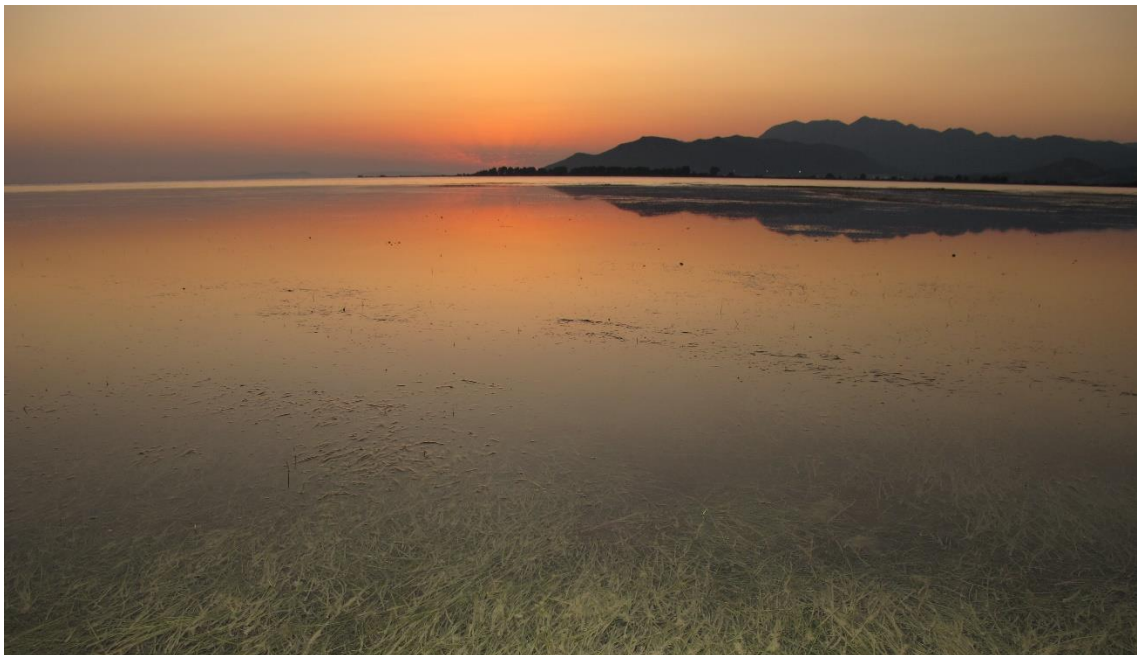


**Institut za oceanografiju i ribarstvo
Split**

**Analiza biološke metode ocjene ekološkog stanja za
fitoplankton, morske cvjetnice i ribe u europskim
interkalibracijskim tipovima prijelaznih voda Mediterana**



Split, studeni, 2018.

Analiza biološke metode ocjene ekološkog stanja za fitoplankton, morske cvjetnice i ribe u europskim interkalibracijskim tipovima prijelaznih voda Mediterana

Izvješće sukladno Ugovoru br.: 77/21

Izvješće izradili:

Dr. sc. Ivan Cvitković

Dr. sc. Marija Despalatović

Dr. sc. Sanja Matić Skoko

Dr. sc. Živana Ninčević Gladan

Dr. sc. Ante Žuljević

Institut za oceanografiju i ribarstvo

Šetalište I. Meštrovića 63

21000 SPLIT

Tel: 021/408-000

Ravnatelj: Dr. Sc Nedo Vrgoč

SADRŽAJ:

1. Pregled klasifikacijskih metoda za morske cvjetnice u prijelaznim vodama zemalja MED GIG-a.....	1
2. Izvješće Republike Hrvatske o klasifikacijskoj metodi za morske cvjetnice u prijelaznim vodama u JRC formatu.....	4
3. Metodologija ocjene ekološkog stanja za BEK Makrofiti – morske cvjetnice.....	13
3.1. Uzorkovanje.....	13
3.2. Laboratorijska obrada uzoraka.....	14
3.3. Izračunavanje indeksa/pokazatelja za ocjenu ekološkog stanja.....	15
3.4. Utvrđivanje granica klasa.....	17
3.5. Izračunavanje omjera ekološke kakvoće (OEK).....	18
3.6. Terenski protokol za uzorkovanje makrofita u prijelaznim vodama.....	18
4. Metodologija ocjene ekološkog stanja za BEK Fitoplankton.....	19
4.1. Uzorkovanje.....	19
4.2. Laboratorijska obrada uzoraka.....	20
4.3. Izračunavanje indeksa/pokazatelja za ocjenu ekološkog stanja.....	23
4.4. Utvrđivanje granica klasa.....	27
4.5. Izračunavanje omjera ekološke kakvoće.....	27
5. Metodologija ocjene ekološkog stanja za BEK Ribe.....	28
5.1. Uzorkovanje.....	28
5.2. Laboratorijska obrada uzoraka.....	29
5.3. Izračunavanje indeksa/pokazatelja za ocjenu ekološkog stanja.....	31
5.4. Utvrđivanje granica klasa.....	37
5.5. Izračunavanje omjera ekološke kakvoće.....	38
6. Literatura.....	39

1. Pregled klasifikacijskih metoda za morske cvjetnice u prijelaznim vodama zemalja MED GIG-a

Geografska interkalibracijska grupa za Sredozemno more (MED GIG) uključuje sljedeće zemlje članice Europska unije: Španjolsku, Francusku, Italiju, Sloveniju, Grčku, Cipar i Hrvatsku. U okviru MED GIG-a su definirani zajednički tipovi prijelaznih voda. Hrvatska dijeli zajednički interkalibracijski tip prijelaznih voda samo sa Španjolskom, a to je estuarij slanog klina. U tom tipu estuarija nije proveden interkalibracijski postupak niti jednog biološkog elementa kakvoće.

Na području zemalja članica na području Sredozemnog mora do sada su predloženi sljedeći biotički indeksi koji se baziraju na morskim cvjetnicama: CYMOX (Španjolska), CymoSkew (Grčka) i MediSkew (Slovenija).

CYMOX

Biotički indeks CYMOX (Oliva et al. 2012) za procjenu ekološkog statusa prijelaznih voda koristi morsku cvjetnicu *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, koja živi u različitim okolišima, u obalnim vodama, lagunama (hipersaline i brakične vode) te u estuarijima.

On uključuje analizu 10 odabranih parametara koji opisuju različite razine, od fiziologije i morfologije cvjetnice do njezine zajednice, a koji daju odgovor o različitim antropogenim pritiscima. Mjere se sljedeći parametri: sadržaj $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{34}\text{S}$, % N i % P u rizomima, veličina čuperka (suha masa), omjer mase korijenja u odnosu na ukupnu masu, opterećenje epifitima (suha masa epifita po čuperku), te količina metala u tragovima, Cd, Cu i Zn, u rizomima.

Odabrani parametri integrirani su u jedinstveni indeks pomoću PCA analize, koristeći rezultate postaja na prvoj osi. Ti rezultati su reducirani na skalu vrijednosti od 0 do 1 (omjer ekološke kakvoće, OEK), a koja se odnosi na vrijednosti od najboljih (referentnih) do najgorih (najviše degradiranih) uvjeta. Skala je podijeljena na pet jednakih razreda koji predstavljaju različite ekološke statuse: vrlo dobar, dobar, umjeren, loš i vrlo loš, prema usvojenom načinu prikazivanja za potrebe ODV. Referentni i 'najgori' uvjeti se ustanovljuju odabirom i usrednjavanjem dviju najboljih i dviju najgorih srednjih vrijednosti na postajama za svaki parametar. Ovako odabrane referentne vrijednosti variraju obzirom na geografsko područje i vrijeme. Smatra se da referentni uvjeti za određeno područje mogu postati nepromjenjivi nakon što se podaci sakupljaju najmanje pet godina zaredom.

Omjer ekološke kakvoće se izračunava prema sljedećoj formuli:

$$EQR_x = (CI_x - CI_{najgora}) / (CI_{najbolja} - CI_{najgora})$$

Gdje je EQR_x (između 0 i 1) omjer ekološke kakvoće (OEK) postaje X; a CI_x , $CI_{najbolja}$ i $CI_{najgora}$ rezultati na prvoj osi postaje X, te najbolje i najgore postaje.

Podaci potrebni za odabir pokazatelja i predlaganje indeksa su sakupljeni tijekom istraživanja u dva plitka zaljeva u kojima su dobro razvijene livade cvjetnice *C. nodosa* u delti rijeke Ebro (Katalonija, NW Sredozemno more), a uočljiv je gradijent nutrijenata i koncentracije organske tvari, a moguće i onečišćivača iz poljoprivrede i industrijske djelatnosti.

Ekološki status postaje koji se dobiva primjenom CYMOX indeksa u značajnoj je korelaciji s gradijentom u okolišu te potvrđuje njegovu adekvatnost za odražavanje zdravlja ekosustava. Indeks je usklađen sa zahtjevima Okvirne direktive o vodama.

CymoSkew

Biotički indeks CymoSkew (Orfanidis et al. 2007, 2010), koji također koristi morsku cvjetnicu *Cymodocea nodosa*, je prvenstveno razvijen za praćenje kvalitete obalnih voda, ali budući da ova vrsta naseljava područja širokih ekoloških valencija, može se primijeniti i na područjima prijelaznih voda.

Indeks se temelji na analizi samo jednog lako mjerljivog parametra, odnosno na dužini listova, koja se povećava obzirom na povećanje degradacije livada, a uglavnom je u vezi s količinom nutrijenata i dostupnim svjetlom. U uvjetima kada je količina nutrijenata ograničena cvjetnica ulaže više u tkivo koje je ispod sedimenta, a u uvjetima kada je dostupno više nutrijenata više se biomase proizvodi u nadzemnim dijelovima, odnosno dolazi do povećanja dužine listova. Duže razdoblje izlaganja visokoj koncentraciji nutrijenata vodi prema degradaciji livade, ali uglavnom zbog ograničene količine svjetla koja nastaje rastom fitoplanktona i epifita.

Za potrebe izračuna ovog indeksa potrebno je procijeniti ukupnu dužinu listova i načiniti histograme učestalosti (%) za ukupne dužine te dužine fotosintetičkih dijelova adultnih i intermedijarnih listova. Histogrami dužina fotosintetičkih dijelova adultnih i intermedijarnih listova se postavljaju u Gaussovu krivulju te se testira je li raspodjela normalna. Promjene u raspodjeli dužina adultnih i intermedijarnih listova kvantificiraju se pomoću indeksa asimetričnosti, odnosno CymoSkew indeksa.

CymoSkew indeks se računa prema sljedećoj formuli (Pearson, 1895):

$$\text{Indeks asimetričnosti} = nM_3 / [(n - 1)(n - 2)\sigma^3]$$

Gdje je $M_3 = \Sigma(x_i - \text{srednjak}_x)^3$, x = ln-transformirana relativna učestalost različitih vrijednosti dužina adultnih i intermedijarnih fotosintetičkih listova iz tablica učestalosti; σ = standardna devijacija; te n = ln-transformirane relativne učestalosti 60 različitih vrijednosti dužina adultini i intermedijarnih fotosintetičkih listova.

Istraživanja tijekom kojih su sakupljeni podaci za razvoj ovog indeksa su provedena u dva zaljeva, Zaljevu Kavala i Solunskom zaljevu, u sjevernom dijelu Egejskog mora. Obuhvaćene su livade na različitim pjeskovitim dnima, od zaštićenih do polu izloženih područja. Odabrane su različito razvijene livade, od netaknute prirodne livade do degradiranih livada. Zaljevi u kojima je provedeno istraživanje su pod različitim antropogenim opterećenjima zbog poljoprivrede, marikulture i industrije, te otpadnih voda iz domaćinstava i turizma.

CymoSkew indeks je osjetljiv na nižu razinu stresa te ga se stoga može smatrati indikatorom koji rano upozorava na degradaciju vrste *C. nodosa*, odnosno obalnih staništa.

MediSkew

Biotički indeks MediSkew (Orlando-Bonaca et al. 2015) je nastao nakon CymoSkew indeksa, kao njegova poboljšana verzija. Autori ovog indeksa su smatrali da je upitno što je CymoSkew indeks baziran na ln-transformiranim relativnim frekvencijama dužina fotosintetičkih listova vrste *C. nodosa*. Oni su stoga razvili novi indeks (MediSkew) u kojem se ln-transformacija primjenjuje na sirovim podacima dužine listova.

Novi indeks je kombinacija dviju metrika koje se baziraju na dužini listova: devijaciji od medijana referente dužine (Medi-) i asimetričnosti raspodjele dužinskih frekvencija (-Skew). Veća je važnost dodijeljena devijaciji od medijana referente dužine.

MediSkew za istraživano područje se računa prema sljedećoj formuli:

$$\text{MediSkew} = [(\text{Md}_{\text{područje}} - \text{Md}_{\text{RC}}) / 20 + |G| / 2] / 2$$

Gdje je $\text{Md}_{\text{područje}}$ medijan dužine fotosintetičkog dijela adultnih i intermedijarnih listova vrste *C. nodosa* na nekom području ($n = 300$); Md_{RC} medijan dužine fotosintetičkog dijela adultnih i intermedijarnih listova na referentnom području; te G apsolutna vrijednost asimetričnosti ln-transformiranih dužina listova za neko područje ($n = 300$), a koja se računa prilagođenim Fisher-Pearson koeficijentom.

Uzorci vrste *C. nodosa* za potrebe ovih istraživanja su sakupljeni na sedam livada na muljevitim pijescima u zaštićenim vodama u Tršćanskom zaljevu u sjevernom Jadranu. To je

vrlo naseljeno područje pod izraženim antropogenim pritiscima te pod utjecajem slatkih voda, a sadašnja geomorfologija područja je rezultat velikih antropogenih izmjena.

Ova bi se metoda, ako se testiranjem na području obalnih voda Sredozemnog mora potvrdi njezina učinkovitost, mogla koristiti za brzi pregled stanja širih područja.

2. Izvješće Republike Hrvatske o klasifikacijskoj metodi za morske cvjetnice u prijelaznim vodama u JRC formatu

Prva istraživanja provedena 2011. godine na cvjetnicama u prijelaznim vodama su pokazala da je metoda CYMOX, koja se temelji na cvjetnici *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, a koja je razvijena za praćenje stanja prijelaznih voda na području Španjolske (Sredozemno more) primjenjiva za praćenje stanja prijelaznih voda na području Republike Hrvatske prema odredbama ODV-a. Preliminarnim istraživanjima utvrđena je značajna korelacija između OEK vrijednosti dobivenih primjenom ove metode na vrsti *C. nodosa* i pojedinih abiotičkih pokazatelja onečišćenja (prozirnost, klorofil *a*, koncentracija nitrata).

Međutim, tijekom istraživanja 2011. i 2013. godine, kojima je obuhvaćeno 10 vodnih tijela u prijelaznim vodama, ustanovljeno je da vrsta *C. nodosa* naseljava samo 5 vodnih tijela, a u 8 vodnih tijela zabilježena je prisutnost cvjetnice *Zostera noltei* Hornemann. Istraživanjima koja su uslijedila ustanovljeno je da je cvjetnica *C. nodosa* prisutna u estuarijima rijeka: Neretve, Cetine, Zrmanje i Mirne; a cvjetnica *Z. noltei* u estuarijima Omble, Neretve, Cetine, Jadra, Krke, Zrmanje, Raše, Mirne i Dragonje. Cvjetnica *C. nodosa* je na ušćima rijeka Mirne i Cetine razvijena na samoj granici između prijelaznih i priobalnih voda te je upitno njezino korištenje kao pokazatelja stanja u vodnim tijelima tih prijelaznih voda. Cvjetnica *Z. noltei* naseljava središnja plitka područja te se može smatrati relevantnim pokazateljem stanja vodnih tijela u kojima je zabilježena.

Unatoč preliminarnim rezultatima koji su pokazivali da je CYMOX metoda zasnovana na vrsti *C. nodosa* primjenjiva, obzirom na slabu zastupljenost cvjetnice u vodnim tijelima, zaključeno je da bi se monitoring trebao usmjeriti na vrstu *Z. noltei*, koja je prisutna u svim prijelaznim vodama na području RH.

Stoga su u razdoblju od 2011. do 2018. godine obavljena istraživanja na cvjetnici *Z. noltei* te je razvijena nova metoda, odnosno novi indeks *Zostera noltei* multivarijatan indeks (ZonoMI; *Zostera noltei* multivariate index).

Izvješće o ZonoMI metodi u JRC formatu:

Template for reporting the MS assessment method
in the case where the Intercalibration exercise
is not possible (Gap 3)

1. INTRODUCTION

- Member State: Republika Hrvatska
- BQE: morske cvjetnice
- Water body category (type): prijelazne vode

2. DESCRIPTION OF NATIONAL ASSESSMENT METHODS

MS has to provide the complete description of the method in the Annex. The main features should be given below

ZonoMI indeks (*Zostera noltei* multivariatni indeks)

Metoda ZonoMI se bazira na principima na kojima su bazirane do sada publicirane metode CYMOX za cvjetnicu *Cymodocea nodosa* (Oliva et al. 2011) i ZoNI za cvjetnicu *Zostera noltei* (García-Marín et al. 2013).

Za izračun ZonoMI indeksa se koristi multivariatna analiza varijabli, koje predstavljaju različite razine, fiziologiju biljke, opis populacije te zagađenje. Varijable, za koje smatramo da mogu dati odgovor na promjene koje se događaju u okolišu, su odabrane nakon analize dosadašnjih istraživanja na cvjetnici *Z. noltei* te na ostalim cvjetnicama prisutnim u Sredozemnom moru, a za koje su već predloženi indeksi ekološke kvalitete (Plus et al. 2001; Brun et al. 2002, 2007, 2008; Peralta et al. 2005; Pergent-Martini et al. 2005; Cabaço et al. 2007, 2008; Machás 2007; Orfanidis et al. 2007, 2010; Romero et al. 2007; Leston et al. 2008; Martínez-Crego et al. 2008; Lopez y Royo et al. 2010; Oliva et al. 2012; García-Marín et al. 2013; Orlando-Bonaca et al. 2015).

Odabrane su sljedeće varijable:

- ukupna suha masa korijenja, rizoma i listova,
- omjer suhe mase korijenja i zbroja suhe mase listova i korijenja,
- gustoća čuperaka,
- postotak dušika (% N) u suhoj masi rizoma,
- omjer koncentracije izotopa dušika ($\delta^{15}\text{N}$) u suhoj masi rizoma,
- količina bakra u suhoj masi rizoma,
- količina olova u suhoj masi rizoma,
- količina kadmija u suhoj masi rizoma,
- količina cinka u suhoj masi rizoma.

Ove varijable različito odgovaraju na promijenjene uvjete u ekosustavu. U slučaju povećane degradacije okoliša smanjuje se ukupna masa korijenja, rizoma i listova, gustoća čuperaka te omjer mase korijenja i zbroja masa listova i korijenja (Plus et al. 2001; Cabaço et al. 2008). Povećava se postotak dušika i omjer koncentracije izotopa dušika ($\delta^{15}\text{N}$) (Machás 2007; Cabaço et al. 2008) te količina metala (Cu, Pb, Cd, Zn) u biljnom tkivu (Malea i Haritonidis 1999).

Rezultati mjerenja ovih varijabli izraženi u različitim mjernim jedinicama transformiraju se te ZonoMI metodom objedinjuju u jedan pokazatelj. Za izračunavanje ZonoMI indeksa koristi se multivariatna statistička analiza glavnih komponenti (PCA). Dobivene vrijednosti prve komponente (C1) predstavljaju vrijednosti ekološkog stanja svake postaje.

Vrijednost OEK-a svake postaje se izračunava prema sljedećoj formuli:

$$OEK_x = \frac{C1x - C1_{najlošija}}{C1_{najbolja} - C1_{najlošija}}$$

gdje je:

OEK_x (0-1) – OEK za postaju x,

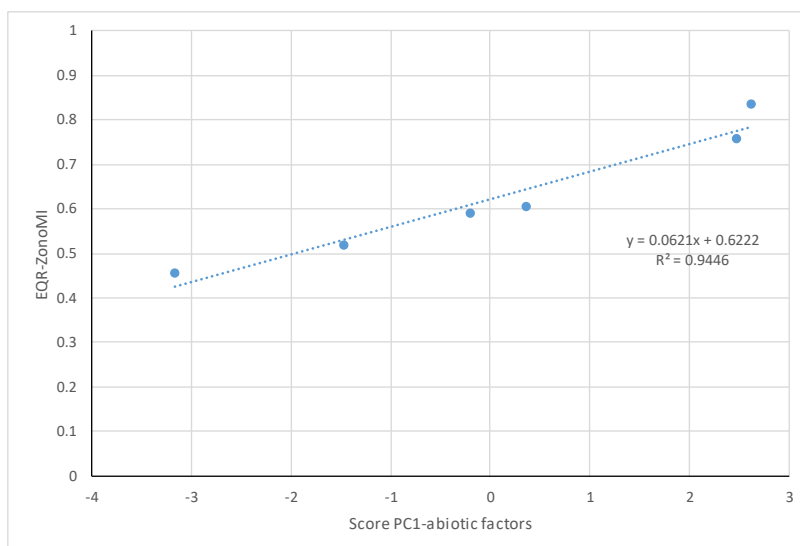
C1_x – vrijednost komponentnih bodova PC1 za postaju x,

C1_{najbolja} – vrijednost komponentnih bodova PC1 za virtualnu najbolju postaju,

C1_{najlošija} – vrijednost komponentnih bodova PC1 za virtualnu najlošiju postaju.

Valjanost ove metode je dokazana visokim stupnjem korelacije dobivenih OEK vrijednosti na pojedinim postajama s abiotičkim čimbenicima okoliša ($r=0,9718$; $p<0,01$). Razmatrani su okolišni parametri koji, prema ekspertnoj procjeni i literaturnim navodima, najviše utječu na stanje biljke, a pod utjecajem su antropogenih aktivnosti. Analizirane su koncentracije kisika, nitrata, nitrita, amonijaka, fosfata, silikata te ukupni dušik i fosfor u vodi.

Analiza pokazuje značajnu korelaciju između ZonoMI indeksa (izračunatog iz rezultata prve osi PCA analize varijabli cvjetnice *Zostera noltei* na pojedinoj postaji) i kvalitete okoliša na tim područjima (rezultati prve osi PCA analize okolišnih parametara) (Slika 2.1).



Slika 2.1. Linearna regresija između OEK vrijednosti dobivenih ZonoMI metodom i rezultata prve osi PCA analize okolišnih parametara.

2.1. METHODS AND REQUIRED BQE PARAMETERS

Table 1. Overview of the metrics included in the national method - example given for phytoplankton. For other BQEs there will be other indicative parameters (see Table 1. Page 17, IC Guidance)

MS	Taxonomic composition	Abundance
HR	Da	Da

Combination rule used in the method

Metoda ZonoMI (*Zostera noltei* multivariatni indeks) se temelji na monitoringu samo jedne vrste cvjetnice *Zostera noltei* te nije potrebno kombinirati ove parametre.

Rezultati mjerenja varijabli cvjetnice (9 varijabli) se objedinjuju u jedan pokazatelj, a za izračunavanje ZonoMI indeksa koristi se multivarijatna statistička analiza glavnih komponenti (PCA).

Conclusion on the WFD compliance (are all the indicative parameters included; if not, why)

Uključeni su svi indikativni parametri te je metoda u skladu s WFD.

2.2. SAMPLING AND DATA PROCESSING

Description of sampling and data processing:

- Sampling time and frequency: srpanj, jednom u četiri godine
- Sampling method: Uzorkovanje se obavlja na unaprijed određenim postajama nacionalne mreže monitoringa na dubini od 0,5 - 1 m. Uzorci cvjetnice sakupljaju se pomoću nazubljenog korera promjera 15 cm na pet točaka međusobno udaljenih 10 - 15 m, na stalnoj dubini. Uzorci za kemijske analize biljnog tkiva sakupljaju se na tri točke koje su međusobno udaljene 20 m. Biljni materijal se sakuplja ručno unutar kvadrata dimenzija 20 x 20 cm. Uzorci se zamrzavaju do daljnje obrade u laboratoriju.
- Data processing: U laboratoriju se izbroje čuperci cvjetnice sakupljeni korerima. Važe se suha masa pojedini biljnih dijelova. Iz dobivenih vrijednosti se računaju srednje vrijednosti pojedinih varijabli za svaku postaju. Sakupljeni biljni materijal se pripremi za kemijsku analizu koja uključuje mjerenje postotka dušika, omjera koncentracije izotopa dušika ($\delta^{15}\text{N}$), količine ($\mu\text{g/g}$ suhe mase) bakra, olova, kadmija i cinka u suhoj masi rizoma.

U PCA analizu ulaze svi podaci izmjereni na svim postajama na kojima se obavlja istraživanje. Za svaku postaju se dobije jedna brojčana vrijednost.

- Identification level: nivo vrste

2.3. NATIONAL REFERENCE CONDITIONS

Detailed description of setting of national reference conditions

Referentna vrijednost predstavlja najbolje zabilježene vrijednosti biomase i gustoće čuperaka cvjetnice *Zostera noltei* koje su zabilježene tijekom istraživanja od 2011. do 2018. godine.

Gustoća čuperaka: 7600 čuperaka po m²

Biomasa cvjetnice: 650 g suhe mase cvjetnice (listovi, rizomi i korijenje) po m²

2.4. NATIONAL BOUNDARY SETTING

Detailed description of methodology used to derive ecological class boundaries.

Prema zahtjevima za implementaciju ODV (European Commission, 2000), omjer ekološke kakvoće (OEK) je podijeljen u pet kategorija, od 0 do 1, a koje se odnose na pet statusa ekološke kvalitete: vrlo dobro, dobro, umjereno, loše i vrlo loše. Prema García-Marín et al. (2013), kada se kao biološki element kakvoće koristi cvjetnica *Zostera noltei*, vrlo loš status uključuje vrijednosti od 0 do 0,1, a ostale granice su raspodijeljene tako da ostatak skale dijele na četiri jednaka dijela. Raspodjela skale na jednake dijelove je u skladu s protokolom Pollarda i van de Bunda (2005).

Koristi se sljedeća skala:

1-0,775 (vrlo dobro)

0,774-0,550 (dobro)

0,549-0,325 (umjereno)

0,324-0,1 (loše)

0,1-0 (vrlo loše)

2.5. PRESSURES ADDRESSED

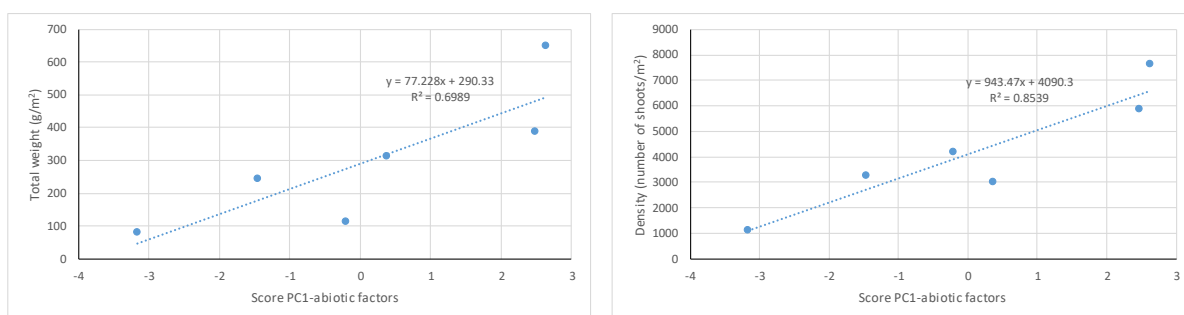
Please describe the pressures addressed by the method and provide pressure-response relationship (graph, equation)

ZonoMI indeks se odnosi općenito na eutrofikaciju i degradaciju u ekosustavu. Uključenost teških metala u metodu omogućuje detektiranje zagađenja iz industrije i pomorskog prometa.

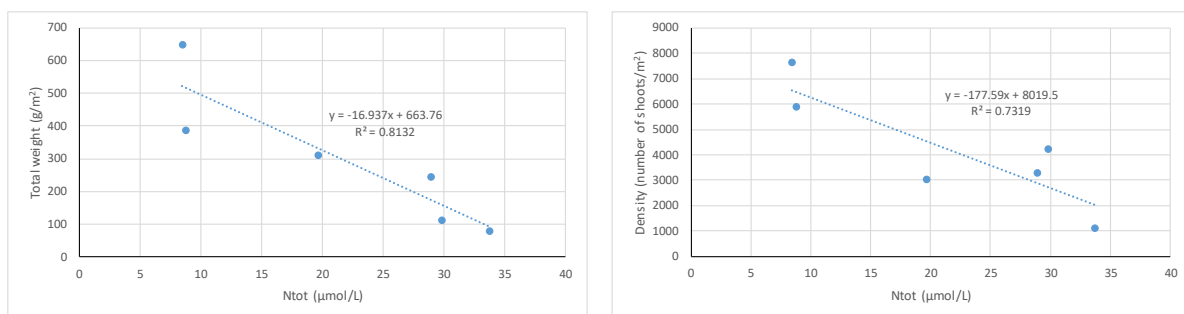
Povezanost pritisaka iz okoliša i odgovora cvjetnice ustanovljena je visokim stupnjem korelacije dobivenih OEK vrijednosti (izračunatih iz rezultata prve osi PCA analize varijabli cvjetnice *Zostera noltei*; ZonoMI indeks) na pojedinim postajama s mjerenim abiotičkim čimbenicima okoliša (rezultati prve osi PCA analize okolišnih parametara) ($r=0,9718$; $p<0,01$).

Linearnom regresijom ustanovljena je povezanost ukupne mase i gustoće cvjetnice s rezultatima prve osi PCA analize okolišnih parametara (Slika 2.5.1).

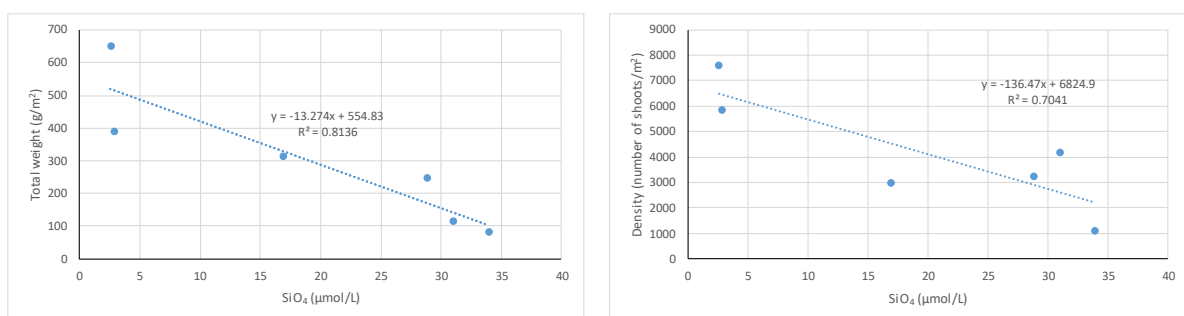
Linearnom regresijom ustanovljena je i povezanost ukupne mase i gustoće cvjetnice s pojedinačnim okolišnim parametrima, za koje je na osnovi ekspertne procjene zaključeno da imaju najveći utjecaj na stanje cvjetnice. Rezultati su grafički prikazani (Slike 2.5.2, 2.5.3, 2.5.4).



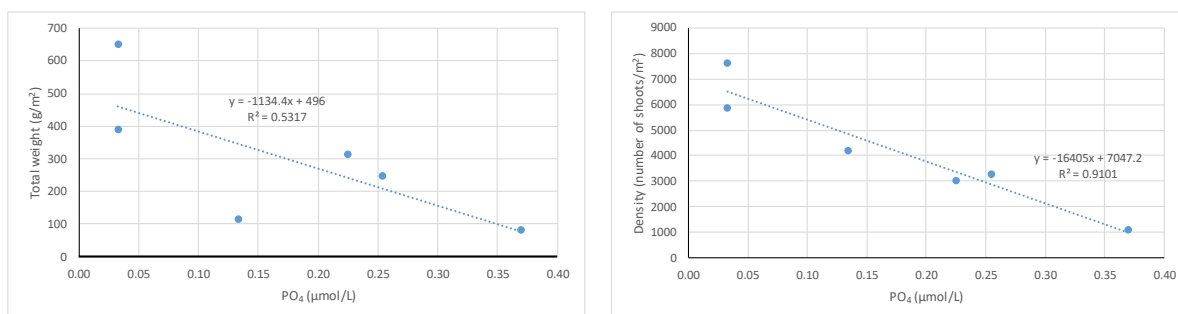
Slika 2.5.1. Linearna regresija između ukupne suhe mase cvjetnice (g/m^2) i gustoće cvjetnice (broj čuperaka/ m^2) *Zostera noltei* i rezultata prve osi PCA analize abiotičkih parametara.



Slika 2.5.2. Linearna regresija između ukupne suhe mase cvjetnice (g/m^2) i gustoće cvjetnice (broj čuperaka/ m^2) *Zostera noltei* i koncentracije dušika ($\mu\text{mol/L}$).



Slika 2.5.3. Linearna regresija između ukupne suhe mase cvjetnice (g/m^2) i gustoće cvjetnice (broj čuperaka/ m^2) *Zostera noltei* i koncentracije silikata ($\mu\text{mol/L}$).



Slika 2.5.4. Linearna regresija između ukupne suhe mase cvjetnice (g/m^2) i gustoće cvjetnice (broj čuperaka/ m^2) *Zostera noltei* i koncentracije fosfata ($\mu\text{mol}/\text{L}$).

3. WFD COMPLIANCE CHECKING

The first step in the Intercalibration process requires the checking of national methods considering the following WFD compliance criteria.

Table 2. List of the WFD compliance criteria and the WFD compliance checking process and results

Compliance criteria	Compliance checking
Ecological status is classified by one of five classes (high, good, moderate, poor and bad).	Da
High, good and moderate ecological status are set in line with the WFD's normative definitions (Boundary setting procedure)	Da
All relevant parameters indicative of the biological quality element are covered (see Table 1 in the IC Guidance). A combination rule to combine parameter assessment into BQE assessment has to be defined. If parameters are missing, Member States need to demonstrate that the method is sufficiently indicative of the status of the QE as a whole	Da (uključena je samo jedna vrsta, cvjetnica <i>Zostera noltei</i> , pa nema potrebe za kombiniranjem parametara)
Assessment is adapted to intercalibration common types that are defined in line with the typological requirements of the Annex II WFD and approved by WG ECOSTAT	Da
The water body is assessed against type-specific near-natural reference conditions	Da
Assessment results are expressed as EQRs	Da
Sampling procedure allows for representative information about water body quality/ecological status in space and time	Da
All data relevant for assessing the biological parameters specified in the WFD's normative definitions are covered by the sampling procedure	Da
Selected taxonomic level achieves adequate confidence and precision in classification	Da (uključena je samo jedna vrsta, cvjetnica <i>Zostera noltei</i>)

4. IC FEASIBILITY CHECKING

The intercalibration process ideally covers all national assessment methods within a GIG. However, the comparison of dissimilar methods (“apples and pears”) has clearly to be avoided. Intercalibration exercise is focused on specific type / biological quality element / pressure combinations. The second step of the process introduces an “IC feasibility check” to restrict the actual intercalibration analysis to methods that address the same common type(s) and anthropogenic pressure(s), and follow a similar assessment concept.

4.1. TYPOLOGY

Does the national method address the same common type(s) as other methods in the Intercalibration group? Provide evaluation if IC feasibility regarding common IC types.
Da. ZonoMI indeks je upotrebljiv za interkalibracijski tip estuariji (slanog klina).

4.2. PRESSURES ADDRESSED

Does the national method address the same pressure(s) as other methods in the Intercalibration group? Provide evaluation if IC feasibility regarding pressures addressed.

Da. Dostupni su podaci o pritiscima okoliša (eutrofikacija) i mjerenim parametrima cvjetnice *Zostera noltei* za vodna tijela prijelaznih voda.

4.3. ASSESSMENT CONCEPT

Does the national method follow the same assessment concept as other methods in the Intercalibration group? Provide evaluation if IC feasibility regarding assessment concept of the intercalibrated methods

Ova metoda koristi isti koncept procjene kao ostale metode koje se temelje na multivarijantnoj analizi bioloških i kemijskih značajki morskih cvjetnica. Temelji se na vrsti *Zostera noltei*.

4.4. CONCLUSION ON THE INTERCALIBRATION FEASIBILITY

Provide conclusions on the IC feasibility.

ZonoMI indeks uključuje biološke i kemijske parametre morske cvjetnice *Zostera noltei*. Metoda je testirana za prijelazne vode na području Republike Hrvatske. Interkalibracija ove metode je moguća s drugim metodama koje se baziraju na cvjetnici *Zostera noltei* u istim tipovima prijelaznih voda.

5. DESCRIPTION OF THE BIOLOGICAL COMMUNITIES

DESCRIPTION OF THE BIOLOGICAL COMMUNITIES AT HIGH STATUS

Značajke zajednice morske cvjetnice *Zostera noltei*, biomasa i gustoća livade, u visokom statusu su vrlo slične značajkama koje odgovaraju referentnim vrijednostima. Očekivane gustoće su iznad 6000 čuperaka po m², a suhe mase cvjetnice (listovi, rizomi i korijenje) po m² veće od 500 g.

DESCRIPTION OF THE BIOLOGICAL COMMUNITIES AT GOOD STATUS

Očekivane gustoće čuperaka cvjetnice *Zostera noltei* u livadama koje predstavljaju dobro stanje okoliša u rasponu su od 4400 do 6000 čuperaka po m², a vrijednosti suhe mase cvjetnice (listovi, rizomi i korijenje) po m² u rasponu su od 370 g do 500 g.

DESCRIPTION OF THE BIOLOGICAL COMMUNITIES AT MODERATE STATUS

Očekivane gustoće čuperaka cvjetnice *Zostera noltei* u livadama koje predstavljaju umjereno stanje okoliša u rasponu su od 2800 do 4400 čuperaka po m², a vrijednosti suhe mase cvjetnice (listovi, rizomi i korijenje) po m² u rasponu su od 230 g do 370 g.

6. REFERENCES

Brun, F. G., F. Cummaudo, I. Olivé, J. J. Vergara, J. L. Pérez-Lloréns (2007) Clonal extent, apical dominance and networking features in the phalanx angiosperm *Zostera noltii* Hornem. *Mar. Biol.*, 151: 1917-1927.

Brun, F. G., I. Hernández, J. J. Vergara, G. Peralta, J. L. Pérez-Lloréns (2002) Assessing the toxicity of ammonium pulses to the survival and growth of *Zostera noltii*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 225: 177-187.

Brun, F. G., I. Olivé, E. J. Malta, J. J. Vergara, I. Hernández, J. L. Pérez-Lloréns (2008) Increased vulnerability of *Zostera noltii* to stress caused by low light and elevated ammonium levels under phosphate deficiency. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 365: 67-75.

Cabaço, S., R. Machás, R. Santos (2007) Biomass-density relationships of the seagrass *Zostera noltii*: a tool for monitoring anthropogenic nutrient disturbance. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 74: 557-564.

Cabaço, S., R. Machás, V. Vieira, R. Santos (2008) Impacts of urban wastewater discharge on seagrass meadows (*Zostera noltii*). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 78: 1-13.

European Commission (2000) Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council Establishing a Framework for the Community action in the Field of Water Policy. *Official Journal L* 327.

García-Marín, P., S. Cabaço, I. Hernández, J. J. Vergara, J. Silva, R. Santos (2013) Multi-metric index based on the seagrass *Zostera noltii* (ZoNI) for ecological quality assessment of coastal and estuarine systems in SW Iberian Peninsula. *Marine Pollution Bulletin*, 68: 46-54.

Leston, S., A. I. Lillebø, M. A. Pardal (2008) The response of primary producer assemblages to mitigation measures to reduce eutrophication in a temperate estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 77: 688-696.

Lopez y Royo, C., G. Casazza, C. Pergent-Martini, G. Pergent (2010) A biotic index using the seagrass *Posidonia oceanica* (BiPo) to evaluate ecological status of coastal waters. *Ecol. Ind.*, 10: 380-389.

Machás, R. (2007) Isotopic tracking of sources in coastal systems: special emphasis to *Zostera noltii* (Horneman) foodweb. PhD Thesis. Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências do Mar e Ambiente.

- Malea, P., S. Haritonidis (1999) *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers. as a bioindicator of metals in Thermaikos Gulf, Greece, during monthly sampling. *Botanica Marina*, 42: 419-430.
- Martínez-Crego, B., A. Vergés, T. Alcoverro, J. Romero (2008) Selection of multiple seagrass indicators for environmental biomonitoring. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 361: 93-109.
- Oliva, S., O. Mascaró, I. Llagostera, M. Pérez, J. Romero (2012) Selection of metrics based on the seagrass *Cymodocea nodosa* and development of a biotic indeks (CYMOX) for assessing ecological status of coastal and transitional waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 114: 7-17.
- Orfanidis, S., V. Papathanasiou, S. Gounaris (2007) Body size descriptor of *Cymodocea nodosa* indicates anthropogenic stress in coastal ecosystems. *Transitional Waters Bulletin*, 2: 1-7.
- Orfanidis, S., V. Papathanasiou, S. Gounaris, Th. Theodosiou (2010) Size distribution approaches for monitoring and conservation of coastal *Cymodocea* habitats. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.*, 20(2): 177-188.
- Orlando-Bonaca, M., J. Francé, B. Mavrič, M. Grego, L. Lipej, V. Flander-Putrlle, M. Šiško, A. Falace (2015) A new indeks (MediSkew) for the assessment of the *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson meadow's status. *Marine Environmental Research*, 110: 132-141.
- Pergent-Martini, C., V. Leoni, V. Pasqualini, G.D. Ardizzone, E. Balestri, R. Bedini, A. Belluscio, T. Belsher, J. Borg, C.F. Boudouresque, S. Boumaza, J.M. Bouquegneau, M.C. Buia, S. Calvo, J. Cebrian, E. Charbonnel, F. Cinelli, A. Cossu, G. Di Maida, B. Dural, P. Francour, S. Gobert, G. Lepoint, A. Meinesz, H. Molenaar, H.M. Mansour, P. Panayotidis, A. Peirano, G. Pergent, L. Piazzzi, M. Pirrotta, G. Relini, J. Romero, J.L. Sanchez-Lizaso, R. Semroud, P. Shembri, A. Shili, A. Tomasello, B. Velimirov (2005) Descriptors of *Posidonia oceanica* meadows: Use and application. *Ecological Indicators*, 5: 213-230.
- Peralta, G., F. G. Brun, I. Hernández, J. J. Vergara, J. L. Pérez-Lloréns (2005) Morphometric variations as acclimation mechanisms in *Zostera noltii* beds. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 64: 347-356.
- Plus, M., J.-M. Deslous-Paoli, I. Auby, F. Dagault (2001) Factors influencing primary production of seagrass beds (*Zostera noltii* Hornem.) in the Thau lagoon (French Mediterranean coast). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 259: 63-84.
- Pollard, P., W. van de Bund (2005) Template for the development of a boundary setting protocol for the purposes of the intercalibration exercise. Common Implementation Strategy – Working Group A ECOSTAT.
- Romero, J., B. Martínez-Crego, T. Alcoverro, M. Pérez (2007) A multivariate indeks based on the seagrass *Posidonia oceanica* (POMI) to assess ecological status of coastal waters under the water framework directive (WFD). *Mar. Pollut. Bull.*, 55: 196-204.

3. Metodologija ocjene ekološkog stanja za BEK Makrofiti – morske cvjetnice

Predložena nova metoda *Zostera noltei* multivarijantni indeks (ZonoMI) za izračunavanje ekološkog stanja i monitoring prijelaznih voda koristi morsku cvjetnicu *Zostera noltei* Hornemann.

3.1. Uzorkovanje

Vrijeme uzorkovanja

Uzorkovanje vrste *Zostera noltei* u prijelaznim vodama obavlja se u srpnju kada su biljke najbolje razvijene.

Izbor mjerne postaje i dubine uzorkovanja

Uzorkovanje se obavlja na unaprijed određenim postajama nacionalne mreže monitoringa na kojima se sakupljaju uzorci makrofita. Uzorkovanje se obavlja na većim livadama na dubini od 0,5 - 1 m.

Oprema potrebna za uzorkovanje

Za uzorkovanje morske cvjetnice *Zostera noltei* u prijelaznim vodama potrebna je sljedeća oprema:

- čamac,
- ronilačka oprema,
- nazubljeni korer promjera 15 cm,
- kvadrati veličine 20x20 cm,
- podvodna tablica s grafitnom pisaljkom,
- vodootporni flomaster,
- posude za prijenos uzoraka,
- plastične kadice,
- najlonske mrežaste vrećice (oko mreže < 0,5 mm),
- plastične vrećice,
- terenski protokol.

Način uzorkovanja

Na svakoj mjernoj postaji uzorci se sakupljaju pomoću nazubljenog korera na pet točaka međusobno udaljenih 10 - 15 m, na stalnoj dubini. Neposredno nakon uzorkovanja se sadržaj korera prebacuje u najlonske mrežaste vrećice te se ispire od sedimenta. Naknadno na kopnu se uzorak prebacuje u prethodno označene plastične vrećice (šifra mjerne postaje, datum uzorkovanja, broj točke uzorkovanja). Uzorci se zamrzavaju do daljnje obrade u laboratoriju.

Uzorci za kemijske analize biljnog tkiva sakupljaju se na tri točke koje su međusobno udaljene 20 m. Biljni materijal se sakuplja ručno unutar kvadrata dimenzija 20 x 20 cm. U vodi se uzorak prebacuje u najlonske mrežaste vrećice te se ispire od sedimenta, a naknadno na kopnu u prethodno označene plastične vrećice (šifra mjerne postaje, datum uzorkovanja, broj točke uzorkovanja). Uzorci se zamrzavaju do daljnje obrade u laboratoriju.

3.2. Laboratorijska obrada uzoraka

U laboratoriju se izbroje čuperci cvjetnice sakupljeni korerima (5 uzoraka).

Uzorci cvjetnice se zatim razdvoje na listove, rizome i korijenje. Pojedini biljni dijelovi se stavljaju u označene papirnate omotnice te se suše 48 sati u sušioniku na 70°C. Važe se suha masa uzoraka.

Iz dobivenih vrijednosti suhih masa za svaki korer se izračunava:

- ukupna suha masa korijenja, rizoma i listova (TW, total weight),
- omjer suhe mase korijenja i zbroja suhe mase listova i korijenja (RWR, root weight ratio).

Iz dobivenih vrijednosti se računaju srednje vrijednosti za pojedinu postaju.

U laboratoriju se iz uzoraka cvjetnice koji su sakupljeni unutar kvadrata (3 uzoraka) odvoje rizomi te pripremaju za daljnju kemijsku analizu. Rizomi se spremaju u papirnate omotnice te se suše 48 sati u sušioniku na 70°C. Osušeni uzorci se samelju u tarioniku te pomoću treskalice s agatovom kuglom usitne u fini homogenizirani prah. Prah se pohranjuje u staklene posudice s odgovarajućim oznakama do daljnje kemijske obrade.

Kemijska analiza rizoma uključuje analizu sljedećih kemijskih pokazatelja:

- postotak dušika (% N) – postotak dušika u suhoj masi rizoma,
- izotop dušika ^{15}N – omjer koncentracije izotopa dušika ($\delta^{15}\text{N}$) u suhoj masi rizoma,

- bakar u rizomima – količina bakra ($\mu\text{g/g}$ suhe mase) u suhoj masi rizoma,
- olovo u rizomima – količina olova ($\mu\text{g/g}$ suhe mase) u suhoj masi rizoma,
- kadmij u rizomima – količina kadmija ($\mu\text{g/g}$ suhe mase) u suhoj masi rizoma,
- cink u rizomima – količina cinka ($\mu\text{g/g}$ suhe mase) u suhoj masi rizoma.

3.3. Izračunavanje indeksa/pokazatelja za ocjenu ekološkog stanja

Pokazatelj i modul za ocjenu ekološkog stanja na temelju makrofita

Za ocjenu ekološkog stanja na temelju biološkog elementa makrofita potrebno je odrediti modul za opću degradaciju izračunavanjem *Zostera noltei* multivarijantnog indeksa (ZonoMI).

Biološki element kakvoće: Makrofiti – morske cvjetnice

Pokazatelj/indeks: *Zostera noltei* multivarijantni indeks (ZonoMI)

Opterećenje na koje ukazuje biološki pokazatelj: Opća degradacija

Modul: Opća degradacija

Određivanje opće degradacije na temelju makrofita metodom ZonoMI

Metoda ZonoMI (*Zostera noltei* multivarijantni indeks) se temelji na mjerenju više različitih varijabli (elemenata) koje opisuju stanje biljke, populacije te zagađenje. Pomoću analize glavnih komponenti (PCA) izračunava se konačna vrijednost omjera ekološke kakvoće (OEK).

Izračunavanje ekološkog stanja na temelju makrofita metodom ZonoMI

Za izračunavanje ZonoMI indeksa potrebno je obaviti mjerenja i kemijske analize za sljedeće elemente ocjene:

- ukupna suha masa korijenja, rizoma i listova (TW, total weight),
- omjer suhe mase korijenja i zbroja suhe mase listova i korijenja (RWR, root weight ratio),
- gustoća čuperaka,
- postotak dušika (% N) – postotak dušika u suhoj masi rizoma,
- izotop dušika ^{15}N – omjer koncentracije izotopa dušika ($\delta^{15}\text{N}$) u suhoj masi rizoma,
- bakar u rizomima – količina bakra ($\mu\text{g/g}$ suhe mase) u suhoj masi rizoma,
- olovo u rizomima – količina olova ($\mu\text{g/g}$ suhe mase) u suhoj masi rizoma,
- kadmij u rizomima – količina kadmija ($\mu\text{g/g}$ suhe mase) u suhoj masi rizoma,
- cink u rizomima – količina cinka ($\mu\text{g/g}$ suhe mase) u suhoj masi rizoma.

Rezultati mjerenja su izraženi u različitim mjernim jedinicama, a ZonoMI metodom se objedinjuju u jedan pokazatelj. Za izračunavanje ZonoMI indeksa koristi se multivarijatna statistička analiza glavnih komponenti (PCA) na transformiranim rezultatima mjerenja. Dobivene vrijednosti prve komponente (C1) predstavljaju vrijednosti ekološkog stanja svake postaje.

Vrijednost OEK-a svake postaje se izračunava prema sljedećoj formuli:

$$OEK_x = \frac{C1_x - C1_{najlošija}}{C1_{najbolja} - C1_{najlošija}}$$

gdje je:

OEK_x (0-1) – OEK za postaju x,

C1_x – vrijednost komponentnih bodova PC1 za postaju x,

C1_{najbolja} – vrijednost komponentnih bodova PC1 za virtualnu najbolju postaju,

C1_{najlošija} – vrijednost komponentnih bodova PC1 za virtualnu najlošiju postaju.

U PCA analizu ulaze svi podaci izmjereni na svim postajama na kojima se obavlja istraživanje. Za svaku postaju se dobije jedna brojučana vrijednost (C1_x). Vrijednosti C1_{najbolja} i C1_{najlošija} se dobiju istom analizom, ali ne predstavljaju stvarne postaje već virtualnu najbolju i najlošiju postaju. Vrijednosti za te virtualne postaje se dobiju tako da se za najbolju koriste najbolje vrijednosti mjerenih elemenata ocjene koje su zabilježene na postajama, a za najlošiju postaju najlošije zabilježene vrijednosti.

Referentne zajednice i opis bioloških zajednica u vrlo dobrom, dobrom i umjerenom stanju

Referentne zajednica

Referentne zajednice predstavljaju izvrsno razvijene livade cvjetnice *Zostera noltei*. Gustoća čuperaka u tim zajednicama je veća od 7600 čuperaka po m², a biomasa cvjetnice veća je od 650 g suhe mase cvjetnice (listovi, rizomi i korijenje) po m².

Zajednice u vrlo dobrom stanju

Značajke zajednice morske cvjetnice *Zostera noltei*, biomasa i gustoća livade, su vrlo slične značajkama koje odgovaraju referentnim vrijednostima. Očekivane gustoće su iznad 6000 čuperaka po m², a suhe mase cvjetnice (listovi, rizomi i korijenje) po m² veće od 500 g.

Zajednice u dobrom stanju

Očekivane gustoće čuperaka cvjetnice *Zostera noltei* u livadama koje predstavljaju dobro stanje okoliša u rasponu su od 4400 do 6000 čuperaka po m², a vrijednosti suhe mase cvjetnice (listovi, rizomi i korijenje) po m² u rasponu su od 370 g do 500 g.

Zajednice u umjerenom stanju

Očekivane gustoće čuperaka cvjetnice *Zostera noltei* u livadama koje predstavljaju umjereno stanje okoliša u rasponu su od 2800 do 4400 čuperaka po m², a vrijednosti suhe mase cvjetnice (listovi, rizomi i korijenje) po m² u rasponu su od 230 g do 370 g.

Referentne i najlošije vrijednosti pokazatelja ekološkog stanja

Referentna vrijednost predstavlja najbolje zabilježene vrijednosti biomase i gustoće čuperaka cvjetnice *Zostera noltei* koje su zabilježene tijekom istraživanja od 2011. do 2018. godine.

Referentna vrijednost gustoće čuperaka iznosi 7600 čuperaka po m², a biomase cvjetnice: 650 g suhe mase cvjetnice (listovi, rizomi i korijenje) po m².

Najlošije zabilježene vrijednosti ovih pokazatelja u livadama cvjetnice od 2011. do 2018. su sljedeće: 1100 čuperaka po m² te 80 g suhe mase cvjetnice (listovi, rizomi i korijenje) po m².

3.4. Utvrđivanje granica klasa

Omjer ekološke kakvoće (OEK) je podijeljen u pet kategorija, od 0 do 1, a koje se odnose na pet statusa ekološke kvalitete: vrlo dobro, dobro, umjereno, loše i vrlo loše. Vrlo loš status uključuje vrijednosti od 0 do 0,1, a ostale granice su raspodijeljene tako da ostatak skale dijele na četiri jednaka dijela.

Koristi se sljedeća skala:

1-0,775 (vrlo dobro)

0,774-0,550 (dobro)

0,549-0,325 (umjereno)

0,324-0,1 (loše)

0,1-0 (vrlo loše)

3.5. Izračunavanje omjera ekološke kakvoće (OEK)

Rezultat ZonoMI indeksa predstavlja vrijednost omjera ekološke kakvoće određene na temelju makrofita.

Ukupna ocjena ekološkog stanja na temelju biološkog elementa kakvoće makrofita je vrijednost ZonoMI indeksa, odnosno $OEK_{\text{makrofita}} = OEK_{\text{ZonoMI}}$.

3.6. Terenski protokol za uzorkovanje makrofita u prijelaznim vodama

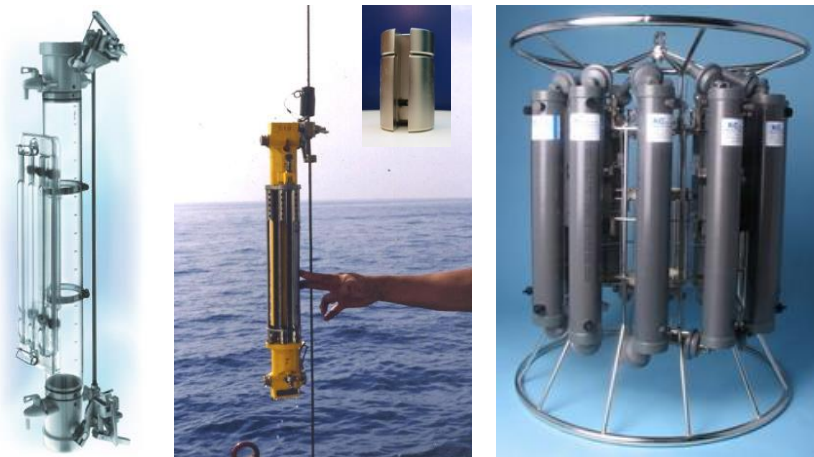
Terenski protokol za uzorkovanje morske cvjetnice *Zostera noltei* u prijelaznim vodama treba sadržavati:

- datum uzorkovanja,
- ime vodnog tijela,
- naziv i šifru mjerne postaje,
- koordinate postaje,
- imena osoba koje su obavile uzorkovanje,
- dubinu uzorkovanja,
- ostala opažanja koja nisu obuhvaćena gore navedenim, unose se u rubriku Napomene.

4. Metodologija ocjene ekološkog stanja za BEK Fitoplankton

4.1. Uzorkovanje

Uzorci morske vode za analizu sastava i brojnosti fitoplanktonske zajednice i određivanje koncentracije klorofila *a* uzimaju se Niskin ili Nansen-ovim crpcima (Slika 4.1.) na određenim dubinama. Uzorkovanje se obavlja na unaprijed određenim mjernim postajama nacionalne mreže monitoringa koja uključuje prijelazne vode.



Slika 4.1. Nansenov crpaci, Nansenov crpaci s utegom za zatvaranje i Niskin crpaci u rozeti

Crpaci se pričvrstite na konop ili brodsku sajlu i spusti do odgovarajuće dubine s oba kraja otvorena, a zatvaraju se pomoću utega koji se namjesti na konop i pusti. Kada se na konopu (sajli) osjeti lagani udarac, crpaci se izvlači na površinu. Bočice za uzimanje uzoraka se ispiru tri puta vodom iz crpaca te se napune.

Za određivanje koncentracije klorofila *a* potrebno je 500 ml vode. Poželjno je vodu odmah filtrirati na uređaju za filtraciju uz vakum do 65 kPa (Slika 4.2.) kroz staklene filtere "Whatman" GF/F, promjera 47 mm i promjera pora oko 0,7 μm . U slučaju intenzivnih fitoplanktonskih cvatnji dovoljno je 100-200 ml morske vode. Nakon filtriranja filteri se pohrane u zamrzivač, a fluorometrijska analiza se mora obaviti u roku od mjesec dana. Ukoliko nema mogućnosti za filtriranje uzoraka na brodu, uzorci morske vode se pohrane u hladnjak i filtriraju u roku od 24 sata.

Za određivanje brojnosti i sastava fitoplanktonske zajednice uzorci morske vode uzimaju se u bočice u kojima je prethodno dodan fiksativ (gluteraldehid, formaldehid ili lugol). Na bočicu je potrebno napisati oznaku postaje, dubinu i vrijeme uzorkovanja.



Slika 4.2. Uređaj za vakum filtriranje morske vode

4.2. Laboratorijska obrada uzoraka

Koncentracija klorofila *a* u uzorcima morske vode određuje se fluorometrijskom metodom (Strickland i Parsons, 1972). Brojnost i sastav fitoplanktonske zajednice određuje se sedimentacijskom metodom po Utermohl-u (1958) pomoću invertnog mikroskopa.

Određivanje koncentracije klorofila *a*

Filter sa sadržajem se homogenizira uz dodatak 90% acetona. Suspenzija se prelije u epruvetu za centrifugiranje, a homogenizator ispere s 90% acetonom. Ekstrakt sakupljen u epruveti nadopuni se acetonom do 10 ml, nakon čega se ostavi u mraku (do 24 sata) da bi se završila ekstrakcija pigmenata. Acetonski ekstrakt se zatim centrifugira 5 – 10 minuta na 5000 G i supernatant prebaci u kivetu za određivanje fluorescencije na laboratorijskom fluorometru prije i nakon zakiseljavanja (2 kapi 0,1M HCl). Koncentracija klorofila *a* izračuna se prema jednadžbi (Strickland i Parsons, 1972):

$$c_{Chl\ a} \left[mg\ m^{-3} \right] = \frac{F_D \left(\frac{T}{T-1} \right) \cdot (R_B - R_A) \cdot v}{V}$$

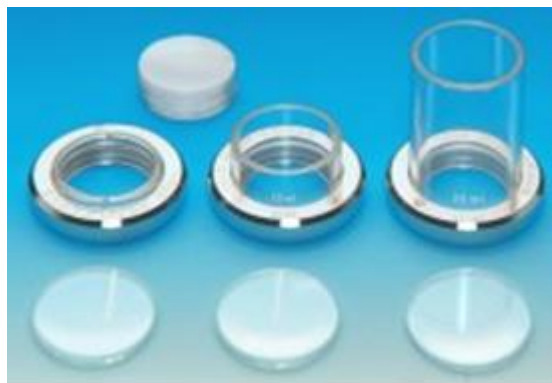
F_D - faktor vrata izražen u $mg\ m^{-3}$ i po jedinici fluorescencije

T - odnos fluorescencije klorofila *a* prije i poslije zakiseljenja (R_B/R_A)

- R_B - fluorescencija uzorka prije zakiseljenja
 R_A - fluorescencija uzorka poslije zakiseljenja
 v - volumen ekstrakta klorofila a u litrama
 V -volumen profiltriranog uzorka u litrama

Mikroskopiranje

Prije nalijevanja uzorka u sedimentacijske komorice potrebno ga je homogenizirati potresanjem boce s uzorkom. Uzorak se nalijeva u sedimentacijske komorice volumena 25 ml odnosno 5 ml u slučaju intenzivnih fitoplanktonskih cvatnji (Slika 4.3.).



Slika 4.3. Komorice za sedimentaciju uzoraka morske vode

Vrijeme sedimentacije je od 8 do 24 sata ovisno o volumenu poduzorka. Nakon sedimentacije određivanje fitoplanktonskih vrsta i brojenje stanica obavlja se na obrnutom mikroskopu (Slika 4.4.) uz povećanje od 200 i 400 puta.



Slika 4.4. Obrnuti mikroskop

Ovisno o brojnosti i veličini pojedine vrste, stanice se broje u odabranim vidnim poljima, transektima ili u pola dna komorice. Nanoplankton (stanice 2-20 µm) se broje u transektu pomoću objektiva 40x. Brojne fitoplanktonske stanice (ako su u prosjeku više od dvije u vidnom polju) se broje u slučajno odabranim vidnim poljima s pomoću objektiva 40x (fazni kontrast ili nomarski diferencijalni kontrast). Mikroplankton (stanice > 20 µm) se broje duž jednog ili više središnjih transekata s pomoću objektiva 20x. Ako je prisutan veliki broj stanica duž transekta koristi se metoda slučajno odabranih vidnih polja. Stanice koje su rijetke se broje u pola dna komorice.

Determinacija

Za određivanje taksonomskog sastava fitoplanktona koriste se sljedeći priručnici: Van Heurck, 1899; Peragallo, 1908; Lebour, 1925; Hustedt, 1930, 1931; Schiller, 1933, 1937; Cupp, 1943; Proškina Lavrenko, 1955; Wall i Dale 1968; Parke i Dixon, 1976; Lassus, 1980; Dodge, 1982; Sournia, 1986; Ricard, 1987, 1993, 1995; Viličić 2002.

Kvantifikacija

Abundancija fitoplanktonske zajednice se izražava kao broj stanica u litri vode. Površina uzorka koja se pregledava ovisi o brojnosti određene vrste. U pravilu se pregledava manja površina uzorka što je brojnost vrste koja se broji veća. Ovisno o abundanciji pojedine vrste se mogu brojati u:

- slučajno odabranim poljima
- transektu
- cijelom dnu komorice (ili ½ dna)

Kada se stanice broje u slučajno odabranim vidnim poljima, broj stanica u litri morske vode se izračuna prema sljedećoj formuli:

$$N = \frac{P \cdot \bar{X}}{p \cdot V}$$

N- broj stanica (L-1)

P- površina dna komorice

X- srednja vrijednost broja stanica po vidnom polju

p- površina vidnog polja

V- volumen uzorka (L)

Kada se stanice broje u jednom transektu, broj stanica u litri morske vode dobiva se na sljedeći način:

Broj stanica u jednom transektu se pomnoži s faktorom F, kako bi se dobio broj stanica u analiziranom volumenu poduzorka, odnosno u komorici. Faktor (F) za određeno povećanje mikroskopa izračunati na način da se površina dna komorice (P) podijeli s površinom transeкта (p).

U slučaju brojanja stanica u pola dna komorice, broj stanica u komorici dobije se na način da se ukupan broj stanica pomnoži sa 2, nakon čega se broj preračuna u broj stanica po litri. Sastav i brojnost pojedinog uzorka se upisuje u tzv. "Bilježnicu mikroskopiranja".

Računalna obrada podataka

Podaci o koncentraciji klorofila *a* i brojnosti i sastavu fitoplanktonske zajednice se upisuju u računalo koristeći Microsoft Excel. Podaci se dalje statistički obrađuju koristeći software STATISTICA 10, XLSTAT i PRIMER7.

Podaci o koncentraciji klorofila *a* se transformiraju na način da se logaritmiraju po bazi 10 i uklone se ekstremne vrijednosti izvan raspona (prosjeak ± 2.5 SD) u cilju dobivanja robusnijeg niza podataka. Na temelju novog skupa podataka izračunaju se prosječne koncentracije za svaku postaju i nakon toga se antilogaritmiraju.

Iz podataka o brojnosti i sastavu fitoplanktonske zajednice se izračunavaju: Hulburtove indeksi dominacije, učestalost cvatnji i Menhinickov indeks bioraznolikosti. Za izračunavanje navedenih metrika koriste se samo organizmi koji se mogu identificirati do razine vrste pomoću konvencionalne metode svjetlosne mikroskopije odnosno pojedinačni neodređeni taksoni (npr. *Navicula* sp. 1, *Cryptophyceae* sp. 1, *Taxa* sp.1). U cilju veće efikasnosti i pouzdanosti metode pri izračunavanju gore navedenih indeksa u obzir se uzimaju samo organizmi veći od 2 μ m koji se mogu odrediti pod svjetlosnim mikroskopom.

Za testiranje odgovora izabranih metrika na porast pritiska koristila se Spearman rank korelacija i linearna regresija.

4.3. Izračunavanje indeksa/pokazatelja za ocjenu ekološkog stanja

Za ocjenu ekološkog stanja prijelaznih voda koristi se Multimetrijski indeks fitoplanktona (MPI) kojeg su predložili Facca et al. (2013). Indeks ujedinjuje Hulburtove indekse dominacije, učestalost cvatnji, Menhinickov indeks raznolikosti i koncentraciju klorofila *a*. Pri izračunavanju MPI indeksa, brojčana vrijednost Hulburtove indeksa i učestalosti cvatnji se

oduzima od 100. Konačna vrijednost MPI indeksa se dobije kao srednja vrijednost od sva 4 omjera ekološke kakvoće (OEK) metrika koje su uključene u MPI indeks:

MPI = srednja vrijednost OEK (100- $\delta 2$); OEK (100-F); OEK (D); EQR (Chl *a*)

$\delta 2$ – Hulburtove indeks dominacije

F – Učestalost cvatnji

D – Menhinickov indeks raznolikosti

Chl *a* – Koncentracija klorofila *a*

Pokazatelji/indeksi za ocjenu ekološkog stanja

Hulburtove indeks dominacije ($\delta 2$) se izračunava prema prema sljedećoj formuli:

$$\delta 2 = 100(n_1 + n_2) / N$$

n_1 – abundancija najdominantnije vrste

n_2 – abundancija druge najdominantnije vrste

N – ukupna abundancija

Učestalost cvatnji nam pokazuje koliko je puta abundancija jedne vrste premašila 50% ukupne abundancije uz uvjet da je abundancija te vrste veća od 5×10^5 stanica/L.

Menhinickov indeks raznolikosti (D) se računa prema sljedećoj formuli:

$$D = S / \sqrt{N}$$

S – broj vrsta

N – ukupna abundancija

Menhinickov indeks se korigira množenjem s određenim faktorom u cilju smanjivanja pogreške nastale zbog izostavljanja pojedinih organizama koji nisu determinirani do razine vrste već su navedeni kao grupa vrsta (npr. *Pseudo-nitzschia* spp.). Faktor korekcije se računa kao omjer abundancije organizama određenih do razine vrste i ukupne abundancije koja uključuje abundanciju organizama određenih do razine vrste i abundanciju organizama koji nisu određeni do razine vrste već su navedeni kao grupa vrsta.

Podaci o **koncentraciji klorofila *a*** se transformiraju na način da se logaritmiraju po bazi 10 i uklone se ekstremne vrijednosti.

Sve četiri metrike uključene u izračunavanje MPI, pojedinačno su testirane na pritiske koje donosi eutrofikacija (Tablica 4.1.) Spearman rank korelacija je potvrdila pouzdanost korištenih metrika za procjenu ekološkog stanja s obzirom na proces eutrofikacije.

Tablica 4.1. Statistički značajna ($p < 0.05$) Spearman rank korelacija između svake metrike korištene za izračunavanje MPI indeksa i pritisaka. DIN otopljeni anorganski dušik, N ukupni dušik, PO₄ fosfati, P ukupni fosfor

	DIN	N ukupni	PO ₄	P ukupni	kisik
Hulburtov indeks $\delta 2$ (100- $\delta 2$)	-0.26	-0.25			-0.21
Učestalost cvatnji (100-F)	-0,19	-0,16			-0.13
Menhinickov indeks raznolikosti (D)	-0.23	-0.27	-0.17	-0.21	-0.33
Log10 Chl a	-0.20	-0.15			

Referentne zajednice i opis bioloških zajednica u vrlo dobrom, dobrom i umjerenom stanju

Abundancija fitoplanktonske zajednice u **referentnom i vrlo dobrom** ekološkom stanju je reda veličine 10^5 stanica L⁻¹. U zajednici dominiraju sitni flagelatni organizmi i dijatomeje. Često se javlja *Dynobryon* sp. (Chrysophyceae). Doprinos dinoflagelata ukupnoj brojnosti je nizak. **Dobar ekološki** status obilježavaju zajednice sličnog sastava kao i vrlo dobar, ali s većim abundancijama vrsta koje brzo rastu pri porastu koncentracije nutrijenata u okolišu (*Pseudonitzschia* spp., *Skeletonema marinoii*, *Cyclotella* sp.). **Umjeren ekološki status** karakteriziraju visoke abundancije (10^7 stanica L⁻¹). U toplijem dijelu godine se javljaju cvatnje dinoflagelata (npr. *Kryptoperidinium foliaceum*), veće abundancije vrsta iz porodice Eutreptiaceae.

Referentne i najlošije vrijednosti pokazatelja ekološkog stanja

Referentne vrijednosti su određene analizom seta podataka sakupljenog tijekom 2014. i 2015. godine. Uzorci su uzimani sezonski (2-6 puta godišnje) na 24 postaje smještene u estuarijima rijeka Mirne, Raše, Rječine, Zrmanje, Krke, Cetine, Jadra, Neretve i Omble. Ukupno je analizirano 256 uzoraka.

Stručnom su procjenom od najvećih vrijednosti koje smo dobili za Hulburtov indeks (100 - $\delta 2$), učestalost cvatnji (100 - F) i Menhinickov indeks raznolikosti (D) određene referentne vrijednosti (Tablica 4.2.) uzimajući u obzir stupanj antropogenog utjecaja pod kojim se određena postaja nalazi, a koji je prethodno procijenjen pomoću LUSI indeksa. Referentne vrijednosti su se odredile na temelju srednjih vrijednosti na analiziranim postajama. Kao referentna vrijednost za koncentraciju klorofila *a* uzet je 30. percentil od prosječnih i

antilogaritmiranih vrijednosti zbog različitih hidrodinamičkih uvjeta i prirodnih obilježja analiziranih estuarija. Rijeka Krka velikim dijelom svoga toka prolazi kroz šumska područja koja nisu pod jakim antropogenim utjecajem, ali usprkos tome donosi velike količine nutrijenata koje potiču rast fitoplanktonske zajednice. Ovakav porast biomase i cvatnje se mogu pripisati prirodnoj eutrofikaciji. Većina analiziranih postaja se nalazi pod umjerenim antropogenim opterećenjem osim estuarija rijeke Jadro koji je pod jakim antropogenim utjecajem. Zbog sličnog antropogenog utjecaja na estuarije s različitim hidrodinamičkim i ekološkim uvjetima, kao referentna vrijednost je uzet 30. percentil od prosječnih i antilogaritmiranih vrijednosti koncentracije klorofila *a*.

Tablica 4.2. Referentne i najlošija izmjerena vrijednost pokazatelja stanja koji se uzimaju u obzir pri izračunavanju Multimetrijskog indeksa fitoplanktona (MPI)

	Ref. vrijednost	Najlošija vrijednost
Hulburtov indeks (100 - $\delta 2$)	40	0
učestalost cvatnji (100 - F)	100	0
Menhinickov indeks (D)	0,025	0,0002
Antilog Chl <i>a</i>	0,5	12,37

Izračunavanje ekološkog stanja u pojedinačnom modulu

Omjer ekološke kakvoće (OEK) na skali od 0 do 1 koristi se za procjenu stanja. Omjer ekološke kakvoće za Hulburtov indeks (100 - $\delta 2$), učestalost cvatnji (100 - F) i Menhinickov indeks (D) određuje se kao omjer između srednje godišnje vrijednosti za određenu postaju i referentne vrijednosti.

OEK = srednja godišnja vrijednost mjerenja na određenoj postaji / referentna vrijednost

Omjer ekološke kakvoće za koncentraciju klorofila *a* računa se kao omjer referentne vrijednosti i srednje godišnje antilogaritmirane vrijednosti na određenoj postaji.

OEK (Chl *a*) = referentna vrijednost / srednja godišnja antilogaritmirana vrijednost na određenoj postaji

Konačna vrijednost MPI indeksa se dobije kao srednja vrijednost od sva 4 omjera ekološke kakvoće (OEK) metrika koje su uključene u MPI indeks:

MPI = srednja vrijednost OEK (100- $\delta 2$); OEK (100-F); OEK (D); EQR (Chl *a*)

4.4. Utvrđivanje granica klasa

Omjer ekološke kakvoće (OEK) je prema Okvirnoj direktivi o vodama (ODV) podijeljen u pet kategorija, od 0 do 1, a koje se odnose na pet statusa ekološke kvalitete: vrlo dobro, dobro, umjereno, loše i vrlo loše. Vrijednosti OEK-a za određena ekološka stanja prikazana su u tablici 4.3.

Tablica 4.3. Vrijednosti omjera ekološke kakvoće (OEK) za kategorije ekološkog stanja

Kategorija ekološkog stanja	OEK
Vrlo dobro	0,81 - 1,00
Dobro	0,61 - 0,80
Umjereno	0,41 - 0,60
Loše	0,21 - 0,40
Vrlo loše	0 - 0,2

4.5. Izračunavanje omjera ekološke kakvoće

Konačna vrijednost MPI indeksa se dobije kao srednja vrijednost sva 4 omjera ekološke kakvoće (OEK) metrika koje su uključene u MPI indeks (vidi pod 3.4):

$MPI = \text{srednja vrijednost OEK (100- } \delta_2); OEK (100-F); OEK (D); EQR (Chl a)$

5. Metodologija ocjene ekološkog stanja za BEK Ribe

5.1. Uzorkovanje

Uzorkovanja se obavljaju malim specijalnim potegačama za ulov riblje mlađi (Slika 5.1.). Uzorkovanje mrežama potegačama se obavlja na prosječno tri mikrolokacije (predstavljaju poduzorke ili replike) unutar jedne mjerne postaje čime je zahvaćen veći broj specifičnih mikrostaništa u pojedinom vodnom tijelu prijelaznih voda i osigurana reprezentativnost uzorka. Konačni rezultati se zasnivaju na srednjim vrijednostima ulova u smislu broja vrsta, broja jedinki i njihove biomase, preračunatim kao prosječni ulov po alatu za svaku mjernu postaju. Prilikom svakog uzorkovanja potrebno je mjeriti vrijeme tijekom kojeg se obavlja ribolov. Ribolov malim obalnim potegačama traje od početka zatvaranja lokacije mrežom do njenog izvlačenja na obalu (uobičajeno 30 minuta). Na temelju navedenih podataka se izračunava ribolovni napor i površina zahvaćena uzorkovanjem. Ribolovni napor se računa kao ulov (broj jedinki ili biomasa) po jedinici ribolovnog napora. Jedinica ribolovnog napora je jedan poteg kod mreže potegače.

Uzorkovanje je moguće provesti u proljetnom, ljetnom i jesenskom razdoblju, ali optimalno je uzorkovati u kasno proljetnom razdoblju.



Slika 5.1. Specijalna potegača za ulov riblje mlađi

Postaje uzorkovanja potrebno je odabrati na način da maksimalno obuhvaćaju raznolikost svih tipova staništa. Veličina postaje uzorkovanja mora biti dovoljna da uključuje životni prostor dominantnih vrsta i obuhvati sva karakteristična staništa, odnosno da kvalitetno predstavlja riblju zajednicu. Mjernu postaju treba odabrati i na temelju bioloških (biljni pokrov, sediment), reljefnih (položnost, nagib) i hidrografskih (dubina, brzina struje) čimbenika. Dodatno, mjerna postaja mora biti dovoljno velika kako bi se mogli obaviti dodatni potezi (replike) pri

uzorkovanju koji predstavljaju poduzorke. Odabir broja postaja unutar vodnog tijela mora biti dovoljan za kvalitetnu procjenu strukture, gustoće i dobne strukture populacija unutar zajednica riba. Uz obuhvaćanje što većeg broja staništa prilikom izbora postaje uzorkovanja treba uzeti u obzir što lakši pristup samom mjestu uzorkovanja i prethodno poznavanje određene postaje. Na samom mjestu uzorkovanja izmjere se geografske koordinate (pomoću GPS-a), fotografira mjesto uzorkovanja i navede ime postaje.

Za uzorkovanje riba prijelaznih voda potrebna je sljedeća oprema:

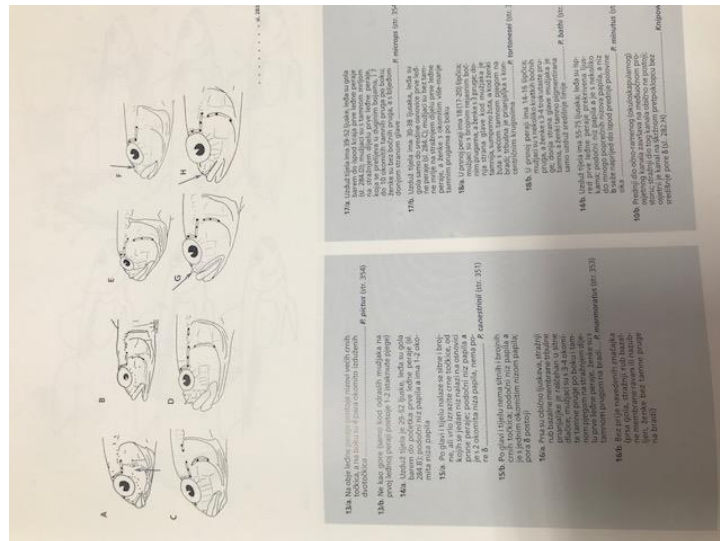
- čamac,
- specijane mreže potegače za ulov riblje mladi,
- trostruke mreže stajačice – poponice,
- kante za ulovljenu ribu,
- vaga,
- ihtiometar,
- posude za spremanje uzoraka,
- pribor za sekciju
- 4%-tna otopina formaldehida,
- prijenosni hladnjak (-15°C)
- terenski protokol,
- vodootporni flomaster,
- grafitna i kemijska olovka,
- terenska obuća i odjeća (gumene čizme, rukavice, kabanice),
- fotografski aparat,
- GPS uređaj,
- kutija s prvom pomoći.

5.2. Laboratorijska obrada uzoraka

Determinacija

Sve su ribe determinirane odmah po ulovu na temelju vanjskih morfoloških značajki uz pomoć determinacijskog ključa (Jardas, 1996) (Slika 5.2.). U slučaju sumnje u točnost određivanja (hibridi, vrlo bliske vrste, mlade jedinke, nove vrste) takve jedinke su konzervirane i odnesene u laboratorij radi daljnje determinacije. Riba su smrznute u prijenosnom hladnjaku, a po dolasku

u laboratorij prebačene u hladnjak. Sve konzervirane jedinke s različitih postaja odvojene su u zasebne posude koje su obilježene izvana.



Slika 5.2. Determinacija riba pomoću determinacijskog ključa od Jardas (1996)

Mikroskopiranje

Laboratorijska obrada uzoraka riba predviđa determinaciju onih riba koje nisu mogle biti determinirane na terenu zbog nejasnih morfoloških obilježja te ulovljenih jedinki slabo poznatih vrsta ili novih vrsta. U slučaju kada nije moguće makroskopski odrediti vrstu, identifikacijski elementi (npr. rupice na glavi glavoča) se promatraju mikroskopski, na lupi (npr. Stemi 305 trino, ZEISS) (Slika 5.3.).



Slika 5.3. Određivanje identifikacijskih elemenata pomoću stereomikroskopa

Kvantifikacija

Radi kvantificiranja potrebno je nakon utvrđivanja svake pojedine vrste, prebrojati jedinke po svakoj vrsti i odrediti ukupan broj vrsta. Slijedi mjerenje. Svakoj jedinki se odredi ukupna dužina tijela (TL) koja se mjeri se ihtiomrom od početka glave do vrha repne peraje i izražava se u cm; te masa ribe koja se izražava u gramima.

Računalna obrada podataka

Podaci o sastavu riblje zajednice se upisuju u računalo koristeći Microsoft Excel. Podaci se dalje statistički obrađuju koristeći software STATISTICA 10, XLSTAT i PRIMER7. Podaci o obrađuju za svaku postaju pojedinačno. Na osnovu 3 replike, izračunaju se prosječne vrijednosti za svaku postaju.

Za testiranje odgovora izabranih metrika na porast pritiska koristila se Spearman rank korelacija i linearna regresija.

5.3. Izračunavanje indeksa/pokazatelja za ocjenu ekološkog stanja

Za izračunavanje pokazatelja za ocjenu ekološkog stanja za ribe se koristi modificirani indeks za ribe u estuarijskim područjima (M-EFI) koji se sastoji od petnaest elemenata, od kojih svaki nastoji procijeniti različiti funkcionalni aspekt estuarijskih ribljih zajednica i ukupnu kvalitetu ekosustava (opću degradaciju). Temelji se na indeksu estuarijskih riba (EFI) koji se razvio za Scheldtov ušće u Flandri (Belgija) (Goethals i sur., 2002, Adriaenssens i sur., 2002a, Adriaenssens et al., 2002b) koji je izmijenjen za nekoliko parametara (specifične porodice riba za mediteransko područje) (Tablica 5.1., Tablica 5.2.). Izračunavaju se bodovi od 15 bioloških elemenata, a prosječna vrijednost rezultata predstavlja vrijednost M-EFI.

Metoda je sukladna WFD, u smislu uključenih indikativnih parametara, osim parametara bioakumulacije - bioloških testova. Međutim, indikativne vrste koji mogu ukazivati na nekoliko vrsta onečišćenja navedene su u tablici 5.2. prema postojećim izvorima iz literature o njihovoj ranjivosti vezanoj uz različita onečišćenja.

Pokazatelji/indeksi za ocjenu ekološkog stanja

Za izračunavanje M-EFI indeksa potrebno je:

- determinirati vrste;

- odrediti ukupan broj vrsta;
- izračunati postotak zastupljenosti pojedinih indikatorskih porodica ili rodova: % plosnatica (*Solea* sp.), % gira (*Spicara* sp.), % cipli (Mugilidae); % ljuskavke (Sparidae), % lubin (Moronidae);
- odrediti trofički sastav prema ishrani, tj. zastupljenosti omnivornih i piscivornih riba;
- grupirati vrste u kategorije i izraziti ih u postocima: tolerantne, estuarijske rezidentne vrste, diadromne vrste, nedorasle migratorne vrste te nove ili unešene vrste.

U tablici 5.1. prikazani su elementi indeksa te bodovi kojima se boduju pojedini elementi za izračunavanje M-EFI, a u tablici 5.2. trofička i ekološka obilježja pojedinih vrsta.

Za izračunavanje indeksa potrebno je nakon utvrđivanja svake pojedine vrste, prebrojati jedinke po svakoj vrsti i odrediti ukupan broj vrsta. Svakoj vrsti treba pridodati trofičko i ekološko obilježje prema tablici 5.2. Nakon toga se za svaki od 15 elemenata od kojih se sastoji M-EFI daje broj/bod (koliko u uzorku ima indikatorskih vrsta) ili izračuna postotak (koliko ima omnivora u odnosu na ukupni broj vrsta) te s obzirom na dobivene vrijednosti, istima se pridružuje vrijednost iz tablici 5.1. Ocjene/bodovi od svih 15 elemenata se zbroje i podijele s 15 (ukupni broj elemenata indeksa M-EFI). Dobivena vrijednost je EFI ocjena za određeni uzorak. Postupak se ponovi za sve postaje u vodnom tijelu, a njihova prosječna ocjena je ocjena ekološkog stanja vodnog tijela na temelju riba.

Tablica 5.1. M- EFI (Modified Estuarine Fish Index) za hrvatske prijelazne vode

Elementi indeksa	BODOVI				
	1	2	3	4	5
Ukupni broj vrsta	>= 2	>= 4	4 - 9	10 - 19	> 20
Vrste					
% plosnatice (<i>Solea</i> sp.)	<= 5	> 5 - 10 > 50 - 80			> 10 - 50
% gire (<i>Spicara</i> sp.)	<= 5	> 5 - 10 > 50 - 80			> 10 - 50
% cipli (Mugilidae)	<= 5	> 5 - 10 > 50 - 80			> 10 - 50
% ljuskavke (Sparidae)	<= 5	> 5 - 10 > 50 - 80			> 10 - 50
% lubini (Moronidae)	<= 5	> 5 - 10 > 50 - 80			> 10 - 50
Trofički sastav					
% omnivori	<= 1 > 80	> 1 - 2.5 > 20 - 80			> 2.5 - 20
% piscivori	<= 5	> 5 - 10			> 10 - 50

	> 80	> 50 - 80			
Tolerancija	< 1.20	1.20 - 1.59	1.60 - 1.99	2 - 3	> 3
Estuarijske rezidentne vrste (ERS)					
Broj ERS	0	1	2	3	> 4
% ERS	< 5 > 50	> 5 - 10 > 40 - 50			> 10 - < 40
% diadromne vrste	< 5 > 80	5 - 10 > 70 - 80			> 10 - 70
% morske juvenilne migrirajuće vrste	<= 10 > 90	5 - 10 > 80 - 90	> 20 - 30 > 70 - 80		> 30 - 70
Indikator vrste	0	1	2 - 3	3 - 5	> 5
Nove / unijete vrste	0	1	2 - 3	3 - 5	> 5

Tablica 5.2. Ekološke značajke riba obuhvaćenih M-EFI indeksom*

Vrsta	Način ishrane	Područje mrijesta	Ekološki zahtjevi	Indikator/ nova/unijeta vrsta
<i>Alburnus neretvae</i>	ZOO/INV	slatkovodno	ST	
<i>Carassius auratus gibelio</i>	OMNI	slatkovodno	EU	
<i>Gambusia hoolbroki</i>	OMNI	slatkovodno	ST	
<i>Lepomis gibbosus</i>	INS/INV	slatkovodno	LI	invazivna
<i>Leuciscus leuciscus</i>	OMNI	slatkovodno	RE	
<i>Padogobius martensi</i>	INS/INV	slatkovodno	EU	
<i>Phoxinus phoxinus</i>	INS/INV	slatkovodno	RE	
<i>Rodeus amarus</i>	INV/PISC	slatkovodno	RE	
<i>Rutilus basak</i>	INS/INV	slatkovodno	EU	
<i>Salmo gairdneri</i>	INV/PISC	slatkovodno	RE	
<i>Salmothymus obtusirostris salonitana</i>	INV/PISC	slatkovodno	RE	
<i>Salmo trutta trutta</i>	INV/PISC	slatkovodno	RE	
<i>Scardinius plotizza</i>	OMNI	slatkovodno	LI	
<i>Squalius squalus</i>	INV/PISC	slatkovodno	EU	
<i>Alosa fallax nilotica</i>	ZOO/PISC	more	EU	
<i>Engraulis encrasicolus</i>	ZOO/INV	more	EU	
<i>Sardina pilchardus</i>	ZOO/INV	more	EU	
<i>Sprattus sprattus</i>	ZOO/INV	more	EU	
<i>Belone belone</i>	INV	more	ST	
<i>Anguilla anguilla</i>	INV/PISC	more	EU	
<i>Conger conger</i>	INV/PISC	more	EU	
<i>Syngnathus abaster</i>	ZOO/INV	more	EU	
<i>Syngnathus acus</i>	ZOO/INV	more	EU	
<i>Syngnathus taenionotus</i>	ZOO/INV	more	EU	
<i>Syngnathus tenuirostris</i>	ZOO/INV	more	EU	
<i>Syngnathus typhle</i>	INV/PISC	more	EU	
<i>Hippocampus hippocampus</i>	OMNI	more	EU/RE	
<i>Nerophis maculatus</i>	ZOO/INV	more	EU	
<i>Nerophis ophidion</i>	ZOO/INV	more	EU	
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	OMNI	more	EU/RE	
<i>Serranus hepatus</i>	INV/PISC	more	EU	
<i>Serranus scriba</i>	INV/PISC	more	EU	
<i>Dicentrarchus labrax</i>	INV/PISC	riječna ušća	EU	
<i>Dicentrarchus punctatus</i>	INV/PISC	riječna ušća	EU	
<i>Lichia amia</i>	PISC	more	EU	
<i>Mullus barbatus</i>	INV	more (kanali)	EU	indikator
<i>Mullus surmuletus</i>	INV	more	ST	indikator
<i>Boops boops</i>	ZOO	more	ST	
<i>Diplodus annularis</i>	OMNI	more	EU	

<i>Diplodus puntazzo</i>	OMNI	more	EU	indikator
<i>Diplodus sargus</i>	INV	more	ST	indikator
<i>Diplodus vulgaris</i>	INV	more	ST	indikator
<i>Lithognathus mormyrus</i>	INV	more	EU	
<i>Oblada melanura</i>	INV	more	EU	
<i>Pagellus acarne</i>	INV	more	ST	
<i>Pagellus erythrinus</i>	INV	more	ST	
<i>Sarpa salpa</i>	HERB	more	ST	
<i>Sparus aurata</i>	INV/PISC	more	EU	
<i>Centrachantus cirrus</i>	INV	more	ST	
<i>Spicara flexuosa</i>	INV	more	ST	
<i>Spicara smaris</i>	INV	more	ST	
<i>Chromis chromis</i>	ZOO/INV	more	EU	
<i>Coris julis</i>	ZOO/INV	more	EU	
<i>Symphodus cinereus</i>	INV	more	EU	
<i>Symphodus mediterraneus</i>	INV	more	EU	
<i>Symphodus ocellatus</i>	INV	more	EU	
<i>Symphodus roissali</i>	INV	more	EU	
<i>Symphodus tinca</i>	OMNI	more	EU	
<i>Eichthys vipera</i>	INV/PISC	more	EU/RE	
<i>Gobius buchichi</i>	OMNI	more	EU/RE	
<i>Gobius cobitis</i>	OMNI	more	EU/RE	
<i>Gobius geniporus</i>	OMNI	more	EU/RE	
<i>Gobius niger</i>	INV/PISC	more	EU/RE	
<i>Gobius paganellus</i>	INV/PISC	more	EU/RE	
<i>Buenia affinis</i>	INV/INS	more	EU/RE	
<i>Knipowitschia caucasica</i>	INV/INS	more	EU/RE	
<i>Knipowitschia panizzae</i>	INV/INS	more	EU/RE	
<i>Padogobius martensi</i>	INV	more	EU/RE	
<i>Pomatoschistus bathi</i>	INV	more	EU/RE	
<i>Pomatoschistus canestrini</i>	INV	more	EU/RE	
<i>Pomatoschistus marmoratus</i>	INV	more	EU/RE	
<i>Pomatoschistus minutus</i>	INV	more	EU/RE	
<i>Zebrus zebrus</i>	INV	more	EU/RE	
<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>	INV/PISC	more	EU/RE	
<i>Callionymus fasciatis</i>	INV	more	EU/RE	
<i>Callionymus pusillus</i>	INV	more	EU/RE	
<i>Callionymus risso</i>	INV	more	EU/RE	
<i>Aidablennius sphyinx</i>	OMNI	more	EU/RE	
<i>Lypophrys dalmatinus</i>	OMNI	more	EU/RE	
<i>Lipophrys fluviatilis</i>	OMNI	rijeka/bočato	RE	
<i>Lypophrys pavo</i>	OMNI	more	EU/RE	
<i>Parablennius sanguinolentus</i>	HERB/DETR	more	EU/RE	
<i>Parablennius tentacularis</i>	INV	more	EU/RE	
<i>Centrolopus niger</i>	ZOO/INV	more	ST	
<i>Chelon labrosus</i>	OMNI	more	EU	
<i>Mugil cephalus</i>	OMNI /DETR	more	EU	
<i>Liza aurata</i>	OMNI	more	EU	
<i>Liza ramada</i>	OMNI	more	EU	
<i>Liza saliens</i>	OMNI /DETR	more	EU	
<i>Oedalechilus labeo</i>	OMNI /DETR	more	EU	
<i>Atherina boyeri</i>	ZOO/INV	more	EU	
<i>Atherina hepsetus</i>	INS/INV	more	EU	
<i>Trigla lucerna</i>	INV/PISC	more	ST	
<i>Arnoglossus laterna</i>	INV/PISC	more	EU	
<i>Buglossidium luteum</i>	INV/PISC	more	EU	
<i>Platichthys flesus</i>	INV/PISC	more	EU	
<i>Pleuronectes platessa</i>	INV/PISC	more	EU	

<i>Scophthalmus rhombus</i>	INV/PISC	more	EU	
<i>Solea kleinii</i>	INV	more	EU	
<i>Solea vulgaris</i>	INV	more	EU	

Legenda:

OMNI (omnivorne), PISC (piscivorne), INV (invertebrata), INS (insekti), HERB (herbivori), DETR (detrivori), ZOO (zooplanktivori), EU (eurihaline), ST (stenohaline), RE (rezidentne) ..itd

*popis vrsta nije konačan, nadopunjavat će se tijekom vremena i uskladiti s novim spoznajama

Referentne zajednice i opis bioloških zajednica u vrlo dobrom, dobrom i umjerenom stanju

U referentnom, vrlo dobrom stanju, zajednica riba često uključuje veliki broj vrsta riba osjetljivih na eutrofikaciju. S većom produktivnošću, zajednica se karakterizira s većom raznolikošću i značajnijim obiljem i biomasom. Ukupan broj vrsta je ≥ 20 (3-4 pretežne vrste, uglavnom Mugilidae). Rod *Solea* sp., *Spicara* sp. i obitelji Mugilidae, Sparidae i Moronidae zastupljene su 10-50%. Omnivori su zastupljeni za 2-20%; piscivori za 10-50%. Tolerantne vrste u zajednici su prisutne > 3 . Estuarijske rezidentne vrste zastupljene su za 10-40%. Diadromne vrste su prisutne u rasponu od 10-70%. Morske nedorasle vrste su brojne (30-70%). Indikatorske ili unesene vrste dobro su zastupljene > 5 .

U dobrom stanju zajednica riba često sadrži relativno velik broj vrsta riba osjetljivih na eutrofikaciju. Ukupan broj vrsta je 10-20 (3 dominantne vrste, uglavnom Atherinidae). Rod *Solea* sp., *Spicara* sp. i obitelji Mugilidae, Sparidae i Moronidae zastupljene su <10 ili $> 50\%$. Omnivori su zastupljeni s <2 ili $> 20\%$; piscivori s <10 ili $> 50\%$. Tolerantnih vrsta u zajednici ima 2-3. Estuarijske rezidentne vrste su zastupljene s <10 ili $> 40\%$. Diadromne vrste su prisutne u rasponu od 10-70%. Morske nedorasle vrste su manje brojne (obično 20-30%). Indikatorske ili strane vrste su relativno dobro zastupljene 4-5.

U umjerenom stanju, riblja zajednica često uključuje relativno mali broj ribljih vrsta koje su osjetljive na eutrofikaciju, one su nisko trofičke, uglavnom planktivorne i detrivorne, rezidentne ribe. Ukupan broj vrsta je 4-9 (pretežno 1-3 vrste). Rod *Solea* sp., *Spicara* sp., a obitelji Mugilidae, Sparidae i Moronidae zastupljene su s 10%. Omnivori su zastupljeni s 2,5%; piscivorine sa 10%. Tolerantne vrste u zajednici su prisutne <2 . Estuarijske rezidentne vrste zastupljene su sa 10%. Diadromne vrste su prisutne sa 10%. Morske nedorasle vrste su prisutne u rasponu od 20-30% ili vrlo brojne u zajednici (70-80%). Indikatorske ili strane vrste su prisutne s <4 .

Referentne i najlošije vrijednosti pokazatelja ekološkog stanja

Nacionalni referentni uvjeti su postavljeni kao kombinacija povijesnih podataka, znanja stručnjaka i recentnih podataka. Referentne vrijednosti su određene analizom seta podataka sakupljenog tijekom 2014. i 2015. godine (Tablica 5.3.). Uzorci su uzimani u toplom dijelu godine (travanj-rujan) na 37 postaja smještenih u estuarijima rijeka Dragonje, Mirne, Raše, Rječine, Zrmanje, Krke, Cetine, Jadra, Neretve i Omble. Ukupno je analizirano 183 uzoraka.

Tablica 5.3. Tip-specifični referentne vrijednosti elemenata M-EFI matrica

Elementi M-EFI	P1_2 Oligohalini estuariji, šljunak	P1_3 Oligohalini estuariji, fino granulirani sediment	P2_2 Meso- i polihalini estuariji, šljunak	P2_3 Meso- i polihalini estuarij, fino granulirani sediment
Ukupni broj vrsta	0,540	0,560	0,680	0,760
% plosnatice (<i>Solea</i> sp.)	0,250	0,430	0,620	0,470
% girovke (<i>Spicara</i> sp.)	0,200	0,230	0,540	0,620
% cipli (Mugilidae)	0,750	0,780	0,810	0,640
% ljuskavke (Sparidae)	0,230	0,200	0,660	0,830
% omnivori	0,500	0,520	0,590	0,430
% piscivori	0,300	0,280	0,880	0,810
Tolerantnost	0,450	0,500	0,680	0,640
Broj ERS	0,810	0,810	0,780	0,690
% ERS	0,800	0,820	0,750	0,700
% diadromne vrste	0,520	0,530	0,630	0,610
% morske nedorasle migratorne vrste	0,210	0,290	0,620	0,850
Indikatorske vrste	0	0	0,350	0,300
Nove/ unesene vrste	0	0	0	0

Najlošije vrijednosti su iznosile 0, i to u trenucima kad na postajama nije ulovljena niti jedna jedinka. Razlozi tome su bili loši meteorološki uvjeti (visoke vode nakon dugotrajnih kiša, visoka zamućenost i znatno snižen salinitet).

Izračunavanje ekološkog stanja u pojedinačnom modulu

Za izračunavanje ekološkog stanja potrebno je nakon utvrđivanja svake pojedine vrste, prebrojati jedinke po svakoj vrsti i odrediti ukupan broj vrsta. Svakoj vrsti treba pridodati trofičko i ekološko obilježje prema tablici 2. Nakon toga se za svaki od 15 elemenata obavi bodovanje prema Tablici 1. Ocjene/bodovi od svih 15 elemenata se zbroje i podijele s 15 (ukupni broj elemenata indeksa M-EFI). Dobivena vrijednost je EFI ocjena za određeni uzorak.

Postupak se ponovi za sve postaje u vodnom tijelu, a njihova prosječna ocjena je ocjena ekološkog stanja.

5.4. Utvrđivanje granica klasa

Ocjenjivanje ekološkog stanja predstavlja mjerenje odstupanja strukture i funkcije ekosustava od prirodnog – referentnog stanja. Omjer ekološke kakvoće (OEK) je prema Okvirnoj direktivi o vodama (ODV) podijeljen u pet kategorija, od 0 do 1, a koje se odnose na pet statusa ekološke kvalitete: vrlo dobro, dobro, umjereno, loše i vrlo loše i to na slijedeći način: 0-0.2 vrlo loše; 0,21-0,4 loše; 0,41-0,6 umjereno; 0,61-0,8 dobro i 0,81-1 vrlo dobro (Tablica 5.4.):

Tablica 5.4. Granične vrijednosti kategorija ekološkog stanja

Kategorija ekološkog stanja	EQR granice klasa
Referentno/Vrlo dobro	EQR= >0.80
Dobro	EQR = 0.60 - 0.80
Umjereno	EQR = 0.20 - 0.60
Loše	EQR= < 0.20
Vrlo loše	Nema riba

*rezultati ocjene prema biološkim elementima kakvoće za potrebe klasificiranja zaokružuju se na dvije decimale

Granične vrijednosti kategorija ekološkog stanja na temelju M-EFI indeksa prikazane su u tablici 5.5.

Tablica 5.5. Granične vrijednosti kategorija ekološkog stanja za ribe

Kategorija ekološkog stanja	Riblje zajednice
Referentno/ Vrlo dobro	Ukupni broj vrsta > 20, 3-4 dominantnih vrsta EFI=4-5*
Dobro	Ukupni broj vrsta 10-20, 3 dominantne vrste EFI=3-4*
Umjereno	Ukupni broj vrsta 4-9, 1-3 dominantnih vrsta EFI =2
Loše	Ukupni broj vrsta 2-3, 1-3 dominantnih vrsta EFI=1
Vrlo loše	Ukupni broj vrsta < 2, 1-3 dominantnih vrsta

NAPOMENA:

Dominantne vrste riba su one kojih u zajednici (uzorku) ima više od 10%. Najčešće takvih ima od 1-5 i čine zajedno i do 80% ukupnog uzorka ili ihtiozajednice.

**EFI vrijednost od 3-4 znači raspon vrijednosti od 3,00 - 3,99, a EFI vrijednosti 4-5 znači raspon vrijednosti od 4,00*

5.5. Izračunavanje omjera ekološke kakvoće

Izmjerene vrijednosti M-EFI se pretvaraju u vrijednosti omjera ekološke kakvoće (OEK) tako da se referentna vrijednost podijeli s izmjerenom vrijednošću prema formuli:

$$\text{OEK} = \frac{\text{referentna vrijednost}}{\text{izmjerena vrijednost M – EFI}}$$

Ukupna ocjena ekološkog stanja na temelju riba je vrijednost OEK M-EFI indeksa, a kategorije ekološkog stanja i granične vrijednosti kategorija ekološkog stanja, izražene kao omjer ekološke kakvoće se određuju prema tablici 5.3.

6. Literatura

Bonacci, O. 1995. Ground water behaviour in Karst – Example of the Ombla spring (Croatia). *Journal of Hydrology*, 165: 113-134.

Chrétiennot-Dinet, M. 1990. Atlas du phytoplancton marin. Volume III. Centre national de la recherche scientifique, Paris. 261 pp.

Clarke, K.R., R.M. Warwick. 2001. Change in marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation, 2nd edition. Plymouth: PRIMER-E Ltd.

Cupp, E.E. 1943. Marine plankton diatoms of the west coast of North America. *Bull. Scripps. Inst. Oceanogr.*, 5: 1-283.

Deegan, L.A., J.T. Finn, J. Buonaccorsi. 1997. Development and validation of an estuarine biotic integrity index. *Estuaries*, 20(3): 601-617.

Dodge, D. 1982. Marine dinoflagelates of the british isles. Her Majesty's Stationary Office. London.

Dulčić, J., S. Matić, M. Kraljević. 2002. Shallow coves as nurseries for non-resident fish: a case study in the eastern middle Adriatic. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 82: 991-993.

Facca, C., et al. 2013. Description of a Multimetric Phytoplankton Index (MPI) for the assessment of transitional waters. *Mar. Pollut. Bull.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.025>

Gemeinhardt, K., J. Schiller. 1930. Silicoflagellatae. Rabenhorst's Kryptogamen Flora. Leipzig, Akad. Verlag., 10: 1-89.

Hallegraeff, G.M., Y. Hara. 1995. Taxonomy of Harmful Marine Raphidophytes. In: G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, A.D. Cembella (eds.) *Manual on Harmful Marine Microalgae*, UNESCO.

Harrison, T.D., J.A.G. Cooper, A.E.L. Ramm. 2000. State of South African estuaries – geomorphology, ichthyofauna, water quality and aesthetics. Departement of Environmental Affairs and Tourism, State of the Environment Series report No. 2.

Hustedt, F. 1930. Kryptogamen-Flora: Die Kieselalgen Deuchelands, Österreich, und der Schweiz mit Berücksichtigung der übrigen Länder Europas sowie der angrenzenden Meeresgebiete. Teil I: 1-920 Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H., Leipzig.

Hustedt, F. 1931. Kryptogamen-Flora: Die Kieselalgen Deuchelands, Österreich, und der Schweiz mit Berücksichtigung der übrigen Länder Europas sowie der angrenzenden Meeresgebiete. Teil II: 1-736 Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H., Leipzig.

Jardas, I. 1996. Jadranska ihtiofauna. Školska knjiga. Zagreb.

- Lassus, P. 1980. Mise à jour des données sur les organismes responsables d' eaux colorées. Extension ou microplancton produisant des toxines. CEDEX, Nantes: 185 pp.
- Lebour, M.V. 1925. The Dinoflagellates of Northern Seas. Mar. Biol. Assoc., Plymouth: 250 pp.
- Matić-Skoko, S., M. Peharda, A. Pallaoro, B. Baždarić. 2006. Infralittoral fish assemblages in a temperate Zrmanja estuary, Adriatic Sea. Acta Adriat., 48: 45-55.
- Mrakovčić, M., S. Mišetić, M. Povz. 1995. Status of freshwater fish in Croatian Adriatic river systems. Biological Conservation, 72: 179-185.
- Muxika, I., Á. Borja, J. Franco. 2003. The use of a Biotic Index (AMBI), to identify spatial and temporal impact gradients on benthic communities in an estuarine area. ICES CM 2003/ Session J-01.
- Oliva, S., O. Mascaró, I. Llagostera, M. Pérez, J. Romero. 2012. Selection of metrics based on the seagrass *Cymodocea nodosa* and development of a biotic indeks (CYMOX) for assessing ecological status of coastal and transitional waters. Estuar. Coast. Shelf Sci., 114: 7-17.
- Okvirna direktiva o vodama 2000/60/EC.
- Orfanidis, S., V. Papathanasiou, S. Gounaris. 2007. Body size descriptor of *Cymodocea nodosa* indicates anthropogenic stress in coastal ecosystems. Transitional Waters Bulletin, 2: 1-7.
- Orfanidis, S., V. Papathanasiou, S. Gounaris, TH. Theodosiou. 2010. Size dostrubution approaches for monitoring and conservation of coastal *Cymodocea* habitats. Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst., 20(2): 177-188.
- Orlando-Bonaca, M., J. Francé, B. Mavrič, M. Grego, L. Lipej, V. Flander-Putrlje, M. Šiško, A. Falace. 2015. A new indeks (MediSkew) for the assessment of the *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson meadow's status. Marine Environmental Research, 110: 132-141.
- Parke, M., P.S. Dixon. 1976. Check-list of British marine algae—third revision. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 56: 527-594.
- Pearson, K. 1895. Mathematical contributions to the theory of evolution, II: Skew variation in homogeneous material. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series A, 186: 343-414.
- Peragallo, H.M. 1908. Diatomées marines de France et des districts maritimes voisins. Mierographe-Editeur: 491 pp.
- Proškina-Lavrenko, A. 1955. Diatomovie vodorosli planktona Černoga moria. Akad. Nauk SSSR: 222 pp.
- Ricard, M. 1987. Atlas du phytoplancton Marin (ed. A. Sournia) Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. 2: 219 pp.

- Schiller, J. 1933. Dinoflagellatae. In: Kolkowitz, R. (ed.), Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Teil I.
- Schiller, J. 1937. Dinoflagellatae. In: Kolkowitz, R. (ed.), Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Teil II.
- Sournia, A. 1986. Atlas du phytoplancton marin. Vol. 1. Introduction, *Cyanophycées*, *Dictyophycées*, *Dinophycées* et *Raphidophycées*, CNRS, Paris.
- Strickland, J.D.H., T.R. Parsons. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Bull. Fish. Res. Bd. Can., 167: 310 pp.
- Tomas, C.R. 1993. Marine Phytoplankton. A Guide to Naked Flagellates and Coccolithophorids. Academic Press, Inc. San Diego, California: pp 263.
- Tomas, C.R. 1995. Identifying Marine Diatoms and Dinoflegellates. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Uthermöhl, H. 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton methodik. Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol., 9: 1-38.
- Van Heurck, H. 1899. Traité des Diatomées (ed. J.R. Hansen). Édité aux frais de l'auteur, Bruxelles: 572 pp.
- Viličić, D. 2002. Fitoplankton Jadranskog mora. Školska knjiga. Zagreb: 247 pp.
- Wall, D., B. Dale. 1968. Modern dinoflagellate cysts and evolution of the Peridinales. Micropaleontology, 14: 265-304.
- Whitfield, A.K., M. Elliott. 2002. Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries – a review of progress and some suggestions for the future. Journal of Fish Biology, 61: 229-250.