



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA OKOLJE IN PROSTOR

Dunajska cesta 48, 1000 Ljubljana

METODOLOGIJA VREDNOTENJA EKOLOŠKEGA STANJA OBALNEGA MORJA NA PODLAGI FITOPLANKTONA



Irena Majcen

MINISTRICA



Ljubljana, maj 2016

KAZALO VSEBINE

1	VZORČENJE FITOPLANKTONA OBALNEGA MORJA	4
1.1	Frekvenca in čas vzorčenja	4
1.2	Izbira mesta vzorčenja.....	4
1.3	Vzorčenje vode in določitev globin vzorčenja	4
2	LABORATORIJSKA OBDELAVA VZORCEV FITOPLANKTONA	6
2.1	Priprava vzorcev v laboratoriju in shranjevanje vzorcev fitoplanktona	6
2.2	Zapis in hranjenje vzorcev	6
2.3	Določanje abundance in vrstne sestave fitoplanktona	7
2.3.1	SESTAVA FITOPLANKTONA IN PRIPOROČENI VIRI	7
2.3.2	KVANTITATIVNA ANALIZA FITOPLANKTONA	9
2.4	Merjenje klorofila <i>a</i> in razgradnih produktov v fitoplanktonu.....	10
3	VREDNOTENJE EKOLOŠKEGA STANJA OBALNEGA MORJA NA PODLAGI FITOPLANKTONA	12
3.1	Vrednotenje ekološkega stanja obalnega morja na podlagi fitoplanktona - modul trofičnost	13
3.1.1	IZRAČUN METRIKE BIOMASE FITOPLANKTONA: LETNA GEOMETRIČNA SREDINA KONCENTRACIJ KLOROFILA A	13
3.1.2	NORMALIZACIJA IN TRANSFORMACIJA METRIKE BIOMASA FITOPLANKTONA.....	14
3.1.3	UVRSTITEV MESTA VZORČENJA V RAZRED EKOLOŠKEGA STANJA PO MODULU TROFIČNOST	15
3.1.4	IZRAČUN VREDNOSTI RAZMERJA EKOLOŠKE KAKOVOSTI PO MODULU TROFIČNOST NA PODLAGI FITOPLANKTONA IN UVRSTITEV VODNEGA TELESA OBALNEGA MORJA V RAZRED EKOLOŠKEGA STANJA PO MODULU TROFIČNOST ZA IZBRANO OBDOBJE.....	16
3.2	Vrednotenje ekološkega stanja in razvrščanje vodnih teles obalnega morja v razrede ekološkega stanja na podlagi biološkega elementa fitoplankton	17
4	VIRI	18
5	STANDARDI.....	18

SLOVAR UPORABLJENIH IZRAZOV

metrika oz. indeks - merljiv del ali proces biološkega sistema, ki se spreminja z velikostjo obremenitve

modul – predstavlja vrsto obremenitve, katere vpliv na združbe vodnih organizmov (biološke elemente kakovosti) se vrednoti z izbranimi metrikami oziroma indeksi

normalizacija metrik – izračun razmerja ekološke kakovosti za posamezno metriko oz. indeks

razmerje ekološke kakovosti – razmerje med ugotovljeno vrednostjo metrike oz. indeksa na izbranem mestu vzorčenja in referenčno vrednostjo metrike oz. indeksa ob upoštevanju spodnje meje

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

spodnja meja – vrednost biološke metrike oz. indeksa v zelo spremenjenih razmerah

transformacija metrik – transformacija vrednosti razmerja ekološke kakovosti (REK) metrike oz. indeksa; izbor transformacijske enačbe je odvisen od vrednosti REK

STANDARDI

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

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

SIST EN 15972:2012 Kakovost vode - Navodilo za kvantitativne in kvalitativne preiskave morskoga fitoplanktona

1 VZORČENJE FITOPLANKTONA OBALNEGA MORJA

1.1 Frekvenca in čas vzorčenja

Vzorčenje fitoplanktona (biomasa, abundanca in sestava) se izvaja enkrat mesečno.

1.2 Izbira mesta vzorčenja

Mesto vzorčenja mora biti reprezentativno za celotno vodno telo oziroma območje, ki ga želimo raziskati. Odraža naj naravne razmere, ki so za vodno telo značilne (npr. bližina rečnih vnosov, izpostavljenost odprtemu morju,...) in/ali značilne antropogene obremenitve (npr. bližina gojišč morskih organizmov, pristanišča, podvodnih izpustov). Mesto vzorčenja naj bo od obale oddaljeno vsaj 500 m.

Če v vodnem telesu že obstaja mesto vzorčenja, kjer je predhodno potekal ali poteka monitoring fitoplanktona ali splošnih fizikalno-kemijskih elementov, je priporočljivo vzorčiti na istem mestu. Tak primer je mreža mest vzorčenja nacionalnega monitoringa za spremljanje kemijskega in ekološkega stanja morja.

1.3 Vzorčenje vode in določitev globin vzorčenja

Vzorke morske vode za fitoplankton (in podporne fizikalno-kemijske elemente) se vzorči z vzorčevalnimi posodami znane prostornine na posameznih globinah vodnega stolpa. Priporočljiva je uporaba standardnega oceanografskega vzorčevalnika – rozete, ki ima na svojem ogrodju vpeto določeno število Niskinovih posod (npr. 12 5-litrskih posod). V računalnik, ki je povezan z rozeto, se vnese globino vzorčenja, poseben mehanizem pa sproži zapiranje vzorčevalnih posod na izbranih globinah. Tako je omogočeno sočasno, oz. z nekaj sekundnim zamikom, zajemanje vzorcev na različnih globinah vodnega stolpa ob enkratnem vertikalnem spustu rozete. Iz vsake vzorčevalne posode se vodo razdeli v ustrezno embalažo za nadaljnje analize parametrov morske vode. Podvzorke za analize klorofila *a* (500 mL) hranimo na temnem in hladnem mestu (ladijski hladilnik, hladilna torba) do prihoda v laboratorij. Podvzorke za mikroskopske analize fitoplanktona (2,5 L) hranimo v temi do prihoda v laboratorij.

Določitev globin vzorčenja:

- Biomasa fitoplanktona, koncentracija klorofila *a* (Chl *a*): veljavna metoda za vrednotenje ekološkega stanja po fitoplanktonu sloni na podatkih o površinskih koncentracijah klorofila *a* (globina: 0 m), vzorčijo pa se tudi dodatne globine kot podporni podatek za fitoplanktonsko sestavo: 10 m in dno.
- Abundanca in sestava fitoplanktona: globine vzorčenja 0 m, 10 m, dno.

Opozorilo:

Delo na ladji, v vodi ali ob vodi je lahko nevarno. Upoštevati je treba vremenske okoliščine in stanje morja ter ravnati temu primerno.

Osebe, udeležene pri izvedbi del opisanih v tem dokumentu, morajo obvladati splošna pravila varnega dela na terenu in v laboratoriju.

2 LABORATORIJSKA OBDELAVA VZORCEV FITOPLANKTONA

2.1 Priprava vzorcev v laboratoriju in shranjevanje vzorcev fitoplanktona

Za kvantitativno analizo fitoplanktona se iz vzorčevalne plastenke (2,5 L) odlije podvzorec v temno steklenico z zamaškom na navoj (500 ali 1000 mL), v kateri je fiksativ. Vzorce fitoplanktona fiksiramo z nasičeno raztopino formalina. Formalin nevtraliziramo z dodatkom približno 20 g heksametilentetramina. Raztopino temeljito premešamo, da se dodana snov popolnoma raztopi (po potrebi se uporabi ultrazvočna kopel, ki pospeši razbitje delcev) in izmerimo pH, ki mora biti v območju pH morske vode (8,1-8,2). Po potrebi dodamo še heksametilentetramina. Pred vsakokratno uporabo se nevtraliziran formalin filtrira skozi filter v plastičnem ohišju za enkratno uporabo (velikost por 0,22 µm), ker heksametilentetramin v vzorcih morske vode s časom precipitira in njegovi delci motijo pri mikroskopiranju. Volumen dodanega nevtraliziranega formalina je odvisen od volumna vzorcev, velja pa, da naj bo končna koncentracija formalina približno 2 %. Priprava fiksativa in fiksiranje vzorcev poteka v digestoriju.

Določanje vsebnosti klorofila *a* v fitoplanktonu je opisano v poglavju »Merjenje klorofila *a* in razgradnih produktov v fitoplanktonu«.

2.2 Zapis in hranjenje vzorcev

V terenski list se na terenu zapiše naslednje podatke: datum, čas, vodno telo, mesto vzorčenja, geografske koordinate, globina, vrsta vzorca, hkrati pa tudi vse opombe in opazovanja.

Terenski list je del dokumentacije o vzorčenju in se ga hrani na dogovorjenem mestu.

Fiksirane vzorce za kvantitativno in kvalitativno analizo fitoplanktona se do nadaljnje obdelave hrani na policah v prezračevanem in temnem skladišču za vzorce in se jih čim manj premika.

Po opravljenih mikroskopskih pregledih se del vzorca prelije v 100 mL plastenko. Ta vzorec se prav tako hrani v skladišču za vzorce in služi za daljše hranjenje (do 5 let) in morebitno preverbo.

2.3 Določanje abundance in vrstne sestave fitoplanktona

2.3.1 SESTAVA FITOPLANKTONA IN PRIPOROČENI VIRI

Zaželeno stopnja določanja sestave je do vrste, v primerih, ko to ni mogoče pa do prvega najnižjega taksona (rod, družina itd.).

Za določanje vrst fitoplanktona je na razpolago številna literatura: določevalni ključi, priporočljivi so tudi znanstveni članki s področja taksonomije in sistematike, ki so po navadi novejši in zato bolj ažurirani. Zelo priporočljiva je tudi spletna stran <http://www.algaebase.org/>, kjer lahko preverimo veljavna imena taksonov. Sezname najbolj uporabne sistematske literature so podani ločeno za posamezne razrede oz. skupine fitoplanktona:

Diatomeje:

Brunel, J. 1970. Le phytoplancton de la Baie des Chaleurs. 2^e édition. Les presses de l'Université de Montréal, Montréal, 365 str.

Cupp, E. E. 1943. Marine plankton diatoms of the west coast of North America. Bull. Scripps Instn. Oceanogr., 5, 1-237.

Hasle, G. R. in Syvertsen, E. E. 1996. Marine diatoms. V: Tomas, C. R. (ur.): Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates. Academic Press, Inc., San Diego, s. 5-385.

Hendey, N. I. 1964. An Introductory Account of the Smaller Algae of British Coastal Waters. Part V: Bacillariophyceae (Diatoms). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Fishery Investigations, Series IV. H.M. Stationery Office, London, 317 str.

Hustedt, F. 1930. Die Kieselalgen. Deutschlands, Österreichs und der Schweiz mit Berücksichtigung der übrigen Länder Europas sowie der angrenzenden Meeresgebiete. Teil 1. Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H., Leipzig, 920 str.

Rampi, L. in Bernhard, M. 1978. Chiave per la determinazione delle diatomee pelagiche mediterranee. C.N.E.N.-C.S.N.-Casaccia, 71 str.

Dinoflagelati:

Balech, E. 1988. Los Dinoflagelados del Atlantico Sudoccidental. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentacion, Madrid. Número 1, 310 str.

Dodge, J. D. 1982. Marine Dinoflagellates of the British Isles. H.M:S.O., 310 str.

Faust, M. A. in Gulledege, R. A. 2002. Identifying Harmful Marine Dinoflagellates. Dept. Systematic Biology-Botany, Washington DC, 144 str.

Fukuyo, J., Takano, H., Chihara, M. in Matsuoka, K. (ur.). 1990. Red Tide Organisms in Japan. An Illustrated Taxonomic Guide. Uchida Rokakuho, Tokyo, 430 str.

Larsen, J. in Moestrup, Ø. 1989. Guide to Toxic and Potentially Toxic Marine Algae. The Fish Inspection Services, Ministry of Fisheries, Copenhagen, 61 str.

McDermot, G. in R. Raine. 2006. The dinoflagellate genus *Ceratium* in Irish shelf seas. National University of Ireland, Galway, Irska. 86 str.

Rampi, L. in Bernhard, M. 1980. Chiave per la determinazione delle peridinee pelagiche mediterranee. C.N.E.N.-RT/B10(80)8, 193 str.

Schiller, J. 1930. Dinoflagellatae (Peridinae). Rabenhorst's Kryptogamen Flora. Teil 1. Akad. Verlag., Leipzig, 10, 617 str.

Schiller, J. 1933. Dinoflagellatae (Peridinae). Rabenhorst's Kryptogamen Flora. Teil 2. Akad. Verlag., Leipzig, 10, 590 str.

Steindinger, K. A. in Tangen, K. 1996. Dinoflagellates. V: Tomas, C. R. (ur.): Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates. Academic Press, Inc., San Diego, s. 387-584.

Kokolitoforidi:

Heimdal, B. R. 1993. Modern Coccolithophorids. V: Tomas, C. R. (ur.): Marine Phytoplankton. A Guide to Naked Flagellates and Coccolithophorids. Academic Press, Inc., San Diego, s. 147-249.

Schiller, J. 1930. Coccolithinae. Rabenhorst's Kryptogamen Flora. Akad. Verlag., Leipzig, 10(2): 89-267.

Druge skupine:

Gemeinhardt, K. 1930. Silicoflagellatae. Rabenhorst's Kryptogamen Flora. Akad. Verlag., Leipzig, 10: 1-88.

Larsen, J., Ø. Moestrup. 1989. Guide to Toxic and Potentially Toxic Marine Algae. The Fish Inspection Services, Ministry of Fisheries, Copenhagen, 61 str.

Thronsen, J. 1993. The Planktonic Marine Flagellates. V: Tomas, C. R. (ur.): Marine Phytoplankton. A Guide to Naked Flagellates and Coccolithophorids. Academic Press, Inc., San Diego, s. 7-145.

Splošno:

Kraberg, A., M. Baumann in C.-D. Dürselen. 2010. Coastal phytoplankton. Photo Guide for Northern European Seas. Verlag Dr. Friedrich Pfei, München, 204 str.

Viličić, D. 2002. Fitoplankton Jadranskoga mora, biologija i taksonomija. Školska knjiga, Zagreb, 247 str.

2.3.2 KVANTITATIVNA ANALIZA FITOPLANKTONA

Kvantitativna analiza služi za določitev abundance taksonov (vrsta, rod, razred) fitoplanktona v vzorcu morske vode, tj. števila celic na volumsko enoto. V ta namen se uporabi Utermöhlova metoda, ki omogoča preštetje fitoplanktonskih organizmov v znanem volumnu podvzorca z uporabo invertnega mikroskopa (Utermöhl, 1958).

Vzorec, shranjen v temni steklenici in fiksiran z 2 % nevtraliziranim formalinom, temeljito premešamo tako, da približno 100-krat počasi obrnemo steklenico. V sedimentacijski valj znane prostornine s sedimentacijsko komorico natočimo podvzorec ter pustimo usedati od 24 do 72 ur. Volumen podvzorca izberemo glede na predvideno gostoto fitoplanktonskih celic, ki jo lahko ocenimo iz meritev koncentracij klorofila *a* (*in situ* fluorescenca, analitska metoda). Včasih je pri zelo veliki gostoti fitoplanktona vzorec potrebno predhodno redčiti (2x, 4x, 8x...). To se izvede s Folsomovim razdelilcem, redčenje pa se kasneje upošteva pri izračunavanju števila.

Po končanem usedanju pod invertnim mikroskopom preštujemo fitoplanktonske celice na dnu sedimentacijske komorice. Pri štetju vseh predstavnikov fitoplanktonske združbe z zelo raznoliko velikostjo in abundanco, štejemo po transektih, tj. po zaporednih vidnih poljih, ki si sledijo v navpični ali prečni smeri ali križem čez dno komore pri 400x povečavi. Drugi način je, da se naključno izbere polja brez določenega vzorca. V vsakem primeru je ključno število pregledanih polj, ki vpliva na velikost napake metode. Priporočljivo je pregledati 100 vidnih polj pri 400x povečavi, v primeru zelo redkih vrst pa do 200 polj. Če štejemo le celice velikih vrst z nizko abundanco (npr. *Dinophysis* spp., velikost > 40 µm), pa pregledamo celotno dno komorice pri 200x povečavi.

Številčnost fitoplanktona, posameznega taksona, funkcionalnih skupin ali celotne združbe, se izračuna po enačbi 1.

Enačba 1: Izračun številčnosti fitoplanktonskih taksonov

$$No. = N * \left(\frac{a}{b}\right) * \left(\frac{1000}{c}\right) * d$$

kjer je:

No. – število fitoplanktona, izražen kot (celice/L),

N – število prešteti celic v pregledanih vidnih poljih,

a – število vseh vidnih polj pri določeni povečavi (npr. 2500 pri 400x povečavi),

b – število pregledanih vidnih polj,

c – volumen sedimentiranega podvzorca (v mL),

d – faktor redčenja (največkrat 1).

2.4 Merjenje klorofila *a* in razgradnih produktov v fitoplanktonu

Za opredelitev biomase fitoplanktona se uporabi analitsko metodo določevanja koncentracije klorofila *a*, ki ga vsebujejo vsi fotoavtotrofni organizmi, vključno s fitoplanktonom. Koncentracijo klorofila *a* in njegovih razgradnih produktov – feopigmentov se določi z uporabo fluorimetrične metode (Yentsch & Menzel, 1963; Holm-Hansen in sod., 1965), ali druge primerljive in validirane metode.

Priprava vzorcev

Iz vzorca (500 mL), ki se ga previdno večkrat premeša, se v plastični merilni valj odmeri željen volumen morske vode (po navadi 400 mL) in filtrira skozi GF/F filter iz steklenih vlaken (nominalna velikost por 0,7 μm) pri nizkem vakuumu. Filter in filtracijski nastavek se nato spere z majhno količino Mili-Q vode. Filter se osuši, prepogne in zavije v alu folijo, označi ime vzorca (postaja, globina), datum vzorčenja in volumen prefiltrirane vode ter shrani do nadaljnje ekstrakcije v zamrzovalniku ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$).

*Potek ekstrakcije in meritev klorofila *a**

Ekstrakcija klorofila *a* poteka v nepolarnem topilu - 90% raztopini acetona (9 delov acetona in 1 del destilirane vode), ki ga hranimo v hladilniku. Med samo ekstrakcijo hranimo delovno raztopino acetona v posodi z zdrobljenim ledom, da se med homogenizacijo filter ne bi preveč segrel, saj povišana temperatura vpliva na fluorescenco.

Filter s fitoplanktonskimi celicami se homogenizira s pomočjo tkivnega homogenizatorja v epruveti za homogeniziranje, v katero se nalije pribl. 3 mL 90% acetona. Homogenizacija filtra poteka pribl. 1 min pri hitrosti 30 rpm, tako da je filter v celoti razbit na majhne koščke. Nato se homogenizat prelije v plastično centrifugirko, dobro spere epruveto in dopolni z acetonom v skupnem volumnu 10 mL. Ekstrakcija klorofila *a* poteka najmanj 2 uri v temi, ne sme pa preseči 24 ur. Po končani ekstrakciji, se v acetonu raztopljeno barvilo centrifugira 10 min pri 5000 rpm (tik pred centrifugiranjem večkrat pretresti vsebino centrifugirke). Fluorimeter se vključi okoli 20 min pred začetkom izvajanja meritev in se ga umeri na fluorescenco čistega topila. Po centrifugiranju se supernatant pazljivo prelije v steklene kivete z zamaškom in izmeri fluorescenco pred zakisanjem (F_b). Fluorescenco se ponovno izmeri še po zakisanju supernatanta z dodatkom 60 μL 0,1 M HCl. Z zakisanjem molekule klorofila *a* razpadejo, novo nastale razgradne spojine – feopigmenti pa fluorescirajo pri isti valovni dolžini kot klorofil *a*. Za ponovno branje fluorescence zakisanega ekstrakta (F_a) se počaka 90 s in vsebino kivete dobro premeša.

Končno koncentracijo klorofila *a* in feopigmentov izračunamo z upoštevanjem vrednosti fluorescence pred (F_b) in po zakisanju (F_a), volumna prefiltriranega vzorca (mL), volumna ekstrakta (mL) ter faktorja zadnje kalibracije inštrumenta (enačba 2). Nekateri modeli fluorimetrov (npr. Turner Trilogy) že sami podajo končni rezultat v izbrani enoti (npr. $\mu\text{g/L}$), potem ko vnesemo potrebne parametre enačbe.

Enačba 2: Izračun koncentracije klorofila *a*, popravljene za feopigmente

$$Chl\ a = \frac{F_d * \frac{r}{r-1} * (R_B - R_A) * V_{ek} * FR}{V_{vz}}$$

kjer je:

Chl *a* – koncentracija klorofila *a* v vzorcu (v µg/L),

F_d – faktor, izračunan iz umeritvene krivulje standarda klorofila *a*. Faktor je izračunan posebej za posamezna vrata na fluorimetru (reža, skozi katero prihaja ekscitacijska svetloba),

R_B – fluorescenca – odčitana vrednost pred zakisanjem,

R_A – fluorescenca – odčitana vrednost po zakisanju,

r – *r* = *R_B*/*R_A*, razmerje med fluorescencama standarda pred zakisanjem in po njem,

V_{ek} – volumen ekstrakta (v L),

V_{vz} – volumen vzorca (v L),

FR – faktor redčenja.

Inštrument se kalibrira (enkrat letno oz. ob znatni spremembi pogojev izvajanja meritev) z uporabo čistega klorofila *a* – standarda (SIGMA Chlorophyll *a* from spinach) znane koncentracije.

3 VREDNOTENJE EKOLOŠKEGA STANJA OBALNEGA MORJA NA PODLAGI FITOPLANKTONA

Vrednotenje ekološkega stanja v skladu z Vodno direktivo (Direktiva 2000/60/EC) predstavlja ugotavljanje spremenjenosti strukture in funkcije ekosistema v primerjavi z naravnimi – referenčnimi razmerami. Glede na ekološko kakovost se razvrsti ekosistem oz. vodno telo v enega od 5 razredov kakovosti ekološkega stanja (preglednica 1).

Preglednica 1: Razredi kakovosti ekološkega stanja

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

Fitoplankton je biološki element, ki se neposredno odziva na bogatitev vodnega telesa s hranilnimi snovmi. Posledice eutrofikacije pri fitoplanktonu so porast biomase, spremembe sestave fitoplanktonske združbe in pogostejša cvetenja, ki so lahko tudi škodljiva. V Vodni direktivi je predvideno, da se za vrednotenje ekološkega stanja s fitoplanktonom uporabijo vsi omenjeni parametri. Vendar so sistemi vrednotenja z več različnimi parametri fitoplanktona še zmeraj v razvoju, v drugi fazi interkalibracije pa je bila v sredozemski interkalibracijski skupini za fitoplankton sprejeta uporaba metrike biomasa fitoplanktona - koncentracije klorofila *a* (Chl *a*).

Na podlagi fitoplanktona oziroma metrike biomasa fitoplanktona vrednotimo ekološko stanje obalnega morja po modulu trofičnost.

3.1 Vrednotenje ekološkega stanja obalnega morja na podlagi fitoplanktona - modul trofičnost

Značilnosti fitoplanktonske združbe v Tržaškem zalivu označujejo njena biomasa (koncentracija klorofila *a*) ter številčnost (abundanca) in vrstna sestava, kar vključuje tudi spremljanje cvetenj posameznih vrst oz. skupin fitoplanktona. Zaenkrat se za vrednotenje ekološkega stanja na podlagi biološkega elementa fitoplankton uporabi le prva izmed teh značilnosti.

Celotno slovensko obalno morje je bilo s stališča fitoplanktona umeščeno le v en tip obalnega morja, ki ni pod neposrednim vplivom sladkovodnih obremenitev, vendar je njihov vpliv še vedno zaznaven (tip IIA Adriatic na nivoju sredozemske interkalibracijske skupine). Zato se za oceno ekološkega stanja na podlagi fitoplanktona v vseh vodnih telesih obalnega morja uporablja enako metodologijo in enako referenčno vrednost.

Metrika, ki se uporabi za oceno stanja po modulu trofičnost, je **biomasa fitoplanktona**.

Zaporedje korakov za pravilno vrednotenje ekološkega stanja na podlagi biološke metrike biomasa fitoplanktona:

- a) izračun metrike za biomaso fitoplanktona,
- b) normalizacija in transformacija metrike za biomaso fitoplanktona,
- c) uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja po modulu trofičnost in
- d) izračun vrednosti razmerja ekološke kakovosti po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona in uvrstitev vodnega telesa obalnega morja v razred ekološkega stanja po modulu trofičnost za izbrano obdobje.

3.1.1 IZRAČUN METRIKE BIOMASE FITOPLANKTONA: LETNA GEOMETRIČNA SREDINA KONCENTRACIJ KLOOROFILA *A*

Za oceno ekološkega stanja se uporabi metrika biomasa fitoplanktona izražena kot letna geometrična sredina koncentracij klorofila *a* ($\mu\text{g/L}$).

Izračun metrike – vstopni podatki:

- obdobje in frekvenca vzorčenja: celoletni cikel vzorčenja s frekvenco 1-krat mesečno
- vzorčevalna globina: 0 m
- izračun metrike biomase fitoplanktona kot letna geometrična sredina površinskih koncentracij klorofila *a*. Slednja se izračuna po naslednji enačbi 3.

Enačba 3: Letna geometrična sredina površinskih koncentracij klorofila *a*

$$G(Chl_a)_l = \left(\prod_{i=1}^n Chl_a \right)^{\frac{1}{n}} = \sqrt[n]{Chl_a_1 * Chl_a_2 * \dots * Chl_a_n}$$

kjer je:

$G(Chl_a)_l$ – geometrična srednja vrednost mesečnih koncentracij klorofila *a* v *l*-tem letu,

Chl_a_n – površinska koncentracija klorofila *a* *n*-tega vzorca,

n – število vzorcev v enem letu.

3.1.2 NORMALIZACIJA IN TRANSFORMACIJA METRIKE BIOMASA FITOPLANKTONA

Metriko biomase fitoplanktona je treba normalizirati v vrednost REK (razmerje ekološke kakovosti) po enačbi 4. Za normalizacijo se upošteva enotna referenčna vrednost klorofilne biomase za oba ekološka tipa obalnega morja (0,33 µg/L).

Enačba 4: Izračun REK-a za biomaso fitoplanktona

$$REK_izr_l = \frac{Chl_a(RC)}{G(Chl_a)_l}$$

kjer je:

REK_izr_l – izračunan REK za biomaso fitoplanktona za *l*-to leto,

$Chl_a(RC)$ – koncentracija klorofila *a* pri referenčnih razmerah (0,33 µg/L),

$G(Chl_a)_l$ – geometrična srednja vrednost mesečnih koncentracij klorofila *a* v *l*-tem letu.

Ker so vrednosti klorofila *a* podrejene logaritemski naravi metrike, tudi izračunani REK-i (razmerje med referenčno in dejansko vrednostjo klorofila *a*) ne ustrezajo linearnim-ekvidistančnim vrednostim, kot jih določa Vodna direktiva. Zato je treba REK vrednosti transformirati z uporabo enačbe 5.

Enačba 5: Transformirana vrednost REK za biomaso fitoplanktona

$$Biomasa_fitopl_REK_l = 0,245 * \ln(REK_izr_l) + 0,981$$

kjer je:

Biomasa_fitopl_REK_l – transformirana vrednost REK za biomaso fitoplanktona za *l*-to leto,

REK_izr_l – izračunan REK za biomaso fitoplanktona za *l*-to leto.

3.1.3 UVRSTITEV MESTA VZORČENJA V RAZRED EKOLOŠKEGA STANJA PO MODULU TROFIČNOST

Transformirane REK vrednosti metrike biomasa fitoplanktona (Biomasa_fitopl_REK_l) se primerja z mejnimi vrednostmi v preglednici 2. S pomočjo le-te se mesto vzorčenja uvrsti v razred kakovosti ekološkega stanja.

V preglednici 2 so poleg mejnih vrednosti razmerja ekološke kakovosti biomase fitoplanktona podane tudi mejne vrednosti izražene kot koncentracija klorofila *a*.

Preglednica 2: Razredi kakovosti ekološkega stanja po modulu trofičnost, pripadajoče mejne REK vrednosti in mejne vrednosti fitoplanktonske biomase za posamezen razred kakovosti

Biomasa_fitopl_REK - razpon	Razred kakovosti – ekološko stanje	Klorofil <i>a</i> (µg/L) - razpon
1	Referenčna vrednost	0,33
≥ 0,82	Zelo dobro	≤ 0,64
0,61 - 0,81	Dobro	0,65 - 1,50
0,40 – 0,60	Zmerno	1,51 - 3,50
0,19 – 0,39	Slabo	3,51 - 8,20
< 0,19	Zelo slabo	> 8,20

3.1.4 IZRAČUN VREDNOSTI RAZMERJA EKOLOŠKE KAKOVOSTI PO MODULU TROFIČNOST NA PODLAGI FITOPLANKTONA IN UVRSTITEV VODNEGA TELESA OBALNEGA MORJA V RAZRED EKOLOŠKEGA STANJA PO MODULU TROFIČNOST ZA IZBRANO OBDOBJE

Izračun vrednosti razmerja ekološke kakovosti po modulu trofičnost za vodno telo je enak izračunu $Biomasa_fitopl_REK_i$ (enačba 5), če je v vodnem telesu le eno mesto vzorčenja. V primeru, da ima vodno telo dve ali več mest vzorčenja, se izračuna letno geometrično sredino mesečnih vrednosti vseh mest vzorčenja skupaj po enačbi 3. Po normalizaciji in transformaciji se dobljeno vrednost $Biomasa_fitopl_REK$ primerja z mejnimi vrednostmi v preglednici 2 in uvrsti vodno telo v razred ekološkega stanja.

Vrednost razmerja ekološke kakovosti po modulu trofičnost na podlagi fitoplanktona za vodno telo obalnega morja za izbrano obdobje (npr. obdobje načrta upravljanja voda) se izračuna kot aritmetično povprečje letnih vrednosti $Biomasa_fitopl_REK_i$ (enačba 6).

Enačba 6: Izračun modula trofičnost na podlagi fitoplanktona za vodno telo za izbrano obdobje

$$OM_FPL_{Tro} = \frac{\sum_{l=1}^m Biomasa_fitopl_REK_l}{m}$$

kjer je:

OM_FPL_{Tro} – vrednost razmerja ekološke kakovosti po modulu trofičnost o -tega obdobja na podlagi fitoplanktona obalnega morja,

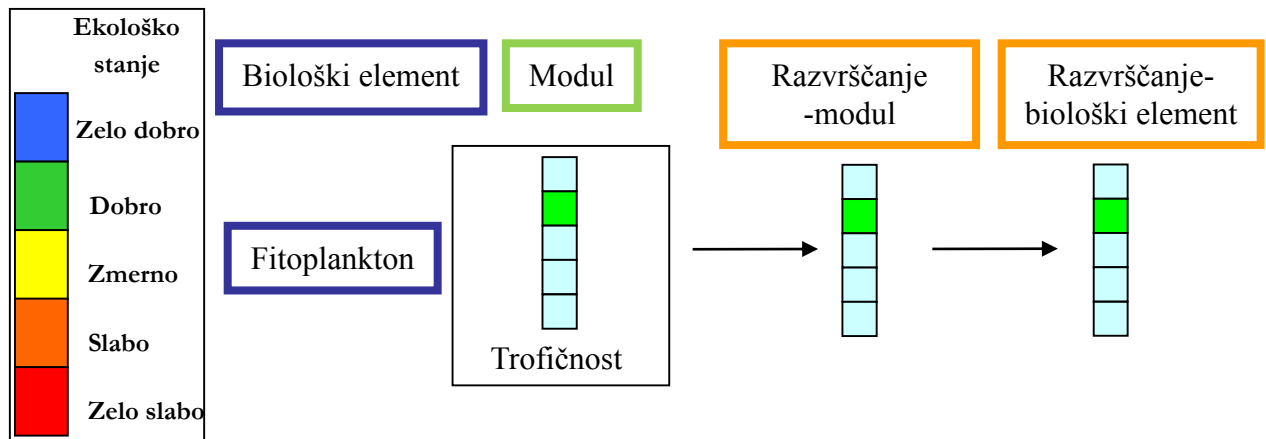
$Biomasa_fitopl_REK_i$ – transformirana vrednost REK za biomaso fitoplanktona l -tega leta,

m – število vzorčenih let.

Vodno telo se uvrsti v razred ekološkega stanja po modulu trofičnost tako, da se vrednost razmerja ekološke kakovosti po modulu trofičnost razvrsti v razred kakovosti (preglednica 2).

3.2 Vrednotenje ekološkega stanja in razvrščanje vodnih teles obalnega morja v razrede ekološkega stanja na podlagi biološkega elementa fitoplankton

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



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

4 VIRI

- Direktiva 2000/60/ES evropskega parlamenta in sveta z dne 23. oktobra 2000. Bruselj, 72 str.
- Edler L. (1979). Recommendations on Methods for Marine Biological Studies in the Baltic Sea. Phytoplankton and Chlorophyll. The Baltic Marine Biologist Publ., No. 5, Gotub, Malmö, 32 str.
- Francé J., Bajt O., Mavrič B., Mozetič P., Orlando Bonaca M. (2013). Sodelovanje pri pripravi strokovnih podlag za dopolnitev uredbe o stanju površinskih voda za obalno morje. Zaključno poročilo. Poročila 150. Morska Biološka Postaja, Nacionalni Inštitut za Biologijo, Piran, 93 str.
- Holm-Hansen O., Lorenzen C. J., Holmes R. W., Strickland J. D. H. (1965). Fluorometric determination of chlorophyll. J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer., 30: 3-15.
- Sournia A. (ur.) (1978). Phytoplankton manual. Monographs on oceanographic methodology, 6. UNESCO, Paris, 337 str.
- Trilogy Laboratory Fluorometer User's Manual (2005). Version 1.0. August 31, 2005.
- Utermöhl H. (1958). Zur Vervollkommung der Quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mit. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol. 9: 1-38.
- Yentsch C. S. in Menzel, D. W. 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. Deep-Sea Research, 10: 221-231.
- Zingone A., Honsell G., Marino D., Montresor M., Socal G. (1990). Fitoplancton. V: Innamorati, M., Ferrari, I., Marino, D. in Ribera D'Alcalà, M (ur.): Metodi nell'ecologia del plancton marino. Nova Thalassia 11: 193-198.

5 STANDARDI

- SIST EN 15204:2007. Kakovost vode - Smerni standard za štetje fitoplanktona z invertno mikroskopijo (postopek po Utermöhlu).
- SIST EN 15972:2012. Kakovost vode - Navodilo za kvantitativne in kvalitativne preiskave morskega fitoplanktona.