

Univerza
v Ljubljani
Veterinarska
fakulteta



Katarina Pavšič Vrtač

**ELEMENTI V SLEDOVIH V KRMI
NA OBMOČJU SLOVENIJE**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2017

Univerza
v Ljubljani
Veterinarska
fakulteta



Interdisciplinarni doktorski študijski program Varstvo okolja
veterinarska medicina

UDK: 636.2.084:636.085.5:631.81.095.337:577.118:543.2:543.51(497.4)(043.3)

Katarina Pavšič Vrtač, univ. dipl. kem.

**ELEMENTI V SLEDOVIH V KRMI
NA OBMOČJU SLOVENIJE**

Doktorska disertacija

TRACE ELEMENTS IN FEED IN SLOVENIA

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2017

Katarina Pavšič Vrtač

Elementi v sledovih v krmi na območju Slovenije

Delo je bilo opravljeno na Veterinarski fakulteti v Ljubljani, Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, Enota za okolje, prehrano, dobrobit in higieno živali.

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentorica: viš. znan. sod. dr. Gabrijela Tavčar Kalcher

Somentor: prof. dr. Janez Salobir

Izjava o delu:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in da nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Martin Dobeic

Član: prof. dr. Breda Jakovac Strajn

Član: prof. dr. Marjan Veber

IZVLEČEK

Ključne besede: krma – analize; prehrambene potrebe; elementi v sledovih – analize; mikrohranila – analize; tehnike analitične kemije; masna spektrometrija – metode; govedo; Slovenija

Elementi v sledovih v krmi so anorganske snovi, ki jih živali dobijo s krmo in so lahko za njih esencialni, nujni za rast in zdravje, lahko pa so neesencialni ali celo toksični. Namen raziskave je bil vpeljati analizne postopke za določanje izbranih mikro- in ultramikroelementov v krmi in pridobiti podatke o vsebnostih izbranih elementov v vzorcih travnih in koruznih silaž, odvzetih na treh pomembnih govedorejskih območjih v Sloveniji. V obrokih za govedo z dveh dodatnih območij, enega potencialno onesnaženega in enega potencialno neonesnaženega, smo ocenili prehranski vnos teh elementov in nevarnost pomanjkanja ali prekomernega vnosa pri govedu. Za preučevanje vsebnosti izbranih elementov v krmi smo vpeljali, optimizirali in validirali ustreerne analizne postopke za določanje naslednjih mikro- in ultramikroelementov: aluminij (Al), arzen (As), barij (Ba), berilij (Be), kadmij (Cd), krom (Cr), kobalt (Co), baker (Cu), bor (B), železo (Fe), svinec (Pb), litij (Li), mangan (Mn), živo srebro (Hg), molibden (Mo), nikelj (Ni), selen (Se), srebro (Ag), stroncij (Sr), kositer (Sn), antimon (Sb), vanadij (V), talij (Tl), titan (Ti) in cink (Zn). Zaradi nizkih vsebnosti nekaterih elementov v krmi smo uporabili najsodobnejšo tehniko indukcijsko sklopljene plazme z masno detekcijo (ICP-MS). Za pripravo vzorcev smo uporabili razklop v zaprtem mikrovalovnem sistemu z dušikovo kislino in vodikovim peroksidom. Vzorce 30 travnih in 30 koruznih silaž smo analizirali in dobljene podatke statistično obdelali. Vsebnosti izbranih elementov so bile v obeh vrstah silaž v širokih koncentracijskih območjih, razen Tl v koruzni silaži, kjer so bili vsi rezultati pod mejo določanja. Statistično značilne razlike za travno in koruzno silažo iz treh različnih regij smo ugotovili za devet elementov. Pri primerjavi vzorcev travnih in koruznih silaž pa so se statistično značilne razlike pokazale pri 23 elementih. Za oceno dnevnih vnosov izbranih elementov smo na 12 kmetijah z dveh območij odvzeli 80 sestavin obrokov. Rezultati ocene vnosa kažejo, da bi moral govedo dobivati ustreerne mineralne dodatke. Najpomembnejša elementa, ki ju je treba dodajati, sta Cu in Se. Govedo, krmljeno s slovensko koruzno silažo, bi potrebovalo tudi dodatke Zn in Co. Zaradi različnih vsebnosti elementov v sledovih bi bilo treba za ustrezni izračun obrokov sestavine obrokov predhodno analizirati.

ABSTRACT

Key words: Animal feed – analysis; nutritional requirements; micronutrient – analysis; trace elements – analysis; chemistry techniques, analytical; mass spectrometry – methods; cattle; Slovenia

Trace elements are inorganic constituents of feed. They are either essential (necessary for the animal growth and health) or non-essential or even toxic. The purpose of the study was to introduce the analytical procedures for the determination of selected micro- and ultramicroelements in feed. Further it was intended to obtain information on the content of selected elements in samples of grass and maize silage from three important cattle-producing regions of Slovenia. From rations for cattle, sampled on farms in two different Slovenian regions, one contaminated and one uncontaminated, dietary intake of these elements and the risk of lack or excess intake in cattle, was assessed. To study the presence of selected elements, appropriate analytical procedures for the determination of the following micro- and ultramicroelements were established, optimised and validated: aluminium (Al), arsenic (As), barium (Ba), berilium (Be), cadmium (Cd), chromium (Cr), cobalt (Co), copper (Cu), boron (B), iron (Fe), lead (Pb), lithium (Li), manganese (Mn), mercury (Hg), molybdenum (Mo), nickel (Ni), selenium (Se), silver (Ag), strontium (Sr), tin (Sn), antimony (Sb), vanadium (V), thallium (Tl), titanium (Ti) and zinc (Zn). After closed-vessel microwave digestion, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was used to analyse samples. Grass silage and maize silage samples ($n = 30$ each) were analysed and statistically evaluated. The selected elements were found in both types of silage in a wide range of concentrations, with the exception of Tl in maize silage, where all results were below the limit of detection. Statistically significant differences were found for nine elements in grass and maize silage from three different regions and for 23 elements when comparing grass silage and maize silage. For the calculations of element intakes in animals, 80 components of meals for cattle were collected on 12 farms from two different Slovenian regions. The data suggest that cattle should receive mineral supplementation routinely. The most important trace elements needed are Cu and Se. Cattle fed Slovenian maize silage also should receive supplementary Zn and Co. To calculate the appropriate meals it would be necessary to analyse the ingredients of meals previously, due to the different levels of the trace elements in ingredients.

KAZALO

1	UVOD	13
2	PREGLED LITERATURE	17
2.1	ESENCIJALNOST ELEMENTOV	17
2.2	POTREBE PO ELEMENTIH V SLEDOVIH	18
2.3	VIRI ELEMENTOV V SLEDOVIH	19
2.4	VSEBNOSTI ELEMENTOV V SLEDOVIH V KRMI	19
2.5	TOKSIČNOST ELEMENTOV V SLEDOVIH	21
2.6	POMEN ELEMENTOV V SLEDOVIH V PREHRANI GOVEDI	22
2.6.1	Srebro	22
2.6.2	Aluminij	23
2.6.3	Arzen	23
2.6.4	Bor	24
2.6.5	Barij	25
2.6.6	Berilij	26
2.6.7	Kadmij	27
2.6.8	Kobalt	28
2.6.9	Krom	29
2.6.10	Baker	30
2.6.11	Železo	32
2.6.12	Živo srebro	33
2.6.13	Litij	33
2.6.14	Mangan	34
2.6.15	Molibden	35
2.6.16	Nikelj	36
2.6.17	Svinec	37
2.6.18	Antimon	38
2.6.19	Selen	39
2.6.20	Kositer	40
2.6.21	Stroncij	41
2.6.22	Titan	42
2.6.23	Talij	42
2.6.24	Vanadij	43
2.6.25	Cink	44

2.7	OBSTOJEČI KRITERIJI ZA ELEMENTE V OBROKIH ZA GOVEDO	46
2.8	TEHNIKE DOLOČANJA VSEBNOSTI ELEMENTOV.....	48
2.8.1	Priprava vzorcev	48
2.8.2	Induktivno sklopljena plazma z masno detekcijo (ICP-MS).....	49
2.8.2.1	Kolizijsko/reakcijske celice in ICP-MS	51
2.8.3	Obvladovanje interferenc	52
2.8.3.1	Spektralne interference	52
2.8.3.2	Nespektralne interference	54
2.8.3.3	Interference zaradi kisline.....	55
3	MATERIALI IN METODE	56
3.1	MATERIALI	56
3.1.1	Sestava obrokov v Mežiški dolini in v gorenjski regiji.....	56
3.2	METODE.....	58
3.2.1	Vzorčenje krme.....	58
3.2.1.1	Silaža v zaprtih silosih	58
3.2.1.2	Silaža v odprtih koritastih (horizontalnih) silosih.....	58
3.2.1.3	Silaža v balah	58
3.2.1.4	Seno in slama v balah	59
3.2.1.5	Seno iz kozolca	60
3.2.1.6	Pakirana krma	60
3.2.1.7	Priprava in shranjevanje vzorcev za analize	60
3.2.2	Določanje vlage in suhe snovi	60
3.2.2.1	Krma, razen žit.....	61
3.2.2.2	Žita	61
3.2.2.3	Krma z višjo vsebnostjo vlage	61
3.2.2.4	Interpretacija rezultatov	62
3.2.3	Mikrovalovni razklop vzorcev.....	63
3.2.3.1	Priprava vzorcev	63
3.2.4	Določanje elementov z ICP-MS	64
3.2.4.1	Priprava aparature in obvladovanje interferenc	67
3.3	VALIDACIJA ANALIZNEGA POSTOPKA	68
3.3.1	Linearnost umeritvenih krivulj, določanje LOD in LOQ	68
3.3.2	Ponovljivost analiznega postopka	68
3.3.3	Znotrajlaboratorijska obnovljivost	69

3.3.4	Izkoristek	69
3.3.5	Pravilnost.....	69
3.3.6	Merilna negotovost	69
3.3.7	Izračun rezultatov validacije.....	70
3.4	STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV	70
4	REZULTATI.....	72
4.1	REZULTATI VSEBNOSTI ELEMENTOV V VZORCIH SILAŽ	72
4.1.1	Rezultati vsebnosti elementov v silažah iz treh slovenskih regij	73
4.1.2	Rezultati vsebnosti elementov v silažah in senu iz MD in GR	75
4.1.3	Rezultati vsebnosti elementov v silažah iz petih izbranih regij.....	76
4.2	REZULTATI VSEBNOSTI ELEMENTOV V OBROKIH.....	78
4.2.1	Prispevki posameznih sestavin obrokov k vsebnosti elementov.....	79
4.2.2	Rezultati vsebnosti elementov v obrokih glede na potrebe	85
4.3	REZULTATI VALIDACIJE ANALIZNEGA POSTOPKA	87
5	RAZPRAVA	91
5.1	VSEBNOSTI ELEMENTOV V VZORCIH SILAŽ	91
5.1.1	Primerjava vsebnosti elementov v silažah s podatki z drugih območij	92
5.1.2	Primerjava vsebnosti elementov v silažah iz petih izbranih regij	96
5.2	VSEBNOSTI ELEMENTOV V OBROKIH	97
5.2.1	Doprinos posameznih sestavin k vsebnosti elementov v obrokih	99
5.2.2	Ocena obrokov glede na kriterije	100
5.2.3	Izpostavljenost goveda toksičnim elementom.....	103
5.3	VPELJAVA IN VALIDACIJA ANALIZNEGA POSTOPKA.....	103
6.	SKLEPI	107
7	POVZETEK	110
8	SUMMARY	112
9	ZAHVALE	114
10	LITERATURA	116

KAZALO TABEL

Tabela 1: Obstojeci kriteriji za posamezne elemente v obrokih za govedo	47
Table 1: Existing criteria for individual elements in cattle meals	47
Tabela 2: Shema vzorčenja glede na regije	56
Table 2: Scheme of sampling according to regions.....	56
Tabela 3: Sestava obrokov na posameznih kmetijah v gorenjski regiji in Mežiški dolini ..	57
Table 3: The ingredients of the meals on individual farms from Gorenjska region and Mežica valley	57
Tabela 4: Program mikrovalovnega razklopa.....	64
Table 4: Microwave digestion program.....	64
Tabela 5: Instrumentalni pogoji delovanja ICP-MS.....	67
Table 5: Instrumental operating conditions for ICP-MS	67
Tabela 6: Vsebnosti elementov v vzorcih travne (n = 30) in koruzne silaže (n = 30) ^a	72
Table 6: Values of elements in samples of grass silage and maize silage (n = 30 each) ^a	72
Tabela 7: Mediane vsebnosti in p-vrednosti za vsebnosti elementov v silažah po regijah ^a ..	74
Table 7: Medians and p-values of elements in samples of silage according to region ^a ...	74
Tabela 8: Mediane vsebnosti in p-vrednosti za elemente v silažah in senu iz MD in GR ^a ..	75
Table 8: Medians and p-values of elements in samples of silage and hay from MD and GR ^a	75
Tabela 9: Vsebnosti elementov v obrokih za govedo ^a	78
Table 9: Contents of elements in meals for cattle ^a	78
Tabela 10: Vsebnosti elementov v obrokih za govedo glede na potrebe ^a	86
Table 10: Contents of elements in meals for cattle according to requirements ^a	86
Tabela 11: Rezultati testa linearnosti ter določitev LOD in LOQ	88
Table 11: Results of linearity test and the determination of LOD and LOQ.....	88
Tabela 12: Rezultati ponovljivosti, obnovljivosti in pravilnosti za ERM-CD 281	89
Table 12: Results of repeatability, reproducibility and trueness tests for ERM-CD 281	89
Tabela 13: Rezultati ponovljivosti, obnovljivosti in pravilnosti za SRM 1570a	89
Table 13: Results of repeatability, reproducibility and trueness tests for SRM 1570a....	89
Tabela 14: Rezultati ponovljivosti, obnovljivosti in pravilnosti za travno silažo	90
Table 14: Results of repeatability, reproducibility and trueness tests for grass silage	90

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz elementov, določanih v raziskavi (označeni z modro barvo).....	15
Figure 1: Elements, analyzed in the survey (marked in blue)	15
Slika 2: Govedo med krmljenjem.....	46
Figure 2: Cattle during feeding.....	46
Slika 3: Shematski prikaz nastanka plazme.....	50
Figure 3: Schematic presentation of the formation of the plasma	50
Slika 4: Poenostavljen prikaz sistema ICP-MS	51
Figure 4: A simplified view of the ICP-MS sistem	51
Slika 5: Primer CRI-modula za odpravo interferenc pri ICP-MS	52
Figure 5: An example of CRI module for interferences elimination in ICP-MS	52
Slika 6: Vpliv koncentracije HNO ₃ na signale različnih elementov	55
Figure 6: The influence of the HNO ₃ concentration on elements signal	55
Slika 7: Govedo in koritasti silos.....	59
Figure 7: Cattle and bunker silo.....	59
Slika 8: Mediane vsebnosti za posamezne elemente v travni silaži iz petih regij	76
Figure 8: Contents of elements in samples of grass silage according to five regions	76
Slika 9: Mediane vsebnosti za posamezne elemente v koruzni silaži iz petih regij	77
Figure 9: Medians of elements in samples of maize silage according to five regions.....	77
Slika 10: Prispevek posameznih sestavin k vsebnostim izbranih elementov v obrokih.....	85
Figure 10: The contribution of the individual components to the content of selected elements in the meals	85
Slika 11: Priprava vzorcev.....	87
Figure 11: Sample preparation.....	87

SEZNAM OKRAJŠAV

AAS	atomska absorpcijska spektrometrija
ABD	akutna berilijeva bolezen
CRI	kolizijsko/reakcijski modul
DRC	dinamična reakcijska celica
DKM	dopolnilna krmna mešanica
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane (ang. European Food Safety Authority)
ET-AAS	atomska absorpcijska spektrometrija z grafitno kiveto
EU	Evropska unija
FAAS	plamenska atomska absorpcijska spektrometrija
FEP	fluoriran etilen propilen
GR	gorenjska regija
ICP	induktivno sklopljena plazma
ICP-AES	atomska emisijska spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo
ICP-OES	optično emisijska spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo
ICP-MS	induktivno sklopljena plazma z masno detekcijo
IE	ionizacijska energija
LOD	meja zaznavanja (ang. limit of detection)
LOQ	meja vrednotenja (ang. limit of quantification)
MS	masni detektor
MC-ICPMS	multi kolektorski ICP-MS
MD	Mežiška dolina
MTL	najvišja dovoljena vsebnost elementa (ang. maximum tolerable levels)
MVD	mineralno-vitaminski dodatek
MW	mikrovalovni razklop
NRC	ang. National Research Council
PFA	perfluoroalkoksi teflon
PTFE	politetrafluoroetilen
Q-ICPMS	kvadrupolni ICP-MS
ROS	reaktivne kisikove spojine (ang. reactive oxygen species)
RSD	relativna standardna deviacija
S.E.M.	standardna napaka povprečja (ang. standard error of the mean)

SS

suha snov

TOF-ICPMS

"time of flight" ICP-MS

U

merilna negotovost (ang. measurement uncertainty)

UN

ultrazvočno razprševanje (ang. ultasonic nebulisation)

ZDA

Združene države Amerike

1 UVOD

Elementi v sledovih (ang. trace elements) so anorganske snovi, ki jih organizem potrebuje za rast, razvoj in proizvodnjo. Potrebne elemente živali dobijo s krmo, ki te elemente vsebuje ali pa so krmi dodani (1). Elementi v sledovih so lahko za živali esencialni, nujni za rast in zdravje, lahko pa so neesencialni in celo toksični. Elemente v sledovih glede na potrebe živali razdelimo na mikro- in ultramikroelemente. Vloge veliko ultramikroelementov še ne poznamo. Nekateri neesencialni mikro- in ultramikroelementi so lahko koristni za zdravje živali zaradi farmakoloških učinkov (2, 3). Med esencialnimi mikroelementi so za živalski organizem najpomembnejši železo (Fe), baker (Cu), cink (Zn), kobalt (Co), mangan (Mn) in selen (Se). So esencialne snovi, ki jih po količini in funkciji v organizmu živali lahko primerjamo z vitaminimi. Mikroelementi so praviloma deli ali aktivatorji encimov in encimskih sistemov v organizmu živali. Potrebe po elementih v obroku so odvisne od vrste in starosti živali ter vrste in količine proizvoda, ki ga živali zaužijejo. Pogosto prihaja do interakcij med posameznimi elementi v prebavi in presnovi. V obroku je treba upoštevati razmerja med posameznimi elementi, saj je pomembno, da jih živali dobijo dovolj, a ne preveč in v pravilnem razmerju. Če so elementi v pravilnem razmerju, se med seboj dopolnjujejo, če niso, pa postanejo antagonisti (1).

Mikroelementi so tisti elementi periodnega sistema, ki se pojavljajo v živalih in ljudeh v koncentracijah 50 mg/kg telesne mase ali manj. Potreba organizmov po mikroelementih, ki so esencialni za njihovo zdravje, je običajno reda velikosti mg na dan. Po letu 1980 pa se je v literaturi s področja prehrane pojavil izraz ultramikroelementi. Izraz, ki se pogosto uporablja za elemente z ocenjenimi prehranskimi potrebami manj kot 1 mg/kg na dan in manj kot 50 µg/kg v krmi za laboratorijske živali, bi bil lahko uporaben za najmanj 20 elementov. Eksperimentalni dokazi za esencialnost teh elementov se med seboj zelo razlikujejo (2).

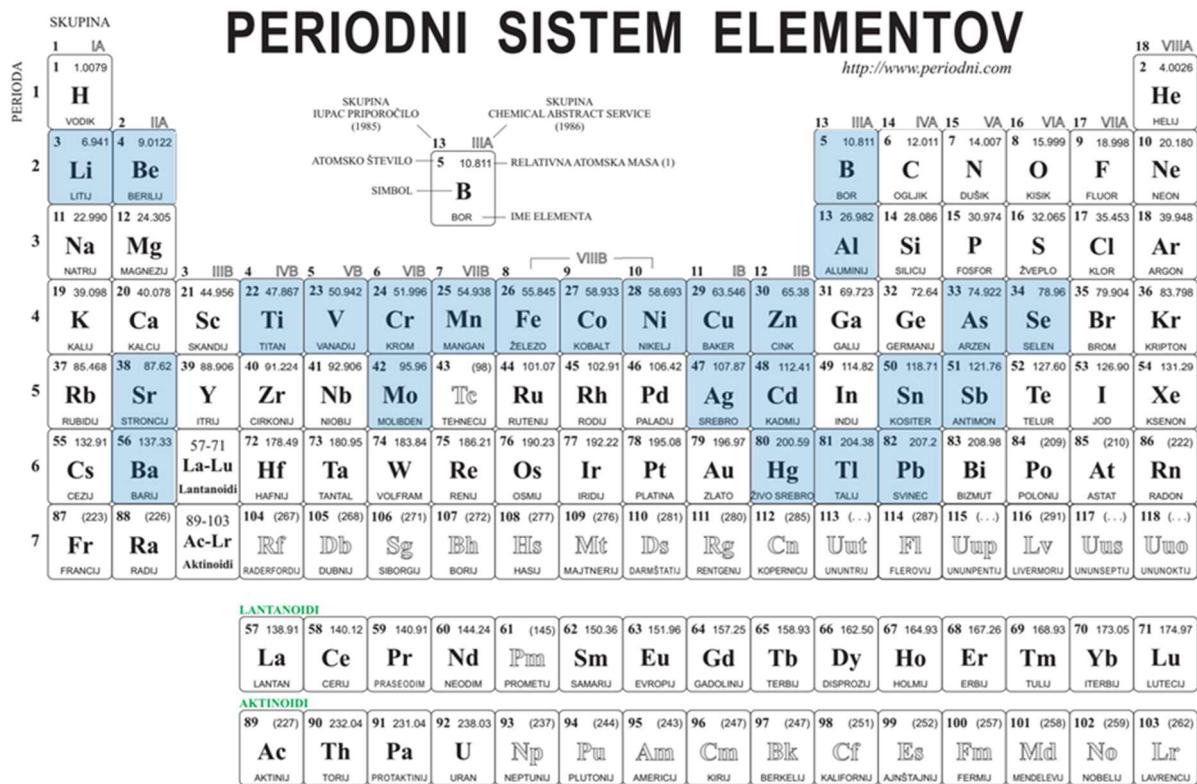
Pomanjkanje enega ali več elementov povzroči motnje v celični presnovi, ki se kažejo v subkliničnih spremembah funkcionalnega stanja organizma, v težjih primerih pa v klinično zaznavnih boleznih. Pri živalih se pri večini primerov pomanjkanja najprej zmanjša proizvodnost. Klinični znaki praviloma niso specifični, kažejo se kot lizavost, motnje v razvoju mladih živali, anemija, plodnostne motnje ter hujšanje. Vsi elementi pa postanejo toksični, če je njihov vnos v organizem prekomeren (1).

Previsoke vsebnosti mikroelementov in ultramikroelementov v krmnih mešanicah so predvsem posledica napak pri izdelavi krmnih mešanic in krmnih dodatkov ali se pa se to zgodi zaradi previsokih vsebnosti nekaterih mikroelementov v sestavinah krme, stranskih proizvodih industrije in odpadkih. Kadar je količina mikroelementov v krmi bistveno večja od fizioloških potreb, se lahko pojavijo zastrupitve ali motnje v izkoristku drugih elementov. Intoksikacije so najpogosteje pri tistih mikroelementih, kjer je razpon med normalno fiziološko količino in toksično količino zelo majhen (Se in Cu) (1).

Prenizke ali previsoke vsebnosti nekaterih mikroelementov in ultramikroelementov v voluminozni krmi so lahko posledica nizkih ali visokih vsebnosti v zemlji. Količina elementov, ki jih rastline absorbirajo, je odvisna od njihove vsebnosti v tleh, posledično pa se zaradi tega pojavi pomanjkanje ali toksičnost pri živalih, ki se z njimi prehranjujejo (4,5). Posledica previsokih vsebnosti toksičnih elementov v krmi je bioakumulacija v tkivih živali, s čimer potujejo po prehranjevalni verigi navzgor. S tem je ogroženo tudi zdravje človeka, ki je na koncu prehranjevalne verige (6–9).

Podatke o biološki vlogi mikro- in ultramikroelementov v živalskih tkivih, vsebnostih v krmi, tolerancah, metabolizmu in toksičnosti se še vedno zbira. Evropska agencija za varnost hrane (European Food Safety Authority, EFSA) je že dobila tehnično poročilo (3), v katerem so zbrani do zdaj znani znanstveni podatki o oblikah oziroma izvoru 27 izbranih mikro- in ultramikroelementov v prehrani živali v EU in zunaj EU (ZDA, Kanada, Mehika, Avstralija, Nova Zelandija, Japonska, Kitajska ...). Ti elementi so Al, As, Cd, Ce, Cr, Co, Cu, B, Br, F, J, Fe, La, Pb, Li, Mn, Hg, Mo, Ni, Rb, Se, Si, Ag, Sr, Sn, V in Zn. Še vedno je premalo podatkov, da bi lahko za nekatere od teh elementov določili tolerance, metabolizem in toksičnost za živali in ljudi (3).

Določanje vsebnosti esencialnih mikroelementov in makroelementov ter toksičnih elementov, katerih najvišja vsebnost je omejena z zakonodajo (Pb, Cd, As in Hg), se izvaja v okviru uradnega nadzora nad kakovostjo in zdravstveno ustreznostjo krme. V Sloveniji je bila opravljena raziskava onesnaženosti tal in rastlin za Cd, Zn, Pb, Cu, Ni, Cr, As in Hg v Celjski kotlini (10). Na vsebnost Zn, Cu, Cd, Pb, Ni in Cr so preiskali tudi vzorce slovenske hrane (11). Poleg tega je bila izdelana tudi ocena dostopnosti težkih kovin iz onesnaženih tal v Mežiški dolini (12).



Slika 1: Prikaz elementov, določanih v raziskavi (označeni z modro barvo) (13)

Figure 1: Elements, analyzed in the survey (marked in blue) (13)

Raziskave drugih mikro- in ultramikroelementov v krmnih mešanicah, posamičnih krmilih in silaži na območju Slovenije do zdaj še niso bile opravljene, predstavlja pa pomemben del pri poznavanju vsebnosti elementov in morebitne onesnaženosti krme s toksičnimi elementi oziroma osnovo za izračune vnosa posameznih elementov v živali. V ta namen smo vpeljali ustrezne analizne postopke za določanje naslednjih mikro- in ultramikroelementov: aluminij (Al), arzen (As), barij (Ba), berilij (Be), kadmij (Cd), krom (Cr), kobalt (Co), baker (Cu), bor (B), železo (Fe), svinec (Pb), litij (Li), mangan (Mn), živo srebro (Hg), molibden (Mo), nikelj (Ni), selen (Se), srebro (Ag), stroncij (Sr), kositer (Sn), antimon (Sb), vanadij (V), talij (Tl), titan (Ti) in cink (Zn), ki so prikazani na Sliki 1. Zaradi nizkih vsebnosti ultramikroelementov v krmi smo uporabili tehniko induksijsko skjene plazme z masno detekcijo (ICP-MS). Za pripravo vzorcev smo uporabili razklop v mikrovalovnem sistemu z dušikovo kislino in vodikovim peroksidom. Vpeljane in optimizirane analizne postopke

smo validirali in tako preverili njihovo ustreznost za določanje mikro- in ultramikroelementov v krmi.

V skladu z Uredbo Komisije (ES) št. 152/2009 o določitvi metod vzorčenja in analiznih metod za uradni nadzor krme (14) in njenem dopolnilu (15) smo vzorce koruznih in travnih silaž vzorčili na različnih območjih Slovenije. Za izračune vnosa elementov v živali smo na šestih kmetijah z vsakega od dveh območij, enega onesnaženega in enega neonesnaženega, vzorčili silaže, posamična krmila in krmne mešanice, ki jih na teh kmetijah krmijo. Dobljene podatke smo statistično obdelali.

Namen naše študije je bil vpeljati analizne postopke, ki nam omogočajo določanje izbranih mikro- in ultramikroelementov v dovolj nizkih koncentracijah, da lahko preučujemo njihove vsebnosti v vzorcih krme. Z analizo odvzetih vzorcev krme po Sloveniji smo dobili podatke o vsebnostih izbranih elementov v krmi in o morebitni onesnaženosti krme s toksičnimi elementi. Z opravljeno raziskavo smo pridobili podatke za elemente, za katere v Sloveniji do zdaj raziskave še niso bile opravljene in za katere v znanstveni literaturi ni podatkov o raziskavah vsebnostih v krmi za govedo (3). Zbrani podatki so nam omogočili izračune vnosa elementov v živali. Preverili smo tudi, ali vzorci glede vsebnosti elementov ustrezajo predpisom, kjer ti obstajajo, za preostale pa smo dobili reprezentativne podatke o vsebnostih v krmi, ki se uporablja v Sloveniji. Podatki o mikro- in ultramikroelementih v krmnih mešanicah, posamičnih krmilih in silaži bodo omogočili, da se izračuni vnosa posameznih elementov v živali uporabijo v praksi v zvezi s pridelavo in obdelavo ter uporabo krme. Pomenili bodo tudi osnova za izdelavo natančnejših prvih ocen tveganja in pripravo predpisov v zvezi z vsebnostjo kemijskih elementov v različnih vrstah krme, posamičnih krmilih in krmnih dodatkih.

V študiji smo preverili naslednje raziskovalne hipoteze:

- izbrani mikrovalovni razklop in uporabljeni tehnika ICP-MS sta ustrezena za določanje mikro- in ultramikroelementov v krmi,
- koncentracije mikro- in ultramikroelementov v krmi so odvisne od vrste in izvora krme,
- izmerjene koncentracije mikro- in ultramikroelementov v posamičnih krmilih omogočajo določitev prve ocene ozadja (background levels) v krmnih mešanicah.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 ESENCIJALNOST ELEMENTOV

Esencialne elemente glede na funkcijo delovanja razdelimo v štiri skupine (16):

- (a) Strukturna funkcija, kjer elementi tvorijo strukturne sestavine telesnih organov in tkiv. Elementi lahko prispevajo tudi k strukturni stabilnosti molekul in membran, ki jih sestavlajo.
- (b) Fiziološka funkcija, kjer se elementi pojavljajo v telesnih tekočinah in tkivih kot elektroliti, ki uravnavajo osmotski tlak, kislinsko-bazno ravnotežje, prepustnost in prenos živčnih impulzov skozi membrane.
- (c) Katalitična funkcija, kjer elementi delujejo kot katalizatorji pri encimih in v endokrinem sistemu, kot sestavne in specifične komponente metaloencimov in hormonov ali kot aktivatorji (koencimi) znotraj teh sistemov.
- (d) Regulacijska funkcija, kjer imajo elementi vlogo pri delitvi in diferenciaciji celic.

Za esencialnost elementov v sledovih je bilo predlaganih več definicij (17). Večina teh govori o naslednjih merilih: (a) esencialni element mora biti prisoten v živih organizmih; (b) sposoben mora biti reagirati z živimi sistemi; (c) posledica prehranskega pomanjkanja mora biti zmanjšanje biološke funkcije z optimalne na suboptimalno, ki jo lahko s fiziološkimi količinami potrebnega elementa preprečimo ali reverzibilno povrnemo (18). Zadnje zelo poudarja razlikovanje med znanstvenim pojmom "esencialen" in praktičnim izrazom "pomemben" element za zdravje živali ali ljudi. Resnost znakov pomanjkanja ni ključna za določitev esencialnosti elementa in ni nič več kot izraz stopnje pomanjkanja, ki ga lahko povzroči. Pomembnost elementa pa po drugi strani ocenjuje razmerje med potrebo posameznega elementa in njegovo navzočnostjo v hrani, vodi in zraku (19).

Dokaz, da je element esencialen za eno ali več različnih živalskih vrst, lahko služi kot osnova za ekstrapolacijo, da je element esencialen tudi za druge vrste, vključno s človekom. Ekstrapolacija nikakor ne kaže, da obstajajo dejanske s prehrano povezane težave v normalnih pogojih. Napačno pa bi bilo domnevati, da zaradi težav z določitvijo stopnje pomanjkanja teh elementov v sledovih takšne praktične težave ne obstajajo. Obstaječe

znanje o simptomatiki pomanjkanja elementov v sledovih, optimalnih potrebah in vplivu prehranskih interakcij na te potrebe je vsekakor nezadostno za izločitev pojavnosti s prehrano povezanih težav v praksi (18). Nekateri od teh elementov imajo tudi zdravstvene koristi, ki jih šele odkrivamo oziroma definiramo in so lahko tudi posledica še neprepoznanih esencialnih funkcij. Zavedanje teh koristi je lahko v pomoč pri pripravi smernic za spodbujanje zdravja in dobrega počutja živali (20).

Zaradi različnih definicij esencialnosti še vedno ni enotnega seznama esencialnih elementov. Glede na NRC (ang. National Research Council) je za govedo esencialnih naslednjih deset elementov: Cr, Co, Cu, I, Fe, Mn, Mo, Ni, Se in Zn. Da so esencialni za živali, je bilo ugotovljeno tudi za dodatnih pet elementov As, B, Pb, Si in V, vendar pa manjkajo dokazi za prehransko pomembnost pri govedu (21). Drugi raziskovalci so pripravili nekoliko drugačen seznam esencialnih elementov (za skoraj vse živalske vrste). Pri njih se je zaradi vključitve F, Li in Sn (22) oziroma zamenjave Sn in F, z B in Pb (23) število esencialnih elementov v sledovih povečalo na 18. Čeprav obstajajo razlike v pojmovanju, kateri elementi so esencialni, pa jih je mogoče enostavno razdeliti na dve podskupini; elemente, pri katerih je dokazano (16, 21), da so pomembni v prehrani pri govedu (Fe, I, Zn, Cu, Mn, Se in Co), in elemente, ki so potencialno pomembni, a še niso upoštevani kot praktično pomembni v prehrani domačih živali (Mo, Cr, Sn, V, F, Si, Ni in As) (23). Poleg tega so lahko nekateri elementi, kot so As, Cu, Li, Ag in Zn, tudi koristni kot terapevtiki ali promotorji rasti (24).

2.2 POTREBE PO ELEMENTIH V SLEDOVIH

Potrebe (ang. requirements) živali po elementih v sledovih so tiste količine elementov, ki v daljšem časovnem obdobju zagotavljajo ustrezne telesne zaloge elementov, optimalno proizvodnost (ustrezno izkoriščanje krme, prirast, proizvodnjo mleka, jajc, volne ...), normalno reprodukcijo in nemoteno zdravje živali (1).

Prehranske potrebe goveda so odvisne od presnovnih potreb, endogenih izgub in učinkovitosti absorpcije elementov (25) in od okolja, v katerem živijo. Čeprav čisto prave presnovne potrebe po elementih, kot so Cu, Mn in Zn, za govedo še vedno niso znane, pa so pripravljena priporočila za količino, ki jo je treba vključiti v obrok. Ta priporočila, ki so rezultat številnih raziskav in temeljijo na oceni endogenih izgub in razpoložljivosti, se redno

posodablja (21, 24). Če priporočila nehote ne dosegajo dejanskih potreb, se kot rezultat neustreznega dodajanja pojavita pomanjkanje in zmanjšanje učinkovitosti proizvodnje. Če so priporočila previsoka in dodane količine presegajo potrebe, prekomerno dopolnjevanje obrokov vodi tudi do prekomernega vnosa elementov v okolje prek iztrebkov goveda in s tem onesnaževanja okolja (21).

Potrebe živali po elementih se lahko izrazi na različne načine: ali v zahtevani količini na dan ali na enoto proizvoda, kot so mleko, jajca ali pridobivanje telesne mase. Lahko jih izrazimo z razmerjem, v odstotkih (%), v delih na milijon (ppm) ozziroma kot maso ali mol (včasih mikro- ali milimol) elementa na kg suhe snovi obroka ali morda najbolj natančno na MJ zaužite energije oz. MJ energijskih potreb. Njenostavneje je uporabiti kriterij, ki določa količino potrebnega elementa v enoti suhe snovi obroka (g/kg SS ali mg/kg SS) (16).

2.3 VIRI ELEMENTOV V SLEDOVIH

Govedo običajno večino elementov dobi iz voluminozne krme. Na vnos elementov vplivajo dejavniki, ki določajo vsebnost elementov v rastlinah in njihovih semenih. Vsebnosti vseh elementov v rastlinah so v veliki meri odvisne od štirih dejavnikov: (a) od genotipa rastline, (b) sestave tal, kjer rastejo, (c) podnebja in (d) stopnje zrelosti rastlin. Pomen posameznih dejavnikov je za posamezne elemente različen. Na vsebnosti elementov vplivajo še drugi dejavniki, kot so uporaba gnojil, obogatitev tal, namakanje, kolobarjenje, križanje kultur in uporaba visokorodnih sort. Trave, ki rastejo skupaj na istem tipu tal in so vzorčene v isti rastni fazi, se lahko v sestavi elementov zelo razlikujejo (16).

2.4 VSEBNOSTI ELEMENTOV V SLEDOVIH V KRMI

Glede na številne dejavnike, ki lahko vplivajo na elementno sestavo določenega pridelka ali krme, se pri določitvi reprezentativnih vrednosti in omejitvi njihove uporabe pojavljajo precejšnje težave. Mnogi so kot reprezentativne vsebnosti uporabili vrednosti iz NRC (26). Z vzpostavitvijo lokalne baze podatkov pa se je na primer na območju Alberte v Kanadi pri vsebnosti elementov v krmi s tega območja pokazalo veliko večje tveganje za pomanjkanje Cu in manjše tveganje za pomanjkanje Zn pri govedu, kot je bilo to razvidno iz uporabljenih

standardov NRC. Za zrnje ječmena se je izkazalo, da je vsebnost Cu na splošno nižja, vsebnost Zn pa višja v primerjavi s standardom NRC. Za seno iz lucerne in koruzno silažo pa se je pokazalo, da lahko vsebuje zelo velike količine Mn in Zn (27). Zaradi navedenega je treba upoštevati naslednje:

- ko vsebnosti elementov očitno odstopajo od srednje vrednosti, je izražanje z medianami vsebnosti bolj reprezentativno in lahko pokaže boljše ujemanje med različnimi državami in s podatkovnimi bazami,
- ustreznost oskrbe z elementi s točno določenim obrokom je le redko mogoče napovedati dovolj natančno iz preglednic za elementno sestavo sestavin krme (16).

K skupni vsebnosti posameznega elementa v popolnih krmnih mešanicah prispevajo trije viri: vsebnosti v posamičnih krmilih, vsebnosti v premiksih ter dodajanje določenega elementa. Vsebnost elementov v sledovih v krmnih mešanicah, ki izhajajo iz posamičnih krmil, uporabljenih za pripravo krmne mešanice, imenujemo ozadje (ang. background levels) (3).

Priporočila za dopolnjevanje obrokov in uporabo premiksov proizvajalci krme pripravijo na naslednji način (3):

- za izračun ozadja elementov v sledovih v krmnih mešanicah uporabljajo podatke iz preglednic, ki jih objavljam in redno posodabljam različni organi na podlagi podatkov iz monitoringov posamičnih krmil,
- ko je območje ozadja v krmnih mešanicah določeno, se izdajo priporočila za dopolnjevanje obrokov s premiksom ali dopolnilno krmno mešanico; priporočila upoštevajo tudi varnostno rezervo, da se ne preseže najvišjih zakonsko dovoljenih vsebnosti.

Čeprav so izračunane vsebnosti verjetno dobri približki, pa rezultati raziskav kažejo, da lahko dejanske vsebnosti elementov v krmnih mešanicah od teh ocen tudi bistveno odstopajo (3).

2.5 TOKSIČNOST ELEMENTOV V SLEDOVIH

Nekateri elementi so lahko za živali, rastline in človeka tudi toksični. Toksičnost za rastline se kaže v inaktivaciji encimov, blokiranju funkcionalnih skupin biološko pomembnih molekul in poškodbah biomembran. To vodi do zmanjšanega sprejema mineralnih hranil in zmanjšane rasti ter pogosto tudi do nespecifičnih znamenj, kot so kloroze. Elementi v sledovih lahko pri rastlinah motijo elektronski transport pri procesih dihanja in fotosinteze. Posledica je zmanjšana pridelava krme, kar predstavlja posreden vpliv na živali (16).

Tveganje za toksičnost elementov v sledovih pri govedu je odvisno od več dejavnikov: (a) sprejemanje elementov iz tal prek rastlin; (b) zaužitje zemlje; (c) absorpcija posameznega elementa iz krme; (d) prehranski dejavniki, ki pospešujejo ali zavirajo prevzem elementa in njegovo zadržanje; (e) obstoj predilekcijskih mest za kopiranje v telesu; (f) trajanje in vzorci izpostavljenosti toksičnim elementom. Visoke vsebnosti elementov v krmi so lahko tudi posledica uporabe gnojil, komunalnih in industrijskih odpadkov ali industrijskega onesnaževanja (24).

Kriterij, ki se v literaturi uporablja za oceno toksičnosti, je najvišja dopustna vsebnost elementa (ang. maximum tolerable levels, MTL) v krmi. Ta je definirana kot maksimalni prehranski vnos posameznega elementa, ki nima nobenih škodljivih učinkov (vključno z zmanjšanjem produktivnosti ali poslabšanjem zdravja), če so ji živali izpostavljene v določenem časovnem obdobju (24).

Medtem ko vsi elementi postanejo toksični, ko jih živali zaužijejo preveč, jih glede na verjetnost, da bodo povzročili toksikoze, lahko vseeno razdelimo v tri skupine:

- elementi, pri katerih so toksikoze malo verjetne, saj so vsebnosti v krmi redko presežene: Al, Sb, Ba, Cr, Co, Li, Mn, Ni, Ag, Sr, Sn, Ti,
- elementi, ki so v posebnih primerih toksični: As, B, Fe, Zn,
- elementi, pri katerih so toksikoze pogoste: Cd, Cu, Pb, Hg, Mo, Se (24).

2.6 POMEN ELEMENTOV V SLEDOVIH V PREHRANI GOVEDI

Iz literature smo v nadaljevanju za vsak posamezni element poskušali zbrati naslednje znane podatke: esencialne funkcije in morebitne druge funkcije pri govedu, potrebe goveda po elementu (ang. animal requirements), morebitno toksičnost, tipične simptome pomanjkanja in zastrupitev, tolerance goveda in najvišje dopustne vsebnosti elementa v krmi (MTL), podatke o vsebnostih posameznega elementa v posamičnih krmilih in v krmnih mešanicah ter potencialni vpliv določenega elementa v živalski prehrani na okolje.

2.6.1 Srebro

Srebro (Ag) velja za neesencialni element (24). Visoko toksičnega potenciala ionskega srebra ni pričakovati v naravnih okoljskih pogojih, saj se Ag zlahka pretvorí v biološko nereaktivne spojine (28). Presenetljivo je, da so se raziskave toksičnosti Ag začele kasneje kot za druge elemente, šele pred približno 40 leti (28, 29).

V krmi za perutnino in prašiče je MTL za Ag 100 mg/kg SS, medtem ko je za določitev vrednosti MTL za glodavce, konje, govedo in ovce podatkov premalo (24). Vsebnosti Ag nad 100 mg/kg popolne krmne mešanice v obliki srebrovega sulfata pri perutnini inducirajo znake, povezane s pomanjkanjem Cu in Se, vključno z zavirano rastjo, znižanjem hemoglobina in aortnega elastina, povečajo pa umrljivost živali in težo srca (3). Pri poskusih na odstavljenih pujskih je bilo opaženo, da majhni odmerki kovinskih srebrovih nanodelcev, dodani krmi, izboljšajo zauživanje krme in rast živali. Predvideva se, da je to posledica njegovih protimikrobnih lastnosti (30). Ionsko srebro je zelo strupeno za vodne živali (31, 32). Znaki akutne toksičnosti Ag pri ribah nastanejo zaradi nezmožnosti vzdrževanja konstantne koncentracije natrijevih in kloridnih ionov v krvni plazmi (24).

Kopičenje Ag v kopenskih rastlinah iz tal je nizka, četudi je zemlja obdelana s komunalnim blatom, ki vsebuje Ag. Trave in kmetijski pridelki shranijo Ag v veliko večji meri v koreninah kot drugih delih rastline (28). Na splošno so vsebnosti Ag v kopenskih rastlinah do 60 µg/kg (3), zato je NRC ugotovil, da krma očitno ni pomemben vir Ag za živino (24, 33).

2.6.2 Aluminij

Aluminij (Al) je tretji najpogostejsi element v zemeljski skorji in najpogostejša kovina. Je zelo reaktivni element in se v naravi ne nahaja v elementarnem stanju, temveč le v spojinah z drugimi elementi, največkrat s kisikom, silicijem in fluorom (34).

Živa bitja nimajo znane biološke potrebe po Al (35, 36), vendar pa ubikvitarnost Al pomeni, da se majhnim količinam zaužitja s hrano ni mogoče izogniti. Nizke količine Al niso škodljive, visoke koncentracije pa so ekstremno toksične (37). Toksičnost Al se kaže tudi kot omejitveni dejavnik rasti rastlin v kislih tleh po vsem svetu in s tem v manjši pridelavi krme (38). Zakisanje tal s kislim dežjem posledično omejuje tudi živinorejo (39, 40). Toksične vplive na živali, ki so daljši čas (več kot dva tedna) izpostavljeni visokim vsebnostim Al v krmi, povezujejo z manjšo rastjo, krajšo življenjsko dobo in slabšim izkoriščanjem fosforja (24). Anke s sod. (41) je kot normativ za prehranske potrebe Al za živali postavil koncentracije pod 10 mg/kg SS. MTL v krmi za govedo je 1000 mg/kg SS (3).

Običajno so na pašnikih vsebnosti Al nižje od 100 mg/kg SS, v posameznih primerih pa lahko presežejo 1000 mg/kg SS. Živali na paši poleg tega zaužijejo še velike količine zemlje, kar lahko pomeni več kot 1,5 % Al v zaužiti suhi snovi (42). Vsebnosti Al v krmnih mešanicah za krave molznice, ovce in konje variirajo med 100 in 600 mg/kg SS (42). Znatne količine Al pa vsebujejo tudi zeoliti in alumosilikati, ki se v krmo dodajajo kot adsorbenti za mikotoksine (43). Ocenjuje se, da z uporabo gnoja živali, hranjenih z zeoliti, ni verjetno, da bi prišlo do spremembe koncentracije alumosilikatov v kmetijskih tleh. Vendar pa zaenkrat ni na razpolago nobenih relevantnih informacij o vplivu Al kot krmnega dodatka na okolje (3).

2.6.3 Arzen

Arzen (As) je metalloid, ki se lahko nahaja v več valenčnih stanjih ($-3, 0, +3, +5$) in v veliko različnih spojinah z mnogovrstnimi kemijskimi lastnostmi (44, 45). Toksičnost arzenovih spojin je odvisna od kemijske oblike in valence: anorganske oblike so veliko bolj toksične kot organske in trivalentni As je bolj toksičen kot petivalentni (3). As na splošno ni prepoznan kot esencialni element za višje živali, vendar pa se mu živali zaradi njegove razširjenosti ne

morejo izogniti. Po nekaterih študijah na različnih živalskih vrstah bi As v ultra sledovih lahko imel tudi koristne učinke za živali (46, 47). Nekatere organske arzenove spojine se v nekaterih državah uporabljajo v ekstenzivni rejti prašičev in perutnine kot pospeševalci rasti in zaradi njihovih antibiotičnih in antikokcidijskih lastnosti tudi za nadzor bolezni (48, 49).

Komercialna uporaba As se zmanjšuje že od leta 1960. As vsebujejo konzervansi za les, pesticidi, herbicidi (za zatiranje plevela), fungicidi, sredstva proti parazitom za govedo in ovce, barve in pigmenti ter osvinčen bencin. Številni izmed teh proizvodov so vir zastrupitev pri govedu (50–53). Znaki akutne zastrupitve z As vključujejo intenzivne bolečine v trebuhu, bruhanje, drisko, slabost, podhladitev in smrt. Znaki kronične zastrupitve so počasnejša rast, zmanjšana učinkovitost krmljenja in zauživanje krme, krči, nekoordinirana hoja in znižanje ravni hemoglobina (24).

Rastline, ki rastejo na z As bogati zemlji, lahko akumulirajo velike količine tega elementa. Vsebnosti As so odvisne od vrste rastlin, saj imajo različne vrste različne zmožnosti za njegovo črpanje in kopičenje (54, 55). Večina kopenske krme vsebuje manj kot 0,3 mg/kg SS As in le redko preseže 1 mg/kg SS. Za večino živalskih vrst je MTL 30 mg/kg SS, razen za ribe, kjer je MTL 5 mg/kg SS, saj imajo te nižjo toleranco na anorganski As iz hrane kot sesalci. Mejne vrednosti so postavljene v skladu z znanimi vplivi na zdravje živali, ne pa na zdravje ljudi. Da bi preprečili previsoke vsebnosti As v tkivih živali, ki jih zaužijemo, so zato nujne nižje mejne dovoljene vrednosti As (3).

Za As kot nezaželeno substanco v krmi so z Direktivo 2002/32/EC (56) in spremembo Priloge I k Direktivi, z Uredbo Komisije (EU) 2015/186 (57), postavljene najvišje mejne vrednosti (ang. maximum content). Vrednosti se gibljejo med 2 in 10 mg/kg (podano na 12 % vsebnost vlage) za popolne krmne mešanice in posamična krmila organskega izvora ter med 10 in 100 mg/kg (podano na 12 % vsebnost vlage) za mineralne krmne mešanice ter posamična krmila in krmne dodatke, ki so vir elementa v krmi.

2.6.4 Bor

Bor (B) je polprevodnik, ki ga glede na njegove lastnosti uvrščamo med polkovine. Borova kislina *in vitro* in *in vivo* kaže veliko afiniteto do cis-hidroksilnih skupin, kar naj bi bila osnova za njen vpliv na marsikatere biološke mehanizme (58). Njegova prednost je

sposobnost, da se anorganski borati pretvorijo v borovo kislino in se tako absorbirajo prek sluznic tudi pri nizkem fiziološkem pH (59).

Bor je že od leta 1923 znan kot esencialni element za rastline (58, 60–62), ne pa tudi za živali in ljudi. Da bi lahko bil B potencialno esencialni element tudi za živali, je znano od leta 1981. Pri piščancih, ki so imeli zaradi pomanjkanja vitamina D₃ deformirane okončine, je dodajanje B v krmo povzročilo izboljšanje njihovega zdravstvenega stanja in stimuliralo rast (63, 64). Najnovejše študije kažejo, da B vpliva na mnogo encimov, razvoj in mineralizacijo kosti, metabolizem Ca, P, Mg in energijski metabolizem. Borove mineralne spojine lahko učinkujejo na optimalno delovanje organizmov, zdravljenje motenj v strukturi kosti, zmanjšajo raven holesterola in trigliceridov, prav tako pa B lahko vpliva na aktivnost vitamina D in pomaga pri motnjah, nastalih zaradi njegovega pomanjkanja (65).

B se dodaja v krmo kot borova kislina ($\text{B}(\text{OH})_3$) ali natrijev borat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) (3). Obstaja kar nekaj študij, ki preučujejo vplive dodanega borata v krmo za prežvekovalce, vendar pa se razlikujejo v količini dodanega borata (65–71). Optimalna količina dodanja še vedno ni določena, manjkajo tudi podatki o vsebnostih v krmi (72, 73). V literaturi smo našli dva članka, ki opisujeta dejansko stanje o vsebnostih B v nekaterih vrstah krme v Turčiji (73), ki ima največje zaloge B in je tudi največja proizvajalka borovih spojin na svetu (pridelajo jih 70 %), in v tropskih krmilnih sistemih v Indiji (72). Površinska porazdelitev B v izmerjenih vzorcih iz Indije je pokazala, da je vsebnost B v vseh vzorcih pod 20 mg/kg, s povprečjem $17,7 \pm 0,96$ mg/kg in mediano 14,4 mg/kg. Podatki o vsebnostih B v krmi bi bili pomembni za študije o ustremnem dodajanju B v krmo in njegovi toksičnosti za živali (73). Šele sto- ali tisočkrat presežen prehranski vnos bi lahko povzročil razvojne in reproduktivne motnje pri živalih (3). Vsebnost B v krmi nima nobenega vpliva na okolje (3).

2.6.5 Barij

Barij (Ba) spada med zemljoalkalijske kovine. Najdemo ga v najmanj 80 mineralih, v naravi v elementarni obliki pa ne obstaja (74). Ba hitro oksidira na zraku in reagira z vodo, v naravi pa se pojavlja kot dvovalentni kation v kombinaciji z drugimi elementi (75). Ba za rastline in živali ni esencialni element. Toksičen je Ba^{2+} ion, toksičnost Ba spojin pa je odvisna od topnosti posamezne spojine (75–77). Ba je v topnih oblikah zelo toksičen za živali in ljudi.

(78). Iz črevesja se Ba ioni absorbirajo prek črevesne sluznice, ki je zanje zelo prepustna (74). Stopnja absorpcije je odvisna od živalske vrste, topnosti spojine in starosti živali. Ker se Ba v hrani nahaja v vezanih in netopnih oblikah, se ga absorbirata le 2 % (79, 80). Študije s podganami z uporabo barijevega klorida so pokazale, da se Ba ioni s krvjo razporedijo po telesu in se v največji meri naložijo v kosteh (75). Tam Ba s Ca tekmuje za določena izmenjevalna mesta (81), prav tako pa lahko deluje kot antagonist za K ione. Hipokaliemijo povezujejo z zmožnostjo Ba ionov, da blokirajo K kanale (82). Simptomi akutne zastrupitve z Ba so prekomerno slinjenje, bruhanje, kolike, driska, drhtavica, mišična paraliza, kardiotoksičnost in paraliza centralnega živčnega sistema (80).

Za rastline so značilne velike razlike v vsebnosti Ba, tako med posameznimi vrstami kakor tudi znotraj iste vrste (83). Običajno so vsebnosti Ba v rastlinah 4–50 mg/kg (84). Študija v Kentuckyju je pokazala, da seno vsebuje 10–90 mg/kg SS Ba in žitarice 1–20 mg/kg SS (85).

V zadnjem času postaja problem Ba in drugih težkih kovin v komunalnem blatu, ki se kot alternativa njegovemu odlaganju uporablja v kmetijstvu. Navzočnost toksičnih elementov v komunalnem blatu tako predstavlja tveganje kontaminacije zemlje in njihov prenos po prehranjevalni verigi z absorpcijo in translokacijo v rastlinah (86). Od vseh elementov v komunalnem blatu so Ba najmanj preučevali. Ba je uvrščen na seznam elementov, ki predstavljajo tveganje za zdravje ljudi in so najpogosteje prisotni v primerih onesnaženja tal (78).

2.6.6 Berilij

Berilij (Be) spada med zemeljskoalkalijske kovine in v naravi obstaja v oksidacijskih stanjih 0 in +2. Kemijsko je zelo podoben Al. Oba imata visoko razmerje med nabojem in radijem, podobno polarizacijsko sposobnost ionov, amfoterne hidrokside in močno tendenco spojin za hidrolizo. Be je zelo reaktiv in v normalnih naravnih pogojih vezan na druge elemente (87, 88).

Be je toksičen element za živali in ljudi (89). Ima dolgoročen vpliv na nenormalno delovanje limfocitov T, kar povzroča imunsko disregulacijo in preobčutljivostne reakcije. Pri živalih povzroča rahitis, okvare jeter, ledvic, pljuč in kože. Njegovi učinki na kostno tkivo (rahitis) so verjetno posledica okvarjene gastrointestinalne absorpcije fosfata in ne posledica

neposrednega učinka Be na kostno tkivo (90). Be se v prebavilih slabo absorbira (91, 92), vendar pa se zelo dobro in hitro absorbira skozi kožo in pljuča. Vdihavanje je glavni način izpostavljenosti, rezultati kronične izpostavljenosti temu elementu pa so dispnea (oteženo dihanje), kašelj in pljučna stiska (88).

Be se po prehranjevalni verigi ne prenaša. Večina rastlin sprejme Be iz tal v majhnih količinah in le malo se ga prenese iz korenin do drugih rastlinskih delov. Be lahko iz tal v rastline preide le v topni obliki. Tipične vrednosti v rastlinah variirajo med 1 in 40 µg/kg in so prenizke, da bi vplivale na živali, ki te rastline jedo (88, 93).

2.6.7 Kadmij

Kadmij (Cd) nima nobene poznane biološke funkcije pri živalih, njegova navzočnost v tkivih živali je nepotrebna. Cd velja za eno najbolj toksičnih snovi v okolju zaradi škodljivih učinkov za različne organe in njegovega dolgega razpolovnega časa izločitve iz organizma (94, 95). Absorpcija Cd prek prebavnega trakta je okoli 5 %. Kot neesencialni element Cd nima svojega transportnega mehanizma, prehaja pa prek različnih membran s pomočjo posnemanja transportnih mehanizmov drugih elementov (96). Po absorpciji Cd kroži po telesu z rdečimi krvnimi celicami ali pa se veže na albumin v plazmi. Večina novorojenih prezvekovcev se skoti z nizko vsebnostjo Cd. Akumulacija poteka počasi in več let. Večinoma se Cd naloži v jetrih in ledvicah. V jetrih povzroči nastanek metalotioneinov, ki se počasi sprostijo v obtok in naložijo v ledvicah (95). Cd vpliva na metabolizem esencialnih elementov, kot so Ca, Zn, Fe, Cu in Se (97, 98). Pri kroničnem uživanju visokih količin Cd so prizadeti skoraj vsi glavni organi, najbolj pa ledvice in jetra. Pri govedu, ki je bilo kronično izpostavljeno Cd, zaznamo različne klinične znake, kot so izguba apetita, odpoved ledvic, hipertenzija, anemija, zaostajanje v rasti, slabša reprodukcija, splavi in rast tumorjev (95).

Rastline Cd sprejemajo zelo različno. V nasprotju z drugimi elementi je Cd veliko bolj mobilen in se absorbira v rastline prek korenin, njegove koncentracije v različnih delih rastlin pa padajo v naslednjem vrstnem redu: korenina > listi > steblo > podzemeljski shranjevalni organi > plod/zrno. Koncentracije Cd v krmi in pridelkih, ki so zrasli na nekontaminirani zemlji, so večinoma pod 1 mg/kg SS. O višjih vsebnostih Cd poročajo v

pridelkih, ki so zrasli na zemlji, ki so ji dodali večje količine kalcija. Nečistoče s Cd so največkrat prisotne v mineralnih krmnih mešanicah. Fosfati, uporabljeni kot krmni dodatki, so verjetno največji viri kontaminacije krme s Cd (99). V kmetijstvu so dodatni viri onesnaženja s Cd tudi uporaba odpadnega komunalnega blata za gnojenje in onesnažena gnojila (100).

MTL v krmi za glodalce, perutnino, prašiče, konje, govedo, ovce in ribe je 10 mg/kg SS. Te meje so postavljene v skladu z znanim vplivom na zdravje živali, ne pa na zdravje ljudi, zato so potrebne nižje meje, da bi preprečili previsoke vsebnosti v živalskih tkivih, ki jih zaužijemo (3).

Za Cd kot nezaželeno substanco v krmi so z Direktivo 2002/32/EC (56) in spremembo Priloge I k Direktivi, z Uredbo komisije (EU) št. 1275/2013 (101), postavljene najvišje mejne vrednosti. V krmnih mešanicah se meje gibljejo med 0,5 in 2 mg/kg (podano na 12 % vsebnost vlage), razen v mineralnih mešanicah, ki vsebujejo fosfate, kjer so lahko vrednosti do 7,5 mg/kg. V posamičnih krmilih so meje med 1 in 2 mg/kg, razen pri fosfatih, kjer sme biti vsebnost Cd do 10 mg/kg. Ista mejna vrednost je postavljena tudi za krmne dodatke, razen nekaterih oksidov in fosfatov, kjer so dovoljene vrednosti do 30 mg/kg (101).

2.6.8 Kobalt

Kobalt (Co) je esencialna sestavina vitamina B₁₂, zato predvsem rastlinojede živali v prehrani potrebujejo tudi Co. Mikroorganizmi v vampu sintetizirajo vitamin B₁₂ in s tem pokrivajo potrebe živali po vitaminu B₁₂. Prežvekovalci niso odvisni od prehranskih virov vitamina B₁₂, saj so mikroorganizmi v vampu sposobni sintetizirati vitamin B₁₂, če je le dovolj Co v njihovi prehrani (3, 25).

Prvi znaki pomanjkanja Co pri govedu so zmanjšano zauživanje krme in manjša rast. Ko pomanjkanje postaja vse hujše, se rast ustavi, živali hitro hujšajo, zaradi slabokrvnosti dobijo bledo kožo in sluznico, pojavi pa se tudi maščobna degeneracija jeter (25). Klinični znaki pomanjkanja Co pri govedu so anoreksijsa, anemija, povečana perinatalna umrljivost, neplodnost in povečana dovzetnost za bolezni (3). Pomanjkanje Co povezujejo tudi z zmanjšano odpornostjo živali proti parazitskim infekcijam (102). O motnjah pri prežvekovalcih, povzročenih zaradi Co, so poročali v različnih delih sveta. Ena od teh je

nezmožnost mikroorganizmov v vampu za sintezo vitamina B₁₂ in s tem neizpolnjevanje presnovnih potreb celic in tkiv (103–105). Zato je minimalna potreba po Co v prehrani goveda približno 100 µg/kg SS (106). Prehrana goveda z vsebnostjo Co nad zahtevami ima lahko nekatere pozitivne učinke v smislu boljše prebave vlaken iz voluminozne krme nižje kakovosti, lahko poveča skupno število anaerobnih bakterij v vampu in poveča nastajanje mlečne kisline v vampu (107, 108).

Toksikoze pri živalih, povzročene s prevelikim vnosom Co, so zelo redke, ker so vsebnosti v krmi precej nizke. Značilni znaki kronične izpostavljenosti za večino živalskih vrst so zmanjšano zauživanje krme in počasnejša rast, hujšanje, slabokrvnost, izčrpanost, povečana vsebnost Co v jetrih in povečana občutljivost za različne bolezni (24, 26).

Rastline običajno vsebujejo od 0,1 do 0,5 mg/kg SS Co. Nedavne študije so pokazale, da sta se vnos krme in rast živali znatno zmanjšala, ko je bilo govedo krmljeno s koruzno silažo, ki je vsebovala 0,08 mg/kg SS Co in brez dodatka Co, v primerjavi z živino, krmljeno z dopolnjenim obrokom z 0,20 mg /kg SS Co (109, 110).

MTL v krmi za govedo je 25 mg/kg SS (3). Krmni dodatki, ki so vir Co in so v uporabi v EU, obravnava Uredba (ES) št. 1831/2003 (111) o dodatkih za uporabo v prehrani živali in njene dopolnitve ter register krmnih dodatkov (112). Trenutno so odobreni kobaltov acetat, karbonat in sulfat. Najvišja dovoljena vsebnost Co v popolnih krmnih mešanicah je 1 mg/kg krme (podano na 12 % vsebnost vlage) za vse navedene skupine živali, kar je v skladu s priporočilom EFSE iz leta 2009 (113), ki je v zadnji oceni priporočila zmanjšanje največje dovoljene vsebnosti Co iz vseh virov z 2 na 1 mg/kg popolne krmne mešanice za vse vrste, razen rib. Zmanjšanje dovoljenih vsebnosti je priporočila na osnovi ocene tveganja za potrošnike živil živalskega izvora in varnosti oseb, ki rokujejo s Co krmnimi dodatki. Morebitnih negativnih posledic teh ukrepov na zdravje živali in učinkovitost proizvodnje živali ne pričakujejo (113).

2.6.9 Krom

Krom (Cr) je kovina, ki se lahko nahaja v različnih oksidacijskih stanjih, od katerih sta biološko najpomembnejši trivalentna (Cr^{3+}) in šestivalentna oblika (Cr^{6+}). Cr^{3+} je v naravi ubikitaren in se nahaja v zraku, vodi, zemlji in biološkem materialu. Cr^{3+} se v krmi nahaja

v anorganski obliki ali v organskih kompleksih, ki so veliko bolj dostopni kot anorganski (114). Cr³⁺ vpliva na vnos glukoze v celice. Prav tako s stimulacijo vnosa aminokislin v celice s pomočjo inzulina sodeluje pri metabolizmu proteinov (115). Cr⁶⁺ je v splošnem antropogenega izvora in ni naravno navzoč v okolju. Cr⁶⁺ je veliko bolj toksičen kot trivalentni krom in ima večjo biodostopnost, vendar pa ga živali ne dobijo s krmo (114).

V preteklosti so domnevali, da običajni obroki za živino vsebujejo dovolj Cr, da zadovoljijo potrebe živali. V zadnjih 15 letih se je ta domnevna spremenila, saj so s številnimi študijami pokazali, da lahko dodajanje Cr v krmo vpliva na metabolizem in proizvodnost živali (116). Številne nedavne študije so pokazale, da lahko dopolnitev obroka s Cr pri kravah molznicah poveča zauživanje krme in mlečnost (117–119). Študije pri govedu so prav tako pokazale, da lahko dodajanje Cr poveča občutljivost na inzulin. Pomanjkanje Cr v tkivih lahko povzroči, da telo postane manj odzivno ali odporno proti inzulinu. Raziskave tudi kažejo, da lahko Cr vpliva na imunski odziv in odpornost proti boleznim pri govedu (102, 115, 120).

Cr³⁺ in Cr⁶⁺ v rastline vstopata na dva načina. Cr⁶⁺ vstopa aktivno s sulfatnimi nosilci in se v koreninah takoj pretvori v Cr³⁺, medtem ko Cr³⁺ vstopa pasivno in se obdrži na ionskih izmenjevalnih mestih celičnih sten. Koncentracije v rastlinah padajo v naslednjem vrstnem redu: korenina > listi > plod. V žitih se Cr koncentrira v semenskih mešičkih. Kaže, da so fosfati v krmi nekaterih živali glavni vir Cr. Monokalcijev fosfat in defluoriran fosfat lahko vsebuje med 83 in 110 mg/kg Cr (3). Cr propionat je edini dodatek, ki je dovoljen za dodajanje v krmo za živino v ZDA. Doda se ga lahko do 0,5 mg/kg SS. V nasprotju s tem dodajanje Cr v krmo za živino v državah EU trenutno ni dovoljeno (112). EFSA je ocenila podatke o Cr in ugotovila, da ni nobenega prepričljivega dokaza za esencialnost ali neesencialnost Cr³⁺ kot elementa v sledovih (121). MTL v krmi za govedo je 100 mg/kg SS za topne Cr³⁺ spojine in med 3.000 in 30.000 mg/kg SS za kromov oksid (24).

2.6.10 Baker

Baker (Cu) je esencialni element v sledovih, ki služi kot kofaktor za mnoge pomembne metaloencime. Je eden najbolj kritičnih elementov v sledovih, ki ga živali potrebujejo. Cu je ključnega pomena v telesu kot sestavni del (ali kofaktor) encimskih sistemov, ki sodelujejo pri transportu in presnovi železa za nastajanje rdečih krvnih celic. Vpliva tudi na imunski

sistem (3,26). Cu vpliva na celično imunost (pomaga pri uničevanju bakterij) in hormonalno imunost (pomaga proizvajati protitelesa). Poleg tega Cu in Zn pripisujejo lastnosti pospeševalcev rasti zaradi njihovih protimikrobnih aktivnosti, podobnih antibiotikom, saj naj bi zatirala črevesne patogene (122,123).

Za pomanjkanje Cu pri govedu obstajata dva glavna vzroki. To sta majhna vsebnost Cu v rastlinah zaradi pomanjkanja Cu v gnojilu, ki se uporablja na tleh, revnih s tem elementom, in sekundarno pomanjkanje, ki ga povzročajo prekomerne vsebnosti Mo in S na pašnikih ali v krmnih dodatkih. Poleg Mo in S na absorpcijo Cu pri prežvekovalcih vpliva tudi vsebnost Fe v organizmu (16, 26, 124). Za govedo je normalno razmerje med Cu in Mo v prehrani od 5 : 1 do 10 : 1. Ko to razmerje pade na 2 : 1 ali manj, lahko pričakujemo hudo spremembo v izkoristljivosti Cu in njegovo pomanjkanje v organizmu. Poleg tega lahko na pomanjkanje Cu vplivajo še zaužitje zemlje na paši, presežki Cd, presežki Zn in odvečni Ca, zlasti v obliki apnenca (125, 126). Pogosti znaki pomanjkanja Cu pri živalih so anemija, počasnejša rast, bolezni kosti, razbarvanje dlake, volne, krvna in perja, demielinizacija hrbtenjače, miokardna fibroza in driska (26, 126–130). Glavni simptomi pomanjkanja Cu se od črede do črede zelo razlikujejo in jih ni lahko prepoznati.

Ob previsokih vsebnostih v krmi se Cu naloži v jetrih. Takšno kopičenje lahko brez kakšnih posebnih znakov povzroči smrt živali v nekaj urah ali dneh, zdravljenje pa je vedno neuspešno. To se pri govedu lahko pojavi pri vsebnostih v krmi 100 mg/kg (24). Kronična izpostavljenost previsokim koncentracijam Cu se lahko kaže v povisani temperaturi, hitrem dihanju, anoreksiji, dehidraciji in kot zlatenica. V normalnih pogojih in v odsotnosti pomembnih antagonistov naj bi bila vsebnost Cu v skupnem obroku do 25 mg/kg SS. MTL v krmi za govedo je 40 mg/kg SS (3) s predpostavko, da je vsebnost Mo v krmi med 1 in 2 mg/kg SS in vsebnost S med 0,15 in 0,25 % (24). Krmni dodatki, ki so vir Cu in so v uporabi v EU, obravnava Uredba (ES) št. 1831/2003 (111) o dodatkih za uporabo v prehrani živali in njene dopolnitve ter register krmnih dodatkov (112). Najvišja dovoljena vsebnost Cu v popolnih krmnih mešanicah je za navedene skupine živali različna in se za posamezne vrste giblje med 15 mg/kg krme in 170 mg/kg krme (podano na 12 % vsebnost vlage) (112).

Študije, v katerih so preučevali vsebnost Cu v krmi in krvnem serumu goveda v različnih vremenskih pogojih, so pokazale nizke vsebnosti Cu v travi in senu (131–134).

2.6.11 Železo

Železo (Fe) je esencialni element pri sesalcih. Je sestavina proteinov, kot so hemoproteini (hemoglobin, mioglobin) in tudi nehemoproteinov (feritin, transferin) ali pa kofaktor pomembnih encimov (citokromi A, B, C; peroksidaze, katalaze). 70 % celotnega Fe v telesu se nahaja v hemoglobinu (135–137). Od njega je odvisna aerobna presnova, ker je kot sestavina hemoglobina vključen v prenos kisika in ogljikovega dioksida po telesu. Ima osrednjo vlogo kot kofaktor za večino encimov Krebsovega cikla in kot prenašalec elektronov (16, 26). Najpomembnejša posledica pomanjkanja Fe je oslabljena telesna zmogljivost. Drugi simptomi pomanjkanja Fe so anemija, reprodukcijske motnje, motnje psihomotoričnega razvoja in zmanjšano delovanje imunskega sistema. Pri večini živalskih vrst pomanjkanje Fe ni pogost pojav in zato ne predstavlja večjih težav (3).

Na splošno vse živalske vrste izkazujejo visoko toleranco do Fe. Toleranca do prevelikih koncentracij železa pri vseh živalskih vrstah je posledica močne blokade absorpcije železa prek sluznic, vendar pa lahko preveliko kopičenje Fe povzroči disfunkcijo organov s tvorjenjem ROS (ang. reactive oxygen species). Pri živalih lahko dolgotrajen prevelik vnos železa privede do preobremenitve v tkivih in tako reaktivno prosto železo povzroči peroksidativni stres, predvsem v jetrih. Eksperimentalno se je preobremenitev telet z Fe v mlečnem nadomestku pokazala z zmanjšanjem telesne mase in zauživanja krme, ko je vsebnost Fe presegla 5000 mg/kg SS (138, 139). V literaturi so opisani redki primeri zastrupitve živali, ko so mladičem vbrizgali ali oralno predozirali Fe (140, 141). Druga težava se kaže pri pašnih živalih, kjer živali zaužijejo velike količine zemlje in se velikemu vnosu Fe ne morejo izogniti. Prav tako so našli velike razlike v vsebnostih Fe v travni silaži (od 61 do 7727 mg/kg SS), ki je glavna sestavina obroka za živino. Do zdaj so bile dovoljene maksimalne vsebnosti Fe v krmi 1000 mg/kg SS (138), EFSA pa je izdala mnenje, da bi bilo treba glede na zbrane literurne podatke dovoljeno najvišjo varno mejo za govedo znižati na 450 mg/kg v krmi z 12 % vsebnostjo vlage (142). Razlogi za to so zmanjšano zauživanje krme in znaki pomanjkanja Cu, ki se lahko pojavijo kot posledica višjih vsebnostih Fe. Izvedene presoje za zdaj ne kažejo nobenega vpliva na okolje (3).

2.6.12 Živo srebro

Živo srebro (Hg) se nahaja v okolju kot elementarni Hg (kovinski), anorganski Hg (soli s Hg^+ in Hg^{2+}) in organski Hg (predvsem metil živo srebro). Ko se enkrat sprosti v okolje, Hg preide niz kompleksnih kemičnih in fizikalnih transformacij. Živali so stalno izpostavljeni Hg in ga med tem ciklom akumulirajo, posledica pa so različni škodljivi vplivi na njihovo zdravje (48, 100, 143). Hg za živali ni esencialni element (3).

Hg štejemo med zelo toksične onesnaževalce (144). Vpliva na skoraj vse sisteme v telesu živali: na ledvice, živčevje, prebavila, dihala in kostno-mišično maso. Izpostavljenost Hg povezujejo tudi z rakotvornostjo in teratogenostjo (48). Najbolj občutljiva končna točka za oralno izpostavljenost organskih oblik Hg je živčni sistem (100). Klinični znaki izpostavljenosti metil živemu srebru pri živalih vključujejo ataksijo, mišične krče, paralizo, motnje vida, izgubo koordinacije in zanašanje zadnjega dela (24, 144, 145). Metil živo srebro je najbolje raziskan primer organokovinske spojine, ki moti normalen razvoj in ima negativne učinke na razvoj možganov pri živalih in ljudeh (3, 146, 147).

Za Hg kot nezaželeno substanco v krmi so z Direktivo 2002/32/EC (56) in s spremembou Priloge I k Direktivi, z Uredbo Komisije (EU) 2015/186 (57), postavljene najvišje mejne vrednosti, ki so 0,1 mg/kg (podano na 12 % vsebnost vlage) za popolne krmne mešanice in posamična krmila za vse živalske vrste. NRC (24) je predlagala najvišjo dovoljeno vsebnost organskih oblik Hg pri govedu 2 mg/kg SS in vsebnost anorganskih oblik Hg 0,2 mg/kg SS. Prehod Hg iz zemlje v rastline je omejen, večina pašniških rastlin in pridelkov vsebuje manj kot 0,1 mg/kg SS. Vsebnosti Hg v rastlinah so neodvisne od vsebnosti Hg v tleh, večina prisotnega Hg izvira iz atmosferskega odlaganja (5, 46, 148). Najpogostejši vir Hg za rejne živali je ribja moka, kjer je pretežno prisoten kot metil živo srebro. Živali lahko večje količine Hg dobijo tudi z zaužitjem zemlje (3).

2.6.13 Litij

Litij (Li) ima zaradi majhnega ionskega radija verjetno mnogo bioloških funkcij. Zaradi zmožnosti induciranja močnih polarizacijskih učinkov je sposoben zamenjati K^+ , Mg^{2+} in Ca^{2+} v različnih bioloških membranah in na encimskih vezavnih mestih (149, 150). Li^+ bi lahko imel večjo vlogo na proteine, ki vsebujejo Mg^{2+} , v rastlinah in pri sesalcih (151).

Biokemični mehanizmi delovanja Li so izredno kompleksni in so povezani s funkcijami drugih elementov, zdravil, encimov, hormonov, vitaminov, rasti in drugih dejavnikov. Schrauzer je predlagal kar nekaj Li bioloških funkcij, vendar pa njegova esencialnost še ni povsem raziskana (149). Za določitev potreb po Li pri različnih živalskih vrstah bodo potrebne še nadaljnje raziskave (152). V študijah, izvedenih med letoma 1970 in 1990, so živali, ki so dobivale krmo z nizkimi vsebnostmi Li, kazale reproduktivne in vedenjske motnje. Povišala se je tudi smrtnost. Čeprav trenutno ni dokazov, da pomanjkanje Li povzroča velike težave pri reji živali, je treba upoštevati možnost, da neprimerni vnosi Li lahko povzročijo vedenjske motnje (149).

V 70. letih prejšnjega stoletja so predlagali, da bi se Li uporabljaj kot dodatek krmi v intenzivni živinoreji za nadzor vedenjskih motenj: stresa, agresivnosti, napadalnosti in panike. Predlog ni bil sprejet zaradi farmakokinetičnih lastnosti Li, kot so počasna možganska penetracija, nizek terapevtski indeks, visoka variabilnost pri posameznih živalih in neprijetni sekundarni učinki. Danes se ponovno kaže zanimanje za uporabo v živinoreji zaradi nevrodgenerativnih bolezni, kot je na primer subakutna transmisivna spongiformna encefalopatija (TSE). Pred tem bi bilo treba izvesti še določene farmakokinetične študije pri govedu (153).

Žita, bogata s sladkorji in škrobom, v glavnem vsebujejo malo Li, med 0,2 in 1,0 mg/kg SS (154). Za krmo, ki raste na območjih, kjer je zemlja bogata z Li, so bile podane vsebnosti med 1 in 4,1 mg/kg SS, na območjih, kjer je zemlja revna z Li, pa se te vrednosti gibljejo med 0,5 in 1,4 mg/kg SS (24). MTL v krmi za govedo je 25 mg/kg SS (3).

Onesnaženje tal z Li postaja resna težava in bi lahko postalo huda grožnja za pridelavo krme v bližnji prihodnosti (150). Poročila o zastrupitvah pri govedu zaradi izpostavljenosti industrijskim proizvodom z Li omenjajo simptome akutne oralne toksičnosti Li, kot so depresija, driska, ataksija in smrt (23).

2.6.14 Mangan

Mangan (Mn) je esencialni element, ki deluje kot encimski aktivator in je sestavina številnih encimov (23, 24). Mn je bistvenega pomena za presnovo lipidov pri živalih (155, 156). Primarno pomanjkanje Mn pri živini se lahko kaže kot počasnejša rast, anomalije okostja,

zmanjšane reproduktivne funkcije, ataksija mladičev ter napake v presnovi lipidov in ogljikovih hidratov (3). Študije, objavljene v zadnjih 20 letih, kažejo, da je lahko pomanjkanje Mn pri teletih težava na številnih območjih po vsem svetu (157–160).

Akutna toksičnost Mn je relativno nizka. Mn je najmanj toksičen izmed vseh esencialnih elementov v sledovih. Pomanjkanje Fe in hematološke spremembe so najpogostejsi znaki toksikoz, ki jih povzroča Mn (3). Živali, ki so zastrupljene z Mn, lahko kažejo naslednje klinične značke: počasnejšo rast, anemijo, gastrointestinalne poškodbe, nevrološke spremembe in zvišanje plazemske koncentracije estrov in trigliceridov (155, 156).

Vsebnosti Mn v voluminozni krmi in žitih so izredno različne (83). MTL v krmi za govedo je zaradi zgoraj omenjenih razlogov zelo visoka, in sicer 2000 mg/kg SS (3). Krmni dodatki, ki so vir Mn in so v uporabi v EU, obravnava Uredba (ES) št. 1831/2003 (111) o dodatkih za uporabo v prehrani živali in njene dopolnitve ter register krmnih dodatkov (112). Najvišja dovoljena vsebnost Mn v popolnih krmnih mešanicah je za navedene skupine živali 150 mg/kg krme (podano na 12 % vsebnost vlage), razen za ribe, kjer je 100 mg/kg krme (112).

Uporaba Mn kot krmnega dodatka nima pomembnega vpliva na okolje (3). Za okolje bi lahko bile skrb vzbujajoče le povečane vsebnosti Pb v manganovem manganioksidu (3).

2.6.15 Molibden

Molibden (Mo) je esencialni element (24, 161). Opredeljen je bil kot sestavni del šestih encimov, vključno s tremi encimi pri sesalcih, in sicer ksantin-dehidrogenaza, aldehid oksidaza in sulfat oksidaza. Vsi znani metaloencimi Mo, z izjemo nitrogenaze (encima v rastlinah), uporablajo Mo v obliki kofaktorja, molibdenovega kompleksa ali organske komponente molibdopterin (26, 161, 162).

Govedo je za Mo najmanj tolerantna vrsta živali, ki mu sledijo ovce, medtem ko so prasiči od domačih živali najbolj tolerantni. Razlike med prežvekovalci in neprežvekovalci je verjetno mogoče pojasniti z lahkoto tvorjenja tiomolibdatov v vampu, ki so močni antagonisti presnove Cu in škodljivo učinkujejo na črevesno sluznico (23). Klinični znaki prevelikega vnosa Mo se kažejo kot izguba teže in anoreksija. Toksikoza pri prežvekovalcih se imenuje molibdenoza (23, 24). Drugi slabti učinki pri govedu so poleg hujšanja še težave

z obrejtvijo, pomanjkanje libida, poškodbe testisov in spermatogeneza pri bikih. Klinični znak molibdenoze je sekundarno pomanjkanje Cu. Raziskave kažejo, da lahko nepravilnosti, ki jih običajno pripisujejo pomanjkanju Cu, dejansko nastanejo zaradi toksičnosti Mo. Znano je, da je Mo toksičen, ko je vnos 20 mg/kg ali višji, in da je neugodne učinke mogoče premagati z dodatkom Cu (163). Dodajanje 5 ppm Mo v krmo z nizko vsebnostjo Mo je upočasnilo rast živali in učinkovitost krme ter povzročilo neplodnost pri telicah (127, 164). Povezave med Cu in Mo smo podrobnejše opisali tudi v poglavju o bakru (2.6.10).

MTL v krmi za govedo je 5 mg/kg SS (3). Zaradi znanih interakcij med Cu, Mo, Fe in S je pri prežvekovalcih povprečna koncentracija Mo v posamičnih krmilih običajno pod 1 mg/kg, razen v lucerni in travah (1,5–3 mg/kg), v skupnem mešanem obroku pa pod 1,5 mg/kg. Potrebe živali po Mo so nizke in jih je z običajnim krmljenjem lahko zadovoljiti. Za govedo so minimalne potrebe po Mo 0,1 mg/kg SS. Glede na vsebnosti Mo v krmi je malo verjetno, da bi se pojavilo njegovo pomanjkanje, zato so predlagali, da se Mo ne dodaja h krmi (3).

2.6.16 Nikelj

Nikelj (Ni) spada med kovine in je v biosferi ubikitaren. Čeprav lahko obstaja v oksidacijskih stanjih od –1 do +4, se v naravi največkrat nahaja v najbolj stabilni dvovalentni obliki (Ni^{2+}) (165). V bioloških sistemih Ni tvori stabilne komplekse z različnimi ligandi in se veže na številne organske molekule (166).

Ni je bil kot esencialni element za rastline prepoznan v različnih študijah (167–170), medtem ko esencialnost Ni za živali še ni povsem opredeljena, saj še vedno ni prepričljivih dokazov, da bi bil potreben za katerikoli metabolni proces. Njegova esencialnost je zdaj splošno priznana le na podlagi številnih znakov pomanjkanja pri različnih živalskih vrstah (171). Pomanjkanje Ni pri živalih povezujejo s slabšo rastjo, motnjami v metabolizmu ogljikovih hidratov in lipidov, zapoznelimi brejostmi, manjšim številom mladičev, anemijo, kožnimi izpuščaji, zmanjšanimi vrednostmi hemoglobina in hematokrita, hematopoezo in pomanjkanjem železa, bakra in cinka v jetrih ter zmanjšano aktivnostjo številnih encimov (hidrogenaze, transmitaze in α -amilaze) (172). Pomemben je tudi za pravilno delovanje imunskega sistema. Ni je znan tudi kot vsesplošen alergen in previsoke vsebnosti tega elementa imajo embriotoksične, teratogene in kancerogene vplive. Ni spojine delujejo

toksično zaradi draženja prebavil. Njegova absorbcijska prek črevesne sluznice je nizka (171). MTL v krmi za govedo je 100 mg/kg SS (3).

Ni, prisoten v krmi, je iz naravnih in antropogenih virov (173). Uporaba umetnih gnojil, predvsem fosfatov, kot tudi komposta, komunalnega blata in gnoja v kmetijstvu, lahko bistveno vpliva na vsebnost Ni v tleh (173). Ni tako postaja pomemben onesnaževalec tal, saj njegova koncentracija strmo narašča po vsem svetu (171). Podatki o vsebnostih Ni v krmi so redki. V Angliji in Walesu so v 183 vzorcih krme za govedo vsebnosti Ni določili v območju med 0,1 in 11,2 mg/kg SS (174).

2.6.17 Svinec

Svinec (Pb) je v okolju ubikvitaren, nima znane biološke vloge in velja za neesencialni element (175, 176). Zastrupitev s Pb je ena izmed najpogostejših zastrupitev pri govedu (46, 177). Pb je kronični in kumulativni strup. Vpliva na skoraj vsak sistem v telesu živali, na srce in ožilje, ledvice, endokrini sistem, prebavila, mišično-skeletni, imunski in reproduktivni sistem (48). Pri govedu so klinični znaki zastrupitve s Pb nevrološke motnje, slepota, mišično trzanje, razdražljivost, depresija, krči, brušenje zob, ataksija ter kroženje in butanje z glavo. Dodatni znaki vključujejo prekomerno slinjenje, anoreksijo, zastoj v vampu in drisko, ki se izmenjuje z zaprtjem (3). Govedo, izpostavljen Pb, predstavlja vir kontaminiranih živil živalskega izvora (156, 178–181).

MTL se gibljejo med 10 mg/kg SS v krmi za glodalce, perutnino, prašiče, konje in ribe ter 100 mg/kg SS za govedo in ovce (3). Vsebnosti Pb v rastlinah na pašnikih in v pridelkih redko presegajo 5 mg/kg SS. Izpostavljenost živine je predvsem posledica uživanja zemlje med pašo na onesnaženih zemljiščih in uporabe kontaminirane krme. Posamezne zastrupitve pri živalih so lahko posledica zaužitja posamičnih krmil, ki izvirajo z onesnaženih območij (46). Pb je pogosto prisoten tudi v mineralnih krmah, ki vsebujejo fosfate. Ti lahko kljub določenim omejitvam v zakonodaji bistveno prispevajo k onesnaženosti krme (42, 182, 183).

Za Pb kot nezaželeno substanco v krmi so z Direktivo 2002/32/EC (56) in spremembou Priloge I k Direktivi, z Uredbo Komisije (EU) 2015/186 (57), postavljene najvišje mejne vrednosti. Vrednosti se gibljejo med 5 in 30 mg/kg (podano na 12 % vsebnost vlage) za popolne krmne mešanice in posamična krmila organskega izvora ter med 15 in 400 mg/kg

(podano na 12 % vsebnost vlage) za mineralne krmne mešanice ter posamična krmila in krmne dodatke, ki so vir elementa v krmi. Izvajanje zakonodaje EU, ki določa mejne vrednosti Pb v krmi, prispeva k omejevanju Pb v okolju, ki izvira iz iztrebkov živali (3).

2.6.18 Antimon

Antimon (Sb) je toksičen metaloid, zelo podoben As (184). Obstaja lahko v različnih oksidacijskih stanjih ($-3, 0, +3, +5$), vendar ga v okoljskih, bioloških in geokemičnih vzorcih večinoma najdemo v oksidacijskih stanjih $+3$ in $+5$ (185). Trivalentne spojine so bolj toksične kot petivalentne (186, 187). Sb in njegove spojine se štejejo za prednostne onesnaževalce v ZDA in EU (185, 188, 189).

Sb nima nobene znane biološke funkcije in je toksičen. Razumevanje njegove toksičnosti in vedenja v okolju je veliko bolj omejeno kot pri As (185, 190). Obstajajo dokazi, da se Sb v sesalcih za razliko od As ne razstruplja prek metilacije, še vedno pa ni jasno, kateri mehanizem je odgovoren za njegovo genotoksičnost. Vse antimonove soli po zaužitju povzročajo težke želodčne in črevesne motnje, ki se kažejo kot bruhanje in hude driske. Iz črevesja se slabo resorbirajo in se razmeroma hitro izločijo iz organizma (191, 192).

Vsebnosti Sb v rastlinah, ki rastejo na neonesnaženih tleh, se gibljejo med 2 in 50 µg/kg (193–195). Prenos iz tal in njegova akumulacija v rastlinah je nizka (196). Kljub visokim vsebnostim Sb v onesnaženih tleh se vsebnosti v preiskovanih rastlinah na splošno ujemajo z vsebnostmi, ki jih poročajo za neonesnažena tla (197). Tipične vsebnosti v rastlinah so prenizke, da bi vplivale na živali, ki te rastline uživajo, saj so toksične vsebnosti Sb v krmi za živino nad 50 mg/kg (190).

Vpliv Sb na okolje kljub že izvedenim raziskavam še vedno ni popolnoma razumljen in številna vprašanja o biološkem obnašanju Sb ostajajo neodgovorjena. Nujno je treba izboljšati naše znanje o biokemiji Sb in o tveganjih, povezanih z njegovo navzočnostjo v okolju. Sb lahko štejemo za tipičen na novo nastajajoč kontaminant, ki se uvršča med resne onesnaževalce za prihodnje generacije (196, 198).

2.6.19 Selen

Selen (Se) je eden najbolj nasprotujočih si elementov v sledovih. Po eni strani je zelo toksičen v visokih odmerkih, po drugi strani pa je pomanjkanje Se pri živalih in ljudeh zaradi esencialnosti globalna težava, povezana s povečano občutljivostjo organizmov za različne bolezni. V literaturi obstaja tudi velika količina informacij, povezanih s kontaminacijo okolja s Se (199). Za razliko od drugih elementov v sledovih je Se element z zelo ozkim območjem med pomanjkanjem, fiziološkim stanjem in toksično količino (83, 200).

Se se nahaja v isti periodni skupini kot žveplo (S) in ima podobno strukturo in lastnosti, tako da ga lahko zamenjuje v aminokislinah. Se je esencialni element za živali zaradi vloge pri encimu glutation peroksidaza. Ta encim ščiti celične membrane pred poškodbami, ki jih povzroča peroksidacija lipidov (201–203). Selen kot esencialni element svojo funkcijo opravlja v obliki seleno proteinov, vodikovih selenidov in metiliranih selenovih spojin. Posledice pomanjkanja so inducirana miodistrofija, omejena funkcija jeter in trebušne slinavke ter zavrite reprodukcijske sposobnosti (204). Že pred desetletji so ugotovili, da je glavni klinični znak pomanjkanja Se pri domačih živalih mišična distrofija, tako imenovana bolezen belih mišic (ang. white muscle disease) (138).

Se v prevelikih količinah lahko povzroči zastrupitev (selenozo) pri ljudeh in živalih. Čeprav je bilo izvedenih mnogo raziskav o toksičnosti Se pri živalih, njegov način delovanja na celični in molekularni ravni še ni popolnoma znan. Nedavno je bilo predlagano, da je lahko toksičnost Se posledica interakcije med selenitom in glutationom, ki tvorita reaktivne selenotrisulfide, posledično pa tudi toksične superokside in vodikov peroksid (205). Zastrupitve s Se navadno izvirajo iz zaužitja rastlin (206), ki vsebujejo povišane vsebnosti tega elementa. Simptomi zastrupitve pri živalih so lahko šepanje, napenjanje, prebavne stiske, mišična distrofija, odpoved dihal, nestabilno gibanje, izguba grive, slinjenje, paraliza, okvara vida, hujšanje, nenormalna rast parkljev oziroma kopit in oslabitev imunskega sistema (102, 138). Mlade živali so bolj občutljive na toksičnost selena kot odrasle in stare živali. MTL v krmi za prežvekovalce je 5 mg/kg SS (3).

V krmi rastlinskega izvora so glavne selenove spojine selenove aminokisline (50–85 %), mineralne mešanice, ki se dodajajo v krmo, pa vsebujejo anorganske in organske oblike Se (112). V povprečju je priporočljiv dodatek Se od 0,1 do 0,3 mg/kg SS. Se lahko živalim

dodajamo z obogatitvijo krmnih rastlin, dodajanjem selenovih spojin v krmo ali pa z neposrednim vbrizgom živalim (200, 207).

Krmni dodatki, ki so vir Se in so v uporabi v EU, obravnava Uredba (ES) št. 1831/2003 (111) o dodatkih za uporabo v prehrani živali in njene dopolnitve ter register krmnih dodatkov (112). Najvišja dovoljena vsebnost Se v popolnih krmnih mešanicah je 0,5 mg/kg krme (podano na 12 % vsebnost vlage) za vse navedene skupine živali (112). Izvajanje zakonodaje EU o določitvi najvišje vsebnosti Se v popolnih krmnih mešanicah je nujno, saj se s tem omejuje tudi škodljiv vnos Se v tla in vodno okolje, ki izvira iz živalskih iztrebkov (3).

2.6.20 Kositer

Za kositer (Sn) še ni dokazano, da je esencialni element pri živalih in ljudeh. Organske kositrove spojine so bolj toksične kot anorganski Sn (3). V preteklih letih so bile organske in anorganske kositrove spojine uporabljene v številne različne namene, kot so fungicidi, stabilizatorji za plastiko, moluskicidi in uničevalci pršic, poleg tega pa so bili predlagani tudi kot kemosterilizanti insektov in v druge industrijske namene (208–210). Na splošno je uporaba pesticidov v kmetijstvu, ki vsebujejo organske kositrove spojine, tudi potencialni vir onesnaževanja okolja (211).

Anorganske kositrove spojine niso zelo toksične, in sicer zaradi nizke topnosti, slabe absorpcije, nizke akumulacije in hitrega izločanja iz organizma. Nasprotno pa lahko sintetične organske kositrove spojine, ki so jih komercialno začeli izdelovati po letu 1960, predstavljajo različne težave za živali, vključno s spremembami vedenja in počasnejšo rastjo, slabšim preživetjem in razmnoževanjem. Koncentracije organskih kositrovih spojin se nevarno višajo v vodnih okoljih in ogrožajo vodne organizme (212).

Izpostavljenost domačih živali visokim vsebnostim anorganskega Sn je zaradi zgoraj omenjenih razlogov malo verjetna. Živali, ki jim primanjkuje Zn ali Cu, so najbolj občutljive na kronično povišane odmerke anorganskega Sn. Znaki toksikoz, povzročenih z anorganskim Sn, vključujejo atrofijo trebušne slinavke, hipertrofiran prebavni trakt, povečano število spremenjenih celic v tankem črevesu, zaviranje rasti zaradi Zn antagonizma, anemijo in zmanjšanje hematokrita (24).

Za večino živalskih vrst je MTL za Sn 100 mg/kg SS (3). Vsebnosti Sn v pašniških rastlinah so v območju od 0,3 do 0,4 mg/kg SS, v žitaricah pa od 5,6 do 7,9 mg/kg SS (23). Sn v krmi nima nobenega vpliva na okolje (3).

2.6.21 Stroncij

Stroncij (Sr) velja za neesencialni element. Spada v skupino alkalijskih kovin in ima podobne fizikalne in kemijske lastnosti kot Ca. Večina absorbiranega Sr, kar 99 %, se pri živalih deponira v kosteh in zobeh (213, 214). Zaradi podobnih lastnosti lahko nadomesti Ca v kosteh (213, 215, 216). Študije na različnih vrstah živali in ljudeh kažejo, da nizke koncentracije Sr zavirajo resorpcijo iz kosti in/ali stimulirajo tvorbo kosti (217–220).

Sr bi lahko izzval toksične učinke pri živalih le ob izredno visokih peroralnih odmerkih. MTL v krmi za govedo je 2000 mg/kg SS (3). Prekomerno zaužitje Sr bi lahko motilo presnovo Ca. Vnos Sr, ki povzroči znake toksičnosti, je odvisen od vnosa Ca in kadar je prehranjenost s Ca ustrezna, imajo živali visoko toleranco do Sr. Študije pri mladih in rastočih živalih so pokazale, da se v primeru krmljenja z visoko vsebnostjo Sr v kombinaciji z nizko vsebnostjo Ca pojavi stroncijev rahitis (3).

Večina Sr je prisotna v otrobih in ne v endospermu zrn. Vnos Sr je ponavadi večji s stročnicami in ne s travnato voluminozno krmo. V ljljki se vsebnosti Sr gibljejo med 5 in 18 mg/kg SS (povprečje 10), v senu pa so v povprečju 9,4 mg/kg SS (3). Vsebnost Sr v posamičnih krmilih je v primerjavi z drugimi mineralnimi dodatki običajno nizka (221). Na splošno imajo sestavine krme mineralnega izvora višjo vsebnost Sr. Največ so ga določili v apnencu, kar 329 mg/kg. Večina krmnih mešanic ga vsebuje pod 20 mg/kg, kar je premalo za vpliv na skeletno trdnost pri živalih in ljudeh. Browning in Cowieson tako predvidevata, da bi ta element lahko v prihodnosti redno dodajali v krmo kot dodatno mikrohranilo za izboljšanje trdnosti kosti (221). Za zdaj ocene v literaturi ne kažejo nobenega vpliva Sr iz živalske krme na okolje (3).

2.6.22 Titan

Titan (Ti) je glede na pogostost nahajanja v litosferi in tleh podoben Al. V rastlinah in živalih se slabo absorbira in akumulira, tako da so vsebnosti v tkivih veliko manjše kot v okolju, ki so mu organizmi izpostavljeni (83). Vsebnosti Ti v vzorcih rastlin se lahko uporabijo kot pokazatelj navzočnosti zemlje, saj so vsebnosti Ti v zemlji običajno do 10.000-krat višje kot v nekontaminiranih vzorcih rastlin (83). Vzorci rastlin, ki niso kontaminirani z zemljo, v povprečju vsebujejo manj kot 1 mg/kg Ti (222).

V nasprotju s TiO_2 , titanov ion TiO^{2+} zaradi antibakterijske aktivnosti izboljša rast sesalcev v mladostni dobi (223–228). Nagy in sod. so poročali, da je dodajanje Ti kot Ti (IV) askorbatnega kompleksa v krmo mladih prašičev izboljšalo njihovo rast (224). Najboljši vir Ti je mleko, kamor najverjetneje pride iz zemlje in prahu, kjer ga je veliko več kot v krmi in vodi (229). TiO^{2+} iz zemlje, ki jo živali zaužijejo s krmo, preide v telo (228) in z mlekom postane dostopen mladičem.

Ti in njegove fiziološke vloge so slabo poznane. Ne velja za esencialni element, čeprav je bilo pri eksperimentalnih živalih dokazano, da spodbuja rast mladih živali. Akumulira se v organih živali, in sicer bolj v mladosti kot v starosti (225).

2.6.23 Talij

Talij (Tl) je neesencialni in v enovalentnih in trivalentnih oblikah toksičen element za rastline, živali, ljudi in mikroorganizme (230). Čeprav je Tl močno toksičen element (njegovo toksičnost lahko primerjamo s toksičnostjo cianida (231)), so ga preiskovali v precej manjšem obsegu kot nekatere druge elemente v sledovih (Pb, Cd, Hg) (232, 233). Razlog je predvsem v tem, da ga je s klasičnimi analiznimi metodami težko določati (232). Pri živalih najdemo Tl v intra- in ekstracelularnih tekočinah kot monovalentni kation. Ker je njegov ionski radij podoben ionskemu radiju kalija (K), lahko Tl posnema K v metabolnih procesih. To je prvi mehanizem za toksičnost Tl pri živalih. Tl je prav tako sposoben tvoriti komplekse s tiolnimi in fosfatnimi ligandi (234). Po drugem mehanizmu se Tl veže na različne proteine in deaktivira njihove komponente, ki so ponavadi kofaktorji pri reakcijah, kataliziranih z encimi (235). Poleg tega lahko monovalentni kation z afiniteto do SH-skupin povzroči motnje metabolizma in energijskih procesov v celicah živali (231).

Tl se je v preteklosti v veliki meri uporabljal kot rodenticid in insekticid. Z uporabo Tl pripravkov je bilo nemamerno zastrupljenih veliko divjih in domačih živali, zato je njihova uporaba od leta 1972 prepovedana (236). Kronične zastrupitve s Tl pri živalih povzročajo motnje živčnega, srčnega, žilnega in razmnoževalnega sistema, pa tudi anomalije na koži in izgubo dlake (237). Raziskave kažejo, da obstaja resna nevarnost kontaminacije okolja s Tl, kar lahko povzroči kopičenje tega elementa pri živalih in v živilih živalskega izvora (238).

Tl je tudi za rastline zelo toksičen, poleg tega pa ga rastline z lahkoto sprejmejo. Škodljivi učinki se na rastlinah kažejo kot upočasnjena razvoj korenin in zastoj rasti, lahko pa povzroči tudi klorozo. Škodljiv vpliv se kaže tudi v razvoju semen in zmanjšani sposobnosti kalitve (239). Tl se v majhnih količinah prenaša na kmetijska zemljišča s komunalnim blatom in s kalijevimi gnojili (232, 240). Medtem ko so vsebnosti Tl v tleh v Evropi (230, 241), Kanadi in ZDA (242, 243) ter na Kitajskem (244) dobro opisane v literaturi in se gibljejo med 0,17 mg/kg in 6,9 mg/kg, pa smo za vsebnosti Tl v krmi našli le nekaj podatkov. Poročane vsebnosti Tl v užitnih rastlinah se gibljejo med 0,02 in 0,125 mg/kg, v detelji med 0,008 in 0,01 mg/kg ter v senu med 0,02 in 0,025 mg/kg (232, 240).

Mejnih vrednosti za ta element v zakonodaji ali priporočilih za kmetijstvo še ni. Zaradi visoke toksičnosti že nizkih količin Tl za ljudi in živali bo treba okrepliti pritisk na oblikovanje zakonodaje in določiti mejne vrednosti v tleh, vodi, rastlinah, živilih in krmi (239).

2.6.24 Vanadij

Vanadij (V) je prehodni element in se v naravi nahaja v okoli 70 mineralih. Njegova najpogostejsa oksidacijska stanja so +3, +4 in +5. Za raziskave postaja zanimiv zaradi esencialnosti in vse večjih izpustov v okolje iz antropogenih virov, zato predstavlja mogoče tveganje za obdelovalne površine, rastline, živali, vodne vire in ljudi (245).

Vanadij (V) so označili za esencialni element za živali (129, 246). Pomanjkanje V je povezano s počasnejšo rastjo, slabšo plodnostjo, spremenjeno tvorbo rdečih krvnih celic in metabolizmom Fe ter s spremembami v ravni lipidov v krvi. Nekatere študije so pokazale, da je V pomemben del večjih encimskih sistemov in kompleksov v živih organizmih. Ob tem so odkrili tudi, da V lahko zamenja Mo v nitrifikacijskih bakterijah. Encimi, povezani z

V, lahko delujejo tudi v pogojih s pomanjkanjem Mo in tudi ob pomanjkanju Mo-Fe encimov (247).

MTL v krmi za govedo je 50 mg/kg SS (3). Glavni klinični znaki, povezani s toksičnostjo V, so zmanjšanje telesne mase rastočih živali, izguba mase odraslih živali in smrt (24). Toksičnost V soli narašča z oksidacijskim stanjem, tako da so petivalentne oblike najbolj toksične (245, 248, 249). V prehrani živali največjo skrb vzbuja navzočnost V v fosfatih, ki se uporabljajo kot vir fosforja. Nekateri fosfati lahko vsebujejo tudi do 6000 mg/kg V. Pašne živali lahko dobijo večje količine V z zaužito zemljo (3).

2.6.25 Cink

Cink (Zn) je bil kot esencialni element za sesalce prepoznan že leta 1934. Kljub temu je preteklo več kot dvajset let do prvih opisov pomanjkanja Zn pri farmskih živalih. V 60. letih prejšnjega stoletja so odkrili, da dodajanje Zn v krmo lajša znake parakeratoze pri pašnem govedu in ovcah. V zadnjih 35 letih je bilo ugotovljeno, da približno polovica pridelovalne zemlje na svetu vsebuje premalo Zn in zato primanjuje Zn v rastlinah (250).

Pri živalih je Zn esencialna komponenta več kot 200 encimskih sistemov, ki sodelujejo pri presnovi ogljikovih hidratov, beljakovin in nukleinskih kislin, pri obnovi celic in njihovi delitvi ter pri transportu in izkoriščanju vitaminov A in E. Poleg tega igra Zn glavno vlogo v imunskem sistemu in nekaterih reproduktivnih hormonih (251). Hudo pomanjkanje Zn lahko pri živalih povzroči upočasnjeno rast, zmanjšanje zauživanja krme, izgubo dlake, kožne spremembe, ki so najhujše na nogah, vratu, glavi in okoli nosnic, prekomerno slinjenje in slabšo reprodukcijo. Tako pomanjkanje Zn pri živalih je redko, je pa bilo opaženo pri pašnih živalih. Obseg marginalnega in subkliničnega pomanjkanja ni znan, vendar pa je verjetno zelo razširjen. Na podlagi študij z dodajanjem Zn v krmo je bilo ugotovljeno, da subklinično pomanjkanje lahko povzroči motnje reprodukcije in zmanjšano telesno težo živali (252). Cu, Cd, Ca in Fe zmanjšujejo absorpcijo Zn in ovirajo njegov metabolizem (253, 254).

Gospodarsko pomembne živali kažejo veliko toleranco do prevelikega vnosa Zn. Znaki toksičnosti se pokažejo, če vsebnosti Zn v krmi presežejo 1000 mg/kg SS. Prežvekovalcji so bolj dovetni za toksičnost Zn kot druge vrste živali, ker visoke vsebnosti Zn vplivajo na

presnovo v vampu, najverjetneje zaradi toksičnih vplivov na tam prisotne mikroorganizme (24). MTL v krmi za govedo je 500 mg/kg SS (3). Začetni znaki zastrupitve s Zn pri živalih so zmanjšanje zauživanja krme, slabša rast in sekundarno pomanjkanje drugih elementov, kot je npr. Cu (24).

Priporočena vsebnost Zn v obroku za krave molznice je od 40 do 60 mg/kg (254, 255). V praksi pa proizvajalci dodajajo večje količine Zn zaradi že prej omenjenih antagonističnih učinkov drugih elementov in različne izkoristljivosti cinkovih spojin (256). Krmni dodatki, ki so vir Zn in so v uporabi v EU, obravnava Uredba (ES) št. 1831/2003 (111) o dodatkih za uporabo v prehrani živali in njene dopolnitve ter register krmnih dodatkov (112). Najvišja dovoljena vsebnost Zn v popolnih krmnih mešanicah je za navedene skupine živali različna in se za posamezne vrste giblje med 120 mg/kg krme in 200 mg/kg krme (podano na 12 % vsebnost vlage) (112). Zn se dodaja v krmo živali (Slika 2) v anorganskih oblikah (cinkov oksid ali cinkov sulfat) in organskih oblikah. Najnovejše raziskave kažejo, da je absorpcija Zn iz organsko vezanih Zn dodatkov boljša kot iz anorganskih cinkovih spojin (256–260).

Van Paemel in sodelavci v poročilu navajajo, da Zn v krmi nima nobenega vpliva na okolje (3), nedavne raziskave pa kažejo, da lahko bakterije v tleh in pri farmskih živalih razvijejo rezistenco na Zn in Cu in s tem na antimikrobna zdravila. Predvideva se, da se z gnojenjem pašnikov ta dva elementa v tleh akumulirata in posredno povečujeta možnost rezistence na antibiotike (261).



Slika 2: Govedo med krmljenjem (Bandelj P., 2015)

Figure 2: Cattle during feeding (Bandelj P., 2015)

2.7 OBSTOJEČI KRITERIJI ZA ELEMENTE V OBROKIH ZA GOVEDO

V Tabeli 1 so za posamezne elemente navedeni naslednji podatki iz literature: vsebnosti, pri katerih se pojavlja pomanjkanje esencialnih elementov pri govedu (262), stopnje vsebnosti posameznih elementov v obrokih (129) in MTL-ji (24). Prav tako so v Tabeli 1 zbrane najvišje dovoljene vsebnosti nezaželenih elementov (As, Cd, Hg, Pb) v obrokih za govedo, ki so v evropski zakonodaji določene z Direktivo 2002/32/EC (56) in njenimi dopolnitvami, v Uredbi komisije (EU) št. 2015/186 (57) in Uredbi komisije (EU) št. 1275/2013 (101).

Elemente, ki se v krmo dodajajo (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, Zn), obravnava Uredba (ES) št. 1831/2003 (111) o dodatkih za uporabo v prehrani živali in njene dopolnitve. V skladu s to uredbo obstaja register krmnih dodatkov (112), ki se redno posodablja in v katerem so zbrani proizvodi, ki se uporabljajo kot krmni dodatki, s povezavami do njihovih dovoljenj, pa tudi proizvodi, za katere dovoljenja ne veljajo več ali so v postopku za pridobitev dovoljenja. Dovoljenja vključujejo opis dodatka in njegove uporabe, omejitve glede uporabe, najvišje dovoljene vsebnosti elementov (celokupno) v krmi ciljnih živalskih vrst in analizno metodo za uradni nadzor. Dovoljenja so v skladu z Uredbo (ES) št. 1831/2003 (111) že obnovljena za proizvode, ki vsebujejo Co, Zn in I ter nekatere bakrove in manganove spojine, za preostale proizvode, ki vsebujejo Cu, Fe, Mn, Se, pa so še v postopku reevalvacije. Ali so elementi esencialni in kakšen vpliv imajo na zdravje živali, smo prav tako povzeli po NRC (24).

Tabela 1: Obstojec kriteriji za posamezne elemente v obrokih za govedo

Table 1: Existing criteria for individual elements in cattle meals

	Esencialnost	Vpliv na zdravje živali	Pomanjkanje (ng/kg SS)	Vsebnosti v obroku (mg/kg SS)		MTL (mg/kg SS)	Najvišja vsebnost* (%)	Zakonodaja EU (*)
				normalno	visoko	toksično	ni (100 za perutino in svinje)	
Ag	Ne	Nizek	<300			>1200	1000	2015/186
Al	Ne	Nizek	ni določeno				30	
As	Verjetno	Srednje Srednje	ni določeno ni določeno	1–50 0,5–20	50–150 >20	>200	150	
B	Verjetno	Nizek	Nizek				ni (100 za perutino in svinje) ni podatkov	
Be	Ne	Nizek	Visok	0,01–0,5 0,1–1	5–50 4–20	>50 >30	10	1 1275/2013 1 131/2014
Cd	Ne	Nizek	Nizek	0,1–0,5	4–20	>40	25	
Co	Da	Nizek	Nizek	<0,1	10–25		100	
Cr	Da	Visok	Visok	<10	1000–2000		40	35 2016/2261
Cu	Da	Srednje	Srednje	<40	100–500	1–5	500	750 2112/2003
Fe	Da	Visok	Visok	<0,01–0,1	1–5	4–30	ni (0,2 za perutino in svinje) 25	0,1 2015/186
Hg	Ne	Nizek	Nizek	<25	40–200	1000	>2000	
Li	Ne	Nizek	Nizek	<0,1	0,5–3,5	>5	>10	
Mn	Da	Visok	Nizek	<0,1	1–10	50–1000	>1500	
Mo	Da	Nizek	Nizek	<1	<1	5–50	>100	
Ni	Verjetno	Visok	Visok				100	
Pb	Ne	Nizek	Nizek				100	
Sb	Ne	Visok	Nizek				ni omenjen za govedo	
Se	Da	Nizek	Nizek				5	
Sn	Ne	Nizek	Nizek				100	
Sr	Ne	Nizek	Nizek				2000	
Ti	Ne	Nizek	Nizek				ni omenjen za govedo	
Tl	Ne	Visok	Nizek				ni podatkov	
V	Verjetno	Visok	Ni določeno	<0,5	1,5–50	330	500	0,5 2015/489
Zn	Da	Srednje	<25	50–100	600–5000	>5000	500	120 2016/1095

* najvišje vsebnosti so podane v mg/kg pri krmi z 12 % vsebnostjo vlage, razen za Fe in Mo, pri katerih so podane v mg/kg obroka

2.8 TEHNIKE DOLOČANJA VSEBNOSTI ELEMENTOV

Tehnike, ki se najpogosteje uporabljajo za določanje vsebnosti elementov, so atomska absorpcijska spektrometrija (AAS), elektrotermična atomska absorpcijska spektrometrija (ET-AAS), optična emisijska spektrometrija z indukcijsko sklopljeno plazmo (ICP-OES) in indukcijsko sklopljena plazma z masno detekcijo (ICP-MS). Najpomembnejši prednosti ICP-MS pred drugimi tehnikami sta, da omogoča istočasno določanje želenih elementov v različnih koncentracijah. To pomeni, da je čas analize posameznega vzorca kratek in neodvisen od števila določevanih elementov in da omogoča določanje elementov v nizkih koncentracijah (reda velikosti $\mu\text{g}/\text{kg}$ ali manj). Določanje elementov je tudi s to tehniko težavno predvsem zaradi narave matriksa in interferenc pri merjenju. Posebno težavo pri določanju vsebnosti elementov z ICP-MS predstavljajo poliatomske interference, vendar pa so te znane in jih je mogoče odpraviti z orodji, ki so vgrajena v instrument. S tem se izognemo težavam, ki v zelo zahtevnih matriksih, kot so krma in živila, otežujejo določevanje elementov z drugimi tehnikami. V literaturi so dobro opisane metode za določanje elementov z ICP-MS v živilih (263–269), ne pa tudi za krmo. Za krmo obstajata metoda za določanje Fe, Cu, Mn in Zn v sledovih z AAS (14) in evropski standard SIST EN 15510:2007 za določanje Ca, Na, P, Mg, K, Fe, Zn, Cu, Mn, Co, Mo, As, Pb in Cd z ICP-AES (270). Uradnih metod za določanje elementov z ICP-MS v krmi ni.

2.8.1 Priprava vzorcev

Kislinski razklop vzorcev je pomembna tehnika za pripravo vzorca v raztopini. Tehnika temelji na razkroju vzorca s kislino ali mešanico kislin, ki se izvaja v odprtih posodah ali lončkih, na vroči plošči (kuhalniku) in v aluminijastih grelnih blokih ali v zaprtih posodah (razklopne bombe) pri povečanem tlaku s termičnim ali mikrovalovnim segrevanjem (271). Največ se uporablja H_2SO_4 in HClO_4 v kombinaciji s HNO_3 . HClO_4 lahko z organskim materialom tvori eksplozivne perklorate, zato je večinoma izginila iz uporabe zaradi varnostnih razlogov. Ker je za celoten razklop potrebna razmeroma velika količina kisline, je včasih problem kontaminacija. V preteklosti se je razklop izvajal v odprtih posodah, pri čemer so se lahko vzorci iz okolja kontaminirali. Najbolj uporabljeni tehnika danes je razklop v zaprtih posodah pod pritiskom, z uporabo HNO_3 same ali pa v kombinaciji s H_2O_2 .

Prevladuje razklop vzorcev v zaprtih plastičnih ali steklenih/kvarčnih lončkih s pomočjo mikrovalov (MW). Razvoj mikrovalovne tehnike gre v smeri višjih pritiskov in temperatur, kar je pomembno v aplikacijah, kjer je potrebna popolna razgradnja organske snovi. Ostanki organskih snovi lahko povzročijo interference pri določanju analitov zaradi spremenjene viskoznosti raztopine vzorcev ali pa kemijske interference (272).

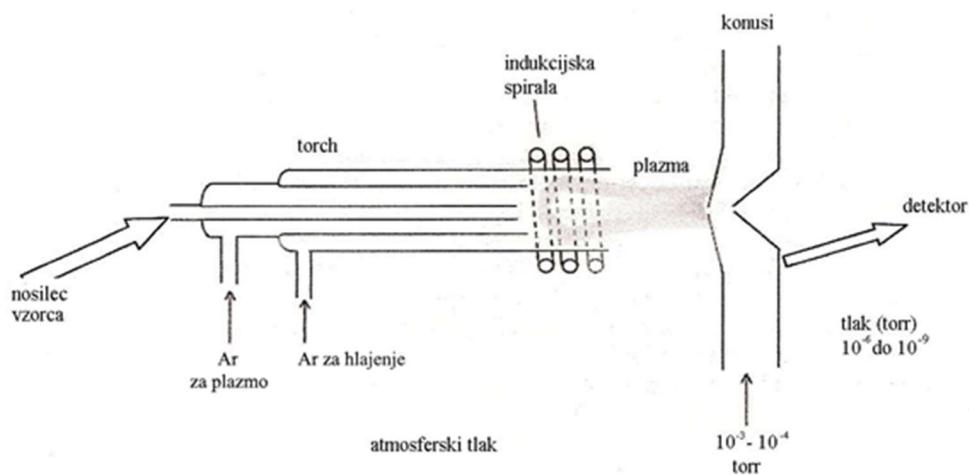
Tip kisline, ki jo uporabimo za razklop, ima pomembne posledice pri merjenju. Splošno znano je, da je HNO_3 najbolj zaželena pri vseh atomskih spektrometričnih tehnikah (273). HCl ne povzroča težav pri ICP-OES, vendar pa ni zaželena pri analizah z ET-AAS zaradi možnosti ustvarjanja hlapnih in težko dissociiranih kloridov, ki bi lahko vplivali na plinasto fazo in/ali spektralne interference. Zaradi visoke viskoznosti H_2SO_4 se njeni uporabi ponavadi izognemo, čeprav je pri razgradnji organskih matrikov zelo učinkovita. Njena uporaba je še posebej nezaželena pri analiznih tehnikah, kjer je način uvajanja vzorca razprševanje (ang. nebulization), to pa so plamenska atomska absorpcijska spektrometrija (FAAS), ICP-OES in ICP-MS (271).

2.8.2 Induktivno sklopljena plazma z masno detekcijo (ICP-MS)

Najpomembnejši sestavni deli masnega spektrometra so: sistem za uvajanje vzorca, izvor ionov, analizator, detektor, vakuumski sistem in sistem za sprejem in obdelavo podatkov (274, 275). Induktivno sklopljena plazma (ang. inductively coupled plasma, ICP) nastane v bakli (ang. torch), ki je sestavljena iz treh koncentričnih cevi, običajno izdelanih iz kvarca. Konec bakle je vstavljen v indukcijsko spiralo, ki ji dovajamo radiofrekvenčni električni tok (Slika 3). Tok argona dovajamo po dveh zunanjih ceveh in z dovajanjem električne iskre za kratek čas uvedemo proste elektrone v tok plina, ki jih pospešujemo z izmeničnim magnetnim poljem, ki se inducira v indukcijski spirali z dodano radiofrekvenco (27,12 ali 40,68 MHz) (274, 275).

Pospešeni elektroni trčijo z atomi argona, zaradi česar argonovi atomi izgubijo enega od svojih elektronov. Sproščeni elektroni se pospešijo s hitro menjajočim se magnetnim poljem. Nastala plazma (ICP) je večinoma sestavljena iz argonovih atomov in majhne frakcije prostih elektronov in argonovih ionov. Temperatura plazme je okoli 10.000 K. ICP

vzdržujemo neprekinjeno v kvarčni bakli s primernim dotokom argona v obeh zunanjih ceveh (274, 275).

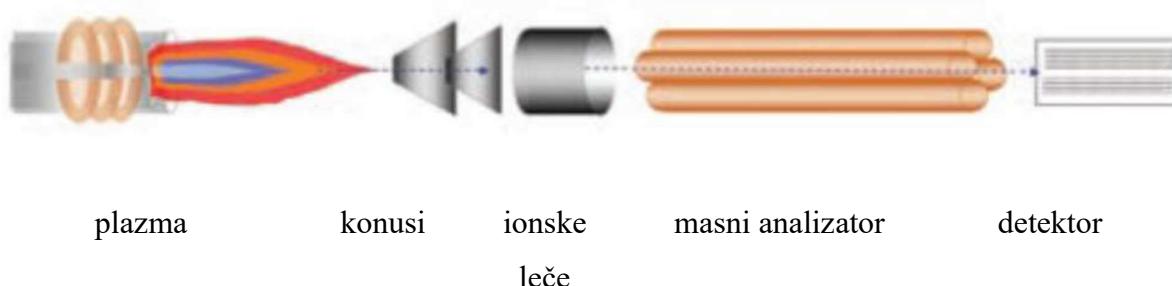


Slika 3: Shematski prikaz nastanka plazme (Pavšič P., 2013)

Figure 3: Schematic presentation of the formation of the plasma (Pavšič P., 2013)

Tok argona, ki ga imenujemo pomožni tok (ang. intermediate/auxiliary flow), uvajamo zato, da se plazma ne dotika konca centralne cevi. Tok argona iz razpršilca (ang. nebuliser flow) uvajamo v srednjo cev bakle, ki potuje skozi središče plazme, kjer ustvari kanal, ki je hladnejši kot obdajajoča plazma. Vzorce za analizo uvajamo s pomočjo argona v ta centralni kanal v obliki aerosola z ustreznim razpršilcem (pnevmatiskim ali ultrazvočnim). Ko kapljica razpršenega vzorca vstopi v centralni kanal ICP, se upari, pri visokih temperaturah v plazmi pa se atomi elementov ionizirajo. Stopnja ionizacije je odvisna od ionizacijskega potenciala določenega elementa. Za elemente, ki jih je lahko ionizirati (npr. Na), je stopnja ionizacije lahko tudi 100 %. Ker se plazma generira na atmosferskem tlaku, masni spektrometer pa deluje pod visokim vakuumom, je zelo pomemben prostor med ICP in MS, kjer se mora ustvariti vakuum za MS. Del nastalih ionov potuje skozi dva konusa (ang. sampler cone (~1 mm premera) in ang. skimmer cone (~0,8 mm premera)), ki omogočata vzpostavitev ustreznega vakuma v masnem spektrometru. Konusa med seboj ločujeta dela aparature, ki delujeta pri atmosferskem tlaku (ionski izvor) in pod vakuumom (MS). Običajno sta narejena iz Ni ali Pt. Vakuum vzdržujemo z večstopenjskim črpanjem. Za prvo stopnjo vakuumiranja se uporablja rotacijske črpalke, za ustvarjanje visokega vakuma pa turbomolekularne

črpalke. Ionski žarek se prek ionske optike usmeri v analizator in ustrezen sistem za detekcijo (274, 275).



Slika 4: Poenostavljen prikaz sistema ICP-MS (Pavšič P., 2013)

Figure 4: A simplified view of the ICP-MS sistem (Pavšič P., 2013)

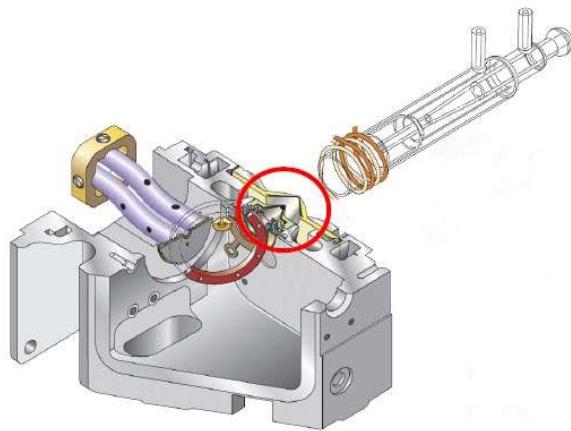
Analizatorji, ki se uporabljajo pri ICP-MS, so kvadrupolni (ang. quadrupole ICP-MS, Q-ICPMS), multikolektorski (ang. multi collector ICP-MS, MC-ICPMS) in analizatorji, ki delujejo na principu časa preleta ionov (TOF) (ang. time of flight ICP-MS, TOF-ICPMS). Za detekcijo ionov se uporablja Faradayeva kletka (ang. Faraday cups) in sekundarni elektronski pomnoževalniki. V sistemih ICP-MS se vse operacije masnega spektrometra nadzoruje z računalnikom, ki omogoča *on-line* sprejemanje podatkov in procesiranje (274, 275).

2.8.2.1 Kolizijsko/reakcijske celice in ICP-MS

Pri določanju elementov z nizkimi masami s Q-ICPMS nastajajo izobarne interference iz poliatomskih oksidov, hidridov, hidroksidov in zvrsti, ki vsebujejo argon. To nastane zaradi visoke temperature plazme, ki vodi do ionizacije vseh elementov v raztopini. Eden od pristopov za zmanjšanje teh interferenc je uporaba masnih spektrometrov z visoko ločljivostjo. Drugi pristopi so desolvatacija vzorca, s katero odstranimo vodno paro in s tem zmanjšamo interference, nastale zaradi vode (oksiidi, hidroksiidi); hladna plazma (moč plazme 600 W, namesto 1300 W) in uporaba kolizijsko/reakcijskih celic (npr. mešanica $H_2 + Ar$ kot reaktivna kolizijska plinska mešanica za redukcijo ArO^+ in ArN^+). Ena od teh celic

je dinamična reakcijska celica (ang. dynamic reaction cell, DRC), ki je sestavljena iz kvadrupola, nameščenega med ionske leče in masni analizator. V celicah se odvisno od analita in izobaričnih interferenc uporablja veliko različnih plinov, npr. He, Ne, Xe (kot kolizijski plini); H₂, NH₃, CH₄, N₂ in Xe (kot plini z izmenjevanjem naboja); O₂, N₂O, NO in CO₂ (kot oksidacijsko reaktivni plini) ter H₂ in CO (kot reduktivni plini). Pri tem potečejo različne reakcije, ki so lahko prenos H atoma (v primeru uporabe H₂), prenos naboja, oksidacija, itd. Namen reakcije med ionom in molekulo je kemijsko spremeniti maso izobarne interference ali analita (276).

Drug primer celic za odpravo interferenc, ki so vgrajene v sodobne instrumente, je kolizijsko/reakcijski modul (ang. collision/reaction interface, CRI). Pri njem vpihujemo plina He ali H₂ v prostor med obema konusoma, kot je prikazano na Sliki 5 (277).



Slika 5: Primer CRI-modula za odpravo interferenc pri ICP-MS (277)

Figure 5: An example of CRI module for interferences elimination in ICP-MS (277)

2.8.3 Obvladovanje interferenc

2.8.3.1 Spektralne interference

Spektralne interference so posledica omejene masne ločljivosti masnih spektrometrov. Te so posledica izobar, dvojno nabitih ionov, poliatomskih ionov (kot so oksidi (MO^+), hidroksidi (MOH^+), argidi (ArM^+), ki imajo enako nominalno razmerje med maso in nabojem (ang. nominal mase-to-charge ratio, m/z) kot nuklid, ki ga določamo. Prekrivanje izobar je

enostavno predvideti in preprečiti z izbiro alternativnih izotopov ali z uporabo elementnih korekcijskih enačb, ki temeljijo na relativni naravni pogostnosti. Dvojno nabitni delci se do neke mere tvorijo samo z elementi z nizkimi drugimi ionizacijskimi energijami (IE) (278).

Poliatomski ioni lahko izvirajo iz plazme, vstopnega zraka, topila ali matriksa. V prvem primeru se interference lahko korigirajo z odštevanjem vsebnosti v slepem vzorcu. V zadnjem primeru je rešitev teh problemov, ki se pojavi večinoma pri $m/z \leq 80$ in v kompleksnih matriksih, veliko težja, predvsem s kvadrupolnimi instrumenti (278). Ogljik (C), kalcij (Ca) in klor (Cl) so najpomembnejši elementi, ki tvorijo naslednje interference: $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$ z ^{51}V , $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ s ^{52}Cr , $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}$ in $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}$ s ^{53}Cr , $^{40}\text{Ca}^{16}\text{OH}$ z ^{57}Fe , $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}$ s ^{59}Co , $^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}$ z ^{60}Ni , $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ z ^{75}As , $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$ s ^{77}Se (279).

Obstaja mnogo predlogov za preprečitev spektralnih interferenc, ki jih povzročajo poliatomske zvrsti iz matriksa. Za večizotopske elemente je najboljša rešitev izbira alternativnega izotopa, če je le dovolj naravno prisotnega, da ga lahko zaznamo s sprejemljivo občutljivostjo. Spremembe v nastavitvah instrumenta (moč RF, tok nosilnega aerosolnega plina) lahko zmanjšajo raven oksidov. Z desolvacijo dosežemo zmanjšanje nastanka oksidov in hidroksidov. Izvedemo jo lahko na različne načine, kot so hlajenje razpršilne komore, uporaba membranskih vmesnikov ali kriogenih desolvacijskih naprav. Naslednji način odprave interferenc zaradi matriksa je uvedba ustreznih postopkov za pripravo vzorcev. Ločitev matriksa od analita, na primer z uporabo mikrokolon ali z uparevanjem analitov, pri katerem nastanejo hidridi, se prav tako uporablja za zmanjševanje interferenc. Naslednja rešitev je uporaba alternativnega sistema za uvajanje vzorcev, kot je ultrazvočno razprševanje (ang. *ultasonic nebulisation*, UN) (278).

Namesto opisanih postopkov lahko uporabimo korekcijske enačbe, in sicer na dva načina: (i) direktno merjenje analoga izotopa poliatoma, ki moti določitev (na primer korekcija $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ interference z merjenjem signala $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$ pri $m/z 77$ in uvedba korekcije na znanih izotopskih razmerjih med ^{35}Cl in ^{37}Cl), ali pa (ii) indirektno merjenje signala podobne zvrsti, kot je spremeljanje signala klora med analizo in upoštevanje korekcije na podlagi razmerja signalov $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ in nadzorovanega izotopa klora. Glavna prednost matematičnih korekcij, ki ponavadi ne zahtevajo dodatnega analitičnega dela, je hitrost in enostavna uporaba (280).

Nova in originalna pot za odpravo spektralnih interferenc so kolizijske celice (ang. multiple collision cell, MCC) in dinamične reakcijske celice (ang. dynamic reaction cell, DRC). Interakcija med žarkom ionov in plinom (ali mešanico plinov) omogoča kemijsko odstranjevanje poliatomskih interferentov s kolizijsko disociacijo in selektivnimi reakcijami med ioni in molekulami. Kvadrupol iz DRC omogoča aktivno odstranjevanje plinskih reakcijskih produktov iz celice, kar omogoča učinkovito zmanjšanje interferentov višjih mas (278).

2.8.3.2 Nespektralne interference

Razprševanje organskih topil, tvorjenje soli na konusih in previsoka koncentracija elementov matriksa v kislinskih izvlečkih iz vzorca imajo zelo velik vpliv na merjenje vzorcev. Nespektralne interference so definirane kot variiranje analitskega signala zaradi matriksa, ki vpliva na učinkovitost transporta vzorca, ionizacijo v plazmi in prenos ionov v masni analizator (278).

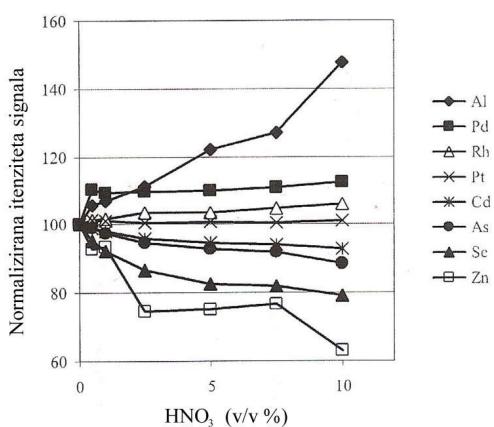
Glede na to, da so vključeni različni mehanizmi, lahko te interference zmanjšujejo ali povečujejo signal. Njihov vpliv je odvisen od analita, fizikalnih lastnosti vzorca (viskoznosti), sestave matriksa, nastavitev instrumenta in pogojev delovanja. Največkrat so opazna znižanja signalov zaradi visokih koncentracij elementov v matriksu. Učinki so največkrat odvisni od absolutne vsebnosti elementov v matriksu, ne pa od molarnega razmerja z analitom. Ta vpliv lahko zmanjšamo z razredčevanjem, vendar pa dodatno razredčevanje poviša mejo zaznavanja (ang. limit of detection, LOD), kar za elemente v sledovih ni več sprejemljivo (278).

Uporaba internih standardov, umeritvene krivulje s standardnimi dodatki, umeritvene krivulje na matriksu (ang. matrix-matched calibration), izotopsko razredčevanje, pretočno injiciranje (ang. flow injection) in ločevanje matriksa so nekatere metode, s katerimi odpravimo ali pa zmanjšamo vplive matriksa. Interna standardizacija se rutinsko uporablja v skoraj vseh aplikacijah ICP-MS tudi zato, ker poleg vplivov matriksa kompenzira tudi lezenje instrumenta (ang. drift). Za učinkovito korekcijo je pomembna pravilna izbira internih standardov (278).

2.8.3.3 Interference zaradi kisline

Za razklop vzorcev so ponavadi potrebne znatne količine koncentriranih kislin. Končna koncentracija kisline v vzorcih ni konstantna, niti je ne moremo zlahka predvideti, če razklapljam različne vrste vzorcev. Odvisno od analita, instrumenta in pogojev merjenja, koncentracija kisline v raztopini vzorca močno vpliva na analitski signal. Ta pojav imenujemo kislinski efekt (ang. acid effect). Če uporabimo eksterno kalibracijo, lahko razlike v koncentraciji kisline med razklopljenimi vzorci in standardnimi raztopinami vodijo do nepravilnih rezultatov (281).

Vplivi koncentracije HNO_3 na različne elemente so prikazani na Sliki 6. Predstavljeni elementi imajo zelo različne mase in tudi različne prve ionizacijske energije (IE). Za večino teh elementov lahko opazimo povečanje ali zmanjšanje analitskega signala, če se koncentracija kisline spremeni od 0,1 % v/v do 10 % v/v. Videti je, da na elemente v srednjem in visokem masnem območju ni takega vpliva, medtem ko za lažje elemente zaznamo močnejše efekte. Ta vzorec se sklada z razširjenostjo naboja (ang. space charge) znotraj masnega spektrometra. As, Se, in Zn, ki imajo visoke IE, so zadušeni. Pri Al se verjetno pojavi povečanje signala zaradi spektralnih interferenc, povezanih z dušikom. To je bilo potrjeno s primerljivimi efekti, ki so nastali kot posledica razprševanja raztopin vzorcev z dušikom, kot so na primer raztopine amonijevih soli. Za zmanjšanje kislinskega efekta moramo zagotoviti podobne koncentracije kislin v vzorcih in standardnih raztopinah (281).



Slika 6: Vpliv koncentracije HNO_3 na signale različnih elementov (281)

Figure 6: The influence of the HNO_3 concentration on elements signal (281)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Vzorce 30 travnih in 30 koruznih silaž smo odvzeli v pomurski, podravski in savinjski regiji v jesenskih mesecih v letu 2011, pomladnih in jesenskih mesecih v letu 2012 in pomladnih mesecih v letu 2013. Tabela 2 prikazuje shemo vzorčenja glede na regije. Regije bomo v nadaljevanju označevali od 1 do 5, kot je prikazano v Tabeli 2.

Tabela 2: Shema vzorčenja glede na regije

Table 2: Scheme of sampling according to regions

Regija	Oznaka regije	Vrsta vzorcev	Št. vzorcev
Pomurska regija	1	koruzna silaža	7
		travna silaža	9
Podravska regija	2	koruzna silaža	14
		travna silaža	11
Savinjska regija	3	koruzna silaža	9
		travna silaža	10
Mežiška dolina	4	sestavine obrokov	26
Gorenjska regija	5	sestavine obrokov	54

3.1.1 Sestava obrokov v Mežiški dolini in v gorenjski regiji

Na šestih kmetijah z vsakega od dveh območij, enega potencialno onesnaženega (Mežiška dolina, MD) in enega potencialno neonesnaženega območja (gorenjska regija, GR), smo pozimi v letu 2014 vzorčili sestavine obrokov ($n = 80$), ki jih na teh kmetijah krmijo. Sestava obrokov s posameznih kmetij je zbrana v Tabeli 3. Sestavine obrokov so razdeljene na voluminozno krmo, druga posamična krmila, dopolnilne krmne mešanice (DKM), mineralno-vitaminske dodatke (MVD) in dodatke, kot so soda bikarbona, sol in apnenec.

Tabela 3: Sestava obrokov na posameznih kmetijah v gorenjski regiji in Mežiški dolini

Table 3: The ingredients of the meals on individual farms from Gorenjska region and Mežica valley

	GR 1	GR 2	GR 3	GR 4	GR 5	GR 6	MD 1	MD 2	MD 3	MD 4	MD 5	MD 6
Voluminozna krma												
- Travna silaža	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
- Koruzna silaža	+	+	+	+	+				-	+	-	+
- Seno	+	+	+	+	-		+	+	+	-	+	+
- Slama	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Posamična krmila												
- Jecmen	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
- Koruza	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
- Psenicna moka	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Pivske tropine	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
- Pesni rezanci	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
DKM												
- K 1/A peleti	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
- Super KZ farmski	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
- KZ 19 N	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
- KLN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
- KZ 19	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
- K TOP	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
- K 19	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
- Energetsko krmilo	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
- K TOP 60	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
- K MIX 35	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
- PROTAMIKS	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
- GUSTO MIX	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
- Proti ketozno krmilo	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
- MIX 35	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MVD												
- Rumisal 4 ekstra	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- VITAMIX TOP	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- Rumisal 4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- LACTO PLUS	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- COMPETIT	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- PALSEN PILOT	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
- COMPETIT C	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
- MILKANAL 17	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
- Supermix	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Dodatki												
- Soda bikarbona	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
- Sol	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
- Apnenec	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Legenda:

+ sestavina obroka

- ni sestavina obroka

GR 1 - 6: kmetije z gorenjske regije

MD 1 - 6: kmetije iz Mežiške doline

DKM - dopolnilne krmne mešanice

MVD - mineralno vitaminski dodatki

3.2 METODE

3.2.1 Vzorčenje krme

Vzorčenje krme smo opravili v skladu z Uredbo Komisije (ES) št. 152/2009 o določitvi metod vzorčenja in analiznih metod za uradni nadzor krme (14) in njenem dopolnilu (15).

3.2.1.1 Silaža v zaprtih silosih

V zaprtih koritastih betonskih silosih smo jemali posamezne vzorce z vrha silosa s posebej prirejeno sondi. Ko smo izračunali količino zahtevanih posameznih vzorcev (14,15), smo si površino silosa navidezno razdelili na dele. Iz vsakega dela smo odvzeli posamezni vzorec. Iz silosov, manjših od 5 t, smo odvzeli po pet posameznih vzorcev, v silosih, večjih od 5 t, pa $\sqrt{5}$ -kratnik mase vzorčenega deleža v t (do največ 40 posameznih vzorcev). Posamezne vzorce smo združili v zbirni vzorec, iz njega pa pripravili končni vzorec.

3.2.1.2 Silaža v odprtih koritastih (horizontalnih) silosih

Odprte horizontalne silose (Slika 7) smo vzorčili na sveži rezni površini. Lastnik nam je s svojo opremo za odvzem silaže odrezal ustrezeno količino iz rezne površine. Če rezna površina ni bila sveža, smo predhodno odstranili cca. 30 centimetrov zunanje plasti. Zgornje in zunanje dele smo iz vzorčenja izvzeli. Število posameznih vzorcev smo določili glede na rezno površino, in sicer 1 vzorec/ m^2 (do največ 20 posameznih vzorcev). Posamezne vzorce smo združili v zbirni vzorec, iz njega pa pripravili končni vzorec.

3.2.1.3 Silaža v balah

Silažo v balah smo vzorčili na odprtih balah. Iz razvite okrogle bale smo z roko odvzeli vsaj 10 primarnih vzorcev oz. 20 iz kvadratne (big bag) bale. Vzorce smo odvzeli reprezentativno tako, da smo zajeli vse plasti, pri čemer smo zunanjou plast izpustili. Posamezne vzorce smo združili v zbirni vzorec, iz njega pa pripravili končni vzorec.



Slika 7: Govedo in koritasti silos (Jakovac Strajn B., 2011)

Figure 7: Cattle and bunker silo (Jakovac Strajn B., 2011)

3.2.1.4 Seno in slama v balah

Seno in slamo v balah smo vzorčili na odprtih balah na kmetijah v Mežiški dolini in v gorenjski regiji (Tabela 3). Iz razvite okrogle bale smo z roko odvzeli vsaj deset primarnih vzorcev oz. 20 iz kvadratne (big bag) bale. Vzorce smo odvzeli reprezentativno tako, da smo zajeli vse plasti, pri čemer smo zunanjou plast izpustili. Pri majhnih balah (20–25 kg) smo po enakem postopku odvzeli vsaj pet posameznih vzorcev. Posamezne vzorce smo združili v zbirni vzorec, iz njega pa pripravili končni vzorec.

3.2.1.5 Seno iz kozolca

Pri vzorčenju sena iz kozolca smo odvzeli 20–30 posameznih vzorcev v enakomernih presledkih z vlečenjem sena, po možnosti čim globlje. Vzorcev sena nismo odvzeli z roko, temveč smo uporabili grablje ali vile. Posamezne vzorce smo združili v zbirni vzorec, iz njega pa pripravili končni vzorec.

3.2.1.6 Pakirana krma

Trdna krma je lahko pakirana v torbe, vrečke, pločevinke, sode, ki se štejejo kot ena enota. V primeru od 1 do 20 enot smo odvzeli eno enoto, v primeru od 21 do 150 enot pa smo odvzeli tri enote. Velike enote (≥ 500 kg ali litrov) smo vzorčili v skladu z zahtevami za razsuto (trdno in tekočo) krmo, ki predvideva odvzem 40 posameznih vzorcev + $\sqrt{\text{ton}}$. Po izbiri zahtevanega števila enot za vzorčenje smo del vsebine vsake enote odstranili s sondi ali lopatko. Po potrebi smo enote izpraznili ločeno in šele nato odvzeli vzorce. Posamezne vzorce smo združili v zbirni vzorec, iz njega pa pripravili končni vzorec.

3.2.1.7 Priprava in shranjevanje vzorcev za analize

Odvzete vzorce voluminozne krme smo homogenizirali, posušili in zmleli z mlinom za mletje voluminozne krme SM 100 (Retsch, Haan, Nemčija). Preostale vzorce, kjer predhodno sušenje ni bilo potrebno, smo homogenizirali in zmleli z ultracentrifugalnim mlinom ZM 100 (Retsch, Haan, Nemčija). Zmlete vzorce smo shranili v steklenih kozarcih v hladilni komori na temperaturi pod 14 °C.

3.2.2 Določanje vlage in suhe snovi

Vlago smo določili z metodo, opisano v Uredbi Komisije (ES) št. 152/2009 (14), Priloga III. Uporabili smo jo za izražanje vsebnosti elementov na SS, kar nam je omogočilo primerjavo naših rezultatov s podatki v literaturi.

- Potrošni material
 - tehtiči
 - pladnji iz papirja ali alufolije
 - eksikator
- Aparature
 - tehtnica z možnostjo tehtanja na 1 mg natančno (Tehtnica, EXACTA 300 EB, Železniki, Slovenija)
 - sušilnik z možnostjo nastavitev temperature na ± 2 °C natančno (Memmert, UFE 500, Schwabach, Nemčija)

3.2.2.1 Krma, razen žit

Tehtič s pokrovom smo stehtali na 1 mg natančno. V tehtič smo prenesli približno 5 g vzorca, ga pokrili s pokrovom in stehtali na 1 mg natančno. Tehtič z odprtim pokrovom smo postavili v sušilnik, predhodno ogret na 103 °C. Po 4 urah sušenja smo tehtič pokrili s pokrovom in ga v eksikatorju ohladili (30 do 45 minut). Ohlajen tehtič z vzorcem in pokrovom smo stehtali na 1 mg natančno.

3.2.2.2 Žita

Tehtič s pokrovom smo stehtali na 1 mg natančno. V tehtič smo nasuli približno 5 g vzorca, ga pokrili s pokrovom in stehtali na 1 mg natančno. Tehtič z odprtim pokrovom smo postavili v sušilnik, predhodno ogret na 130 °C. Po 2 urah sušenja smo tehtič pokrili s pokrovom, ga vzeli iz sušilnika in postavili v eksikator. Pustili smo, da se tehtič z vzorcem ohladi (30 do 45 minut). Ohlajen tehtič z vzorcem in pokrovom smo stehtali na 1 mg natančno.

3.2.2.3 Krma z višjo vsebnostjo vlage

Vzorce z višjo vsebnostjo vlage, ki otežuje mletje (silaža, sveža trava, pesni rezanci ...), smo predhodno posušili po naslednjem postopku:

Dva podvzorca smo položili na pladnja iz papirja ali alufolije, ki smo ju pred tem stehtali na 1 mg natančno. Vsak pladenj z vzorcem smo stehtali na 1 mg natančno. Pladenj z vzorcem smo položili v sušilnik, predhodno ogret na 60 °C in ga sušili čez noč. Pladenj z vzorcem smo vzeli iz sušilnika, ga ohladili na zraku (eno uro) in stehtali na 1 mg natančno. Podvzorca smo združili, ju zmleli in naprej sušili po postopku za krmo.

3.2.2.4 Interpretacija rezultatov

Vsebnost vlage v krmi izrazimo v odstotkih (%). Izračunamo jo po enačbi:

$$x = \frac{(m_1 - m_2) \times 100}{(m_1 - m_0)},$$

kjer je m_0 masa tehtiča s pokrovom, izražena v g, m_1 masa tehtiča s pokrovom in vzorcem pred sušenjem, izražena v g, in m_2 masa tehtiča s pokrovom in vzorcem po sušenju, izražena v g. Rezultat lahko izrazimo tudi kot suho snov, izraženo v %:

$$SS = 100 - x.$$

Pri postopku s predhodnim sušenjem izračunamo vlago in suho snov po zgornjih enačbah za vsak del postopka ločeno (pri predhodnem sušenju m_0 pomeni maso pladnja, m_1 maso pladnja z vzorcem pred sušenjem in m_2 maso pladnja z vzorcem po sušenju). Končni rezultat za suho snov in vlago izračunamo po enačbah:

$$SS_{celotna} = SS_1 \times SS_2 \times 0,01,$$

kjer je SS_2 suha snov, izračunana za predhodno sušenje, in SS_1 suha snov, izračunana za nadaljnje sušenje, in vлага je

$$x_{celotna} = 100 - SS_{celotna}.$$

3.2.3 Mikrovalovni razklop vzorcev

- Steklovina in potrošni material
 - OMNI visokotlačna posoda (CEM, Matthews, NC)
 - teflonski lonček in XP 1500 Plus pokrovček (CEM, Matthews, NC)
 - filtrirni papir (Sartorius, kat. št. FT-3-102-110)
 - plastične posodice (Brand)
- Aparature
 - Sistem za deionizirano vodo (Millipore, Direct 8, Bedford, MA)
 - precizna elektronska tehtnica (Tehnica, EXACTA 300 EB, Železniki, Slovenija)
 - mikrovalovni sistem Mars Xpress (CEM, Matthews, NC)
- Kemikalije
 - deionizirana voda (upornost 18,2 MΩ cm)
 - dušikova kislina 65 %, Suprapur (Merck, kat. št. 100441)
 - vodikov peroksid 30 %, Suprapur (Merck, kat. št. 107298)

3.2.3.1 Priprava vzorcev

Steklovino smo pred uporabo očistili s kislino in spirali z deionizirano vodo. Teflonske lončke smo pred vsako serijo očistili v mikrovalovnem sistemu po enakem postopku kot za pripravo vzorcev. V teflonski lonček smo zatehtali okoli 0,5 g vzorca na 1 mg natančno. V lonček smo dodali 5,0 mL dušikove kisline in 1,0 mL vodikovega peroksida in pustili stati eno uro. Lonček smo zaprli s pokrovčkom XP 1500 Plus in ga vstavili v visokotlačno

posodo. Visokotlačne posode z lončki smo postavili v mikrovalovni sistem, v katerega lahko naenkrat vstavimo 12 posod. Vzorce smo razklopili po programu v Tabeli 4.

Ko se je pritisk v lončkih znižal, smo jih previdno odprli. Raztopine vzorcev smo prenesli v 100 mL merilne bučke in z deionizirano vodo dopolnili do oznake. Raztopine smo prefiltrirali in shranili v plastičnih posodicah. Pripravljeni raztopini smo pred merjenjem primerno razredčili.

Tabela 4: Program mikrovalovnega razklopa

Table 4: Microwave digestion program

Stopnja	Čas (min)	Temperatura (°C)
segrevanje	15	200
čakanje	20	200
hlajenje	20	-

3.2.4 Določanje elementov z ICP-MS

- Steklovina in potrošni material
 - merilne bučke (razred A ali AS)
 - steklene pipete (razred A ali AS)
- Aparature
 - ICP z masnim spektrometrom (Varian, 820-MS, Mulgrave, Australia)
 - računalnik s programom ICP-MS Expert za vodenje aparature in obdelavo podatkov
- Kemikalije
 - deionizirana voda (upornost 18,2 MΩ cm)
 - dušikova kislina 65 %, Suprapur (Merck, kat. št. 100441)
 - argon, 4,8
 - vodik, 5,0

- Raztopine
 - 1 % raztopina dušikove kisline – 10 mL dušikove kisline razredčimo na 1 L z deionizirano vodo
 - 5 % raztopina dušikove kisline – 50 mL dušikove kisline razredčimo na 1 L z deionizirano vodo
- Standardne raztopine
 - Standardna raztopina za umerjanje aparature, 10 µg/mL (Inorganic Ventures, kat. št. VAR-TS-MS)
 - Standardna raztopina internih standardov, 100 µg/mL (Inorganic Ventures, kat. št. VAR-IS-1)
 - Multielementna standardna raztopina XVI, 100 mg/L (Merck, kat. št. 109487)
 - Standardna raztopina Ba, 1000 mg/L (Merck, kat. št. 170304)
 - Standardna raztopina Sn, 1000 mg/L (Merck, kat. št. 170362)
 - Standardna raztopina B, 1000 mg/L (Merck, kat. št. 170307)
 - Standardna raztopina Ag, 1000 mg/L (Merck, kat. št. 170352)
 - Standardna raztopina Al, 1000 mg/L (Merck, kat. št. 170301)
 - Standardna raztopina Hg, 100 mg/L (Inorganic Ventures, kat. št. MSHGN)

Delovno standardno raztopino VAR-TS-MS s koncentracijo 5 µg/L smo pripravili z redčenjem osnovne standardne raztopine VAR-TS-MS z 1 % raztopino dušikove kisline. Delovno standardno raztopino VAR-IS-1 (^{6}Li , ^{45}Sc , ^{115}In , ^{89}Y , ^{159}Tb in ^{209}Bi) s koncentracijo 100 µg/L smo pripravili z redčenjem osnovne standardne raztopine VAR-IS-1 s 5 % raztopino dušikove kisline. Delovne standardne raztopine elementov s koncentracijami v območju med 0,05 in 1000 µg/L smo pripravili z redčenjem multielementne standardne raztopine XVI (As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, V in Zn) in posameznih standardnih raztopin Ba, Sn, B, Ag, Al v 5 % raztopini dušikove kisline. Delovno standardno raztopino Hg smo zaradi možnosti kontaminacije aparature dodali v mešanico posebej, v območju od 0,05 do 10 µg/L. Vse delovne standardne raztopine smo pripravili vsakič sveže.

- Pogoji merjenja
 - Nosilni plin: argon
 - CRI-plin: vodik, pretok 70 mL/min
 - Izotopi merjenih elementov (m/z): ^7Li , ^9Be , ^{11}B , ^{27}Al , ^{47}Ti , ^{51}V , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{88}Sr , ^{95}Mo , ^{107}Ag , ^{111}Cd , ^{118}Sn , ^{121}Sb , ^{137}Ba , ^{202}Hg , ^{205}Tl , $^{206+7+8}\text{Pb}$, ^{75}Se and ^{78}As
- Način merjenja
 - Pred merjenjem smo aparatujo spirali približno dve uri z 1 % raztopino dušikove kisline.
 - Po spiranju smo aparatu pripravili s pomočjo "Auto-setup" z delovno standardno raztopino VAR-TS-MS koncentracije 5 µg/L.
 - Izmerili smo standardne raztopine. Korelacijski koeficient umeritvene krivulje mora biti vsaj 0,995 (če ne bi bil, bi pripravili sveže delovne standardne raztopine in ponovili merjenje).
 - Izmerili smo raztopine vzorcev. Po vsakem desetem vzorcu smo izmerili eno od delovnih standardnih raztopin.
 - Na koncu serije smo še enkrat izmerili eno od delovnih standardnih raztopin.
 - Po merjenju smo aparatu sprali z 1 % raztopino dušikove kisline.
- Interpretacija rezultatov
 - Za kvalitativno in kvantitativno vrednotenje rezultatov smo uporabili procesirno metodo programa ICP-MS Expert.
 - Za izračun vsebnosti posameznih elementov v vzorcu smo uporabili zatehto vzorca, volumen raztopine vzorca, razredčitve in enote, v katerih so izraženi rezultati. Rezultate smo korigirali s povprečnim izkoristkom, določenim pri validaciji metode.
 - Kot rezultat smo dobili vsebnost posameznih elementov v krmi v mg/kg ali µg/kg.
 - Za preračun vsebnosti elementov na SS smo uporabili podatke o vlagi, ki smo jo določili po zgoraj opisanem postopku.

3.2.4.1 Priprava aparature in obvladovanje interferenc

Aparaturo ICP-MS smo pred vsako sekvenco optimizirali z delovno standardno raztopino VAR-TS-MS s koncentracijo 5 µg/L. Preverili smo stabilnost instrumenta, z optimizacijo smo zvišali odzive posameznih elementov in znižali interferenčne vplive iz poliatomskih ionov in dvojno nabitih ionov. Za spremljanje nastanka oksidov in dvojno nabitih ionov smo merili razmerja CeO⁺/Ce⁺ in Ba²⁺/Ba. Da bi se izognili znanim interferencam, smo izbrali naslednje izotope elementov: ⁷Li, ⁹Be, ¹¹B, ²⁷Al, ⁴⁷Ti, ⁵¹V, ⁵³Cr, ⁵⁵Mn, ⁵⁷Fe, ⁵⁹Co, ⁶⁰Ni, ⁶³Cu, ⁶⁶Zn, ⁸⁸Sr, ⁹⁵Mo, ¹⁰⁷Ag, ¹¹¹Cd, ¹¹⁸Sn, ¹²¹Sb, ¹³⁷Ba, ²⁰²Hg, ²⁰⁵Tl, ²⁰⁶⁺⁷⁺⁸Pb. Pri določanju ⁷⁵Se in ⁷⁸As smo za odpravo poliatomskih referenc, ki otežujejo njuno določanje, uporabili CRI-modul z vodikom. Za korekcijo spektralnih interferenc smo uporabili medelementne korekcijske algoritme, ki so že vnesene v procesirno metodo programa ICP-MS Expert. Za korekcijo nespektralnih interferenc smo uporabili ustrezne interne standarde, ki smo jih črpali prek "Y-kosa" (ang. Y-piece) na tretjem kanalu črpalke za vzorce. Pri vsaki sekvenci smo izmerili tudi dva slepa vzorca za preverjanje navzkrižne kontaminacije in spominskih učinkov.

Tabela 5: Instrumentalni pogoji delovanja ICP-MS

Table 5: Instrumental operating conditions for ICP-MS

	Pogoji delovanja	
Razpršilec	Glass concentric, Micromist	
Razpršilna komora	Scott-type, Peltier-cooled (3 °C)	
RF moč	1,40 kW	
Vmesnik	Nickel sampler and skimmer	
	Normalni način	CRI način
Pretok plina v plazmi (L/min)	18,50	17,00
Pomožni pretok (L/min)	1,85	1,70
Pretok v plašču (L/min)	0,14	0,25
Pretok plina v razpršilcu (L/min)	0,94	0,90
Pretok plina CRI (L/min)	–	H ₂ , 70
Način skeniranja	Peak hopping	Peak hopping
Skeni/ponovitve	20	20
Število ponovitev/vzorec	5	5
Atenuacija	Automatic	None

3.3 VALIDACIJA ANALIZNEGA POSTOPKA

Optimiziran analizni postopek smo validirali. V skladu z Uredbo (EC) št. 882/2004 (282) smo pri validaciji določili naslednje parametre: linearnost umeritvenih krivulj, mejo zaznavanja (ang. limit of detection, LOD) in mejo vrednotenja (ang. limit of quantification, LOQ), ponovljivost postopka, znotrajlaboratorijsko obnovljivost, izkoristek, pravilnost in merilno negotovost. Dobljene parametre smo primerjali z zahtevami, podanimi v Uredbi (EU) št. 836/2011 (283), ki je spremenila Uredbo (ES) št. 333/2007 (284), ter v Direktivi 2002/32/EC Evropskega parlamenta in Sveta (56) in njenimi dopolnili (57, 101). Podatke smo zbrali v tabelah, ki so predstavljene v nadaljevanju.

3.3.1 Linearnost umeritvenih krivulj, določanje LOD in LOQ

Za test linearnosti ter določitev LOD in LOQ posameznih elementov smo pripravili deset mešanih delovnih standardnih raztopin elementov s koncentracijami 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 5, 10, 50, 500 in 1000 µg/L. Te koncentracije ustrezano vsebnostim posameznih elementov v krmi od 0,01 mg/kg do 2 mg/kg. Za posamezni element smo za umeritveno krivuljo upoštevali različno število točk, tako da je območje ustrezano vsebnostim tega elementa v krmi.

3.3.2 Ponovljivost analiznega postopka

Za določitev ponovljivosti analiznega postopka (ang. repeatability), ki predstavlja natančnost oz. ujemanje neodvisnih analiznih rezultatov, dobavljenih pod pogoji ponovljivosti (isti analistik, isti laboratorij, isti merilni instrument, analize, ki jih opravimo v kratkem časovnem razdobju), smo pripravili po šest paralelk dveh referenčnih materialov ERM-CD 281 (Rye grass) in SRM 1570a (Spinach) istočasno in jih izmerili v enem dnevu.

3.3.3 Znotrajlaboratorijska obnovljivost

Za določitev znotrajlaboratorijske obnovljivosti (ang. within-laboratory reproducibility), kjer gre za obnovljivost, doseženo v enem laboratoriju (različni izvajalci, pogoji izvedbe, daljše časovno razdobje), smo vzorec travne silaže pripravili desetkrat v dveh paralelkah (dve različni osebi, različni dnevi) in dva referenčna materiala ERM-CD 281 (Rye grass) in SRM 1570a (Spinach) po šestkrat v dveh paralelkah. Vzorcu travne silaže smo dodali multielementne delovne standardne raztopine, tako da so vsebnosti ustrezale 2 mg/kg v krmi.

3.3.4 Izkoristek

Za izračune izkoristkov (ang. recovery) smo uporabili rezultate znotrajlaboratorijske obnovljivosti. Vzorcu travne silaže smo dodali multielementne delovne standardne raztopine, tako da so vsebnosti ustrezale 2 mg/kg v krmi. Če dodatek zaradi visokih vsebnosti v vzorcu ni bil ustrezen, smo uporabili rezultate meritev dveh referenčnih materialov ERM-CD 281 (Rye grass) in SRM 1570a (Spinach).

3.3.5 Pravilnost

Za izračun pravilnosti (ang. trueness) smo uporabili rezultate meritev dveh referenčnih materialov ERM-CD 281 (Rye grass) in SRM 1570a (Spinach), ki smo ju pripravili pod pogoji znotrajlaboratorijske obnovljivosti. Upoštevali smo povprečno vrednost vseh rezultatov, ki smo jih korigirali za izkoristek.

3.3.6 Merilna negotovost

Za izračun merilnih negotovosti (ang. measurement uncertainty) smo uporabili rezultate znotrajlaboratorijske obnovljivosti. Z analizo vzorca travne silaže smo preverili tudi homogenost pripravljenega vzorca, njen prispevek pa je upoštevan v izračunu merilne negotovosti za posamezne elemente.

3.3.7 Izračun rezultatov validacije

Regresijske parametre in koreacijske koeficiente umeritvenih krivulj v izbranih koncentracijskih območjih smo izračunali z metodo najmanjših kvadratov (ang. the least squares method). LOD in LOQ posameznih elementov smo določili s standardnim odmikom presekov kalibracijskih krivulj z osjo y (285). Primerjali smo jih z zahtevami, podanimi v Uredbi (EU) št. 836/2011 (283). Ponovljivost postopka smo izrazili kot relativno standardno deviacijo (RSD_r) rezultatov meritev za posamezne elemente v dveh referenčnih materialih ERM-CD 281 (Rye grass) in SRM 1570a (Spinach). Za druge elemente, ki smo jih določili v vzorcu travne silaže, smo ponovljivost izrazili kot razliko med paralelkami, izvedenimi v testu znotrajlaboratorijske obnovljivosti. Izračunane RSD_r smo primerjali z referenčnimi vrednostmi, izračunanimi v skladu z zahtevo iz Uredbe (EU) št. 836/2011 (283), po kateri so referenčne vrednosti za posamezna koncentracijska območja dvakratne vrednosti, dobljene s Horwitzovo ali modificirano Horwitzovo enačbo (odvisno od koncentracije) in uporabo predpostavke $r = 0,66R$. Znotrajlaboratorijsko obnovljivost smo izrazili kot relativno standardno deviacijo (RSD_R). Referenčne vrednosti za RSD_R so v skladu z zahtevo iz Uredbe (EU) št. 836/2011 (283) dvakratne vrednosti, dobljene s Horwitzovo ali modificirano Horwitzovo enačbo (odvisno od koncentracije). Pred izračunom vseh opisanih parametrov smo izvedli Cochranov in Grubbsov test ter izločili rezultate s preveliko razliko med rezultati paralelk vzorcev in morebitne ubežnike (285). Razširjene meritne negotovosti (U) smo izračunali iz rezultatov meritev znotrajlaboratorijske obnovljivosti (s_R) (286), s faktorjem pokritja 2 ($U = \pm 2s_R$). Za pravilnost postopka smo uporabili rezultate meritev dveh referenčnih materialov, s katerimi smo pokrili večino elementov v ustreznih območjih. Za štiri elemente, kjer ni bilo ustreznih certificiranih vrednosti, smo pravilnost določili iz meritev vzorca travne silaže, ki smo mu dodali ustrezne dodatke.

3.4 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Statistično obdelavo rezultatov analize odvzetih vzorcev koruznih in travnih silaž smo izvedli s statističnim programom Statistical Package for Social Sciences (SPSS, verzija 12, november 2003). Izračunali smo aritmetična povprečja, mediane vsebnosti in območja (minimum in maksimum) posameznih elementov. Če so bile koncentracije elementov pod LOQ, smo za te izračune upoštevali vrednosti LOQ/2 (287). Za test normalnosti porazdelitev

smo uporabili Shapiro-Wilkov test. Ker porazdelitve niso bile normalne ($p<0,05$), smo uporabili neparametrični Kruskal-Wallisov test, s katerim smo vrednotili razlike med vzorci silaž iz različnih regij. Neparametrični Mann-Whitneyjev test smo uporabili za oceno razlik v vsebnostih med vzorci travne silaže in koruzne silaže. Spearmanovo korelacijsko analizo smo uporabili za določitev korelacij med vsebnostmi elementov. Za statistično analizo rezultatov obrokov in sestavin obrokov v dveh vzorčenih regijah smo uporabili isti statistični program SPSS. Za test normalnosti porazdelitev smo uporabili Shapiro-Wilkov test. Ker porazdelitve večinoma niso bile normalne ($p<0,05$), smo uporabili neparametrični Mann-Whitneyjev test.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI VSEBNOSTI ELEMENTOV V VZORCIH SILAŽ

V Tabeli 6 so zbrani podatki o vsebnosti elementov v travnih in koruznih silažah ($n = 30$ za vsako vrsto silaže), ki smo jih vzorčili v treh izbranih regijah.

Tabela 6: Vsebnosti elementov v vzorcih travne ($n = 30$) in koruzne silaže ($n = 30$)^a

Table 6: Values of elements in samples of grass silage and maize silage ($n = 30$ each)^a

	Travna silaža				Koruzna silaža			
	Mediana	Povp.	S.E.M.	Območje	Mediana	Povp.	S.E.M.	Območje
Al	480	857	172	60,7–4204	46,0	68,0	12,3	23,0–353
Fe	468	744	137	113–3489	58,3	76,9	9,3	45,7–275
Mn	71,8	79,0	5,8	26,3–159	23,2	25,0	1,7	12,5–49,6
Zn	27,7	30,6	1,9	20,9–77,5	23,1	23,9	0,9	13,3–35,9
Ti	19,0	29,5	5,1	5,89–143	4,09	4,69	0,48	2,17–14,6
Ba	15,4	21,2	2,3	6,71–62,4	2,67	2,98	0,28	1,04–8,29
Sr	11,7	13,2	1,1	5,96–28,4	3,07	3,38	0,18	2,17–6,11
Cu	7,98	8,05	0,29	5,15–11,1	5,36	5,53	0,15	4,27–7,53
B	7,13	8,04	0,65	4,02–17,0	5,78	5,75	0,20	4,10–8,78
Ni	2,20	2,57	0,40	0,80–12,2	0,40	1,32	0,52	0,18–15,6
Cr	1,24	1,78	0,28	0,24–7,15	0,37	0,41	0,03	0,19–0,85
Mo	1,02	1,17	0,14	0,27–2,92	0,28	0,33	0,03	0,10–0,75
V	1,01	1,70	0,34	0,15–9,16	0,09	0,16	0,03	0,06–0,72
Li	605	1024	203	107–5174	58	90	15	33–458
Pb	553	1060	328	159–10067	135	146	13	59–384
Co	270	380	63	75–1645	24	45	8	14–150
As	210	418	101	60–2852	52	54	7	<8–126
Cd	91	130	19	20–518	59	68	7	23–182
Sn	82	120	20	40–493	47	49	2	28–78
Se	53	66	7	<33–176	52	55	5	<10–66
Hg	33	40	8	<7–56	58	58	–	<7–58
Be	32	56	10	11–229	9	10	1	5–22
Tl	28	38	8	<2–143	<2	<2	–	–
Sb	22	28	3	11–65	18	23	7	<10–124
Ag	11	13	2	<1–31	11	10	1	<1–14

Opomba: ^aVsebnosti so podane v mg/kg SS za elemente od Al do V in v µg/kg SS za elemente od Li do Ag.

V Tabeli 6 so podane mediane vsebnosti, aritmetična povprečja, standardna napaka povprečja (ang. standard error of the mean, S.E.M.) in območja (minimum–maksimum) za posamezne elemente. Vsi rezultati so podani na suho snov (SS). Vsebnosti so v tej in vseh drugih tabelah podane v mg/kg SS za elemente od Al do V in v µg/kg SS za elemente od Li do Ag.

Povprečna vrednost suhe snovi je v travnih silažah 47,9 % (območje 30,6–69,8 %) in za koruzne silaže 38,6 %. Izbrane elemente smo našli v obeh vrstah silaž, z izjemo Tl v koruzni silaži, kjer so vse vsebnosti Tl pod LOD (1,9 µg/kg). Vsebnosti posameznih elementov so bile višje v travni silaži, razen za Zn in Hg. Hg (območje 31,1–56,1 µg/kg) je bil prisoten v treh vzorcih travne silaže in le v enem vzorcu koruzne silaže (58,2 µg/kg).

4.1.1 Rezultati vsebnosti elementov v silažah iz treh slovenskih regij

V Tabeli 7 so podane mediane vsebnosti posameznih elementov v vzorcih silaž za pomursko (M1), podravsko (M2) in savinjsko regijo (M3), *p*-vrednosti za ovrednotenje statistično značilnih razlik ($p<0,05$) v vsebnostih posameznih elementov v vzorcih silaž med tremi regijami ter *p*-vrednosti za ovrednotenje statistično značilnih razlik ($p<0,01$) med travno in koruzno silažo.

Analiza variance je pokazala statistično značilne razlike v silaži med tremi regijami v Sloveniji pri devetih različnih elementih. Statistično značilne razlike ($p<0,05$) v vsebnostih elementov v travnih silažah smo ugotovili pri Mn, Ti, B, Mo in Sb in pri koruzni silaži za Ba, Ni, Mo, Hg in Ag. Največje razlike med regijami so se pokazale pri mediani Mo v travni silaži in Ni v koruzni silaži. Statistično značilne razlike med travno in koruzno silažo so bile ugotovljene za večino elementov, razen za Ag in Hg.

Rezultati statistične analize so pokazali statistično značilne korelacije med vsebnostmi elementov v obeh vrstah silaže. Najvišje statistično značilne korelacije so bile ugotovljene med vsebnostjo Fe in vsebnostjo 16 elementov v travni silaži (Al, Mn, Ti, Ba, Sr, Ni, Cr, V, Li, Pb, Co, As, Sn, Be, Tl, Sb; $r = 0,981$ – $0,472$, $p<0,01$), ne pa tudi z B, Cu, Ag, Cd, Hg in Se. Pokazale so se tudi korelacije med Fe in Zn ($r = 0,369$, $p<0,05$) in Fe in Mo ($r = 0,439$, $p<0,05$). B, Se, Cu in Hg niso pokazali skoraj nobene korelacije z drugimi elementi v travni silaži. Po drugi strani so bile ugotovljene najvišje statistično značilne korelacije v koruzni

silaži med Pb in 10 drugimi elementi (Li, Be, Al, Ti, V, Fe, Co, Cu, Zn in Cd; $r = 0,972 - 0,479$, $p < 0,01$) in med Pb in As ($r = 0,445$, $p < 0,05$). Korelacij med Pb in vsebnostmi drugih elementov v koruzni silaži nismo našli. B, Se, Sn in Mn niso kazali nobene korelacije z vsebnostmi drugih elementov v koruzni silaži.

Tabela 7: Mediane vsebnosti in p -vrednosti za vsebnosti elementov v silažah po regijah^aTable 7: Medians and p -values of elements in samples of silage according to region^a

	Travna silaža				Koruzna silaža				p^c
	M1	M2	M3	p^b	M1	M2	M3	p^b	
Al	1133	396	480	0,209	42,4	50,7	42,0	0,376	<0,01
Fe	972	360	461	0,218	53,9	65,8	59,4	0,383	<0,01
Mn	116	74,0	50,9	<0,05	27,4	20,7	19,7	0,107	<0,01
Zn	24,2	29,5	30,0	0,082	21,7	23,5	26,1	0,093	<0,01
Ti	33,2	22,7	14,5	<0,05	3,84	4,78	3,63	0,165	<0,01
Ba	24,1	16,6	15,4	0,603	2,80	3,71	2,13	<0,05	<0,01
Sr	13,2	9,00	13,3	0,216	3,44	3,08	2,63	0,414	<0,01
Cu	7,46	7,26	9,62	0,107	5,26	5,43	5,26	0,519	<0,01
B	6,86	6,47	10,6	<0,05	5,38	6,05	5,98	0,518	<0,01
Ni	2,33	1,87	2,13	0,985	0,25	0,42	0,90	<0,05	<0,01
Cr	2,11	1,24	1,05	0,226	0,34	0,36	0,45	0,476	<0,01
Mo	0,37	1,38	1,27	<0,05	0,16	0,37	0,34	<0,05	<0,01
V	2,01	0,86	1,11	0,238	0,08	0,10	0,10	0,184	<0,01
Li	1234	494	599	0,184	54	75	59	0,800	<0,01
Pb	747	533	594	0,485	133	143	124	0,517	<0,01
Co	377	180	266	0,179	24	24	34	0,905	<0,01
As	344	174	262	0,511	46	52	52	0,293	<0,01
Cd	83	76	122	0,063	52	61	73	0,359	<0,01
Sn	104	80	81	0,341	47	48	50	0,993	<0,01
Se	47	49	56	0,056	52	<33	57	0,084	<0,01
Hg	31	<25	45	0,476	<7	<7	58	<0,05	0,055
Be	59	29	36	0,272	9	9	10	0,349	<0,01
Tl	21	29	27	0,260	<2	<2	<2	–	<0,01
Sb	40	20	23	<0,05	18	12	18	0,615	<0,01
Ag	13	9	15	0,230	11	9	11	<0,05	0,163

Opombe:

^a Mediane vsebnosti za posamezne elemente glede na regije so podane v mg/kg SS za elemente od Al do V in v µg/kg SS za elemente od Li do Ag.

^b p -vrednosti za elemente v vzorcih travnih in koruznih silaž iz treh regij. $p < 0,05$ pomeni statistično značilne razlike med tremi regijami.

^c p -vrednosti za ovrednotenje statistično značilnih razlik ($p < 0,01$) med travno silažo in koruzno silažo.

4.1.2 Rezultati vsebnosti elementov v silažah in senu iz MD in GR

Tabela 8: Mediane vsebnosti in *p*-vrednosti za elemente v silažah in senu iz MD in GR^aTable 8: Medians and *p*-values of elements in samples of silage and hay from MD and GR^a

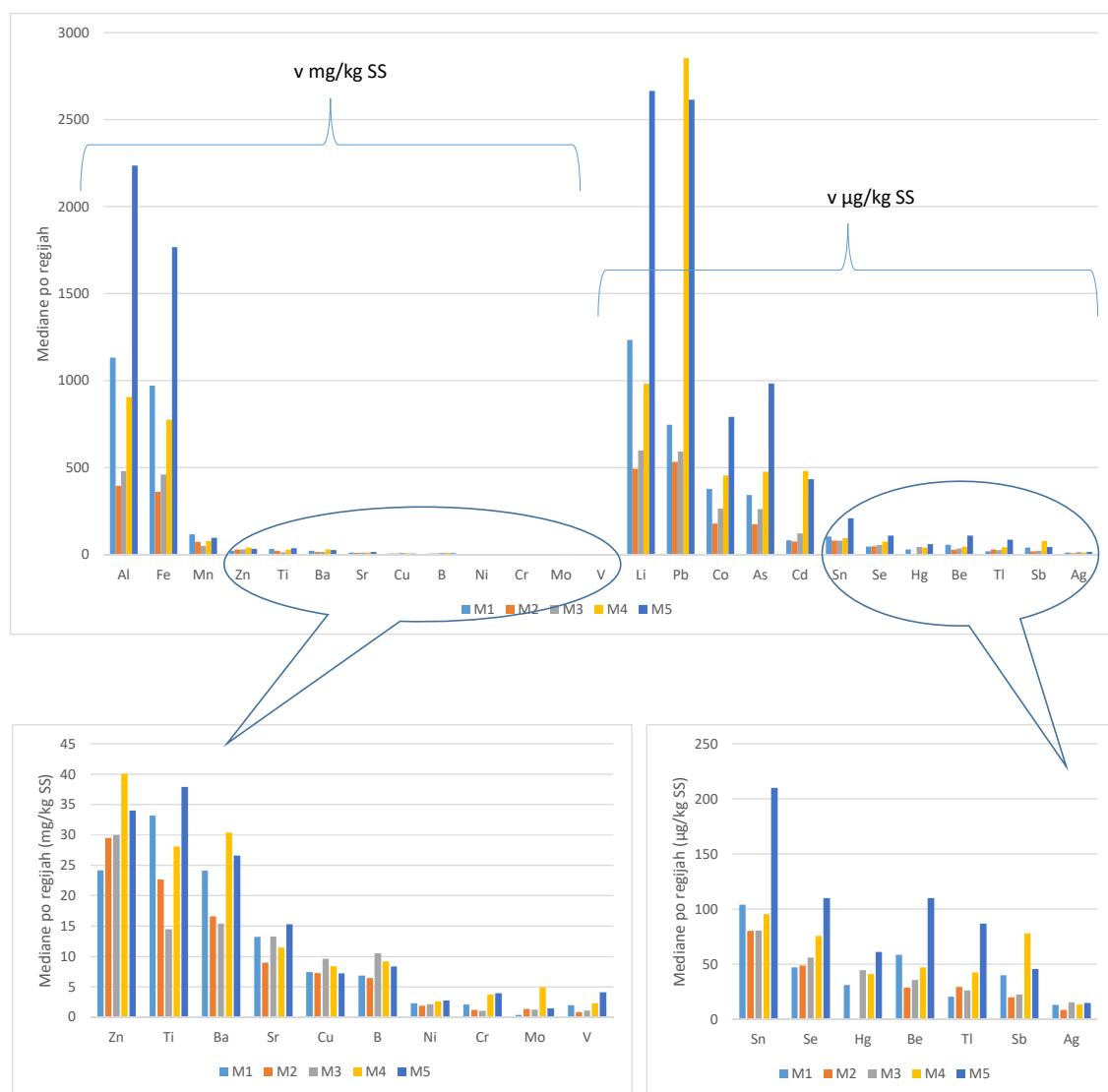
	Travna silaža			Koruzna silaža			Seno		
	M4	M5	<i>p</i>	M4	M5	<i>p</i>	M4	M5	<i>p</i>
Al	906	2235	0,063	184	131	0,201	244	974	<0,05
Fe	776	1767	0,063	199	122	<0,05	202	596	<0,05
Mn	77,8	96,9	0,317	26,7	33,5	0,522	61,9	72,0	0,855
Zn	40,1	34,0	<0,05	45,9	23,2	<0,05	29,8	22,8	0,144
Ti	28,1	37,9	0,391	10,5	5,63	<0,05	8,81	22,0	<0,05
Ba	30,4	26,6	0,668	6,39	2,26	<0,05	14,2	15,5	0,465
Sr	11,5	15,3	<0,05	3,91	3,63	0,394	6,81	8,98	0,584
Cu	8,40	7,23	0,475	4,59	4,16	0,394	5,47	5,03	0,361
B	9,16	8,37	0,199	6,34	4,41	0,394	9,94	6,23	0,361
Ni	2,61	2,79	0,568	0,82	0,47	<0,05	1,11	1,57	0,361
Cr	3,76	3,93	0,475	1,28	0,74	0,088	1,62	2,67	0,144
Mo	4,96	1,49	<0,05	1,69	0,63	<0,05	2,58	1,07	0,465
V	2,31	4,13	0,116	0,45	0,26	0,088	0,50	2,22	<0,05
Li	982	2664	<0,05	227	167	0,138	336	1449	<0,05
Pb	2852	2613	1,000	2381	233	<0,05	929	808	0,855
Co	456	791	0,086	86	50	<0,05	149	438	<0,05
As	478	985	0,116	132	54	<0,05	122	532	<0,05
Cd	480	434	0,475	200	78	<0,05	164	188	0,855
Sn	96	210	<0,05	64	44	0,201	54	69	0,100
Se	76	110	<0,05	63	44	0,495	79	48	0,486
Hg	41	61	<0,05	34	<25	0,714	<25	40	<0,05
Be	47	110	0,063	15	9	<0,05	18	52	<0,05
Tl	43	87	0,199	15	19	0,286	26	41	0,201
Sb	78	46	0,668	28	15	<0,05	29	38	0,201
Ag	13	15	0,568	7	8	0,195	13	17	0,566

Opomba: ^a Vsebnosti so podane v mg/kg SS za elemente od Al do V in v µg/kg SS za elemente od Li do Ag. *p*<0,05 prikazuje statistično značilne razlike med dvema regijama.

V Tabeli 8 so podane mediane vsebnosti elementov v travnih in koruznih silažah ter v senu za MD (M4) in GR (M5) in statistično značilne razlike med temi regijama (*p*<0,05). Mediane vsebnosti 17 elementov v travni silaži so višje v GR kot v MD, mediane vsebnosti osmih elementov pa nižje v GR kot v MD. Mediane vsebnosti posameznih elementov v koruzni silaži so v GR nižje kot v MD, razen za Mn, Tl in Ag, ki so v GR višje za okoli 25 %.

Analiza variance v travni silaži je pokazala statistično značilne razlike med območjema za sedem elementov: Zn, Sr, Mo, Li, Sn, Se in Hg. Statistično značilne razlike med območjema pri koruzni silaži se kažejo pri elementih Fe, Zn, Ti, Ba, Ni, Mo, Pb, Co, As, Cd, Be in Sb. V senu so se pokazale statistično značilne razlike pri devetih elementih: Al, Fe, Ti, V, Li, Co, As, Hg, Be. Mediani za Pb (mg/kg SS) v koruzni silaži ($M_4 = 2381$ in $M_5 = 233$) sta pokazali največjo razliko med temi dvema regijama.

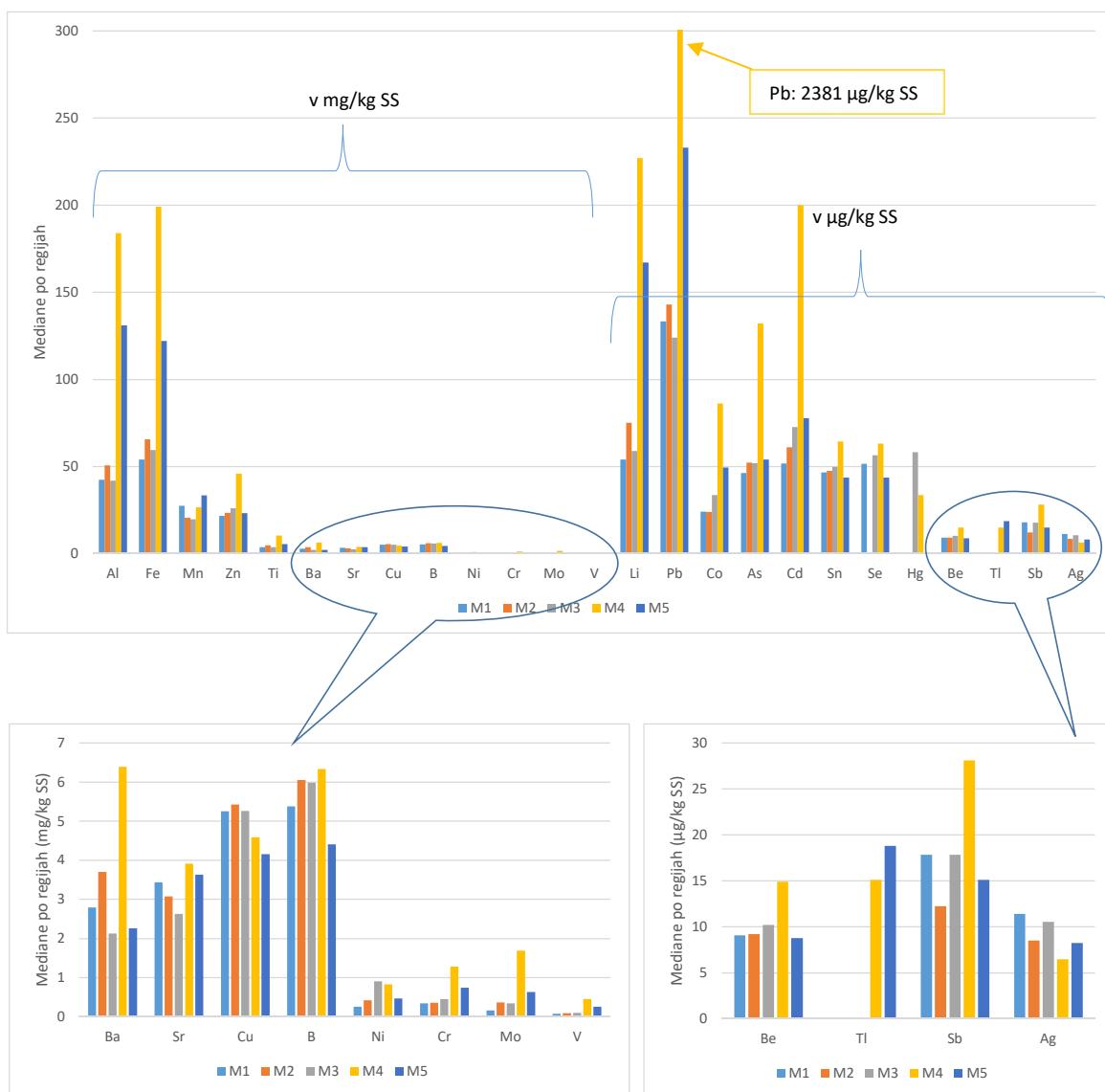
4.1.3 Rezultati vsebnosti elementov v silažah iz petih izbranih regij



Slika 8: Mediane vsebnosti za posamezne elemente v travni silaži iz petih regij

Figure 8: Contents of elements in samples of grass silage according to five regions

Na Sliki 8 in Sliki 9 so prikazane mediane vsebnosti posameznih elementov v travnih in koruznih silažah iz vseh petih izbranih regij. M1 je mediana vzorcev silaž iz pomurske, M2 iz podravske, M3 iz savinjske regije, M4 iz Mežiške doline in M5 iz gorenjske regije. Elementi so za boljšo pregledost navedeni v padajočem vrstnem redu glede na njihovo vsebnost v silažah. Zaradi velikih razlik v vsebnostih so mediane tako v travni kot v koruzni silaži za nekatere elemente dodatno prikazane tudi v nižjem območju (povečan pogled).



Slika 9: Mediane vsebnosti za posamezne elemente v koruzni silaži iz petih regij

Figure 9: Medians of elements in samples of maize silage according to five regions

4.2 REZULTATI VSEBNOSTI ELEMENTOV V OBROKIH

V Tabeli 9 so zbrani podatki o vsebnostih elementov v obrokih ($n = 6$ za vsako regijo), ki smo jih vzorčili v GR in MD. V Tabeli 9 so podane mediane vsebnosti, aritmetična povprečja, S.E.M. in območja (minimum–maksimum) za posamezne elemente. Vsi rezultati so podani na suho snov (SS).

Tabela 9: Vsebnosti elementov v obrokih za govedo^aTable 9: Contents of elements in meals for cattle^a

	Vsebnosti elementov v obrokih MD				Vsebnosti elementov v obrokih GR				<i>p</i>
	M4	Povp.	S.E.M.	Območje	M5	Povp.	S.E.M.	Območje	
Al	602	1007	364	237–2511	945	1021	219	471–1763	0,631
Fe	509	788	232	261–1528	728	793	142	392–1264	0,749
Mn	82,0	86,7	14,6	54,4–152	81,4	87,2	11,3	62,1–135	0,749
Zn	49,8	63,5	12,9	45,2–127	83,9	87,7	16,3	47,6–158	0,200
Ti	21,9	24,1	4,73	13,4–46,2	21,3	21,4	2,76	11,0–31,2	1,000
Ba	22,0	23,3	3,11	16,3–37,7	13,6	14,6	2,13	8,15–23,6	<0,05
Sr	11,4	11,5	1,01	8,57–14,8	10,3	13,5	2,88	8,55–26,5	0,873
Cu	9,26	9,48	0,98	6,00–13,2	10,9	13,9	2,88	8,51–25,9	0,337
B	9,11	9,48	0,92	6,84–13,6	7,24	7,31	0,33	6,36–8,38	<0,05
Ni	2,46	2,61	0,28	1,72–3,47	1,84	1,88	0,17	1,28–2,38	0,078
Cr	2,77	3,05	0,56	1,73–5,13	2,17	2,29	0,28	1,33–3,14	0,522
Mo	3,62	3,95	1,19	1,23–9,14	1,39	1,47	0,21	0,82–2,30	0,109
V	1,51	2,52	0,85	0,65–5,33	1,82	2,01	0,41	0,92–3,51	1,000
Li	620	1063	443	351–3209	1227	1223	222	553–1869	0,200
Pb	4076	6354	3041	497–20323	1231	1921	778	638–5722	0,262
Co	352	461	94	258–794	509	710	270	257–2041	0,631
As	295	719	334	110–2014	521	730	304	234–2219	0,423
Cd	378	417	55	273–603	187	212	37	110–342	<0,05
Sn	78	107	28	48–228	120	143	37	57–316	0,337
Se	80	123	28	<33–201	275	412	163	165–1203	0,055
Hg	<25	<25	–	<7–<25	35	35	1	<25–36	–
Be	34	56	18	18–124	55	59	11	28–100	0,423
Tl	31	47	15	14–117	62	60	13	27–115	0,522
Sb	42	57	18	12–124	37	36	4	19–49	0,631
Ag	13	14	4	<1–27	10	10	2	5–16	0,873

Opomba: ^aVsebnosti so podane v mg/kg SS za elemente od Al Do V in v µg/kg SS za elemente od Li do Ag. $p < 0,05$ prikazuje statistično značilne razlike med dvema regijama.

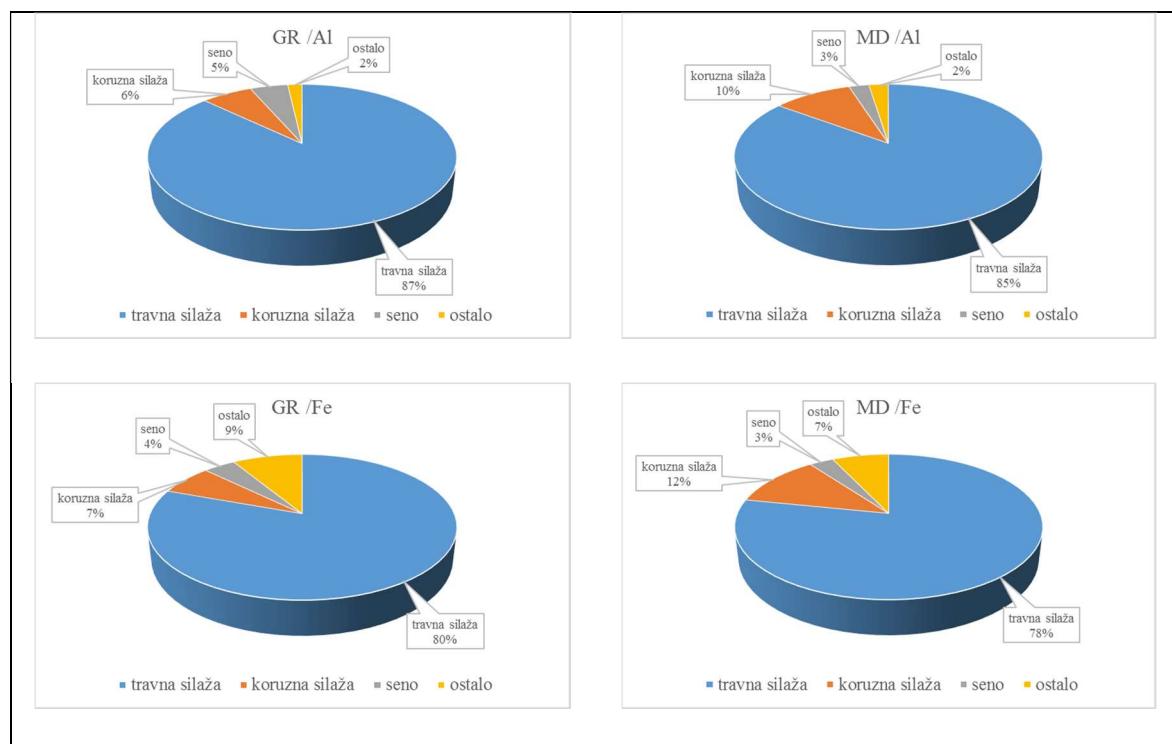
Vsebnosti izbranih elementov so bile v vseh obrokih nad LOD, z izjemo Hg, Se in Ag.

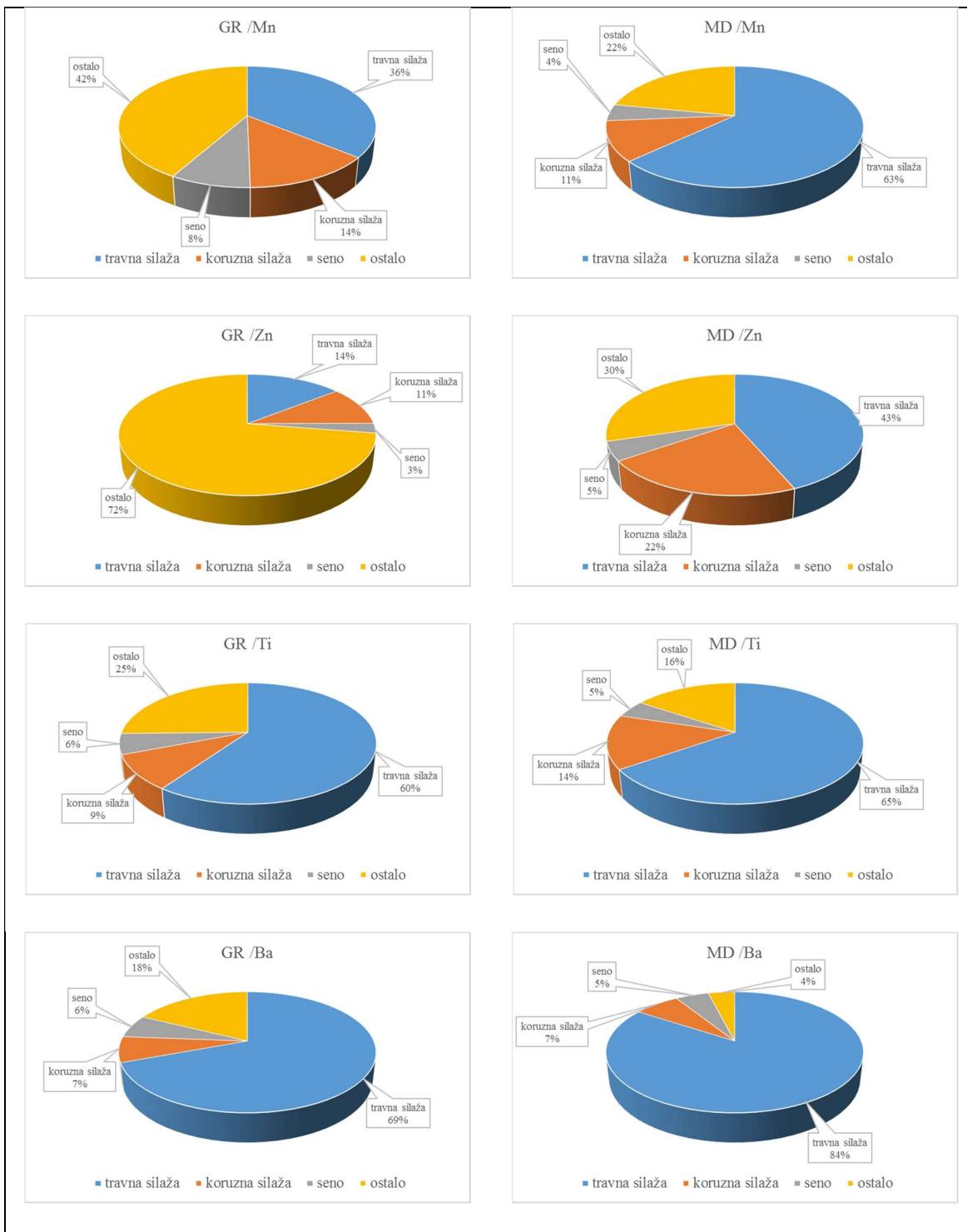
Vsebnosti Hg so bile v treh obrokih v MD pod LOQ (24,8 µg/kg SS), v treh obrokih pa celo

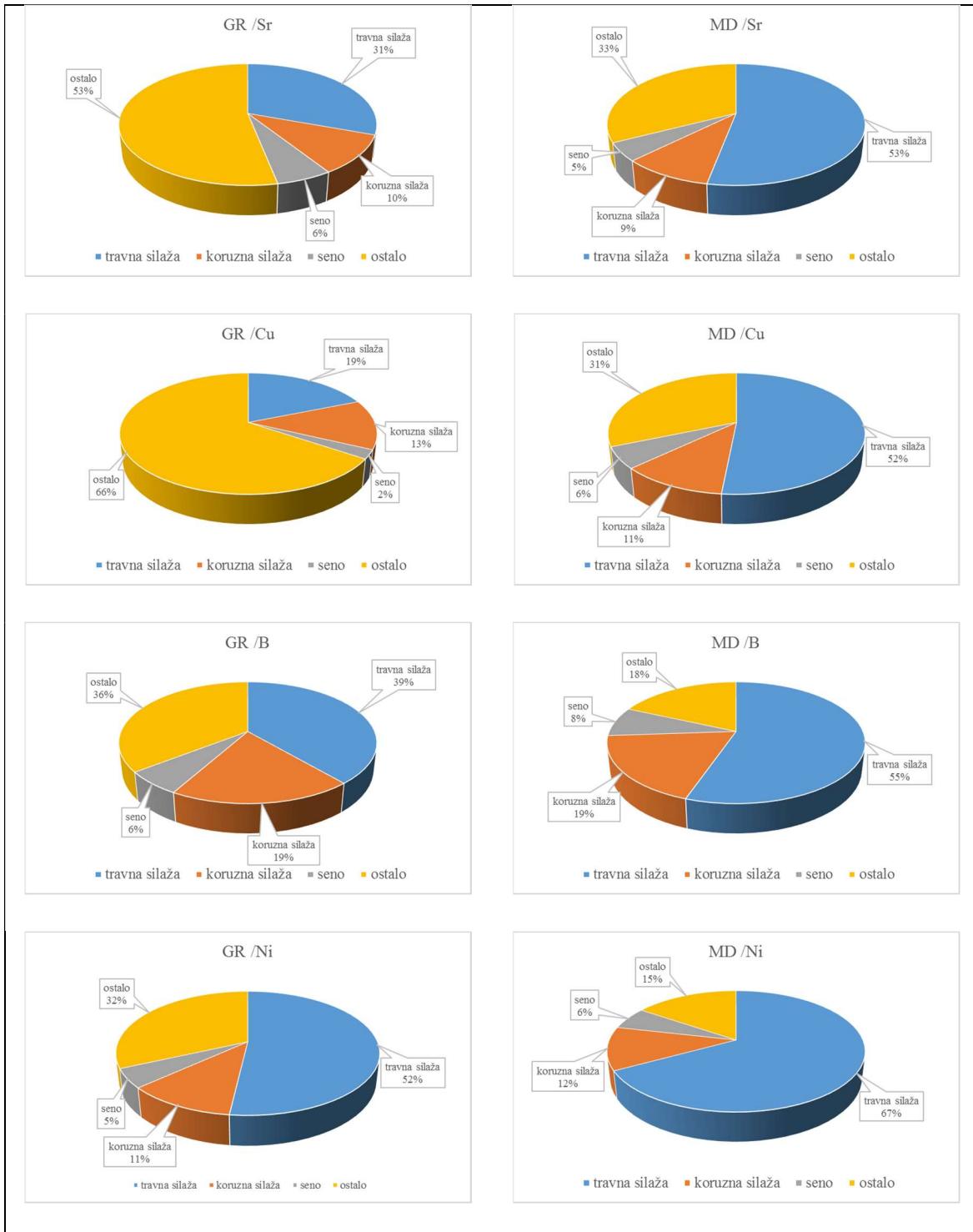
pod LOD ($7,4 \mu\text{g/kg SS}$). V GR sta Hg vsebovala le dva obroka ($33,9$ in $36,4 \mu\text{g/kg SS}$), v preostalih pa so bile vsebnosti prav tako pod LOQ ($24,8 \mu\text{g/kg SS}$). En obrok iz MD ni vseboval Se ($<32,5 \mu\text{g/kg SS}$), tudi en obrok iz MD ni vseboval Ag ($<1,1 \mu\text{g/kg SS}$). Izbrani elementi so bili v obrokih iz obeh regij prisotni v širokih koncentracijskih območjih. Maksimalne vsebnosti so bile za posamezne elemente v obrokih precej višje od mediane.

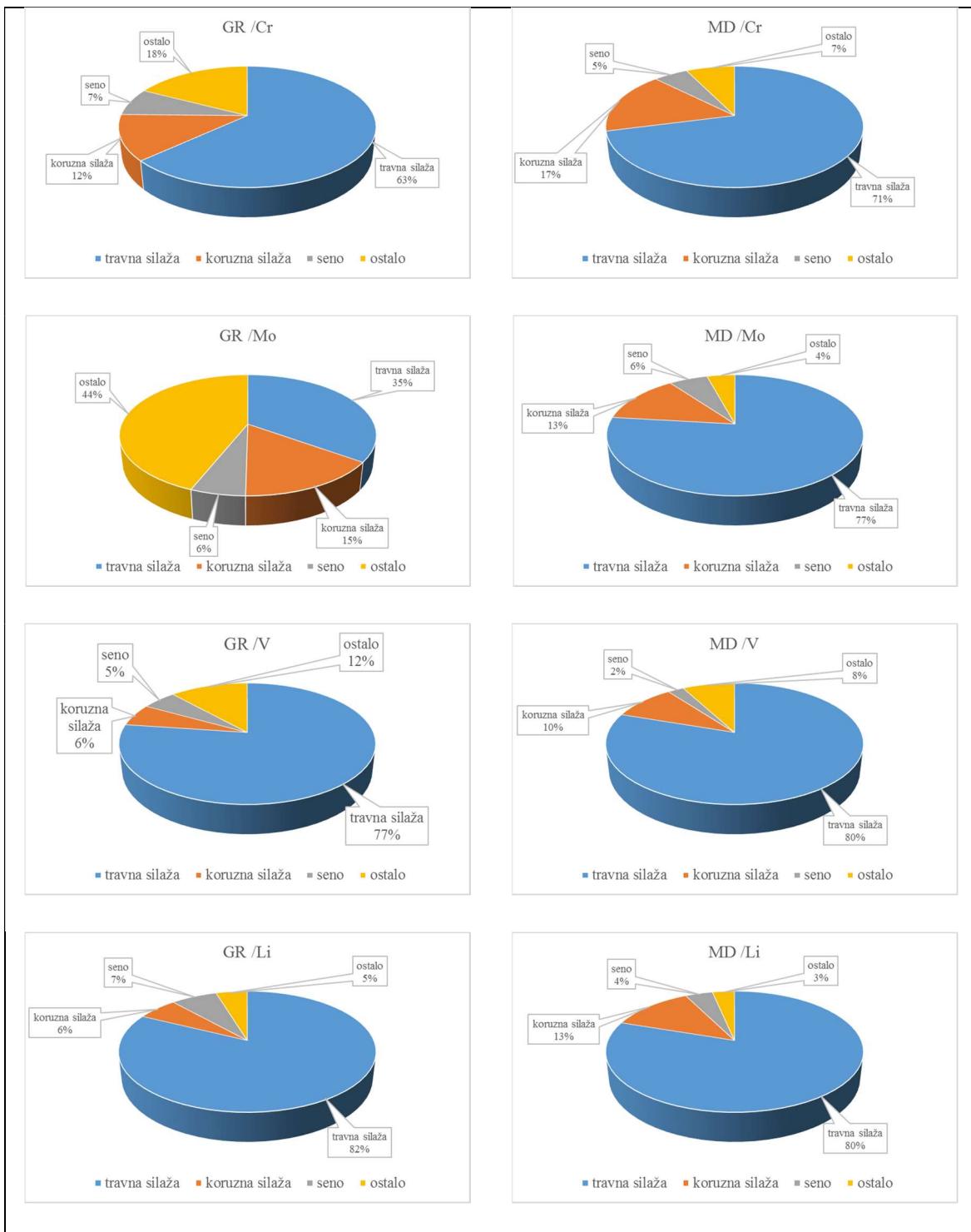
4.2.1 Prispevki posameznih sestavin obrokov k vsebnosti elementov

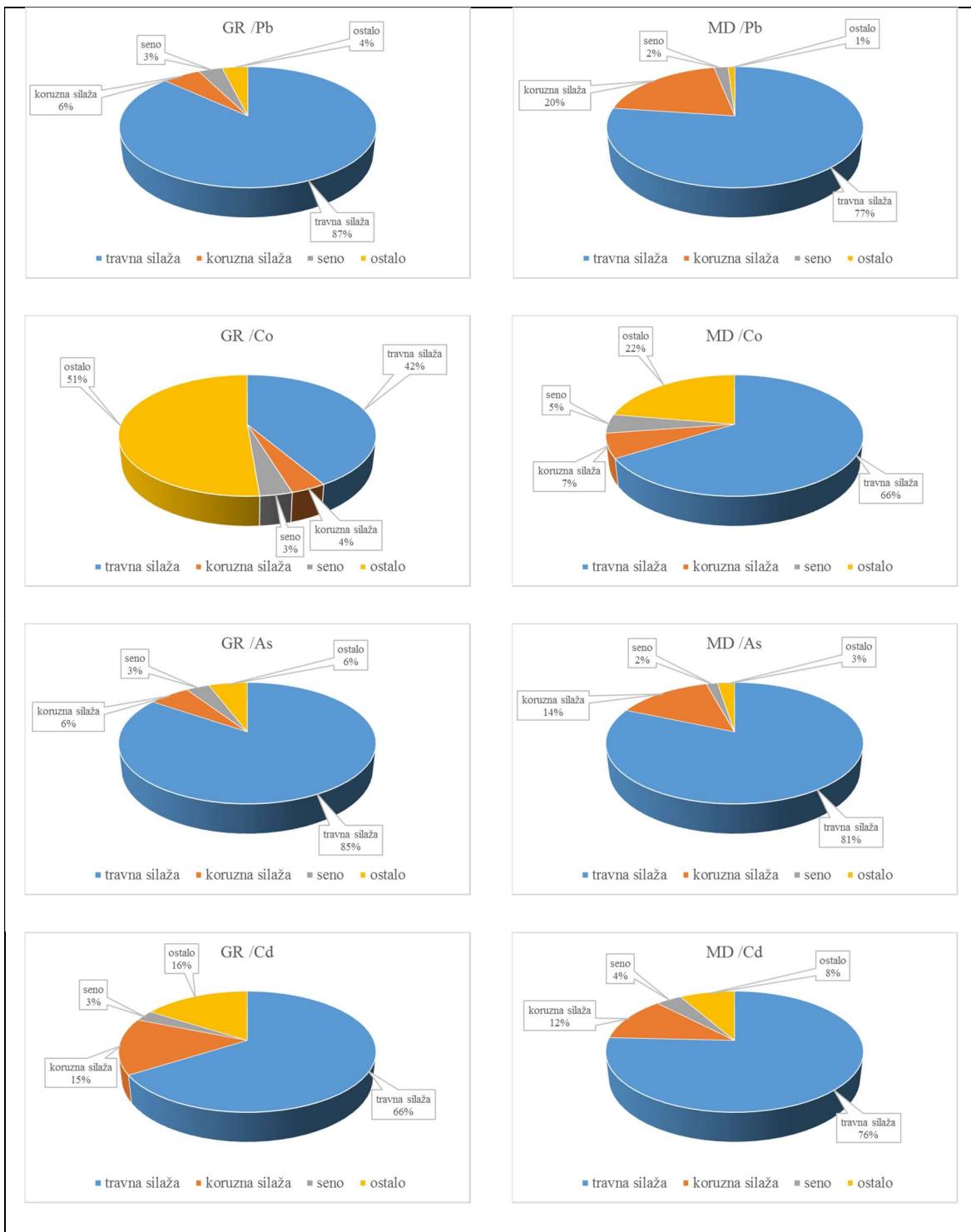
Tortni diagrami (Slika 10) prikazujejo, kakšen delež izbranega elementa doprinese posamezna sestavina v analiziranih obrokih iz GR in MD. Za izračun deleža (%), ki ga doprinese posamezna sestavina v obroku, smo uporabili mediane vsebnosti posameznih elementov.

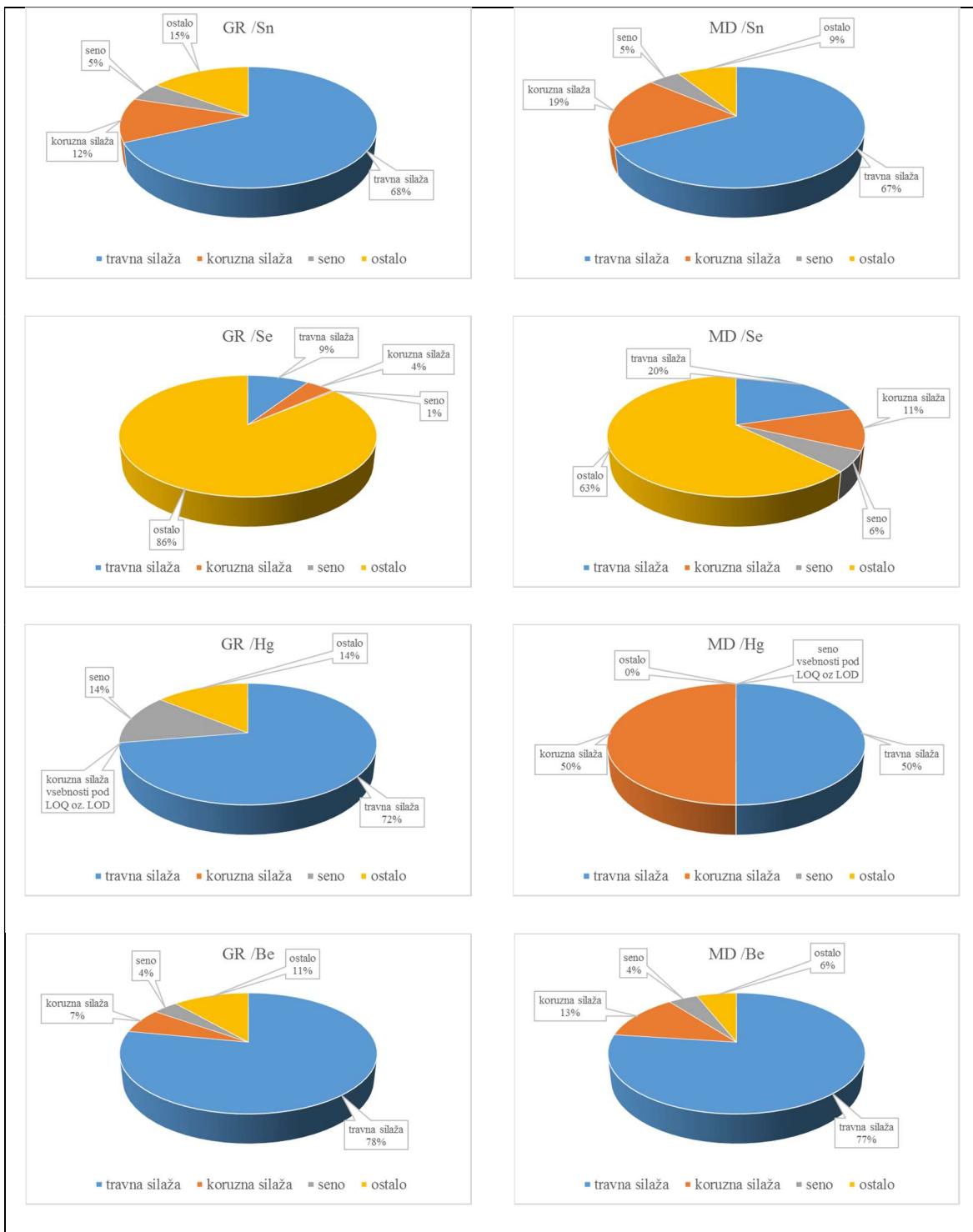


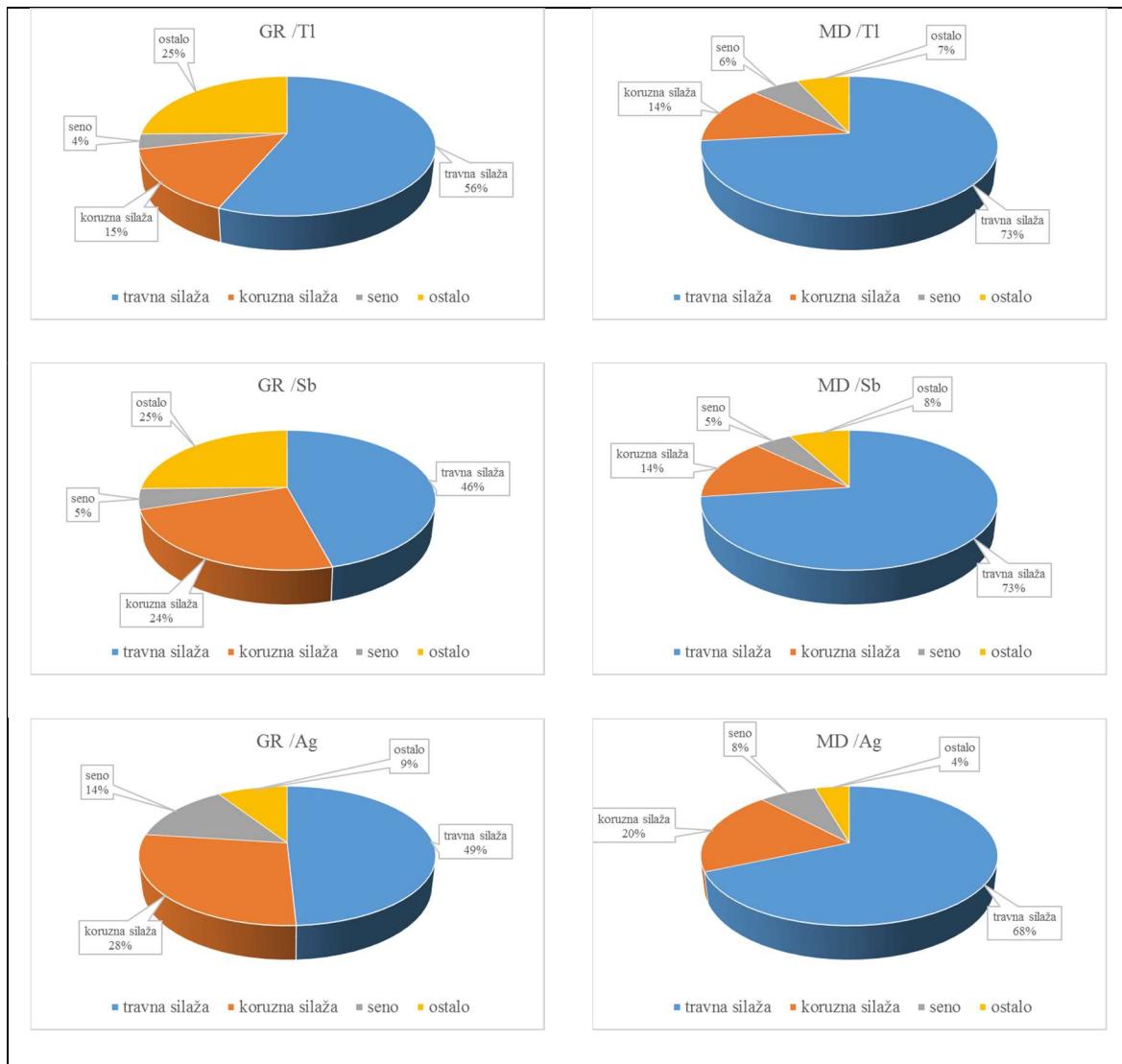












Slika 10: Prispevek posameznih sestavin k vsebnostim izbranih elementov v obrokih

Figure 10: The contribution of the individual components to the content of selected elements in the meals

4.2.2 Rezultati vsebnosti elementov v obrokih glede na potrebe

V Tabeli 10 so podane vsebnosti posameznih elementov v vseh dvanajstih obrokih iz GR in MD. Obroke iz GR in MD smo vrednotili v skladu s Tabelo 1, v kateri so zbrani kriteriji za posamezne elemente. Različne barve celic prikazujejo različne ravni vsebnosti elementov v obroku. S sivo barvo so označeni elementi, za katere podatki niso bili podani.

Tabela 10: Vsebnosti elementov v obrokih za govedo glede na potrebe^aTable 10: Contents of elements in meals for cattle according to requirements^a

	GR1	GR2	GR3	GR4	GR5	GR6	MD1	MD2	MD3	MD4	MD5	MD6
Al	645	1443	1244	471	558	1763	726	478	1663	425	237	2511
Fe	646	1137	810	392	510	1264	562	456	1493	425	261	1528
Mn	78,7	135	62,3	62,1	84,2	101	54,4	58,2	91,0	152	89,5	74,5
Zn	71,7	158	47,6	55,7	96,1	96,7	50,8	127	45,2	60,6	48,4	48,8
Ti	18,6	31,2	22,7	11,0	20,0	24,8	24,1	19,8	24,2	17,2	13,4	46,2
Ba	8,15	16,4	14,6	12,1	12,6	23,6	22,7	16,3	37,7	23,8	17,8	21,2
Sr	9,39	26,5	8,78	8,55	16,6	11,3	10,3	13,7	9,45	12,4	14,8	8,57
Cu	12,8	25,9	8,51	8,54	18,6	9,06	8,44	10,7	13,2	8,94	9,57	6,00
B	7,48	8,38	6,36	6,63	8,05	6,99	9,72	9,28	8,94	8,47	13,6	6,84
Ni	1,65	2,38	1,82	1,28	2,26	1,86	2,31	1,72	3,47	2,20	2,61	3,34
Cr	1,92	3,02	2,19	1,33	2,14	3,14	3,54	2,00	3,97	1,91	1,73	5,13
Mo	2,30	1,26	0,82	1,26	1,70	1,51	4,60	9,14	2,76	1,23	1,50	4,47
V	1,62	2,87	2,03	0,92	1,12	3,51	1,60	1,41	5,01	1,13	0,65	5,33
Li	973	1725	1481	553	736	1869	733	508	1119	461	351	3209
Pb	1139	1323	1832	638	871	5722	2402	5750	8158	992	497	20323
Co	561	2041	381	257	528	490	298	319	794	386	258	708
As	469	572	590	234	296	2219	284	306	1481	110	118	2014
Cd	175	304	199	144	110	342	309	603	352	405	273	560
Sn	92	151	142	57	99	316	87	65	145	69	48	228
Se	378	1203	165	181	368	178	80	201	182	76	78	<33
Hg	<25	36	<25	<25	34	<25	<25	<25	<7	<25	<7	<7
Be	42	73	67	28	42	100	39	29	97	27	18	124
Tl	65	67	59	29	27	115	32	27	64	30	14	117
Sb	38	37	19	42	29	49	36	49	124	27	12	93
Ag	11	10	9	5	6	16	18	9	27	5	<1	13

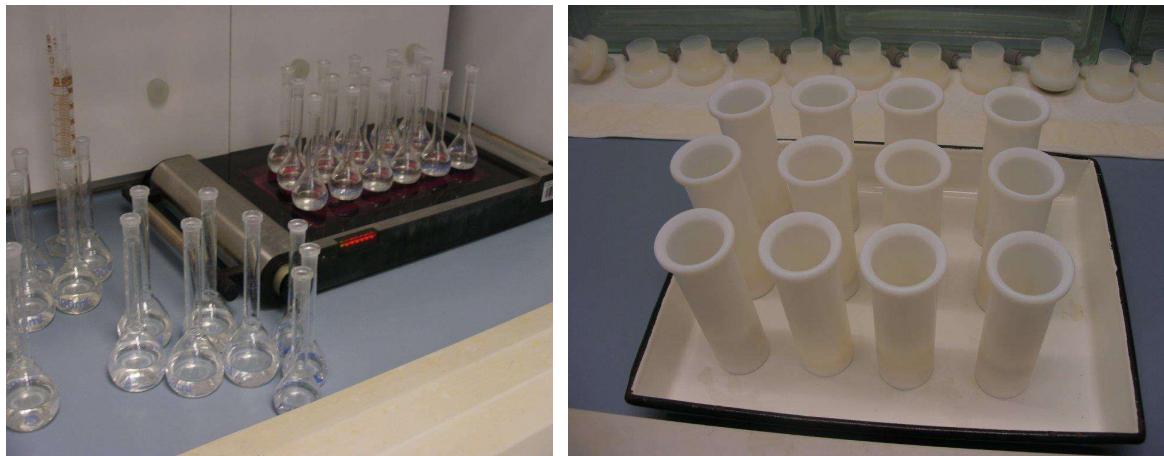
Legenda:

nizko	normalno	povišano	visoko	toksično	ni podatka
-------	----------	----------	--------	----------	------------

Opombe: ^a Vsebnosti so podane v mg/kg SS za elemente od Al do V in v µg/kg SS za elemente od Li do Ag.

4.3 REZULTATI VALIDACIJE ANALIZNEGA POSTOPKA

Rezultate testa linearnosti ter določitev LOD in LOQ smo zbrali v Tabeli 11. Linearost umeritvenih krivulj smo preverili v ustreznih koncentracijskih območjih od 0,05 µg/L do 1000 µg/L glede na vsebnosti posameznega elementa v krmi. V Tabeli 11 smo podali korelacijske koeficiente (R), ki se gibljejo od 0,9994 do 1,0000.



Slika 11: Priprava vzorcev

Figure 11: Sample preparation

Najnižji LOD (0,0008 mg/kg) in LOQ (0,0028 mg/kg) smo določili za element Be. Najvišji LOD (1,98 mg/kg) in LOQ (6,61 mg/kg) smo določili za element Fe. Z analizo dveh referenčnih materialov ERM-CD 281 (Rye grass) in SRM 1570a (Spinach) in z uporabo rezultatov znotrajlaboratorijske obnovljivosti smo določili izkoristke analiznega postopka, ki se za posamezne elemente gibljejo med 74 in 100 %.

Tabela 11: Rezultati testa linearnosti ter določitev LOD in LOQ

Table 11: Results of linearity test and the determination of LOD and LOQ

	⁷ Li	⁹ Be	¹¹ B	²⁷ Al	⁴⁷ Ti	⁵¹ V	⁵³ Cr	⁵⁵ Mn	⁵⁷ Fe	⁵⁹ Co	⁶⁰ Ni	⁶³ Cu	⁶⁶ Zn
Konc. območje (µg/L)	0,05-10	0,05-10	1-1000	10-1000	0,3-1000	0,05-50	0,05-500	0,5-1000	1-1000	0,05-100	0,1-100	0,5-1000	1-1000
Naklon (b ₁)	47601	11542	8637	33506	2667	36691	4079	55955	938	35957	7235	16149	4005
S.D. faktorjev	28	57	47	306	4	51	12	472	7	34	13	25	37
Presek (b ₀)	22638	82	31408	-114642	1272	6052	6407	32330	32671	1213	4937	6877	4128
S.D. preseka	115	16	2632	78359	101	210	50	98690	3103	140	277	5231	2101
Korelacijski koeficient	1,0000	1,0000	0,9996	0,9998	0,9999	1,0000	0,9999	0,9998	0,9999	0,9994	0,9999	0,9999	0,9998
LOD (mg/kg)	0,0015	0,0008	0,1829	1,4032	0,0227	0,0034	0,0073	1,0583	1,9849	0,0023	0,0230	0,1944	0,3147
LOQ (mg/kg)	0,0048	0,0028	0,6096	4,6773	0,0757	0,0115	0,0245	3,5275	6,6164	0,0078	0,0765	0,6478	1,0490
<hr/>													
Konc. območje (µg/L)	0,05-100	0,05-50	0,05-50	0,05-50	0,05-50	0,05-50	0,05-500	0,05-10	0,05-50	0,05-100	0,1-100	0,05-100	0,05-100
Naklon (b ₁)	59150	9694	27938	5558	17182	17670	9010	3559	36933	49507	36	52	
S.D. faktorjev	78	36	13	3	23	21	57	85	232	90	0,83	0,21	
Presek (b ₀)	-507	552	338	277	1120	193	449	1282	712	7776	7,42	9,19	
S.D. preseka	1506	19	54	13	93	87	30	44	119	371	0,48	0,85	
Korelacijski koeficient	0,9994	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	
LOD (mg/kg)	0,0153	0,0012	0,0011	0,0014	0,0033	0,0029	0,0020	0,0074	0,0019	0,0045	0,0079	0,0097	
LOQ (mg/kg)	0,0509	0,0039	0,0038	0,0045	0,0109	0,0098	0,0066	0,0248	0,0065	0,0150	0,0264	0,0325	

Tabela 12: Rezultati ponovljivosti, obnovljivosti in pravilnosti za ERM-CD 281

Table 12: Results of repeatability, reproducibility and trueness tests for ERM-CD 281

	RSD _r (%)	RSD _{ref} (%)	RSD _R (%)	RSD _{Ref} (%)	Pravilnost (%)	Določena vsebnost ± U (mg/kg)	Certificirana vsebnost ± U (mg/kg)
B	11	8,2	6,7	12	102	5,6 ± 0,8	5,5 ± 0,5
Cr	1,1	6,6	5,6	9,8	101	25,0 ± 2,8	24,8 ± 1,3
Mn	1,1	5,5	5,3	8,2	101	82,6 ± 8,8	82 ± 4
Fe	0,6	4,9	5,7	7,3	100	179 ± 20	180
Ni	0,9	7,1	6,6	11	100	15,2 ± 2,0	15,2 ± 0,6
Cu	2,3	7,5	7,5	11	98	10,0 ± 1,5	10,2 ± 0,5
Zn	0,7	6,4	4,9	9,5	100	30,4 ± 3,0	30,5 ± 1,1
Mo	1,8	9,4	7,2	14	104	2,32 ± 0,33	2,22 ± 0,12
Cd	3,4	29	1,7	44	97	0,117 ± 0,004	0,120 ± 0,007
Sn	3,9	29	18	44	106	0,066 ± 0,024	0,062 ± 0,011
Sb	3,7	29	51	44	86	0,036 ± 0,036	0,042 ± 0,007
Pb	2,1	10	4,2	15	101	1,68 ± 0,14	1,67 ± 0,11
As	12	29	11	44	105	0,044 ± 0,010	0,042 ± 0,010

Opomba: Hg in Se < LOQ

Tabela 13: Rezultati ponovljivosti, obnovljivosti in pravilnosti za SRM 1570a

Table 13: Results of repeatability, reproducibility and trueness tests for SRM 1570a

	RSD _r (%)	RSD _{ref} (%)	RSD _R (%)	RSD _{Ref} (%)	Pravilnost (%)	Določena vsebnost ± U (mg/kg)	Certificirana vsebnost ± U (mg/kg)
B	4,1	6,2	3,7	9,3	94	35,4 ± 2,7	37,6 ± 1,0
Al	3,9	4,5	5,6	6,6	108	334 ± 37	310 ± 11
V	3,6	12	15	17	100	0,57 ± 0,17	0,57 ± 0,03
Mn	2,8	5,6	3,5	8,3	98	74,4 ± 5,1	75,9 ± 1,9
Co	3,4	12	14	25	100	0,39 ± 0,06	0,39 ± 0,05
Ni	5,7	10	7,7	14	94	2,02 ± 0,31	2,14 ± 0,10
Cu	3,9	7,4	6,0	11	94	11,5 ± 1,4	12,2 ± 0,6
Zn	3,6	5,6	3,3	8,3	92	75,8 ± 5,1	82 ± 3
Sr	2,1	5,7	3,0	8,7	100	55,8 ± 3,3	55,6 ± 0,8
Cd	2,0	9	2,1	14	100	2,90 ± 0,06	2,89 ± 0,07
Hg	8,7	29	15	44	93	0,028 ± 0,008	0,030 ± 0,003
As	13	29	11	44	103	0,070 ± 0,016	0,068 ± 0,012
Se	4,4	29	7,6	44	105	0,123 ± 0,019	0,117 ± 0,009

V Tabelah 12 in 13 so zbrani rezultati preizkusa ponovljivosti postopka, izraženi z relativno standardno deviacijo (RSD_r), znotrajlaboratorijske obnovljivosti, izraženi z relativno standardno deviacijo (RSD_R), ter referenčne vrednosti RSD_{ref} in RSD_{Rref} , izračunane v skladu z zahtevami iz Uredbe (EU) št. 836/2011 (283). Poleg tega so podane še pravilnost, vsebnosti, ki smo jih določili, in certificirane vsebnosti dveh referenčnih materialov ERM-CD 281 in SRM 1570a z izračunanimi meritnimi negotovostmi (U).

Tabela 14: Rezultati ponovljivosti, obnovljivosti in pravilnosti za travno silažo

Table 14: Results of repeatability, reproducibility and trueness tests for grass silage

	Maks. razlika (mg/kg)	r_{ref} (mg/kg)	RSD_R (%)	RSD_{Rref} (%)	Pravilnost (%)	Določena vsebnost $\pm U$ (mg/kg)
Li	0,144	0,298	8,2	14	100	$2,00 \pm 0,34$
Be	0,074	0,302	6,7	14	100	$2,00 \pm 0,27$
Ti	9,87	6,86	6,9	8,7	–	$55,7 \pm 7,7$
Ag	0,097	0,319	9,5	14	105	$2,11 \pm 0,40$
Ba	3,29	3,29	6,7	10	–	$23,5 \pm 3,1$
Tl	0,083	0,369	6,5	14	104	$2,09 \pm 0,27$

V Tabeli 14 so zbrani rezultati ponovljivosti postopka za vzorec travne silaže, ki smo jo izrazili kot razliko med paralelkami, izvedenimi v testu znotrajlaboratorijske obnovljivosti (r), rezultati znotrajlaboratorijske obnovljivosti, izraženi z relativno standardno deviacijo (RSD_R), pravilnosti postopka in rezultati izračunane meritne negotovosti (U). Vzorcu travne silaže smo dodali multielementne delovne standardne raztopine, tako da so vsebnosti ustrezale 2 mg/kg v krmi.

5 RAZPRAVA

5.1 VSEBNOSTI ELEMENTOV V VZORCIH SILAŽ

Da bi ugotovili, kakšne so vsebnosti elementov v sledovih v travnih in koruznih silažah in ali se vsebnosti elementov v silažah razlikujejo po regijah v Sloveniji, smo vzorce odvzeli v pomurski, podravski in savinjski regiji. Shema vzorčenja glede na regije je prikazana v Tabeli 2. Glede na popis kmetijstva, ki se izvaja vsakih deset let in je bil nazadnje izveden leta 2010 (288), je bilo največ kmetijskih gospodarstev prav v teh treh regijah, in sicer v podravski nekaj več kot 12.300, v savinjski nekaj več kot 11.400 in v pomurski statistični regiji skoraj 8.900. V teh treh regijah (od skupno 12 regij) so skupaj gojili kar 42 % vsega goveda v Sloveniji (288).

V Sloveniji se za siliranje največ uporablja travnine in koruza. Ocenjena letna količina pripravljenih silaže je 1,5 milijona ton travne silaže in 1,2 milijona ton koruzne silaže. Silaža se pripravlja že več kot sto let, vendar pa se je siliranje bolj uveljavilo po 1970, ko so stroji za siliranje in silosi postali dostopnejši. Uporaba sena za zimsko krmo se je postopoma zmanjševala in pridelava silaže se je povečala. V zadnjem času je silaža postala pomembna za krmljenje goveda in 25% slovenskih kmetij silažo za krave molznice zdaj uporablja tudi poleti (289).

Obseg živinoreje na kmetijskih gospodarstvih je bil v letu 2010 v povprečju največji v gorenjski regiji (GR), kjer je znašal skoraj devet glad velike živine na kmetijsko gospodarstvo (288). To regijo smo izbrali za odvzem obrokov na potencialno neonesnaženem območju. Za potencialno onesnaženo območje smo izbrali Mežiško dolino (MD) zaradi onesnaženosti okolja kot posledice rudarsko-metalurške dejavnosti v preteklosti. Obremenjenost okolja z žveplovim dioksidom (SO_2) in prahom (posledično tudi Pb v prahu) se je sicer v zadnjih letih občutno zmanjšala, ostaja pa problematika obremenjenosti tal s Pb, Zn in Cd. Na kmetijah v Mežiški dolini prevladuje živinorejska dejavnost, od tega govedoreja, predvsem reja krav dojlj in pitanje mladega goveda. Tržna proizvodnja mleka prevladuje na šestih kmetijah, nekatere kmetije pa se ukvarjajo tudi z rejo drobnice in divjadi v oborah (damjaki, jelenjad, mufloni). Doma pridelana voluminozna krma (mrva, travna silaža) se uporablja za prehrano prežvekovalcev v zimskem času (290).

5.1.1 Primerjava vsebnosti elementov v silažah s podatki z drugih območij

Rezultati naše študije o vsebnostih elementov v travnih in koruznih silažah (291) so primerljivi z vsebnostmi z drugih območij. Ker so podatki o raziskavah vsebnosti elementov v krmi za govedo v znanstveni literaturi pomanjkljivi (3), smo lahko primerjali podatke le za določene elemente in le z območij, za katere podatki obstajajo. Rezultate vsebnosti Cu, Mo, Zn, Mn, Co in Se, ki so zbrani v Tabeli 6, lahko primerjamo le z vsebnostmi v travnih silažah z Islandije (292) in z vsebnostmi v travnih silažah in pašniških krmnih rastlinah iz Irske (262).

Vsebnosti Cu (mg/kg SS) so podobne v slovenski travni silaži (povprečje 8,05; območje 5,16–11,1) in v islandski krmi (povprečje 8,0; območje 4–16), so pa nižje kot v irski travni silaži (povprečje 10,36; območje 2,8–39,7). Povprečne vsebnosti Cu v slovenski in islandski travni silaži tako ne zadoščajo potrebam (<10 mg/kg SS), zato je priporočljivo njegovo rutinsko dodajanje (262).

Mo je dokazan antagonist Cu pri govedu. V vsebnostih Mo (mg/kg SS) v travni silaži se kažejo največje razlike med Slovenijo (povprečje 1,17; območje 0,272–2,92), Islandijo (povprečje 0,23, območje 0,0043–2,37) in Irsko (povprečje 1,48, območje 0,1–18,3, n = 1505). Mo povzroča pomanjkanje Cu pri govedu običajno takrat, ko so vsebnosti v krmi >5 mg/kg SS in/ali pri razmerjih Cu : Mo<3 : 1. Te vsebnosti v travni silaži v Sloveniji in na Islandiji niso pogoste (291). Klinična pomanjkanja Cu, ki jih povzroči Mo, so pogosta pri irski živini na paši brez dodajanja druge krme (293). Zelišča na irskih pašnikih imajo višje vsebnosti Mo (povprečje 2,49; območje 0,1–52,0; n = 1658) in nižje vsebnosti Cu (povprečje 9,22; območje 1,6–23,7; n = 1741) kot vsebnosti v irski travni silaži, vendar pa so vsebnosti Mo v irski travni silaži pogosto nad 5 mg/kg SS (262). Zaradi nižje vsebnosti Cu in povišane vsebnosti Mo v irskih zeliščih in travni silaži se dopolnitev obrokov s Cu v irskih čredah uporablja rutinsko (262). Tudi pri nas so obroki za govedo iz istih razlogov dopolnjeni s Cu.

Vsebnosti Se ($\mu\text{g}/\text{kg}$ SS) v slovenski travni silaži (povprečje 65,9; območje <32,5–176) se ujemajo z vsebnostmi, ki so jih prikazali v Nemčiji (povprečje 65,3; območje <32,5–180) (294). Obe povprečni vsebnosti sta nekoliko višji kot povprečne vsebnosti Se v slovenski krmi (50,2), o kateri so poročali Žust in sod. (295), ter precej nižji kot v irski travni silaži (povprečje 93; območje <2 – 232; n = 1507) in v irskih pašnih rastlinah (povprečje 93;

območje <1 – 250; n = 1459) (262). Povprečne vsebnosti Se ($\mu\text{g}/\text{kg}$ SS) v koruzni silaži so bile še nižje. V našem primeru je bila povprečna vsebnost 55,0, v Nemčiji 28,2 (294) in 38,7, ki so jo poročali Žust in sod. (295).

Naši podatki kažejo, da so vsebnosti Se v slovenski travni in koruzni silaži nizke in ne zadovoljujejo potreb prežvekovalcev (262). Podatki potrjujejo tudi ugotovitve študije v Nemčiji (294), ki navajajo, da je treba posodobiti preglednice nemške kmetijske družbe (DLG). Večina naših podatkov in podatkov v študiji iz Nemčije (294) se giblje med <90 in 130 $\mu\text{g}/\text{kg}$ SS, dejansko pa je optimalna priporočljiva vsebnost Se v krmi za govedo višja (>200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ SS) (296). Iz teh podatkov sledi, da je treba govedu, ki se krmi s slovensko voluminozno krmo, Se dodajati.

Povprečne vsebnosti Zn (mg/kg SS) v travni silaži v Sloveniji, na Islandiji in Irskem so 30,6 (območje 20,9–77,5), 35 (območje 14,1–85,0) in 29,7 (območje 10–94). Vsebnosti Zn v irskih pašniških rastlinah so bile zelo podobne vsebnostim v irski travni silaži (povprečje 30,8; območje 13–84; n = 928). Nekatere vsebnosti so bile v vseh treh državah <25 mg/kg SS, ki je najnižja vsebnost Zn, priporočljive za govedo (262), toda vsi pogoji so bili normalni in tveganje za pomanjkanje Zn, ki bi izhajalo iz takšne krme, je nizko. Na Irskem so poročali, da jim ni uspelo potrditi primarnega pomanjkanja Zn pri irskih čredah, vendar pa so potrdili nekaj primerov sekundarnega pomanjkanja Zn, ki je bilo povezano s previsokimi vsebnostmi Ca v krmi (262).

Povprečne vsebnosti Mn (mg/kg SS) v travni silaži v Sloveniji, na Islandiji in Irskem so 79,0 (območje 26,3–159), 125 (območje 40–550) in 103,5 (območje 2–477). Vsebnosti Mn v irskih pašniških rastlinah so 119,8 (območje 10–693; n = 1872) (262). Ker so ugotovljene vsebnosti v vseh primerjanih državah precej višje od najnižje priporočene vsebnosti za govedo (25 mg/kg SS), je tveganje za primarno pomanjkanje Mn pri govedu na teh območjih nizko (262).

Povprečne vsebnosti Co ($\mu\text{g}/\text{kg}$ SS) v travni silaži v Sloveniji in na Islandiji so 380 (območje 74,7–1645) in 317 (območje 41–2010). Te vsebnosti v večini primerov presegajo minimalne potrebe goveda po Co, ki so 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ SS. Tudi povišane vsebnosti Co v vzorcih so odraz kontaminacije silaže z zemljo (262).

Razlike med vsebnostmi Co, Al in Fe v travni silaži v primerjavi s koruzno silažo so dokaz za kontaminacijo z zemljo pri spravilu travne silaže (1, 46, 292, 297). Vsebnost Co ($\mu\text{g}/\text{kg}$ SS) v travni silaži je približno devetkrat višja kot v koruzni silaži (povprečje 44,6; mediana 24,3; območje 14,1–150). Vsebnosti Al so običajno na pašniku $<100 \text{ mg/kg}$, v neugodnih razmerah pa lahko ravno zaradi kontaminacije z zemljo presežejo tudi 1000 mg/kg . Vsebnosti Al v zrnju so običajno 5–68 mg/kg (3). Vsebnosti Al (mg/kg SS) v travni silaži v Sloveniji (povprečje 857; mediana 480; območje 60,7–4204) so bile približno 13-krat višje kot v koruzni silaži (povprečje 68,0; mediana 46,0; območje 23,0–353) in vsebnosti Fe v travni silaži (povprečje 744; mediana 468; območje 113–3489) približno desetkrat višje kot v koruzni silaži (povprečje 76,9; mediana 58,3; območje 45,7–275). Medtem ko govedo, krmljeno s travno silažo, verjetno ne bi potrebovalo dodatka Co, ga tisto, krmljeno s koruzno silažo, potrebuje, saj so bile povprečne vrednosti v koruzni silaži $<50 \text{ \%}$ minimalne priporočene vsebnosti Co v krmi za govedo (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ SS) (262).

V nekaterih študijah (292) so vzorce z vsebnostmi Fe $>1000 \text{ mg/kg}$ označili kot kontaminirane z zemljo in so jih iz raziskave izključili. Med žetvijo pridelka za seno ali silažo pogosto zajamejo tudi zemljo in povišane vsebnosti drugih elementov so lahko posledica te kontaminacije (46). To bi pojasnilo tudi široka območja izbranih elementov, navzočih v analiziranih vzorcih, in razlike med povprečjem in mediano. Po našem mnenju izključitev teh vzorcev iz raziskave ne bi zagotovila celovitega vpogleda v dejansko stanje glede vsebnosti elementov v silaži, s katero krmijo živali na slovenskih kmetijah. Na splošno je v naši voluminozni krmi dovolj Fe in se v praksi s pomanjkanjem tega elementa ne srečujejo (297).

Tudi vsebnosti Zn, Cu, Cr, Cd, Pb in As v koruzni silaži smo primerjali z rezultati študije iz Wisconsina (6). Vsebnosti Zn (mg/kg SS) v koruzni silaži v Sloveniji (povprečje 23,9; mediana 23,1; območje 13,3–35,9) in v Wisconsinu (povprečje 27; mediana 24; območje 17–77) so bile podobne, vendar pa je območje ugotovljenih vsebnosti v tej raziskavi v Sloveniji ožje kot v Wisconsinu. Vsebnosti Zn v koruzni silaži so bile v obeh raziskavah mejne, saj je minimalna priporočljiva vsebnost Zn v krmi za govedo 25 mg/kg SS (262).

Povprečne vsebnosti Cu (mg/kg SS) v koruzni silaži v Sloveniji (povprečje 5,53; območje 4,27–7,53) so bile malenkost višje kot v Wisconsinu (povprečje 4,0; območje 2–6,4). Vsebnosti Cu v koruzni silaži so bile v obeh raziskavah zelo nizke, saj je minimalna priporočljiva vsebnost Cu v krmi za govedo 10 mg/kg SS (262). Povprečne vsebnosti Mn (mg/kg SS) v slovenskih silažah so primerljive tudi z vsebnostmi, objavljenimi v literaturi (3). Poročane vsebnosti Mn v travni in koruzni silaži so bile 98 in 28, medtem ko so naši rezultati nekoliko nižji, 79 v travni silaži in 25 v koruzni silaži.

V naši raziskavi so ugotovljene povprečne vsebnosti Cr (mg/kg SS) v koruzni silaži (povprečje 0,412; območje 0,194–0,848) le malenkost nižje kot v Wisconsinu (povprečje 0,519; območje 0,207–1,702) (6). Povprečne vsebnosti Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$ SS) v slovenskih silažah (povprečje 62) so primerljive z vsebnostmi v Wisconsinu (povprečje 68). Vendar pa so bile povprečne vsebnosti Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ SS) v slovenskih silažah (povprečje 146) za polovico nižje od vsebnosti v Wisconsinu (povprečje 260), povprečne vsebnosti As ($\mu\text{g}/\text{kg}$ SS) pa so še nižje (53,6 pri nas in 201 v Wisconsinu). Povprečne vsebnosti Ni (mg/kg SS) v koruzni silaži v Sloveniji (povprečje 1,32; območje 0,179–15,6) so bile primerljive s povprečjem 1,28, ki ga navaja Van Paemel s sodelavci (3).

Do zdaj so podatki za vsebnosti elementov v posamičnih krmilih, ki se štejejo za neesencialne za živali, v literaturi pomanjkljivi. Za Li, B, Sr, in Ag smo našli naslednje podatke. Krma je na splošno bogat vir Li, a vrednosti Li se razlikujejo glede na tla, na katerih se te rastline goji (3). Vsebnosti B v kopenskih rastlinah se gibljejo med 2 in 95 mg/kg. Poročane vsebnosti Sr v senu so 9,4 mg/kg, vendar pa ni na voljo podatkov za travno silažo. Akumulacija Ag v kopenskih rastlinah iz tal je nizka, tudi iz tal, gnojenih s komunalnim blatom, ki vsebuje Ag. Na splošno kopenske rastline vsebujejo 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Ag. Poročane vsebnosti Sn na pašnikih se gibljejo med 0,3 in 0,4 mg/kg. V literaturi ni na voljo podatkov o vsebnosti V v posamičnih krmilih (3), zato za vse te elemente naših rezultatov ne moremo primerjati s podatki iz literature.

Iz navedenega sledi, da je v slovenskih travnih in koruznih silažah dovolj le dveh esencialnih elementov – Mn in Fe. V obeh vrstah silaž primanjkuje Cu in Se, medtem ko je v koruzni silaži premalo Zn in Co. Voluminozna krma za govedo ne vsebuje dovolj elementov v sledovih, prav tako elementi niso v ustreznih razmerjih, zato moramo redno krmiti primerno izbran MVD v količinah, ki ustrezajo stopnji pomanjkanja posameznega elementa.

S primerjavo vsebnosti izbranega elementa v travnih in koruznih silažah lahko ugotovimo, da se lahko razlikujejo tudi do desetkrat. Statistično značilne razlike med travno in koruzno silažo so bile ugotovljene za večino elementov, razen za Ag in Hg. Ti rezultati potrjujejo našo drugo hipotezo, da so koncentracije mikro- in ultramikroelementov v krmi odvisne od vrste in izvora krme.

5.1.2 Primerjava vsebnosti elementov v silažah iz petih izbranih regij

Mediane vsebnosti posameznih elementov v travnih in koruznih silažah v vseh petih vzorčenih regijah so prikazane na Slikah 8 in 9 v stolpcih v padajočem vrstnem redu.

V obeh vrstah silaž so najvišje vsebnosti Al (396–2235 mg/kg SS) in Fe (360–1767 mg/kg SS), kar kaže na kontaminacijo vzorcev z zemljo. Izstopajo tudi vsebnosti Zn, Pb in Cd v vzorcih iz MD, kar smo glede na znano onesnaženost regije s temi elementi pričakovali. V povprečju so mediane vsebnosti teh treh elementov v travni silaži iz MD za 11 % višje kot v silaži iz GR. Še večje razlike se kažejo v koruzni silaži, kjer so mediane vsebnosti Zn v silaži iz MD za 50 %, Cd za 61 % in Pb celo za 90 % višje kot v silaži iz GR. V vsebnostih Cd in Pb obe regiji zelo odstopata, saj so mediane vsebnosti v travni silaži kar za 80 % višje kot v preostalih regijah. Koruzna silaža v preostalih regijah vsebuje le 6 % vsebnosti Pb in 27 % vsebnosti Cd v silažah iz MD. Če so bile v prvih treh regijah povprečne vsebnosti Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ SS) v koruzni silaži (povprečje 146) za polovico nižje od vsebnosti v Wisconsinu (povprečje 260) (6), pa so bile v MD (povprečje 5255) kar za 20-krat višje. Prav tako so povprečne vsebnosti Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$ SS) (povprečje 499) v MD za sedemkrat višje kot v Wisconsinu (povprečje 68) (6). V primerjavi z literaturo navzgor odstopajo še vsebnosti za Ti zaradi kontaminacije z zemljo (ponavadi vsebnosti do 1 mg/kg (222)), Cr v MD in GR (ponavadi vsebnosti do 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (129)), Co v GR (ponavadi do 1 mg/kg (129)), Be v GR (ponavadi do 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (88,93)) in Sb v MD (ponavadi do 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (193–195)).

Presenetljivo visoke so vsebnosti Al, Fe in Co v travnih silažah iz vseh petih regij. Te visoke vsebnosti kažejo na povečano kontaminacijo travne silaže z zemljo pri spravilu ali pa med pripravo silosa. Kontaminacija z zemljo pojasnjuje tudi široka območja vsebnosti izbranih elementov v analiziranih vzorcih in velike razlike med njihovim povprečjem in mediano. Tudi povišane vsebnosti nekaterih drugih elementov so lahko posledica kontaminacije (46).

Ta problem so opazili tudi v nekaterih drugih študijah pri nas in po svetu (1, 46, 292, 297). Na kontaminacijo silaž z zemljo prav tako kažejo visoke vsebnosti Ti (mg/kg SS) v travni silaži (povprečje 19,0; mediana 29,5; območje 5,89–143) in koruzni silaži (povprečje 4,09; mediana 4,69; območje 2,17–14,6), saj vzorci rastlin, ki niso kontaminirani z zemljo, glede na podatke v literaturi povprečno vsebujejo manj kot 1 mg/kg Ti (222).

Primesi zemlje v silaži tudi ob drugače pravilno izvedenih postopkih siliranja povzročajo kvarjenje silaže in so za živali škodljive. Zemlja v silažo zaide takrat, ko je na obdelovalnih površinah veliko krtin, ko je višina rezi na kosičnicah ob košnji nastavljena prenizko in ko na mokrih površinah na trdo zgrabimo v redi. Paziti je treba tudi pri postavljanju silosov. V koritastih silosih se pri dovoznih površinah, onesnaženih z zemljo, ob tlačenju silosa lahko s traktorjem navozi zelo veliko zemlje. Škodljive učinke primesi zemlje v silaži se v praksi hitro opazi. Eden od simptomov je pojav driske pri govedu. Zelo pogosto se lahko pri govedu pojavi mastitis (tudi do 30 % in več živali v čredi). Škodljive snovi, ki jih zemlja vsebuje ali povzroča njihov nastanek, in mikroorganizmi v zemlji lahko povzročijo vnetja mlečnih žlez (297).

5.2 VSEBNOSTI ELEMENTOV V OBROKIH

Da bi ugotovili, kakšne so vsebnosti elementov v sledovih v obrokih za govedo, smo pozimi 2014 na šestih kmetijah v Mežiški dolini (MD) in v gorenjski regiji (GR) vzorčili sestavine obrokov, ki jih na teh kmetijah krmijo. Glavni sestavini vzorčenih obrokov sta v teh dveh slovenskih regijah prav tako doma pridelani travna in koruzna silaža. Vzorčili smo tudi doma pridelano seno. Sestava obrokov s posameznih kmetij je zbrana v Tabeli 3.

Na GR so vse kmetije krmile obe vrsti silaž, travno in koruzno, ter seno. Dve kmetiji sta krmili slamo. Poleg tega so kot posamična krmila uporabljali ječmen, koruzo, pivske tropine in pšenično moko. Kot dopolnilne krmne mešanice so v štirih primerih uporabljali K 19, druge pa tudi K TOP, K TOP 60, MIX 35, K MIX 35, PROTAMIX, GUSTO MIX, Energetsko krmilo in Protiketozno krmilo. Obroke so dopolnjevali z MVD-ji: RUMISAL 4, RUMISAL 4 ekstra, VITAMIX TOP, LACTO PLUS, COMPETIT, PALSEN PILOT, COMPETIT C, MILKANAL 17. Uporabljali so tudi apnenec, sol in sodo bikarbono.

V MD so na štirih kmetijah govedo krmili z obema vrstama silaže, travno in koruzno, na dveh kmetijah pa samo s travno silažo. Ti dve kmetiji zaradi svoje lege ne moreta pridelovati koruzne silaže doma. Pet kmetij je krmilo seno in ena kmetija slamo. Kot dopolnilno krmno mešanico so uporabljali KZ 19, na dveh kmetijah KZ 19 N, KLN, super KZ farmski in K1/A pelete. Samo na eni kmetiji so kot posamično krmilo uporabljali pesne rezance in samo na eni kmetiji so kot MVD uporabljali SUPER MIX.

Največje razlike v medianah vsebnosti med obema regijama so se pokazale za elemente Zn, Ba, B, Ni, Mo, Li, Pb, Cd, Se. Najbolj se razlikujejo v obrokih vsebnosti Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$ SS) v MD (povprečje 6354; mediana 4076; območje 497–20323) in v GR (povprečje 1921; mediana 1231; območje 638–5722). Izstopala je razlika v vsebnosti Ba (mg/kg SS) v obrokih iz MD (povprečje 23,3; mediana 22,0; območje 16,3–37,7) in GR (povprečje 14,6; mediana 13,6; območje 8,15–23,6) in v vsebnosti Li ($\mu\text{g}/\text{kg}$ SS) v obrokih iz MD (povprečje 1063; mediana 620; območje 351–3209) in iz GR (povprečje 1223; mediana 1227; območje 553–1869). V obrokih so bile najnižje vsebnosti Hg, Be, Tl, Sb in Ag, ki so za govedo najbolj toksični.

Pokazale so se tudi razlike v medianah vsebnosti esencialnih elementov, ki se v obroke dodajajo (Zn, Cu, Mn, Fe, Se, Co), saj v GR redno uporabljajo MVD, v MD pa ne. Vsebnosti Cu (mg/kg SS) v obrokih iz MD (povprečje 9,26; mediana 9,48; območje 6,00–13,2) so prenizke, saj je minimalna priporočljiva vsebnost Cu v krmi za govedo 10 mg/kg SS (262). Prav tako so v obrokih iz MD prenizke vsebnosti Se ($\mu\text{g}/\text{kg}$ SS) (povprečje 80,1; mediana 123; območje <32,5–201), saj je optimalna priporočljiva vsebnost Se v krmi za govedo >200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (296). Analiza variance v obrokih iz MD in GR je pokazala statistično značilne razlike ($p<0,05$) za Ba, B in Cd. Vsebnosti Ba (mg/kg SS) v obrokih iz MD (povprečje 23,3; mediana 22,0; območje 16,3–37,7) so bile višje kot v obrokih iz GR (povprečje 14,6; mediana 13,6; območje 8,15–23,6). Višje so bile tudi vsebnosti Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$ SS) v obrokih iz MD (povprečje 417; mediana 378; območje 273–603) v primerjavi z obroki iz MD (povprečje 212; mediana 187; območje 110–342). V primeru B so bile vsebnosti v obrokih iz MD (povprečje 9,48; mediana 9,11; območje 6,84–13,6) prav tako višje kot v GR (povprečje 7,31; mediana 7,24; območje 6,36–8,38).

5.2.1 Doprinos posameznih sestavin k vsebnosti elementov v obrokih

S tortnimi diagrami na Sliki 10 smo prikazali glavne vire posameznega elementa v obroku glede na uporabljeni sestavine ter v kakšnih deležih so elementi iz posameznih sestavin v analiziranih obrokih. Spremljali smo doma pridelane travne in koruzne silaže, kot glavni sestavini obrokov, seno kot doma pridelano sestavino in ostalo, kamor sodijo žita, dokupljena močna krmila, koncentrati in MVD.

Glede doprinosov posameznih sestavin k vsebnosti elementov v obrokih se med obema regijama kažejo precejšne razlike (Slika 10). V MD pri vseh elementih razen pri Se največji delež elementa doprinese travna silaža, pri šestnajstih elementih sledi koruzna silaža, nato ostalo in kar pri osemnajstih elementih najmanj seno. Pri sedmih elementih (Mn, Zn, Ti, Sr, Cu, Ni in Co) ostale sestavine doprinesajo več kot koruzna silaža. Nasprotno pa v GR največji delež posameznega esencialnega elementa (Mn, Zn, Cu, Mo, Co in Se) in Sr doprinesajo ostale sestavine, sledita jim travna in koruzna silaža, najmanjši prispevek pa je prispevek sena (za enaindvajset elementov, razen za Al, Li, Hg in Ag).

Na prikazanih diagramih je opazna razlika v prispevku ostalih sestavin k esencialnim elementom (Mn, Zn, Cu, Co, Se) v obrokih med GR (od 42 % do 86 %) in MD (od 22 % do 63 %), saj v prvi regiji redno uporabljajo MVD, v drugi pa ne. Najvišja sta doprinsa ostalih sestavin k vsebnosti Se v obrokih, v GR 86 % in v MD 63%. Če te deleže povežemo z dobljenimi vsebnostmi elementov v mg/kg SS v obrokih, lahko potrdimo, da je dodajanje MVD v obroke za govedo nujno, da zadovoljimo potrebe živali po esencialnih elementih. Najpomembnejša elementa, ki jih je treba dodajati, sta Cu in Se.

Zanimalo nas je tudi, kakšen je prispevek dokupljenih sestavin obrokov in MVD k celotni vsebnosti nezaželenih elementov, kot so Cd, Pb, Hg in As v obrokih. Deleži iz teh virov so bili pri Cd v GR 16 % in v MD 8 %, pri Pb v GR 4 % in v MD 1 %, pri Hg v GR 14 % in v MD 0 % in pri As v GR 6 % in v MD 3 %. Naši rezultati tako ne potrjujejo predvidevanj iz literature (46), da bi bili mineralno-vitaminski dodatki h krmi bistven vir teh elementov.

Tudi k vsebnostim toksičnih elementov Be, Tl, Sb in Ag v obrokih največ doprinese travna silaža. Njen prispevek je v GR med 46 % in 78 %, v MD pa še višji, med 63 % in 77 %. Izjema je Hg, h kateremu travna in koruzna silaža v MD prispevata vsaka 50 %, medtem ko seno in ostalo ne doprinesajo nič, saj so bile vse vsebnosti Hg v teh vzorcih pod LOD in

LOQ. V GR pa k celotni vsebnosti Hg v obrokih prispeva travna silaža 72 %, seno 14 % in ostale sestavine 14 %.

5.2.2 Ocena obrokov glede na kriterije

Na podlagi rezultatov iz Tabele 10 smo ocenili pomanjkanje esencialnih elementov pri govedu, ravni posameznih elementov v obrokih in naredili primerjavo z evropsko zakonodajo, ki določa najvišje dovoljene vsebnosti nezaželenih elementov in najvišjih dovoljenih vsebnostih elementov, ki se v krmo dodajajo. Za primerjavo rezultatov z evropsko zakonodajo je določene elemente treba preračunati na 12 % vsebnost vlage, za Fe in Mo pa upoštevati rezultate v mg/kg.

Glede na kriterije za pomanjkanje iz Tabele 1 (262) in rezultate iz Tabele 10 primanjkuje Cu v sedmih obrokih (v treh iz GR in v štirih iz MD), Se pa v osmih obrokih (v treh iz GR in v petih iz MD), kar znaša pri Cu 58 % in pri Se 67 % analiziranih obrokov. Preostalih šest elementov (Co, Fe, Mn, Mo, Ni in Zn) je glede na navedene meje v obrokih dovolj.

Simptomi pomanjkanja posameznih elementov ponavadi niso specifični do te mere, da bi lahko na osnovi klinično opaznih znakov sklepali na pomanjkanje določenega elementa v obroku. Kot posledice pomanjkljive oskrbe z elementi so vedno prisotni bolj ali manj izraženi simptomi: manjša konzumacija krme, slabša rast v obdobju vzreje, zmanjševanje mlečnosti, motnje v plodnosti in zmanjšana odpornost živali proti okužbam (297).

Nivoji vsebnosti posameznih elementov v obrokih (normalno, visoko, toksično) smo povzeli po Pulsu (129) in smo jih v Tabeli 10 označili z različnimi barvami. Vsebnosti Mn, B, Ni, V, Hg in Tl v vseh dvanajstih obrokih ne odstopajo od normalnih vsebnosti, podanih v literaturi (129), vsebnosti Cu in Se pa so tudi po teh kriterijih nizke. V sedmih obrokih (v treh iz GR in v štirih iz MD) so nizke vsebnosti Cu, v devetih obrokih pa vsebnosti Se (v treh iz GR in prav vseh obrokih iz MD). Vsebnosti Zn so nizke v štirih obrokih (v enem iz GR in v treh iz MD), saj so normalne vsebnosti 50–100 mg/kg SS (129). Ti rezultati kažejo, da bi moralo govedo dobivati ustrezne mineralne dodatke.

Visoke vsebnosti v obrokih smo določili pri elementih Al, Fe, Ba, Mo in Pb. Vsebnost Al je bila normalna le v enem obroku, v šestih obrokih je bila povisana (50 % obrokov), v petih

obrokih pa je bila >1200 mg/kg SS, kar naj bi bilo za govedo že toksično (129). Štirje obroki so imeli povišane vsebnosti Fe in štirje visoke vsebnosti, kar pomeni, da je imela le ena tretjina obrokov normalne vsebnosti tega elementa. Visoke vsebnosti Ba smo določili v petih obrokih, od tega so bili štirje iz MD, eden pa iz GR. Prav v vseh obrokih je vsebnost Cr presegala normalne vsebnosti iz (0,1–0,5 mg/kg SS), in sicer od 2,5-krat do 10-krat. Visoko vsebnost Mo je imel en obrok iz MD (> 5 mg/kg SS), dva pa povišano. To pomeni, da je bila vsebnost Mo med 3,5 in 5 mg/kg SS. Štirje obroki so imeli povišane vsebnosti Pb in štirje visoke vsebnosti, kar pomeni, da je le tretjina obrokov vsebovala <1 mg/kg SS tega elementa (129). V MD je bila v dveh obrokih povišana vsebnost Cd. Povišano vsebnost Se in Co smo določili v enem obroku v GR, kar je verjetno posledica nepravilne uporabe MVD. Kriteriji za vsebnosti Ti, Sr, Li, As, Sn, Be, Sb, Ag v obrokih po Pulsu (129) niso bili določeni in jih zato nismo mogli vrednotiti na enak način kot ostale.

MTL-je (24) presegajo vsebnosti Al, Fe in Mo. Vsebnost Al presega MTL 1000 mg/kg SS v petih obrokih (dva iz GR in trije iz MD). V kar osmih obrokih je presežena MTL 500 mg/kg SS za Fe (v petih iz GR in treh iz MD), v enem obroku iz MD pa je presežena MTL 5 mg/kg SS za Mo.

Pri primerjavi vsebnosti elementov, ki smo jih določili v obrokih, z najvišjimi dovoljenimi vsebnostmi nezaželenih elementov (Cd, Pb, As in Hg) v obrokih za govedo, ki so v evropski zakonodaji določene z Direktivo 2002/32/EC (56) in njenimi dopolnitvami, ter z najvišjimi dovoljenimi vsebnostmi za elemente, ki se v krmo dodajajo (Zn, Cu, Mn, Fe, Se, Co), z Uredbo (ES) št. 1831/2003 (111) in njenimi dopolnitvami, smo ugotovili, da te vsebnosti presega sedem rezultatov za štiri različne elemente. Vsebnosti Zn, Se in Co so bile presežene v enem obroku iz GR, vsebnosti Pb pa v štirih obrokih (v enem iz GR in v treh iz MD). Vsebnost Zn v obroku je bila tako 139 mg/kg namesto dovoljenih 120 mg/kg v krmi z 12 % vsebnostjo vlage. Vsebnost Se v obroku je bila 1,06 mg/kg namesto dovoljenih 0,5 mg/kg v krmi z 12 % vsebnostjo vlage in vsebnost Co 1,77 mg/kg, preračunano na 12 % vsebnost vlage, namesto dovoljenih 1 mg/kg v krmi. Dva obroka iz MD nista ustrezala najvišji dovoljeni vsebnosti Pb (meja 5 mg/kg v krmi z 12 % vsebnostjo vlage), saj sta bili vsebnosti 7,18 in 17,9 mg/kg, medtem ko sta dva, z upoštevanjem meritve negotovosti še ustrezala temu kriteriju, saj sta bili vsebnosti $5,04 \pm 0,42$ in $5,06 \pm 0,42$ mg/kg pri krmi z 12 % vsebnostjo vlage.

Glede na trenutno veljavno evropsko zakonodajo vsebnosti za Fe niso bile presežene (111). Za zdaj je v evropski zakonodaji za Fe najvišja dovoljena meja 750 mg/kg popolne krmne mešanice. EFSA (142) je izdala mnenje, da bi bilo treba najvišje dovoljene meje za govedo znižati na 450 mg/kg v krmi z 12 % vsebnostjo vlage. Velja omeniti, da bi temu pogoju ustrezalo le pet obrokov, sedem pa bi to mejno vrednost presegalo.

Kriterijev za vsebnosti za Ti, Sr, Li, Sn, Be, Sb, Ag v obrokih v literaturi nismo našli, smo pa našli nekaj podatkov o vsebnostih v rastlinah in jih uporabili za primerjavo, saj so te, kot je razvidno iz tortnih diagramov, največji vir omenjenih elementov v obrokih. Vzorci rastlin, ki niso kontaminirani z zemljo, v povprečju vsebujejo manj kot 1 mg/kg Ti (222). Vsebnosti Ti v obrokih (mg/kg SS) so glede na ta podatek v obeh regijah visoke (povprečje v GR 21,4; povprečje v MD 24,1) in so posledica kontaminacije travne silaže z zemljo. Vsebnosti Sr se ujemajo s podatki v literaturi, kjer navajajo, da večina krmnih mešanic vsebuje pod 20 mg/kg Sr (221). Prav tako vsebnosti Be, Sn, Ag in Sb v obrokih ne odstopajo glede na poročane vsebnosti v rastlinah in so prenizke, da bi vplivale na živali, ki te rastline jedo. Primerjali smo jih z naslednjimi podatki iz literature: (a) tipične vrednosti Be v rastlinah variirajo med 1 in 40 µg/kg (88,93), (b) vsebnosti Sn v pašniških rastlinah so v območju od 0,3 do 0,4 mg/kg SS in v žitaricah od 5,6 do 7,9 mg/kg SS (23), (c) na splošno so vsebnosti Ag v kopenskih rastlinah do 60 µg/kg (3), (d) Vsebnosti Sb v rastlinah, ki rastejo na neonesnaženih tleh se gibljejo med 2 in 50 µg/kg SS (193–195).

V preiskanih obrokih tako primanjkuje Cu in Se, vsebnosti Zn pa so v nekaterih obrokih nizke. Izbrani elementi so v obrokih iz obeh regij prisotni v širokih koncentracijskih območjih in maksimalne vsebnosti so za posamezne elemente v obrokih precej višje od mediane. Ustreznost oskrbe z elementi s točno določenim obrokom je mogoče le redko dovolj natančno napovedati iz preglednic za elementno sestavo sestavin krme (16). Tako so analize sestavin obrokov nujno potrebne in le izmerjene koncentracije mikro- in ultramikroelementov v posamičnih krmilih nam omogočajo določitev prve ocene ozadja v krmnih mešanicah, s čimer smo potrdili tudi našo tretjo raziskovalno hipotezo.

5.2.3 Izpostavljenost goveda toksičnim elementom

Pri ocenjevanju izpostavljenosti goveda toksičnim elementom v sledovih je pomembno upoštevati, da je izpostavljenost prek prehrane zelo pogojena z govedorejsko prakso in velikokrat odvisna od uporabe mineralno-vitaminskih dodatkov, zaužitja zemlje ali onesnaženja krme z zemljo (46). Vsi izbrani elementi vključno z esencialnimi postanejo toksični za živali, ko so prisotni v krmi v neustreznih količinah. Glede na verjetnost, da bodo povzročili toksikoze, jih lahko razdelimo na tri skupine:

- elementi, pri katerih so toksikoze malo verjetne, saj so vsebnosti v krmi redko presežene: Al, Sb, Ba, Cr, Co, Li, Mn, Ni, Ag, Sr, Sn, Ti,
- elementi, ki so v posebnih primerih toksični: As, B, Fe, Zn,
- elementi, pri katerih so toksikoze pogoste: Cd, Cu, Pb, Hg, Mo, Se (24).

V zakonodaji (56) je trenutno največja pozornost posvečena Cd, Pb, Hg in As. S prikazom krmnih obrokov v obliki tortnih diagramov (Slika 10) smo prikazali, kakšen delež prinesejo dokupljene sestavine obrokov in MVD k celotni vsebnosti Cd, Pb, Hg in As v obrokih. Naši rezultati tako ne potrjujejo predvidevanj iz literature (46), da bi uporaba mineralno-vitaminskih dodatkov bila bistven vir teh elementov.

Moramo se zavedati, da grožnjo predstavljajo tudi drugi elementi, kot so Tl, Ag, Sb, Be, ki so še bolj toksični od prej navedenih, njihove koncentracije v okolju pa strmo naraščajo. Naši rezultati kažejo, da so vsebnosti teh elementov v analiziranih obrokih prenizke, da bi vplivale na živali, ki te rastline jedo, vendar pa te elemente lahko štejemo za tipične na novo nastajajoče kontaminante, ki se uvrščajo med resne onesnaževalce za prihodnje generacije. Zaradi visoke toksičnosti celo nizkih količin teh elementov za ljudi in živali bo treba okrepliti pritisk na oblikovanje zakonodaje in določiti mejne vrednosti v tleh, vodi, rastlinah, živilih in krmi (239).

5.3 VPELJAVA IN VALIDACIJA ANALIZNEGA POSTOPKA

Glede na to, da so nekateri elementi v analiziranih vzorcih prisotni v zelo nizkih količinah, je bila uporaba tako občutljive tehnike, kot je ICP-MS, v raziskavi nujna. ICP-MS je tudi

edina tehnika, ki nam omogoča določanje vseh izbranih elementov naenkrat. Prednosti tehnike ICP-MS so, da omogoča multielementno merjenje in z uporabo avtomatskega vzorčevalnika analiziranje velikega števila vzorcev v zelo kratkem času. Priprava vzorca je razmeroma nezahtevna v primerjavi z drugimi tehnikami, ki zahtevajo bolje prečiščene vzorce. Paziti moramo, da celotna vsebnost raztopljenih snovi ne presega 0,1 %. Masni spektri so razmeroma enostavni. Za večino elementov lahko dobimo enojno pozitivno nabite ione atomov z relativno majhno količino poliatomskih (oksiidi in argidi) ali dvojno nabitih ionov, ki motijo določitev. Občutljivost je visoka in v večini primerov je sposobnost laboratorija za detekcijo in kvantifikacijo odvisna od najnižjih vsebnosti določenega elementa v slepem vzorcu, ki jo lahko dosežejo. Glede na visoko temperaturo plazme lahko določamo tudi elemente z visokim ionizacijskim potencialom (274, 275).

Določitev vsebnosti elementov v sledovih z uporabo konvencionalnega uvajanja vzorcev (na primer tekočega vzorca) terja razgradnjo trdnih vzorcev krme. Razklopno tehniko smo izbrali na podlagi različnih faktorjev, kot so učinkovitost razapljanja analitov, potencialne izgube lahkoklapnih elementov in možnosti kontaminacije vzorcev, interferenc, ki jih povzročijo reagenti in učinki matriksa, hitrosti obdelave vzorcev, zahteve po nizkih LOD-jih in LOQ-jih. Uporabili smo mikrovalovni razklop v zaprtih posodah s HNO_3 z dodatkom H_2O_2 , ki je najpogosteje uporabljeni tehnika za razkroj vzorcev hrane. Prednosti mikrovalovnega razklopa so: (a) hitrost razklopa, (b) manjša možnost kontaminacije in (c) dobra ponovljivost rezultatov. Pomanjkljivosti te tehnike pa so: (a) velik faktor razredčitve (posledično višje meje določanja), (b) majhne zatehte vzorca, ponavadi manj kot 0,5 g suhega vzorca, kar poveča težave z reprezentativnostjo vzorcev in (c) laboratorijsko zahteven postopek (272). Razklop vzorcev v zaprtih posodah (ang. closed-vessel digestion) ima prednost pred razklopom v odprtih posodah (ang. open-vessel digestion): (a) zaradi povišane temperature in pritiska v zaprtem sistemu je razklop hitrejši in omogoča učinkovitejši razklop težko razgradljivih materialov, (b) Si ostane v raztopini kot silicijeva kislina, ki jo lahko določimo z vsako instrumentalno metodo, c) če je sistem zaprt, ne izgubljamo hlapnih elementov; elementi, kot so As, Sb, Se, B, Cr, Hg, Sn, ostanejo v sistemu in jih lahko kvantitativno določimo, (d) poraba reagentov je manjša, ker ni izparevanja, (e) kontaminacija iz okolice je močno zmanjšana, (f) ne dodajamo soli za razapljanje, ki jih v raztopini za aspiriranje ne sme biti, in (g) uporabljamo kisline z visoko čistostjo, kar omogoča določanje elementov v nižjih koncentracijah (298).

Tip kisline, ki jo uporabimo za razklop, ima pomembne posledice pri merjenju. HNO_3 je najbolj zaželena kislina pri vseh atomskih spektrometričnih tehnikah in je za analizo z ICP-MS najprimernejša zato, ker povzroča minimalne interference. Kljub občasnemu opaznemu zaviranju signala v njeni navzočnosti, v praksi pri nobeni od atomskih spektrometričnih tehnik pri koncentracijah do 10 % ne povzroča večjih analitičnih problemov, dokler je koncentracija v raztopinah vzorcev in standardnih raztopinah podobna. H_2O_2 , ki se dodaja pri večini mineralizacijskih postopkov, je prav tako redko vzrok za probleme pri analitiki (273).

Da bi se izognili neželenim spektralnim in nespektralnim interferencam med merjenjem, smo izvedli naslednje ukrepe. Za elemente smo glede na literaturo izbrali naslednje ustrezne izotope: ^7Li , ^9Be , ^{11}B , ^{27}Al , ^{47}Ti , ^{51}V , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{88}Sr , ^{95}Mo , ^{107}Ag , ^{111}Cd , ^{118}Sn , ^{121}Sb , ^{137}Ba , ^{202}Hg , ^{205}Tl , $^{206+7+8}\text{Pb}$, ^{75}Se in ^{78}As . Tako smo se izognili spektralnim interferencam, ki bi jih lahko povzročila plazma, in težek matriks, kot je krma. Za elementa ^{75}Se in ^{78}As smo uporabili kolizijsko reakcijsko celico (CRI) z vodikom. Kjer je bilo potrebno, smo za izračun vsebnosti uporabili ustrezne korekcijske enačbe. Za korekcijo nespektralnih interferenc smo uporabili ustrezne interne standarde (^6Li , ^{45}Sc , ^{115}In , ^{89}Y , ^{159}Tb in ^{209}Bi). Interference, ki jih povzroča matriks, so tudi drift instrumenta in zadušitev ali povečanje odzivov. Pomemben vpliv, ki smo ga zaznali pri prvih merjenjih, je tudi vpliv kisline, ki jo uporabimo za razklop vzorca. Do kislinskega efekta pride, ker imajo kisle raztopine nekatere fizikalne lastnosti drugačne od vode. Za atomsko spektroskopijo so najpomembnejše gostota, viskoznost, površinska napetost in hlapnost. Spremembe v viskoznosti in površinski napetosti povzročijo spremembe pri aspiraciji in razprševanju raztopine, medtem ko gostota in hlapnost vplivata na transport raztopine skozi razpršilno komoro (299). Za zmanjšanje tega efekta moramo zagotoviti podobne koncentracije kisline v vzorcih in standardnih raztopinah. Tako smo za pripravo standardnih raztopin za umeritvene krivulje namesto 1 % raztopine HNO_3 , kot je predlagano v večini aplikacij, uporabili 5 % raztopino. S tem smo bistveno zvišali izkoristke metode.

Optimiziran analizni postopek smo validirali z namenom, da z izbranimi statističnimi parametri dokažemo njegovo primernost za določanje izbranih elementov. V postopku validacije smo ovrednotili naslednje parametre: linearnost umeritvenih krivulj, LOD in

LOQ, ponovljivost postopka, znotrajlaboratorijsko obnovljivost, izkoristek, pravilnost in meritno negotovost. Korelacijski koeficienti (R) za posamezne elemente, ki so podani v Tabeli 6, se gibljejo od 0,9994 do 1,0000. Dobljene vrednosti ustrezajo kriteriju, da morajo biti R med 0,9990 in 1,0000, in jih ocenjujemo kot ustrezne. LOD in LOQ ustrezajo zahtevam Uredbe (EU) št. 836/2011 (283).

Ponovljivost postopka in znotrajlaboratorijsko obnovljivost smo izračunali v skladu z zahtevami iz Uredbe (EU) št. 836/2011 (283). Testa (Cochranov in Grubbsov test), ki smo ju izvedli pred izračunom danih parametrov, sta izločila rezultate s preveliko razliko med rezultati paralelk vzorcev in morebitne ubežnike. Z vsakim od testov smo izločili po šest parov meritev, kar predstavlja 6,1 % vseh meritev. Dobljene vrednosti RSD_r in RSD_R so v vseh primerih manjše od referenčnih vrednosti, razen pri RSD_R Sb, ki jo nekoliko presega, vendar jih vse štejemo za sprejemljive.

Za pravilnost postopka smo uporabili rezultate meritev dveh referenčnih materialov, s katerimi smo pokrili večino elementov v ustreznih območjih. Za štiri elemente, kjer ni bilo ustreznih certificiranih vrednosti, smo pravilnost določili iz meritev vzorca travne silaže, ki smo mu dodali ustrezne dodatke. Za elementa Ti in Ba pravilnosti nismo mogli določiti, saj je bila dodana količina prenizka glede na že vsebovano visoko vsebnost teh dveh elementov (55,7 mg/kg za Ti in 23,5 mg/kg za Ba). Iz tega razloga smo za izračune uporabili vsebnosti v vzorcu silaže. Z analizo vzorcev travne silaže smo preverili tudi homogenost pripravljenega vzorca, njen prispevek pa je upoštevan v izračunu meritne negotovosti za posamezne elemente.

S primerjavo dobljenih parametrov z zahtevami v ustreznih predpisih smo ugotovili, da je glede na te karakteristike analizni postopek primeren za določanje izbranih elementov v vzorcih krme v koncentracijah, v katerih so prisotni. S tem smo potrdili našo prvo raziskovalno hipotezo, da sta izbrani mikrovalovni razklop in uporabljenatahnika ICP-MS ustrezena za določanje mikro- in ultramikroelementov v krmi.

6. SKLEPI

Izbrani mikrovalovni razklop in uporabljeni tehnika ICP-MS sta ustrezna za določanje mikro- in ultramikroelementov v krmi. Izvedena validacija potrjuje ustreznost vpeljane in optimirane metode, zato lahko prvo raziskovalno hipotezo potrdimo.

Koncentracije mikro- in ultramikroelementov v krmi so odvisne od vrste in izvora krme. S primerjavo vsebnosti izbranega elementa v travnih in koruznih silažah lahko ugotovimo, da se lahko razlikujejo tudi do desetkrat. Statistično značilne razlike med travno in koruzno silažo so bile ugotovljene za večino elementov, razen za Ag in Hg, zato lahko drugo raziskovalno hipotezo potrdimo.

Izmerjene koncentracije mikro- in ultramikroelementov v posamičnih krmilih omogočajo določitev prve ocene ozadja (background levels) v krmnih mešanicah. Analize sestavin obrokov so nujno potrebne in le izmerjene koncentracije mikro- in ultramikroelementov v posamičnih krmilih nam omogočajo določitev prve ocene ozadja v krmnih mešanicah, da lahko zagotovimo ustrezno oskrbo živali s temi elementi. Zato lahko tretjo raziskovalno hipotezo potrdimo.

Izbrani elementi so v travnih in koruznih silažah iz različnih slovenskih regij prisotni v širokih koncentracijskih območjih in maksimalne vsebnosti so za posamezne elemente precej višje od mediane. Ustreznost oskrbe z elementi tako ni mogoče napovedati dovolj natančno na podlagi reprezentativnih vsebnosti in zato je za ustrezen izračun obrokov sestavine obrokov predhodno treba analizirati.

V slovenskih travnih in koruznih silažah je dovolj le dveh esencialnih elementov, Mn in Fe. V obeh vrstah silaž primanjkuje Cu in Se, medtem ko je v koruzni silaži premalo še Zn in Co. V voluminozni krmi za govedo elementi v sledovih niso v potrebnih količinah in ne v

ustreznih razmerjih, zato moramo redno krmiti primerno izbran MVD v količinah, ki ustrezajo stopnji pomanjkanja posameznega elementa.

Visoke vsebnosti Al, Fe in Co v travni silaži kažejo na povečano kontaminacijo travne silaže z zemljo. Primesi zemlje v silaži tudi ob pravilno izvedenih postopkih siliranja povzročajo kvarjenje silaže in so za živali škodljive. Zemlja se med siliranjem primeša takrat, ko je na obdelovalnih površinah veliko krtin, ko je višina rezi na kosilnicah ob košnji nastavljena prenizko in ko na mokrih površinah na trdo zgrabimo v redi. Paziti je treba tudi pri postavljanju silosov. V koritastih silosih se pri dovoznih površinah, onesnaženih z zemljo, ob tlačenju silosa lahko s traktorjem navozi zelo veliko zemlje.

V preiskanih obrokih prav tako primanjkuje Cu in Se, vsebnosti Zn pa so v nekaterih nizke. Simptomi pomanjkanja posameznih elementov ponavadi niso specifični do te mere, da bi lahko na osnovi klinično opaznih znakov sklepali na pomanjkanje določenega elementa v obroku. Kot posledice pomanjkljive oskrbe z elementi so vedno prisotni bolj ali manj izraženi simptomi: manjša konzumacija krme, slabša rast v obdobju vzreje, zmanjševanje mlečnosti, motnje v plodnosti in zmanjšana odpornost živali proti okužbam. Ko se pojavi pomanjkanje določenega elementa in je zaradi nespecifičnih znakov pomanjkanje težko opaziti, je stanje zelo težko popraviti. S primerno izbranimi obroki, ki vsebujejo primerne MVD-je, je to treba storiti, preden se pojavi pomanjkanje.

Največji delež Cd, Pb, Hg in As k celotni vsebnosti v analiziranih obrokih za govedo doprinese doma pridelana voluminozna krma in ne dokupljene sestavine obrokov in MVD, kot so predvidevali v literaturi.

Novonastajajočo grožnjo predstavljajo elementi, kot so Tl, Ag, Sb, Be, ki so še bolj toksični od v zakonodaji določenih nezaželenih elementov in njihove koncentracije v okolju strmo naraščajo. Naši rezultati kažejo, da so vsebnosti v analiziranih obrokih prenizke, da bi

vplivale na živali, ki te rastline jedo. Glede na podatke iz literature te elemente lahko štejemo za tipične novonastajajoče onesnaževalce in jih bo treba v prihodnosti tudi nadzirati.

Zaradi različnih vsebnosti elementov v sledovih bi bilo treba sestavine obrokov za ustrezен izračun obrokov predhodno analizirati. Če so vsebnosti elementov nižje od dejanskih potreb, se kot rezultat neustreznega dodajanja pojavita pomanjkanje in zmanjšanje učinkovitosti proizvodnje. Če dodane količine presegajo potrebe, prekomerno dopolnjevanje obrokov vodi tudi do prekomernega vnosa elementov v okolje prek iztrebkov goveda in do onesnaževanja okolja.

7 POVZETEK

Elementi v sledovih so anorganske snovi, ki jih živali dobijo s krmo in so lahko za njih esencialni, nujni za rast in zdravje, lahko pa so neesencialni. Podatke o bioloških vlogah, metabolizmu in odlaganju teh elementov v živalskih tkivih, vsebnostih v krmi, potrebah živali in ocenah tveganja, se še vedno zbira. Namen raziskave je bil vpeljati analizne postopke za določanje izbranih mikro- in ultramikroelementov v krmi in pridobiti podatke o vsebnostih izbranih elementov v vzorcih silaž in obrokih za govedo. Vzorčili smo jih na kmetijah v različnih slovenskih regijah ter ocenili prehranski vnos teh elementov in nevarnost pomanjkanja ali prekomernega vnosa pri govedu. Za preučevanje vsebnosti izbranih elementov v krmi za govedo (Al, As, Ba, Be, Cd, Cr, Co, Cu, B, Fe, Pb, Li, Mn, Hg, Mo, Ni, Se, Ag, Sr, Sn, Sb, V, Tl, Ti in Zn) smo vpeljali in validirali ustreerne analizne postopke. Zaradi nizkih vsebnosti teh elementov v silažah smo uporabili najsodobnejšo metodo indukcijsko sklopljene plazme z masno detekcijo (ICP-MS). Za pripravo vzorcev smo uporabili razklop v zaprtem mikrovalovnem sistemu z dušikovo kislino in vodikovim peroksidom.

V prvem delu študije smo vzorce travnih in koruznih silaž, odvzetih v treh pomembnih govedorejskih regijah v Sloveniji, analizirali in dobljene podatke statistično obdelali. Izbrani elementi so prisotni v obeh vrstah silaže v širokih koncentracijskih območjih, z izjemo Tl v koruzni silaži, kjer so vsi rezultati pod mejo določanja. Statistično značilne razlike za travno in koruzno silažo iz treh različnih regij smo ugotovili za devet elementov. Pri primerjavi vzorcev travnih in koruznih silaž so se statistično značilne razlike pokazale za 23 elementov. Rezultati študije kažejo, da bi moralo govedo, hranjeno s slovensko travno in koruzno silažo, dobivati tudi ustrerene mineralne dodatke. Najpomembnejša elementa, ki jih je treba dodajati, sta Cu in Se, govedo, krmljeno s slovensko koruzno silažo, pa bi potrebovalo tudi dodatke Zn in Co.

V drugem delu študije smo na 12 kmetijah z dveh območij, enega onesnaženega in enega neonesnaženega, vzorčili sestavine obrokov za govedo. V nekaterih preiskanih obrokih prav tako primanjkuje Cu in Se, vsebnosti Zn pa so v nekaterih nizke. Dva obroka iz onesnaženega območja presegata najvišjo dovoljeno vsebnost Pb, ki je v skladu z evropsko zakonodajo 5 mg/kg v krmi z 12 % vsebnostjo vlage. Visoke vsebnosti Al in Fe v doma pridelani voluminozni krmi kažejo na povečano kontaminacijo krme z zemljo, kar se zgodi

pri spravilu krme ali pa med pripravo silosa. Analiza variance v obrokih iz obeh regij je pokazala statistično značilne razlike za naslednje tri elemente: Ba, B in Cd. Rezultati študije obrokov kažejo, da bi moralo govedo dobivati ustrezne mineralne dodatke. Zaradi različnih vsebnosti elementov v sledovih bi bilo treba sestavine obrokov za ustrezen izračun obrokov predhodno analizirati.

8 SUMMARY

Trace elements are inorganic constituents of feed. They are either essential (necessary for the animal growth and health) or non-essential. Data regarding the function, metabolism and deposition, the content in feed and animal requirements, as well as some parts of risk assessment, are still needed. The purpose of the study was to introduce the analytical procedures for the determination of the selected micro- and ultramicroelements in feed. Further it was intended to obtain information on the content of the selected elements in samples of silage and ration for cattle, sampled on farms in different Slovenian regions, and to assess dietary intake of these elements and the risk of lack or excess intake in cattle. To study the presence of selected elements (Al, As, Ba, Be, Cd, Cr, Co, Cu, B, Fe, Pb, Li, Mn, Hg, Mo, Ni, Se, Ag, Sr, Sn, Sb, V, Tl, Ti and Zn) in feed for cattle, the appropriate analytical procedures for their determination were introduced and validated in our laboratory. After closed-vessel microwave digestion, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was used to analyse samples.

In the first part of the study of grass and maize silage samples from three important cattle-producing regions of Slovenia were analysed and statistically evaluated. The selected elements were found in both types of silage in a wide range of concentrations, with the exception of Tl in maize silage, where all results were below the limit of detection. Statistically significant differences were found for nine elements in grass and maize silage from three different regions and for 23 elements when comparing grass silage and maize silage. The data suggest that cattle fed Slovenian grass silage or maize silage should receive routine mineral supplementation, of which the most important trace elements needed are Cu and Se. Cattle fed Slovenian maize silage also should receive supplementary Zn and Co.

In the second part of the study, meal ingredients for cattle on 12 farms from two regions of Slovenia, one polluted and one unpolluted, were collected and evaluated. The contents of trace elements Cu and Se in some meals are below the requirements and the contents of Zn in some meals are low. Two meals from the polluted region exceed the maximum permitted content of Pb, which is 5 mg/kg of complete feedingstuff with a moisture content of 12 %. High contents of Al and Fe suggest that are forages physically contaminated with soil. Statistically significant differences for meal from two regions were found for elements Ba, B in Cd. The data suggest that cattle should receive routine mineral supplementation. To

calculate the appropriate meals it would be necessary to analyze the ingredients of meals previously, due to the different levels of the trace elements in ingredients.

9 ZAHVALE

Doktorski študij je sofinancirala Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada, za kar se zahvaljujem tudi Ministrstvu za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo v okviru javnega razpisa Inovativne sheme. Sofinanciranje se je izvajalo v okviru Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007–2013, 1. razvojne prioritete Spodbujanje podjetništva in prilagodljivosti; prednostne usmeritve 1.3: Štipendijske sheme.

Mentorici viš. znan. sod. dr. Gabrijeli Tavčar Kalcher se zahvaljujem za strokovno pomoč, vodenje in nasvete pri nastajanju doktorskega dela.

Somentorju prof. dr. Janezu Salobirju se zahvaljujem za strokovno pomoč, ker je vedno prvi popravil vse moje izdelke in vedno zgladil vse napete situacije, ki so med delom nastale.

Prof. dr. Bredi Jakovac Strajn se zahvaljujem za strokovno podporo, da mi je omogočila opravljanje doktorskega študija in ker je za to delo naredila več kot dovolj.

Predsedniku komisije prof. dr. Martinu Dobeicu in članu komisije prof. dr. Marjanu Vebru se zahvaljujem za natančen pregled in predloge za izboljšanje doktorskega dela.

Prof. dr. Antonu Venguštu se zahvaljujem, da je prvi opazil moj potencial, da verjame, da so elementi pomembni in da me je neizmerno podpiral v vseh letih mojega dela.

Mag. Mateji Nagode se zahvaljujem za statistične izračune.

Mag. Brigit Greč-Smole se zahvaljujem za skrben pregled citirane literature. Lektorici Katji Nakrst se zahvaljujem za lektoriranje doktorskega dela. Za pomoč in strokovne nasvete pri administrativnih postopkih pa se zahvaljujem mag. Mateji Stvarnik.

Naši asistentki dr. Marjani Grandič se zahvaljujem za pomoč pri izračunih obrokov, za razumevanje in za odlične nasvete, kako premagati stres.

Sodelavki Ireni Indihar se zahvaljujem, da je marsikaj postorila po laboratoriju, medtem ko sem se jaz ukvarjala z elementi.

Sodelavcema mag. Igorju Ujčiču in Robertu Rožiču, ki sta akreditirana vzorčevalca, se zahvaljujem za pomoč pri vzorčenju krme.

Sodelavki dr. Petri Bandelj se zahvaljujem za podporo in vsakodnevna vprašanja, kaj sem naredila in zakaj še česa nisem naredila.

Mojemu možu dr. Primožu Pavšiču se zahvaljujem za računalniško in matematično pomoč, za potrežljivost in odganjanje slabe volje. Predvsem pa sem mu hvaležna, da kot znanstvenik razume, da kakšen članek pa tudi mora biti.

Moji hčerki Anji se zahvaljujem, da je potrežljivo počakala, da je bilo delo končano.

10 LITERATURA

1. Žust J, Pestevšek U, Vengušt A, Jakovac Strajn B. Patologija prehrane goved, malih prežvekovalcev, prašičev in perutnine: izbrana poglavja iz higiene in patologije prehrane živali. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2009: 214–55.
2. Nielsen FH. How should dietary guidance be given for mineral elements with beneficial actions or suspected of being essential? *J Nutr* 1996; 126 (suppl. 9): 2377–85.
3. Van Paemel M, Dierick N, Janssen G, Fievez V, De Smet S. Selected trace and ultratrace elements: biological role, content in feed and requirements in animal nutrition: elements for risk assessment (Technical report submitted to EFSA). EFSA Support Publ 2010; 7: e68E.
4. Aubert H, Pinta M. Trace elements in soils. Amsterdam: Elsevier, 1977: 1–115.
5. Kabata-Pendias A, Pendias H. Trace elements in soils and plants. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2001: 88–113.
6. Li Y, McCrory DF, Powell JM, Saam H, Jackson-Smith D. A survey of selected heavy metal concentrations in Wisconsin dairy feeds. *J Dairy Sci* 2005; 88: 2911–22.
7. Huang M, Zhou S, Sun B, Zhao Q. Heavy metals in wheat grain: assessment of potential health risk for inhabitants in Kunshan, China. *Sci Total Environ* 2008; 405: 54–61.
8. Sridhara Chary N, Kamala CT, Samuel Suman Raj D. Assessing risk of heavy metals from consuming food grown on sewage irrigated soils and food chain transfer. *Ecotoxicol Environ Saf* 2008; 69: 513–24.
9. Bermudez GMA, Jasan R, Plá R, Pignata ML. Heavy metal and trace element concentrations in wheat grains: assessment of potential non-carcinogenic health hazard through their consumption. *J Hazard Mater* 2011; 193: 264–71.
10. Lobnik F, Zupan M, Hudnik V, Vidic NJ. A soil and plant pollution case study in an industrial area in Slovenia. In: Adriano DC, Chen ZS, Yang SS, eds. Environmental geochemistry and health. Nortwood: Science and Technology Letters, 1994: 287–300.

11. Milačič R, Kralj B. Determination of Zn, Cu, Cd, Pb, Ni and Cr in some Slovenian foodstuffs. *Eur Food Res Technol* 2003; 217: 211–4.
12. Finžgar N, Leštan D. Ocena dostopnosti težkih kovin iz onesnaženih tal Mežiške doline (Evaluation of heavy metals accessibility in polluted soils from Mežica valley). *Acta Agric Slov* 2008; 91: 157–66.
13. Periodni sistem elementov. *Pure Appl Chem* 2009; 81: 2131–56.
14. Uredba Komisije (ES) št. 152/2009 z dne 27. januarja 2009 o določitvi metod vzorčenja in analitskih metod za uradni nadzor krme. *Ur List EU* 2009; L 54: 1–130.
15. Uredba Komisije (EU) št. 691/2013 z dne 19. julija 2013 o spremembi Uredbe (ES) št. 152/2009 glede metod vzorčenja in analitskih metod. *Ur List EU* 2013; L 197:1–12.
16. Suttle N. Mineral nutrition of livestock. 4th ed. (Online) Wallingford: CABI, 2010. <http://www.cabi.org/cabbooks/ebook/20103291114> (6. jan. 2017).
17. Hoekstra WG. Animal requirements: basic and optimal. *Ann N Y Acad Sci* 1972; 199: 182–190.
18. Mertz W. Human requirements: basic and optimal. *Ann N Y Acad Sci* 1972; 199: 191–201.
19. Mertz W. The newer essential trace elements, chromium, tin, nickel, vanadium and silicon. *Proc Nutr Soc* 1974; 33: 307–13.
20. Bogden J, Klevay LM. Clinical nutrition of the essential trace elements and minerals: the guide for health professionals. (Online) Totowa: Humana Press Inc., 2000. <http://www.springer.com/us/book/9780896035980> (30. jan. 2017).
21. National Research Council. Nutrient requirements of beef cattle: update 2000. 7th ed: Washington: National Academy Press, 1996: 1–248.
22. McDowell LR. Minerals in animal and human nutrition. San Diego: Academia Press, 1992: 1–524.

23. Underwood EJ, Suttle NF. The mineral nutrition of livestock. 3rd ed. Wallingford: CABI, 1999: 8–453.
24. National Research Council. Mineral tolerance of animals. 2nd ed. Washington: The National Academies Press, 2005: 1–510.
25. Spears JW. Overview of mineral nutrition in cattle: the dairy and beef NRC. In: Proceedings of the 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium. Gainesville: University of Florida, 2002: 113–26.
26. McDowell LR. Minerals in animal and human nutrition. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2003: 203–555.
27. Suleiman A, Okine E, Goonewardene LA. Relevance of National Research Council feed composition tables in Alberta. *Can J Anim Sci* 1997; 77: 197–203.
28. Ratte HT. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environ Toxicol Chem* 1999; 18: 89–108.
29. Coleman RL, Cearley JE. Silver toxicity and accumulation in largemouth bass and bluegill. *Bull Environ Contam Toxicol* 1974; 12: 53–61.
30. Fondevila M, Herrer R, Casallas MC, Abecia L, Ducha JJ. Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs. *Anim Feed Sci Technol* 2009; 150: 259–69.
31. Bianchini A, Playle RC, Wood CM, Walsh PJ. Mechanism of acute silver toxicity in marine invertebrates. *Aquat Toxicol* 2005; 72: 67–82.
32. Bianchini A, Grosell M, Gregory SM, Wood CM. Acute silver toxicity in aquatic animals is a function of sodium uptake rate. *Environ Sci Technol* 2002; 36: 1763–6.
33. Silver and silver compounds: environmental aspects. (Concise international chemical assessment document, 44) Geneva: World Health Organization, 2002.
34. Pérez-Granados AM, Vaquero MP. Silicon, aluminium, arsenic and lithium: essentiality and human health implications. *J Nutr Health Aging* 2002; 6: 154–62.

35. Kawahara M, Konoha K, Nagata T, Sadakane Y. Aluminum and human health: its intake, bioavailability and neurotoxicity. *Biomed Res Trace Elem* 2007; 18: 211–20.
36. Verstraeten SV, Aimo L, Oteiza PI. Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Arch Toxicol* 2008; 82: 789–802.
37. Drugă M, Trif A, Drugă M, Ștef D, Driha A. Aluminium intake impact on broiler chickens during a production cycle on some bioprotective parameters. *Sci Pap Anim Sci Biotechnol* 2010; 43: 47–50.
38. Rout G, Samantaray S, Das P. Aluminium toxicity in plants: a review. *Agronomie* 2001; 21: 3–21.
39. Mora ML, Alfaro MA, Jarvis SC, Demanet R, Cartes P. Soil aluminium availability in Andisols of southern Chile and its effect on forage production and animal metabolism. *Soil Use Manag* 2006; 22: 95–101.
40. Mutimura M, Everson TM. Assessment of livestock feed resource-use patterns in low rainfall and aluminium toxicity prone areas of Rwanda. *Afr J Agric Res* 2011; 6: 3461–9.
41. Anke M, Müller M, Hoppe C. Recent progress in exploring the essentiality of the ultratrace element aluminum to the nutrition of animals and man. *Biomed Res Trace Elem* 2005; 16: 183–7.
42. Scientific Committee on Animal Nutrition. Opinion of the Scientific committee on animal nutrition on undesirable substances in feed. (Online) 2003. <http://fluoridealert.org/wp-content/pesticides/fluorine.eu.report.2003.pdf> (17. jan. 2017).
43. Turner KK, Nielsen BD, O'Connor-Robison CI, Nielsen FH, Orth MW. Tissue response to a supplement high in aluminum and silicon. *Biol Trace Elem Res* 2008; 121: 134–48.
44. Datta BK, Mishra A, Singh A, et al. Chronic arsenicosis in cattle with special reference to its metabolism in arsenic endemic village of Nadia district West Bengal India. *Sci Total Environ* 2010; 409: 284–8.

45. Rana T, Bera AK, Das S, et al. Effect of chronic intake of arsenic-contaminated water on blood oxidative stress indices in cattle in an arsenic-affected zone. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010; 73: 1327–32.
46. Fink-Gremmels J. Animal feed contamination: effects on livestock and food safety. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2012: 183–204.
47. Neiger R, Nelson N, Miskimins D, Caster J, Caster L. Bovine arsenic toxicosis. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16: 436–8.
48. Bampidis VA, Nistor E, Nitas D. Arsenic, cadmium, lead and mercury as undesirable substances in animal feeds. *Sci Pap Anim Sci Biotechnol* 2013; 46: 17–22.
49. European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific panel on contaminants in the food chain [contam] related to arsenic as undesirable substance in animal feed. *EFSA J* 2005; 180: 1–35.
50. Bertin FR, Baseler LJ, Wilson CR, Kritchevsky JE, Taylor SD. Arsenic toxicosis in cattle: meta-analysis of 156 cases. *J Vet Intern Med* 2013; 27: 977–81.
51. Hatch RC, Clark JD, Jain AV. Use of thiols and thiosulfate for treatment of experimentally induced acute arsenite toxicosis in cattle. *Am J Vet Res* 1978; 39: 1411–4.
52. Hullinger G, Sangster L, Colvin B, Frazier K. Bovine arsenic toxicosis from ingestion of ashed copper-chrome-arsenate treated timber. *Vet Hum Toxicol* 1998; 40: 147–8.
53. Reagor JC. Arsenic poisoning in cattle. *Southwest Vet* 1973; 26: 295–6.
54. López-Alonso M. Trace minerals and livestock: not too much not too little. *ISRN Vet Sci* 2012; 1–18.
55. Onistratenko NV, Ivantsova EA, Denysov AA, Solodovnikov DA. Heavy metals in suburban ecosystems of industrial centres and ways of their reduction. *Ekológia Bratisl* 2016; 35: 205–12.
56. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Off J Eur Union* 2002; L 140: 10–22.

57. Uredba Komisije (EU) 2015/186 z dne 6. februarja 2015 o spremembji Priloge I k Direktivi 2002/32/ES Evropskega parlamenta in Sveta glede mejnih vrednosti za arzen, fluor, svinec, živo srebro, endosulfan in semena ambrozije.
- Ur List EU 2015; 31: 11–7.
58. Bolaños L, Lukaszewski K, Bonilla I, Blevins D. Why boron? *Plant Physiol Biochem* 2004; 42: 907–12.
59. Kabu M, Akosman MS. Biological effects of boron. *Rev Environ Contam Toxicol* 2013; 225: 57–75.
60. Nielsen FH. Is boron nutritionally relevant? *Nutr Rev* 2008; 66: 183–91.
61. Nielsen FH. Boron in human and animal nutrition. *Plant Soil* 1997; 193: 199–208.
62. Nielsen FH. The saga of boron in food: from a banished food preservative to a beneficial nutrient for humans. *Curent Top Plant Biochem Physiol* 1991; 10: 274–86.
63. Criste RD, Grossu DV, Scorei R, Duca RC, Mitrut M, Ciurascu C. New investigations on the effect of the dietary boron on broilers and layers; Boron and food quality. *Arch Zootech* 2005; 8: 65–78.
64. Hunt CD, Nielsen FH. Interaction between boron and cholecalciferol in the chick. In: Gawthorne J, Howell JM, White CL, eds. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Trace Element Metabolism in Man and Animals (TEMA-4)*, Perth, Western Australia, 1981. Canberra: Australia Academy of Science, 1981: 597–600.
65. Kabu M, Uyarlar C. The effects of borax on milk yield and selected metabolic parameters in Austrian Simmental (Fleckvieh) cows. *Vet Med* 2015; 60: 175–80.
66. Basoglu A, Sevinc M, Birdane FM, Boydak M. Efficacy of sodium borate in the prevention of fatty liver in dairy cows. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 732–5.
67. Fry RS, Brown TT, Lloyd KE, et al. Effect of dietary boron on physiological responses in growing steers inoculated with bovine herpesvirus type-1. *Res Vet Sci* 2011; 90: 78–83.

68. Fry RS, Lloyd KE, Jacobi SK, Siciliano PD, Robarge WP, Spears JW. Effect of dietary boron on immune function in growing beef steers.
J Anim Physiol Anim Nutr 2010; 94: 273–9.
69. Kabu M, Civelek T, Birdane FM. Effects of boron, propylene glycol and methionine administration on some hematological parameters in dairy cattle during periparturient period. *Vet Arh* 2014; 84: 19–29.
70. Kabu M, Birdane FM, Civelek T, Uyarlar C. Affects of boron administration on serum Ca, Mg and P of peripartum cows. *Arch Anim Breed* 2013; 56: 733–41.
71. Kabu M, Civelek T. Effects of propylene glycol, methionine and sodium borate on metabolic profile in dairy cattle during periparturient period.
Rev Med Veterinaire 2012; 163: 419–30.
72. Bhasker TV, Gowda NKS, Pal DT, Bhat SK, Pattanaik AK. Boron profile in common feedstuffs used in tropical livestock systems.
Anim Feed Sci Technol 2015; 209: 280–5.
73. Serbester U. Determination of boron level in feeds used in cattle nutrition in regions of central Anatolia and Mediterranean of Turkey. *KSU J Nat Sci* 2013; 16: 25–7.
74. Dibello PM, Manganaro JL, Aguinaldo ER, Mahmood T, Lindahl CB. Barium compounds. In: Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. New York: John Wiley & Sons, 1991: 909–31.
75. Barium and barium compounds (Concise international chemical assessment document, 33). Geneva: World Health Organization, 2001.
76. Toxicological profile for barium and barium compounds. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007: 1–8.
77. Toxicological review of barium and compounds. Washington: U.S. Environmental Protection Agency; 2005: 1–53.

78. Nogueira TAR, de Melo WJ, Fonseca IM, Marques MO, He Z. Barium uptake by maize plants as affected by sewage sludge in a long-term field study. *J Hazard Mater* 2010; 181: 1148–57.
79. Reeves AL. Barium. In: Friberg L, Nordberg G, Vouk VB, eds. *Handbook on the toxicology of metals*. Amsterdam; New York: Elsevier Science, 1986: 84–94.
80. Venugopal B, Luckey TD. Metal toxicity in mammals. Vol. 2: chemical toxicity of metals and metalloids. London: Plenum Press, 1978: 1–409.
81. Taylor DM, Bligh PH, Duggan MH. The absorption of calcium, strontium, barium and radium from the gastrointestinal tract of the rat. *Biochem J* 1962; 83: 25–9.
82. Koch M, Appoloni O, Haufroid V, Vincent JL, Lheureux P. Acute barium intoxication and hemodiafiltration. *J Toxicol Clin Toxicol* 2003; 41: 363–7.
83. Underwood E. Trace elements in human and animal nutrition. 4th ed. New York: Academic Press, 1977: 1–453.
84. Chaudhry FM, Wallace A, Mueller RT. Barium toxicity in plants. *Commun Soil Sci Plant Anal* 1977; 8: 795–7.
85. Hodgkiss WS, Errington BJ. Spectrographic identification of minor elements In hay and grain mixtures. *Trans Ky Acad Sci* 1941; 9: 17–20.
86. Nogueira TAR, de Melo WJ, Oliveira LR, et al. Nickel in soil and maize plants grown on an oxisol treated over a long time with sewage sludge. *Chem Speciat Bioavailab* 2009; 21: 165–73.
87. Newland LW. Arsenic, beryllium, selenium and vanadium. In: Hutzinger O, ed. *The handbook of environmental chemistry*. New York: Springer, 1982: 27–67.
88. Beryllium, environmental health criteria 106, international programme on chemical safety. Geneva: World Health Organization, 1990: 1–15.
89. Strupp C. Beryllium metal II. a review of the available toxicity data. *Ann Occup Hyg* 2011; 55: 43–56.

90. Toxicological profile for beryllium. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2002: 1–247.
91. Furchner JE, Richmond CR, London JE. Comparative metabolism of radionuclides in mammals. 8. Retention of beryllium in the mouse, rat, monkey and dog. *Health Phys* 1973; 24: 293–300.
92. Richmond CR, London JE, Drake GA, Furchner JE. Whole-body retention of orally and intravenously administered beryllium-7 by beagles. LA-3132-MS. *LA Rep* 1964; 127: 66–75.
93. Nielsen E, Greve K, Ladefoged O, Larsen JC. Beryllium, inorganic and soluble salts. Evaluation of health hazards by exposure and proposal of a health based quality criterion for drinking water. Copenhagen: The Danish Environmental Protection Agency, 2013.
94. Lane EA, Carty MJ, More SJ. Cadmium exposure and consequence for the health and productivity of farmed ruminants. *Res Vet Sci* 2015; 101: 132–9.
95. Patrick L. Toxic metals and antioxidants: Part II. The role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity. *Altern Med Rev J Clin Ther* 2003; 8: 106–28.
96. Martelli A, Rousselet E, Dycke C, Bouron A, Moulis JM. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* 2006; 88: 1807–14.
97. Goyer RA. Nutrition and metal toxicity. *Am J Clin Nutr* 1995; 61 (suppl. 3): 646–50.
98. Peraza MA, Ayala-Fierro F, Barber DS, Casarez E, Rael LT. Effects of micronutrients on metal toxicity. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 203–16.
99. Stafford AD, Anderson CWN, Hedley MJ, McDowell RW. Cadmium accumulation by forage species used in New Zealand livestock grazing systems. *Geoderma Reg* 2016; 7: 11–8.
100. EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion of the Panel on contaminants in the food chain: mercury as undesirable substance in animal feed. *EFSA J* 2008; 654, 1–76.

101. EC (European Commission). Uredba Komisije (EU) št. 1275/2013 z dne 6. decembra 2013 o spremembi Priloge I k Direktivi 2002/32/ES Evropskega parlamenta in Sveta glede mejnih vrednosti za arzen, kadmij, svinec, nitrite, eterično gorčično olje in škodljive botanične nečistoče. Ur List EU 2013; L 328, 86–92.
102. Spears JW. Micronutrients and immune function in cattle.
Proc Nutr Soc 2000; 59: 587–94.
103. Duncan IF, Greentree PL, Ellis KJ. Cobalt deficiency in cattle.
Aust Vet J 1986; 63: 127–8.
104. Musewe VO, Gombe S. Plasma vitamin B12 and reproductive performance of cows on cobalt-deficient pastures in the Rift Valley of Kenya.
Int J Vitam Nutr Res 1980; 50: 272–82.
105. Poole DBR, Fleming GA, Kiely J. Cobalt deficiency in Ireland: soil, plant and animal.
Ir Vet J 1972; 26: 109–17.
106. Stangl GI, Schwarz FJ, Müller H, Kirchgessner M. Evaluation of the cobalt requirement of beef cattle based on vitamin B12, folate, homocysteine and methylmalonic acid. Br J Nutr 2000; 84: 645–53.
107. Lopez-Guisa JM, Satter LD. Effect of copper and cobalt addition on digestion and growth in heifers fed diets containing alfalfa silage or corn crop residues.
J Dairy Sci 1992; 75: 247–56.
108. Paragon BM. Readjustment of the supply of cobalt in the ruminant: critical approach.
Recl Med Veterinaire 1993; 169: 759–61.
109. Kirchgessner M, Schwarz FJ, Stangl GI. Growth performance of beef cattle fed corn silage-based rations without Cu, Zn, Mn, Co and Se supplementation.
J Anim Physiol Anim Nutr 1997; 78: 141–53.
110. Schwarz FJ, Kirchgessner M, Stangl GI. Cobalt requirement of beef cattle – feed intake and growth at different levels of cobalt supply.
J Anim Physiol Anim Nutr 2000; 83: 121–31.

111. Uredba Evropskega Parlamenta in Sveta (ES) št. 1831/2003 z dne 22. septembra 2003 o dodatkih za uporabo v prehrani živali Ur List RS 2003; L 268: 1–29.
112. EC (European Commission Directorate-General for Health and Food Safety). Register of feed additives, pursuant to regulation (EC) No 1831/2003: Annex I: List of additives. Edition 251. (Online) 2017. (19. feb. 2017).
113. Scientific opinion on the use of cobalt compounds as additives in animal nutrition. EFSA J 2009; 7: 1383–428.
114. Mowat DN. Organic chromium: A new nutrient for stressed animals. In: Lyons TP, Jacques KA, eds. Biotechnology in the feed industry: proceedings of Alltech's 10th annual symposium. Nottingham: University Press, 1994: 275–82.
115. Amata IA. Chromium in livestock nutrition: review. Glo Adv Res J Agric Sci 2013; 2: 289–306.
116. Amoikon EK, Fernandez JM, Southern LL, Thompson DL, Ward TL, Olcott BM. Effect of chromium tripicolinate on growth, glucose tolerance, insulin sensitivity, plasma metabolites, and growth hormone in pigs. J Anim Sci 1995; 73: 1123–30.
117. Hayirli A, Bremmer DR, Bertics SJ, Socha MT, Grummer RR. Effect of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cows. J Dairy Sci 2001; 84: 1218–30.
118. McNamara JP, Valdez F. Adipose tissue metabolism and production responses to calcium propionate and chromium propionate. J Dairy Sci 2005; 88: 2498–507.
119. Smith KL, Waldron MR, Drackley JK, Socha MT, Overton TR. Performance of dairy cows as affected by prepartum dietary carbohydrate source and supplementation with chromium throughout the transition period. J Dairy Sci 2005; 88: 255–63.
120. Sano H, Narahara S, Kondo T, Takahashi A, Terashima Y. Insulin responsiveness to glucose and tissue responsiveness to insulin during lactation in dairy cows. Domest Anim Endocrinol 1993; 10: 191–7.

121. Safety and efficacy of chromium methionine (Availa® Cr) as feed additive for all species: safety and efficacy of chromium methionine (Availa®Cr) as feed additive for all species. EFSA J 2009; 7: 1043–112.
122. Højberg O, Canibe N, Poulsen HD, Hedemann MS, Jensen BB. Influence of dietary zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 2267–77.
123. Yazdankhah S, Rudi K, Bernhoft A. Zinc and copper in animal feed – development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. Microb Ecol Health Dis 2014 ;25: 1–7.
124. McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA, Wilkinson RG. Animal nutrition. 7th ed. Harlow: Pearson Education, 2011.
125. Dias RS, López S, Montanholi YR, et al. A meta-analysis of the effects of dietary copper, molybdenum, and sulfur on plasma and liver copper, weight gain, and feed conversion in growing-finishing cattle. J Anim Sci 2013; 91: 5714–23.
126. Gooneratne SR, Buckley WT, Christensen DA. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. Can J Anim Sci 1989; 69: 819–45.
127. Gengelbach GP, Ward JD, Spears JW. Effect of dietary copper, iron, and molybdenum on growth and copper status of beef cows and calves. J Anim Sci 1994; 72: 2722–7.
128. Leeson S. Copper metabolism and dietary needs. Worlds Poult Sci J 2009; 65: 353–66.
129. Puls R. Mineral levels in animal health: diagnostic data. 2nd ed. Clearbrook: Sherpa International, 1994: 1–285.
130. Wikse SE, Herd D, Field R, Holland P. Diagnosis of copper deficiency in cattle. J Am Vet Med Assoc 1992; 200: 1625–9.
131. Kalita DJ, Sarmah BC, Sarmah DN, Mili DC. Mineral status and their retention in lactating cows in relation to soil, fodder and feed in Kamrup district of Assam. Indian J Anim Nutr 2003; 20: 421–9.

132. Ramana JV, Prasad CS, Gowda SK. Mineral profile of soil, feeds, fodders and blood plasma in southern transition zone of Karnataka. *Indian J Anim Nutr* 2000; 17: 179–83.
133. Shahjalal M, Khaleduzzaman ABM, Khandaker ZH. Micro mineral profile of cattle in four selected areas of Mymensingh district. *Bangladesh J Anim Sci* 2008; 37: 44–52.
134. Skalicka M, Nad P, Samudovska AH, Bunjak L. Micro mineral concentrations of dairy cows in selected areas from Slovak Republic. *J Vet Sci Technol* 2016; 7: 1–4.
135. Fuqua BK, Vulpe CD, Anderson GJ. Intestinal iron absorption. *J Trace Elem Med Biol* 2012; 26: 115–9.
136. Miret S, Simpson RJ, McKie AT. Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annu Rev Nutr* 2003; 23: 283–301.
137. Wessling-Resnick M. Iron transport. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 129–51.
138. Humann-Ziehank E. Selenium, copper and iron in veterinary medicine – From clinical implications to scientific models. *J Trace Elem Med Biol* 2016; 37: 96–103.
139. Jenkins KJ, Hidiroglou M. Effect of excess iron in milk replacer on calf performance. *J Dairy Sci* 1987; 70: 2349–54.
140. Oruç HH, Uzunoğlu İ, Cengiz M. Suspected iron toxicity in dairy cattle. ‘Süt sığırlarında demirle şüpheli zehirlenme. *Uludag Univ J FacVet Med* 2009; 28: 75–7.
141. Osweiler GD, Buck WB, Van Gelder GA. Clinical and diagnostic veterinary toxicology. 3rd ed. Dubuque: Kendall Hunt Publishing Company, 1985: 104–6.
142. European Food Safety Authority. Safety and efficacy of iron compounds (E1) as feed additives for all animal species: ferrous carbonate; ferric chloride, hexahydrate; ferrous fumarate; ferrous sulphate, heptahydrate; ferrous sulphate, monohydrate; ferrous chelate of amino acids, hydrate; ferrous chelate of glycine, hydrate, based on a dossier submitted by FEFANA asbl. *EFSA J* 2016;14: 4396–443.
143. Langford NJ, Ferner RE. Toxicity of mercury. *J Hum Hypertens* 1999; 13: 651–6.

144. Raikwar MK, Kumar P, Singh M, Singh A. Toxic effect of heavy metals in livestock health. *Vet World* 2008; 1: 28–30.
145. Kochare T, Tamir B. Assessment of dairy feeds for heavy metals. *Am Sci Res J Eng Technol Sci* 2015; 11: 20–31.
146. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol* 2014; 7: 60–72.
147. Patrick L. Mercury toxicity and antioxidants: Part 1: role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. *Altern Med Rev* 2002; 7: 456–71.
148. Erickson JA, Gustin MS, Schorran DE, Johnson DW, Lindberg SE, Coleman JS. Accumulation of atmospheric mercury in forest foliage. *Atmos Environ* 2003; 37: 1613–22.
149. Schrauzer GN. Lithium: occurrence, dietary intakes, nutritional essentiality. *J Am Coll Nutr* 2002; 21: 14–21.
150. Shahzad B, Tanveer M, Hassan W, et al. Lithium toxicity in plants: reasons, mechanisms and remediation possibilities: a review. *Plant Physiol Biochem* 2016; 107: 104–15.
151. Duff MC, Kuhne WW, Halverson NV, et al. mRNA transcript abundance during plant growth and the influence of Li(+) exposure. *Plant Sci* 2014; 229: 262–79.
152. Aral H, Vecchio-Sadus A. Toxicity of lithium to humans and the environment: a literature review. *Ecotoxicol Environ Saf* 2008; 70: 349–56.
153. Ledoux J-M. Features of the comparative pharmacokinetics of lithium; a potential application of its use in livestock farming. *Med Hypotheses* 2003; 61: 278–81.
154. Anke M, Arnhold W, Schäfer U, Müller R. Recent progress in exploring the essentiality of the ultratrace element lithium to the nutrition of animals and man. *Biomed Res Trace Elem* 2005; 16: 169–76.

155. Jenkins KJ, Kramer JKG. Effect of excess dietary manganese on lipid composition of calf blood plasma, heart, and liver1. *J Dairy Sci* 1991; 74: 3944–48.
156. Reis LSL de S, Pardo PE, Camargos AS, Oba E. Mineral element and heavy metal poisoning in animals. *J Med Med Sci* 2010; 1: 560–79.
157. Cave JG, McLaren PJ, Whittaker SJ, Rast L, Stephens A, Parker EM. An extended outbreak of congenital chondrodysplasia in calves in South East Australia. *Aust Vet J* 2008; 86: 130–5.
158. McLaren PJ, Cave JG, Parker EM, Slocombe RF. Chondrodysplastic calves in Northeast Victoria. *Vet Pathol* 2007; 44: 342–54.
159. Mee JF. Nonhereditary disproportionate dwarfism in a beef herd: clinical and pathological features. *Ir Vet J* 1995; 48: 93–105.
160. Valero G, Alley MR, Badcoe LM, Manktelow BW, Merrall M, Lawes GS. Chondrodytropy in calves associated with manganese deficiency. *N Z Vet J* 1990; 38: 161–7.
161. European Commission. Opinion of the Scientific committee on food on the tolerable upper intake level of molybdenum. (Online) 2000. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out80h_en.pdf (23. feb. 2016).
162. Turnlund J, Friberg L. Molybdenum. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg L, eds. *Handbook on the toxicology of metals*, 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2007: 731–8.
163. Spears JW. Improving cattle health through trace mineral supplementation. In: Range Beef Cow Symposium. Paper 191. Gering, Nebraska, 1995; 1–7.
164. Phillippe M, Humphries WR, Atkinson T, Henderson GD, Garthwaite PH. The effect of dietary molybdenum and iron on copper status, puberty, fertility and oestrous cycles in cattle. *J Agric Sci* 1987; 109: 321–36.

165. Poonkothai M, Vijayavathi BS. Nickel as an essential element and a toxicant. *Int J Environ Sci* 2012; 1: 255–8.
166. Scott-Fordsmand JJ. Toxicity of nickel to soil organisms in Denmark. In: Ware G, Nigg H, Benvenue A, eds. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. New York: Springer, 1997: 1–34.
167. Brown PH, Welch RM, Cary EE. Nickel: a micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiol* 1987; 85: 801–3.
168. Dixon NE, Gazzola TC, Blakeley RL, Zermer B. Letter: Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *J Am Chem Soc* 1975; 97: 4131–3.
169. Eskew DL, Welch RM, Norvell WA. Nickel in higher plants: further evidence for an essential role. *Plant Physiol* 1984; 76: 691–3.
170. Marschner H. *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd ed. San Diego: Academic Press Limited, 1995: 1–889.
171. Samal L, Mishra C. Significance of nickel in livestock health and production. *Int J Agro Vet Med Sci* 2011; 5: 349–61.
172. Aleksandrovn R, Cortisor O, Patron I. Nickel. *Exp Pathol Parasitol* 2006; 911: 64–74.
173. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the risks to animal and public health and the environment related to the presence of nickel in feed. *EFSA J* 2015; 13: 4047–123.
174. Nicholson FA, Chambers BJ, Williams JR, Unwin RJ. Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales. *Bioresour Technol* 1999; 70: 23–31.
175. Bischoff K, Hillebrandt J, Erb HN, Thompson B, Johns S. Comparison of blood and tissue lead concentrations from cattle with known lead exposure. *Food Addit Contam Part A* 2016; 33: 1563–9.

176. Patra RC, Swarup D, Sharma MC, Naresh R. Trace mineral profile in blood and hair from cattle environmentally exposed to lead and cadmium around different industrial units. *J Vet Med A* 2006; 53: 511–7.
177. Miranda M, López-Alonso M, García-Partida P, Velasco J, Benedito JL. Long-term follow-up of blood lead levels and haematological and biochemical parameters in heifers that survived an accidental lead poisoning episode. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2006; 53: 305–10.
178. Cowan V, Blakley B. Acute lead poisoning in western Canadian cattle - A 16-year retrospective study of diagnostic case records. *Can Vet J Rev Veterinaire Can* 2016; 57: 421–6.
179. Sharpe R, Livesey C. Discarded lead-acid batteries: a preventable cause of lead poisoning in cattle. *Vet Rec* 2004; 154: 512.
180. Waldner C, Checkley S, Blakley B, Pollock C, Mitchell B. Managing lead exposure and toxicity in cow-calf herds to minimize the potential for food residues. *J Vet Diagn Invest* 2002; 14: 481–6.
181. Zhou X, Qu X, Zhao S, Wang J, Li S, Zheng N. Analysis of 22 elements in milk, feed, and water of dairy cow, goat, and buffalo from different regions of China. *Biol Trace Elem Res*, 2017; 176: 120–9.
182. dos Santos Sigarini K, de Oliveira AP, Martins DL, Brasil AS, de Oliveira KC, Dalla Villa R. Determination of the lead, cadmium, and chromium concentration in mineral feeds and supplements for cattle produced in the Mato Grosso state, Brazil. *Biol Trace Elem Res* 2016; 177: 209–14.
183. European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific panel on contaminants in the food chain [contam] related to lead as undesirable substance in animal feed. *EFSA J* 2004; 71, 1–20.
184. Wilson SC, Lockwood PV, Ashley PM, Tighe M. The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: a critical review. *Environ Pollut* 2010; 158: 1169–81.

185. Filella M, Belzile N, Chen YW. Antimony in the environment: a review focused on natural waters: I. occurrence. *Earth Sci Rev* 2002; 57: 125–76.
186. Bencze K. Antimony. In: Seiler H, eds. *Handbook on metals in clinical and analytical chemistry*. New York: Marcel Dekker, 1994: 227–36.
187. Smichowski P. Antimony in the environment as a global pollutant: a review on analytical methodologies for its determination in atmospheric aerosols. *Talanta* 2008; 75: 2–14.
188. Council Directive 76/464/EEC of 4 May 1976 on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community. *Off J Eur Commun* 1976; L 129: 23.
189. Callahan MA, Slimak MW, Gabel NW, et al. Water-Related Environmental Fate of 129 Priority Pollutants. Volume I: Introduction and Technical Background Metals and Inorganics Pesticides and PCBs. Washington: U. S. Environmental Protection Agency, 1979.
190. Casado M, Anawar HM, Garcia-Sánchez A, Santa Regina I. Antimony and arsenic uptake by plants in an abandoned mining area. *Commun Soil Sci Plant Anal* 2007; 38: 1255–75.
191. Gebel T. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. *Chem Biol Interact* 1997; 107: 131–44.
192. Gurnani N, Sharma A, Talukder G. Comparison of the clastogenic effects of antimony trioxide on mice in vivo following acute and chronic exposure. *Biometals* 1992; 5: 47–50.
193. Murciego AM, Sánchez AG, González MAR, et al. Antimony distribution and mobility in topsoils and plants (*Cytisus striatus*, *Cistus ladanifer* and *Dittrichia viscosa*) from polluted Sb-mining areas in Extremadura (Spain). *Environ Pollut* 2007; 145: 15–21.
194. Tschan M, Robinson BH, Nodari M, Schulin R. Antimony uptake by different plant species from nutrient solution, agar and soil. *Environ Chem* 2009; 6: 144–52.

195. Zeng D, Zhou S, Ren B, Chen T. Bioaccumulation of antimony and arsenic in vegetables and health risk assessment in the superlarge antimony-mining area, China. *J Anal Methods Chem* 2015; 2015: 1–9.
196. Hajiani NJ, Ghaderian SM, Karimi N, Schat H. A comparative study of antimony accumulation in plants growing in two mining areas in Iran, Moghanlo, and Patyar. *Environ Sci Pollut Res* 2015; 22: 16542–53.
197. Hammel W, Debus R, Steubing L. Mobility of antimony in soil and its availability to plants. *Chemosphere* 2000; 41: 1791–8.
198. Shtangeeva I, Steinnes E, Lierhagen S. Uptake of different forms of antimony by wheat and rye seedlings. *Environ Sci Pollut Res Int* 2012; 19: 502–9.
199. Lyons MP, Papazyan TT, Surai PF. Selenium in food chain and animal nutrition: lessons from nature -review-. *Asian-Australas J Anim Sci* 2007; 20: 1135–55.
200. Kieliszek M, Błażejak S. Current knowledge on the importance of selenium in food for living organisms: a review. *Molecules* 2016; 21: 609–25.
201. Gong J, Xiao M. Selenium and antioxidant status in dairy cows at different stages of lactation. *Biol Trace Elem Res* 2016; 171: 89–93.
202. Karatzia MA, Katsoulos PD, Karatzias H, Zeyner A. Blood selenium, copper, and zinc in dairy heifers during the transition period and effects of clinoptilolite administration. *Czech J Anim Sci* 2016; 61: 133–9.
203. Tinggi U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicol Lett* 2003; 137: 103–10.
204. European Food Safety Authority. Opinion of the Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the safety and efficacy of the product Sel-Plex 2000 as a feed additive according to Regulation (EC) No 1831/2003. *EFSA J* 2006; 348, 1–40.
205. Spallholz JE. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 45–64.

206. Davis TZ, Stegelmeier BL, Panter KE, Cook D, Gardner DR, Hall JO. Toxicokinetics and pathology of plant-associated acute selenium toxicosis in steers. *J Vet Diagn Invest* 2012; 24: 319–27.
207. Ramos SJ, Faquin V, Guilherme LRG, et al. Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant Soil Environ* 2010; 56: 584–8.
208. Graceli JB, Sena GC, Lopes PFI, et al. Organotins: a review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. *Reprod Toxicol* 2013; 36: 40–52.
209. Kimbrough RD. Toxicity and health effects of selected organotin compounds: a review. *Environ Health Perspect* 1976; 14: 51–6.
210. Wu L, Chen Z, Zhu J, Hu L, Huang X, Shi H. Developmental toxicity of organotin compounds in animals. *Front Mar Sci* 2014; 1: e 39 (4 str.).
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmars.2014.00039/full>
211. Okoro HK, Fatoki OS, Adekola FA, Ximba BJ, Snyman RG. Sources, environmental levels and toxicity of organotin in marine environment-a review. *Asian J Chem* 2011; 23: 473–82.
212. Eisler R. Tin hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *Contam Hazard Rev Rep* 1989, 85 (1.15): 1–53.
213. Budis H, Kalisińska E, Łanocha N, Kosik-Bogacka D. Concentrations of manganese, iron, and strontium in bones of the domestic dog (*Canis lupus familiaris*). *Turk J Vet Anim Sci* 2015; 39: 279–86.
214. Shorr E, Carter AC. The usefulness of strontium as an adjuvant to calcium in the remineralization of the skeleton in man. *Bull Hosp Joint Dis* 1952; 13: 59–66.
215. Alexander GV, Nusbaum RE, MacDonald NS. The relative retention of strontium and calcium in bone tissue. *J Biol Chem* 1956; 218: 911–9.

216. Omdahl JL, DeLuca HF. Rachitogenic activity of dietary strontium. I. Inhibition of intestinal calcium absorption and 1,25-dihydroxycholecalciferol synthesis. *J Biol Chem* 1972; 247: 5520–6.
217. Dahl SG, Allain P, Marie PJ, et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone* 2001; 28: 446–53.
218. Pagano AR, Yasuda K, Roneker KR, Crenshaw TD, Lei XG. Supplemental Escherichia coli phytase and strontium enhance bone strength of young pigs fed a phosphorus-adequate diet. *J Nutr* 2007; 137: 1795–801.
219. Shahnazari M, Lang DH, Fosmire GJ, Sharkey NA, Mitchell AD, Leach RM. Strontium administration in young chickens improves bone volume and architecture but does not enhance bone structural and material strength. *Calcif Tissue Int* 2007; 80: 160–6.
220. Shahnazari M, Sharkey NA, Fosmire GJ, Leach RM. Effects of strontium on bone strength, density, volume, and microarchitecture in laying hens. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 1696–703.
221. Browning LC, Cowieson AJ. The concentration of strontium and other minerals in animal feed ingredients. *J Appl Anim Nutr* 2013; 2: 1–6.
222. Healy WB. Ingestion of soil by dairy cows. *N Z J Agric Res* 1968; 11: 487–99.
223. Duffy B, Schwietert C, France A, et al. Transition metals as protease inhibitors. *Biol Trace Elem Res* 1998; 64: 197–213.
224. Nagy B, Pais I, Bokori J. The application of titanium-chelate in pig-feeding. In: Anke M, eds. 5. Spurenelement-Symposium New Trace Elements. Jena: Karl-Marx-Universität, Friedrich-Schiller-Universität, 1986: 1254–9.
225. Schroeder HA, Balassa JJ, Vinton WH. Chromium, lead, cadmium, nickel and titanium in mice: effect on mortality, tumors and tissue levels. *J Nutr* 1964; 83: 239–50.
226. Schroeder HA, Vinton WH, Balassa JJ. Effect of chromim, cadmium and other trace metals on the growth and survival of mice. *J Nutr* 1963; 80: 39–47.

227. Schwietert CW, Yaghoubi S, Gerber NC, McSharry JJ, McCue JP. Dietary titanium and infant growth. *Biol Trace Elem Res* 2001; 83: 149–67.
228. Yaghoubi S, Schwietert CW, McCue JP. Biological roles of titanium. *Biol Trace Elem Res* 2000; 78: 205–17.
229. Barksdale J. Titanium: its occurrence, chemistry, and technology. 2nd ed. New York: Ronald Press, 1966.
230. Tremel A, Masson P, Garraud H, Donard OFX, Baize D, Mench M. Thallium in French agrosystems—II. concentration of thallium in field-grown rape and some other plant species. *Environ Pollut* 1997; 97: 161–8.
231. LaCoste C, Robinson B, Brooks R. Uptake of thallium by vegetables: its significance for human health, phytoremediation, and phytomining. *J Plant Nutr* 2001; 24: 1205–15.
232. Peter ALJ, Viraraghavan T. Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Environ Int* 2005; 31: 493–501.
233. Zitko V. Toxicity and pollution potential of thallium. *Sci Total Environ* 1975; 4: 185–92.
234. Logan PG. Thallium uptake and transport in higher plants. Ph.D. thesis. Liverpool: Department of Biology, Liverpool Polytechnic, 1985.
235. Mulkey JP, Oehme FW. A review of thallium toxicity. *Vet Hum Toxicol* 1993; 35: 445–53.
236. Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health: thallium. Winnipeg: Canadian Council of Ministers of the Environment. 1999.
237. Thallium. Environmental health criteria 182, international programme on chemical safety. Geneva: World Health Organization, 1996.
238. Dmowski K, Kozakiewicz A, Kozakiewicz M. Small mammal populations and community under conditions of extremely high thallium contamination in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 1998; 41: 2–7.

239. Małuszyński MJ, Małuszyńska I. Evaluation of the soil quality from areas with varying degrees of pollution. *Desalination Water Treat* 2016; 57: 1034–7.
240. Smith IC, Carson BL. Trace metals in the environment. Volume 1: Thallium. Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers, 1977: 950–1.
241. Heim M, Wappelhorst O, Markert B. Thallium in terrestrial environments – occurrence and effects. *Ecotoxicology* 2002; 11: 369–77.
242. Fergusson JE. The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects. Oxford: Pergamon, 1990: 558–64.
243. Kabata-Pendias A, Pendias H. Trace elements in soils and plants. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 1992: 1–315.
244. Xiao T, Guha J, Boyle D, Liu C-Q, Chen J. Environmental concerns related to high thallium levels in soils and thallium uptake by plants in southwest Guizhou, China. *Sci Total Environ* 2004; 318: 223–44.
245. Imtiaz M, Rizwan MS, Xiong S, Li H, Ashraf M, Shahzad SM et al. Vanadium, recent advancements and research prospects: a review. *Environ Int* 2015; 80: 79–88.
246. Anke M, Illing-Günther H, Schäfer U. Recent progress on essentiality of the ultratrace element vanadium in the nutrition of animal and man. *Biomed Res Trace Elem* 2005; 16: 208–14.
247. Chan MK, Kim J, Rees DC. The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair: 2.2 Å resolution structures. *Science* 1993; 260: 792–4.
248. Frank A, Madej A, Galgan V, Petersson LR. Vanadium poisoning of cattle with basic slag. Concentrations in tissues from poisoned animals and from a reference, slaughterhouse material. *Sci Total Environ* 1996; 181: 73–92.
249. McCrindle CM, Mokantla E, Duncan N. Peracute vanadium toxicity in cattle grazing near a vanadium mine. *J Environ Monit* 2001; 3: 580–2.
250. Nielsen FH. History of zinc in agriculture. *Adv Nutr* 2012; 3: 783–9.

251. Capuco AV, Wood DL, Bright SA, Miller RH, Bitman J. Regeneration of teat canal keratin in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1990; 73: 1745–50.
252. Spears JW. Minerals in forages. In: Fahey GC, ed. *Forage quality, evaluation, and utilization*. Madison: American Society of Agronomy, 1994: 281–317.
253. Patterson HH, Adams DC, Klopfenstein TJ, Clark RT, Teichert B. Supplementation to meet metabolizable protein requirements of primiparous beef heifers: II. Pregnancy and economics. *J Anim Sci* 2003; 81: 563–70.
254. Velladurai C, Selvaraju M, Napolean RE. Effects of macro and micro minerals on reproduction in dairy cattle - a review. *Int J Sci Res Sci Technol* 2016; 2: 68–74.
255. National Research Council. *Nutrient requirements of dairy cattle*: 7th ed. Washington: National Academy Press, 2001: 1–408.
256. Sobhanirad S, Naserian AA. Effects of high dietary zinc concentration and zinc sources on hematology and biochemistry of blood serum in Holstein dairy cows. *Anim Feed Sci Technol* 2012; 177: 242–6.
257. Ahola JK, Baker DS, Burns PD, et al. Effect of copper, zinc, and manganese supplementation and source on reproduction, mineral status, and performance in grazing beef cattle over a two-year period. *J Anim Sci* 2004; 82: 2375–83.
258. Cope CM, Mackenzie AM, Wilde D, Sinclair LA. Effects of level and form of dietary zinc on dairy cow performance and health. *J Dairy Sci* 2009; 92: 2128–35.
259. El Ashry GM, Hassan AAM, Soliman SM. Effect of feeding a combination of zinc, manganese and copper methionine chelates of early lactation high producing dairy cow. *Food Nutr Sci* 2012; 3: 1084–91.
260. Spears JW. Trace mineral bioavailability in ruminants. *J Nutr* 2003; 133 (suppl. 1): 1506–9.

261. Zinc and copper in pig and poultry production - fate and effects in the food chain and the environment. (Online) Oslo: Vitenskapskomiteen for mattrygghet - Norwegian Scientific Committe for Food Safety, 2014.
<http://www.english.vkm.no/dav/3b1b6769dd.pdf> (13. feb. 2017).
262. Rogers P, Murphy W. Levels of dry matter, major elements (Ca, Mg, N, P, K, Na and S) and trace elements (Co, Cu, I, Mn, Mo, Se and Zn) in Irish grass, silage and hay. Wexford: Teagasc. Publications, 2000.
263. Ihnat M. A survey of methods of analysis for minerals in feedstuffs. *J Anim Sci* 2003; 81: 3218–25.
264. Cubadda F, Raggi A. Determination of cadmium, lead, iron, nickel and chromium in selected food matrices by plasma spectrometric techniques. *Microchem J* 2005; 79: 91–6.
265. Guérin T, Chekri R, Vastel C, et al. Determination of 20 trace elements in fish and other seafood from the French market. *Food Chem* 2011; 127: 934–42.
266. Hongxing Z, Yu-Kui R. Determination of trace elements, heavy metals and rare earth elements in corn seeds from Beijing by ICP-MS simultaneously. *J Chem* 2011; 8: 782–6.
267. Hongxing Z, Yu-Kui R. Determining mineral elements in four kinds of grains from Beijing market by ICP-MS simultaneously. *J Saudi Chem Soc* 2012; 16: 31–3.
268. Llorent-Martínez EJ, Ortega-Barrales P, Fernández-de Córdova ML, Domínguez-Vidal A, Ruiz-Medina A. Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain. *Food Chem* 2011; 127: 1257–62.
269. Millour S, Noël L, Kadar A, Chekri R, Vastel C, Guérin T. Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: method validation. *J Food Compos Anal* 2011; 24: 111–20.
270. SIST EN 15510:2007. Krma – Določevanje kalcija, natrija, fosforja, magnezija, kalija, železa, cinka, bakra, mangana, kobalta, molibdena, arzena, svinca in kadmija z ICP-AES (Animal feeding stuffs – Determination of calcium, sodium, phosphorus,

- magnesium, potassium, iron, zinc, copper, manganese, cobalt, molybdenum, arsenic, lead and cadmium by ICP-AES). Ljubljana: Slovenski inštitut za standardizacijo, 2007.
271. Korn M das GA, Morte ES da B, Santos DCMB dos, Castro JT, Barbosa JTP, Teixeira AP et al. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods: a review. *Appl Spectrosc Rev* 2008; 43: 67–92.
272. Jorhem L, Engman J. Chemical Elements in Food and the Role of Atomic and Mass Spectrometry. Advantages and drawbacks of the determination of selected trace elements in foodstuffs by atomic absorption spectrometry. In: Caroli S, ed. The determination of chemical elements in food: applications for atomic and mass spectrometry. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007: 51–80.
273. Arruda MAZ. Trends in sample preparation. New York: Nova Science Publishers, 2007: 1–304.
274. Becker JS. Inorganic mass spectrometry: principles and applications. Chichester: John Wiley & Sons, 2007: 1–514.
275. Lahiri S. Advanced trace analysis. New Delhi: Alpha Science International, 2010: 1–179.
276. Capar SG, Mindak WR, Cheng J. Analysis of food for toxic elements. *Anal Bioanal Chem* 2007; 389: 159–69.
277. Varian 810/820-MS. ICP Mass Spectrometers. Pre-installation Manual. Mulgrave: Varian, 2011.
278. Cubadda F. Inductively coupled plasma-mass spectrometry for the determination of elements and elemental species in food: a review. *J AOAC Int* 2004; 87: 173–204.
279. Cubadda F, Raggi A, Testoni A, Zanasi F. Multielemental analysis of food and agricultural matrixes by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J AOAC Int* 2002; 85: 113–21.
280. Dams RFJ, Goossens J, Moens L. Spectral and non-spectral interferences in inductively coupled plasma mass-spectrometry. *Microchim Acta* 1995; 119: 277–86.

281. Cubadda F, Raggi A, Coni E. Element fingerprinting of marine organisms by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2006; 384: 887–96.
282. Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules. *Off J Eur Commun* 2004; L 165: 1–141.
283. Uredba Komisije (EU) št. 836/2011 z dne 19. avgusta 2011 o spremembi Uredbe (ES) št. 333/2007 o določitvi metod vzorčenja in analitskih metod za uradni nadzor vsebnosti svinca, kadmija, živega srebra, anorganskega kositra, 3-MCPD in benzo(a)pirena v živilih. *Ur List EU* 2011; L 215: 9–16.
284. Uredba Komisije (ES) št. 333/2007 z dne 28. marca 2007 o določitvi metod vzorčenja in analitskih metod za uradni nadzor vsebnosti svinca, kadmija, živega srebra, anorganskega kositra, 3-MCPD in benzo-a-pirena v živilih. *Ur List EU* 2007; L 88: 29–38.
285. Miller JN, Miller JC. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 4th ed. Harlow: Prentice Hall, 2000: 1–271.
286. European Accreditation. EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing: EA-4/16. Paris: European co-operation for accreditation, 2003: 1–28.
287. Waegeneers N, Hoenig M, Goeyens L, De Temmerman L. Trace elements in home-produced eggs in Belgium: levels and spatiotemporal distribution. *Sci Total Environ* 2009; 407: 4397–402.
288. Kutin Slatnar B, Kranjc A, Lojović Hadžishanović E, Stele A. Popis kmetijstva 2010 - vsaka kmetija šteje. Ljubljana: Statistični urad Republike Slovenije, 2012.
289. Mohorko M, Ambrožič I, Šturbaj E, Verbič J. Legislative requirements for using silage additives at agricultural holdings. In: Proceedings of the 18th International Scientific Symposium on Nutrition of Domestic Animals »Zadravec-Erjavec days«. Radenci:

- Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenija in Kmetijsko gozdarski zavod Murska Sobota, 2009: 148–61.
290. Majer D, Verbič Kugonič N, Pokorný B. Navodila za kmetovanje v degradiranem okolju - zgornja Mežiška dolina. Ljubljana: Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, 2015.
291. Pavšič Vrtač K, Jakovac Strajn B, Salobir J, Šrimpf K, Tavčar Kalcher G. Study of trace and ultratrace elements in silage intended for cattle nutrition. *Slov Vet Res* 2016; 53: 49–57.
292. Jóhannesson T, Eiríksson T, Guðmundsdóttir KB, Sigurdarson S, Kristinsson J. Seven trace elements in Icelandic forage. Their value in animal health and with special relation to scrapie. *Icel Agric Sci* 2007; 20: 3–24.
293. Mee JF, Rogers PA, O'Farrell KJ. Effect of feeding a mineral-vitamin supplement before calving on the calving performance of a trace element deficient dairy herd. *Vet rec* 1995; 137: 508–12.
294. Pick D, Leiterer M, Einax JW. Reduction of polyatomic interferences in biological material using dynamic reaction cell ICP-MS. *Microchem J* 2010; 95: 315–9.
295. Žust J, Hrovatin B, Šimundić B. Assessment of selenium and vitamin E deficiencies in dairy herds and clinical disease in calves. *Vet Rec* 1996; 139: 391–4.
296. Rogers P, Gately T. Control of mineral imbalances in cattle and sheep: a reference manual for advisers and vets. Wexford: Teagasc Publications, 2000.
297. Orešnik A, Lavrenčič J. Krave molznice: prehrana, zdravstveno varstvo in reprodukcija. Ljubljana: Kmečki glas, 2013: 21–150.
298. Lahiri S. Trace analysis. Daryaganj: Narosa Publishing House, 2008.
299. Todolí JL, Mermet JM. Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc* 1999; 54: 895–929.