




REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA OKOLJE IN PROSTOR

Dunajska cesta 48, 1000 Ljubljana

METODOLOGIJA VREDNOTENJA EKOLOŠKEGA STANJA JEZER NA PODLAGI FITOPLANKTONA




Irena Majcen
MINISTRICA

Ljubljana, maj 2016

KAZALO VSEBINE

1	VZORČENJE FITOPLANKTONA.....	6
1.1	Obvezna oprema za vzorčenje	6
1.2	Frekvenca vzorčenja	6
1.3	Mesto vzorčenja in globina zajema	7
1.4	Kvantitativno vzorčenje fitoplanktona in vzorčenje klorofila- <i>a</i>	8
1.5	Kvalitativno vzorčenje fitoplanktona.....	9
2	LABORATORIJSKA ANALIZA FITOPLANKTONA	9
2.1	Oprema za analizo fitoplanktona	9
2.2	Kvalitativna analiza fitoplanktona	10
2.2.1	Taksonomski pregled diatomej in določitev biovolumna posamezne vrste	10
2.3	Kvantitativna analiza fitoplanktona.....	11
2.3.1	Določanje vsebnosti klorofila- <i>a</i>	13
3	VREDNOTENJE EKOLOŠKEGA STANJA JEZER NA PODLAGI FITOPLANKTONA.....	13
3.1	Ekološki tipi jezer v Sloveniji in referenčne razmere.....	14
3.2	Vrednotenje ekološkega stanja jezer na podlagi fitoplanktona - modul trofičnost.....	15
3.2.1	Določitev skupne količine fitoplanktona z izbranimi metrikami	16
3.2.2	Izračun indeksa Brettum.....	16
3.2.3	Izračun razmerja ekološke kakovosti (REK) za posamezne metrike.....	20
3.2.4	Transformacija normaliziranih rek vrednosti posameznih metrik	22
3.2.5	Izračun multimetrijskega indeksa fitoplanktona	22
3.2.6	Izračun razmerja ekološke kakovosti po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona za posamezno leto	23
3.2.7	Izračun razmerja ekološke kakovosti po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona za izbrano obdobje.....	23
3.2.8	Razvrstitev vodnega telesa v razred ekološkega stanja po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona	24
3.3	Vrednotenje ekološkega stanja jezer in razvrščanje vodnih teles jezer v razrede ekološkega stanja na podlagi biološkega elementa fitoplankton	24
4	VIRI	25

SLOVAR UPORABLJENIH IZRAZOV

Fitoplankton	Združba v vodi prosto lebdečih, večinoma fotosintetskih organizmov, ki vključuje enocelične ali kolonijske alge in cianobakterije (Cyanophyta).
Eufotična cona	Območje pelagiala jezera, kjer je še dovolj svetlobe, da poteka fotosinteza in je omogočena neto produkcija (bruto primarna produkcija > respiracija). Spodnja meja eufotične cone je globina do katere pride še 1 % svetlobne radiacije. Približno globino eufotične cone določimo s pomnožitvijo Secchijeve globine s faktorjem 2,5.
Secchijeva globina	Maksimalna globina, do katere je še vidna bela plošča (po Secchi-ju). Merjenje Secchijeve globine po SIST EN ISO 7027:2000 je način merjenja prosojnosti, oziroma motnosti vode.
Prosojnost	glej Secchijeva globina
Termoklina	Globina temperaturnega in gostotnega preskoka med oblikovanimi plastmi vode v jezeru, v času poletne plastovitosti. Za oblikovanje termokline v globinski vertikali jezera je potrebna temperaturna razlika 1 °C na 1 m globine.
Epilimnij	Površinska, temperaturno homogena plast vode, ki se oblikuje v obdobju poletne plastovitosti površine do globine termokline.
Metalimnij	Plast med segretim epilimnijem in hladnim hipolimnijem z največjimi spremembami gostote in temperature. Po originalni definiciji Birge (1897) je metalimnij plast, kjer se na vsak m globine spremeni temperatura vode vsaj za 1 °C.
Hipolimnij	Plast hladne, temperaturno homogene vode na dnu jezera v obdobju poletne plastovitosti.
Spomladanska, jesenska homotermija	Obdobje temperaturne homogenosti v jezerih zgodaj spomladi in v pozni jeseni, ki omogoča mešanje vode - cirkulacijo.
Poletna plastovitost	Obdobje razslojenosti vodnih mas po globinski vertikali zaradi različne temperature vode v jezeru.
Pelagial	Območje proste vode v jezerih; v nasprotju z bentosom, ki predstavlja območje jezerskega dna.
Kvantitativna analiza fitoplanktona	Analiza skupne količine fitoplanktona, na podlagi ugotavljanja prisotnosti posameznih vrst fitoplanktona SIST EN 15204:2007 in določanja njihovega biovolumna SIST EN 16695:2015.
Kvalitativna analiza fitoplanktona	Taksonomska analiza vrstne sestave fitoplanktona.

Celični volumen	Povprečni volumen 1 celice ali kolonije posamezne vrste fitoplanktona, ki se upošteva pri ovrednotenju skupnega biovolumna.
Indeks Brettum	Trofični indeks za vrednotenje fitoplanktonske združbe v skladu z EU-direktivo, na osnovi indeksa P.Brettum-a (Brettum 1989), ki sta ga dodatno dodelala in preoblikovala M.T. Dokulil in G. Wolfram (Dokulil in sod. 2005, Wolfram in sod. 2007, neobjavljeno).
Biomasa	Skupna živa organska masa v vodi.
Metrika oz. indeks	Merljiv ali drugače določljiv del procesa v biološkem sistemu, ki se spreminja z velikostjo obremenitve.
Modul	Označuje obremenitev, katere vpliv na združbe vodnih organizmov (biološke elemente kakovosti) se vrednoti z izbranimi metrikami oz. indeksi.
Referenčna vrednost	Vrednost biološke metrike oz. indeksa v referenčnih razmerah, ki predstavlja izhodišče za izračunavanje razmerja ekološke kakovosti.
Referenčne razmere	Razmere, ki predstavljajo vrednosti metrik oz. indeksov pri zelo dobrem ekološkem stanju.
Razmerje ekološke kakovosti REK	Razmerje med ugotovljeno vrednostjo metrike oz. indeksa na izbranem mestu vzorčenja in referenčno vrednostjo metrike oz. indeksa.
Normalizacija metrik	Izračun razmerja ekološke kakovosti za posamezno metriko oz. indeks.
Transformacija metrik	Izračun transformirane vrednosti razmerja ekološke kakovosti (REK) metrike oz. indeksa z uporabo transformacijske enačbe za zagotovitev ekvidistančne porazdelitve vrednosti REK v razrede

STANDARDI

Metode spremljanja fitoplanktona za vrednotenje ekološkega stanja jezer so v skladu s sledečimi mednarodnimi in slovenskimi standardi:

SIST EN ISO 5667-3:2013	Kakovost vode - Vzorčenje - 3. del: Shranjevanje in ravnanje z vzorci vode (ISO 5667-3:2012)
SIST ISO 5667-4:1996	Kakovost vode - Vzorčenje - 4. del: Navodilo za vzorčenje naravnih in umetnih jezer
SIST EN ISO 7027:2000	Kakovost vode - Ugotavljanje motnosti (ISO 7027:1999)
SIST ISO 10260:2001	Kakovost vode - Merjenje biokemijskih parametrov - Spektrometrično določevanje koncentracije klorofila-a
SIST EN 14996 :2006	Kakovost vode - Navodilo za zagotavljanje kakovosti biološkega in ekološkega ocenjevanja v vodnem okolju
SIST EN 15204:2007	Kakovost vode - Smerni standard za štetje fitoplanktona z invertno mikroskopijo (postopek po Utermöhl)
SIST EN 14407:2014	Kakovost vode - Navodilo za identifikacijo in štetje vzorcev bentoških kremenastih alg rek in jezer
SIST EN 13946:2014	Kakovost vode - Navodilo za rutinsko vzorčenje in pripravo vzorcev bentoških kremenastih alg rek in jezer
SIST EN 16695:2015	Kakovost vode - Navodilo za ocenjevanje biovolumna mikroalg
SIST EN 16698:2016	Kakovost vode - Navodilo za kvantitativno in kvalitativno vzorčenje fitoplanktona v celinskih vodah

1 VZORČENJE FITOPLANKTONA

To poglavje vključuje podrobno navodilo za vzorčenje kvantitativnih in kvalitativnih vzorcev fitoplanktona in klorofila-*a* ter postopke kvalitativne in kvantitativne analize fitoplanktona za vse parametre in metrike potrebne za vrednotenje ekološkega stanja jezer na podlagi fitoplanktona v skladu s to metodologijo.

Vzorčenje fitoplanktona, ki vključuje pravilen izbor frekvence in globin vzorčenja, poteka v skladu s standardiziranimi postopki SIST EN 16698:2016 in je za pravilno vrednotenje ekološkega stanja odlojučega pomena. Poleg kvantitativnih in kvalitativnih vzorcev fitoplanktona se sočasno, na istih globinah zajame tudi vzorce za analizo koncentracije klorofila-*a* v vodi.

1.1 Obvezna oprema za vzorčenje

1. Osebna zaščitna oprema, rešilni jopič itd.
2. Ustrezno registrirano plovilo, v skladu z lokalnim uredbami
3. Vzorčevalnik za integrirano vzorčenje za integriran vzorec ali ustrezen globinski vzorčevalnik za točkovno vzorčenje na posameznih globinah za sestavljen vzorec
4. Kvalitativna planktonska mreža s porami od 20-40 μm
5. Secchijeva plošča (SIST EN ISO 7027:2000)
6. Potopna sonda za merjenje temperature vode po globinski vertikali
7. Hladilna torba z elementi za hlajenje za shranjevanje vzorcev
8. Embalaža za shranjevanje vzorcev (200-500 mL steklenica iz temnega stekla za kvantitativne vzorce, 250-500 mL steklenica za kvalitativne vzorce, vse s širokim vratom in 1000-2000 mL PE posoda za klorofil-*a*)
9. Pribor za konzervacijo vzorcev (kapalke, formaldehid 37 % ali lugol SIST EN 15204:2007)
10. Pribor za označevanje vzorcev
11. Terenski list, ki mora vključevati datum vzorčenja, lokacijo vzorčenja, ime vzorčevalca, meritve Secchijeve globine (m), globino vzorčenja (m) in temperaturni profil jezera ali zadrževalnika v metriških intervalih ($^{\circ}\text{C}$), kot tudi posebnosti na terenu

1.2 Frekvenca vzorčenja

Minimalna letna frekvenca vzorčenja fitoplanktona in klorofila-*a* za potrebe določanja ekološkega stanja jezer je 4-krat letno v enakomernih presledkih, 1-krat v vsakem od limnoloških obdobj, kot je zapisano spodaj. Za izračun ekološkega stanja vodnega telesa se uporabi zaporedni triletni niz podatkov.

V obdobju enega leta se vzorčenje fitoplanktona obvezno opravi:

- 1-krat v obdobju spomladanske cirkulacije – homotermije,
- 1-krat na začetku poletne plastovitosti,
- 1-krat na višku poletne plastovitosti,

1-krat med jesensko homotermijo.

Ob vsakem vzorčenju se zajame kvalitativne in kvantitativne vzorce fitoplanktona ter vzorce za analizo klorofila-*a*.

1.3 Mesto vzorčenja in globina zajema

Vzorci za kvalitativno in kvantitativno analizo fitoplanktona in klorofila-*a* se zajamejo iz čolna na **osnovnem vzorčnem mestu** vodnega telesa. **Osnovno vzorčno mesto** je določeno na osnovi hidromorfoloških značilnosti jezera in je v večini jezer določeno kot točka na površini jezera, kjer je jezero najgloblje.

Pred vzorčenjem fitoplanktona se za pravilno določitev globin vzorčenja obvezno opravi meritve prosojnosti in meritve temperature vode po globinski vertikali.

Vzorce se večinoma zajame v območju eufotične cone, oziroma po shemi v preglednici 1.

Preglednica 1: Izbor globin za vzorčenje fitoplanktona v plitvih in globokih jezerih

Globoka jezera ($Z_{\max} \geq 15 \text{ m}$)	
Homotermija	Plastovitost
$Z_{\text{euf}} > 20 \text{ m} \rightarrow Z_{\text{vz}} = 20 \text{ m}$ $Z_{\text{euf}} < 20 \text{ m} \rightarrow Z_{\text{vz}} = 20 \text{ m}$	$Z_{\text{euf}} > 20 \text{ m} \rightarrow Z_{\text{vz}} = 20 \text{ m}$ $Z_{\text{euf}} < Z_{\text{epi}} \rightarrow Z_{\text{vz}} = Z_{\text{epi}}$ $Z_{\text{euf}} > Z_{\text{epi}} \rightarrow Z_{\text{vz}} = Z_{\text{euf}}$
Plitva jezera ($Z_{\max} \leq 10 \text{ m}$)	
Homotermija	Plastovitost
$Z_{\text{vz}} = Z_{\max} - 0,5 \text{ m}$	$Z_{\text{euf}} < Z_{\text{epi}} \rightarrow Z_{\text{vz}} = Z_{\text{epi}}$ $Z_{\text{euf}} < 6 \text{ m} \rightarrow Z_{\text{vz}} = 6 \text{ m}$ $Z_{\text{euf}} > 6 \text{ m} \rightarrow Z_{\text{vz}} = Z_{\text{euf}}$
Zelo plitva jezera ($Z_{\max} \leq 5 \text{ m}$)	
Homotermija	Plastovitost
$Z_{\text{vz}} = Z_{\max} - 0,5 \text{ m}$	$Z_{\text{vz}} = Z_{\max} - 0,5 \text{ m}$

Z_{vz} – globina vzorčenja

Z_{euf} – globina eufotične cone

Z_{epi} – globina epilimnija do globine prve termokline

Z_{\max} – globina celotnega vodnega stolpca

Eufotična ali produktivna cona je plast vodne mase, kjer je dovolj svetlobe za potek fotosinteze in je bruto primarna produkcija večja od respiracije. Njen obseg, oziroma globina je določen z 2,5-kratno globino prosojnosti, ki se meri s Secchijevo ploščo (SIST EN ISO 7027:2000).

V globokih jezerih, kjer območje eufotične cone presega globino 20 m ($Z_{eu} > 20\text{m}$) se vzorčenje opravi v plasti od 0-20 m. Če je globina eufotične cone manjša od globine epilimnija ($Z_{eu} < Z_{epi}$), se vzorčenje opravi v območju epilimnija. **Epilimnij** obsega plast vode od površine do globine prve termokline. Termoklina je globina temperaturnega preskoka, kjer se na globini enega metra temperatura vode spremeni za $\geq 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Birge 1897, Hutchinson 1957).

V globokih jezerih se ne glede na globino eufotične cone vzorči do globine 20 m tudi v obdobju homotermije. Izjema je Velenjsko jezero, kjer se vzorčenje fitoplanktona opravi le v prezračeni plasti jezera, ki trenutno obsega plast od površine do globine 15 m.

V polimiktičnih plitvih zadrževalnikih ($Z_{max} \leq 10\text{ m}$) se v obdobju homotermije opravi vzorčenje celega vodnega stolpca. V obdobju plastovitosti se vzorči v območju eufotične cone, če je globina le te $\geq 6\text{ m}$, sicer pa se vzorčenje opravi do globine 6 m ali v območju epilimnija. V zelo plitvih zadrževalnikih, kjer je ($Z_{max} \leq 6\text{ m}$) se ne glede na obdobje vzorce zajame v celotnem vodnem stolpcu. Končna globina vzorčenja je 0,5 m nad dnom, da se ne zajame mulja ($Z_{vz} = Z_{max} - 0,5\text{ m}$).

1.4 Kvantitativno vzorčenje fitoplanktona in vzorčenje klorofila-*a*

Vzorci za kvantitativno analizo fitoplanktona in analizo klorofila-*a* se vedno zajame skupaj, na osnovnem vzorčnem mestu, v območju eufotične cone ali drugače, kot je opredeljeno v poglavju 1.3. Vzorce se lahko zajame integrirano ali točkovno, v skladu s standardom SIST ISO 5667-4:1996. Primernejše je integrirano vzorčenje, ki je ekonomsko in časovno učinkovitejše. Integriran vzorec se zajame z ustreznim vzorčevalnikom za integrirano vzorčenje v celotni plasti eufotične cone. Pri točkovnem načinu vzorčenja se zajame posamezne vzorce na različnih globinah eufotične cone. V plitvih jezerih se točkovne vzorce zajame na vsak meter, v globljih pa najmanj na vsak drugi meter globine. Iz enakih volumskih deležev točkovnih vzorcev se sestavi vzorec za analizo fitoplanktona in klorofila-*a*.

Vzorci za kvantitativno analizo fitoplanktona se shrani v ustrezno 200–500 mL temno stekleno ali drugo ustrezno embalažo in takoj doda sredstvo za konzervacijo, 36 % formaldehid (1 mL 36 % formaldehida/100 mL vzorca) ali raztopino lugola (SIST EN 15204:2007). Plastična embalaža je manj primerna za shranjevanje vzorcev fitoplanktona za kvantitativno analizo. Do analiznega laboratorija se vzorce hrani v temi v hladilni torbi in nato konzervirane, največ 6 mesecev v hladilniku pri temperaturi 4 - 10 °C.

Vzorci za analizo klorofila-*a* se zajame v ustrezno 1000–2000 mL embalažo. Analizo se opravi v roku 24, do največ 36 ur po zajemu. Do analize se vzorce hrani v temi pri temperaturi 4–10 °C.

Vsi vzorci morajo biti označeni z etiketo, ki vsebuje naslednje podatke:

- ime vodnega telesa,
- mesto vzorčenja,
- datum vzorčenja,
- globino zajema.

Iz zajetih kvantitativnih vzorcev fitoplanktona se določa število in biovolumen prisotnih fitoplanktonskih vrst v vzorcu, na osnovi česar se izračuna skupni biovolumen fitoplanktona in relativni biovolumen posamezne vrste.

1.5 Kvalitativno vzorčenje fitoplanktona

Vzorci fitoplanktona za kvalitativno analizo in analizo planktonskih diatomej se zajame na osnovnem vzorčnem mestu, z ustrezno planktonsko mrežo s porami 20–40 µm v celotnem vodnem stolpcu, od površine do dna, oziroma v globokih jezerih najmanj do globine 20 m. Vzorci so namenjeni taksonomski analizi, meritvam in določanju relativne pogostosti prisotnih vrst fitoplanktona.

Vzorci se shranijo v ustrezno 250–500 mL plastično ali temno stekleno embalažo.

Za kvalitativno analizo se zajame 2 ali 3 vzorce fitoplanktona. En vzorec se takoj po zajemu konzervira s 36 % formaldehidom (1 mL 36 % formaldehida/100 mL vzorca) ali lugolom. Vzorec shranimo v hladilniku pri temperaturi 4–10 °C. Analize opravimo najkasneje 6 mesecev po zajemu.

Drugi vzorec se ne konzervira. Pregleda se ga v najkrajšem možnem času po zajemu (največ 36 ur po zajemu) in je namenjen predvsem natančnejši taksonomski determinaciji.

Tretji vzorec se uporabi za podrobno analizo diatomej. Vzorec se v roku 36 ur od zajema prefiltrira preko celulozno acetatnega filtra, ki se ga do nadaljnje analize hrani v pokriti petrijevki na sobni temperaturi. Podroben postopek nadaljnje priprave vzorca je opisan v poglavju 2.3.

Vsi vzorci morajo biti označeni z etiketo, ki vsebuje podatke o vodnem telesu, mestu vzorčenja, datumu vzorčenja in globini zajema.

2 LABORATORIJSKA ANALIZA FITOPLANKTONA

Analiza fitoplanktona za potrebe določanja ekološkega stanja jezer vključuje kvantitativno in kvalitativno analizo. Postopki so skladni s standardom SIST EN 16695:2015.

2.1 Oprema za analizo fitoplanktona

Za kvantitativno in kvalitativno analizo fitoplanktona je potrebna oprema iz spodnjega seznama.

1. Svetlobni mikroskop z oljno-imerzijskimi objektivi z visoko optično ločljivostjo pri visokih povečavah 1000x in več za kvalitativno analizo.
2. Pripomočki za merjenje (PC software –analiza slike).

3. Invertni mikroskop s faznim kontrastom z veliko delovno razdaljo in numerično aperturo (NA) > 0,5 za analizo kvantitativnega vzorca, z objektivni 10x in 12,5x in okularji 10x in 20x.
4. Standardna oprema za mikroskopiranje (objektna, krovna stekelca, čistilni pribor, pipete).
5. Standardizirane števne komore, z določenim volumnom.
6. Sedimentacijski stekleni valji (5–50 mL) za koncentriranje zelo redkih vzorcev.
7. Filtrirana, ultra čista voda za redčenje zelo gostih vzorcev.
8. Pripomočki za beleženje.
9. Ustrezna literatura za taksonomsko determinacijo fitoplanktona.

2.2 Kvalitativna analiza fitoplanktona

S kvalitativno analizo fitoplanktona se določi vrstna sestava fitoplanktona in oceni relativna pogostost posameznih vrst. Taksonomsko določanje poteka do nivoja vrste, pod svetlobnim mikroskopom s pomočjo ustreznih taksonomskih ključev. Na osnovi pregleda kvalitativnega vzorca se oblikuje seznam vrst, ki ga uporabimo tudi pri pregledu kvantitativnega vzorca. Vsaki najdeni vrsti se dodeli šifra iz šifrant, ki je del podatkovne baze EKO-VODE na ARSO.

Relativna pogostost posamezne vrste se določi s 5-stopenjsko lestvico v preglednici 2. Podatki relativne pogostosti niso direktno vključeni v izračun ekološkega stanja, so pa osnova za načrtovanje strategije štetja, oziroma pripravo podvzorcev fitoplanktona pri kvantitativni analizi. Na materialu iz kvalitativnega vzorca se opravi tudi potrebne meritve za določanje povprečnega celičnega volumna posamezne vrste.

Pregled svežega kvalitativnega vzorca se opravi najkasneje v roku 36 ur po zajemu, fiksirane vzorce pa je potrebno analizirati najkasneje 6 mesecev po vzorčenju.

Preglednica 2: Lestvica za oceno pogostosti fitoplanktona v kvalitativnem vzorcu

Ocena pogostosti vrste	Opis pogostosti
5	masovno prisotna vrsta
4	pogosta vrsta
3	zmerno prisotna vrsta
2	redka vrsta
1	posamična vrsta

2.2.1 Taksonomski pregled diatomej in določitev biovolumna posamezne vrste

Če diatomeje, zlasti iz skupine Centrales (ciklične diatomeje) presegajo 10 % skupne biomase fitoplanktona, je potrebna posebna obdelava vzorca po standardnem postopku SIST EN 14407:2014, za odstranjevanje organske snovi iz frustul, ki omogoči taksonomsko določanje do nivoja vrste.

Vzorec planktona (250–500 mL) za taksonomsko analizo diatomej filtriramo preko celulozno – acetatnega filtra (> 4 µm) že na terenu, ali pa uporabimo nekonzerviran kvalitativni vzorec, ki ga filtriramo v najkrajšem možnem času po zajemu, oziroma največ 36 ur po zajemu, sicer moramo uporabiti konzerviran vzorec. Diatomeje iz filtra v laboratoriju speremo z destilirano vodo in usedlino naneseemo na večje krovno stekelce, ki ga na vroči plošči ali v sežigalni peči segrevamo na 500 °C. Ohlajeno krovno stekelce položimo skupaj s fiksirnim sredstvom (npr. Naphrax) na objektno stekelce in ponovno razžarimo. Priprava vzorca za taksonomsko analizo diatomej se lahko izvede tudi s kemijsko oksidacijo ali s preparacijo s kislino (Nausch 1988, SIST EN 13946:2014, Krammer in Lange-Bertalot 1986). V prepariranem vzorcu se določi delež (%) posamezne vrste na najmanj 300 prešteti frustul in določi velikost posamezne vrste po shemi v preglednici 3. Te podatke se nato uporabi pri določitvi biovolumna posamezne vrste (primer 1). Pod invertnim mikroskopom se ciklične diatomeje vedno šteje in določa njihov biovolumen v okviru velikostnega razreda.

Preglednica 3: Primer analize diatomej

Velikostni razred	Vrsta	Število	Delež vrste v velikostnem razredu (%)
Centrales 4–6 µm	<i>Cyclotella pseudostelligera</i>	50	100
Centrales 8–10 µm	<i>Cyclotella ocellata</i>	30	75
	<i>Cyclotella pseudostelligera</i>	10	25
Centrales 20–35 µm	<i>Cyclotella ocellata</i>	80	38,1
	<i>Cyclotella radiosa</i>	130	61,9

Primer 1: Določitev biovolumna posamezne vrste

Določen je bil skupni biovolumen velikostnega razreda Centrales 20–35 µm: 0,2288 mm³*L⁻¹; glede na deleže posamezne vrste v preglednici 3 → *Cyclotella ocellata* 0,0872 mm³*L⁻¹ in *Cyclotella radiosa* 0,1416 mm³*L⁻¹.

2.3 Kvantitativna analiza fitoplanktona

Analiza vključuje:

- **ugotavljanje številčne prisotnosti posameznih vrst** (abundanca) v vzorcu po postopku Utermöhl 1958, oziroma standardu SIST EN 15204:2007 in SIST EN 14996:2006,
- **določitev skupnega biovolumna fitoplanktona** na osnovi številčnosti in povprečnih celičnih volumnov prisotnih vrst po standardu SIST EN 16695:2015.

Kvantitativna analiza fitoplanktona zahteva specifično pripravo in obdelavo vzorcev:

- prilagoditev – akomodacija vzorca na sobno temperaturo,
- homogenizacijo vzorca za enakomerno porazdelitev celic,
- pripravo podvzorca v sedimentacijski števni komori,
- štetje,
- merjenje posameznih celic alg in določanje celičnega volumna,
- izračun skupnega biovolumna fitoplanktona.

Številčnost posameznih vrst fitoplanktona, oziroma **štetje** se izvede skladno s standardom SIST EN 16695:2015 s pregledom treh podvzorcev s točno določenim volumnom pod invertnim mikroskopom. Izbor volumna podvzorca, oziroma tip števne komore je odvisen od količine prisotnega fitoplanktona v vzorcu. V primeru redkih vzorcev se vzorce koncentriira s pomočjo sedimentacijskih valjev z različnimi volumni, v primeru zelo gostih vzorcev iz evtrofnih jezer pa je potrebno redčenje vzorca. Štetje je optimalno pri gostoti števnih enot od 4–20 na vidno polje pri povečavi 400x do 800x.

Oseba, ki je odgovorna za kvantitativno analizo fitoplanktona se mora, zaradi potreb zagotavljanja kakovosti meritev, vsake 3 do 4 leta udeležiti testov za preverjanje strokovnosti (External Proficiency tests), pri čemer se poleg strokovnosti kadra preveri tudi kalibracija opreme, od volumna sedimentacijskih števnih komor, do površine vidnih polj pri različnih povečavah.

Strategija, oziroma način štetja se prav tako prilagodi velikosti in številčni prisotnosti posameznih vrst v vzorcu. Pred štetjem se določi tudi strategija štetja praznih celic, npr. praznih valv diatomej ali lorik pri rodu *Dynobryon*. Slednje se šteje le, če so prazne lorike posledica konzervacije vzorca. Šteje se tudi miksotrofne vrste, striktnih heterotrofov, kot je vrsta *Gymnodinium helveticum* pa ne. V zelo plitvih jezerih oziroma zadrževalnikih se šteje tudi litoralne in bentoške vrste kot sta *Surirella* in *Nostoc*, ki lahko predstavljajo znatni delež skupne biomase fitoplanktona. Picoplankton, ki tvori kolonije npr. *Aphanothece* in *Cyanodictyon* se šteje, enocelični pikoplankton (<2 µm) pa ne. Šteje se tudi heterociste in akinete cianobakterij (Cyanophyta), če so pogoste. Šteje se jih ločeno od vegetativnih celic in se pri določanju biovolumna upošteva tudi drugačne dimenzije teh celic. Vrste, za katere smo v dvomih glede taksonomske razvrstitve, lahko vključimo v seznam samo z rodovnim imenom.

Skupni biovolumen fitoplanktona je vsota biovolumnov posameznih vrst, ki so zastopane v vzorcu fitoplanktona. Biovolumen posamezne vrste se izračuna iz pogostosti posamezne vrste in povprečnega celičnega biovolumna vrste po standardu SIST EN 16695:2015. Določanje povprečnega volumna celice temelji na meritvah različnih dimenzij celice, in določitvi **povprečnega biovolumna celice** s predpisanimi formulami. Za izračun povprečnega biovolumna celice se uporabi srednjo vrednost (mediano) posameznih dimenzij najmanj 10-tih meritev. Meritve se opravi pri pregledu kvalitativnega vzorca. **Merjenje**, oziroma določanje celičnega biovolumna je bistveni del izračuna skupnega biovolumna fitoplanktona, saj nepravilne meritve, oziroma napačni celični biovolumni lahko povzročajo znatno napako pri določitvi povprečnega skupnega biovolumna fitoplanktona, ki je eden od parametrov za določanje ekološkega stanja jezer. Za vrste, katerih dimenzija se le malo spreminja, ponuja SIST EN 16695:2015 tudi uporabo preproste regresijske enačbe dolžina-volumen za korekcijo že določenih celičnih volumnov. Vrste, ki se jim dimenzije zelo spreminjajo (Centrales,

Dynophyta) pa je potrebno vsakokrat izmeriti in določiti njihov celični biovolumen. Pri celicah z zelo velikim zunanjim skeletom npr. *Rhizosolenia* se za določitev celičnega volumna uporabi dimenzije notranje organske plazme in ne zunanjega skeleta.

Pojmi za boljše razumevanje

- **Skupni biovolumen fitoplanktona** je vsota biovolumnov vseh prisotnih vrst v vzorcu.
- **Povprečni letni biovolumen fitoplanktona** je povprečni biovolumen vseh izvedenih vzorčenj v posameznem letu. Za vrednotenje ekološkega - trofičnega stanja jezer se uporablja povprečni letni biovolumen fitoplanktona treh zaporednih let. Izračuna se aritmetična sredina posameznih vrednosti. Povprečni biovolumen fitoplanktona se podaja v $\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ ali kot povprečna skupna biomasa fitoplanktona v mg L^{-1} .

Pretvorba enot:

$$10^9 \mu\text{m}^3 \text{L}^{-1} = 1 \text{mm}^3 \text{L}^{-1}$$

$$1 \text{mm}^3 \text{L}^{-1} = 1 \text{mg L}^{-1}$$

- **Relativni biovolumen posamezne vrste** je delež (%) biovolumna ki ga vrsta dosega v skupnem biovolumnu fitoplanktona.

2.3.1 Določanje vsebnosti klorofila-a

Vsebnost klorofila-a se določa po standardnih postopkih SIST ISO 10260:2001 spektrometrično ali z uporabo HPLC.

3 VREDNOTENJE EKOLOŠKEGA STANJA JEZER NA PODLAGI FITOPLANKTONA

Vodna direktiva (Direktiva 2000/60/EC), ki je zavezujoč dokument za države članice EU pri opredelitvi stanja površinskih voda zahteva poleg kemijskega tudi določanje ekološkega stanja. Vrednotenje ekološkega stanja mora biti izvedeno na podlagi odziva bioloških elementov-bioindikatorjev na razmere v vodah in predstavlja ugotavljanje spremenjenosti strukture in funkcije ekosistema v primerjavi z naravnimi – referenčnimi razmerami. Glede na stopnjo spremenjenosti se oceni stanje vodnega telesa v enega od pet razredov kakovosti ekološkega stanja (preglednica 4).

Preglednica 4: Razredi kakovosti ekološkega stanja

Razred kakovosti – ekološko stanje
Zelo dobro
Dobro
Zmerno
Slabo
Zelo slabo

Fitoplankton je v skladu z vodno direktivo (Direktiva 2000/60/ES) eden izmed obveznih bioloških elementov za vrednotenje ekološkega stanja jezer. Nova, dopolnjena **Metodologija vrednotenja ekološkega stanja jezer na podlagi fitoplanktona v Sloveniji**, je tako kot stara, nastala v procesu interkalibracije. Povzeta je po avstrijski nacionalni metodi (Wolfram in Dokulil 2007) in prilagojena na razmere v Sloveniji. Temelji na odzivu fitoplanktona na spremenjeno koncentracijo celotnega fosforja, oziroma spremenjene trofične razmere v vodnem telesu in omogoča razlikovanje petih razredov kakovosti. Uporablja se za vrednotenje produktivnosti jezer, oziroma ekološkega stanja jezer po **modulu trofičnost**. Stanje po modulu trofičnost se ovrednoti na podlagi **Multimetrijskega indeksa fitoplanktona**, ki ga sestavljajo naslednje metrike:

- povprečni letni skupni biovolumen fitoplanktona,
- povprečna letna koncentracija klorofila-*a* in
- indeks Brettum.

Povprečni letni skupni biovolumen fitoplanktona in povprečna letna koncentracija klorofila-*a* sta metriki za določanje količine fitoplanktona, indeks Brettum pa je metrika, ki opredeljuje spremembo vrstne sestave fitoplanktona.

3.1 Ekološki tipi jezer v Sloveniji in referenčne razmere

Pred vrednotenjem ekološkega stanja se vodna telesa jezer razvrsti v ustrezen ekološki tip. Za vsak posamezen ekološki tip jezer se določi referenčne razmere ter meje med kakovostnimi razredi, za vse uporabljene metrike v metodologiji. Izhodišče za vrednotenje ekološkega stanja, je referenčno stanje vodnega okolja, oziroma vrednosti, ki jih dosegajo izbrani parametri ali metrike vrednotenja stanja posameznih bioloških elementov v okolju, kjer ni vplivov človeka, oziroma je vpliv človeka zelo majhen (Wallin in sod. 2003).

V Sloveniji sta Blejsko in Bohinjsko jezero edini naravni alpski jezera s površino > 50 ha. Obe jezera pripadata istemu interkalibracijskemu tipu L-AL3, po nacionalni tipologiji pa različnima ekološkima tipoma (preglednica 5).

Preglednica 5: Ekološka tipa naravnih jezer v Sloveniji (Urbanič in sod. 2007)

Ekološki tip	Tip-koda	Ekoregija (Urbanič 2005)	Bioregija (Urbanič 2006)	Povprečna globina	Velikost površine
Globoka alpska jezera (Bohinjsko jezero)	J_SI_4_KB-D_>15_1-10	Alpe	Karbonatne Alpe donavskega porečja	> 15 m	1–10 km ²
Globoka predalpska jezera (Blejsko jezero)	J_SI_4_PA-D_>15_1-10	Alpe	Predalpska hribovja donavskega porečja	> 15 m	1–10 km ²

Referenčne vrednosti in meje med razredi ekološkega stanja za vse tri parametre, ki določajo stanje fitoplanktona, biovolumen fitoplanktona, koncentracijo klorofila-a in indeks Brettum, so bile za Blejsko in Bohinjsko jezero določene med procesom interkalibracije v okviru alpskega GIG-a (Wolfram in sod. 2009) in so podane v preglednici 6.

Preglednica 6: Referenčne vrednosti in meje ekoloških razredov za Blejsko in Bohinjsko jezero

Biovolumen fitoplanktona (mm³ L⁻¹)				
Meje razredov ekološkega stanja	Globoka alpska jezera	Globoka predalpska jezera	Razmerje ekološke kakovosti	
	Bohinjsko jezero	Blejsko jezero	REK	nREK
Ref.	0,20	0,30	1,00	1,00
ZD/D	0,33	0,50	0,60	0,80
D/Z	0,80	1,20	0,25	0,60
Z/S	2,00	3,10	0,10	0,40
S/ZS	5,30	7,50	0,04	0,20
Klorofil-a (µg L⁻¹)				
Ref.	1,50	1,90	1,00	1,00
ZD/D	2,14	2,71	0,70	0,80
D/Z	3,75	4,75	0,40	0,60
Z/S	6,82	8,64	0,22	0,40
S/ZS	12,50	15,83	0,12	0,20
Indeks Brettum				
Ref.	5,29	5,09	1,000	1,0
ZD/D	4,37	4,21	0,827	0,8
D/Z	3,46	3,33	0,654	0,6
Z/S	2,54	2,45	0,481	0,4
S/ZS	1,63	1,57	0,308	0,2

- Ref. Referenčne vrednosti
 ZD/D meja med zelo dobrim in dobrim stanjem
 D/Z meja med dobrim in zmernim stanjem
 Z/S meja med zmernim in slabim stanjem
 S/ZS meja med slabim in zelo slabim stanjem

3.2 Vrednotenje ekološkega stanja jezer na podlagi fitoplanktona - modul trofičnost

Koraki za pravilno vrednotenje ekološkega stanja po modulu trofičnost z uporabo Multimetrijskega indeksa fitoplanktona (MMI_FPL) v posameznih ekoloških tipih jezer so naslednji:

- a) določitev skupne količine fitoplanktona z izbranimi metrikami (biovolumen oz. BV in klorofil-*a*),
- b) izračun indeksa Brettum,
- c) normalizacija metrik oz. izračun razmerja ekološke kakovosti (REK),
- d) transformacija normaliziranih REK vrednosti posameznih metrik,
- e) izračun multimetrijskega indeksa fitoplanktona za posamezno leto,
- f) izračun razmerja ekološke kakovosti po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona in razvrstitev vodnega telesa jezer v razred ekološkega stanja po modulu trofičnost za izbrano 3-letno obdobje.

3.2.1 Določitev skupne količine fitoplanktona z izbranimi metrikami

Osnovni metriki, oziroma parametra za oceno količine fitoplanktona sta **povprečni letni skupni biovolumen fitoplanktona** in **povprečna vsebnost klorofila-*a***. Postopki določanja biovolumna fitoplanktona in klorofila-*a* so opisani v poglavju 2.3.

Povprečni biovolumen fitoplanktona in klorofila-*a* predstavlja povprečje (aritmetična sredina) najmanj štirih vzorčenj fitoplanktona, oziroma klorofila-*a* v posameznem letu.

3.2.2 Izračun indeksa Brettum

Osnova za izračun indeksa Brettum, ki je metrika za vrednotenje odziva vrst na spremembo trofičnosti vodnega telesa, je seznam indikatorskih vrst fitoplanktona z določenimi trofičnimi vrednostmi v šestih trofičnih razredih (preglednica 7). Gre za vrstno specifične trofične vrednosti v trofičnih razredih od 1 do 6 z določenim območjem koncentracije celotnega fosforja (TP $\mu\text{g L}^{-1}$) in pogostosti pojavljanja posamezne vrste (specifični biovolumen vrste) v vseh šestih trofičnih razredih.

Zadnja dopolnitev in razširitev seznama indikatorskih vrst za alpska jezera (preglednica 7) je potekala v okviru drugega kroga procesa interkalibracije v alpskem GIG-u za jezera (2008 - 2012). Zaradi spremenjenih izhodišč, oziroma referenčnih razmer in mej med razredi ekološkega stanja, ki so bile v tem procesu določene, so se spremenile tudi indikatorske vrednosti za vrste, ki so že bile v seznamu pred temi spremembami.

Preglednica 7: Vrstno specifične indikatorske vrednosti (x_{ij}) fitoplanktonskih vrst in rodov v določenih trofičnih razredih za vse ekološke tipe jezer z alpskim vplivom

Koda	Vrsta	Trofični razredi z različno koncentracijo celotnega fosforja (TP $\mu\text{g L}^{-1}$)					
A. Razvrstitev vrst po naraščajoči trofičnosti		< 5	5–8	8–15	15–30	30–60	> 60
R0040	<i>Cyclotella bodanica</i>	7	3				
R2195	<i>Cyclotella cyclopuncta</i>	7	3				
R2196	<i>Cyclotella distinguenda</i>	8	1	1			
R0733	<i>Pseudoquadrigula</i> sp.	8	1	1			
R0042	<i>Cyclotella comensis</i>	7	2	1			
R1070	<i>Dinobryon cylindricum</i>	7	2	1			
R2058	<i>Discostella glo merata</i>	6	3	1			
R1903	<i>Peridinium umbonatum</i> - complex	7	2		1		
R1166	<i>Chrysolynos planctonicus</i>	5	4	1			
R1446	<i>Chroococcus turgidus</i>	5	3	2			
R1167	<i>Chrysolynos skujae</i>	2	8				
R1155	<i>Bitrichia chodatii</i>	4	4	2			
R0493	<i>Botryococcus braunii</i>	5	2	2	1		
R1037	<i>Kephyrion</i> sp.	6	1	1	1	1	
R0191	<i>Diatoma vulgaris</i>	5	2	1	1	1	
R1697	<i>Peridinium pusillum</i>		9	1			
R1066	<i>Dinobryon bavaricum</i>	3	3	2	2		
R1438	<i>Chroococcus limneticus</i>	4	2	2	1	1	
R1660	<i>Gymnodinium uberrimum</i>	1	6	2	1		
R0442	<i>Tabellaria flocculosa</i>	1	4	5			
R2174	<i>Ulnaria delicatissima</i> var. <i>angustissima</i>	2	3	3	2		
R1654	<i>Gymnodinium</i> sp.	1	5	2	1	1	
R1691	<i>Peridinium inconspicuum</i>	1	4	3	2		
R1069	<i>Dinobryon crenulatum</i>	2	2	3	2	1	
R1443	<i>Chroococcus minutus</i>	1	3	4	1	1	
R0033	<i>Aulacoseira subarctica</i>		1	8	1		
R1209	<i>Cosmarium depressum</i>	2	2	3	1	1	1
R1704	<i>Peridinium willei</i>	1	4	2	1	1	1
R0440	<i>Tabellaria fenestrata</i>	1	1	4	4		
R1642	<i>Glenodinium</i> sp.		2	5	3		
R1151	<i>Uroglena</i> sp.		3	3	3	1	
R0606	<i>Coenococcus planctonicus</i>		1	5	4		
R1413	<i>Aphanocapsa delicatissima</i>		3	3	2	2	
R1617	<i>Planktothrix rubescens</i>	1	1	3	4	1	
R0582	<i>Didymocystis</i> sp.		1	4	4	1	
R1510	<i>Snowella lacustris</i>		1	4	4	1	
R1549	<i>Anabaena spiroides</i>		1	6	1	1	1
R1282	<i>Staurastrum chaetoceras</i>			3	7		
R2549	<i>Urosolenia longiseta</i>		1	3	3	3	
R2556	<i>Crucigeniella irregularis</i>			4	4	2	
R0025	<i>Aulacoseira islandica</i>		1	3	3	2	1
R0083	<i>Stephanodiscus neoastreae</i>		1	2	4	3	
R0533	<i>Coenochloris fottii</i>		1	3	3	2	1
R1074	<i>Dinobryon divergens varschauinslandii</i>			1	9		
R2503	<i>Achnanthydium catenatum</i>			1	8	1	
R1081	<i>Dinobryon sertularia</i>		1	1	5	3	
R1096	<i>Mallomonas acaroides</i>		1	2	4	2	1
R1342	<i>Sphaerosozma</i> sp.			1	8	1	
R1687	<i>Peridinium cinctum</i>		1	2	4	2	1
R0649	<i>Lagerheimia genevensis</i>			3	3	4	
R1303	<i>Staurastrum pingue</i>			2	5	3	
R1375	<i>Chroomonas</i> sp.		1	2	2	5	

Koda	Vrsta	Trofični razredi z različno koncentracijo celotnega fosforja (TP µg L ⁻¹)					
		< 5	5-8	8-15	15-30	30-60	> 60
A. Razvrstitev vrst po naraščajoči trofičnosti							
R0048	<i>Cyclotella ocellata</i>		1	1	4	3	1
R0848	<i>Tetraedron minimum</i>		1	1	4	3	1
R0736	<i>Pseudosphaerocystis lacustris</i>			2	5	2	1
R1414	<i>Aphanocapsa elachista</i>	1		2	2	4	1
R0571	<i>Dictyosphaerium pulchellum</i>			1	5	4	
R1097	<i>Mallomonas akrokomos</i>			2	4	3	1
R2169	<i>Staurisira construens</i>			2	2	6	
R1100	<i>Mallomonas caudata</i>			1	4	5	
R1427	<i>Aphanothece clathrata</i>			1	4	5	
R1776	<i>Trachelomonas volvocina</i>			1	4	5	
R2520	<i>Fragilaria capucina</i> ssp. <i>rumpens</i>			2	3	3	2
R0555	<i>Crucigeniella rectangularis</i>			1	5	2	2
R0690	<i>Nephrocytium agardhianum</i>				5	5	
R0782	<i>Scenedesmus ellipticus</i>			1	5	2	2
R0935	<i>Chlamydomonas globosa</i>			1	3	6	
R0051	<i>Cyclotella radiosa</i>			1	3	5	1
R0682	<i>Monoraphidium</i> sp.			1	2	7	
R0971	<i>Pandorina morum</i>			2	2	4	2
R1377	<i>Cryptomonas curvata</i>			1	3	5	1
R1536	<i>Anabaena flos-aquae</i>	1		1	2	3	3
R1620	<i>Pseudanabaena catenata</i>	1		1	2	3	3
R1205	<i>Cosmarium bioculatum</i>			1	1	8	
R1506	<i>Rhabdogloea</i> sp.			1	1	8	
R0490	<i>Ankyra lanceolata</i>			1	3	4	2
R0762	<i>Scenedesmus armatus</i>			1	3	4	2
R0975	<i>Phacotus lenticularis</i>			1	3	4	2
R1818	<i>Chrysochromulina parva</i>			1	3	4	2
R1004	<i>Mougeotia thylespora</i>				3	7	
R0184	<i>Diatoma ehrenbergii</i>				3	7	
R1141	<i>Synura</i> sp.			1	3	3	3
R0697	<i>Oocystis lacustris</i>			1	2	5	2
R0743	<i>Quadrigula lacustris</i>			1	1	7	1
R1288	<i>Staurastrum gracile</i>				3	6	1
R1487	<i>Microcystis flos-aquae</i>	1		1	1	3	4
R0701	<i>Oocystis parva</i>			1	1	6	2
R0760	<i>Scenedesmus obtusus</i>				1	9	
R0966	<i>Gonium pectorale</i>				1	9	
R0996	<i>Tetraselmis cordiformis</i>				2	7	1
R0998	<i>Volvox aureus</i>				1	9	
R1181	<i>Closterium acutum</i> var. <i>variabile</i>				2	7	1
R1300	<i>Staurastrum paradoxum</i>				2	7	1
R1519	<i>Synechocystis aquatilis</i>				2	7	1
R1560	<i>Aphanizomenon gracile</i>			1	2	4	3
R1613	<i>Planktothrix agardhii</i>			1	3	2	4
R0082	<i>Stephanodiscus minutulus</i>				3	4	3
R0489	<i>Ankyra judayi</i>				1	8	1
R0633	<i>Kirchneriella</i> sp.				2	6	2
R0654	<i>Lagerheimia subsalsa</i>				1	8	1
R0923	<i>Carteria</i> sp.			1	1	5	3
R1095	<i>Erkenia subaequiciliata</i>			1	2	3	4
R1386	<i>Cryptomonas ovata</i>			1	2	3	4
R1199	<i>Closterium pronum</i>				1	8	1
R1283	<i>Staurastrum cingulum</i>				1	8	1
R1621	<i>Pseudanabaena limnetica</i>				3	4	3
R0189	<i>Diatoma tenue</i>			1	1	4	4
R0529	<i>Coelastrum pseudomicroporum</i>				1	7	2

Koda	Vrsta	Trofični razredi z različno koncentracijo celotnega fosforja (TP $\mu\text{g L}^{-1}$)					
		< 5	5–8	8–15	15–30	30–60	> 60
A. Razvrstitev vrst po naraščajoči trofičnosti							
R0530	<i>Coelastrum reticulatum</i>			1	2	2	5
R1726	<i>Euglena</i> sp.			1	2	2	5
R0993	<i>Sphaerocystis schroeteri</i>				2	5	3
R1191	<i>Closterium limneticum</i>				1	7	2
R1525	<i>Woronichinia naegeliana</i>				3	3	4
R0891	<i>Gloeocystis</i> sp.				1	6	3
R0660	<i>Micractinium pusillum</i>				1	6	3
R0820	<i>Schroederia setigera</i>				1	6	3
R1482	<i>Microcystis aeruginosa</i>			1	1	3	5
R0016	<i>Acanthoceras zachariasii</i>				2	3	5
R0024	<i>Aulacoseira granulata</i> var. <i>angustissima</i>				2	3	5
R0343	<i>Nitzschia acicularis</i>			1	1	2	6
R0527	<i>Coelastrum microporum</i>			1	1	2	6
R1178	<i>Closterium acutum</i>			1	1	2	6
R0704	<i>Oocystis solitaria</i>				2	3	5
R1003	<i>Mougeotia</i> sp.				1	5	4
R0806	<i>Scenedesmus quadricauda</i>				1	4	5
R0940	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>				1	4	5
R0047	<i>Cyclotella meneghiniana</i>				1	4	5
R0963	<i>Eudorina elegans</i>				2	2	6
R1176	<i>Closterium aciculare</i>					6	4
R1311	<i>Staurastrum tetracerum</i>					6	4
R1153	<i>Pseudopedinella erkensis</i>				2	2	6
R0023	<i>Aulacoseira granulata</i>				1	3	6
R0506	<i>Chlorococcum</i> sp.					5	5
R0698	<i>Oocystis marssonii</i>				1	3	6
R1518	<i>Synechococcus</i> sp.					5	5
R1558	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>				1	3	6
R0713	<i>Pediastrum boryanum</i>					4	6
R0722	<i>Pediastrum simplex</i>				1	2	7
R0725	<i>Pediastrum tetras</i>				1	2	7
R0754	<i>Scenedesmus acuminatus</i>					4	6
R1499	<i>Microcystis wesenbergii</i>				1	2	7
R1582	<i>Limnithrix redekei</i>				1	2	7
R0488	<i>Ankyra ancora</i>				1	1	8
R0523	<i>Coelastrum astroideum</i>					3	7
R0616	<i>Golenkinia radiata</i>				1	1	8
R0716	<i>Pediastrum duplex</i>					3	7
R0777	<i>Scenedesmus dimorphus</i>				1	1	8
R1531	<i>Anabaena circinalis</i>				1	1	8
R1544	<i>Anabaena planctonica</i>					3	7
R1748	<i>Phacus longicauda</i>				1	1	8
R0078	<i>Stephanodiscus binderanus</i>					2	8
R0079	<i>Stephanodiscus hantzschii</i>					2	8
R0484	<i>Ankistrodesmus</i> sp.					2	8
R0781	<i>Scenedesmus ecomis</i>					2	8
R0999	<i>Volvox globator</i>					2	8
R1622	<i>Pseudanabaena mucicola</i>					2	8
R0503	<i>Chlorella</i> sp.					2	8
R0020	<i>Aulacoseira ambigua</i>					1	9
R0500	<i>Characium</i> sp.					1	9
R1610	<i>Planktolyngbya limnetica</i>					1	9
R0028	<i>Aulacoseira italica</i>						10
R0930	<i>Chlamydocapsa planctonica</i>						10

Pred izračunom Brettum indeksa je potrebno določiti skupni biovolumen fitoplanktona in relativni biovolumen posamezne indikatorske vrste v vzorcu. Natančni postopki za določitev skupnega biovolumna fitoplanktona so opisani v poglavju 2.3.

V prvem koraku izračuna indeksa Brettum za posamezni vzorec se indikatorska vrednost posamezne indikatorske vrste i v vsakem od trofičnih razredov j (X_{ij}) pomnoži z relativnim biovolumnom vrste (V_i) (preglednica 7, enačba 1). Za vsak posamezni trofični razred j dobimo indeks I_j .

Enačba 1: Izračun skupnega indeksa trofičnih razredov (I_j)

$$I_j = \frac{\sum_{i=1}^n V_i * X_{ij}}{\sum_{i=1}^n V_i}$$

Kjer je:

X_{ij} – specifična indikatorska vrednost taksona i v trofičnem razredu j

V_i – relativni biovolumen taksona i

I_j – skupni indeks trofičnega razreda j

Iz šestih indeksov I_j posameznega trofičnega razreda se v naslednjem koraku izračuna indeks Brettum (enačba 2). V izračunu se prvi trofični razred obteži z utežjo $T=6$, šesti trofični razred pa z utežjo $T=1$. Obteženo povprečje predstavlja končni indeks Brettum. Z gradientom trofičnosti vrednost indeksa Brettum narašča.

Enačba 2: Izračun indeksa Brettum

$$BI = \frac{\sum_{j=1}^6 I_j * T_j}{\sum_{j=1}^6 I_j}$$

Kjer je:

BI – vrednost indeksa Brettum

T_j – utež trofičnega razreda j

I_j – vrednost skupnega indeksa trofičnega razreda j

3.2.3 Izračun razmerja ekološke kakovosti (REK) za posamezne metrike

Vsako vrednotenje ekološkega stanja vodnega telesa, ki je v skladu z Vodno direktivo (Direktiva 2000/60/ES), mora v končni oceni opredeliti odstopanje od referenčnih razmer. Za prikaz tega odstopanja se uvede razmerje ekološke kakovosti ali REK vrednosti, kar se doseže z normalizacijo vrednosti posameznih parametrov, oziroma metrik.

Normalizacijo povprečnega letnega skupnega biovolumna fitoplanktona in povprečne letne vsebnosti klorofila-*a* se izvede tako, da se referenčno vrednost metrike deli z izračunano oziroma izmerjeno vrednostjo metrike (enačbi 3 in 4).

Enačba 3: Normalizacija parametra povprečni skupni biovolumen fitoplanktona

$$\mathbf{REK_BV} = \frac{\mathbf{BV_ref}}{\mathbf{BV_vzorca}}$$

Kjer je:

REK_BV – razmerje ekološke kakovosti za skupni biovolumen fitoplanktona

BV_ref – referenčna vrednost za skupni biovolumen fitoplanktona

BV_vzorca – skupni biovolumen fitoplanktona v vzorcu

Enačba 4: Normalizacija metrike klorofil-*a*

$$\mathbf{REK_Chla} = \frac{\mathbf{Chla_ref}}{\mathbf{Chla_vzorca}}$$

Kjer je:

REK_Chla – razmerje ekološke kakovosti za povprečno vsebnost klorofila-*a*

Chla_ref – referenčna vrednost za povprečno vsebnost klorofila-*a*

Chla_vzorca – določena povprečna vsebnost klorofila-*a* v vzorcu

Normalizacijo izračunane vrednosti za indeks Brettum (BI) se izvede tako, da se izračunana vrednost indeksa Brettum deli z referenčno vrednostjo indeksa Brettum (enačba 5).

Enačba 5: Normalizacija metrike indeksa Brettum

$$\mathbf{REK_BI} = \frac{\mathbf{BI_vzorca}}{\mathbf{BI_ref}}$$

Kjer je:

REK_BI – razmerje ekološke kakovosti metrike indeks Brettum

BI_ref – referenčna vrednost metrike indeks Brettum

BI_vzorca – izračunana vrednost indeksa Brettum v vzorcu

3.2.4 Transformacija normaliziranih rek vrednosti posameznih metrik

Za doseganje enakomerne oddaljenosti razredov ekološkega stanja, ki omogoča direkten izračun ekološkega stanja iz normaliziranih REK vrednosti, je potrebna nadaljnja transformacija REK vrednosti za vse parametre, oziroma metrike.

Transformacija REK_i vrednosti v normalizirane nREK_i vrednosti za vsak posamezen razred kakovosti se opravi z uporabo algoritma v preglednici 8.

Preglednica 8: Algoritem za pretvorbo transformiranih (REK_i) v normalizirane REK vrednosti (nREK_i)

REK _i	nREK _i
≥ 1	1
≥ REK ZD/D	(REK _i – REK ZD/D) / (1 – REK ZD/D) * 0,2 + 0,8
REK ZD/D > REK _i ≥ REK D/Z	(REK _i – REK D/Z) / (REK ZD/D – REK D/Z) * 0,2 + 0,6
REK D/Z > REK _i ≥ REK Z/S	(REK _i – REK Z/S) / (REK D/Z – REK Z/S) * 0,2 + 0,4
REK Z/S > REK _i ≥ REK S/ZS	(REK _i – REK S/ZS) / (REK Z/S – REK S/ZS) * 0,2 + 0,2
< REK S/ZS	REK _i / REK S/ZS * 0,2

ZD/D meja med zelo dobrim in dobrim ekološkim stanjem

D/Z meja med dobrim in zmernim stanjem

Z/S meja med zmernim in slabim stanjem

S/ZS meja med slabim in zelo slabim stanjem

3.2.5 Izračun multimetrijskega indeksa fitoplanktona

Multimetrijski indeks fitoplanktona (MMI_FPL) je sestavljena metrika iz normaliziranih in transformiranih REK vrednosti osnovnih metrik za oceno stanja fitoplanktona, povprečne letne vrednosti skupnega biovolumna, povprečne letne vsebnosti klorofil-*a*, in indeksa Brettum. Obe metriki za količino fitoplanktona imata skupaj enako težo kot indeks Brettum, ki je metrika za vrednotenje kvalitete oz. vrstne sestave fitoplanktona (enačba 6).

Enačba 6: Izračun multimetrijskega indeksa fitoplanktona za vrednotenje ekološkega stanja jezer v posameznem letu

$$\text{MMI_FPL}_i = \frac{(\text{nREK_BV}_i + \text{nREK_Chla}_i) / 2 + \text{nREK_BI}_i}{2}$$

Kjer je:

MMI_FPL_i – vrednost multimetrijskega indeksa fitoplanktona v i-tem letu

nREK_BV_i – normalizirana REK vrednost za povprečni letni skupni biovolumen fitoplanktona v i-tem letu

nREK_Chla_i – normalizirana REK vrednost za povprečno letno vsebnost klorofila-*a* v i-tem letu

nREK_BI_i – normalizirana REK vrednost indeksa Brettum v i-tem letu

Za izračun multimetrijskega indeksa fitoplanktona (MMI_FPL) v posameznem letu so potrebna minimalno 4 vzorčenja fitoplanktona v različnih limnoloških obdobjih. Le tako določen indeks omogoča izračun vrednosti modula trofičnosti na podlagi fitoplanktona.

3.2.6 Izračun razmerja ekološke kakovosti po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona za posamezno leto

Vrednost razmerja ekološke kakovosti (REK) po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona za vodno telo jezera v posameznem letu je enaka vrednosti multimetrijskega indeksa fitoplanktona za posamezno leto (enačba 7).

Enačba 7: Izračun vrednosti REK po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona za posamezno leto

$$\text{MMI_FPL}_i = \text{J_FPL}_{\text{Tri}}$$

Kjer je:

MMI_FPL_i – vrednost multimetrijskega indeksa fitoplanktona v i-tem letu

J_FPL_{Tri} – razmerje ekološke kakovosti po modulu trofičnost v i-tem letu na podlagi fitoplanktona

Metodologija vrednotenja ekološkega stanja jezer na podlagi fitoplanktona zahteva najmanj 3-letno zaporedno spremljanje stanja fitoplanktona, zato se razvrstitev vodnega telesa v razred ekološkega stanja po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona v posameznem letu nikoli ne uporablja kot končno razvrstitev.

3.2.7 Izračun razmerja ekološke kakovosti po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona za izbrano obdobje

Metodologija vrednotenja ekološkega stanja jezer na podlagi fitoplanktona zahteva za uvrstitev vodnega telesa v razred ekološkega stanja **najmanj triletni zaporedni niz opazovanj fitoplanktona**. Razmerje ekološke kakovosti po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona se zato izračuna najmanj za obdobje treh zaporednih let po enačbi 8.

Enačba 8: Izračun razmerja ekološke kakovosti po modulu trofičnost

$$\text{J_FPL}_{\text{Tr } l} = \frac{\sum_{j=1}^m \text{J_FPL}_i}{m}$$

Kjer je:

J_FPL_{Tr l} – razmerje ekološke kakovosti po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona v l-tem izbranem obdobju

J_FPL_i – razmerje ekološke kakovosti po modulu trofičnost v i-tem letu

m – število opazovanih let (m ≥ 3)

3.2.8 Razvrstitev vodnega telesa v razred ekološkega stanja po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona

Vodno telo se razvrsti v razred ekološkega stanja po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona tako, da se razmerje ekološke kakovosti po modulu trofičnost izračunano za izbrano obdobje razvrsti v razred kakovosti glede na preglednico 9.

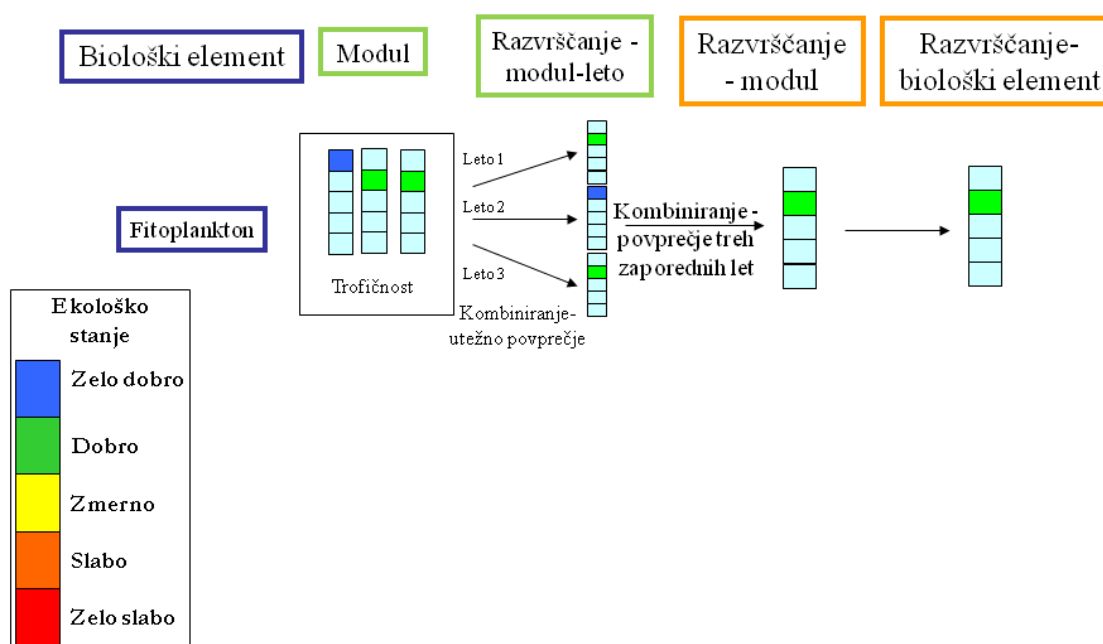
Preglednica 9: Mejne vrednosti razredov kakovosti ekološkega stanja po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona

Razmerje ekološke kakovosti* - razpon	Razred kakovosti – ekološko stanje
$\geq 0,80$	zelo dobro
0,60 - 0,80	dobro
0,40 - 0,60	zmerno
0,20 - 0,40	slabo
$> 0,20$	zelo slabo

* rezultate se zaokroži na dve decimalni mesti.

3.3 Vrednotenje ekološkega stanja jezer in razvrščanje vodnih teles jezer v razrede ekološkega stanja na podlagi biološkega elementa fitoplankton

Vrednotenje ekološkega stanja in razvrščanje vodnih teles jezer v razrede ekološkega stanja na podlagi fitoplanktona se izvede na podlagi modula trofičnost (slika 1).



Slika 1: Shematski prikaz razvrščanja vodnih teles jezer v razrede ekološkega stanja na podlagi biološkega elementa fitoplankton

4 VIRI

Direktiva 2000/60/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 23. oktobra 2000 o določitvi okvira za ukrepe Skupnosti na področju vodne politike. Bruselj, 72 str.

http://www.lebensministerium.at/wasser/wasseroesterreich/plan_gewaesser_ngp/nationaler_gewaesserbewirtschaftungsplan-nlp/bio_lf.html Georg WOLFRAM, Martin T. DOKULIL 2009.

Hutchinson G. E. (1957). A Treatise on Limnology. Volume 1,2,3. John Wiley & Sons, Inc. New York, London.

SIST ISO 5667-4:1996. Kakovost vode - Vzorčenje - 4. del: Navodilo za vzorčenje naravnih in umetnih jezer.

SIST EN ISO 7027:2000. Kakovost vode - Ugotavljanje motnosti (ISO 7027:1999).

SIST ISO 10260:2001. Kakovost vode - Merjenje biokemijskih parametrov - Spektrometrično določevanje koncentracije klorofila-*a*.

SIST EN 14996:2006. Kakovost vode - Navodilo za zagotavljanje kakovosti biološkega in ekološkega ocenjevanja v vodnem okolju.

SIST EN 15204:2007. Kakovost vode - Smerni standard za štetje fitoplanktona z invertno mikroskopijo (postopek po Utermöhl).

SIST EN ISO 5667-3:2013. Kakovost vode - Vzorčenje - 3. del: Shranjevanje in ravnanje z vzorci vode (ISO 5667-3:2012).

SIST EN 14407:2014. Kakovost vode - Navodilo za identifikacijo in štetje vzorcev bentoških kremenastih alg rek in jezer.

SIST EN 13946:2014. Kakovost vode - Navodilo za rutinsko vzorčenje in pripravo vzorcev bentoških kremenastih alg rek in jezer.

SIST EN 16695:2015. Kakovost vode - Navodilo za ocenjevanje biovolumna mikroalg.

SIST EN 16698:2016. Kakovost vode - Navodilo za kvantitativno in kvalitativno vzorčenje fitoplanktona v celinskih vodah.

Urbanič G., Remec-Rekar Š., Kosi G. (2008). Klasifikacija ekološkega stanja jezer z biološkimi elementi v skladu z Vodno direktivo (Direktiva 2000/60/ES). Eko-voda, Zgornja Ščavnica, 31 str.

Urbanič, G., Remec-Rekar, Š., Kosi, G., Germ, M., M. Bricelj & Podgornik S. (2007). Typology of lakes in Slovenia. *Natura Sloveniae* 91: 5-13.

Utermöhl H. (1958). Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. int. Ver. theor. angew. Limnol.* 9: 1–38.

Wallin M., Wiederholm T., Johnson K. R. (2003). Guidance on establishing reference condition and ecological status class boundaries for inland surface waters, version 7.0. CIS Working Group 2.3 – REFCOND, 93 str.

Wolfram G., Argillier C., de Bortoli J., Buzzi F., Dalmiglio A., Dokulil M. T., Hoehn E., Marchetto A., Martinez P.-J., Morabito G., Reichmann M., Remec-Rekar Š., Riedmüller U., Rioury C.,

Schaumburg J., Schulz L. & Urbanič G. (2009). Reference conditions and WFD compliant class boundaries for phytoplankton biomass and chlorophyll-a in Alpine lakes. *Hydrobiologia* 633: 45–58.

Wolfram G., Donabaum K., Dokulil M. (2012). Leitfaden zur Erhebung der Biologischen Qualitätselemente. Teil B2 – Phytoplankton.