koprivi (do 100 mg kg^{-1}), kot so bile vsebnosti fluora v drugih analiziranih zeliščih (do 10 mg kg^{-1}). Na vsebnosti fluora v koprivi je imela največji vpliv vsebnost fluorida v zemlji.

V nadaljevanju raziskav smo izvedli lončni poskus, s katerim smo želeli ugotoviti, kakšen je: (1) vzorec po katerem kopriva iz zemlje privzema fluorid, (2) odziv koprive na stres oziroma na vsebnost fluora oziroma fluorida v substratu, (3) akumulacijska sposobnost koprive za fluor, (4) učinkovitost prehajanja fluorida iz korenin v liste oziroma nadzemna tkiva, (5) možnost uporabe koprive kot bioindikator za fluorid in (6) fitoremediacijski potencial koprive za področja obremenjena z antropogenimi viri fluorida.

4.4.1 Substrat

Koprivo smo gojili na substratu, onesnaženem z NH_4F. Z izbiro substrata, namesto zemlje iz naravnega okolja, smo želeli preprečiti možnost bakterijskih in glivičnih infekcij, ter onesnaženja s plevelom, hkrati pa zagotoviti homogen material in optimalne pogoje za rast in razvoj novih rastlin. Stopnje onesnaženja substrata s fluoridom smo izbrali tako, da so bile najvišje vsebnosti fluora v onesnaženem substratu višje od vsebnosti fluora (in fluorida) v večini zemelj.

V raziskavah poročajo o uporabi NaF za onesnaženje Hoaglandovih hidroponičnih raztopin oziroma zemlje (Arnesen, 1997; Fornasiero, 2001; S. K. Jha et al., 2008, 2009; S. K. Jha et al., 2008; Kamaluddin & Zwiazek, 2003; Rathore, 1992; Ruan, Ma, Shi, & Han, 2004). Pri našem poskusu smo za onesnaženje uporabili NH_4F, ker, tako kot NaF, zagotavlja vir prostega fluorida, ki je rastlinam najbolj dostopna oblika fluora. Kopriva je na podlagi indikatorskih vrednosti za dušik (Ellenberg et al., 1991) rastlina, ki za svojo rast potrebuje dušik. Z onesnaženjem substrata z NH_4F smo zagotovili, da dušik ne bi bil faktor, ki bi omejeval rast in razvoj kopriv.

Z biološkega vidika je pomembno poznati vsebnost fluorida, ki je ne razpolago koreninam rastlin (Davison & Weinstein, 2006). Z namenom ugotovitve, do kakšnih sprememb v vsebnostih fluora in fluorida v substratu prihaja med lončnim poskusom, smo iz vsakega lončka odvzeli vzorec substrata in v njem določili vsebnosti fluora in fluorida. Glede na to, da je vsebnost fluorida v zemlji odvisna tudi od pH (Wenzel & Blum, 1992), smo vsem odvzetim vzorcem substrata določili še pH. Rezultati analiz so zbrani v tabeli 18.

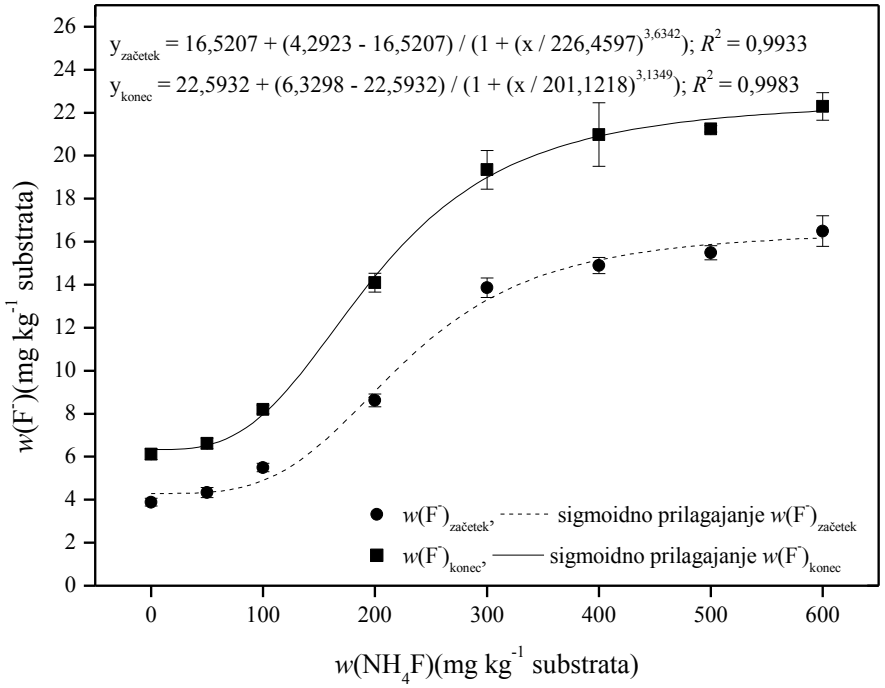
Tabela 18: *Vsebnosti fluora in fluorida ter pH vrednosti substrata na začetku poskusa in na koncu poskusa po zaključenem gojenju kopriv (po 75 dneh)*.

$w(NH_4F)_{substrat}$ (mg kg^{-1})	$w(F)_{substrat}$ (mg kg^{-1})[a]				$w(F^-)_{substrat}$ (mg kg^{-1})[a]				$pH_{substrat}$ [a]			
	začetek	konec	kontrola$_{zač.}$	kontrola$_{konec}$	začetek	konec	kontrola$_{zač.}$	kontrola$_{konec}$	začetek	konec	kontrola$_{zač.}$	kontrola$_{konec}$
0	197 ± 14	179 ± 5	188 ± 8	192 ± 6	3,9 ± 0,2	6,1 ± 0,2	4,0 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,31 ± 0,02	6,79 ± 0,02	6,31	6,79
50	239 ± 11	213 ± 11	251 ± 4	251 ± 10	4,3 ± 0,2	6,6 ± 0,3	4,3 ± 0,1	7,5 ± 0,1	6,35 ± 0,02	6,84 ± 0,02	6,32	6,82
100	270 ± 7	229 ± 8	261 ± 6	256 ± 10	5,5 ± 0,2	8,2 ± 0,2	5,6 ± 0,1	10,4 ± 0,1	6,39 ± 0,03	6,88 ± 002	6,35	6,86
200	296 ± 14	270 ± 11	304 ± 6	308 ± 10	8,6 ± 0,3	14,1 ± 0,4	8,9 ± 0,3	15,4 ± 0,1	6,55 ± 0,05	6,98 ± 0,03	6,53	6,95
300	334 ± 10	313 ± 6	327 ± 13	332 ± 11	13,9 ± 0,5	19,3 ± 0,9	13,7 ± 0,2	21,9 ± 0,2	6,79 ± 0,02	7,11 ± 0,05	6,78	7,10
400	392 ± 20	351 ± 10	381 ± 12	371 ± 24	14,9 ± 0,4	21,0 ± 1,5	14,8 ± 0,1	23,6 ± 0,1	6,83 ± 0,03	7,13 ± 0,04	6,82	7,15
500	449 ± 14	423 ± 4	443 ± 10	436 ± 4	15,5 ± 0,3	21,2 ± 0,1	15,2 ± 0,1	24,2 ± 0,1	6,88 ± 0,03	7,14 ± 0,04	6,86	7,17
600	529 ± 9	504 ± 10	532 ± 12	528 ± 16	16,5 ± 0,7	22,3 ± 0,6	16,5 ± 0,1	24,2 ± 0,1	6,96 ± 0,04	7,18 ± 0,03	6,98	7,21

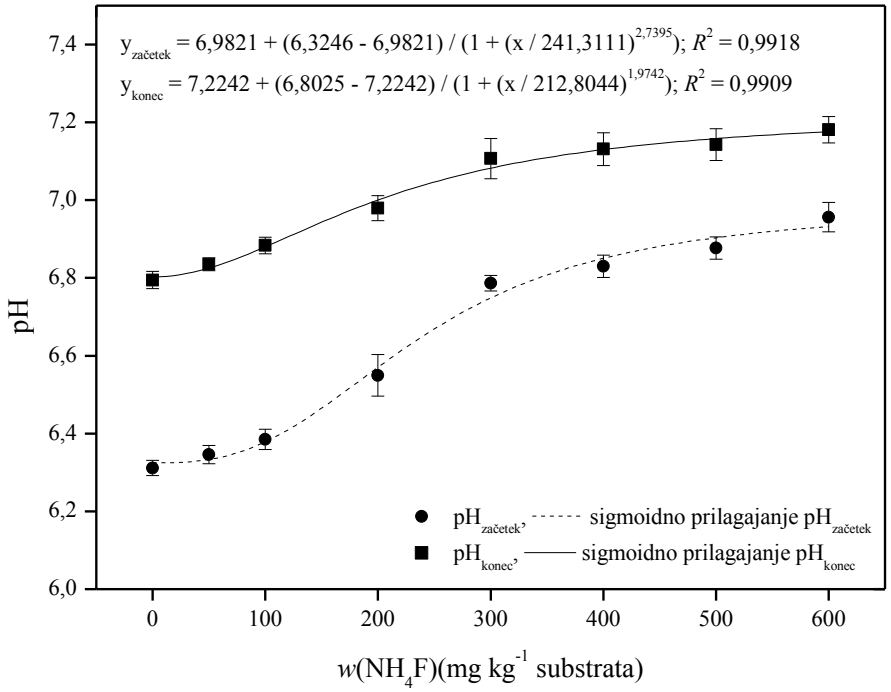
[a] Rezultati predstavljajo povprečje več določitev ± S. D.

Vsebnosti fluora v substratu na začetku poskusa so bile 197–529 mg kg^{-1}, po zaključenem gojenju kopriv pa 179–504 mg kg^{-1}. Med substrati z enako stopnjo onesnaženja z NH_4F in kontrolnimi substrati ni bilo statistično pomembnih razlik.

Vsebnosti fluorida v substratu na začetku poskusa so bile 3,9–16,5 mg kg^{-1}, pH vrednosti pa 6,31–6,96. Med vsebnostmi fluorida in pH vrednostmi v primerjavi s kontrolnimi substrati ni bilo statistično pomembnih razlik, z izjemo substratov substratov, ki so vsebovali 0 in 50 mg NH_4F kg^{-1} substrata. Vsebnosti fluorida in pH vrednosti so bile po koncu poskusa statistično pomembno višje; vsebnosti fluorida v substratih so bile 6,1–22,3 mg kg^{-1} in pH vrednosti 6,79–7,18. Vsebnosti fluorida v substratu, kjer so rasle koprive, so bile statistično pomembno nižje (8–22 %) kot v kontrolnih substratih (substrat brez kopriv), med pH vrednostnimi substrata in kontrolnimi substrati pa ni bilo statistično pomembnih razlik. Spremembe tako v vsebnostih fluorida kot pH vrednostih substrata so bile statistično pomembne v območju 50–400 mg NH_4F kg^{-1} substrata. Izračun razmerja med vsebnostmi fluorida in fluora je pokazal, da smo dosegli prenasičenje s fluoridom, saj je bilo na začetku poskusa 1,8–4,2 %, na koncu poskusa pa 3,1–6,2 % fluora prisotnega v obliki fluorida; navadno je v zemlji prisotnega 0,05–0,5 % fluora v obliki fluorida (Álvarez-Ayuso et al., 2011; Koblar et al., 2011). Na sliki 19 je prikazan učinek substratu dodanega NH_4F na vsebnost fluorida v substratu in na sliki 20 učinek substratu dodanega NH_4F na pH vrednost substrata.



Slika 19: *Učinek stopnje onesnaženja substrata z NH_4F na začetno in končno vsebnost fluorida v substratu.* Odkloni predstavljajo standardni odmik.



Slika 20: *Učinek stopnje onesnaženja substrata z NH4F na začetno in končno pH vrednost substrata*. Odkloni predstavljajo standardni odmik.

Spremembe v vsebnostih fluorida in v pH vrednostih substrata tekom poskusa glede na stopnje onesnaženja substrata z NH_4F lahko opišemo s sigmoidno krivuljo, z R^2 vrednostmi, višjimi od 0,99. Obliko obeh krivulj lahko razložimo z odvisnostjo adsorpcijske kapacitete glinenih mineralov v substratu za fluorid od pH (Bower & Hatcher, 1967; S. K. Jha et al., 2009). Majhne razlike v območju med 0–50 mg NH_4F kg^{-1} substrata lahko razložimo z izmenjavo F^- z OH^- v $Al(OH)_3$. Statistično pomembno zvišanje med 50 in 300 mg NH_4F kg^{-1} substrata je najverjetneje posledica pomanjkanja vezavnih mest za F^- v substratu v tem pH območju. Pri 300–600 NH_4F mg kg^{-1} substrata je povišanje pH dovolj veliko, da se lahko OH^- v kristalni rešetki glinenih materialov v substratu počasi izmenjuje s F^-. Statistično pomembne višje vsebnosti fluorida v substratu ob koncu poskusa, v primerjavi z začetnimi vrednostmi lahko razložimo s tem, da je prišlo med poskusom, najverjetneje zaradi sproščanja OH^-, do zviševanja pH, kar je v skladu z literaturnimi podatki (Stevens, McLaughlin, Alston, 1998). Posledično je lahko več dodanega fluorida na voljo v obliki fluorida. Nižje vsebnosti fluorida v substratih, v katerih so rasle koprive, v primerjavi s kontrolnimi substrati, lahko pripišemo privzemanju fluorida s strani koprive.

4.4.2 Morfologija kopriv po zaključku lončnega poskusa

Spremembe v morfologiji kopriv po koncu ločnega poskusa smo opisali z vidnimi, tako imenovanimi fitološkimi spremembami rastlin, ki jih lahko zaznamo s prostim očesom

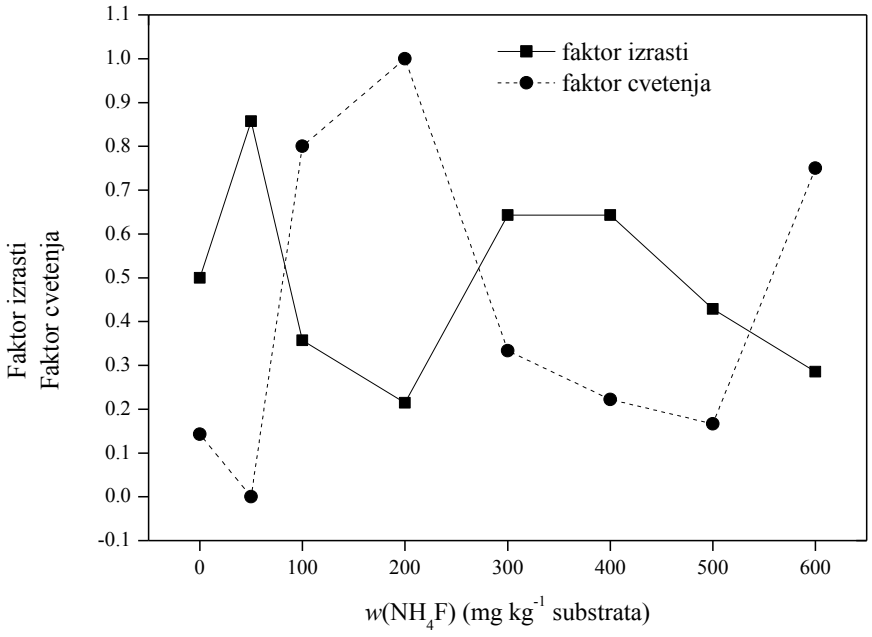
oziroma lupo. V našem poskusu smo opazovali pojav razbarvanja ali nekroz listov, faktor izrasti, faktor cvetenja, višino in število listov. Vsem rastlinam oziroma delom rastlin smo določili tudi biomaso. Kot standardno okolje za primerjavo morfologije smo uporabili koprive, ki so rasle v substratu brez dodanega NH_4F.

Koprive so rasle v vseh substratih ne glede na stopnjo onesnaženja z NH_4F. Vidne spremembe na listih v obliki razbarvanja ali pojava rjavih lis kot posledica akumulacije fluora v koprivi so se pojavile pri vsebnostih NH_4F v substratu enakih ali višjih od 100 mg kg^{-1}. Prikazane so na sliki 21.

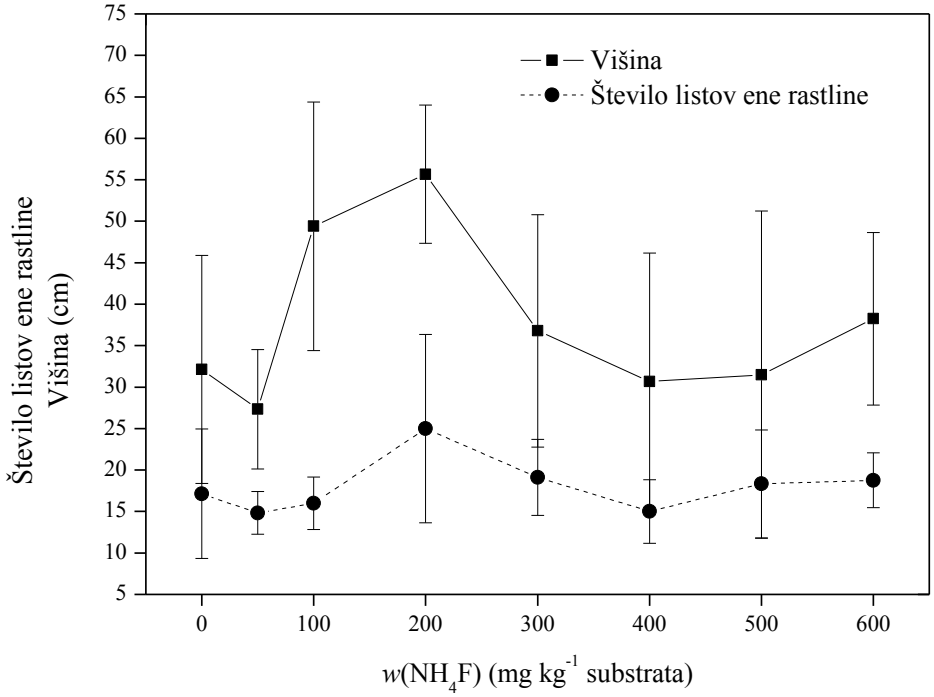


Slika 21: *Morfološke spremembe kot posledica akumulacije fluora v koprivi*; na sliki levo je vidno razbarvanje listov, desno pa nastanek rjavih lis.

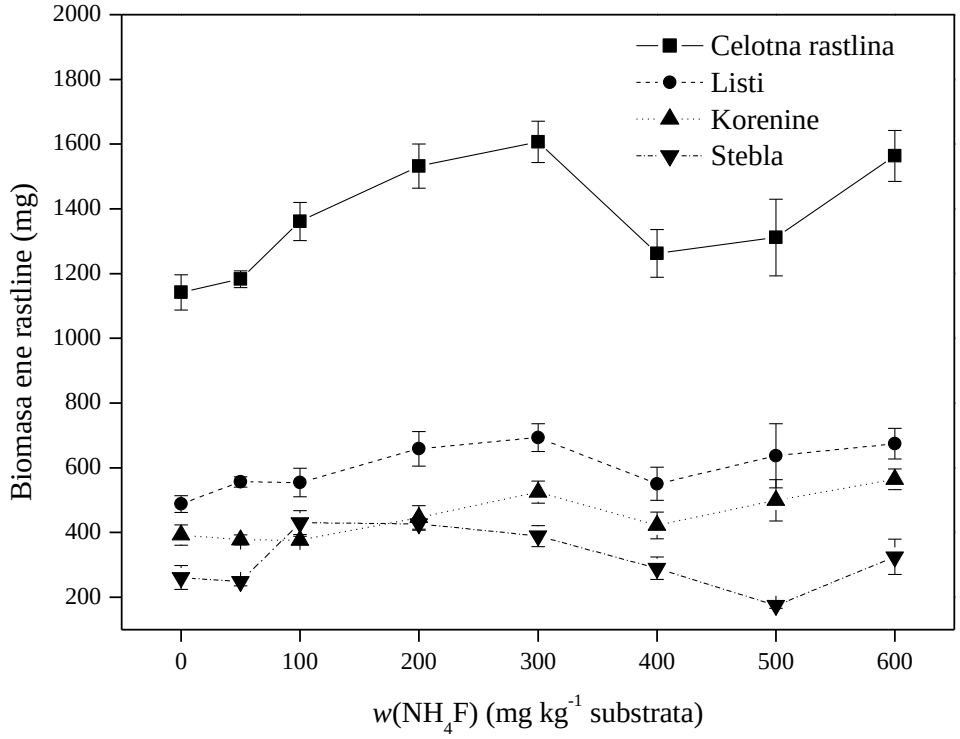
Odmike v standardni morfologiji smo ovrednotili s faktorjem izrasti in faktorjem cvetenja (slika 22), višino in številom listov rastlin (slika 23) in biomaso rastlin (slika 24) v odvisnosti od stopnje onesnaženja substrata z NH_4F.



Slika 22*: Faktor izrasti in faktor cvetenja koprive v odvisnosti od stopnje onesnaženja substrata z* NH_4F.

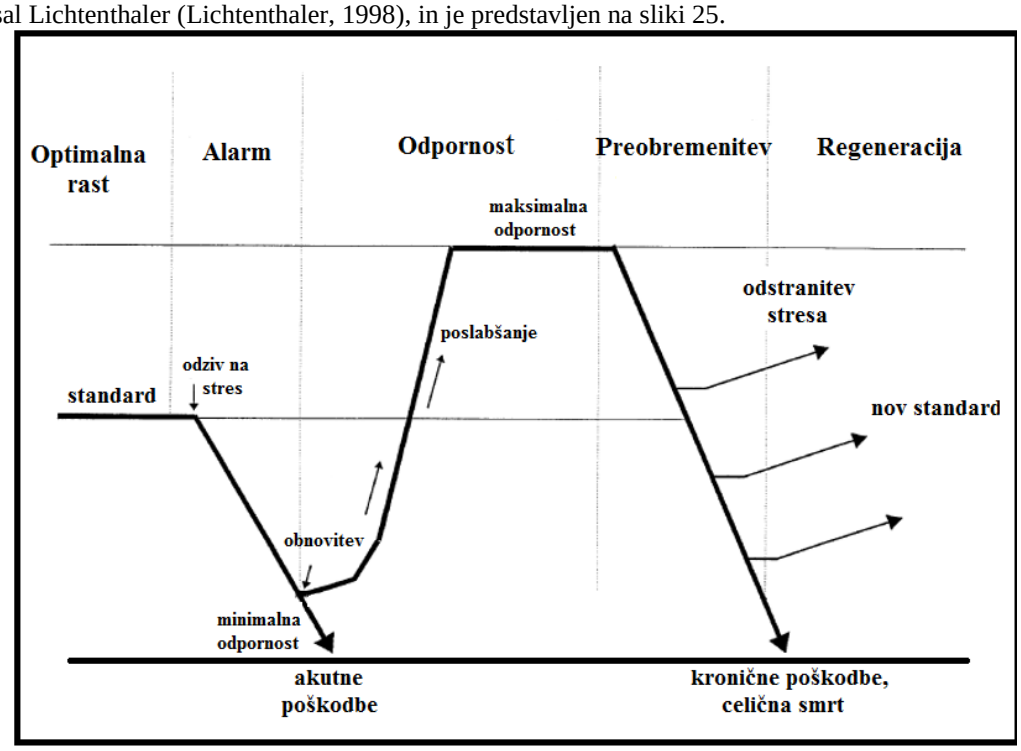


Slika 23: *Višina koprive in število listov ene koprive v odvisnosti od stopnje onesnaženja substrata z* NH_4F. Odkloni predstavljajo standardni odmik.



Slika 24: *Biomasa ene rastline v odvisnosti od stopnje onesnaženja substrata z NH_4F*. Odkloni predstavljajo standardni odmik.

Odziv koprive na onesnaženje substrata z NH_4F se ujema s konceptom odziva rastlin na stres, kot ga je opisal Lichtenthaler (Lichtenthaler, 1998), in je predstavljen na sliki 25.



Slika 25: *Odziv rastlin na stres z različnimi fazami rasti*; optimalna rast, odziv, faza odpornosti,

faza preobremenitve in faze regeneracije ob odstranitvi stresorja (Lichtenthaler, 1998).

Med lončnim poskusom je bila uspešnost izrasta 21–86 %; izraslo je 3–12 od skupno 14 posajenih ramet. Število cvetočih rastlin je bilo 0–4, največji delež cvetočih pa 80 %. Višina rastlin, ki so imele 15–25 listov, je bila 27–56 cm. Skupna biomasa ene rastline je bila 1,14–1,61 g, delež nadzemnih tkiv pa je predstavljal 62–72 % biomase.

Rast koprive na substratu brez dodanega NH_4F lahko obravnavamo kot rast v optimalnem okolju, ki se odraža v normalni (standardni) fitologiji in fiziologiji rastlin. Takšne rastline lahko obravnavamo kot kontrolne (standardne) rastline. Pri teh pogojih je izrasla polovica posajenih klonov.

V substratu s 50 mg kg^{-1} dodanega NH_4F je bil izrast kopriv v primerjavi z izrastom v optimalnih pogojih, celo stimuliran, kar lahko pripišemo zvišani vsebnosti amonija v substratu, vendarle pa ni cvetela nobena rastlina. Biomasa ni bila statistično pomembno različna od biomase kontrolnih rastlin.

V fazi odziva oziroma alarma, pri 100–200 mg NH_4F kg^{-1} substrata, je povečana dostopnost fluorida povzročila odstopanja od standardne fiziologije, ki se je izražala v prekomerni kompenzaciji (utrjevanju). Izrast ramet je bil nižji, kljub temu pa je večina rastlin cvetela, kar omogoča razmnoževanje. V primerjavi s standardno fitologijo kontrolnih rastlin so bili višina, število listov in biomasa statistično pomembno višji.

Fazi odziva sledi, pri vsebnostih NH_4F v substratu 300–400 mg kg^{-1}, faza adaptacije (prilagoditve). V tej fazi so se razvili obrambni mehanizmi koprive, ki so omogočili prilagoditev in ponovno »normalno« rast. Rastlina pravzaprav predstavlja nov standard glede na fiziologijo. Izrast rastlin in faktor cvetenja sta bila primerljiva kot pri kontrolnih rastlinah. Med višino rastlin in številom listov, v primerjavi s fitologijo kontrolnih rastlin, ni bilo statistično pomembnih razlik. Razliko je bilo mogoče opaziti v biomasi. Biomasa rastlin pri 300 mg NH_4F kg^{-1} substrata je bila v primerjavi s kontrolnimi rastlinami večja. Povečano biomaso je mogoče razložiti s spremenjeno fiziologijo, ki omogoča rast vitalnejših, krepkejših ter posledično težjih rastlin. Vendarle, pa že pri 400 mg NH_4F kg^{-1} substrata zaradi vzpostavljanja novega fiziološkega standarda, ni bilo statistično pomembnih razlik v biomasi kontrolnih rastlin in rastlin, ki so rasle pri vsebnosti NH_4F v substratu 400 mg kg^{-1}.

Pri vsebnostih NH_4F v substratu, večjih od 400 mg kg^{-1}, je prišlo do faze preobremenitve kopriv s fluoridom. Rastline so še vedno cvetele, vendar je bil izrast nizek. Pri vsebnostih NH_4F v substratu 500 oziroma 600 mg kg^{-1} je izraslo 6 oziroma 4 od 14 posajenih ramet. Višina in število listov sicer nista bila statistično pomembno različna od kontrolnih rastlin, je pa bila statistično pomembno višja biomasa. Razloga za to sta večja površina in posledično masa listov in večji ter bolj razvejan koreninski sistem.

Primerjava kontrolnih rastlin, ki so rastle na substratu brez dodanega NH_4F, in rastlin, ki so rasle na substratu z vsebnostjo NH_4F 600 mg kg^{-1}, je prikazana na sliki 26.



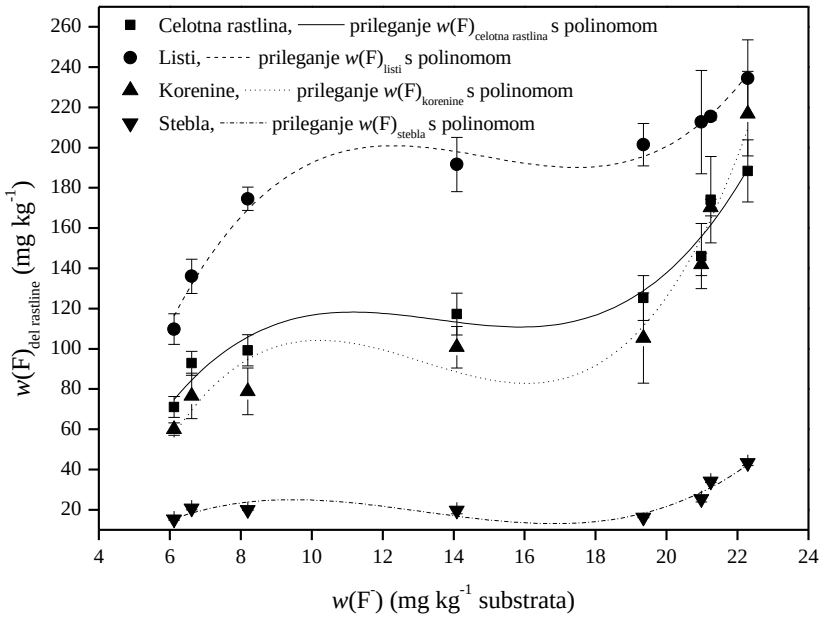
Slika 26: *Primerjava rastlin, ki so rasle na substratu brez dodanega NH_4F (levo) z rastlinami, ki so rasle na substratu, onesnaženem s 600 mg NH_4F kg^{-1} (desno).*

Z nadaljnjim povečanjem vsebnosti NH_4F v substratu je mogoče pričakovati še manjši izrast. Kot posledici spremenjene fiziologije sta pričakovani tudi slabša vitalnost in fitologija, kar bi vodilo do hudih poškodb in propada celic. Ne glede na to pa sklepamo, da bi se rastline, rastoče in cvetoče pri 600 mg NH_4F kg^{-1} substrata, ob odstranitvi stresorja oziroma presaditvi v čisto zemljo ali substrat, opomogle. Prišlo bi do delne oziroma celo do popolne regeneracije in razmnoževanja.

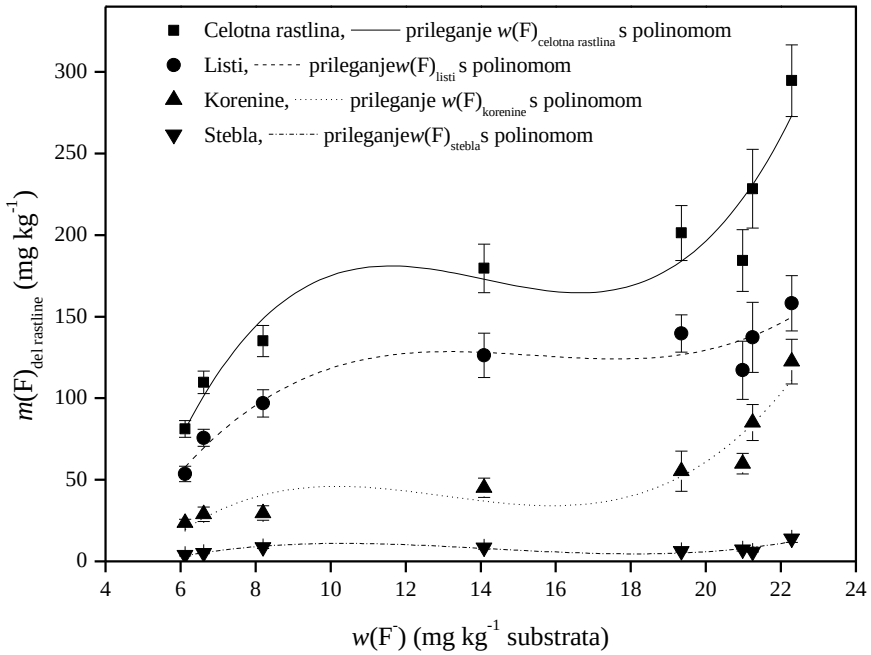
Pojav nekrotičnih sprememb pri vsebnostih NH_4F v substratu $\geq$ 100 mg kg^{-1} kaže na možnost uporabe koprive kot bioindikatorja za spremljanje onesnaženosti zemlje s fluoridom; koprive so izraščale, cvetele, akumulirale fluor in imele ob tem tudi visoko biomaso ne glede na stopnjo onesnaženosti substrata z NH_4F.

4.4.3 Vsebnost fluora v koprivi po zaključku lončnega poskusa

Vpliv stopnje onesnaženja substrata z NH_4F in s tem vpliv vsebnosti fluorida v substratu na vsebnost fluora v listih, steblih in koreninah je prikazan na sliki 27.



Slika 27: *Vpliv vsebnosti fluorida v substratu ob koncu poskusa na delež fluora w(F) v listih, koreninah in steblih koprive ter prileganje vsebnosti polinomu tretje stopnje*. Odkloni predstavljajo standardni odmik.



Slika 28: *Vpliv vsebnosti fluorida v substratu ob koncu poskusa na maso fluora m(F) v listih, koreninah in steblih koprive ter prileganje vsebnosti polinomu tretje stopnje*. Odkloni predstavljajo standardni odmik.

Vsebnosti fluora, določene v koprivi, so bile do 19-krat višje, kot so običajne vsebnosti fluora v večini rastlin in so se gibale med 71 in 188 mg kg^{-1}, medtem ko so se mase gibale med 81 in 295 μg $rastlino^{-1}$. Največ fluora je bilo določeno v listih (110–235 mg kg^{-1} oziroma 54–158 μg $rastlino^{-1}$), manj v koreninah (60–217 mg kg^{-1} oziroma 24–122 μg $rastlino^{-1}$), najmanj pa v steblih (15–43 mg kg^{-1} oziroma 4–14 μg $rastlino^{-1}$). Povečevanje vsebnosti fluora v listih je bilo statistično pomembno v območju 6,1–8,2 mg F^- kg^{-1} substrata (ustreza 0–100 mg NH_4F kg^{-1} substrata), v koreninah pa v območju 19,3–22,3 mg F^- kg^{-1} substrata (ustreza 300–600 mg NH_4F kg^{-1} substrata). Povečevanje mase F v listih je bilo statistično pomembno med 6,1–14,1 mg F^- kg^{-1} substrata in 21,2–22,3 mg F^- kg^{-1} substrata (ustreza 0– 200 oziroma 500–600 mg NH_4F kg^{-1} substrata) in v koreninah med 8,2–14,1 in 21,0–22,3 mg F^- kg^{-1} substrata (ustreza 100–200 oziroma 400–600 mg NH_4F kg^{-1} substrata). Posledično sta bila tako masni delež kot masa F v listih kopriv pri vseh stopnjah onesnaženosti substrata z NH_4F statistično pomembno višja od masnega deleža in mase F v kontrolnih koprivah, medtem ko sta bila v primeru korenin statistično pomembno višja le v območju 14,1–22,3 mg F^- kg^{-1} substrata (ustreza 200–600 NH_4F kg^{-1} substrata). Nizka vsebnost fluora v steblih, pri vseh stopnjah onesnaženosti substrata z NH_4F, potrjuje, da služijo stebla le za transport fluora med koreninami in listi. Določene vsebnosti v listih in koreninah so višje od vsebnosti fluora v rastlinah, ki ne privzemajo fluora in primerljive oziroma višje od vsebnosti fluora v večini rastlin, ki lahko privzemajo in akumulirajo fluor (Tabela 4: Vsebnost fluora v nekaterih rastlinah, ki lahko akumulirajo fluor.)

Vsebnosti oziroma mase fluora v listih, koreninah in steblih se glede na vsebnost fluorida v substratu prilegajo polinomu tretje stopnje. Koeficienti polinomov so zbrani v tabeli 19.

Tabela 19: *Koeficienti polinomov tretje stopnje, ki opisujejo odvisnost vsebnosti oziroma mase fluora v listih, koreninah, steblih in celotni rastlini od vsebnosti fluorida v substratu*.

	$w(F)_{rastlinski\ del} = f(w(F^-)_{substrat})$			
Koeficient	**Listi**	**Korenine**	**Stebla**	**Celotna rastlina**
B_0	–280,5487	–324,386	–84,6338	–202,3519
B_1	102,2353	106,4934	28,4989	75,0593
B_2	–7,0790	–8,52934	–2,3516	–5,7286
B_3	0,1585	0,21651	0,0596	0,1413
R^2	0,9866	0,9626	0,9187	0,9647
	$m(F)_{rastlinski\ del} = f(w(F^-)_{substrat})$			
Koeficient	**Listi**	**Korenine**	**Stebla**	**Celotna rastlina**
B_0	–227,8878	–199,6039	15,1808	–479,8957
B_1	72,0393	61,3114	–1,1555	148,5315
B_2	–4,7768	–4,9382	0,0271	–10,8706
B_3	0,10341	0,1262	15,1808	0,2567
R^2	0,9253	0,9116	0,8048	0,9230

Prevojne točke funkcij $w(F)_{rastlinski\ del} = f(w(F^-)_{substrat})$ in $m(F)_{rastlina} = f(w(F^-)_{substrat}$ so zbrane v Tabeli 20, dodane pa so še ustrezne vsebnosti NH_4F v substratu.

Tabela 20: *Prevojne točke funkcij $w(F)_{rastlinski\ del} = f(w(F^-)_{substrat})$ in $m(F)_{rastlina} = f(w(F^-)_{substrat}$ in ustrezne vsebnosti NH_4F v substratu.*

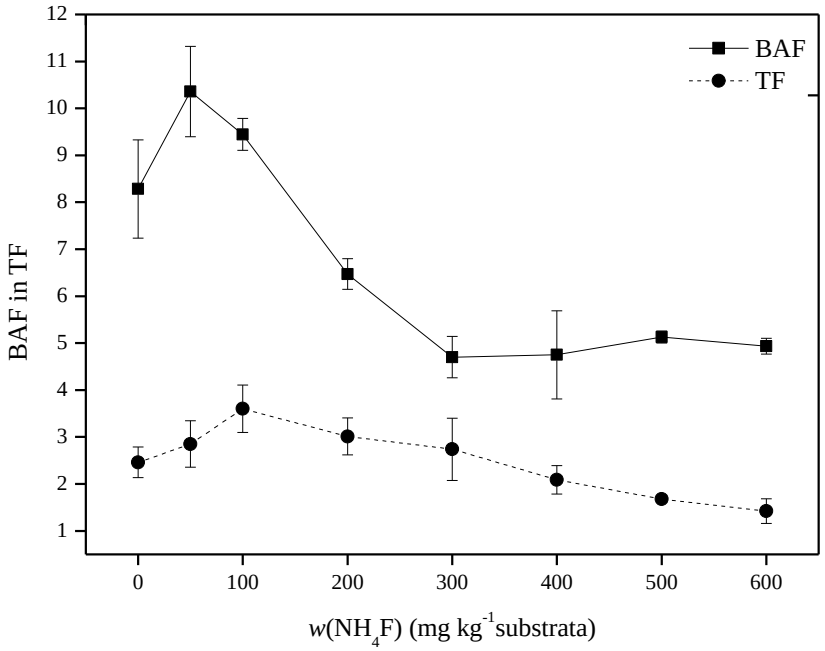
	Prevojne točke			
	$w(F)_{rastlinski\ del} = f(w(F^-)_{substrat})$		$m(F)_{rastlinski\ del} = f(w(F^-)_{substrat})$	
	$w(F^-)_{substrat}$ (mg kg^{-1})	$w(NH_4F)_{substrat}$ (mg kg^{-1})	$w(F^-)_{substrat}$ (mg kg^{-1})	$w(NH_4F)_{substrat}$ (mg kg^{-1})
Listi	14,9	208	15,4	217
Korenine	13,2	182	13,1	181
Stebla	13,2	182	14,2	197
Celotna rastlina	13,5	186	14,1	195

Prevojne točke funkcij $w(F)_{rastlinski\ del} = f(w(F^-)_{substrat})$ se nahajajo pri vsebnosti fluorida v substratu 13,2–14,9 mg F^- kg^{-1} substrata (ustreza 182–208 mg NH_4F kg^{-1} substrata in za funkcije $m(F)_{rastlinski\ del} = f(w(F^-)_{substrat}$ pri 13,1–15,4 mg F^- kg^{-1} substrata (ustreza 181–217 mg NH_4F kg^{-1} substrata). Primerjava z morfološkimi spremembami je pokazala, da se prevojne točke ujemajo z začetkom faze alarma; krivulje levo od prevojnih točk predstavljajo rast v optimalnih pogojih in fazo alarma, krivulje desno od prevojnih točk pa predstavljajo fazo prilagoditve na nove fiziološke standarde in pojav preobremenitve.

Vrstni red zadrževanja fluora v koprivi je: listi > korenine > stebla, kar je v nasprotju z večino rastlin, kjer je vsebnost fluora najvišja v koreninah. Izjema je čajevec, za katerega so poročali, da je bila vsebnost F v listih linearno odvisna od vsebnosti fluorida v hranilni raztopini (Ruan et al., 2003). O linearnem modelu privzemanja fluorida iz zemlje so poročali tudi za špinačo in čebulo (Jha et al., 2008, 2009). Rezultate raziskav, kjer so poročali o linearnem modelu privzemanja bi bilo smiselno preveriti tudi s prileganjem polinomu tretje stopnje. Na ta način bi lahko preverili, ali je mogoče opaziti pojav faze alarma tudi pri drugih rastlinah, poleg tega pa bi lahko primerjali privzemanje fluorida s strani čajevca, ki je znan kot bioakumulator in drugih rastlin, ki bi jih bilo mogoče uporabiti kot bioakumulatorje. Krivulje levo od prevojnih točk se ujemajo s sigmoidnim modelom privzemanja fluorida v rastline iz hidroponičnih sistemov (Stevens et al. 1998); zaradi nižjih vsebnosti fluorida v hidroponičnih sistemih, kot so bile vsebnosti fluorida v substratih, ki smo jih uporabljali med našim poskusom, do faze alarma ni prišlo.

4.4.4 Bioakumulacijski in translokacijski faktorji koprive

Učinkovitost koprive za privzemanje fluorida iz substrata (ali vode) smo ovrednotili z bioakumulacijskim faktorjem (BAF). Učinkovitost prehajanja fluorida iz korenin v liste oziroma nadzemna tkiva smo ovrednotili s translokacijskim faktorjem (TF). Odvisnost TF in BAF od stopnje onesnaženja substrata z NH_4F je prikazana na sliki 28.



Slika 29: *Vpliv dodanega NH_4F v substratu na TF in BAF vrednosti*. Odkloni predstavljajo standardni odmik.

Vrednosti BAF so se gibale med 4,7 in 10,4 (kontrolne rastline 8,3), vrednosti TF pa so bile v celotnem območju večje od 1 in so se gibale med 1,4 in 3,6 (kontrolne rastline 2,5). V primerjavi s kontrolnimi rastlinami so bile statistično višje vrednosti določene pri vsebnosti 50–100 NH_4F kg^{-1} substrata (ustreza 6,6–8,2 mg F^- kg^{-1} substrata). Pri vsebnostih 100–300 mg NH_4F kg^{-1} substrata (ustreza8,2–19,3 mg F^- kg^{-1} substrata) je mogoče opaziti statistično pomembno zniževanje obeh faktorjev, pri višjih onesnaženostih substrata z NH_4F pa tako BAF, kot TF, ostaneta praktično konstantna.

Najvišja vrednost TF je bila določena pri 100 mg NH_4F kg^{-1} substrata (ustreza 8,2 mg F^- kg^{-1} substrata), nad temi vsebnostmi pa se TF linearno zmanjšuje. Pri 50 mg NH_4F kg^{-1} substrata in v območju 200–400 mg NH_4F kg^{-1} substrata (ustreza 6,6 in 14,1–22,0 mg F^- kg^{-1} substrata) ni bilo statistično pomembnih razlik v primerjavi s TF kontrolnih rastlin, med tem, ko v območju 500–600 mg NH_4F kg^{-1} substrata (ustreza 21,2–22,3 mg F^- kg^{-1} substrata) TF vrednosti statistično pomembno nižje od TF vrednosti kontrolnih rastlin.

Le majhne spremembe BAF pri onesnaženju substrata s 300–600 NH_4F kg^{-1} substrata (ustreza 19,3–22,33 mg F^- kg^{-1} substrata) kažejo, da se sposobnost koprive za privzemanje fluorida iz substrata ne spreminja, medtem ko vrednosti TF padajo. Zmanjšano učinkovitost prenosa fluorida iz korenin v liste, kljub zviševanju vsebnosti fluorida v substratu, je mogoče pripisati spremembam v normalni fiziologiji kopriv v fazi alarma, kar povzroči nižjo permeabilnost endodermisa za fluorid (Keller, 1980; Takmaz-Nisancioglu & Davison, 1988).

Ne glede na nihaja v BAF in TF vrednostih in njunem zmanjševanjem pri stopnji onesnaženosti substrata z več kot 100 mg NH_4F kg^{-1} (ustreza 8,2 mg F^- kg^{-1} substrata) pa sta v celotnem preiskovanem območju oba, BAF in TF višja od 1 (BAF > 4,7 in TF > 1,4), kar kaže na to, da kopriva akumulira fluor. Poleg tega so tudi vsebnosti fluorida v substratu s koprivami v primerjavi s kontrolnimi substrati (8–22 %) statistično pomembno nižje. Sklepamo lahko, da je kopriva akumulator fluora, ki ima visok potencial za fitoekstrakcijo, to je metodo fitoremediacije, pri kateri se onesnažilo iz zemlje akumulira v nadzemnih delih rastline, ki jih je mogoče enostavno odstraniti iz okolja (na primer

žetev).

4.4.5 Fitoremediacijski potencial koprive

Kopriva je razširjena rastlina, ki hitro raste, ima lahko visoko gostoto posaditve in posledično tudi visoko biomaso. Privzemanje fluora v koprivo poteka s fitoekstrakcijo; večina iz zemlje privzetega fluora se akumulira v nadzemnih delih koprive (TF > 1). Učinkovitost koprive za fitoekstrakcijo smo ocenili na osnovi predpostavk;

1. biomasa nadzemnih delov kopriv lahko doseže 700 g m^{-2} (Taylor, 2009),
2. masa fluora v nadzemnih delih rastline (listi in stebla) po 75 dneh rasti je 51–110 mg kg^{-1},
3. povprečna vsebnost fluora v zemlji je 100–600 mg kg^{-1} (Davison & Weinstein, 2006),
4. 0,05–0,5 % fluora v zemlji je prisotnega v obliki fluorida (Álvarez-Ayuso et al., 2011; Koblar et al., 2011) in
5. masa vrhnje plasti zemlje, v kateri so korenine (globina ≈ 20 cm, gostota zemlje je ≈ 1,3 t m^{-3} (Zhao, Lombi, & McGrath, 2003), približno 2600 t.

Na osnovi tega modela smo ocenili, da je mogoče iz vrhnje plasti enega hektara zemlje z uporabo kopriv odstraniti 0,36–0,77 kg F^{-}, ki se akumulira v nadzemnih delih rastline (listi in stebla). To je več, kot so običajne nižje mase fluorida (≈ 0,13 kg) in med 4,6–9,9 % (≈ 7,8 kg) najvišjih vsebnosti fluorida v zgornjih plasteh zemlje, kar kaže na dober potencial koprive za fitoekstrakcijo. Pri modelnem izračunu smo upoštevali le površinsko plast zemlje, v kateri se nahajajo korenine koprive. Uporaba koprive za fitoremediacijo s fluoridi onesnaženih zemelj po mehanizmu fitoekstrakcije bi bila zaradi relativno kratkih korenin koprive manj učinkovita za fitoremediacijo nižjih plasti zemlje. Vsebnost fluora je lahko namreč zaradi dolgoletne uporabe fosfatnih gnojil oziroma posedanja plinastih fluoridov povečana tudi na globini 50 cm (Arnesen & Krogstad, 1998). S primerno predobdelavo tal, na primer globokim oranjem, pa bi bilo mogoče odstraniti tudi fluorid iz nižjih plasti (do globine 1 m) zemlje.

5 Zaključki

V okviru doktorske disertacije smo preučevali izpostavljenost fluoru preko nekaterih naravnih in antropogenih virov. Raziskave smo razdelili v tri medsebojno povezane sklope.

V prvem sklopu raziskav z naslovom **Pravi čaji** smo raziskali, kakšne so vsebnosti fluora v nekaterih komercialno dostopnih pravih čajih, ki jih najbolj pogosto uživamo Slovenci. Čajevec (*Camellia sinensis*) je namreč edina doslej znana rastlina, ki lahko iz zemlje privzema fluor in ga kopiči v listih, od koder se med pripravo čajnih poparkov zlahka sprosti. V izbranih vrstah čaja smo določili tako vsebnosti fluora v čajnih listih, kot vsebnosti fluorida v poparkih in na ta način določili, kakšna je učinkovitost sproščanja fluora v obliki fluorida. Pri tem smo čaje razlikovali glede na stopnjo fermentacije in glede na obliko, v kateri se prodajajo. Na osnovi pridobljenih rezultatov smo zaključili:

- Vsebnost fluora v čajnih listih je bila med 53 in 435 mg kg^{-1} in vsebnost fluorida v čajnih poparkih, pripravljenih z enkratnim namakanjem (t = 5 min), med 0,33 in 3,55 mg l^{-1}.
- Učinkovitost sproščanja fluora iz zelenih, oolong in črnih čajev z enkratnim namakanjem je bila 55–90 % in pri pripravi zaporednih poparkov 74–100 % in ni bila odvisna od vrste oziroma oblike pakiranja čaja. Nižja učinkovitost sproščanja fluora iz Pu'erh čajev, 21–38 % z enkratnim oziroma 37–59 % z zaporednim namakanjem, je najverjetneje posledica drugačnega proizvodnega postopka Pu'erh čajev.
- Učinkovitost sproščanja fluora pri pripravi zaporednih poparkov je tako glede na stopnjo fermentacije čaja, kot glede na obliko pakiranja čaja, mogoče opisati z logaritemskimi enačbami. Vrednosti kvadrata regresijskega koeficienta (R^2) so med 0,9133 in 0,9982.
- Vsebnost fluora v čaju iz čajnih vrečk (185–435 mg kg^{-1}) je bila v povprečju približno 2,5-krat višja od vsebnosti v čajih, kupljenih v razsulu (53–197 mg kg^{-1}). Podobno velja za vsebnosti fluorida v čajnih poparkih. Največ fluorida, določenega pri enkratnem namakanju, so vsebovali poparki čajev iz filter vrečk (0,55–3,55 mg l^{-1}), manj pa poparki čajev, ki jih kupimo v razsulu (0,33–1,47 mg l^{-1}).

Pitje pravih čajev znatno prispeva k dnevnemu vnosu fluora. V primeru, da odrasla oseba s 70 kg dnevno v povprečju spije pet skodelic pravega čaja (1000 ml), doseže v primeru čaja, kupljenega v filter vrečkah, 40–101 %, v primeru čaja, kupljenega v razsulu, 13–42 %, v primeru granuliranega čaja 64 % in v primeru pitja pu'erh čaja 9–16 % primernega dnevnega vnosa fluora. Ocenjen skupni dnevni vnos fluora s čajem in hrano za nefluorirana področja predstavlja 25–173 % primernega dnevnega vnosa. Na področjih s fluorirano vodo je vnos fluora zaradi uporabe fluorirane vode za pripravo hrane in kuhanje še višji; ocenjeni dnevni vnos lahko doseže tudi do 210 % primernega dnevnega vnosa.

S pitjem pravih čajev lahko pripomoremo k bolj zdravemu načinu življenja, vendar je potrebno izbrati kvaliteten čaj in ga uživati v zmernih količinah. Posledice kroničnega vnosa prekomernih količin fluora v telo s pitjem pravega čaja so znane in dokumentirane, žal pa pogosto spregledane. Smiselna bi bila uvedba smernic, ki bi zakonsko omejevale

vsebnost fluora v komercialno dostopnih pravih čajih. Postopek priprave čajnih poparkov bi bilo potrebno standardizirati, da bi bilo mogoče rezultate, pridobljene v različnih preiskavah, ustrezno ovrednotiti in primerjati. Poleg tega bi bilo potrebno uvesti tudi smernice oziroma mednarodni standard, ki bi omejeval dovoljeno vsebnost fluora v pravih čajih in drugi, s fluorom bogati, hrani.

V drugem sklopu doktorske disertacije z naslovom **Učinek plinastih fluoridov na vsebnost fluora v zemlji, koruzi in zeliščih** smo proučevali učinek plinastih fluoridov na rastline in zemljo. Povod za raziskave v tem sklopu disertacije so bile poškodbe koruze, ki so jih jeseni 2005 opazili na poljih v okolici talilnice aluminija Talum d. d. v Kidričevem. Poškodbe so bile na videz enake nekrotičnim poškodbam, ki jih povzročajo plinasti fluoridi. Rezultati analiz so pokazali:

- Vsebnosti fluora v koruznih metlicah v okolici Talum d. d. so bile na področju v smeri vetra več kot 100-krat višje in iz smeri vetra več kot 10-krat višje, kot je bila vsebnost fluora v neobremenjenem okolju, ki je bila primerljiva naravnim vsebnostim fluora v rastlinah (do 10 mg kg^{-1}).
- Vsebnosti fluora v koruznih listih v okolici Talum d. d so bile na področju v smeri vetra več kot 20-krat višje, iz smeri vetra pa 10-krat višje, kot je bila vsebnost fluora v neobremenjenem okolju, ki je bila primerljiva naravnim vsebnostim fluora v rastlinah.
- Določene vsebnosti so presegale najvišjo dovoljeno vsebnost fluora v živalski krmi (30 mg kg^{-1}).
- Poškodbe koruze smo pripisali nenadzorovanemu izpustu plinastih fluoridov v ozračje.

Zadnje peči elektrolize B v Talum d. d. so bile leta 2007 ustavljene, podjetje pa je pridobilo okoljevarstveno dovoljenje za obratovanje naprave, ki lahko povzroča onesnaževanje okolja večjega obsega. V poznem poletju leta 2010 smo na več mestih v okolici talilnice in v čistem okolju ponovno odvzeli vzorce koruznih listov in zemlje. Rezultati analiz so pokazali:

- Vsebnosti fluora v koruznih listih, odvzetih leta 2010 (14–28 mg kg^{-1}), so bile statistično pomembno nižje kot vsebnosti fluora v koruznih listih, odvzetih leta 2005 (59–159 mg kg^{-1}).
- Vsebnost fluora v koruznih listih, ki so bili odvzeti v smeri vetra, je bila še vedno statistično pomembno višja (14–28 mg kg^{-1}) od vsebnosti v koruznih listih, ki so bili odvzeti izven smeri vetra oziroma v neobremenjenem okolju (6–9 mg kg^{-1}). Razlog bi lahko bila povečana vsebnost fluora v zemlji zaradi večletnega posedanja plinastih fluoridov iz ozračja in omejena sposobnost koruze za akumulacijo fluora.

Zaključimo lahko, da smo s ponovnim odvzemom vzorcev v letu 2010 potrdili, da so bile nekrotične spremembe koruze v letu 2005 res posledica izpusta plinastih fluoridov in da je koruza do določene mere zmožna privzemanja fluora iz zemlje.

Glede na povišane vsebnosti fluora, določene v koruznih listih v smeri vetra v okolici Talum d. d., smo ta sklop raziskav razširili še na določanje vsebnosti fluora v zeliščih iz okolice Talum d. d. Zelišča se uporabljajo za pripravo zeliščnih čajev in kot samostojne jedi in lahko znatno prispevajo dnevnemu vnosu fluora. Z analizami nekaterih komercialno dostopnih zeliščnih čajev smo ugotovili:

- Vsebnost fluora v večini zelišč je bila pod 10 mg kg^{-1}. Višje vsebnosti fluora so bile določene v lipi, meti, hibiskusu, koprivi in kamilici, od tega največ v koprivi in kamilici, 15,7 oziroma 28,9 mg kg^{-1}. Poparki zeliščnih čajev so vsebovali med 2,0 in 5,2 mg kg^{-1} fluorida. Učinkovitost sproščanja je bila med 12 % (kamilica) in 89 % (bezeg).

- Zeliščni čaji se navadno pripravljajo kot 1 % (*m*/*V*) poparki, zato je dnevni vnos fluora s pitjem zeliščnih čajev zanemarljiv in ne predstavlja tveganja za zdravje.

Pri analizi zelišč, nabranih v okolici Talum d. d., smo ugotovili:

- Vsebnost fluora v zeliščih je bila nižja od 10 mg kg^{-1}. Izjema je bila kopriva (*Urtica dioica* L.), kjer so bile določene vsebnosti fluora statistično pomembno višje. Vsebnosti fluorida v zeliščnih poparkih so bile nižje od 7 mg kg^{-1}.
- Vsebnost fluora v koprivah s področij v smeri vetra je bila statistično pomembno višja kot s področij iz smeri vetra, 71–100 mg kg^{-1} *vs.* 10–28 mg kg^{-1}.
- Vsebnosti fluora v koprivah iz čistega okolja so bile primerljive naravnim vsebnostim fluora v rastlinah (do 10 mg kg^{-1}).

Statistična obdelava rezultatov z izračunom korelacijskih koeficientov in multivariantno regresijsko analizo je pokazala, da je vsebnost fluora v koprivi najbolj odvisna od vsebnosti fluorida v zemlji, velik vpliv pa ima tudi smer vetra. Manjši je vpliv vsebnosti fluora v zemlji in pH zemlje.

V zadnjem sklopu raziskav, naslovljenem **Lončni poskus s koprivo,** smo raziskovali akumulacijske sposobnosti koprive za fluor, vzorec privzemanja fluora v rastlino in ocenili možnosti uporabe koprive kot bioindikatorja in kot fitoremediatorja področij, obremenjenih z antropogenimi viri fluora. Na osnovi rezultatov lončnega poskusa gojenja koprive na substratu, kontaminiranem z NH_4F (0–600 mg NH4F kg^{-1} substrata), smo ugotovili:

- Vsebnosti fluorida in pH vrednosti substrata v odvisnosti od stopnje onesnaženja substrata so bile na koncu poskusa statistično pomembno višje kot na koncu poskusa, kar je mogoče razložiti s poviševanjem pH vrednosti substrata med poskusom. Spremembe v vsebnostih fluorida in v pH vrednostih tekom poskusa, glede na stopnje onesnaženja substrata z NH_4F lahko opišemo s sigmoidnima krivuljama z R^2 vrednostmi, višjimi od 0,99. Nižje vsebnosti fluorida v substratu vzorcev v primerjavi z vsebnostmi fluorida v kontrolnih substratih lahko pripišemo privzemanju fluorida s strani koprive.
- Odziv koprive na onesnaženje substrata z NH_4F se ujema s konceptom odziva rastlin na stres. Fazi optimalne rasti v neonesnaženem substratu sledi zaradi visoke vsebnosti dušika v substratu faza pospešene rasti. Sledijo faza odziva oziroma alarma (100–200 mg NH_4F kg^{-1} substrata), ki ji sledita faza adaptacije (300–400 mg NH_4F kg^{-1} substrata) in nato faza preobremenitve kopriv s fluoridom (500–600 mg NH_4F kg^{-1} substrata).
- Najvišji faktorji izrasti, višina in število listov ter najvišji biomasa so bili opaženi pri stopnjah onesnaženja substrata z NH_4F med 50 in 300 mg kg^{-1}. Kopriva izrašča, raste in je sposobna razmnoževanja (cvetenje) tudi pri stopnji onesnaženja substrata z NH_4F 600 mg kg^{-1}, kar kaže na možnost uporabe koprive kot pasivnega bioindikatorja.
- Največ fluora se je akumuliralo v listih (110–235 mg kg^{-1}), manj v koreninah (60–217 mg kg^{-1}), najmanj pa v steblih (15–43 mg kg^{-1}). Vsebnosti fluora v listih, koreninah in steblih, glede na stopnjo onesnaženja s fluorom se najbolj prilegajo polinomu pete stopnje.
- Določene vsebnosti fluora v listih in koreninah koprive so bile do 19-krat višje od vsebnosti fluora v rastlinah, ki ne privzemajo fluora in primerljive oziroma višje od vsebnosti fluora v večini rastlin, ki lahko privzemajo in akumulirajo fluor.
- Kopriva je akumulator fluora. Pri vseh stopnjah onesnaženja substrata z NH_4F

sta oba, bioakmulacijski faktor in translokacijski faktor, višja od 1 (BAF > 4,7 in TF > 1,4).

- Kopriva ima visok potencial za fitoekstrakcijo. Iz enega hektara zemlje je mogoče z uporabo kopriv odstraniti 0,36–0,77 kg fluora, ki se akumulira v nadzemnih delih rastline. Masa odstranjenega fluora predstavlja tisti delež fluora, ki je v zemlji naravno prisoten v obliki fluorida.

6 Zahvale

Najprej se želim globoko zahvaliti moj zlati mentorici Maji Ponikvar-Svet, ki me je vpeljala v svet fluora, ter me podrobneje seznanila z analizno kemijo in samim raziskovalnim delom. Zahvaljujem se ji za tisočere napotke, nasvete in pripombe pri izvedbi laboratorijskega dela, ter za vso pomoč pri pisanju tako strokovne literature kot doktorske disertacije.

Velika zahvala gre tudi vsem sodelavcem odseka K1, še posebej Gašperju Tavčar za vse koristne pogovore, pa tudi za prijazno kritiko in vzbodbudo. Posebna zahvala gre tudi Miri Zupančič, ki mi je s svojimi nasveti v laboratoriju olajšala marsikatero delo, mi pri vsem pomagala, obenem pa skrbela tudi za dobro vzdušje v laboratoriju.

Zahvaljujem se članom komisije prof. dr. Mileni Horvat, prof. dr. Venčeslavu Kaučič, ter prof. dr. Borisu Žemva za hitro in korektno opravljeno delo.

Zahvaljujem se tudi Javni agenciji za raziskovalno dejavnost (ARRS), ki je omogočila finančno podporo študija.

Največja zahvala pa gre seveda vsem domačim. Zahvaljujem se za razumevanje, neomajno podporo in spodbudo, še posebej v težkih trenutkih. Posebna zahvala gre možu Davidu, ki me je v vsem neomajno podpiral, ter mojima sončkoma Luciji in Adamu za vso potpežljivost.

Nazadnje se želim zahvaliti še vsem ostalim prijateljem in bljižnim, ki ste bili z mano v trenutkih uspehov in razočaranj v preteklih letih. Vesela in ponosna sem, da lahko to delim z vami.

7 Literatura in viri

2002/32/EC, E. d. (2002). *European commision of the European parliament and of the concil of 7th May 2002 on undesirable substances in animal feed (OJ L 140, 30.5.2002, p. 10)*. Brussels: European Commission.

2005/87/EC, E. D. (2005). *European commission directive of 5 December 2005 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed as regards lead, fluorine and cadmium*. Brussels: Official Journal of the European Union.

Adriano, D. C., & Donner, H. E. (1982). Bromine, chlorine in fluorine. In A. L. Page, R. H. Miller & D. R. Keeney (Eds.), *Methods of soil analyses, part 2: Chemical and microbiological properties*. Madison: American Society of Agronomy.

Agalakova, N. I., & Gusev, G. P. (2012). Molecular mechanisms of cytotoxicity and apoptosis induced by inorganic fluoride. *ISRN Cell Biology*. 1–16.

Álvarez-Ayuso, E., Giménez, A., & Ballesteros, J. C. (2011). Fluoride accumulation by plants grown in acid soils amended with flue gas desulphurisation gypsum. *Journal of Hazardous Materials, 192*(3), 1659–1666.

Alvarez, P. J., & Illman, W. A. (2005). *Bioremediation and natural attenuation: Process fundamentals and mathematical models*. New Jersy: John Wiley & Sons.

Andersson, L. H., & Gelin, B. (1967a). The separation of fluorine by Wilard-Winter destillation and its determination by titration with thorium nitrate or by spectrophotometric measurement. *FOA Reports, 1*, 1–5

Andersson, L. H., & Gelin, B. (1967b). Separation of fluorine by Willard-Winter distillation and its determination by titration with thorium nitrate or by spectrophotometric measurement. *FOA Reports*(1), 1–5.

Aoba, T., & Fejerskov, O. (2002). Dental fluorosis: chemistry and biology. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 13*(2), 155–170

Arndt, U., Nobel, W., & Schweizer, B. (1987). *Bioindikatoren: Möglichkeiten, Grenzen und neue Erkenntnisse*. Stuttgart: Ulmer.

Arnesen, A. K. M. (1997). Availability of fluoride to plants grown in contaminated soils. *Plant and Soil, 191*(1), 13–25.

Arnesen, A. K. M., Abrahamsen, G., Sandvik, G., & Krogstad, T. (1995). Aluminium-smelters and fluoride pollution of soil and soil solution in Norway. *Science of The Total Environment, 163*(1–3), 39–53.

Arnesen, A. K. M., & Krogstad, T. (1998). Sorption and desorption of fluoride in soil polluted from the aluminium smelter at Årdal in Western Norway. *Water, Air, and Soil Pollution, 103*(1–4), 357–373.

Asada, M., Parkpian, P., & Horiuchi, S. (2006). Remediation technology for boron and fluoride contaminated sediments using green plants. *Contaminated Sediments: Evaluation and Remediation Techniques*, 304–310.

Atkins, P., & Jones, L. (2008). *Chemical Principles*. New York: W. H. Freeman.

ATSDR. (1993). Toxicology profile for fluorides, hydrogen fluoride and fluorine. Atlanta: U. S. Department of Health and Human Services.

ATSDR. (2003). Toxicology profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine. Atlanta: U. S. Department of Health and Human Services.

Baelum, V., Fejerskov, O., Manji, F., & Larsen, M. J. (1987). Daily dose of fluoride and dental fluorosis. *Tandlaegebladet, 91*(10), 452–456.

Bailey, P. L. (1980). *Analysis with ion-selective electrodes* (2nd ed. Vol. 5). London: Heyden.

Baker, A. J. M., & Brooks, R. R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery., 1*(2), 81–126.

Barbier, O., Arreola-Mendoza, L., & Del Razo, L. M. (2010). Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, *188*(2), 319–333.

Bar-Yosef, B., & Rosenberg, R. (1988). Response of corn and tomato plants to fluorine concentration in solution culture. *Agronomy journal, 80*(2), 173–177.

Barnhart, W. E., Hiller, L. K., Leonard, G. J., & Michaels, S. E. (1974). Dentifrice usage and ingestion among four age groups. *Journal of dental research, 53*(6), 1317–1322.

Barrow, N. J., & Ellis, A. S. (1986). Testing a mechanistic model. III. The effects of pH on fluoride retention by a soil. *Journal of Soil Science, 37*(2), 287–293.

Bayón, M. M., Garcia, A. R., Alonso, J. I. G., & Sanz-Medel, A. (1999). Indirect determination of trace amounts of fluoride in natural waters by ion chromatography: a comparison of on-line post-column fluorimetry and ICP-MS detectors. *Analyst, 124*(1), 27–31.

Berns, E. G., & van Der Zwaan, P. W. (1972). The pyrohydrolytic determination of fluoride. *Analytica Chimica Acta, 59*(2), 293–297.

Bertrand, G. (1912). On the role of trace substances in agriculture. Eighth international congres of applied chemistry, 28, 30–40.

Bock, R. (1979). *A Handbook of decomposition methods in analytical chemistry*. London: Blackie Group.

Borsdorf, W. (1960). Beiträge zur Fluorschadendiagnostik. *Journal of Phytopathology, 38*(3), 309–315.

Bower, C. A., & Hatcher, J. T. (1967). Adsorption of fluoride by soils and minerals. *Soil Science, 103*(3), 151–154.

Braen, S. N., & Weinstein, L. H. (1985). Uptake of fluoride and aluminum by plants grown in contaminated soils. *Water, Air and Soil Pollution, 24*(2), 215–223.

Brenčič, J., Lazarini, F., & Žot, J. (1997). *Splošna in anorganska kemija za gimnazije, strokovne in tehniške šole*. Ljubljana: DZS.

Brennan, E. G., Leone, I. A., & Daines, R. H. (1950). Fluorine toxicity in tomato as modified by alterations in the nitrogen, calcium, and phosphorus nutrition of the plant. *Plant physiology, 25*(4), 736–747.

Brewer, R. F. (1965). Fluorine. In C. A. Black (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Madison, WI, USA: ASA and SSSA.

Burt, B. A. (1992). The changing patterns of systemic fluoride intake. *Journal of dental research, 71*(5), 1228–1237.

Cabrera, C., Artacho, R., & Giménez, R. (2006). Beneficial effects of green tea - a review. *Journal of the American College of Nutrition, 25*(2), 79–99.

Cai, H.-m., Peng, C.-y., Chen, J., Hou, R.-y., Gao, H.-j., & Wan, X.-c. (2014). X-ray photoelectron spectroscopy surface analysis of fluoride stress in tea (*Camellia sinensis* L.) leaves. *Journal of Fluorine Chemistry, 158*, 11–15.

Cao, J., Bai, X., Zhao, Y., Liu, J., Zhou, D., Fang, S., . . . Wu, J. (1996). The relationship of fluorosis and brick tea drinking in Chinese Tibetans. *Environmental health perspectives, 104*(12), 1340–1343.

Cao, J., Liu, J., Zhao, Y., Qu, H., Danzeng, S., Da, W., & Guan, Y. (2004). Fluoride in newer tea commodities. *Fluoride, 37*(4), 296–300.

Cao, J., Zhan, Y., & Liu, J. (2001). Processing procedures of brick tea and their influence on fluorine content. *Food and Chemical Toxicology, 39*(9), 959–962.

Cao, J., Zhao, Y., Li, Y., Deng, H. J., Yi, J., & Liu, J. W. (2006). Fluoride levels in various black tea commodities: Measurement and safety evaluation. *Food and Chemical Toxicology, 44*(7), 1131–1137.

Cao, J., Zhao, Y., & Liu, J. (1997). Brick tea consumption as the cause of dental fluorosis among children from Mongol, Kazak and Yugu populations in China. *Food and Chemical Toxicology, 35*(8), 827–833.

Cao, J., Zhao, Y., Liu, J., Xirao, R., Danzeng, S., Daji, D., & Yan, Y. (2003). Brick tea fluoride as a main source of adult fluorosis. *Food and Chemical Toxicology, 41*(4), 535–542.

Cao, J., Zhao, Y., Liu, J. W., Bai, X. S., Zhou, D. Y., Fang, S. L., . . . Wu, J. S. (1995). Research on fluorosis caused by drinking brick tea in Sichuan Province. *Chinese Journal of Tea Science, 17*, 35–38.

Carr, M. K. V., & Stephens, W. (1992). Climate, weather and the yield of tea. In K. C. Wilson & M. N. Clifford (Eds.), *Tea, cultivation to consumption* (pp. 87–135). London: Chapman & Hall.

Chacko, S. M., Thambi, P. T., Kuttan, R., & Nishigaki, I. (2010). Beneficial effects of green tea: a literature review. *Chinese Medicine, 5*, 1– 9.

Chan, C. C. (1978). *Detailed record of Guangdong province*. Hong Kong: Tin De Press.

Chaney, R. L. (1983). *Plant uptake of inorganic waste constituents.* New Jork: Noyes Data Corporation.

Chaudhri, M. A., Nadeem, Q., Chaudhri, M. N., & Jabbar, Q. (2007). Application of prompt activation analysis in the determination of fluorine in tea, in international geochemical standards, bones and teeth of experimental animals. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry, 271*(3), 697–700.

Cheng, K. K., Chalmers, I., & Sheldon, T. A. (2007). Controversy: Adding fluoride to water supplies. *British medical journal, 335*(7622), 699–702.

Cheng, T. P., Anderson, H. D., Mills, D. S., Spate, V. L., Baskett, C. K., & Morris, J. S. (1997). Determination of the fluoride distribution in rabbit bone using instrumental neutron activation analysis. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry, 217*(2), 171–174.

Chhabra, R., Singh, A., & Abrol, I. P. (1980). Fluorine in sodic soils. *Soil science society of America journal, 44*(1), 33–36.

Chiba, K., Tsunoda, K., Haraguchi, H., & Fuwa, K. (1980). Determination of fluorine in urine and blood serum by aluminum monofluoride molecular absorption spectrometry and with a fluoride ion-selective electrode. *Analytical Chemistry, 52*(11), 1582–1585.

Clements, R. L., Sergeant, G. A., & Webb, P. J. (1971). The determination of fluorine in rocks and minerals by a pyrohydrolytic method. *Analyst, 96*(1138), 51–54.

Cobo, G., Gomez, M., Camara, C., & Palacios, M. A. (1993). Determination of fluoride in complex liquid matrices by electrothermal atomic absorption spectrometry with in-furnace oxygen-assisted ashing. *Microchimica Acta, 110*(1–3), 103–110.

Codling, E. E., & Rutto, K. L. (2014). Stinging nettle (*Urtica Dioica* L.) growth and mineral uptake from lead-arsenate contaminated orchard soils. *Journal of Plant Nutrition, 37*(3), 393–405.

Coleman, P., Mascarenhas, R., & Rumsby, P. (2005). A review of the toxicity and environmental behaviour of hydrogen fluoride in air (pp. 60). Bristol: Environment Agency.

Council, E. (1998). Directive 98/83/EC. The Quality of Water Intended for Human Consumption. *Official Journal of the European Communities L, 330*, 5–12.

Crosby, N. T., Dennis, A. L., & Stevens, J. G. (1968). An evaluation of some methods for the determination of fluoride in potable waters and other aqueous solutions. *Analyst, 93*(1111), 643–652.

Dässler, H. G., & Grumbach, H. (1967). Schaden an Obst durch Industrieabgase. *Obstbau, 3*, 59–69.

Davies, Worthington, H. V., Ellwood, R. P., Bentley, E. M., Blinkhorn, A. S., Taylor, G. O., & Davies, R. M. (2002). A randomised controlled trial of the effectiveness of providing free fluoride toothpaste from the age of 12 months on reducing caries in 5-6-year-old children. *Community dental health, 19*(3), 131–136.

Davies, F. (1982). Accumulation of fluoride by *Xanthoria parietina* growing in the vicinity of the bedfordshire brickfields. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological, 29*(3), 189–196.

Davies, F. (1986). The long-term changes in fluoride content of *Xanthoria parientina* growing in the vicinity of the bedfordshire brickfields. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological, 42*(3), 201–207.

Davis, W. L. (1972). Ambient air fluorides in Salt Lake Country. *Rocky Mountain medical journal, 69*(12), 53–56.

Davison, A. W., Takmaz-Nisancioglu, S., & Bailey, I. F. (1985). The dynamics of fluoride accumulation by vegetation. *Fluoride Toxicity, 46*, 30–46.

Davison, A. W., & Weinstein, L. H. (2006). Some problems relating to fluorides in the environment; effects on plants and animals. In A. Tressaud (Ed.), *Fluorine and The Environment: Atmospheric chemistry, emissions, & Litosphere* (pp. 251–300). Amsterdam: Elsevier.

del Socorro Santos-Díaz, M., Zamora-Pedraza, C., & Potosí, S. L. (2010). Fluoride removal from water by plant species that are tolerant and highly tolerant to hydrogen fluoride. *Fluoride, 43*, 150–156.

Denzinger, H. F., König, H. J., & Krüger, G. E. (1979). Fluorine recovery in the fertilizer industry – a review. *Phosphorus & Potassium*(103), 33–39

Devey, P. J. (1989). Potentiometric determination of fluoride in coal ores and slags after direct fusion. *Analytica Chimica Acta, 219*, 335–338.

Dressler, V. L., Pozebon, D., Flores, É. L. M., Paniz, J. N. G., & Flores, É. M. M. (2002). Potentiometric determination of fluoride in geological and biological samples following pyrohydrolytic decomposition. *Analytica Chimica Acta, 466*(1), 117–123.

DRI. (1997). *Dietary reference intakes (DRI): for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride*. Washington: National Academies Press.

Dushenkov, S. (2003). Trends in phytoremediation of radionuclides. *Plant and Soil, 249*(1), 167–175.

Dushenkov, S., Kumar, P. B. A. N., Motto, H., & Raskin, I. (1995). Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental science & technology, 29*(5), 1239–1245.

Edwards, S. C., MacLeod, C. L., & Lester, J. N. (1998). The bioavailability of copper and mercury to the common nettle (*Urtica Dioica*) and the earthworm E*isenia fetida* from contaminated dredge soil. *Water, Air and Soil Pollution, 102*(1-2), 75–90.

EFSA. (2005). Opinion of the scientific panel in dietetic products, Nutrition and allergies on a request from the commission related to the tolerable upper intake level of fluoride. *EFSA journal*, 1–65.

EFSA. (2013). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fluoride. *EFSA journal, 11*(8), 3332.

Ellenberg, H., Weber, H. E., Düll, R., Wirth, V., Werner, W., & Paulißen, D. (1991). Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa. *Scripta Geobotanica, 18*(1), 1–248.

Emekli-Alturfan, E., Yarat, A., & Akyuz, S. (2009). Fluoride levels in various black tea, herbal and fruit infusions consumed in Turkey. *Food and Chemical Toxicology, 47*(7), 1495–1498. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.03.036

Esala, S., Vuori, E., & Niinistö, L. (1983). Determination of nanogram amounts of fluorine in breast milk by ashing-diffusion method and the fluoride electrode. *Microchimica Acta, 79*(1–2), 155–165.

EVM. (2001). Covering note from EVM/01/3/P – Review of fluoride. London: Expert Group on Vitamins and Minerals.

Eyde, B. (1982). Determination of fluoride in plant material with a ione-selective electrode. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie, 311*(1), 19–22.

Eyde, B. (1983). Determination of acid soluble fluoride in soils by means of an ion-selective electrode. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie, 316*(3), 299–301.

Fabbri, B., & Donati, F. (1981). Sample fusion at low temperature for the potentiometric determination of fluorine in silicate materials. *Analyst, 106*(1269), 1338–1341.

Fein, N. J., & Cerklewski, F. L. (2001). Fluoride content of foods made with mechanically separated chicken. Journal of agricultural and food chemistry, 49(9), 4284–4286.

Fejerskov, O., Stephen, K. W., Richards, A., & Speirs, R. (1987). Combined effect of systemic and topical fluoride treatments on human deciduous teeth - case studies. *Caries research, 21*(5), 452–459.

Field, A. C., & Purves, D. (1964). *Intake of soil by grazing sheep.* Paper presented at the Proceedings of the Nutrition Society.

Fornasiero, R. B. (2001). Phytotoxic effects of fluorides. *Plant Science, 161*(5), 979–985.

Fornasiero, R. B. (2003). Fluorides effects on *Hypericum perforatum* plants: first field observations. *Plant Science, 165*(3), 507–513.

Frant, M. S., & Ross, J. W. (1966). Electrode for sensing fluoride ion activity in solution. *Science, 154*(3756), 1553–1555.

Frant, M. S., & Ross, J. W. (1968). Use of total ionic strength adjustment buffer for electrode determination of fluoride in water supplies. *Analytical Chemistry, 4*, 1169–1171.

Franzaring, J., Klumpp, A., & Fangmeier, A. (2007). Active biomonitoring of airborne fluoride near an HF producing factory using standardised grass cultures. *Atmospheric Evironment, 41*(23), 4828–4840.

Freytag, J. (1986). Bestimmung von Transferfaktoren Boden/Pflanze einiger Elemente und Untersuchungen über Deren Abhängigkeit von Ausgewählten Bodeneigenschatten. *Hamburger Bodenkundliche Arbeiten, 1*, 43–51.

Fuge, R., & Andrews, M. J. (1988). Fluorine in the UK environment. *Environmental Geochemistry and Health, 10*(3–4), 96–104.

Fung, K. F., Zhang, Z. Q., Wong, J. W. C., & Wong, M. H. (1999). Fluoride contents in tea and soil from tea plantations and the release of fluoride into tea liquor during infusion. *Environmental Pollution, 104*(2), 197–205.

Galloway, H. L., Shoaf, R. E., & Skaggs, C. H. (1975). A rapid method for the determination of fluoride in vegetation. *The American Industrial Hygiene Association Journal, 36*(10), 721–724.

Gehlhausen, J. M., & Carnahan, J. W. (1989). Determination of aqueous fluoride with a helium microwave-induced plasma and flow injection analysis. *Analytical Chemistry, 61*(7), 674–677.

Ghosh, M., & Singh, S. P. (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Asian journal of energy and environment, 6*(4), 214–231.

Gjorgieva, D., Kadifkova-Panovska, T., Bačeva, K., & Stafilov, T. (2011). Assessment of heavy metal pollution in Republic of Macedonia using a plant assay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 60*(2), 233–240.

Greenwood, N. N., & Earnshaw, A. (1997). *Chemistry of the elements* (2nd ed.). Oxford: Elsevier Ltd.

Grewal, M. S., Kumar, A., & Kuhad, M. S. (1996). Spatial variation of fluorine in an Indo-Gangetic alluvial plain of India. *Fluoride, 29*(3), 166–174.

Grobbelaar, N., & Marion Meyer, J. J. (1990). Fluoroacetate production by *Dichapetalum cymosum*. *Journal of Plant Physiology, 135*(5), 550–553.

Grobler, S. R., & Louw, A. J. (1998). A new microwave acid digestion bomb method for the determination of total fluorine. *Caries research, 32*(5), 378–384.

GTM-24. (2007). Test method for the determinatio of pH value of water or soil by pH meter, Geotechnical test method: New York State Department of Transportation.

Guanghan, L., Qiongling, W., Xiaogang, W., Tong, Z., & Xin, Y. (1999). Polarographic determination of trace fluoride in foods. *Food Chemistry, 66*(4), 519–523.

Haidouti, C. (1991). Fluoride distribution in soils in the vicinity of a point emission source in Greece. *Geoderma, 49*(1–2), 129-138.

Haldimann, M., & Zimmerli, B. (1993). Evaluation of ashing procedures for the gas chromatographic determination of flouride in biological material. *Analytica Chimica Acta, 282*(3), 589–601.

Hamilton, I. R. (1990). Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *Journal of dental research, 69*, 660–667.

Hargreaves, J. A., Ingram, G. S., & Wagg, B. J. (1972). A gravimetric study of the ingestion of toothpaste by children. *Caries research, 6*(3), 237–243.

Healy, W. B. (1967). *Ingestion of soil by sheep.* Paper presented at the Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production.

Healy, W. B. (1968). Ingestion of soil by dairy cows. *New Zealand Journal of Agricultural Research, 11*(2), 487–499.

Healy, W. B., & Drew, K. R. (1970). Ingestion of soil by hoggets grazing swedes. *New Zealand Journal of Agricultural Research, 13*(4), 940–944.

Healy, W. B., & Ludwig, T. G. (1965). Wear of sheep's teeth: I. The role of ingested soil. *New Zealand Journal of Agricultural Research, 8*(4), 737–752.

Henry, J. R. (2000). Overview of the phytoremediation of lead and mercury *NNEMS Report* (pp. 3–9). Washington: EPA.

Higdon, J. V., & Frei, B. (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43*(1), 89–143.

Horntvedt, R. (1995). Fluoride uptake in conifers related to emissions from aluminium smelters in Norway. *Science of The Total Environment, 163*(1), 35–37.

Horntvedt, R. (1997). Accumulation of airborne fluorides in forest trees and vegetation. *European Journal of Forest Pathology, 27*(2), 73–82.

Horowitz, H. S. (1989). Fluoride and enamel defects. *Advances in dental research, 3*(2), 143–146.

Inkielewicz, I., & Krechniak, J. (2003). Fluoride content in soft tissues and urine of rats exposed to sodium fluoride in drinking water. *Fluoride, 36*(4), 263–266.

Iyengar, G. V., Kollmer, W. E., & Bowen, H. J. M. (1978). *The elemental composition of human tissues and body fluids: a compilation of values for adults*: Vch Pub.

Jha, S. K., Nayak, A. K., & Sharma, Y. K. (2008). Response of spinach (*Spinacea oleracea*) to the added fluoride in an alkaline soil. *Food and Chemical Toxicology, 46*(9), 2968–2971.

Jha, S. K., Nayak, A. K., & Sharma, Y. K. (2009). Fluoride toxicity effects in onion

(*Allium cepa* L.) grown in contaminated soils. *Chemosphere, 76*(3), 353–356.

Jha, S. K., Nayak, A. K., Sharma, Y. K., Mishra, V. K., & Sharma, D. K. (2008). Fluoride accumulation in soil and vegetation in the vicinity of brick fields. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 80*, 369–373.

Johnson, J. E. H., Kearns, A. E., Doran, P. M., Khoo, T. K., & Wermers, R. A. (2007). Fluoride-related bone disease associated with habitual tea consumption. *Mayo Clinic Proceedings, 82*, 719–724.

Jurdi, M., Said, D. A., & Al Kouatly Kambris, M. (2001). Decision to fluoridate. 1. Fluoride levels in herbal teas used in Lebanese communities. *Food Nutrition Bulletin, 22*(1), 62–66.

Kabata-Pendias, A. (2001). *Trace Elements in Soils and Plants* (3 ed.). New York: CRC Press.

Kamaluddin, M., & Zwiazek, J. J. (2003). Fluoride inhibits root water transport and affects leaf expansion and gas exchange in aspen (*Populus tremuloides*) seedlings. *Physiologia plantarum, 117*(3), 368–375.

Kaminsky, L. S., Mahoney, M. C., Leach, J., Melius, J., & Miller, M. J. (1990). Fluoride: benefits and risks of exposure. *Critical review in oral biology and medicine, 4*(1), 261–281.

Kang, D.-H., Tsao, D., Wang-Cahill, F., Rock, S., Schwab, A. P., & Banks, M. K. (2008). Assessment of landfill leachate volume and concentrations of cyanide and fluoride during phytoremediation. *Bioremediation Journal, 12*(1), 32–45.

Keller, T. H. (1980). The simultaneous effect of soil-borne NaF and air pollutant SO_2 on CO_2-uptake and pollutant accumulation. *Oecologia, 44*(2), 283–285.

Khan, K. S., & Joergensen, R. G. (2006). Decomposition of heavy metal contaminated nettles (*Urtica dioica* L.) in soils subjected to heavy metal pollution by river sediments. *Chemosphere, 65*(6), 981–987.

Khan, K. S., & Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life sciences, 81*(7), 519–533.

Kidd, E. A. M., Thylstrup, A., Fejerskov, O., & Bruun, C. (1980). Influence of fluoride in surface enamel and degree of dental fluorosis on caries development in vitro. *Caries research, 14*(4), 196–202.

Kierdorf, U., & Kierdorf, H. (2000). The fluoride content of antlers as an Indicator of fluoride exposure in red deer (*Cervus elaphus*): A historical biomonitoring study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 38*(1), 121–127.

Kjellevold, M., Bjorvatn, K., & Julshamn, K. (2001). Determination of fluoride in food by the use of alkali fusion and fluoride ion-selective electrode. *Food Chemistry, 73*(3), 373–379.

Klockow, D., Auffarth, J., & Kopp, C. (1977). A catalytic-kinetic method for the determination of traces of fluoride in biological material. *Analytica Chimica Acta, 89*(1), 37–46.

Klumpp, A., Domingos, M., & Pignata, M. L. (2000). Air pollution and vegetation damage in South America–state of knowledge and perspectives. In S. B. Agrawal & M. Agrawal (Eds.), *Environmental Pollution and Plant Responses* (pp. 111–136). New York: Lewis Publishers/CRC Press

Koblar, A., Tavčar, G., & Ponikvar-Svet, M. (2011). Effects of airborne fluoride on soil and vegetation. *Journal of Fluorine Chemistry, 132*(10), 755–759.

Krishnamachari, K. A. V. R. (1987). Fluorine. In W. Mertz (Ed.), *Trace Elements in Human and Animal Nutrition* (Vol. 1, pp. 365–415). Salt Lake City: Academic Press.

Kuroda, Y., & Hara, Y. (1999). Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 436*(1), 69–97.

Larsen, S., & Widdowson, A. E. (1971). Soil fluorine. *Journal of Soil Science, 22*(2), 210–221.

Levaggi, D. A., Oyung, W., & Feldstein, M. (1971). Microdetermination of fluoride in vegetation by oxygen bomb combustion and fluoride ion electrode analysis. *Journal of the Air Pollution Control Association, 21*(5), 277–279.

Lichtenthaler, H. K. (1998). The stress concept in plants: An introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences, 851*(1), 187–198.

Loganathan, P., Hedley, M. J., Wallace, G. C., & Roberts, A. H. C. (2001). Fluoride accumulation in pasture forages and soils following long-term applications of phosphorus fertilisers. *Environmental Pollution, 115*(2), 275–282.

Lorenzini, G. (2000). Composti del fluoro. In E.-E. agricole (Ed.), *Le piante e l'inquinamento dell'aria* (pp. 177–195). Bologna: Springer Milan.

Lori, J. A. (1987). *Determination of some essential minerals in the source soil and two cultivars of white yam (Discrorea rotundata).* (M. Sc. Thesis), Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria.

Low, P. S., & Bloom, H. (1988). Atmospheric deposition of fluoride in the lower Tamar Valley, Tasmania. *Atmospheric Environment, 22*(9), 2049–2056.

Lu, Y., Guo, W. F., & Yang, X. Q. (2004). Fluoride content in tea and its relationship with tea quality. *Journal of agricultural and food chemistry, 52*(14), 4472–4476.

Machoy, Z., Dabkowska, E., & Nowicka, W. (1991). Increased fluoride content in mandibular bones of deer living in industrialised regions of Poland. *Environmental Geochemistry and Health, 13*(3), 161–163.

Mackowiak, C. L., Grossl, P. R., & Bugbee, B. G. (2003). Biogeochemistry of fluoride in a plant–solution system. *Journal of environmental quality, 32*(6), 2230–2237.

MacLean, D. C., Hansen, K. S., & Schneider, R. E. (1992). Amelioration of aluminium toxicity in wheat by fluoride. *New Phytologist, 121*(1), 81–88.

Malinowska, E., Inkielewicz, I., Czarnowski, W., & Szefer, P. (2008). Assessment of fluoride concentration and daily intake by human from tea and herbal infusions. *Food and Chemical Toxicology, 46*(3), 1055–1061.

Manzoori, J. L., & Miyazaki, A. (1990). Indirect inductively coupled plasma atomic emission determination of fluoride in water samples by flow injection solvent extraction. *Analytical Chemistry, 62*(22), 2457–2460.

Marcos, J., & Townshend, A. (1995). Fluoride determination by its inhibitory effect on immobilised liver esterase. *Analytica Chimica Acta, 310*(1), 173–180.

Marshall, E. (1990). The fluoride debate: one more time. *Science, 247*(4940), 276–277.

Marthaler, T. M. (2005). Overview of salt fluoridation in Switzerland since 1955, a short history. *Schweiz Monatsschr Zahnmed, 115*(8), 651–655.

McGrath, S. P., & Zhao, F. J. (2003). Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology, 14*(3), 277–282.

McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2002). The role of tea in human health: an update. *Journal of the American College of Nutrition, 21*(1), 1–13.

Michigami, Y., Kuroda, Y., Ueda, K., & Yamamoto, Y. (1993). Determination of urinary fluoride by ion chromatography. *Analytica Chimica Acta, 274*(2), 299–302.

Miller, G. W. (1992). The effect of fluoride on higher plants with special emphasis on early physiological and biochemical disorders. *Fluoride, 26*(1), 3–22.

Miller, G. W., Yu, M. H., & Pushnik, J. C. (1983). Basic metabolic and physiologic effects of fluorides on vegetation. *Fluorides. Effects on vegetation, animals and humans*, 83–104.

Müller, M., Anke, M., & Illing-Günther, H. (1998). Aluminium in foodstuffs. *Food Chemistry, 61*(4), 419–428.

Murphy, A. P., Coudert, M., & Barker, J. (2000). Plants as biomarkers for monitoring

heavy metal contaminants on landfill sites using sequential extraction and inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometry (ICP-AES). *Journal of Environmental Monitoring, 2*(6), 621–627.

Naccache, H., Simard, P. L., Trahan, L., Demers, M., Lapointe, C., & Brodeur, J.-M. (1990). Variability in the ingestion of toothpaste by preschool children. *Caries research, 24*(5), 359–363.

Nagata, T., Hayatsu, M., & Kosuge, N. (1993). Aluminium kinetics in the tea plant using ^{27}Al and ^{19}F NMR. *Phytochemistry, 32*(4), 771–775.

Nardozzi, M. J., & Lewis, L. L. (1961). Pyrolitic separation and determniation of fluoride in raw materials. *Analytical Chemistry, 33*, 1261–1264.

Newbrun, E. (1992). Current regulations and recommendations concerning water fluoridation, fluoride supplements, and topical fluoride agents. *Journal of dental research, 71*(5), 1255–1265.

Newman, A. C. D. (1968). A simple aparatus for separating fluorine from alumosilicates by pyrohydrolysis. *Analyst, 93*, 827–831.

neznan. (1994). The Norwegian aluminium industry and the local environment. Oslo: Aluminiumindustries Miljøsekretariat.

Nicholson, K., & Duff, E. J. (1981). Rapid sample pre-treatment for removal of aluminium from aqueous solutions prior to fluoride determination using a fluoride-selective electrode. *Analyst, 106*(1265), 904–906.

Notten, M. J. M., Oosthoek, A. J. P., Rozema, J., & Aerts, R. (2005). Heavy metal concentrations in a soil–plant–snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environmental Pollution, 138*(1), 178–190.

O'Donnell, T. A. (1975). *Comprehensive inorganic chemistry* (1st ed. Vol. 5). Oxford: Pergamon Press.

O'Hagan, D., Perry, R., Lock, J. M., Meyer, J. J., Dasaradhi, L., Hamilton, J. T. G., & Harper, D. B. (1993). High levels of monofluoroacetate in *Dichapetalum braunii*. *Phytochemistry, 33*(5), 1043–1045.

Omueti, J. A. I., & Jones, R. L. (1977). Fluoride absorption by illinois soils. *Journal of Soil Science, 28*(4), 564–572.

Orion. (1999). Instruction manual: Model 94-09, 96-09 fluoride/fluoride combination electrode. Witchford: Orion Research.

Otte, M. L., & Wijte, A. H. B. M. (1993). Environmental variation between habitats and uptake of heavy metals by *Urtica dioica*. *Environmental Monitoring and Assessment, 28*(3), 263–275.

Paik, D. I., Ma, D. S., Park, D. Y., Moon, H. S., Chang, Y. I., & Kim, J. B. (1997). Determination of fluorine by PIGE analysis on bovine tooth enamel treated with bamboo salt SMFP toothpaste and fluoride mouth rinsing solution. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry, 217*(2), 221–223.

Parry, M. A. J., Schmidt, C. N. G., & Gutteridge, S. (1984). Inhibition of ribulose-P2 carboxylase/oxygenase by fluoride. *Journal of experimental botany, 35*(8), 1177–1181.

Peek, D. C., & Volk, V. V. (1985). Fluoride sorption and desorption in soils. *Soil science society of America journal, 49*(3), 583–586.

Perkins, D. F., & Millar, R. O. (1987). Effects of airborne fluoride emissions near an aluminium works in Wales: Part 1—Corticolous lichens growing on broadleaved trees. *Environmental Pollution, 47*(1), 63–78.

Perkins, D. F., Millar, R. O., & Neep, P. E. (1980). Accumulation of airborne fluoride by lichens in the vicinity of an aluminium reduction plant. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological, 21*(2), 155–168.

Peters, M. A., & Ladd, D. M. (1971). Determination of fluoride in oxides with the

fluoride-ion activity electrode. *Talanta*, *18*(7), 655–664.
Pickering, W. F. (1985). The mobility of soluble fluoride in soils. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, *9*(4), 281–308.
Pietzka, G., & Ehrlich, P. (1953). Fluor-Bestimmung mit Destillation als H_2SiF_6 unter Kreislaufführung des Wassers. *Angewandte Chemie*, *65*(5), 131–135.
Pihlar, B. (2011). Instrumentalna analiza; Voltametrija. Retrieved maj 2011, from http://abra.fkkt.uni-lj.si/pihlar/Voltametrija.pdf
Polomski, J., Flühler, H., & Blaser, P. (1982). Accumulation of airborne fluoride in soils. *Journal of environmental quality*, *11*(3), 457–461.
Ponikvar, M. (2008). Exposure of humans to fluorine and its assessment. In A. Tressaud & G. Haufe (Eds.), *Fluorine & Health: Molecular Imaging, Biomedical Materials and Pharmaceuticals* (pp. 488–549). Amsterdam: Elsevier.
Ponikvar, M., & Liebman, J. (2006). Paradoxes and paradigms: Observations on pyrohydrolytic decomposition of fluorine-containg materials and accompanying thermochemistry. *Structural Chemistry*, *17*(1), 75–78.
Ponikvar, M., Pihlar, B., & Žemva, B. (2002). Potentiometric determination of antimony in metal(II) hexafluoroantimonates(V). *Talanta*, *58*(4), 803–810.
Ponikvar, M., Stibilj, V., & Žemva, B. (2007). Daily dietary intake of fluoride by Slovenian Military based on analysis of total fluorine in total diet samples using fluoride ion selective electrode. *Food Chemistry*, *103*(2), 369–374.
Posthumus, A. C. (1983). Higher plants as indicators and accumulators of gaseous air pollution. *Environmental Monitoring and Assessment*, *3*, 263–272.
Quin, J. I., & Clark, R. (1947). Studies on the action of potassium monofluoroacetate, CH_2FCOOK; *Dichapetalum cymosum*. *The Onderstepoort journal of veterinary science and animal industry*, *22*(1), 77.
Ramagopal, S., Welkie, G. W., & Moller, G. W. (1969). Fluoride injury of wheat roots and calcium nutrition. *Plant and Cell Physiology*, *10*(3), 675–685.
Rathore, S. (1992). Effect of fluoride toxicity on leaf area, net assimilation rate and relative growth rate of *Hordeum vulgare* and *Zea mays*. *Fluoride*, *25*(4), 175–182.
Rice, T. D. (1983). Gravimetric standard additions in ion-selective electrode potentiometry with application to fluoride measurements. *Analytica Chimica Acta*, *151*(0), 383–389.
Richards, A., & Banting, D. W. (1996). Fluoride toothpaste. In B. A. Burt, J. Ekstrand & O. Fejerskov (Eds.), *Fluoride in Dentistry* (2nd ed., pp. 328–346). Copenhagen: Munksgaard.
Rocha, R. A., de la Fuente, B., Clemente, M. J., Ruiz, A., Vélez, D., & Devesa, V. (2013). Factors affecting the bioaccessibility of fluoride from seafood products. *Food and Chemical Toxicology*, *59*, 104–110.
Rocha, R. A., Rojas, D., Clemente, M. a. J. s., Ruiz, A., Devesa, V., & Vélez, D. (2013a). Quantification of Fluoride in Food by Microwave Acid Digestion and Fluoride Ion-Selective Electrode. *Journal of agricultural and food chemistry*, *61*(45), 10708–10713.
Rocha, R. A., Rojas, D., Clemente, M. J., Ruiz, A., Devesa, V., & Vélez, D. (2013b). Quantification of fluoride in food by microwave acid digestion and fluoride ion-selective electrode. *Journal of agricultural and food chemistry*, *61*, 10708–10713.
Ruan, J., Ma, L., Shi, Y., & Han, W. (2003). Uptake of fluoride by tea plant (*Camellia sinensis* L) and the impact of aluminium. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, *83*(13), 1342–1348.
Ruan, J., Ma, L., Shi, Y., & Han, W. (2004). The impact of pH and calcium on the uptake of fluoride by tea plants (*Camellia sinensis* L.). *Annals of Botany*, *93*(1), 97–105.
Ruan, J., & Wong, M. H. (2001). Accumulation of fluoride and aluminium related to

different varieties of tea plant. *Environmental Geochemistry and Health*, *23*(1), 53–63.

Sager, M. (1987). Rapid determination of fluorine in solid samples. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, *118*(1), 25–29.

Saini, P., Khan, S., Baunthiyal, M., & Sharma, V. (2012). Organ-wise accumulation of fluoride in Prosopis juliflora and its potential for phytoremediation of fluoride contaminated soil, *Chemosphere*, 89(5), 633–635.

Salt, D. E., Blaylock, M., Kumar, N. P. B. A., Dushenkov, V., Ensley, B. D., Chet, I., & Raskin, I. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Nature Biotechnology*, *13*(5), 468–474.

Salt, D. E., Smith, R. D., & Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annual review of plant biology*, *49*(1), 643–668.

SCHER. (2010). SCHER pre-consultation opinion on critical review of any new evidence on the hazard profile, health effects, and human exposure to fluoride and the fluoridating agents of drinking water (pp. 55).

Shams, K. M., Tichy, G., Fischer, A., Sager, M., Peer, T., Bashar, A., & Filip, K. (2010). Aspects of phytoremediation for chromium contaminated sites using common plants *Urtica dioica, Brassica napus* and *Zea mays*. *Plant and Soil*, *328*(1–2), 175–189.

Sharma, P., & Pandey, S. (2014). Status of Phytoremediation in World Scenario. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, *2*(4), 178–191.

Shu, W. S., Zhang, Z. Q., Lan, C. Y., & Wong, M. H. (2003). Fluoride and aluminium concentrations of tea plants and tea products from Sichuan province, PR China. *Chemosphere*, *52*(9), 1475–1482.

Shupe, J. L., & Olson, A. E. (1983). Clinical and pathological aspects of fluoride toxicosis in animals *Fluorides–effects on vegetation, animals and humans* (pp. 319–338). Salt Lake City: Paragon Press.

Sidhu, S. S. (1976). A summer of vegetation recovery near a phosphorus plant, Long Harbour, Newfoundland. *Notes*, *32*, 16–17.

Sikora, E. J., & Chappelka, A. H. (1996). Air pollution damage to plants *Report ANR-913* (pp. 84–91): Auburn University.

Simard, P. L., Lachapelle, D., Trahan, L., Naccache, H., Demers, M., & Brodeur, J. M. (1988). The ingestion of fluoride dentifrice by young children. *ASDC journal of dentistry for children*, *56*(3), 177–181.

Singer, L., & Armstrong, W. D. (1959). Determination of fluoride in blood serum. *Analytical Chemistry*, *31*(1), 105–109.

Singer, L., & Ophaug, R. H. (1977). Determination of fluorine in blood plasma. *Analytical Chemistry*, *49*(1), 38–40.

Singer, L., & Ophaug, R. H. (1986). Determination of fluoride in foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, *34*(3), 510–513.

Singer, L., Ophaug, R. H., & Harland, B. F. (1980). Fluoride intakes of young male adults in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *33*(2), 328–332.

Skjelkvåle, B. L. (1994). Water chemistry in areas with high deposition of fluoride. *Science of The Total Environment*, *152*(2), 105–112.

Smith, G. E. (1985). A surfeit of fluoride? *Science progress*, *69*(275), 429–442.

Stevens, D. P., & McLaughlin, M. J. (1999). Risk assessment of soil fluoride ingestion by cattle. *Proceedings of the 5th Conference on the biochemistry of trace elements*, 856–857.

Stevens, D. P., McLaughlin, M. J., & Alston, A. M. (1998a). Phytotoxicity of hydrogen fluoride and fluoroborate and their uptake from solution culture by *Lycopersicon*

esculentum and *Avena sativa*. *Plant and Soil, 200*(2), 175–184.

Stevens, D. P., McLaughlin, M. J., & Alston, A. M. (1998b). Phytotoxicity of the fluoride ion and its uptake from solution culture by *Avena sativa* and *Lycopersicon esculentum*. *Plant and Soil, 200*(2), 119–129.

Stevens, D. P., McLaughlin, M. J., Randall, P. J., & Keerthisinghe, G. (2000). Effect of fluoride supply on fluoride concentrations in five pasture species: Levels required to reach phytotoxic or potentially zootoxic concentrations in plant tissue. *Plant and Soil, 227*(1–2), 223–233.

Subhashini, V., Swamy, A. V. V. S., & Krishna, R. H. (2013). Pot experiment: To study the uptake of zinc by different plant species in artificially contaminated soil. *World Journal of Environmental Engineering, 1*(2), 27–33.

Symonds, R. B., Rose, W. I., & Reed, M. H. (1988). Contribution of Cl^- and F^- bearing gases to the atmosphere by volcanoes. *Nature, 334*(6181), 415–418.

Ščančar, J., Stibilj, V., & Milačič, R. (2004). Determination of aluminium in Slovenian foodstuffs and its leachability from aluminium-cookware. *Food Chemistry, 85*(1), 151–157.

Takmaz-Nisancioglu, S., & Davison, A. W. (1988). Effects of aluminium on fluoride uptake by plants. *New Phytologist, 109*(2), 149–155.

Tannock, J. (1975). Determination of monofluoraceatate in *Dichapetalum cymosum* (Hook). *Rhodesia, Zambia and Malawi journal of agricultural research, 13*, 67–70.

Taves, D. R. (1983). Dietary intake of fluoride flashed (total fluoride) vs. unashed (inorganic fluoride) analysis of individual foods. *British journal of nutrition, 49*(3), 295–301.

Taylor, K. (2009). Biological flora of the British Isles: *Urtica dioica* L. *Journal of Ecology, 97*(6), 1436–1458.

Telesiński, A., Śnioszek, M., Smolik, B., Malinowska, K., Mikiciuk, M., Cichocka, J., & Zakrzewska, H. (2011). Fluoride uptake in hydroponic culture by different clones of basket willow, *Salix Viminalis* L. *Fluoride, 44*, 255–259.

Thomas, J., & Gluskoter, H. J. (1974). Determination of fluoride in coal with the fluoride ion-selective electrode. *Analytical Chemistry, 46*(9), 1321–1323.

Tsunoda, K., Fujiwara, K., & Fuwa, K. (1977). Subnanogram fluorine determination by aluminum monofluoride molecular absorption spectrometry. *Analytical Chemistry, 49*(13), 2035–2039.

Underwood, E. J., & Mertz, W. (1987). Introduction. In W. Mertz (Ed.), *Trace Elements in Human and Animal Nutrition* (5 ed., Vol. 1, pp. 1–19). San Diego: Academic Press.

USDA. (2005). USDA National fluoride database of selected beverages and foods, Release 2 Maryland: Nutrition Data Laboratory, Beltsville Human Research Centre, Agriculture Research service, United States department of agriculture.

Venkateswarlu, P. (1975). Determination of total fluorine in serum and other biological materials by oxygen bomb and reverse extraction techniques. *Analytical biochemistry, 68*(2), 512–521.

Vickery, B., & Vickery, M. L. (1972). Fluoride metabolism in *Dichapetalum toxicarium*. *Phytochemistry, 11*(6), 1905–1909.

Vike, E. (1999). Air-pollutant dispersal patterns and vegetation damage in the vicinity of three aluminium smelters in Norway. *Science of The Total Environment, 236*(1–3), 75–90.

Vike, E. (2005). Uptake, deposition and wash off of fluoride and aluminium in plant foliage in the vicinity of an aluminium smelter in norway. *Water, Air and Soil Pollution, 160*(1–4), 145–159.

Wade, M. A., & Yamamura, S. S. (1965). Microdetermination of fluoride using an improved distillation procedure. *Analytical Chemistry, 37*(10), 1276–1278.

Wang-Cahill, F., & Fields, K. (2007). *Investigation of fluoride distribution in deciduous trees at a hazardous waste landfill.* Paper presented at the The Annual International Conference on Soils, Sediments and Water, University of Massachusetts Amherst

Wang, J., & Grabarić, B. S. (1990). Application of adsorptive stripping voltammetry for indirect measurement of nonelectroactive ions using competitive complex formation reactions. *Microchimica Acta, 100*(1-2), 31–40.

Warf, J. C., Cline, W. D., & Tevebaugh, R. D. (1954). Pyrohydrolysis in determination of fluoride and other halides. *Analytical Chemistry, 26*(2), 342–346.

Weinstein, L. H., & Alscher-Herman, R. (1982). Physiological responses of plants to fluorine. In M. H. Unsworth & D. P. Ormrod (Eds.), *Effects of gaseous air pollutants in agriculture and horticulture* (pp. 139–167). London: Butterworths.

Weinstein, L. H., & Davison, A. W. (2003). Native plant species suitable as bioindicators and biomonitors for airborne fluoride. *Environmental Pollution, 125*(1), 3–11.

Weinstein, L. H., & Davison, A. W. (2004). *Fluorides in the environment*. Cambridge: CABI.

Weinstein, L. H., Davison, A. W., & Arndt, U. (1999). Fluoride. In R. B. Flagler (Ed.), *Recognition of air pollution injury to vegetation* (pp. 41–427). Pittsburgh: A Pictorial Atlas, Air and Waste Management Association.

Wenzel, W. W., & Blum, W. E. H. (1992). Fluorine speciation and mobility in F^- contaminated soils. *Soil Science, 153*(5), 357–364.

Whitford, G. M. (1987). Fluoride in dental products: safety considerations. *Journal of dental research, 66*(5), 1056–1060.

WHO. (1994). Fluorides and oral health *WHO Technical report series 846*. Geneva: Expert comittee on oral health status and fluoride use.

WHO. (1996). Trace elements that are probably essential: Fluoride. In WHO (Ed.), *Trace elements in human nutrition and health* (Vol. B, pp. 187–194). Geneva.

WHO. (2002). Environmental Health Criteria, Fluorides. Geneva: WHO.

WHO. (2006). *Fluoride in drinking-water* (1 ed.). London: IWA Publishing.

WHO. (2009). *Milk fluoridation for the prevention of dental caries*. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

WHO/FAO/IAEA. (1996). *Trace elements in human nutrition and health*. Geneva: WHO.

Willard, H. H., & Winter, O. B. (1933). Volumetric method for determination of fluorine. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition, 5*(1), 7–10.

Willson, K. C. (1999). *Coffee, cocoa and tea*. New York: CABI International.

Wong, M. H., Fung, K. F., & Carr, H. P. (2003). Aluminium and fluoride contents of tea, with emphasis on brick tea and their health implications. *Toxicology Letters, 137*(1), 111–120.

Wu, C., & Wei, G. X. (2002). Tea as a functional food for oral health. *Nutrition, 18*(5), 443–444.

Xie, Z., Chen, Z., Sun, W., Guo, X., & Yin, B. (2007). Distribution of aluminum and fluoride in tea plant and soil of tea garden in Central and Southwest China. *Chinese Geographical Science, 17*(4), 376–382.

Xie, Z., Chen, Z., Sun, W., Guo, X., YYin, B., & Wang, J. (2007). Distribution of fluoride and aluminum in tea and soil of tea garden in Central and Southwest China. *Chinese Geographical Science, 17*, 376–382.

Yamamoto, T., Juneja, L. R., Chu, D. C., & Kim, M. (1997). *Chemistry and applications of green tea*. Boca Raton: CRC Press.

Yang, S. F., & Miller, G. W. (1963). Biochemical studies on the effect of fluoride on

higher plants. 1. Metabolism of carbohydrates, organic acids and amino acids. *Biochemical Journal, 88*(3), 505–509.

Yu, M.-H., & Miller, G. W. (1967). Effect of fluoride on the respiration of leaves from higher plants. *Plant and Cell Physiology, 8*(3), 483–493.

Zhao, F. J., Lombi, E., & McGrath, S. P. (2003). Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil, 249*(1), 37–43. doi: 10.1023/a:1022530217289

Zwiazek, J. J., & Shay, J. M. (1988a). The effects of sodium fluoride on cytoplasmic leakage and the lipid and fatty acid composition of jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings. *Canadian journal of botany, 66*(3), 535–541.

Zwiazek, J. J., & Shay, J. M. (1988b). Sodium fluoride induced metabolic changes in jack pine seedlings. I. Effect on gas exchange, water content, and carbohydrates. *Canadian Journal of Forest Research, 18*(10), 1305–1310.

Zwiazek, J. J., & Shay, J. M. (1988c). Sodium fluoride induced metabolic changes in jack pine seedlings. II. Effect on growth, acid phosphatase, cytokinins, and pools of soluble proteins, amino acids, and organic acids. *Canadian Journal of Forest Research, 18*(10), 1311–1317.

Bibliografija

Izvirni znanstveni članek

Koblar, A., Tavčar, G., Ponikvar-Svet, M.. Fluoride in teas of different types and forms and the exposure of humans to fluoride with tea and diet. (2012). *Food chemistrty, 130(2), 286–290*. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.07.037.

Koblar, A., Tavčar, G., Ponikvar-Svet, M.. Effects of airborne fluoride on soil and vegetation. (2011). *Journal of fluorine chemistry. 132(10), 755–759*, doi: 10.1016/j.jfluchem.2011.05.022.

Koblar, A., Tavčar, G., Ponikvar-Svet, M. (2015). Stress syndrome response of nettle (*Urtica dioica L.*) grown in fluoride contaminated substrate to fluoride and fluorine accumulation pattern. *Journal of fluorine chemistry, 172, 7–12*.

Poljudni članek

Koblar, A., Ponikvar-Svet, M. Fluor in človek. (maj 2013) *Gea, 23, 46–52*.

Koblar, A., Ponikvar-Svet, M. Prave čaje pijte zmerno, ne več kot štiri skodelice na dan. *Delo (Ljubljana), 12. april 2012, 54(85), str. 16.*

Objavljeni povzetki znanstvenih prispevki na konferencah

Koblar, A., Ponikvar-Svet, M. Interferences of aluminium ion on fluoride ion selective electrode determination of fluoride in tea infusions. V: Guzsvany, V. (ur.), Papp, Z. (ur.). 18th Young Investigators´ Seminar on Analytical Chemistry, YISAC 2011, Novi Sad, June 28th-July 1st, 2011. *Book of abstracts. Novi Sad: University of Novi Sad, 2011, str. 24.*

Koblar, A., Ponikvar-Svet, M. Spremljanje obremenjenosti okolja s fluorom. V: Priboščič, I. (ur.), Krnel, K. (ur.). 5. dan mladih raziskovalcev, Ljubljana, Februar 2011. [Program in povzetki]. *Ljubljana: Institut "Jožef Stefan", 2011, str. 13.*

Koblar, A., Ponikvar-Svet, M. Intake of fluoride with tea and diet. V: Trebše, P. (ur.), Petrič, M. (ur.), Lavtižar, V. (ur.). The 11th European Meeting on Environmental Chemistry - EMEC 11, Portorož, Slovenia, December 8-11, 2010. Book of abstracts. *Nova Gorica: University, 2010, str. 161*.

Koblar, A., Ponikvar-Svet, M. Fluoride intake with some teas available in Slovenia. V: Skapin, T. (ur.). 16th European Symposium on Fluorine Chemistry - ESFC, July 18-23, 2010, Ljubljana, Slovenia. [Book of abstracts]. *Ljubljana: Jožef Stefan Institute, 2010, str. 283.*

Koblar, A., Ponikvar-Svet, M. Fluor v pravih čajih, po katerih pogosto sežemo Slovenci. V: Kuščer, D. (ur.), Perc, B. (ur.). 4. Dan Mladih Raziskovalcev KMBO, Ljubljana, Slovenija, 11.2.2010. [Program in povzetki]. *Ljubljana: Institut "Jožef Stefan", 2010, str. 26.*

Kazalo slik

Slika 1: *Kroženje fluorida v naravi*; polne puščice predstavljajo neposreden vpliv, črtkane pa posreden. Slika povzeta po WHO (2002). 2
Slika 2: *Odziv na dnevni odmerek fluora*: Ocenjeno glede na specifične potrebe organizma, podano v mg fluora dan^{-1}. Slika povzeta po Bertrand (1912). 5
Slika 3: *Zobna fluoroza:* Fotografija dr. Hardy Limebacik in dr. Iain Pretty (dostop http://fluoridealert.org/issues/fluorosis/). 7
Slika 4: *Kostna fluoroza*: Prizadene tako otroke kot odrasle (dostop http://bestmeal.info/food/fluoridation.shtml). 8
Slika 5: *Vsebnost fluora in fluorida v nekaterih vrstah hrane*. Povprečne vrednosti so ocenjene iz rezultatov treh raziskav (Singer & Ophaug, 1986; Singer et al., 1980; Taves, 1983). 11
Slika 6: *Vrste čaja glede na obliko pakiranja, v kateri se prodajajo*. Spredaj sta čaj v razsulu in čaj v filter vrečki, zadaj pa čaj, stisnjen v opeko. 16
Slika 7: *Morfološke spremembe rastlin zaradi akumulacije fluora*: Nekroza na konicah razvijajočih se iglic bora, *Pinus contorta* (A), ter robna in medžilna kloroza listov *Eucalyptus globulus* (B) (Leonard. H. Weinstein & Davison, 2003) 19
Slika 8: *Shema kombinirane F-ISE* (Orion, model 96-09). 23
Slika 9: *Thermo, Orion model 96-09*. 30
Slika 10: *Nekateri izmed analiziranih komercialno dostopnih črnih, oolong, zelenih in pu'erh čajev*. 31
Slika 11: *Komercialno dostopni zeliščni čaji, izbrani za analizo* 33
Slika 12: *Roža vetrov za področje Ptuja*. Dostop http://meteo.arso.gov.si/uploads/probase/www/climate/table/sl/by_variable/wind/Ptuj.html. 34
Slika 13: *Mesta vzorčenja*. Na sliki so prikazana mesta vzorčenja v letu 2010 v okolici talilnice aluminija Talum d. d. na Kidričevem pri Ptuju. 35
Slika 14: *Shema poskusa*: priprava lončkov z onesnaženim substratom in zasaditev rastlin. 37
Slika 15: *Postopek priprave vzorcev na analizo*. 39
Slika 16: *Učinkovitost sproščanja fluora pri pripravi zaporednih poparkov različnih vrst čaja glede na stopnjo fermentacije* 47
Slika 17: *Učinkovitost sproščanja fluora pri pripravi zaporednih poparkov različnih vrst čaja glede na obliko pakiranja*. 48
Slika 18: *Vsebnost fluora oziroma fluorida v koprivi v odvisnosti od vsebnosti fluorida v zemlji* 56
Slika 19: *Učinek stopnje onesnaženja substrata z NH_4F na začetno in končno vsebnost fluorida v substratu.* Odkloni predstavljajo standardni odmik. 59

Slika 20: *Učinek stopnje onesnaženja substrata z NH4F na začetno in končno pH vrednost substrata*. Odkloni predstavljajo standardni odmik. 60
Slika 21: *Morfološke spremembe kot posledica akumulacije fluora v koprivi*; na sliki levo je vidno razbarvanje listov, desno pa nastanek rjavih lis. 61
Slika 22*: Faktor izrasti in faktor cvetenja koprive v odvisnosti od stopnje onesnaženja substrata z* NH_4F. 62
Slika 23: *Višina koprive in število listov ene koprive v odvisnosti od stopnje onesnaženja substrata z NH_4F*. Odkloni predstavljajo standardni odmik. 62
Slika 24: *Biomasa ene rastline v odvisnosti od stopnje onesnaženja substrata z NH_4F*. Odkloni predstavljajo standardni odmik. 63
Slika 25: *Odziv rastlin na stres z različnimi fazami rasti*; optimalna rast, odziv, faza odpornosti, faza preobremenitve in faze regeneracije ob odstranitvi stresorja (Lichtenthaler, 1998). 63
Slika 26: *Primerjava rastlin, ki so rasle na substratu brez dodanega NH_4F (levo) z rastlinami, ki so rasle na substratu, onesnaženem s 600 mg NH_4F kg^{-1} (desno)*. 65
Slika 27: *Vpliv vsebnosti fluorida v substratu ob koncu poskusa na delež fluora w(F) v listih, koreninah in steblih koprive ter prileganje vsebnosti polinomu tretje stopnje*. Odkloni predstavljajo standardni odmik. 66
Slika 28: *Vpliv vsebnosti fluorida v substratu ob koncu poskusa na maso fluora m(F) v listih, koreninah in steblih koprive ter prileganje vsebnosti polinomu tretje stopnje*. Odkloni predstavljajo standardni odmik. 66
Slika 29: *Vpliv dodanega NH_4F v substratu na TF in BAF vrednosti*. Odkloni predstavljajo standardni odmik. 69

Kazalo tabel

Tabela 1: *Fizikalne in kemijske lastnosti fluora*. ……1
Tabela 2: *Ocenjene vrednosti vnosa fluorida v človeško telo s pitjem vodovodne vode*. Ocenjene vrednosti se nanašajo na pubertetnike, starejše od 15 let, in odrasle osebe. ……...10
Tabela 3: *Vsebnost fluora v nekaterih rastlinah, ki lahko akumulirajo fluor*..……..14
Tabela 4: *Značilnosti različnih vrst čaja glede na obliko pakiranja*...……...17
Tabela 5: *Vrste čaja glede na stopnjo fermentacije*. Postopek pridelave določene vrste……...18
Tabela 6: *Podatki o analiziranih čajih* (vrsta čaja, tržno ime in blagovna znamka, izvor surovine, oblika, mesto nakupa).……...32
Tabela 7: *Zračna oddaljenost vzorčnih mest od talilnice aluminija Talum d. d.*…….....35
Tabela 8: *Lastnosti komercialno dostopnega substrata za setev in pikiranje* (Cvetal, Agroruše d. o. o.). …….....36
Tabela 9: *Rezultati določitev fluora v referenčnih materialih*. ……..42
Tabela 10: *Vsebnost fluora v čajnih listih različnih vrst čaja in vsebnost fluorida v čajnih poparkih pripravljenih z enkratnim oziroma ponavljajočim namakanjem.*….....44
Tabela 11: *Vpliv temperature vode in časa namakanja na učinkovitost sproščanja fluora iz zelenega čaja (SPAR)*. ……46
Tabela 12: *Ocenjen dnevni vnos fluora za odraslo osebo s pitjem čaja (5 skodelic), ter s pitjem čaja in s hrano*. Podana so območja povprečij. ……...……...50
Tabela 13: *Vsebnosti fluora v koruznih metlicah in listih koruze ter zemlji iz okolice Talum d. d. in v čistem okolju*. ……...……...51
Tabela 14: *Vsebnosti fluora v koruznih listih in fluora ter fluorida v zemlji v okolici Talum d. d. in v čistem okolju*…….....52
Tabela 15: *Vsebnosti fluora in fluorida v nekaterih komercialno dostopnih zeliščnih čajih*…….....53
Tabela 16: *Vzorčna mesta, vsebnosti fluora in fluorida v vzorcih zelišč, vsebnosti fluora in fluorida v zemlji ter* pH *zemlje*.……...…….54
Tabela 17: *Korelacijski koeficienti za posamezne pare spremenljivk*: $w(F)_{kopriva}$, $w(F^-)_{kopriva}$, $w(F)_{zemlja}$, $w(F^-)_{zemlja}$, pH_{zemlja} *in vpliv vetra*. …….....55
Tabela 18: *Vsebnosti fluora in fluorida ter pH vrednosti substrata na začetku poskusa in na koncu poskusa po zaključenem gojenju kopriv (po 75 dneh).*…….....58
Tabela 19: *Koeficienti polinomov tretje stopnje, ki opisujeta prileganje vsebnosti fluora v listih, koreninah in steblih).*…….....67
Tabela 20: Prevojne točke funkcij $w(F)_{rastlinski\ del} = f(w(F^-)_{substrat})$ in $m(F)_{rastlina} = f(w(F^-)_{substrat}$ ustrezne vsebnosti NH_4F v substratu …...…….....68