



**NACIONALNI INŠTITUT ZA BIOLOGIJO
MORSKA BIOLOŠKA POSTAJA**

Zaključno poročilo za leto 2013

**Strokovne podlage za implementacijo
Okvirne direktive o morski strategiji (2008/56/ES)**

December 2013

AVTORJI:

Orlando-Bonaca, M., O. Bajt, B. Čermelj, D. Deželjin, J. Francé, T. Kogovšek, N. Kovač, L. Lipej, V. Malačič, A. Malej, B. Mavrič, P. Mozetič, A. Ramšak, M. Šiško, T. Tinta in V. Turk (2013): Strokovne podlage za implementacijo Okvirne direktive o morski strategiji (2008/56/ES). Zaključno poročilo za leto 2013. Poročila **148**. Morska Biološka Postaja, Nacionalni Inštitut za Biologijo, Piran, 201 str.

NASLOV PROJEKTNE NALOGE: STROKOVNE PODLAGE ZA IMPLEMENTACIJO OKVIRNE DIREKTIVE O MORSKI STRATEGIJI (2008/56/ES) IN OKVIRNE VODNE DIREKTIVE (2000/60/ES).

NAROČNIK: INŠTITUT ZA VODE RS

IZVAJALEC: NACIONALNI INŠTITUT ZA BIOLOGIJO,
MORSKA BIOLOŠKA POSTAJA
6330 Piran, Fornače 41

NOSILKI PROJEKTA: DR. MARTINA ORLANDO BONACA IN DR. JANJA FRANCÉ

SODELAVCI NA PROJEKTU: dr. Borut Mavrič, prof. dr. Lovrenc Lipej, prof. dr. Alenka Malej, prof. dr. Vlado Malačič, doc. dr. Patricija Mozetič, doc. dr. Oliver Bajt, doc. dr. Nives Kovač, doc. dr. Branko Čermelj, doc. dr. Valentina Turk, doc. dr. Andreja Ramšak, dr. Vesna Flander Putrle, dr. Mateja Grego, dr. Tjaša Kogovšek, dr. Tinkara Tinta, mag. Boris Petelin, Martin Vodopivec, Milijan Šiško, Tihomir Makovec, Vladimir Bernetič, Marko Tadejevič, Maja Jeromel, Urška Martinčič, Damir Deželjin

OBLIKOVANJE NASLOVNICE: Vladimir Bernetič

KRAJ IN DATUM: PIRAN, DECEMBER 2013

KAZALO VSEBINE

1 PREDLOG PROGRAMA SPREMLJANJA STANJA ZA STALNO PRESOJO OKOLJSKEGA STANJA SLOVENSkih MORSkih VODA	1
1.1 IZHODIŠČA	2
1.2 MAKROALGE NA SKALNATEM DNU INFRALITORALA	24
1.2.1 Uvod.....	24
1.2.2 Izbira in velikost mesta vzorčenja	24
1.2.3 Predlog mest vzorčenja.....	26
1.2.4 Čas in frekvenca vzorčenja.....	27
1.2.5 Metoda vzorčenja	27
1.2.6 Laboratorijska obdelava vzorcev	27
1.2.7 Uvrščanje makroalg v razrede ekološkega stanja in izračun EEI-c ter REK.....	28
1.2.8 Uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja	34
1.3 TRAVNIK POZEJDONKE MED KOPROM IN IZOLO.....	36
1.3.1 Uvod.....	36
1.3.2 Izbira in velikost mesta vzorčenja	37
1.3.3 Predlog mest vzorčenja.....	37
1.3.4 Čas in frekvenca vzorčenja.....	37
1.3.5 Metoda vzorčenja	38
1.3.6 Laboratorijska obdelava vzorcev	38
1.3.7 Uvrščanje vzorcev pozejdonke v razrede ekološkega stanja.....	38
1.3.8 Uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja	39
1.4 TRAVNIKI KOLENČASTE CIMODOCEJE.....	41
1.4.1 Uvod.....	41
1.4.2 Izbira in velikost mesta vzorčenja	42
1.4.3 Predlog mest vzorčenja.....	42
1.4.4 Čas in frekvenca vzorčenja.....	42
1.4.5 Metoda vzorčenja	43
1.4.6 Laboratorijska obdelava vzorcev	44
1.4.7 Uvrščanje vzorcev kolenčaste cimodoceje v razrede ekološkega stanja.....	45
1.4.8 Uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja	47
1.5 BENTOŠKI NEVREtenČARJI MEHKEGA DNA INFRALITORALA	48
1.5.1 Uvod.....	48
1.5.2 Predlog mest vzorčenja.....	48
1.5.3 Čas in frekvenca vzorčevanja.....	49
1.5.4 Metoda vzorčenja	49

1.5.5	<i>Laboratorijska obdelava vzorcev</i>	50
1.5.6	<i>Metodologija vrednotenja ekološkega stanja</i>	51
1.6	BENTOŠKI NEVRETEČARJI MEHKEGA DNA CIRKALITORALA	53
1.6.1	<i>Uvod</i>	53
1.6.2	<i>Predlog mest vzorčenja</i>	53
1.6.3	<i>Čas in frekvenca vzorčenja</i>	54
1.6.4	<i>Metoda vzorčenja</i>	54
1.6.5	<i>Laboratorijska obdelava vzorcev</i>	55
1.6.6	<i>Metoda vrednotenja ekološkega stanja</i>	55
1.7	KOSTNICE	56
1.7.1	<i>Uvod</i>	56
1.7.2	<i>Izbira in velikost mesta vzorčenja</i>	57
1.7.3	<i>Čas in frekvenca vzorčenja</i>	58
1.7.4	<i>Metoda vzorčenja</i>	58
1.7.5	<i>Laboratorijska obdelava vzorcev</i>	59
1.7.6	<i>Uvrščanje kostnic v razrede ekološkega stanja</i>	59
1.7.7	<i>Uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja</i>	61
1.8	HRUSTANČNICE.....	62
1.8.1	<i>Uvod</i>	62
1.8.2	<i>Metoda vzorčenja</i>	62
1.8.3	<i>Laboratorijska obdelava vzorcev</i>	63
1.9	FITOPLANKTON	66
1.9.1	<i>Uvod</i>	66
1.9.2	<i>Parameter: biomasa fitoplanktona</i>	67
1.9.2.1	<i>Uvod</i>	67
1.9.2.2	<i>Predlog mest in globin vzorčenja</i>	67
1.9.2.3	<i>Čas in frekvenca vzorčenja</i>	69
1.9.2.4	<i>Metoda vzorčenja</i>	69
1.9.2.5	<i>Metoda določanja koncentracije Chl a</i>	70
1.9.2.6	<i>Metodologija vrednotenja okoljskega stanja morja s fitoplanktonsko biomaso</i>	71
1.9.3	<i>Parameter: vrstna sestava fitoplanktona in abundanca</i>	74
1.9.3.1	<i>Uvod</i>	74
1.9.3.2	<i>Predlog mest in globin vzorčenja</i>	75
1.9.3.3	<i>Čas in frekvenca vzorčenja</i>	76
1.9.3.4	<i>Metoda vzorčenja</i>	77
1.9.3.5	<i>Določanje abundance in vrstne sestave fitoplanktona</i>	77
1.9.3.6	<i>Metodologija vrednotenja okoljskega stanja morja po vrstni sestavi in abundanci fitoplanktona</i>	79
1.10	KLOBUČNJAŠKE MEDUZE	82
1.10.1	<i>Uvod</i>	82

1.10.2	<i>Predlog mest vzorčenja</i>	82
1.10.3	<i>Čas in frekvenca vzorčenja</i>	83
1.10.4	<i>Metoda vzorčenja</i>	83
1.10.5	<i>Laboratorijska obdelava vzorcev</i>	84
1.10.6	<i>Metoda vrednotenja ekološkega stanja</i>	84
1.11	ZOOPLANKTON	85
1.11.1	<i>Uvod</i>	85
1.11.2	<i>Predlog mest vzorčenja</i>	85
1.11.3	<i>Čas in frekvenca vzorčenja</i>	86
1.11.4	<i>Metoda vzorčenja</i>	86
1.11.5	<i>Laboratorijska obdelava vzorcev</i>	86
1.11.6	<i>Metoda vrednotenja ekološkega stanja</i>	87
1.12	MIKROBNI PATOGENI V MORSKEM OKOLJU	88
1.12.1	<i>Uvod</i>	88
1.12.2	<i>Predlog mest vzorčenja</i>	92
1.12.3	<i>Čas in frekvenca vzorčenja</i>	92
1.12.4	<i>Metoda vzorčenja</i>	93
1.12.5	<i>Laboratorijska obdelava vzorcev</i>	93
1.12.5.1	Določevanje števila fekalnih indikatorskih bakterij	93
1.12.5.2	Določevanje sestave bakterijske združbe	93
1.12.5.3	Denaturacijska gradientna gelska elektroforeza (DGGE)	95
1.12.5.4	Bakterijske 16 S rRNA klonske knjižnice	95
1.12.5.5	Filogenetske analize – določanje prisotnosti vrst mikrobnih patogenov	96
1.12.5.6	Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH)	96
1.12.5.7	Q-PCR	97
1.13	FIZIKALNO-KEMIJSKO STANJE	98
1.13.1	<i>Uvod</i>	98
1.13.2	<i>Vzorčenje - splošno</i>	99
1.13.3	<i>Temperatura</i>	100
1.13.3.1	<i>Uvod</i>	100
1.13.3.2	<i>Predlog mest vzorčenja in frekvenc meritev</i>	100
1.13.3.3	<i>Meritve temperature</i>	101
1.13.3.4	<i>Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja</i>	101
1.13.4	<i>Slanost</i>	101
1.13.4.1	<i>Uvod</i>	101
1.13.4.2	<i>Predlog mest vzorčenja in frekvenc meritev</i>	102
1.13.4.3	<i>Meritve slanosti</i>	102
1.13.4.4	<i>Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja</i>	102
1.13.5	<i>pH</i>	103

1.13.5.1	Uvod.....	103
1.13.5.2	Predlog mest vzorčenja in frekvenc meritev	103
1.13.5.3	Določanje pH vrednosti	104
1.13.5.4	Laboratorijska obdelava vzorcev	104
1.13.5.5	Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja	105
1.13.6	<i>Prosojnost</i>	105
1.13.6.1	Uvod.....	105
1.13.6.2	Predlog mest vzorčenja in frekvenc meritev	105
1.13.6.3	Meritve prosojnosti.....	106
1.13.6.4	Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja	106
1.13.7	<i>Skupna suspendirana snov (TPM) in suspendirani organski ogljik (POC)</i>	106
1.13.7.1	Uvod.....	106
1.13.7.2	Predlog mest vzorčenja, čas in frekvenca vzorčenja	107
1.13.7.3	Metoda vzorčenja	107
1.13.7.4	Laboratorijska obdelava vzorcev	108
1.13.7.5	Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja	108
1.13.8	<i>Koncentracija raztopljenega kisika</i>	108
1.13.8.1	Uvod.....	108
1.13.8.2	Predlog mest vzorčenja in frekvenc meritev	109
1.13.8.3	Metoda vzorčenja	110
1.13.8.4	Laboratorijska obdelava vzorcev	110
1.13.8.5	Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja	111
1.13.9	<i>Koncentracije hranil</i>	111
1.13.9.1	Uvod.....	111
1.13.9.2	Predlog mest vzorčenja in frekvenc vzorčenja	112
1.13.9.3	Metoda vzorčenja	113
1.13.9.4	Laboratorijska obdelava vzorcev	113
1.13.9.5	Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja	113
1.13.10	<i>Analize sedimenta (skupni organski ogljik in hranila v intersticielnih vodah)</i>	113
1.13.10.1	Uvod.....	113
1.13.10.2	Predlog vzorčnih mest in frekvenc vzorčenja	114
1.13.10.3	Metoda vzorčenja	114
1.13.10.4	Laboratorijska obdelava vzorcev	114
1.13.10.5	Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja	115
1.13.11	<i>Strižna napetost pri morskem dnu</i>	116
1.13.11.1	Uvod.....	116
1.13.11.2	Metodologija meritev.....	118
1.13.11.3	Metodologija modeliranja.....	119
1.13.11.4	Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja	119
1.14	KONCENTRACIJE ONESNAŽEVAL	120
1.14.1	<i>Uvod</i>	120

1.14.2	<i>Morska voda</i>	121
1.14.2.1	Izbira mest vzorčenja	121
1.14.2.2	Določanje nabora onesnaževal za spremljanje	121
1.14.2.3	Čas in frekvenca vzorčenja	121
1.14.2.4	Metoda vzorčenja	122
1.14.2.5	Laboratorijska obdelava in analiza vzorcev	122
1.14.3	<i>Sediment</i>	122
1.14.3.1	Izbira mest vzorčenja	122
1.14.3.2	Določanje nabora onesnaževal za spremljanje	123
1.14.3.3	Čas in frekvenca vzorčenja	123
1.14.3.4	Metoda vzorčenja	124
1.14.3.5	Laboratorijska obdelava in analiza vzorcev	124
1.14.4	<i>Organizmi</i>	124
1.14.4.1	Izbira organizmov in mest vzorčenja	124
1.14.4.2	Določanje nabora onesnaževal za spremljanje	125
1.14.4.3	Čas in frekvenca vzorčenja	125
1.14.4.4	Metoda vzorčenja	125
1.14.4.5	Laboratorijska obdelava in analiza vzorcev	126
1.15	BIOLOŠKI UČINKI ONESNAŽIL	127
1.15.1	<i>Uvod</i>	127
1.15.2	<i>Predlog mest vzorčenja</i>	134
1.15.3	<i>Čas in frekvenca vzorčenja</i>	134
1.15.4	<i>Metoda vzorčenja</i>	134
1.15.5	<i>Laboratorijska obdelava vzorcev</i>	136
1.15.5.1	Standardiziran način merjenja telesa školjk	136
1.15.5.2	Splošni stres	137
1.15.5.3	Genotoksični učinki	140
1.15.5.4	Nevrotoksični učinki	142
1.15.5.5	Detoksifikacija kovin.....	145
1.15.5.6	Biomarkerji oksidativnega stresa	146
1.16	ONESNAŽEVALA V RIBAH IN DRUGI MORSKI HRANI	148
1.16.1	<i>Uvod</i>	148
1.16.2	<i>Izbira organizmov</i>	148
1.16.3	<i>Določanje nabora onesnaževal za spremljanje</i>	149
1.16.4	<i>Čas in frekvenca vzorčenja</i>	149
1.16.5	<i>Metoda vzorčenja</i>	149
1.16.6	<i>Laboratorijska obdelava in analiza vzorcev</i>	149
1.17	HABITATNI TIP - KAMNITI MEDIOLITORAL V POVEZAVI S HIDROMORFOLOŠKIMI SPREMEMBAMI	150
1.17.1	<i>Uvod</i>	150
1.17.2	<i>Čas in frekvenca vzorčenja</i>	150

1.17.3	Metoda vzorčenja	151
1.17.4	Laboratorijska obdelava vzorcev	152
1.18	HABITATNI TIP - SEDIMENTNI MEDIOLITORAL V POVEZAVI S HIDROMORFOLOŠKIMI SPREMENBAMI	154
1.18.1	Uvod.....	154
1.18.2	Čas in frekvenca vzorčenja	154
1.18.3	Metoda vzorčenja	155
1.18.4	Laboratorijska obdelava vzorcev	156
1.19	HABITATNI TIP – KAMNITI INFRALITORAL	158
1.19.1	Uvod.....	158
1.19.2	Izbira in velikost mesta vzorčenja	159
1.19.3	Čas in frekvenca vzorčenja	159
1.19.4	Metoda vzorčenja	160
1.19.5	Laboratorijska obdelava vzorcev	160
1.19.6	Izračun indeksa za opredelitev stanja kamnitega infralitorala	163
1.19.7	Uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja	164
1.20	HABITATNI TIP – SEDIMENTNI INFRALITORAL	166
1.21	HABITATNI TIP – SEDIMENTNI CIRKALITORAL	166
1.22	HABITAT VODNEGA STOLPCA.....	166
2	RAZVOJ METODOLOGIJ ZA SPREMLJANJE OKOLJSKEGA STANJA SLOVENSkih MORSKIH VODA.....	167
2.1	UVOD	168
2.2	RAZVOJ METODOLOGIJE ZA OCENO STANJA KAMENE KORALE (<i>CLADOCORA CAESPITOSA</i>) – D1	168
2.3	RAZVOJ METODOLOGIJE ZA OCENO STANJA HRUSTANČNIC - D1	168
2.4	NADALJEVANJE RAZVOJA METODOLOGIJE ZA OCENO STANJA CIRKALITORALNIH HABITATNIH TIPOV - D1	169
2.5	RAZVOJ METODOLOGIJE ZA SPREMLJANJE VRSTNE PESTROSTI IN ABUNDANCE TUJERODNIH ORGANIZMOV IN NIVOJA PRITISKA NA AVTOHTONE VRSTE IN HABITATE – D2	169
2.6	RAZVOJ METODOLOGIJE ZA OCENO PRODUKTIVNOSTI KLJUČNIH VRST ALI TROFIČNIH SKUPIN IN DELEŽA IZBRANIH VRST NA VRHU PREHRANJEVALNIH SPLETOV NA NIVOJU SUB-REGIJE JADRANSKO MORJE - D4	170
2.7	INTERKALIBRACIJA METODE ZA ŠTEVILČNOST/RAZPOREDITEV KLJUČNIH TROFIČNIH SKUPIN/VRST IN OVREDNOTENJE STANJA NA NIVOJU SEVERNEGA JADRANA V SODELOVANJU Z DRUGIMI DRŽAVAMI - D4	170
2.8	PRIDOBITEV SATELITSKIH PODATKOV IN PREUČITEV NJIHOVE UPORABNOSTI ZA OCENJEVANJE KONCENTRACIJ Klorofila A NA NIVOJU SUBREGIJE – D5	171
2.9	RAZVOJ METODOLOGIJE ZA OCENO STANJA BIOGENEGA SUBSTRATA (SEKUNDARNO DETRITNO DNO) – D6	175
2.10	NADALJEVANJE RAZVOJA METODOLOGIJE ZA OCENO STANJA BENTOŠKIH NEVREtenČARJEV (INFAVNA IN EPIFAVNA) V CIRKALITORALU – D6.....	176
2.11	RAZVOJ METODOLOGIJE ZA OCENO VPLIVOV NA EKOSISTEM ZARADI HIDROGRAFSKIH POSEGOV V MORSKO OKOLJE. IZVAJANJE MERITEV HITROSTI PRIDNENIH TOKOV Z UPORABO VISOKOFREKVENČNIH MERILNIKOV TOKOV - D7	176
2.12	NADALJNI RAZVOJ METODOLOGIJ ZA D8.1 IN D9	176

2.13	NADALJEVANJE RAZVOJA METODOLOGIJE ZA OCENO STANJA OKOLJA PO DESKRIPTORJU 8, MERILO 8.2	177
2.14	RAZVOJ METODOLOGIJE ZA DETEKCIJO MIKROBNIH PATOGENOV V MORSKEM EKOSISTEMU	178
3	PRIPRAVA PODATKOVNE BAZE V SKLADU Z ZAHTEVAMI EVROPSKE KOMISIJE (ČLENI 8. 11 IN 19.3)	
OZ.	INSPIRE DIREKTIVE	180
3.1	UVOD	181
3.2	ZAKLJUČENE AKTIVNOSTI.....	181
3.2.1	<i>Funkcionalna definicija produkta</i>	181
3.3	TRENTNE AKTIVNOSTI PROJEKTA	182
3.4	PRIHODNJE AKTIVNOSTI	182
4	VIRI	183
5	PRILOGE.....	198

1 PREDLOG PROGRAMA SPREMLJANJA STANJA ZA STALNO PRESOJO OKOLJSKEGA STANJA SLOVENSКИH MORSКИH VODA

1.1 Izhodišča

V obdobju od 1. septembra do 20. decembra 2013 smo na Morski biološki postaji Nacionalnega inštituta za biologijo zelo intenzivno delali na nalogah 1.4.3 (pisanje predloga programa spremljanja stanja za stalno presojo okoljskega stanja in razvoj potrebnih metodologij) in 1.4.7 (priprava podatkovne baze v skladu z zahtevami Evropske Komisije) projektne naloge za izdelavo strokovnih podlag za implementacijo Okvirne direktive o morskimi strategiji (2008/56/ES) v letu 2013. Z naročnikom smo sodelovali tudi pri nalogi 1.4.4 (priprava vsebin za sodelovanje z javnostmi). K sodelovanju pri nalogah 1.4.1 (sodelovanje pri nadaljnjem poročanju Evropski Komisiji), 1.4.2 (nadaljevanje kvantifikacije okoljskih ciljnih vrednosti), 1.4.5 (usklajevanje z državami regije in pod-regije), 1.4.6 (zagotovitev strokovne podpore Ministrstvu za kmetijstvo in okolje pri pripravi programov ukrepov), ki predstavljajo delo z naročnikom in drugimi inštitucijami, v tem obdobju nismo bili pozvani.

V členu 11 Okvirne direktive o morskimi strategiji (ODMS) je zapisano, da morajo države članice na osnovi začetne presoje pripraviti program spremljanja stanja svojih morskih voda, oblikovan na podlagi okvirnega seznama iz Prilog III in seznama iz Priloge V ter s sklicevanjem na okoljske ciljne vrednosti, oblikovane v skladu s členom 10.

V preliminarnem poročilu o izboru elementov za vzpostavitev programa spremljanja stanja morskega okolja (*Orlando-Bonaca in sod.*, januar 2013) smo »program spremljanja stanja« definirali kot »sistematsko merjenje biotskih in abiotskih parametrov morskega okolja, z vnaprej določenim časovnim in prostorskim načrtom« (*Zampoukas in sod.*, 2012). Namen je pridobivanje podatkovnih nizov, na katerih bodo uporabljene metode ocenjevanja (vrednotenja) in se bodo nato napisali verodostojni sklepi (z določeno zanesljivostjo) o tem, ali je/ni doseženo dobro okoljsko stanje v zadevnem morskem območju. V tem smislu »program spremljanja stanja« vključuje izbiro parametrov za merjenje, mest vzorčenja, pogostost vzorčenja, obdelavo posameznega vzorca in merjenje vrednosti parametra. Po *Zampoukas in sod.* (2012) pa program spremljanja stanja ne vključuje izračun indeksov/metrik in razvrstitev (klasifikacijo). V tem poročilu smo pripravili predlog programa spremljanja stanja, ki vključuje izbor indeksov/metrik za oceno stanja za tiste elemente, za katere je razvoj metodologij že končan. Za elemente/indikatorje, za katere je

metodologija za oceno stanja še v razvoju, smo napisali poglavja le za metodologijo vzorčenja in/ali laboratorijske obdelave vzorcev. Predlog programa spremljanja stanja bomo v naslednjih letih sproti dopolnjevali z novimi metodologijami, čim bo razvoj zaključen. V Tabeli 1.1.1 so prikazani elementi, ki so obravnavani v tem poročilu.

Za vse predlagane elemente in metodologije bo moralo še potekati usklajevanje na nivoju regije ali podregije. Metode za spremljanje ekološkega/okoljskega stanja morajo biti usklajene, da se s tem omogoči lažjo primerljivost rezultatov spremljanja v okviru morske regije/podregije in morajo upoštevati relevantne čezmejne vplive in čezmejne lastnosti.

V Tabelah 1.1.2-1.1.9 prikazujemo mesta vzorčenja in frekvenco vzorčenja za elemente/indikatorje, ki so relevantni za posamezen deskriptor. Geografske koordinate za vsa mesta vzorčenja (Slike 1.1.1-1.1.4) na morskem dnu in v vodnem stolpcu so prikazane v Prilogah 1 in 2.

Tabela 1.1.1.: Elementi/indikatorji vključeni v predlog programa spremljanja stanja.

Indikatorji	Deskriptorji									
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
klorofil a	■			■	■		■			
struktura fitoplanktonske združbe	■	■		■	■		■			
pozejdonka (<i>Posidonia oceanica</i>)	■					■				
kolenčasta cimodoceja (<i>Cymodocea nodosa</i>)	■				■	■				
makroalge zgornjega infralitorala	■	■			■	■				
makroalge spodnjega infralitorala	■	■				■				
kostnice	■	■	■			■				
hrustančnice	■	■	■	■						
nevretenčarji v sedimentnem infralitoralu	■	■		■		■				
nevretenčarji v cirkalitoralu - muljasto detritno dno	■	■		■		■				
zooplankton	■	■		■						
klobučnjaške meduze	■	■		■						
mikrobni patogeni organizmi	■									
temperatura	■				■		■			
slanost	■				■		■			
pH	■						■			
alkalnost	■						■			
raztopljeni kisik	■				■		■			
skupni dušik (N-tot)	■				■		■			
anorganski raztopljeni dušik (DIN)	■				■		■			
skupni fosfor	■				■		■			
anorganski raztopljeni fosfor ali ortofosfat (PO4-P)	■				■		■			
silikat	■				■		■			
partikulatni organski ogljik (POC)	■				■		■			
skupni organski ogljik v sedimentu (TOC)	■				■		■			
prosojnost morske vode	■				■		■			
strižna napetost pri dnu (hidrografske spremembe)	■					■	■			
onesnaževala v morski vodi, sedimentih in organizmih								■		
biomarkerji	■		■					■	■	■
onesnaževala v morski hrani									■	
Habitati										
vodni stolpec	■	■		■	■		■	■		
kamniti mediolitoral	■	■				■				
sedimentni mediolitoral	■	■				■				
sedimentni infralitoral	■	■			■	■	■	■		
kamniti infralitoral	■	■			■	■				
cirkalitoral - biocenozo muljastega detritnega dna	■	■				■	■	■		

Tabela 1.1.2.: Elementi, ki so relevantni za **biotsko raznovrstnost v vodnem stolpcu (deskriptor 1)**, mesta vzorčenja in frekvenca vzorčenja.

mesto vzorčenja	klorofil <i>a</i>	fitoplankton	zooplankton	klobučnjaške meduze	hranila	raztopljeni kisik	prosojnost	temperatura	slanost	pH	alkalnost titrimetrično	mikrobni patogeni	biomarkerji
00BF/000F	glej tabelo za D5	glej tabelo za D5	vodni stolpec, 2x mesečno	glej tabelo za D4	glej tabelo za D5	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	3 globine (0 m, 10 m, dno), 2x mesečno	vodni stolpec, 1x mesečno	
00T5	3 globine (0, 10 m, dno), 1x mesečno	3 globine (0, 10 m, dno), 1x mesečno	vodni stolpec, 1x mesečno	vodni stolpec, 1x mesečno; videokamera	4 globine (0 m, 5 m, 15 m, dno), 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno			
CN01					4 globine (0 m, 5 m, 15 m, dno), 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno		vodni stolpec, 1x mesečno	
CN02					4 globine (0 m, 5 m, 15 m, dno), 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno		vodni stolpec, 1x mesečno	
5 mest													glej tabelo za D8.2

Tabela 1.1.3.: Elementi, ki so relevantni za **biotsko raznovrstnost na morskem dnu (deskriptor 1)** in za **neoporečnost morskega dna (deskriptor 6)**, mesta vzorčenja ter frekvenca vzorčenja.

mesto vzorčenja	pozejdanka	kolenčasta cimodoceja	makroalge zgornjega infralitoralna	makroalge spodnjega infralitoralna	kostnice	nevretenčarji v sedimentnem infralitoralnu	nevretenčarji v sedimentnem cirkalitoralnu	strižna napetost pri dnu (hidrografske spremembe)	HT - kamniti infralitoral
Pos1	1x letno (poletje) na treh globinah								
Pos2	1x letno (poletje) na treh globinah								
Pos3	1x letno (poletje) na treh globinah								
Cy1		1x letno (junij/julij)							
Cy2		1x letno (junij/julij)							
Cy3		1x letno (junij/julij)							
Cy4		1x letno (junij/julij)							
Cy5		1x letno (junij/julij)							
Cy6		1x letno (junij/julij)							
Cy7		1x letno (junij/julij)							
Cy8		1x letno (junij/julij)							
Cy9		1x letno (junij/julij)							
Cy10		1x letno (junij/julij)							

se nadaljuje

nadaljevanje

mesto vzorčenja	pozejdonka	kolenčasta cimodoceja	makroalge zgornjega infralitoralna	makroalge spodnjega infralitoralna	kostnice	nevretenčarji v sedimentnem infralitoralnu	nevretenčarji v sedimentnem cirkalitoralnu	strižna napetost pri dnu (hidrografske spremembe)	HT - kamniti infralitoral
DR2			2x letno (pomlad, jesen)						
DR3			2x letno (pomlad, jesen)						
DR4			2x letno (pomlad, jesen)						
KP4			2x letno (pomlad, jesen)						
KP1			2x letno (pomlad, jesen)						
KP3			2x letno (pomlad, jesen)						
PO8			2x letno (pomlad, jesen)						
Iz4			2x letno (pomlad, jesen)						
RR1			2x letno (pomlad, jesen)						
Pa2			2x letno (pomlad, jesen)						
PP4			2x letno (pomlad, jesen)						
Por1			2x letno (pomlad, jesen)						
Por2			2x letno (pomlad, jesen)						
Se1			2x letno (pomlad, jesen)						

se nadaljuje

nadaljevanje

mesto vzorčenja	pozejdonka	kolenčasta cimodoceja	makroalge zgornjega infralitoralna	makroalge spodnjega infralitoralna	kostnice	nevretenčarji v sedimentnem infralitoralnu	nevretenčarji v sedimentnem cirkalitoralnu	strižna napetost pri dnu (hidrografske spremembe)	HT - kamniti infralitoral
DR5					1x letno (julij-avgust)				1x letno (julij-avgust)
Sve1					1x letno (julij-avgust)				1x letno (julij-avgust)
RR2				1x letno (julij-avgust)	1x letno (julij-avgust)				1x letno (julij-avgust)
Pa3				1x letno (julij-avgust)	1x letno (julij-avgust)				1x letno (julij-avgust)
Fi3				1x letno (julij-avgust)	1x letno (julij-avgust)				1x letno (julij-avgust)
PP5				1x letno (julij-avgust)	1x letno (julij-avgust)				1x letno (julij-avgust)
VT2P2						2X letno (konec maja/začetek junija; september)			
VT2P3						2X letno (konec maja/začetek junija; september)			
VT3P2						2X letno (konec maja/začetek junija; september)			

se nadaljuje

nadaljevanje

mesto vzorčenja	pozejdonka	kolenčasta cimodoceja	makroalge zgornjega infralitorala	makroalge spodnjega infralitorala	kostnice	nevretenčarji v sedimentnem infralitoralu	nevretenčarji v sedimentnem cirkalitoralu	strižna napetost pri dnu (hidrografske spremembe)	HT - kamniti infralitoral
VT3P4						2X letno (konec maja/začetek junija; september)			
VT3P6						2X letno (konec maja/začetek junija; september)			
VT4P10						2X letno (konec maja/začetek junija; september)			
VT4P11						2X letno (konec maja/začetek junija; september)			
VT4P12						2X letno (konec maja/začetek junija; september)			
VT4P13						2X letno (konec maja/začetek junija; september)			
VT4P14						2X letno (konec maja/začetek junija; september)			
VT5P6						2X letno (konec maja/začetek junija; september)			
VT5P7						2X letno (konec maja/začetek junija; september)			
VT5P8						2X letno (konec maja/začetek junija; september)			

se nadaljuje

nadaljevanje

mesto vzorčenja	pozejdanka	kolenčasta cimodoceja	makroalge zgornjega infralitoral	makroalge spodnjega infralitoral	kostnice	nevretenčarji v sedimentnem infralitoral	nevretenčarji v sedimentnem cirkalitoral	strižna napetost pri dnu (hidrografske spremembe)	HT - kamniti infralitoral
BNCL1							2X letno (konec maja/začetek junija; september)		
BNCL2							2X letno (konec maja/začetek junija; september)		
BNCL3							2X letno (konec maja/začetek junija; september)		
00C2 (=BNCL4)							2X letno (konec maja/začetek junija; september)		
00CZ (=BNCL5)							2X letno (konec maja/začetek junija; september)		
BNCL6							2X letno (konec maja/začetek junija; september)		
BNCL7							2X letno (konec maja/začetek junija; september)		
00F2 (=BNCL8)							2X letno (konec maja/začetek junija; september)		

se nadaljuje

nadaljevanje

mesto vzorčenja	pozejdonka	kolenčasta cimodoceja	makroalge zgornjega infralitorala	makroalge spodnjega infralitorala	kostnice	nevretenčarji v sedimentnem infralitoralu	nevretenčarji v sedimentnem cirkalitoralu	strižna napetost pri dnu (hidrografske spremembe)	HT - kamniti infralitoral
							2X letno (konec maja/začetek junija; september)		
							2X letno (konec maja/začetek junija; september)		
							2X letno (konec maja/začetek junija; september)		
Tri ali štiri izbrane lokacije ob obali in pod glavnimi plovnimi potmi								Meritve med obdobju močnega in šibkega plimovanja ter v situacijah z močnim jugom ali burjo	

Tabela 1.1.4.: Elementi, ki so relevantni za **morske prehranjevalne spletke (deskriptor 4)**, mesta vzorčenja in frekvenca vzorčenja.

mesto vzorčenja	klorofil <i>a</i>	fitoplankton	zooplankton	klobučnjaške meduze	nevretenčarji v sedimentnem infralitoralumu	nevretenčarji v sedimentnem cirkalitoralumu
00BF/000F	3 globine (0 m, 10 m, dno), 2x mesečno	3 globine (0 m, 10 m, dno), 2x mesečno	vodni stolpec, 2x mesečno	vodni stolpec, 2x mesečno; videokamera		
K				vodni stolpec, 1x mesečno; videokamera		
CZ				vodni stolpec, 1x mesečno; videokamera		
F2				vodni stolpec, 1x mesečno; videokamera		
Transekti v odprtih vodah centralnega dela Tržaškega zaliva				v sodelovanju z zavodom za ribištvo; frekvenca se prilagodi		
Obalne vode				vizualni cenzus 1x tedensko		
13 mest					glej tabelo za D1 bentos	
11 mest						glej tabelo za D1 bentos

Tabela 1.1.5.: Elementi, ki so relevantni za **eutrofikacijo (deskriptor 5)**, mesta vzorčenja in frekvenca vzorčenja. Za spremljajoče parametre (temperatura, slanost, pH) glej tabelo 1.1.6.

mesto vzorčenja	klorofil α	fitoplankton	hranila	suspendiran organski ogljik (POC)	makroalge zgornjega infralitorala	kolenčasta cimodoceja	kisik pri dnu	prosojnost	skupni organski ogljik v sedimentu (TOC)
00MA	3 globine (0 m, 10 m, dno), 1x mesečno	3 globine (0 m, 10 m, dno), 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 10 m, dno), 1x mesečno					1x mesečno	
00BF/000F	3 globine (0 m, 10 m, dno), 1x mesečno	3 globine (0 m, 10 m, dno), 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 15 m, dno), 1x mesečno				senzor pri dnu kontinuirano (near real time)	1x mesečno	
00C4	3 globine (0 m, 10 m, dno), 1x mesečno	3 globine (0 m, 10 m, dno), 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 10 m, dno), 1x mesečno					1x mesečno	
000K	3 globine (0 m, 10 m, dno), 1x mesečno	3 globine (0 m, 10 m, dno), 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 10 m, dno), 1x mesečno	2 globini (0 m, dno), 1x mesečno				1x mesečno	
00B2	3 globine (0 m, 10 m, dno), 1x mesečno	3 globine (0 m, 10 m, dno), 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 10 m, dno), 1x mesečno	2 globini (0 m, dno), 1x mesečno				1x mesečno	

se nadaljuje

nadaljevanje

mesto vzorčenja	klorofil <i>a</i>	fitoplankton	hranila	suspendiran organski ogljik (POC)	makroalge zgornjega infralitorala	kolenčasta cimodoceja	kisik pri dnu	prosojnost	skupni organski ogljik v sedimentu (TOC)
00CZ	3 globine (0 m, 10 m, dno), 1x mesečno	3 globine (0 m, 10 m, dno), 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 15 m, dno), 1x mesečno	2 globini (0 m, dno), 1x mesečno			senzor pri dnu kontinuirano (near real time) #	1x mesečno	
00F2	3 globine (0 m, 10 m, dno), 1x mesečno	3 globine (0 m, 10 m, dno), 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 15 m, dno), 1x mesečno					1x mesečno	
DR3					2x letno (pomlad, jesen)				
KP1					2x letno (pomlad, jesen)				
Iz4					2x letno (pomlad, jesen)				
RR1					2x letno (pomlad, jesen)				
PP4					2x letno (pomlad, jesen)				
Por2					2x letno (pomlad, jesen)				

(# postavitve senzorja na širšem območju osrednjega dela zaliva (preveri se možnost postavitve na PALOMA stolp ali na nove strukture (boje), ki jih ARSO načrtuje) **se nadaljuje**

nadaljevanje

mesto vzorčenja	klorofil <i>a</i>	fitoplankton	hranila	suspendiran organski ogljik (POC)	makroalge zgornjega infralitorala	kolenčasta cimotoceja	kisik pri dnu	prosojnost	skupni organski ogljik v sedimentu (TOC)
Cy1						1x letno (junij/julij)			
Cy2						1x letno (junij/julij)			
Cy3						1x letno (junij/julij)			
Cy4			intersticielne vode 1x letno (junij/julij)			1x letno (junij/julij)			površinski sediment 1x letno (junij/julij)
Cy5						1x letno (junij/julij)			
Cy6			intersticielne vode 1x letno (junij/julij)			1x letno (junij/julij)			površinski sediment 1x letno (junij/julij)
Cy7						1x letno (junij/julij)			
Cy8						1x letno (junij/julij)			
Cy9			intersticielne vode 1x letno (junij/julij)			1x letno (junij/julij)			površinski sediment 1x letno (junij/julij)
Cy10						1x letno (junij/julij)			

Tabela 1.1.6: Elementi, ki so relevantni za **hidrografske pogoje (deskriptor 7)**, mesta vzorčenja in frekvenca vzorčenja.

mesto vzorčenja	temperatura	slanost	hranila	raztopljeni kisik	prosojnost	pH	alkalnost titrimetrično	strižna napetost pri dnu
00MA	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 10 m, dno), 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno		
000F	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 15 m, dno), 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 15 m, dno), 1x mesečno	
00C2	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 15 m, dno), 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno		
000K	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 10 m, dno), 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno		
0DB2	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 10 m, dno), 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno		
00CZ	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 15 m, dno), 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 15 m, dno), 1x mesečno	
00F2	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 15 m, dno), 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno		
00C1	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	4 globine (0 m, 5 m, 10 m, dno), 1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno	1x mesečno	CTD profil vodnega stolpca, 1x mesečno		
Tri ali štiri izbrane lokacije ob obali in pod glavnimi plovnimi potmi								Meritve med obdobju močnega in šibkega plimovanja ter v situacijah z močnim jugom ali burjo

Tabela 1.1.7: Elementi, ki so relevantni za koncentracije onesnaževal (deskriptor 8, merilo 8.1), mesta vzorčenja in frekvenca vzorčenja.

mesto vzorčenja	Prednostna organska onesnaževala v morski vodi	Kovine (vključno Hg) v morski vodi	Organokositrove spojine v morski vodi	PAH v sedimentih	Kovine (vključno Hg) v sedimentih	Organokositrove spojine v sedimentih	Prednostna organska onesnaževala v školjkah	Kovine (vključno Hg) v školjkah	Organokositrove spojine v školjkah
0024	4x letno	4x letno	4x letno				1x letno	1x letno	1x letno
0035	4x letno	4x letno	4x letno				1x letno	1x letno	1x letno
0DB2	4x letno	4x letno	4x letno				1x letno	1x letno	1x letno
00CZ	4x letno	4x letno	4x letno	1x letno	1x letno	1x letno			
000K	4x letno	4x letno	4x letno	1x letno	1x letno	1x letno			
00MA	4x letno	4x letno	4x letno	1x letno	1x letno	1x letno			
000F	4x letno	4x letno	4x letno	1x letno	1x letno				
0014				1x letno	1x letno	1x letno			
00C2				1x letno	1x letno				
00F2				1x letno	1x letno				
BNCL10				1x letno	1x letno	1x letno			
00TM							1x letno	1x letno	1x letno

Tabela 1.1.8: Elementi, ki so relevantni za vplive onesnaževal (deskriptor 8, merilo 8.2), mesta vzorčenja in frekvenca vzorčenja.

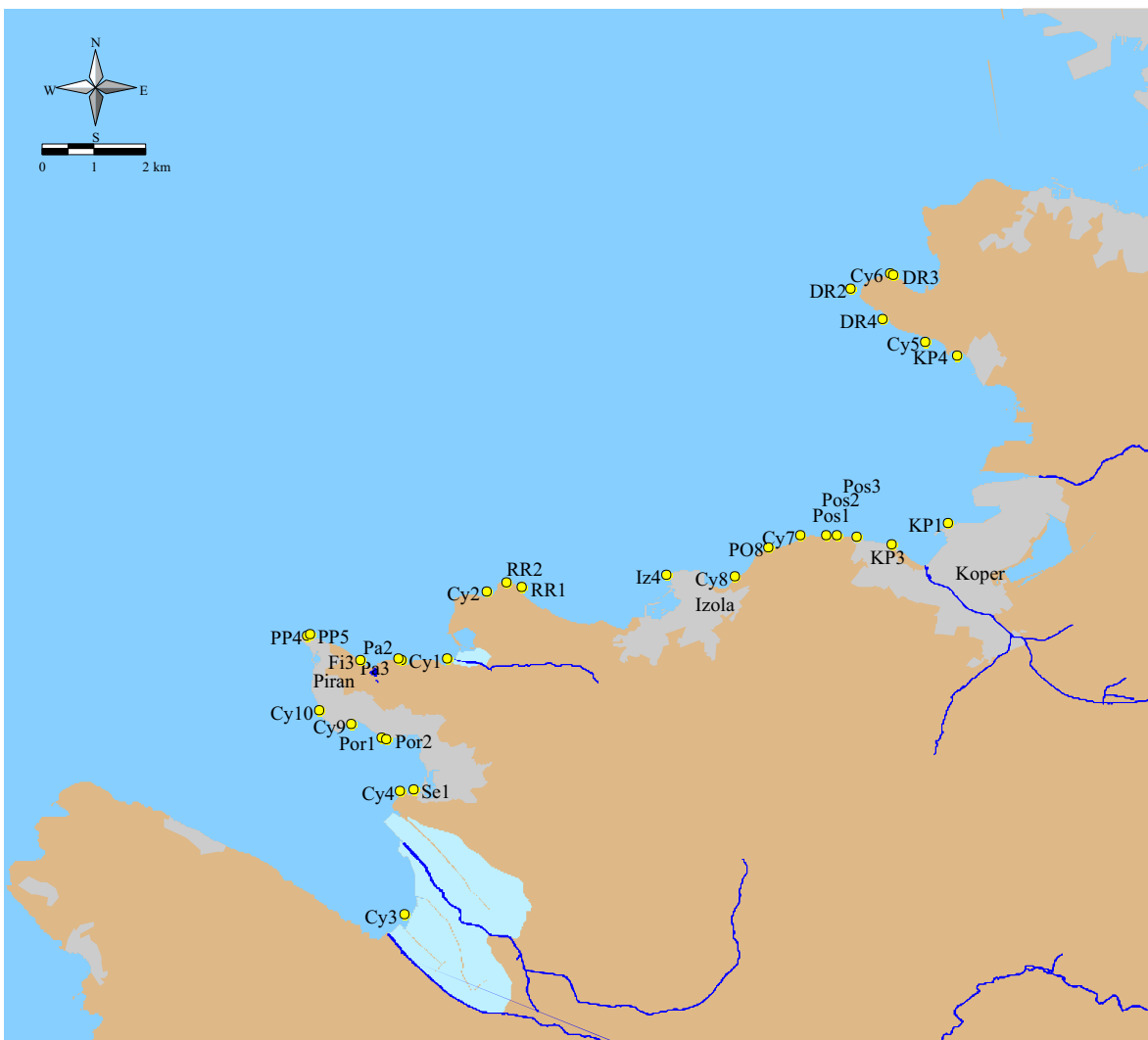
mesto vzorčenja	Metalotioneini	Acetilholin esteraza	Glutation-S-transferaza	katalaza	TBARS peroksidacija lipidov	Mikronukleusi Trajne poškodbe DNA	Comet test	Test nevtralnno rdeče- stabilnost lizosomskih	EROD ribe
00TM	2 x letno (zima in poletje), prebavna žleza	2 x letno (zima in poletje), škrge	2 x letno, škrge in prebavna žleza	2 x letno, škrge in prebavna žleza	2 x letno, in prebavna žleza	2 x letno, škrge	2 x letno, škrge in hemolimfa	2 x letno, hemolimfa	2 x letno, jetra
0024	2 x letno (zima in poletje), prebavna žleza	2 x letno (zima in poletje), škrge	2 x letno, škrge in prebavna žleza	2 x letno, škrge in prebavna žleza	2 x letno, in prebavna žleza	2 x letno, škrge	2 x letno, škrge in hemolimfa	2 x letno, hemolimfa	2 x letno, jetra
0035	2 x letno (zima in poletje), prebavna žleza	2 x letno (zima in poletje), škrge	2 x letno, škrge in prebavna žleza	2 x letno, škrge in prebavna žleza	2 x letno, in prebavna žleza	2 x letno, škrge	2 x letno, škrge in hemolimfa	2 x letno, hemolimfa	2 x letno, jetra
00BF	2 x letno (zima in poletje), prebavna žleza	2 x letno (zima in poletje), škrge	2 x letno, škrge in prebavna žleza	2 x letno, škrge in prebavna žleza	2 x letno, in prebavna žleza	2 x letno, škrge	2 x letno, škrge in hemolimfa	2 x letno, hemolimfa	2 x letno, jetra
0DB2	2 x letno (zima in poletje), prebavna žleza	2 x letno (zima in poletje), škrge	2 x letno, škrge in prebavna žleza	2 x letno, škrge in prebavna žleza	2 x letno, in prebavna žleza	2 x letno, škrge	2 x letno, škrge in hemolimfa	2 x letno, hemolimfa	2 x letno, jetra

Tabela 1.1.9: Elementi, ki so relevantni za onesnaževala v morski hrani (deskriptor 9), mesta vzorčenja in frekvenca vzorčenja.

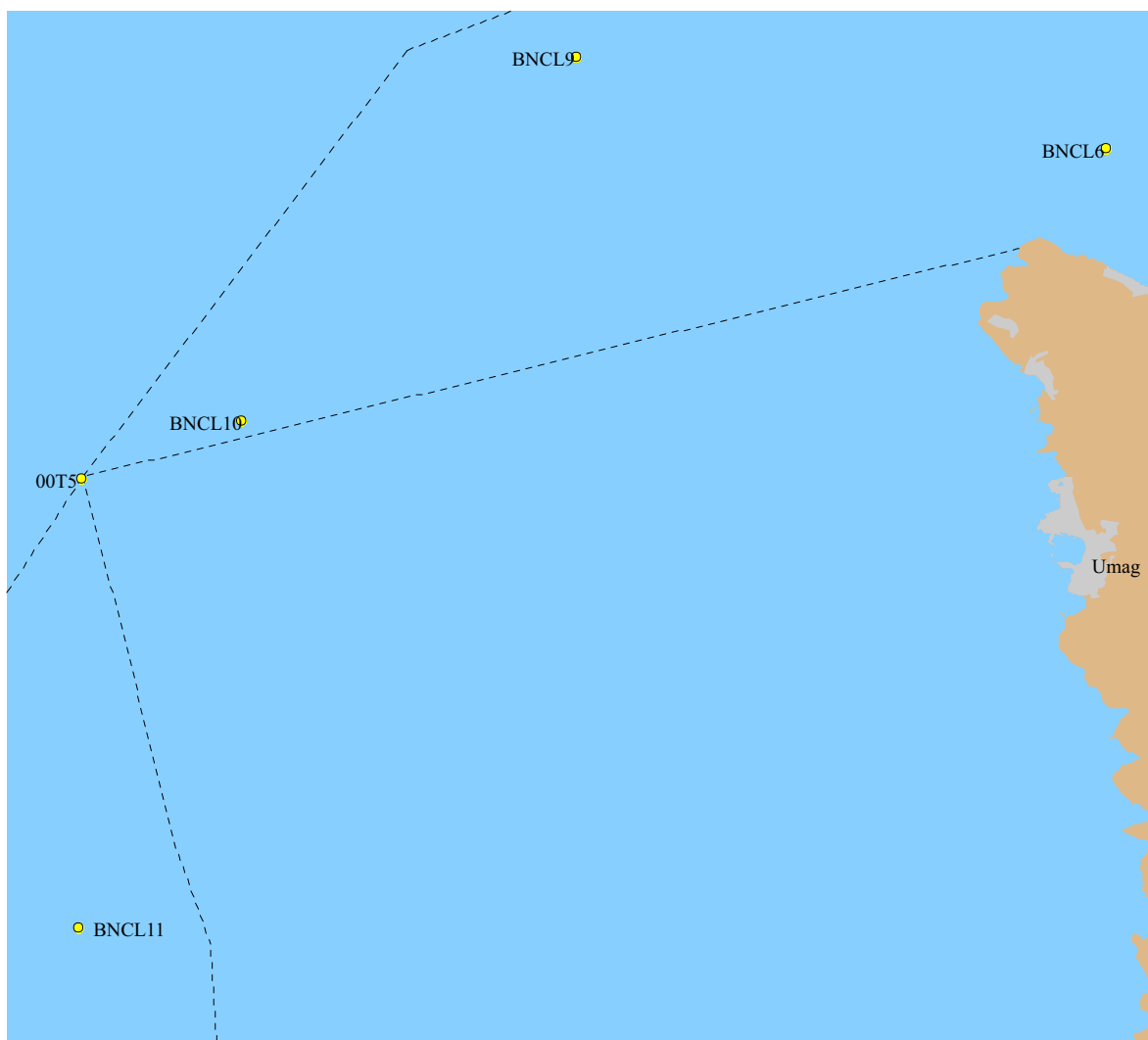
mesto vzorčenja	Prednostna organska onesnaževala v školjkah	Kovine (vključno Hg) v školjkah	Prednostna onesnaževala v ribah	Kovine (Cd in Hg) v ribah	biomarkerji
0024	2x letno	2x letno			
0035	2x letno	2x letno			
0DB2	2x letno	2x letno			
SLO morje			1x letno	1x letno	
5 mest					glej tabelo za D8.2



Slika 1.1.1: Predlagana mesta vzorčenja v vodnem stolpcu za program spremljanja stanja.



Slika 1.1.2: Predlagana mesta vzorčenja na morskem dnu za vegetacijo (makroalge in kritosemenke) za program spremljanja stanja.



Slika 1.1.4: Predlagana mesta vzorčenja v odprtih vodah za bentoške nevretenčarje, D1 - vodni stolpec in koncentracije onesnaževal v sedimentih.

1.2 Makroalge na skalnatem dnu infralitorala

1.2.1 Uvod

Makroalge na skalnatem dnu zgornjega infralitorala so vključene v program spremljanja stanja po Vodni Direktivi že od leta 2007 (Mozetič *in sod.*, 2008). Za oceno stanja makroalg se je uporabljal Indeks **vrednotenja ekološkega stanja (EEI)** (Orfanidis *in sod.*, 2001). Vrednotenje z indeksom EEI temelji na predpostavki, da so morski bentoški makrofiti bioindikatorji za antropogene pritiske v okolju, ki se odzivajo predvsem na spremembe v vnosu hranil iz kmetijstva, industrijskih in komunalnih izpustov. Indeks EEI je vključen v nacionalno metodologijo vrednotenja ekološkega stanja obalnih voda z makrofitskimi algami. Indeks EEI upošteva tako oportunistične kot večletne makroalge.

Leta 2011 so avtorji indeks izboljšali, tako da sedaj ocenjuje stanje v ekosistemu z neprekinjenimi števili – od tod ime EEI-c oziroma EEI neprekinjena formula (continuous formula) (Orfanidis *in sod.*, 2011). **EEI-c** temelji na podrobnejši razdelitvi rodov alg v ekološke razrede. Po novem je prvi razred ESG I razdeljen v tri podrazrede (IA, IB in IC), drugi razred ESG II pa v dva podrazreda (IIA in IIB). Metodologija je bila potrjena in sprejeta v okviru izvedene interkalibracije za metodologije vrednotenja ekološkega stanja obalnega morja za sredozemske države (MED-GIG, 2013).

Predlagamo, da se v program spremljanja stanja po ODMS vključijo tudi makroalge na skalnatem dnu spodnjega infralitorala, vendar z nižjo frekvenco vzorčenja.

Element makroalge je uporaben za vrednotenje stanja po deskriptorjih D1, D2, D5 in D6.

1.2.2 Izbira in velikost mesta vzorčenja

Vzorčenje biološkega elementa makroalge se izvaja na skalnatem dnu.

Makroalge zgornjega infralitorala: Na odsekih s skalnatim dnem, obalno črto razdelimo na *dolžinske segmente* glede na poznane in možne obremenitve (pomorski promet, marikultura, komunalne odplake, marine, industrija, kmetijstvo, itd.) ter geomorfologijo

obale in morskega dna (Lipej *in sod.*, 2007). Glede na število obremenitev izberemo različno število dolžinskih segmentov.

Na vsakem dolžinskem segmentu nato izberemo mesto vzorčenja v velikosti 10 m x 10 m. Na dolžinskih segmentih, kjer je kamnit infralitoralni pas širok, je priporočljivo vzorčenje na globini med 2. in 4. m. Na dolžinskih segmentih, kjer je v tem globinskem intervalu že sedimentno dno, lahko vzorčujemo tudi na 1 m globine.

Vzorčenje makroalg poteka večinoma v obalnih vodah tipa OM M1 (po Vodni direktivi), kjer je v obalnem pasu prevladujoče skalnato dno. Vzorčenje lahko poteka tudi v obalnih vodah tipa OM M3 (kjer ob obali prevladuje sediment), če v vodnih telesih tega tipa trda podlaga (tudi če alohtona) pokriva vsaj 20 % obalne črte ali obalnih voda (do globine 4-5 m).

Vzorčenje izvedemo v naslednjih habitatnih tipih, skladno z EUNIS razvrstitvijo habitatov (EEA, 2004):

A3.2 Kamniti infralitoral zmerno izpostavljen valovanju in/ali tokovanju in plimovanju;

A3.3 Kamniti infralitoral zaščiten pred valovanjem in/ali tokovanjem in plimovanjem;

A5.5 - A5.53 Obalni travniki kritosemenk z dominantnimi makroalgami na kamnih.

Makroalge spodnjega infralitorala: Vzorčenje poteka na skalnatem dnu v globinskem razponu od 5 m do 8 m. V slovenskem morju je smiselno opraviti tovrstna vzorčenja le v štirih predelih slovenskega morja: na piranski Punti, v Fiesi, v Pacugu in na rtu Ronek. Na vsakem od omenjenih predelih izberemo mesto vzorčenja v velikosti 10 m x 10 m.

Vzorčenje izvedemo v habitatnem tipu, skladno z EUNIS razvrstitvijo habitatov (EEA, 2004):

A4.26 Sredozemske koraligene združbe zmerno izpostavljene hidrodinamičnim silam.

1.2.3 Predlog mest vzorčenja

Za makroalge zgornjega infralitorala predlagamo, da se obdržijo mesta vzorčenja, ki so že vključena v nacionalni monitoring po Vodni Direktivi (Tabela 1.2.1). Za makroalge spodnjega infralitorala pa predlagamo nekatera od tistih mest, kjer so bila opravljena vzorčenja za potrebe začetne presoje stanja slovenskega morja (Tabela 1.2.1, glej tudi Orlando-Bonaca in sod., 2012a).

Tabela 1.2.1: Predlog mest vzorčenja za makroalge zgornjega in spodnjega infralitorala.

Fitalni pas	Mesto vzorčenja	Zemlj. širina (N)	Zemlj. dolžina (E)	Globina (m)	Št. paralelk
zgornji infralitoral	DR2	45°35.479'	13°42.067'	2 - 4	3
	DR3	45°35.632'	13°42.697'	2 - 4	3
	DR4	45°35.170'	13°42.543'	2 - 4	3
	KP4	45°34.787'	13°43.672'	2 - 4	3
	KP1	45°33.030'	13°43.528'	2 - 4	3
	KP3	45°32.804'	13°42.688'	2 - 4	3
	PO8	45°32.769'	13°40.834'	2 - 4	3
	Iz4	45°32.475'	13°39.299'	2 - 4	3
	RR1	45°32.354'	13°37.137'	2 - 4	3
	Pa2	45°31.586'	13°35.336'	2 - 4	3
	PP4	45°31.841'	13°33.924'	2 - 4	3
	Por1	45°30.774'	13°35.039'	2 - 4	3
	Por2	45°30.752'	13°35.094'	2 - 4	3
	Se1	45°30.234'	13°35.511'	2 - 4	3
	spodnji infralitoral	RR2	45°32.401'	13°36.901'	6
Pa3		45°31.597'	13°35.294'	6	3
Fi3		45°31.579'	13°34.713'	6	3
PP5		45°31.854'	13°33.959'	6	3

1.2.4 Čas in frekvenca vzorčenja

Makroalge zgornjega infralitorala vzorčimo dvakrat letno: v spomladanskem času (maj – junij) in konec poletja (avgust - september). Vzorčenje opravimo med 9. in 13. uro.

Frekvenca vzorčenja: vzorčenje poteka z različno letno frekvenco za posamezno mesto vzorčenja, glede na potrebe trenutno veljavnega nacionalnega programa spremljanja stanja.

Makroalge spodnjega infralitorala vzorčimo enkrat letno, v poletnem času (julij – avgust).

Vzorčenje opravimo med 9. in 13. uro.

Frekvenca vzorčenja: predlagamo, da se vzorči vsaj 2x v 6 letnem ciklusu.

1.2.5 Metoda vzorčenja

Postopek vzorčenja je enak za makroalge zgornjega in spodnjega infralitorala. Vzorčenje poteka tako, da na dno položimo kvadrat 20 cm × 20 cm (400 cm²), kar predstavlja eno paralelko. Ta površina velja za minimalno površino vzorčenja za sredozemske infralitoralne združbe (Montesanto in Panayotidis, 2001). Površino znotraj kvadrata pred jemanjem vzorca posnamemo s podvodnim fotoaparatom.

S površine znotraj kvadrata s strgalom postrgamo vso floro do trdne podlage. Vse nastrgane alge znotraj enega okvirja začasno shranimo v plastični vrečki, ki smo jo predhodno označili z vodoodpornim pisalom (mesto vzorčenja, številka paralelke, datum vzorčenja). Na vsakem mestu vzorčenja pobereмо po tri paralelke (en vzorec). Na podvodno tablico zapišemo globino vsake paralelke.

Na obali/palubi na terenski list zapišemo osnovne podatke o vzorčenju: mesto vzorčenja, lokacija, datum, metodika, globine, delovna ekipa (vzorčevalci, fotografi,...), opombe in morebitna druga opažanja.

1.2.6 Laboratorijska obdelava vzorcev

Postopek obdelave vzorcev je enak za makroalge zgornjega in spodnjega infralitorala. Po prihodu iz terena še sveže vzorce makroalg pregledamo v laboratoriju. Taksonomsko določanje poteka s pomočjo binokularne lupe in mikroskopa. Makroalge določamo do rodu oziroma, kjer je možno, do vrste natančno. V času določanja vzorce hranimo v hladilniku.

Za določanje taksonov uporabljamo naslednje ključne in sezname: Ercegović (1952), Giaccone (1973), Ribera *in sod.* (1992), Gallardo *in sod.* (1993), Battelli (1996, 1997, 2000), Bressan in Babbini (2003), Gómez Garreta *in sod.* (2001), Sfriso (2010, 2011).

Pregledane taksone shranimo v vodoodporni plastični posodi primerne velikosti v 5% raztopini nevtraliziranega formaldehida ali 70% raztopini etanola. V posodo dodamo etiketo iz paos papirja, opremljeno s podatki o vzorcu. Izjema so vzorci koraligenih alg, ki jih le posušimo na zraku, preden jih shranimo v primerno označene posode.

Za vsako določeno vrsto oziroma takson ocenimo pokrovnost na kvadratu 20 cm × 20 cm (vertikalna projekcija). Upoštevamo samo tiste taksone, ki pokrivajo vsaj 1% površine (4 cm²) (Panayotidis *in sod.*, 2004). Za vsako paralelko pokrovnost taksonov izračunamo posebej.

1.2.7 Uvrščanje makroalg v razrede ekološkega stanja in izračun EEI-c ter REK

Pri oceni stanja makroalg zgornjega in spodnjega infralitorala uporabljamo Indeks vrednotenja ekološkega stanja (EEI) (Orfanidis *in sod.*, 2001). Leta 2011 so avtorji indeks izboljšali tako, da sedaj ocenjuje stanje v ekosistemu z neprekinjenimi števili – od tod ime **EEI-c** oziroma EEI neprekinjena formula (continuous formula) (Orfanidis *in sod.*, 2011). **EEI-c** temelji na podrobnejši razdelitvi rodov alg v ekološke razrede (ESG: Ecological State Groups). Po novem je prvi razred ESG I razdeljen v tri podrazrede (IA, IB in IC), drugi razred ESG II pa v dva podrazreda (IIA in IIB).

EEI-c je biološka metrika, ki se uporabi za modul obremenjenosti obalnih voda s hranili (trofičnost).

Za izračun **EEI-c** indeksa v prvem koraku razporedimo vse prepoznane rodove makroalg v ekološke razrede (Orfanidis *in sod.*, 2011). V ESG I se uvrščajo vrste, ki rastejo počasi in imajo dolgo vegetacijsko dobo. Za uvrščanje v podrazrede (IA, IB in IC) upoštevamo njihovo prilagodljivost na svetlobne razmere. V ESG II se uvrščajo vrste, ki hitro rastejo in imajo kratko vegetacijsko dobo oz. oportunistične. Za uvrščanje v podrazrede (IIA in IIB)

upoštevamo njihovo stopnjo rasti (Orfanidis *in sod.*, 2011). Seznam taksonov in njihova razporeditev v ekološke podrazrede sta prikazana v Tabeli 1.2.2.

Tabela 1.2.2: Seznam relevantnih taksonov za slovenske obalne vode in njihova razporeditev v ekološke razrede ESGI (IA, IB in IC) in ESG II (IIA in IIB) (po Orfanidis *in sod.*, 2011).

Takson	ESG
zelene alge	
<i>Acetabularia acetabulum</i>	IC
<i>Anadyomene stellata</i>	IC
<i>Bryopsis</i> spp.	IIB
<i>Chaetomorpha</i> sp.	IIB
<i>Cladophora</i> spp.	IIB
<i>Cladophora prolifera</i>	IIB
<i>Codium bursa</i>	IIB
<i>Codium effusum</i>	IIB
<i>Codium fragile</i> subsp. <i>tomentosoides</i>	IIB
<i>Codium vermilara</i>	IIB
<i>Flabellia petiolata</i>	IC
<i>Halimeda tuna</i>	IC
<i>Ulva intestinalis</i>	IIB
<i>Ulva rigida</i>	IIB
<i>Ulva</i> sp.	IIB
<i>Valonia utricularis</i>	IIB
rjave alge	
<i>Cladostephus spongiosus</i> f. <i>verticillatus</i>	IIA
<i>Cystoseira barbata</i>	IB
<i>Cystoseira compressa</i>	IB
<i>Cystoseira compressa</i> var. <i>rosetta</i>	IB
<i>Cystoseira corniculata</i>	IA
<i>Cystoseira crinita</i>	IA
<i>Cystoseira crinitophylla</i>	IA
<i>Cystoseira sauvageauana</i>	IA
<i>Cystoseira spinosa</i> var. <i>compressa</i>	IA
<i>Cystoseira</i> sp.	IA
<i>Dictyopteris polypodioides</i>	IIA
<i>Dictyota dichotoma</i>	IIA
<i>Dictyota dichotoma</i> var. <i>implexa</i>	IIA
<i>Dictyota linearis</i>	IIA
<i>Padina pavonica</i>	IB
<i>Sphacelaria</i> spp.	IIA
<i>Stypocaulon scoparium</i>	IIA

Takson	ESG
<i>Zanardinia typus</i>	IIA
rdeče alge	
<i>Alsidium corallinum</i>	IIA
<i>Amphiroa rigida</i>	IC
<i>Antithamnion</i> spp.	IIB
<i>Boergeseniella fruticulosa</i>	IIA
<i>Botryocladia botryoides</i>	IIA
<i>Ceramium</i> spp.	IIB
<i>Champia</i> sp.	IIA
<i>Chondria</i> spp.	IIA
<i>Corallina officinalis</i>	IC
<i>Gelidiella</i> sp.	IIA
<i>Gelidium</i> cf. <i>latifolium</i>	IIA
<i>Gelidium spinosum</i> var. <i>hystrix</i>	IIA
<i>Gelidium</i> sp.	IIA
<i>Gigartina</i> sp.	IIA
<i>Gracilaria verrucosa</i>	IIA
<i>Gymnogongrus</i> sp.	IB
<i>Gracilaria bursa-pastoris</i>	IIA
<i>Haliptilon virgatum</i>	IC
<i>Halopithys incurva</i>	IB
<i>Hydrolithon boreale</i>	IC
<i>Hydrolithon farinosum</i>	IC
<i>Jania rubens</i>	IC
<i>Jania</i> sp.	IC
<i>Laurencia obtusa</i>	IIA
<i>Laurencia papillosa</i>	IIA
<i>Laurencia</i> spp.	IIA
<i>Lithophyllum corallinae</i>	IC
<i>Lithophyllum cystoseirae</i>	IC
<i>Lithophyllum pustulatum</i>	IC
<i>Lithophyllum</i> spp.	IC
<i>Lithothamnion</i> spp.	IC
<i>Lomentaria</i> sp.	IIA
<i>Neogoniolithon brassica-florida</i>	IC
<i>Mesophyllum expansum</i>	IC
<i>Nitophyllum punctatum</i>	IIA
<i>Osmundea pinnatifida</i>	IIA
<i>Peyssonnelia polymorpha</i>	IC
<i>Peyssonnelia rosa-marina</i>	IC
<i>Peyssonnelia rubra</i>	IC
<i>Peyssonnelia squamaria</i>	IC
<i>Phyllophora</i> sp.	IIA
<i>Phymatolithon lenormandii</i>	IC
<i>Pneophyllum fragile</i>	IC

Takson	ESG
<i>Polysiphonia</i> spp.	IIB
<i>Porphyra</i> spp.	IIB
<i>Pterocladia</i> <i>capillacea</i>	IIA
<i>Rhodomenia</i> sp.	IIA
<i>Wrangelia</i> <i>penicillata</i>	IIB
<i>Titanoderma</i> <i>cystoseirae</i>	IC

Pri vrednotenju ekološkega stanja ni pomembno le število taksonov iz prvega in drugega ekološkega razreda, ampak tudi pokrovnost (%) posameznih taksonov makroalg iz ESG I in II.

Za končni rezultat pokrovnosti ekoloških razredov ESG I in II v eni paralelki uporabimo spodnji enačbi (1 in 2):

$$ESG I (\% \text{ pokrovnost}) = [(IA * 1) + (IB * 0,8) + (IC * 0,6)]$$

$$ESG II (\% \text{ pokrovnost}) = [(IIA * 0,8) + (IIB * 1)]$$

Da bi se izognili diskretnim skokom na mejah med vnaprej določenimi ekološkimi kategorijami, je bil EEI-c opredeljen kot neprekinjena funkcija (Orfanidis *in sod.*, 2011). Hiperbolični model je bil razvit s približevanjem vrednosti indeksa (Slika 1.2.1). Sestavljen je iz dveh nelinearnih oblik (parabolični funkciji) - ESG I (x os) in ESG II (y os) in iz enega interakcijskega izraza (hiperbolična funkcija). Ker osi predstavljajo pokrovnost v odstotkih, se EEI-c lahko določi prek drugega polinomskega reda (enačba 3):

$$p(x, y) = a + b * \left(\frac{x}{100}\right) + c * \left(\frac{x}{100}\right)^2 + d * \left(\frac{y}{100}\right) + e * \left(\frac{y}{100}\right)^2 + f * \left(\frac{x}{100}\right) * \left(\frac{y}{100}\right)$$

kjer je:

x = rezultat za ESG I po enačbi 1,

y = rezultat za ESG II po enačbi 2,

a , b , c , d , e in f so pa fiksne vrednosti (koeficienti hiperbole) in sicer:

$$a = 0,4680$$

$$b = 1,2088$$

$$c = -0,3583$$

$$d = -1,1289$$

$$e = 0,5129$$

$$f = -0,1869$$

V namen, da se $p(x,y)$ vrednost ohrani pod 1, se $p(x,y)$ vrednost vnese v enačbo 4 (oziroma se enostavno reže vrednosti, ki so višje od 1). Končna EEI-c vrednost je med 2 in 10 (enačba 4):

$$EEI-c_j = 2 + 8 * \min\{1, p(x, y)\}$$

kjer je:

EEI-c_j – vrednost indeksa EEI-c za j-to paralelko.

Po zgoraj opisanemu postopku dobimo EEI-c vrednost za posamezno paralelko. Za končni EEI-c rezultat posameznega vzorca je potrebno izračunati povprečje treh EEI-c vrednosti paralelk (enačba 5):

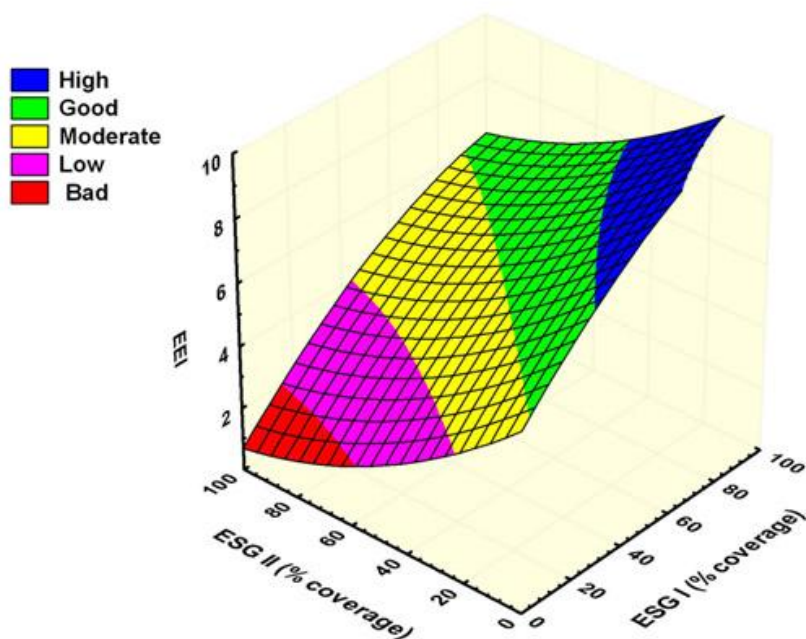
$$EEI-c_v = \frac{\sum_{j=1}^n EEI-c_j}{n}$$

kjer je:

EEI-c_v – vrednost indeksa EEI-c za v-ti vzorec,

EEI-c_j – vrednost indeksa EEI-c za j-to paralelko,

n – število paralelk v vzorcu.



Slika 1.2.1: Prikaz EEI-c hiperbolične funkcije (po Orfanidis *in sod.*, 2011).

Vsako vrednotenje ekološkega stanja mora v končni oceni opredeliti odstopanje od referenčnih razmer. Za prikaz tega odstopanja se uvede razmerje ekološke kakovosti ali REK vrednosti, kar se doseže z normalizacijo vrednosti posameznih metrik (indeksov). To pomeni, da mora biti vsaka biološka metrika izražena kot številka med 0 (zelo slabo ekološko stanje) in 1 (zelo dobro ekološko stanje). Za vsak izračun biološke metrike na mestu vzorčenja, ta razpon izhaja iz razmerja med opaženo vrednostjo in vrednostjo iste metrike pod referenčnimi pogoji.

Za normalizacijo vrednosti EEI-c indeksa se uporabi enačbo 6, ki predstavlja razmerje ekološke kakovosti EEI-c:

$$EEIc_REK = 0,125 * \left(\frac{EEI_c}{RC}\right) - 0,25$$

kjer je:

EEI-c_REK = razmerje ekološke kakovosti Indeksa ovrednotenja ekološkega stanja,

EEI-c = izračunana vrednost Indeksa ovrednotenja ekološkega stanja, in

RC = referenčna vrednost (RC=10).

Enako enačbo normalizacije se uporabi v vseh stopnjah klasifikacije v razrede ekološkega stanja na podlagi makroalg.

1.2.8 Uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja

Mesto vzorčenja uvrstimo v razred ekološkega stanja na podlagi enega biološkega vzorca tako, da izračunano vrednost $EEI-c_{REK}$ biološkega vzorca primerjamo z mejnimi vrednostmi razredov kakovosti, ki so prikazane v Tabeli 1.2.3.

V primeru, da so v posameznem letu na voljo rezultati več vzorčenj, izračunamo najprej letno povprečje vrednosti indeksa $EEI-c$ za posamezno mesto vzorčenja (enačba 7) in nato iz povprečja izračunamo REK vrednosti Indeksa vrednotenja ekološkega stanja.

$$EEI-c_i = \frac{\sum_{v=1}^n EEI-c_v}{n}$$

kjer je:

$EEI-c_i$ – vrednost indeksa $EEI-c$ za i -to mesto vzorčenja za posamezno leto,

$EEI-c_v$ – vrednost indeksa $EEI-c$ za v -ti vzorec,

n – število vzorcev v posameznem letu.

Dobljeno vrednost nato primerjamo z mejnimi vrednostmi razredov kakovosti. Podane mejne vrednosti za $EEI-c$ in REK so sprejele vse sredozemske države članice EU, ki uporabljajo $EEI-c$.

Tabela 1.2.3: Razpon EEI-c in REK za posamezne razrede kakovosti (MED-GIG, 2013).

Klasifikacija antropogenih obremenitev	Razred ekološkega stanja	Razpon EEI-c	Razpon EEI-c_REK
Prvotno/normalno stanje	Zelo dober	$10 \geq \text{EEI-c} \geq 8,09$	$1 \geq \text{REK} \geq 0,76$
Blaga obremenitev	Dober	$8,09 > \text{EEI-c} \geq 5,84$	$0,76 > \text{REK} \geq 0,48$
Zmerna obremenitev	Zmeren	$5,84 > \text{EEI-c} \geq 4,04$	$0,48 > \text{REK} \geq 0,25$
Močna obremenitev	Slab	$4,04 > \text{EEI-c} \geq 2,34$	$0,25 > \text{REK} \geq 0,04$
Pred izumrtjem	Zelo slab	$2,34 > \text{EEI-c}$	$0,04 > \text{REK}$

1.3 Travnik pozejdonke med Koprom in Izolo

1.3.1 Uvod

Prekomeren vnos nutrientov iz različnih virov, kot so komunalne in industrijske odplake, kmetijstvo in urbanizacija obalnih območij, predstavlja grožnjo travnikom morskih trav po vsem svetu. Najbolj pogosto so travniki prizadeti zaradi zmanjšanja razpoložljive svetlobe, ki jo povzroči prekomerna razrast epifitskih in makrofitskih alg v plitkih obalnih območjih ali cvetenje fitoplanktona v globljih obalnih vodah. Posredni učinki evtrofikacije, ki še pospešijo izginjanje travnikov, so resuspenzija sedimenta, povečano dihanje v ekosistemu in posledično oksidativni stres, manjša izmenjava vodnih mas zaradi prekomerne algalne razrasti, itd. (Burkholder *in sod.*, 2007).

V slovenskem morju najdemo 4 vrste morskih kritosemenk: *Posidonia oceanica*, *Cymodocea nodosa*, *Zostera marina* in *Zostera noltei* (Lipej *in sod.*, 2007).

Morska trava pozejdonka je zaščitena vrsta morskih kritosemenk, ki v Sredozemskem morju tvori obsežne morske travnike v globinskem razponu od 0,5 do 30-40 m globine. Je dolgoživeča vrsta z zelo počasno rastjo (Marba' *in sod.*, 2004). Ker se hitro odzove na negativne dražljaje iz okolice, ki se jih da tudi izmeriti ter spričo dejstva, da gre za dolgoživečo vrsto, je uporabna indikatorska vrsta.

Po starejših zapisih je pozejdonka poseljevala več območij v Tržaškem zalivu, po letu 1960 pa je prišlo do obsežne degradacije (Simonetti, 1966). Danes je v Tržaškem zalivu navzoč le še en travnik pozejdonke (Vukovič, 1982), v bližini ceste, ki iz Žusterne vodi proti Izoli, kjer raste v obliki večjih ali manjših »otočkov« (Turk in Vukovič, 1998). Prvo kartiranje travnika, ki je bilo opravljeno leta 1993 (Vukovič in Turk, 1995), je pokazalo, da je travnik približno 1 km dolg in razširjen na globini od 0,5 do 4 m (50 m od obale). Travnik je krpasto razprostranjen in obrobljen s travnikom kolenčaste cimodoceje. Travnik pozejdonke zajema približno 0,64 ha površine (T. Makovec, *ustno sporočilo*).

Element pozejdonka je uporaben za vrednotenje stanja po deskriptorjih D1 in D6.

1.3.2 Izbira in velikost mesta vzorčenja

Zotraj travnika pozejdonke pri Žusterni izberemo tri mesta vzorčenja, v širini 10 metrov. Na vsakem mestu vzorčenja vzorčimo v treh globinskih razponih.

1.3.3 Predlog mest vzorčenja

Predlagamo, da bi se travnik pozejdonke vzorčilo na treh mestih, kjer so prisotni večji otočki pozejdonke (Tabela 1.3.1).

Tabela 1.3.1: Predlog mest vzorčenja za pozejdonko v infralitoralalu.

Fitalni pas	Mesto vzorčenja	Zemlj. širina (N)	Zemlj. dolžina (E)	Globinski razpon (m)	Št. paralelk
zgornji infralitoral	Pos1	45°32.889'	13°41.704'	1-2	3
	Pos1	45°32.889'	13°41.704'	2-3	3
	Pos1	45°32.889'	13°41.704'	3-4	3
	Pos2	45°32.893'	13°41.860'	1-2	3
	Pos2	45°32.893'	13°41.860'	2-3	3
	Pos2	45°32.893'	13°41.860'	3-4	3
	Pos3	45°32.879'	13°42.157'	1-2	3
	Pos3	45°32.879'	13°42.157'	2-3	3
	Pos3	45°32.879'	13°42.157'	3-4	3

1.3.4 Čas in frekvenca vzorčenja

Travnik pozejdonke vzorčimo enkrat letno, v poletnem času (od junija do septembra). Vzorčenje opravljamo med 9. in 13. uro.

Frekvenca vzorčenja: predlagamo, da se vzorči vsaj 2x v 6 letnem ciklusu.

1.3.5 Metoda vzorčenja

Vzorčenje pozejdonke poteka tako, da na dno položimo kvadrat $20\text{ cm} \times 20\text{ cm}$ (400 cm^2), kar predstavlja eno paralelko. Ta površina velja za minimalno površino vzorčenja za sredozemske infrolitoralne združbe (Montesanto in Panayotidis, 2001). Zaradi biogeografskih posebnosti travnika, ki je krpasto razprostranjen, je potrebno vzorčiti na tistih postajah, kjer so prisotni večji otočki pozejdonke. Na vsakem mestu vzorčenja preštejemo 3 vzorce v različnih globinskih razponih. Prvi vzorec preštejemo v globinskem razponu 1-2 m, drugega v globinskem razponu 2-3 m in tretjega v globinskem razponu 3-4 m. Vsak vzorec je sestavljen iz treh paralelk, torej skupno preštejemo 9 paralelk. Vzorčenje je nedestruktivno, zato najprej s podvodnim fotoaparatom posnamemo površino znotraj kvadrata. Nato preštejemo število šopov na površini vzorčenja znotraj kvadrata. Na podvodno tablico zapišemo število šopov pozejdonke znotraj vsake paralelke in globino vsake paralelke.

Za ugotavljanje globinske razširjenosti travnikov pozejdonke je nato potrebno na vsakem mestu vzorčenja ugotoviti in zapisati spodnjo globinsko mejo pojavljanja šopov trave.

Na obali/palubi na terenski list zapišemo osnovne podatke o vzorčenju: mesto vzorčenja, lokacija, datum, metodika, globine, delovna ekipa (vzorčevalci, fotografi,...), opombe in morebitna druga opažanja.

1.3.6 Laboratorijska obdelava vzorcev

Vzorčenje je nedestruktivno in zato laboratorijsko delo ni potrebno.

1.3.7 Uvrščanje vzorcev pozejdonke v razrede ekološkega stanja

Najprej izračunamo povprečno število šopov za vsak vzorec (povprečje treh paralelk). Povprečno gostoto šopov na 400 cm^2 nato pretvorimo v gostoto na 1 m^2 . Za oceno ekološkega stanja posameznega vzorca uporabimo klasifikacijo, ki jo je pripravil prof. dr. P. Panayotidis (Tabela 1.3.2) ne glede na globino vzorčenja (Lipej in sod., 2007).

Tabela 1.3.2: Kriteriji za vrednotenje ekološkega stanja posameznega vzorca in mesta vzorčenja znotraj travnika pozejdonke v slovenskem morju glede na število šopov/m² (prirejeno po Panayotidisu v Lipej in sod., 2007).

	Zelo gosto	Gosto	Manj gosto	Redko	Zelo redko
Število šopov/m ²	> 750	500 – 749	250- 499	50-249	<50
Razred ekološkega stanja	Zelo dober	Dober	Zmeren	Slab	Zelo slab

1.3.8 Uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja

Za uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja izračunamo povprečno gostoto šopov pozejdonke na 1 m² v treh vzorcih iz različnih globinskih razponov. To vrednost nato uvrstimo v razred ekološkega stanja na podlagi klasifikacije po Panayotidisu (Tabela 1.3.2).

Ekološko stanje travnika podamo na osnovi ocene treh mest vzorčenja po kriterijih, ki so prikazani v Tabeli 1.3.3.

Tabela 1.3.3: Kriteriji za končno oceno ekološkega stanja travnika pozejdonke v slovenskem morju glede na število šopov/m².

Ekološko stanje			
Mesto vzorčenja 1	Mesto vzorčenja 2	Mesto vzorčenja 3	Skupno vrednotenje stanja travnika
Zelo dobro	Zelo dobro	Zelo dobro	Zelo dobro
Zelo dobro	Zelo dobro	Dobro	Zelo dobro
Zelo dobro	Zelo dobro	Zmerno	Dobro
Zelo dobro	Zelo dobro	Slabo	Dobro
Zelo dobro	Zelo dobro	Zelo slabo	Dobro
Zelo dobro	Dobro	Dobro	Dobro
Zelo dobro	Dobro	Zmerno	Dobro

Mesto vzorčenja 1	Mesto vzorčenja 2	Mesto vzorčenja 3	Skupna ocena travnika
Zelo dobro	Dobro	Slabo	Dobro
Zelo dobro	Dobro	Zelo slabo	Zmerno
Zelo dobro	Zmerno	Zmerno	Dobro
Zelo dobro	Zmerno	Slabo	Zmerno
Zelo dobro	Zmerno	Zelo slabo	Zmerno
Zelo dobro	Slabo	Slabo	Zmerno
Zelo dobro	Slabo	Zelo slabo	Zmerno
Zelo dobro	Zelo slabo	Zelo slabo	Slabo
Dobro	Dobro	Dobro	Dobro
Dobro	Dobro	Zmerno	Dobro
Dobro	Dobro	Slabo	Zmerno
Dobro	Dobro	Zelo slabo	Zmerno
Dobro	Zmerno	Zmerno	Zmerno
Dobro	Zmerno	Slabo	Zmerno
Dobro	Zmerno	Zelo slabo	Zmerno
Dobro	Slabo	Slabo	Zmerno
Dobro	Slabo	Zelo slabo	Slabo
Dobro	Zelo slabo	Zelo slabo	Slabo
Zmerno	Zmerno	Zmerno	Zmerno
Zmerno	Zmerno	Slabo	Zmerno
Zmerno	Slabo	Slabo	Slabo
Zmerno	Slabo	Zelo slabo	Slabo
Zmerno	Zelo slabo	Zelo slabo	Slabo
Slabo	Slabo	Slabo	Slabo
Slabo	Slabo	Zelo slabo	Slabo
Slabo	Zelo slabo	Zelo slabo	Zelo slabo
Zelo slabo	Zelo slabo	Zelo slabo	Zelo slabo

1.4 Travniki kolenčaste cimodoceje

1.4.1 Uvod

Med morskimi cvetnicami največje in najgloblje segajoče travnike tvori kolenčasta cimodoceja (*Cymodocea nodosa*), v njih pa pogosto najdemo tudi manjše število šopov male morske trave (*Zostera noltei*). V slovenskem morju so travniki kolenčaste cimodoceje navzoči skoraj povsod, kjer je na globini od 0,5 m do 10 m peščeno dno.

Kolenčasta cimodoceja je hitrorastoča trajnica, ki naseljuje peščeno in blatno dno v antropogeno razmeroma neobremenjenih pa tudi degradiranih obalnih voda (Orfanidis *in sod.*, 2007). Tako kot v travnikih pozejdonke so tudi stanje v travnikih cimodoceje v Sredozemskem morju slabša zaradi antropogenih pritiskov, ki vplivajo na razpoložljivost svetlobe in hranilnih snovi (Orfanidis *in sod.*, 2007). V iskanju primernih indikatorjev antropogenih pritiskov v obalnih vodah so v Grčiji razvili indeks (*skewness index* $SkLnRfLL_{A,l,leaves}$ ali *CymoSkew*), ki upošteva frekvenčno porazdelitev dolžine listov kolenčaste cimodoceje (Orfanidis *in sod.*, 2007, 2010). Indeks temelji na dejstvu, da dolžina listov narašča od travnika, ki je v najboljšem ekološkem stanju do travnika, ki je v najslabšem ekološkem stanju. Ker smatramo, da pri *CymoSkew* indeksu ni bila uporabljena pravilna statistična obdelava podatkov, smo koncept nadgradili in razvili indeks *MediSkew* (Orlando-Bonaca *in sod.*, v recenziji).

Za redno spremljanje stanja travnikov kolenčaste cimodoceje, predlagamo protokol vzorčenja in laboratorijsko obdelavo vzorcev po Orfanidisu *in sod.* (2007, 2010) ter oceno ekološkega stanja travnikov ob uporabi novega indeksa *MediSkew*.

Element kolenčasta cimodoceja je uporaben za vrednotenje stanja po deskriptorjih D1, D5 in D6.

1.4.2 Izbira in velikost mesta vzorčenja

Kolenčasto cimodocejo vzorčimo v petih travnikih, ki so bili izbrani na podlagi začetne presoje stanja slovenskega morja (Orlando-Bonaca in sod., 2012a). V vsakem travniku izberemo 2 mesti vzorčenja. Na vsakem mestu izberemo po 2 delovni točki (100 m narazen, Slika 1.4.1). Na vsaki točki, na konstantni globini 3 m, poberemo 5 paralelk, ki predstavljajo en vzorec.

1.4.3 Predlog mest vzorčenja

Za kolenčasto cimodocejo predlagamo, da se obdržijo mesta vzorčenja (Tabela 1.4.1), ki so bila izbrana za začetno presojo okoljskega stanja slovenskega morja (Orlando-Bonaca in sod., 2012a).

Tabela 1.4.1: Predlog mest vzorčenja za kolenčasto cimodocejo.

Fitalni pas	Mesto vzorčenja	Zemlj. širina (N)	Zemlj. dolžina (E)	Globina (m)	Število točk	Št. paralelk
zgornji infralitoral	Cy1	45°31.609'	13°36.023'	3	2	10
	Cy2	45°32.306'	13°36.607'	3	2	10
	Cy3	45°28.921'	13°35.375'	3	2	10
	Cy4	45°30.214'	13°35.310'	3	2	10
	Cy5	45°34.927'	13°43.193'	3	2	10
	Cy6	45°35.649'	13°42.657'	3	2	10
	Cy7	45°32.900'	13°41.317'	3	2	10
	Cy8	45°32.469'	13°40.318'	3	2	10
	Cy9	45°30.915'	13°34.583'	3	2	10
	Cy10	45°31.060'	13°34.092'	3	2	10

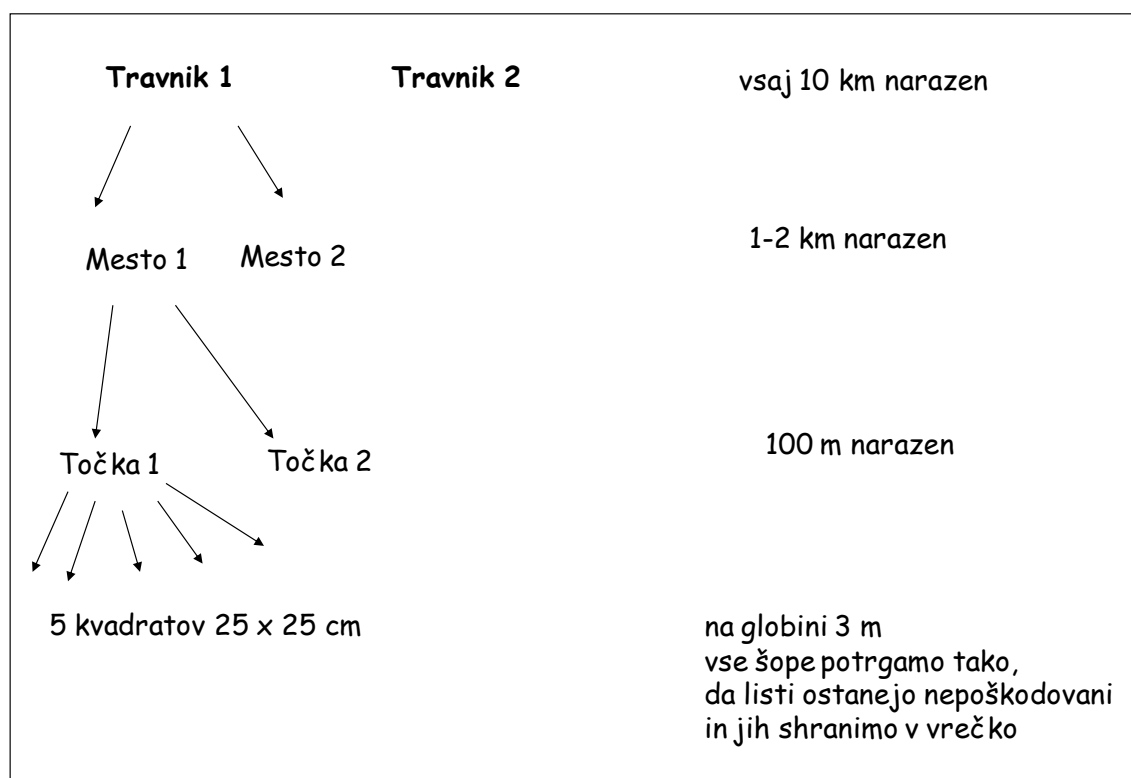
1.4.4 Čas in frekvenca vzorčenja

Travnike kolenčaste cimodoceje vzorčimo enkrat letno, ob začetku poletja (junij-julij). Vzorčenje opravljamo med 9. in 13. uro.

Frekvenca vzorčenja: predlagamo, da se vzorči vsaj 2x v 6 letnem ciklusu.

1.4.5 Metoda vzorčenja

Metoda vzorčenja je shematsko prikazana na Sliki 1.4.1. V vsakem od 5 izbranih travnikov kolenčaste cimodoceje izberemo 2 mesti vzorčenja. Na vsakem mestu izberemo po 2 delovni točki, ki naj bosta 100 m narazen, na konstantni globini 3 m. Na vsaki delovni točki pobereмо 1 vzorec, vsak vzorec je sestavljen iz 5 paralelk. Vzorčenje kolenčaste cimodoceje poteka tako, da na dno položimo kvadrat velikosti 25 cm x 25 cm (Orfanidis *in sod.*, 2007), kar predstavlja eno paralelko. Znotraj kvadrata potrgamo vse šope kolenčaste cimodoceje tako, da ne poškodujemo listov (Orfanidis *in sod.*, 2007, 2010). Šope trave na plovilu speremo s sladko vodo in shranimo v označene plastične vrečke, ločeno za vsako paralelko. Po vrnitvi s terenskega dela vrečke s šopi trave shranimo v zamrzovalniku na -20°C.



Slika 1.4.1: Postopek vzorčenja za kolenčasto cimodocejo.

Predlagamo, da se na mestih vzorčenja Cy4, Cy6 in Cy9 vzorči še sediment s pornimi vodami. Ob zaključku vzorčenja šopov kolenčaste cimodoceje, potapljač na isti globini zapiči gravitacijski korer vsaj 10-12 cm globoko v sediment. Vzorce sedimenta vzamemo s primernim gravitacijskim korerjem (primer: <http://www.uwitec.at/html/frame.html>). Natančna metodologija vzorčenja sedimenta in pornih voda je opisana v poglavju 1.13.10.

1.4.6 Laboratorijska obdelava vzorcev

Vzorce kolenčaste cimodoceje odmrzujemo dan pred obdelavo (počasno odmrzovanje v hladilniku).

Vsako paralelko pregledamo posebej. Med delom morajo biti šopi cimodoceje potopljeni v slani vodi v plastični banjici. Iz vsake paralelke naključno izberemo 20 šopov. Vsak šop pazljivo razpremo s pinceto in v banjico položimo ločene liste, od zunanjšega (najdaljšega) do notranjšega (najkrajšega). Nato preštejemo število listov v šopu in za vsak list zabeležimo (Orfanidis in sod., 2007, 2010):

- dolžino lista (bazalnega in fotosintetsko aktivnega dela) v cm,
- širino lista v cm,
- število znakov posledic paše,
- starost lista, pri čemer upoštevamo: razviti (odrasli) oz. stari listi so daljši od 5 cm in imajo dobro razvit bazalni del; srednji listi so daljši od 5 cm in imajo komajda viden bazalni del; mladi listi so krajši od 5 cm in nimajo razvitega bazalnega dela,
- stanje lista (list cel, poškodovan).

Ko pregledamo 20 šopov, preverimo, ali smo izmerili vsaj **60 nepoškodovanih odraslih in srednjih listov**. V nasprotnem primeru pregledamo še dodatno število šopov.

Po obdelavi vse vzorce shranimo v plastične vrečke, jih etiketiramo in ponovno zamrzujemo na -20°C.

Natančna metodologija vzorčenja sedimenta in pornih voda je opisana v poglavju 1.13.10.

1.4.7 Uvrščanje vzorcev kolenčaste cimodoceje v razrede ekološkega stanja

Pri oceni stanja travnikov kolenčaste cimodoceje predlagamo uporabo indeksa MediSkew (Orlando-Bonaca in sod., v recenziji). Novi indeks je kombinacija dveh metrik, ki temeljita na dolžini listov kolenčaste cimodoceje. Prva metrika predstavlja asimetrijo frekvenčne porazdelitve dolžin listov (Skew), druga pa odklon dolžine listov od referenčne mediane. Za izračun indeksa uporabimo podatke o dolžini fotosintetsko aktivnega dela odraslih in srednjih listov. Oceno stanja podajamo za vsak vzorec (5 paralelk) in ne posebej za posamezno paralelko.

Postopek je sledeč:

- a) dolžine listov v vzorcu (60 listov x 5 paralelk = 300 podatkov) ln-transformiramo in izračunamo koeficient asimetrije (Fisher-Pearson standardized moment coefficient), po enačbi 1:

$$G = \frac{n}{(n-1)(n-2)} \sum_{i=1}^n \left(\frac{x_i - \bar{x}}{s} \right)^3$$

kjer je:

G = koeficient asimetrije ln-transformiranih dolžin fotosintetsko aktivnega dela odraslih in srednjih listov kolenčaste cimodoceje v vzorcu (n = 300),

n = velikost vzorca (300) in

s = standardna deviacija vzorca.

- b) izračunamo mediano nelogaritmiranih podatkov;

c) dobljene vrednosti vnesemo v enačbo 2:

$$MediSkew = \frac{(Md_{area} - Md_{RC})/20 \text{ cm} + |G|/2}{2}$$

kjer je:

Md_{area} = mediana dolžin fotosintetsko aktivnega dela odraslih in srednjih listov kolenčaste cimodoceje v enem vzorcu oziroma na eni točki vzorčenja ($n = 300$),

Md_{RC} = mediana dolžin fotosintetsko aktivnega dela odraslih in srednjih listov kolenčaste cimodoceje na referenčni točki za slovensko morje. Po izčrpnih analizah vseh razpoložljivih podatkov je bila kot referenčna točka vzorčenja za slovensko morje izbrana točka DeRt_2, ki se nahaja v travniku kolenčaste cimodoceje na Debelem rtiču. Vrednost mediane na točki DeRt_2 je **10,2 cm**.

$|G|$ = absolutna vrednost koeficienta asimetrije ln-transformiranih dolžin fotosintetsko aktivnega dela odraslih in srednjih listov kolenčaste cimodoceje v vzorcu ($n = 300$), ki se izračuna po enačbi 1.

Obrazložitev k enačbi 2:

Pri združevanju koeficienta asimetrije in razlike med medianami je bilo potrebno metrikam dodati ustrezno težo. Zato smo obe metriki delili z dovolj visokim številom, da smo dobili podoben obseg vrednosti (npr. od 0 do 1). Za razliko med medianami smo izbrali dolžino **20 cm**, ker je bila največja izračunana razlika med medianami za travnike v slovenskem morju **18,7 cm**.

Da bi dobili največjo teoretično vrednost koeficienta asimetrije za dolžine listov kolenčaste cimodoceje, smo generirali 300 namišljenih dolžin listov v intervalu vrednosti realnih dolžin, vendar z zelo negativno asimetrično vzorčno porazdelitvijo. Za to teoretično porazdelitev je bila vrednost koeficienta asimetrije (izračunana po enačbi 1) enaka **-2,007**. Ker je koeficient asimetrije lahko večji ali manjši od 0, smo v enačbi 2 upoštevali njegovo absolutno vrednost in jo nato delili s številko 2 (teoretično največji koeficient asimetrije). S tem postopkom smo podvojili pomen razlike med medianami (2-kratna utež) v primerjavi s pomenom koeficienta asimetrije. Da ima razlika median dolžine listov dvakrat večjo težo kot koeficient asimetrije, nam je potrdila tudi analiza glavnih komponent (PCA), kjer sta bili predlagani metriki v vlogi spremenljivk. V linearni kombinaciji spremenljivk prve osi

glavnih komponent, ki je razložila veliko večino celotne variacije (92,6%), je imela metrika razlike median dolžine listov 2-krat večji koeficient (0,896) v primerjavi z metriko koeficienta asimetrije (0,444).

1.4.8 Uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja

Najprej se izračuna vrednost indeksa MediSkew (enačba 2) za posamezno točko vzorčenja. Za uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja se izračuna aritmetično povprečje vrednosti indeksa MediSkew na dveh točkah vzorčenja. Za uvrstitev travnika kolenčaste cimodoceje v razred ekološkega stanja se izračuna aritmetično povprečje vrednosti indeksa MediSkew na 4 točkah vzorčenja (2 mesti vzorčenja). Dobljene vrednosti se primerja z mejnimi vrednostmi med razredi ekološkega stanja (Tabela 1.4.2) in uvrsti točke vzorčenja, mesta vzorčenja ali celoten travnik v primeren razred.

Tabela 1.4.2: Mejne vrednosti za MediSkew, po katerih podamo oceno ekološkega stanja travnikov kolenčaste cimodoceje v slovenskem morju.

Razred ekološkega stanja	MediSkew
Zelo dober	$0 \leq \text{MediSkew} < 0,2$
Dober	$0,2 \leq \text{MediSkew} < 0,4$
Zmeren	$0,4 \leq \text{MediSkew} < 0,6$
Slab	$0,6 \leq \text{MediSkew} < 0,8$
Zelo slab	$0,8 \leq \text{MediSkew} \leq 1$

1.5 Bentoški nevretenčarji mehkega dna infralitorala

1.5.1 Uvod

Bentoški nevretenčarji mehkega dna infralitorala so že od leta 2007 vključeni v program spremljanja stanja po Vodni Direktivi (Mozetič *in sod.*, 2008). Metodologija vrednotenja je uspešno prestala interkalibracijo znotraj MedGIG-a in je vključena v zadnjo Odločbo evropske skupnosti z dne 20.9.2013 (Odločba 2013/480/ES). Predlagamo, da se ta del vključi tudi v program spremljanja stanja po ODMS, saj je uporaben za vrednotenje stanja okolja po deskriptorjih D1, D2, D4 in D6.

1.5.2 Predlog mest vzorčenja

Del morskega dna na katerem poteka vzorčenje bentoških nevretenčarjev mehkega dna infralitorala zaobjema obalna vodna telesa, ki so določena na podlagi Vodne direktive in vključujejo oba tipa obalnih vod (OM M1 in OM M3).

V vseh obalnih vodnih telesih (SI5VT2 – SI5VT5) že poteka monitoring po Vodni direktivi. Predlagamo, da se tudi za potrebe ODMS obdržijo ta mesta vzorčenja (Tabela 1.5.1).

Tabela 1.5.1: Predlog mest vzorčenja za bentoške nevretenčarje mehkega dna infralitorala.

Mesto vzorčenja	Zemlj. širina (N)	Zemlj. dolžina (E)	Globina (m)	Št. paralelk
VT2P2	45°35.699'	13°42.576'	7 – 11	3
VT2P3	45°35.172'	13°42.405'	7 – 11	3
VT3P2	45°33.383'	13°43.540'	7 – 11	3
VT3P4	45°34.275'	13°43.931'	7 – 11	3
VT3P6	45°32.930'	13°42.494'	7 – 11	3
VT4P10	45°31.074'	13°34.057'	7 – 11	3
VT4P11	45°31.949'	13°35.946'	7 – 11	3
VT4P12	45°32.339'	13°37.264'	7 – 11	3
VT4P13	45°32.359'	13°38.933'	7 – 11	3
VT4P14	45°32.835'	13°40.870'	7 – 11	3
VT5P6	45°29.224'	13°35.137'	7 – 11	3
VT5P7	45°30.722'	13°35.369'	7 – 11	3
VT5P8	45°30.891'	13°34.540'	7 – 11	3

1.5.3 Čas in frekvenca vzorčevanja

Vzorčenje poteka dvakrat letno, spomladi (konec maja, začetek junija) ter konec poletja / začetek jeseni (začetek septembra).

Frekvenca vzorčenja mora biti vsaj 2x v 6 letnem ciklusu, za zagotovitev visoke stopnje zaupanja. Najboljše je, da vsa mesta vzorčenja vzorčimo v istem letu.

1.5.4 Metoda vzorčenja

Vzorčenje poteka na mehkem dnu infralitorala na globini med 7-11 m. Na vzorčenem delu morskega dna se ne smejo pojavljati morske cvetnice. Vzorčimo z Van Veenovim grabilom z vzorčevalno površino 0,1 m². Na vsakem mestu vzorčenja zajamemo tri vzorce. Vse nadaljnje korake obdelave izvedemo ločeno za vsak vzorec posebej.

Najprej izmerimo volumen pobranega vzorca. Dobljene vzorce sedimenta že na palubi speremo s slano vodo skozi sita z velikostjo odprtín 3,0 mm in 1,0 mm. Ločevanje na več velikostnih

frakcij olajša spiranje in prebiranje organizmov. Večje in občutljive organizme sproti pobereмо iz vzorca in shranimo v posodicah v 80% etanolu. Iz materiala, ki ostane na sitih (groba in fina frakcija), odstranimo večje kose kamnov in odmrlih lupin polžev in školjk, ostalo pa shranimo v posodicah z 80% etanolom. Vse posodice označimo z etiketo na kateri je s svinčnikom napisana koda vzorca, sestavljena iz sezone in leta vzorčenja, ter vodnega telesa in mesta vzorčenja (npr. J13VT2P2).

Vse podatke vezane na vzorčenje (datum, lokacija, vzorčevalci, stanje bibavice, globina vzorčenja, značilnosti sedimenta (volumen, barva, morebiten vonj, količina in značilnost materiala, ki ostane na sitih), prisotnost bentoških makroalg in morebitne druge posebnosti v vzorcu) vpišemo na terenski list.

1.5.5 Laboratorijska obdelava vzorcev

Obdelava vzorcev poteka v laboratoriju in je v grobem sestavljena iz treh faz: spiranja, sortiranja in določanja. Vzorec vedno obravnavamo kot celoto in ga ne delimo na podvzorce.

Vzorci so fiksirani z etanolom, zato jih pred sortiranjem najprej speremo z vodo na situ z velikostjo odprtin 0,5 mm. Spiranje vzorca naj poteka pod majhnim tokom vode, oz. v kadički z vodo, zato da se zmanjša verjetnost poškodb na živalih. Zaradi visoke hlapljivosti etanola je priporočljivo, da spiranje poteka v digestoriju.

Sprani vzorec razprostremo po banjici. Iz banjice izločimo organizme vidne s prostim očesom ter jih razvrstimo po širših taksonomskih skupinah (mnogoščetinci, mehkužci, raki, iglokožci). Upoštevamo samo tiste organizme, ki so bili ob vzorčenju še živi. Izločene in razvrščene organizme shranimo v 70% etanolu.

Določanje in štetje organizmov poteka s pomočjo binokularne lupe in mikroskopa. Določamo do najmanjšega možnega taksona s pomočjo ustreznih določevalnih ključev in taksonomskih zbirk. Pregledane in določene osebke shranimo v 70% etanolu, v fiolah ali drugih primernih posodicah za dolgotrajno shranjevanje. Posamezno posodico opremimo z etiketo iz pavs papirja, ki vsebuje naslednje podatke: koda vzorca in taksonomsko ime. Pridobljene podatke zapišemo v excelovo ali drugo ustrezno tabelo z vrstami in njihovim številom na vzorec.

1.5.6 Metodologija vrednotenja ekološkega stanja

Pri vrednotenju ekološkega stanja z bentoškimi nevretenčarji mehkega dna infralitorala uporabljamo multimetrijski indeks M-AMBI (**M**ultimetric- **A**zti **M**arine **B**iotic **I**ndex).

Multimetrijski indeks M-AMBI temelji na faktorski analizi treh metrik:

- morskega biotičnega indeksa AMBI (**Azti Marine Biotic Index**), ki temelji na razdelitvi makrobentoških živali v ekološke skupine glede na stopnjo tolerance oziroma občutljivosti na naraščajočo stopnjo okoljskega stresa,
- števila najdenih taksonov v vzorcu (S) in
- Shannon-Wienerjevega diverzitetnega indeksa (H').

Vsaka metrika je normalizirana z referenčno vrednostjo izračunano posebej za slovenske razmere (Tabela 1.5.2).

Izračun posameznih metrik in multimetrijskega indeksa M-AMBI izvedemo z uporabo programske opreme AMBI index software, ki je prosto dostopen na spletni strani (<http://ambi.azti.es/>). Za izračun multimetrijskega indeksa M-AMBI moramo imeti excelovo tabelo s taksoni in njihovimi abundancami, v program pa moramo vnesti referenčne vrednosti za vse tri metrike (AMBI, S in H').

Tabela 1.5.2: Referenčne vrednosti metrik AMBI, S in H'

Metrika	S	H'	AMBI
Referenčna vrednost	91	5,87	1,34/6*

* Pri AMBI se zaradi potrebe programske opreme navaja tako spodnja meja, ki je referenčna vrednost, kot tudi zgornja meja

Na podlagi vrednosti indeksa M-AMBI vzorce oz. mesta vzorčenja razvrstimo v razrede ekološke kakovosti (za potrebe Vodne direktive) oz. določimo okoljsko stanje po MSFD. Meje med petimi razredi ekološke kakovosti so prikazane v Tabeli 1.5.3, razmejitve med dobrim in slabim okoljskim stanjem pa se ujema z razmejitvijo med dobrim in zmernim razredom ekološke kakovosti (0,62).

Tabela 1.5.3: Meje med posameznimi razredi kakovosti ekološkega stanja za bentoške nevretenčarje v infralitoralju.

Razredi kakovosti	Meje vrednosti med razredi kakovosti
Zelo dobro / Dobro	0,83
Dobro / Zmerno	0,62
Zmerno / Slabo	0,41
Slabo / Zelo slabo	0,20

Morju oz. določenemu območju morja določimo okoljsko stanje s povprečenjem vseh REK vrednosti mest vzorčenja, ki se v njem nahajajo, za zeleno obdobje. Upoštevati moramo tako spomladanske kot tudi jesenske REK vrednosti.

1.6 Bentoški nevretenčarji mehkega dna cirkalitorala

1.6.1 Uvod

Bentoški nevretenčarji mehkega dna cirkalitorala niso še vključeni v redni program spremljanja stanja za slovensko morje. V cirkalitoralu smo vzorčili v letu 2011 za potrebe priprave metodologije vzorčenja v okviru ODMS (*Orlando-Bonaca in sod.*, 2012a). Na podlagi vzorčenj v cirkalitoralu in izkušenj iz vzorčenj v infralitoralu predlagamo, da se vzorčenje bentoških nevretenčarjev na mehkem dnu cirkalitorala vključi v program spremljanja stanja po ODMS. Bentoški nevretenčarji mehkega dna cirkalitorala so uporabni za vrednotenje stanja okolja po deskriptorjih D1, D2, D4 in D6.

1.6.2 Predlog mest vzorčenja

Del morskega dna na katerem poteka vzorčenje bentoških nevretenčarjev mehkega dna cirkalitorala zaobjema vsa morska vodna telesa, ki so določena na podlagi Vodne direktive. Na tem delu morskega dna se pojavljata dve biocenozi: biocenoza obalnega detritičnega dna in biocenoza muljastega detritičnega dna. Morsko dno je v tem globinskem pasu podvrženo različnim pritiskom, predvsem s strani pomorskega prometa velikih tovornih ladij in ribiških bark. Predlagamo, da se za potrebe monitoringa uporabi mreža 9-ih točk (Tabela 1.6.1), ki odraža značilnosti, ki so posledica različnih abiotskih dejavnikov in antropogenih pritiskov.

Tabela 1.6.1: Predlog mest vzorčenja za bentoške nevretenčarje mehkega dna cirkalitorala.

Mesto vzorčenja	Zemlj. širina (N)	Zemlj. dolžina (E)	Globina (m)	Št. paralelk
BNCL1	45°34.665'	13°41.568'	≥ 20	3
BNCL2	45°33.442'	13°39.695'	≥ 20	3
BNCL3	45°35.606'	13°37.360'	≥ 20	3
BNCL4 (00C2)	45°34.800'	13°36.800'	≥ 20	3
BNCL5 (00CZ)	45°37.400'	13°37.930'	≥ 20	3
BNCL6	45°31.503'	13°31.803'	≥ 20	3
BNCL7	45°33.792'	13°29.615'	≥ 20	3
BNCL8 (00F2)	45°35.000'	13°28.600'	≥ 20	3
BNCL9	45°32.702'	13°21.883'	≥ 20	3
BNCL10	45°27.915'	13°15.616'	≥ 20	3
BNCL11	45°21.235'	13°12.551'	≥ 20	3

1.6.3 Čas in frekvenca vzorčenja

Vzorčenje poteka dvakrat letno, spomladi (konec maja, začetek junija) ter konec poletja / začetek jeseni (začetek septembra).

Frekvenca vzorčenja mora biti vsaj 2x v 6 letnem ciklusu, za zagotovitev visoke stopnje zaupanja. Najboljše je, da vsa mesta vzorčenja vzorčimo v istem letu.

1.6.4 Metoda vzorčenja

Vzorčenje poteka na mehkem dnu cirkalitorala v obeh biocenozah (obalnega detritičnega dna in muljastega detritičnega dna). Vzorcimo z Van Veenovim grabilom z vzorčevalno površino 0,1 m². Na vsakem mestu vzorčenja zajamemo tri vzorce. Vse nadaljnje korake obdelave izvedemo ločeno za vsak vzorec posebej.

Najprej izmerimo volumen pobranega vzorca. Dobljene vzorce sedimenta že na palubi speremo s slano vodo skozi sita z velikostjo odprtin 3,0 in 1,0 mm. Ločevanje na več velikostnih frakcij olajša spiranje in prebiranje organizmov. Večje in občutljive organizme sproti poberemo iz vzorca in shranimo v posodice v 80% etanolu. Iz materiala, ki ostane na sitih (groba in fina

frakcija), odstranimo večje kose kamnov in odmrlih lupin polžev in školjk, ostalo pa shranimo v posodicah z 80% etanolom. Vse posodice označimo z etiketo na kateri je s svinčnikom napisana koda vzorca, sestavljena iz sezone in leta vzorčenja ter vodnega telesa in mesta vzorčenja (npr. J13VT2P2).

Vse podatke vezane na vzorčenje (datum, lokacija, vzorčevalci, stanje bibavice, globina vzorčenja, značilnosti sedimenta (barva, morebiten vonj, količina in značilnost materiala, ki ostane na sitih), prisotnost bentoških makroalg in morebitne druge posebnosti v vzorcu) vpišemo na terenski list.

1.6.5 Laboratorijska obdelava vzorcev

Obdelava vzorcev poteka v laboratoriju in je v grobem sestavljena iz treh faz: spiranja, sortiranja in določanja. Vzorec vedno obravnavamo kot celoto in ga ne delimo na podvzorce.

Vzorci so fiksirani z etanolom, zato jih pred sortiranjem najprej speremo z vodo na situ z velikostjo odprtin 0,5 mm. Spiranje vzorca naj poteka pod majhnim tokom vode, oz. v kadički z vodo, zato da se zmanjša verjetnost poškodb na živalih. Zaradi visoke hlapljivosti etanola je priporočljivo, da spiranje poteka v digestoriju.

Sprani vzorec razprostremo po banjici. Iz banjice izločimo organizme vidne s prostim očesom, ter jih razvrstimo po širših taksonomskih skupinah (mnogoščetinci, mehkužci, raki, iglokožci). Upoštevamo samo tiste organizme, ki so bili ob vzorčenju še živi. Izločene in razvrščene organizme shranimo v 70% etanolu.

Določanje in štetje organizmov poteka s pomočjo binokularne lupe in mikroskopa. Določamo do najmanjšega možnega taksona s pomočjo ustreznih določevalnih ključev in taksonomskih zbirk. Pregledane in določene osebke shranimo v 70% etanolu, v fiolah ali drugih primernih posodicah za dolgotrajno shranjevanje. Posamezno posodico opremimo z etiketo iz paus papirja, ki vsebuje naslednje podatke: koda vzorca in taksonomsko ime. Pridobljene podatke zapišemo v excelovo ali drugo ustrezno tabelo z vrstami in njihovim številom na vzorec.

1.6.6 Metoda vrednotenja ekološkega stanja

Metoda vrednotenja še ni razvita.

1.7 Kostnice

1.7.1 Uvod

Pri pripravi kriterijev za oceno stanja elementa kostnic v slovenskem morju smo skušali odgovoriti na vprašanja kot so kakšno ribjo združbo lahko v nekem okolju pričakujemo, in kolikšna je gostota rib neke vrste v določenem okolju. Spričo pomanjkanja rednega monitoringa ribjih združb v slovenskem morju (pri tem imamo v mislih predvsem nekolestibilne vrste, ki predstavljajo veliko večino rib), smo za poskus ovrednotenja stanja uporabili le razpoložljive podatke, ki se nanašajo na popise obrežne ribje favne.

V obrežni ribji združbi infralitorala predstavljajo štiri glavne skupine obrežnih rib skupaj veliko večino vseh ribjih vrst. To so babice (Blenniidae), glavači (Gobiidae), špary (Sparidae) in ustnače (Labridae). Večina babic domuje predvsem v zgornjem infralitoralu, že na meji mediolitorala, zato niso primerne kot indikatorski biološki element. Glavače najdemo povsod, vendar niso preveč izbirčni glede substrata. Podobno velja tudi za špare, ki nimajo posebnih habitatnih preferenc, poleg tega pa jih najdemo tudi na sedimentnem dnu in v morskih travnikih. Zato smo izbrali družino ustnač (Labridae), katere izbor argumentiramo z naslednjimi argumenti (Orlando-Bonaca in sod., 2012a).

Ustnače so:

- a. redni in pogosti prebivalci obrežnih habitatnih tipov (v povprečju več kot 50% vseh obrežnih rib, če ne upoštevamo jatnih vrst);
- b. povezava med njimi in mikrohabitatnimi ter makrohabitatnimi tipi je velika in tudi statistično oprijemljiva, kar izhaja iz njihovih ekoloških in bioloških posebnosti (gnezdenje, prehranjevanje in skrivanje v vegetaciji). Prav vse ustnače, razen do neke mere gnezdivka (*Symphodus cinereus*), ki preferira neporasle kamnite mikrohabitatne tipe, so tesno povezane z omenjenimi habitatnimi tipi. Z uporabo kanonične korespondenčne analize (CCA) smo potrdili, da so vse vrste ustnač, z izjemo omenjene gnezdivke, povezane z gosto algalno zarastjo v infralitoralu, zato to še dodatno potrjuje smiselnost uporabe ustnač kot indikatorjev;
- c. vse vrste so lahko opazne in spričo tega dobro detektibilne, poleg tega je za nekatere značilna spolna dvoličnost;
- d. potencialno zmanjševanje populacije teh vrst v habitatnih tipih lahko povezujemo z degradacijo habitatnega tipa, ki se posledično odraža tudi v vrstah iz drugih družin.

Poleg omenjenega je potrebno upoštevati tudi dejstvo, da ribja diverziteteta ni enakomerno porazdeljena v obrežnem pasu, ampak so določeni predeli znatno bolj bogati po številu vrst in tudi po številu osebkov. Okolje, ki je bolj strukturirano, ima večje število skrivališč, posledično večjo številčnost osebkov in vrst, obenem pa tudi boljše možnosti za prehranjevanje in razmnoževanje (Macpherson, 1994).

Prisotnost ustnač je v veliki meri odvisna od vegetacijskega pokrova, za katerega smatramo, da je na obravnavanem območju prvobitno stanje. S pojavom raznih motenj, bodisi naravnih ali antropogenih, se bo ribja skupnost pričela spreminjati, kar še dodatno .

Element kostnice je uporaben za vrednotenje stanja po deskriptorjih D1, D2, D3 in D6.

1.7.2 Izbira in velikost mesta vzorčenja

Vzorčenje kostnic se izvaja na skalnatem dnu. To utemeljujemo z dejstvom, da na ta način vzorčimo na območju dveh pomembnih biocenoz, ki sta najbolj bogati po vrstni pestrosti in sicer v biocenozi fotofilnih alg (zgornji infralitoral) in prekoraligenski fazi koraligenske biocenoze (spodnji infralitoral). Vzorčenje v mediolitoralu (bibavični pas) ne bi bilo smiselno, saj je tako okolje zaradi stresnih ekoloških dejavnikov revno po številu vrst. V njem prebivajo predvsem številne vrste babilic, ki pa so zaradi velike variabilnosti ekoloških dejavnikov v okolju oportunistične. Za vzorčevanje na muljastem in peščenem dnu pa bi morali uporabljati destruktivne metode vzorčenja, saj je število osebkov in število vrst v takem okolju zelo skromno in jih s popisovalnimi tehnikami ne moremo kvalitetno popisati.

Na vsakem mestu vzorčenja postavimo dva vertikalna transekta (med njima naj bo 150 m razdalje). Velikost posameznega transekta obsega 100 m² na levo in 100 m² na desno merilnega traka. Seznam mest vzorčenja je predstavljen v Tabeli 1.7.1.

Tabela 1.7.1: Predlog mest vzorčenja za kostnice na skalnatem dnu v infralitoralju.

Mesto vzorčenja	Zemlj. širina (N)	Zemlj. dolžina (E)
DR5	45°35.457'	13°42.028'
Sve1	45°32.532'	13°39.339'
RR2	45°32.401'	13°36.901'
Pa3	45°31.597'	13°35.294'
Fi3	45°31.579'	13°34.713'
PP5	45°31.854'	13°33.959'

1.7.3 Čas in frekvenca vzorčenja

Vzorčenje mora potekati v poletnih mesecih in sicer julija in avgusta. Potekati mora v dopoldanskih urah, najbolje med 9. in 12. uro, pred začetkom maestrala. Predlagamo vzorčenje 1 x letno.

Vzorčenje je potrebno načrtovati v skladu z vidljivostjo; če je ta preslaba, je potrebno vzorčenje prestaviti na primernejši dan, ko je vidljivost primernejša za popis ribjih vrst.

1.7.4 Metoda vzorčenja

Za popis obrežne ribje združbe uporabljamo nedestruktivne metode vzorčenja (glej Lipej in sod., 2003; Lipej in Orlando-Bonaca, 2006). To so podvodne metode, pri katerih popisujemo obrežno favno rib na mestu samem (*in situ*). Ker so nedestruktivne, jih lahko uporabljamo tudi v zavarovanih območjih. V slovenskem morju so za obrežno ribjo združbo najbolj primerni vertikalni transekti, kadar popisujemo ribjo združbo vzdolž različnih habitatnih tipov (glej Orlando-Bonaca in sod., 2012a).

Za vertikalni transekt uporabimo 100 m merilnega traka na vodoodpornem nosilcu. Raztegnemo ga od obrežja do 100 m oddaljenosti, pravokotno na obalo. Pri tem poskrbimo, da je vzorčevalni meter karseda napet. Na koncu transekta nosilec metra zasidramo s kovinskim klinom ali obtežimo s kamni. Nato začnemo s popisom vedno na desni strani merilnega traka, kjer popisujemo vse ribe na razdalji do 1 m. Čeprav smo za

biološki element izbrali ribe iz družine ustnač, na transektu popišemo primerke vseh vrst rib. Na tak način dobimo poleg željene gostote različnih vrst ustnač tudi gostoto vseh ribjih vrst na transektu. Tako dobimo podatek, kolikšen del celotne ihtiofavne predstavljajo ustnače. Posebno pozornost posvetimo epibentoškim ribam in gostim sestojem alg, kjer se prehranjujejo ali zadržujejo ustnače. Plavamo s konstantno hitrostjo tik nad dnom. Časovni potek enega transekta je odvisen od strukturiranosti habitatnih tipov, ki si sledijo vzdolž transekta. Običajno opravimo vertikalni transekt v 15 do 25 minutah. Ko pridemo do konca transekta ponovimo popis ribje združbe še enkrat, na drugi strani merilnega traku, tokrat v smeri proti obali. Po opravljenem popisu rib transekt posnamemo še z videokamero, da dobimo sosledje habitatnih in mikrohabitatnih tipov na transektu. Na tak način opredelimo transekt z vidika dominantnih vegetacijskih in habitatnih tipov.

Za popis obrežne ribje favne moramo opraviti 2 vertikalna transekta (med njima naj bo 150 m razdalje) v obe smeri, skupno torej 4 transekte na vsakem mestu vzorčenja.

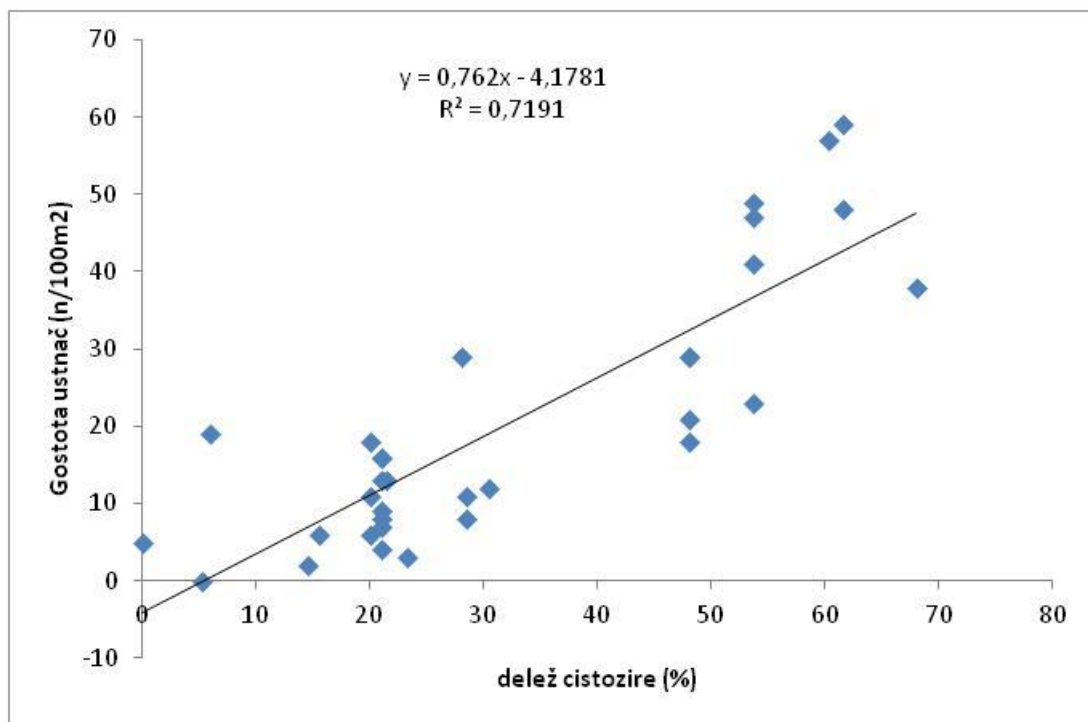
1.7.5 Laboratorijska obdelava vzorcev

Dobljene podatke o ribji favni na vseh opravljenih transektih prepíšemo iz potapljaške knjižice oziroma tablice v podatkovno bazo v računalniku in preračunamo gostote posameznih ribjih. Podatke izrazimo kot gostoto rib na 100 m².

Originalne videozapise uredimo in opremimo z ustreznimi označbami. Posnetke pregledamo na monitorju ali TV sprejemniku in določimo ter popišemo vse habitatne tipe od začetka do konca transekta. Tako dobimo informacijo o pokrovnosti vegetacije in pestrosti habitatnih tipov v katerih smo popisovali obrežno ribjo favno.

1.7.6 Uvrščanje kostnic v razrede ekološkega stanja

Orlando-Bonaca in sod. (2008) so ugotovili statistično značilno korelacijo med pokrovnostjo (%) alg iz rodov *Cystoseira* in/ali *Halopithys* in gostoto kosiric (*Symphodus roissali*) na 100 m². Podobno se je izkazala tudi dobra medsebojna povezanost še za pisano ustnačo (*S. tinca*), najboljšo pa, ko smo upoštevali gostoto vseh vrst ustnač (seštevek vseh osebkov te družine) na transektu ($R^2 = 0,72$) (Slika 1.7.1, po Orlando-Bonaca in sod., 2012a). Za uvrščanje kostnic v razrede ekološkega stanja upoštevamo zato gostoto vseh predstavnikov iz družine ustnač na posameznem transektu (Tabela 1.7.2).



Slika 1.7.1: Povezanost med gostoto ustnač (število osebkov na 100m²) in deležem cistozir na celotni površini pregledanega transeкта.

Tabela 1.7.2: Kriteriji za oceno ekološkega stanja morskih kostnic na podlagi kumulativne gostote ustnač na vertikalnem transektu.

Razred ekološkega stanja	Povprečna gostota ustnač/100m ²
Zelo dober	32,1 -
Dober	24,1 - 32
Zmeren	16,1 - 24
Slab	8,1 - 16
Zelo slab	0 - 8

1.7.7 Uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja

Za uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja na podlagi kostnic izračunamo aritmetično povprečje gostot ustnač na vseh štirih vertikalnih transektih. Dobljene vrednosti primerjamo z mejnimi vrednostmi med razredi ekološkega stanja (Tablea 1.7.2) in uvrstimo mesto vzorčenja v primeren razred.

1.8 Hrustančnice

1.8.1 Uvod

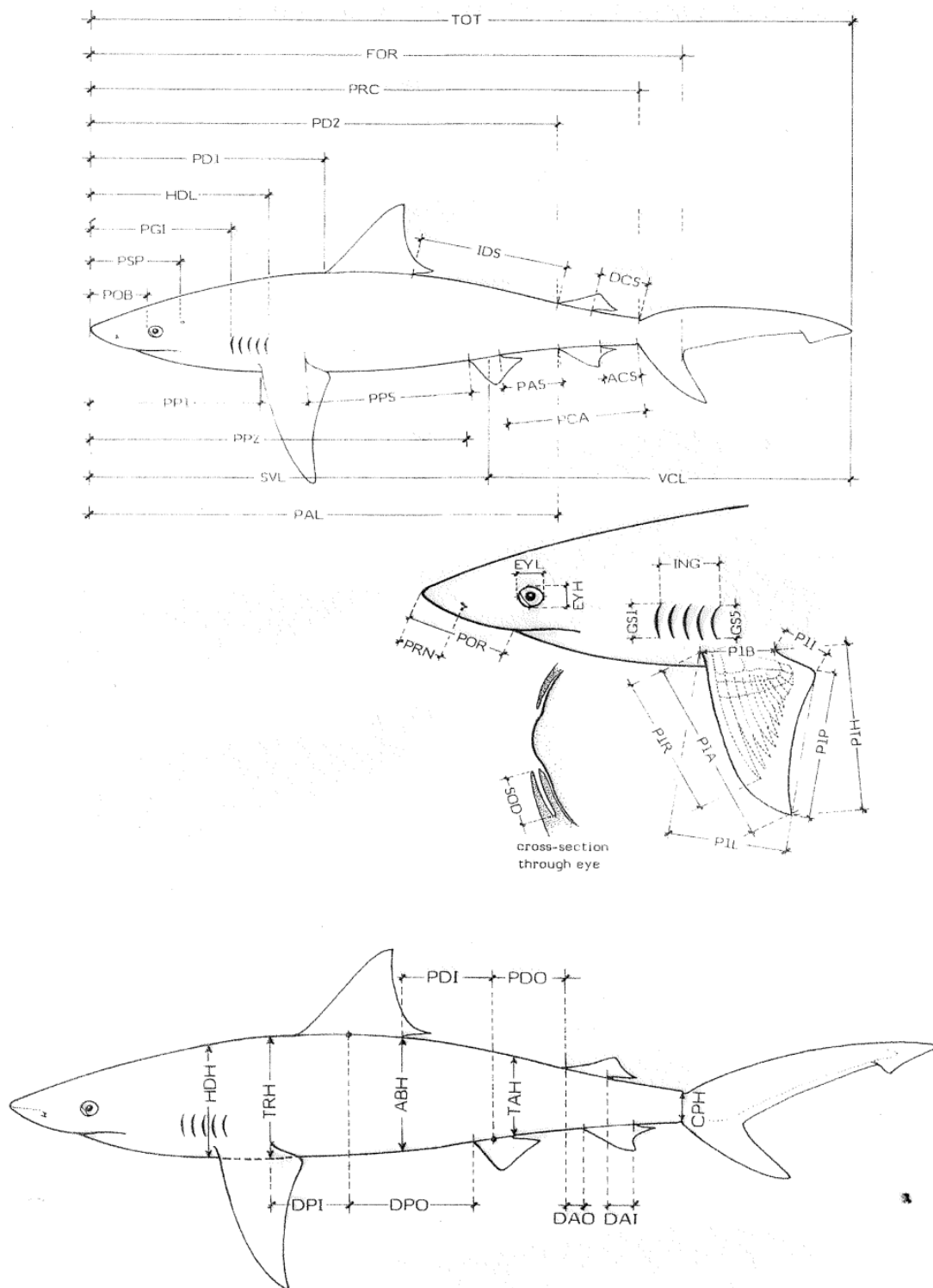
Hrustančnice se povsod po svetu soočajo z velikim in hitrim upadom populacij, predvsem zaradi netrajnostne rabe naravnih virov. V tem oziru ogroža lovne vrste pretiran izlov (prelov), še bolj kritičen pa je prilov, ko se v ribiške mreže kot netarčne vrste ujamejo tudi hrustančnice (glej npr. Jardas *in sod.*, 2008). Tudi Jadransko morje in njegov najsevernejši del, ki zajema slovensko morje, glede tega ni izjema (Piccinetti *in sod.*, 2012). Zaradi maloštevilnosti populacij hrustančnic je načrtovanje vzorčenja zelo zahtevno in je skoraj v celoti odvisno od naključnega prilova hrustančnic. V slovenskem morju je dovoljen izlov vseh vrst hrustančnic, razen belega morskega volka (*Carcharodon carcharias*) in morskega psa orjaka (*Cetorhinus maximus*) (Ur.l., 46/2004). Dejanski obseg načrtnega lova na hrustančnice je zelo majhen in omejen predvsem na vrste iz rodu *Mustelus*, ki jih izlavlja predvsem z uporabo posebnih mrež za morske pse, tako imenovane »psare« ali »cagnolere«.

1.8.2 Metoda vzorčenja

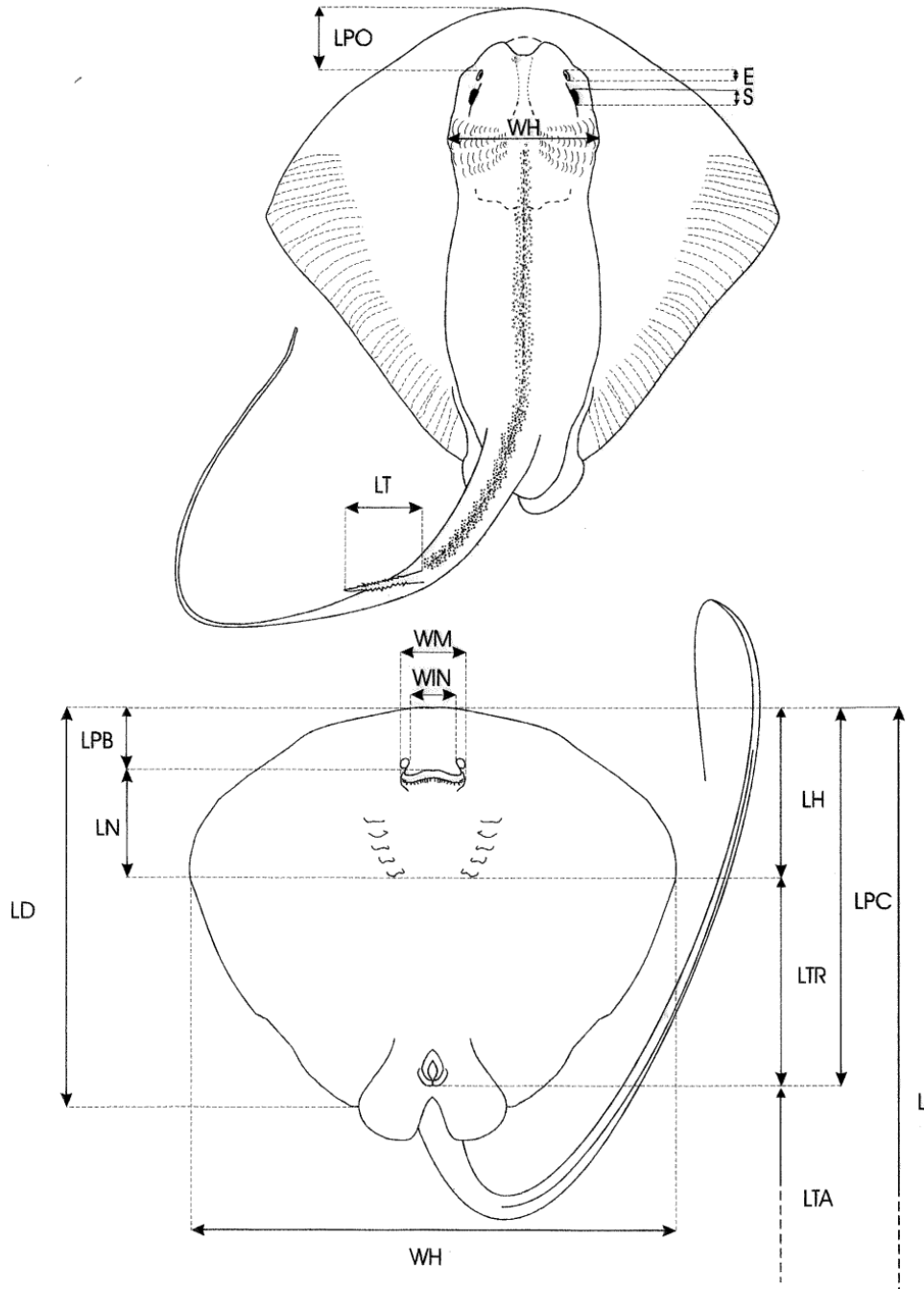
Metoda vzorčenja naj bi temeljila na spremljanju slučajnega izlova (prilova) morskih psov in skatov. Za to je potrebno vzpostaviti primerno sodelovanje in komunikacijo z ribiči, ki bi sporočali potrebne podatke o pojavljanju hrustančnic in predali ulovljeni material. Vsaj v času lova na določene vrste hrustančnic je potrebno zagotoviti prisotnost raziskovalcev oz. strokovnjakov pri samem dviganju ulova, ki morajo oceniti število in vrstno sestavo hrustančnic ter pobrati in izmeriti potrebne parametre (npr. določiti spol, izmeriti težo ter glavne velikostne mere). Prav tako bi se spremljal ulov in prilov hrustančnic na terenih, ki jih izvaja Zavod za ribištvo v okviru svojega monitoringa. Vsi pridobljeni podatki in material morajo imeti določeno tudi (vsaj približno) lokacijo in čas pojavljanja oz. ulova in metodo ulova.

1.8.3 Laboratorijska obdelava vzorcev

Upošteva se dejstvo, da bodo v slovenskem delu Jadranskega morja tudi v bližnji prihodnosti prisotne populacije različnih vrst hrustančnic, je smiselno v zvezi s tem (za zdaj) pripraviti standardne metode popisovanja hrustančnic. Primerke hrustančnic (sveže ali odtaljene, odvisno od prejema vzorcev) je potrebno najprej določiti do vrste s pomočjo identifikacijskih priročnikov kot so ključ za določevanje vretenčarjev Slovenije (Lipej, 1999) ali določevalni ključ v monografiji *Jadranska ihtiofauna* (Jardas, 1996). Nato je potrebno primerke stehtati do grama natančno in določiti spol. Pri samcih izmerimo dolžine klasperjev do desetinke milimetra natančno in opišemo stanje njihove potrdelosti kot nekalcificiran ali calcificiran klasper. Pri juvenilnih primerkih vrst, za katere je značilna rumenjalkova vreča, je potrebno preveriti ali je brazgotina na mestu, kjer je bila pritrjena rumenjalkova vreča še vidna ali ne. V kolikor je brazgotina še vidna, zapišemo ali je sveža (nezarashčena in dobro vidna) ali zarashčena. Nato opravimo osnovne biometrične meritve (glej Sliki 1.8.1 in 1.8.2). Pri lovnih vrstah, ki jih ribiči nato prodajo na trg, so meritve omejene na tiste najnujnejše (teža, celotna dolžina (total length) do razcepa repne plavuti (fork length)), poleg tega pa opravimo še fotografiranje osebkov z merilom za poznejše ovrednotenje določenih značilnosti. Pri materialu, ki ga lahko zadržimo in obdelamo v laboratoriju, pa izmerimo tudi druge biometrične podatke, ki nam služijo tudi za ugotavljanje (i) biometričnih lastnosti vrste, (ii) spolne dvoličnosti (pri nekaterih vrstah), (iii) morfoloških anomalij, (iv) ožje in širše biogeografske variabilnosti ter za (v) opredelitev starosti. V širšem smislu si s tako dobljenimi podatki lahko pomagamo pri razumevanju velikostne porazdelitve, starostne in spolne strukture ter nekaterimi podatki o razmnoževalni ekologiji.



Slika 1.8.1: Primer biometričnih meritev za morske pse (po Compagno in sod., 1984).



Slika 1.8.2: Primer biometričnih meritev za skate. Prirejeno po Mavriču in sod. (2004).

1.9 Fitoplankton

1.9.1 Uvod

Fitoplankton je pomemben biološki element za opredelitev okoljskega stanja v vodnem stolpcu, pri čemer se najpogosteje uporabljajo parametri kot so biomasa, abundanca in sestava fitoplanktona. Ti so tudi ključni za določevanje ekološkega stanja obalnega morja po Direktivi 2000/60/ES (v nadaljevanju Vodna direktiva). Zazdaj je bila na evropski ravni (Aneks 2 Odločbe 2013/480/EU) potrjena le metodologija, ki vključuje en fitoplanktonski parameter – biomasa, ki jo določa koncentracija klorofila *a*. Kljub vsemu se razvoj metodologije, ki bo vključevala tudi abundanco in sestavo fitoplanktona nadaljuje, saj zgolj biomasa ne zadošča za opis značilnosti fitoplanktonske združbe nekega območja.

Fitoplanktonski parametri se v Morski strategiji večkrat ponovijo in sicer v sledečih deskriptorjih za opredelitev stanja morskega okolja:

- deskriptor D1 - Biotska raznovrstnost: biomasa ter abundanca in sestava fitoplanktona za stanje habitata vodnega stolpca (merilo 1.6, kazalnik 1.6.1),
- deskriptor D4 – Elementi morskih prehranjevalnih spletov: trend abundance ključnih trofičnih skupin oz. vrst, kamor so vključeni vsi fitoplanktonski parametri, saj opredeljujejo prvi trofični nivo pelaškega prehranjevalnega spleta (merilo 4.3, kazalnik 4.3.1),
- deskriptor D5 - Evtrofikacija: Neposredni vplivi obogatitve s hranilnimi snovmi (merilo 5.2, kazalnika 5.2.1 in 5.2.4); fitoplanktonski parametri so še posebej pomembni pri tem deskriptorju. Povečane koncentracije klorofila *a* so opredeljene kot neposreden učinek prekomerne obogatitve s hranilnimi snovmi, ki se lahko kaže tudi v bolj pogostih in obsežnejših cvetenjih kakor tudi v spremenjeni sestavi fitoplanktonske združbe.

Fitoplankton se povezuje še z drugimi deskriptorji, čeprav njihova merila in kazalniki fitoplanktonskih parametrov eksplicitno ne omenjano in zato ni predvideno njihovo spremljanje. Se pa podatki o biomasi in/ali abundanci in sestavi, pridobljeni v okviru spremljanja zgoraj naštetih deskriptorjev, lahko uporabijo pri interpretaciji stanja morja

tako glede tujerodnih vrst (deskriptor D2) kot trajnih hidrografskih sprememb na določenih območjih (deskriptor D7).

V nadaljevanju opisujemo predlog spremljanja stanja oz. monitoringa za fitoplanktonske parametre po deskriptorjih D1, D4 in D5. Predlog monitoringa vključuje izbor mest vzorčenja, čas in frekvenco glede na umeščenost elementa v posamezen deskriptor ter opis analitskih metod in metodologije vrednotenja ekološkega oz. okoljskega stanja s fitoplanktonom, kjer so te že razvite.

1.9.2 Parameter: biomasa fitoplanktona

1.9.2.1 Uvod

Kot že omenjeno, je bila na evropskem nivoju znotraj sredozemske interkalibracijske skupine (Med_GIG) in kasneje tudi na nacionalnem nivoju izbrana koncentracija klorofila *a* (v nadaljevanju Chl *a*) kot pokazatelj fitoplanktonske biomase.

1.9.2.2 Predlog mest in globin vzorčenja

Deskriptor D1: Biotska raznovrstnost v vodnem stolpcu (Tabela 1.1.2.)

Predlagamo dve (2) mesti vzorčenja, ki sta reprezentativni za priobalni pas (območje oceanografske boje »Vida«, mesto vzorčenja 00BF <http://buoy.mbss.org/portal/>), kateri najbližje obstoječe mesto vzorčenja v mreži merilnih mest nacionalnega monitoringa ekološkega stanja obalnega morja je 000F; MKO/ARSO 2013) in za območje v mednarodnih vodah (mesto vzorčenja 00T5). Menimo, da obe predlagani mesti odražata antropogeno neobremenjene ali zelo malo obremenjene razmere vodnega stolpca in sta kot taki primerni za spremljanje biotske raznovrstnosti v smislu njene ohranitve. Mesto vzorčenja v priobalnem pasu se prekriva s predlogom spremljanja stanja po deskriptorjih D4 in D5, medtem ko je mesto vzorčenja 00T5 novo in do sedaj še ni bilo vključeno v noben monitoring ali projekt. Z vzorčenjem tega mesta bomo pridobili povsem nove podatke o biomasi fitoplanktona odprtih voda severnega Jadrana.

Globina vzorčenja: predlagamo 3 globine (0 m, 10 m, dno), ki se ponavljajo na vseh mestih vzorčenja, ki vključujejo element fitoplankton. Veljavna metoda za vrednotenje ekološkega stanja po fitoplanktonu sloni na podatkih o površinskih koncentracijah Chl *a* (globina: 0 m). Vendar predlagamo vključitev še dveh globin vzorčenja (10 m, dno), ki bosta, poleg površinskega sloja, vključeni v razvoj multimetričnega indeksa za vrednotenje ekološkega stanja s fitoplanktonom (obveznost, izhajajoča iz Aneksa 2 Odločbe 2013/480/EU).

Deskriptor D4: Morski prehranjevalni spleti (Tabela 1.1.4.)

Za ta deskriptor predlagamo eno (1) mesto vzorčenja in sicer na območju oceanografske boje (mesto vzorčenja 00BF, najbližje obstoječe mesto vzorčenja v mreži merilnih mest nacionalnega monitoringa ekološkega stanja obalnega morja je 000F), ki se prekriva s predlogom spremljanja stanja po deskriptorjih D1 in D5.

Globina vzorčenja: predlagamo 3 globine (0 m, 10 m, dno), ki se ponavljajo na vseh mestih vzorčenja, ki vključujejo element fitoplankton. Vzorčenje na več globinah vodnega stolpca za Chl *a* je tu še posebej pomembno, saj bo s tem možna primerjava s porazdelitvijo zooplanktonske biomase, ki se vzorči vzdolž celotnega vodnega stolpca. Vzorčenje za Chl *a* samo na eni globini (npr. površina) bi podcenilo fitoplanktonsko biomaso vodnega stolpa.

Deskriptor D5: Evtrofikacija (Tabela 1.1.5.)

Za ta deskriptor predlagamo sedem (7) mest vzorčenja. Šest mest je vključenih v mrežo merilnih mest nacionalnega monitoringa ekološkega stanja obalnega morja za vzorčenje fitoplanktona in podpornih splošnih fizikalno-kemijskih elementov po Vodni direktivi: 00MA, 000F, 00C4, 000K, 0DB2, 00CZ. Eno mesto vzorčenja (00F2) pa je vključeno v program spremljanja kakovosti morja po Barcelonski konvenciji in predstavlja najmanj obremenjeno območje Tržaškega zaliva.

Globina vzorčenja: predlagamo 3 globine (0 m, 10 m, dno), ki se ponavljajo na vseh mestih vzorčenja, ki vključujejo element fitoplankton.

1.9.2.3 Čas in frekvenca vzorčenja

Ker se za vrednotenje okoljskega stanja s fitoplanktonom (koncentracija Chl *a*) uporablja letna geometrijska sredina mesečnih meritev (poglavje 1.3.2.6), je najmanjša sprejemljiva frekvenca 12 meritev na leto, tj. 1 krat na mesec v enem koledarskem letu. V nadaljevanju podajamo čas in frekvenco vzorčenja za vsak deskriptor posebej.

Deskriptor D1: Biotska raznovrstnost v habitatu vodnega stolpca (Tabela 1.1.2.)

Časovni okvir vzorčenja: eno leto

Frekvenca vzorčenja: 1-krat mesečno

Deskriptor D4: Prehranjevalni spleti (Tabela 1.1.4.)

Časovni okvir vzorčenja: eno leto

Frekvenca vzorčenja: 2-krat mesečno

Deskriptor D5: Evtrofikacija (Tabela 1.1.5.)

Časovni okvir vzorčenja: eno leto

Frekvenca vzorčenja: 1-krat mesečno

1.9.2.4 Metoda vzorčenja

Vzorci morske vode za analizo fitoplanktonske biomase (in drugih fizikalnih, kemičnih in bioloških parametrov morske vode) vzorčimo z vzorčevalnimi posodami znane prostornine (npr. 5-litrsk Niskinove posode) na posameznih globinah vodnega stolpca (določene v poglavju 1.9.2.2). Priporočljiva je uporaba standardnega oceanografskega vzorčevalnika – rozete, ki ima na svojem ogrodju vpete Niskinove posode. V računalnik, ki je povezan z rozeto, vnesemo globino vzorčenja, poseben mehanizem pa potem sproži zapiranje vzorčevalnih posod na izbranih globinah. Tako je omogočeno zajemanje vzorcev na različnih globinah vodnega stolpa le z nekaj sekundnim zamikom ob enkratnem vertikalnem spustu rozete. Nato iz vsake vzorčevalne posode razdelimo vodo za nadaljnje laboratorijske analize. Vzorce za analize Chl *a* (500 ml) hranimo na temnem in hladnem mestu (ladijski hladilnik) do prihoda v laboratorij.

1.9.2.5 Metoda določanja koncentracije Chl *a*

Koncentracija glavnega fotosinteznega pigmenta Chl *a*, ki ga vsebujejo vsi fotoavtotrofni organizmi, vključno s fitoplanktonom, služi za oceno fitoplanktonske biomase. Prednosti uporabe koncentracije Chl *a* za oceno fitoplanktonske biomase v primerjavi z drugimi parametri (npr. celični volumen, celični ogljik) so predvsem enostavno določanje, ki je bolj poceni in hitro ter zahteva manj taksonomskega znanja v primerjavi z mikroskopskimi analizami za določevanje celičnega volumna/ogljika. To je tudi glavni razlog za veliko razširjenost med laboratoriji. Poleg tega so mehanizmi povezave med obremenitvami iz okolja in koncentracijami Chl *a* dobro poznani, kar omogoča učinkovitejše načrtovanje ukrepov.

Koncentracijo Chl *a* in njegovih razgradnih produktov – feopigmentov določimo z uporabo analitske fluorimetrične metode (prvi opisal Holm-Hansen *in sod.*, 1965). To metodo priporočamo zato, ker je zaradi svoje občutljivosti primerna za določevanje zelo nizkih koncentracij Chl *a* (proizvajalec Turner fluorimetra, ki sledi tej metodi, zagotavlja mejo zaznavnosti inštrumenta $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$; Arar & Collins 1997) in je zato primerna za določanje Chl *a* tudi v vodah Tržaškega zaliva, kjer je razpon koncentracij v splošnem med $0,05\text{-}14 \mu\text{g L}^{-1}$ (baza podatkov NIB-MBP).

Priprava vzorcev. Iz vzorca (500 ml), ki ga večkrat previdno premešamo, odmerimo v plastični merilni valj željen volumen morske vode (po navadi 400 ml) in filtriramo skozi GF/F filter iz steklenih vlaken (nominalna velikost por $0,7 \mu\text{m}$) pri nizkem vakuumu. Filter in filtracijski nastavek nato speremo z majhno količino Mili-Q vode. Filter osušimo, prepognemo in zavijemo v alu folijo, označimo ime vzorca (mesto vzorčenja in globina), datum vzorčenja in volumen prefiltrirane vode ter shranimo do nadaljnje ekstrakcije v zamrzovalniku ($-18 \text{ }^\circ\text{C}$).

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

Filter s fitoplanktonskimi celicami homogeniziramo s pomočjo tkivnega homogenizatorja v epruveti za homogeniziranje, v katero nalijemo 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. Razgrajen filter v acetonu nato prelijemo v plastično centrifugirko, epruveto pa nekajkrat speremo z majhno količino acetona, ki ga dodajamo v centrifugirko. Na koncu centrifugirko dopolnimo z acetonom v skupnem volumnu 10 ml. Ekstrakcija Chl *a* poteka najmanj 2 uri v temi, ne sme pa preseči 24 ur. Po končani ekstrakciji ekstrakt z raztopljenim Chl *a* centrifugiramo 10 min pri 5000 rpm.

Fluorimeter vključimo vsaj 20 min pred začetkom izvajanja meritev in ga umerimo na fluorescenco čistega topila. Po centrifugiranju supernatant pazljivo prelijemo v stekleno kiveto z zamaškom in izmerimo fluorescenco vzorca pred zakisanjem (Fb). Z zakisanjem (60 μ l 0,1 M HCl) molekule Chl *a* razpadejo, novo nastale razgradne spojine – feopigmenti pa fluorescirajo pri isti valovni dolžini kot Chl *a*. Za ponovno branje fluorescence zakisanega vzorca (Fa) počakamo 90 s in vsebino kivete dobro premešamo.

Končno koncentracijo Chl *a* in feopigmentov izračunamo z upoštevanjem vrednosti fluorescence pred (Fb) in po zakisanju (Fa), volumna prefiltriranega vzorca (ml), volumna ekstrakta (ml) ter faktorja zadnje kalibracije inštrumenta. Nekateri modeli fluorimetrov (npr. Turner Trilogy) že sami podajo končni rezultat v izbrani enoti (npr. μ g/l), potem ko vnesemo potrebne parametre enačbe.

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

1.9.2.6 Metodologija vrednotenja okoljskega stanja morja s fitoplanktonsko biomaso

Biomasa fitoplanktona je biološka metrika, ki se po Vodni direktivi uporablja za modul obremenjenosti obalnega morja s hranili oz. trofičnosti. Ker se Direktiva o morski strategiji, natančneje deskriptor D5 o eutrofikaciji, in Vodna direktiva na tem področju prekrivata, bomo za vrednotenje okoljskega stanja morja s fitoplanktonsko biomaso za deskriptor D5 povzeli metodologijo vrednotenja ekološkega stanja morja po Vodni direktivi. Pri ostalih dveh deskriptorjih, D1 in D4, ki tudi vključujeta fitoplanktonsko biomaso, bomo zazdaj sledili enakemu vrednotenju stanja, čeprav so lahko poleg

antropogenih pritiskov, ki nastopajo pri deskriptorju D5, tudi drugi pritiski (npr. *top-down* kontrola), ki lahko vplivajo na lastnosti fitoplanktonske združbe.

Za oceno stanja po biomasi fitoplanktona so potrebni naslednji koraki:

- *Umestitev mesta vzorčenja v ekološki tip obalnega morja*: celotno slovensko morje in s tem vsa mesta vzorčenja so bila s stališča fitoplanktona umeščena v en tip obalnega morja, ki ni pod neposrednim vplivom sladkovodnih obremenitev, vendar je njihov vpliv še vedno zaznaven. Na nivoju sredozemske interkalibracijske skupine je to tip IIA Adriatic. To pomeni, da za oba za oba sprejeta ekološka tipa slovenskega obalnega morja, OM M1 in OM M3, veljajo v primeru fitoplanktonske biomase enake referenčne razmere.
- *Referenčne razmere*: vrednost Chl *a*, ki odraža enotne referenčne razmere na nivoju Sredozemskega morja za tip IIA Adriatic, je 0,15 µg L⁻¹.
- **Metrika**: letna geometrična sredina koncentracij Chl *a*, obdobje in frekvenca vzorčenja: celoletni cikel vzorčenja z 1-krat mesečno frekvenco, globina: 0 m. K izboru metrike letne geometrične sredine koncentracij Chl *a* izmed drugih možnih (npr. srednja vrednost, mediana, 90-ti centil oz. krajša ali daljša obdobja od enega leta), je največ prispevalo dejstvo, da se s povprečenjem koncentracij zmanjšajo sezonska nihanja, ki so v primeru slovenskega obalnega morja večja kot medletna. Zaradi log-normalne porazdelitve koncentracij Chl *a*, je uporaba geometrične sredine najbolj upravičen pristop, ki je enaka aritmetični sredini logaritmiranih koncentracij.
- *Normalizacija metrike*: vsaka biološka metrika je izražena kot številka med 0 (zelo slabo ekološko stanje) in 1 (zelo dobro ekološko stanje), ki predstavlja razmerje ekološke kakovosti – REK. Izračunamo ga iz razmerja med izmerjeno vrednostjo metrike G(Chl_a) in referenčno vrednostjo Chl_a(RC):

$$REK_{izr} = \frac{Chl_a(RC)}{G(Chl_a)}$$

- *Transformacija metrike*: ker so vrednosti Chl *a* podrejene logaritemski naravi metrike, izračunani REK-i ne ustrezajo linearnim, tj. ekvidistančnim vrednostim, kot jih določa Vodna direktiva. Zato je treba REK vrednosti transformirati po enačbi:

$$Biomasa_fitopl_REK = 0,1976 * \ln(REK_izr) + 1,0412$$

- *Meje med razredi ekološkega stanja*: tako kot referenčne razmere, so tudi meje med razredi ekološkega stanja enake za vse obalne vode tipa IIA Adriatic. Meje so bile določene na podatkih iz skupne baze za Jadransko morje in z upoštevanjem odvisnosti biomase fitoplanktona od antropogenega pritiska - skupni fosfor (podroben opis v Francé in sod., 2011).
- *Uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja*: transformirane REK-e (Biomasa_fitopl_REK) se primerja z mejnimi vrednostmi, ki veljajo za vse obalne vode tipa IIA Adriatic (Tabela 1.9.1.) in uvrsti mesto vzorčenja v ustrezen razred kakovosti ekološkega stanja. Klasifikacija vodnih teles sloni na izračunu REK vrednosti za posamezno mesto vzorčenja. Če je v vodnem telesu le eno mesto vzorčenja, se vodno telo ovrednoti enako kot mesto vzorčenja. V primeru, da ima vodno telo dve ali več mest vzorčenja, se izračuna letno geometrično sredino mesečnih koncentracij Chl *a* vseh mest vzorčenja skupaj, nato pa se izračuna REK_izr in Biomasa_fitopl_REK za vodno telo po zgornjih enačbah.

Tabela 1.9.1.: Razredi kakovosti ekološkega stanja, pripadajoče mejne REK vrednosti in mejne vrednosti fitoplanktonske biomase za posamezen razred kakovosti

Biomasa_fitopl_REK	Razred ekološkega stanja	Chl <i>a</i> (µg L ⁻¹)
1	Ref. vrednost	0,15
0,75	Zelo dober	0,65
0,58	Dober	1,57
0,41	Zmeren	3,79
0,22	Slab	9,14
< 0,22	Zelo slab	> 9,14

Kot že omenjeno, opisana metodologija povzema metodologijo vrednotenja ekološkega stanja obalnega morja po določenih Vodne direktive, katere najpomembnejši cilj je doseči dobro stanje kakovosti za vse vode v državah članicah do konca leta 2015. V konkretnem primeru to pomeni, da bi za doseg tega cilja fitoplanktonska biomasa za večletno obdobje (npr. obdobje načrta upravljanja voda) v povprečju ne bi bila nižja od $1,57 \mu\text{g L}^{-1}$, torej ne bi padla v zmeren razred kakovosti ekološkega stanja. Za opredelitev dobrega okoljskega stanja po Direktivi o morski strategiji predlagamo enak pristop: meja med dobrim in slabim okoljskim stanjem je postavljena na meji med dobrim in zmernim razredom kakovosti ekološkega stanja.

1.9.3 Parameter: vrstna sestava fitoplanktona in abundanca

1.9.3.1 Uvod

Parameter vrstne sestave in abundance fitoplanktona je še posebej uporaben za vrednotenje posrednih posledic eutrofikacije, kot je npr. sprememba vrst v rastlinski sestavi (kazalnik 5.2.4). Ena od možnih posledic bogatenja morja s hranili je namreč tudi sprememba v vrstni sestavi fitoplanktonske združbe. V to skupino posledic eutrofikacije na primer sodijo različna cvetenja fitoplanktona, predvsem se ob velikih vnosih hranilnih snovi, ob zadostnem vnosu silikata, namnožijo – zacvetijo diatomeje. Ob porušenem razmerju med hranilnimi snovmi, ko npr. primanjkuje silikata ob velikih vnosih dušikovi in/ali fosforjevih hranil, pa lahko prevlada nediatomejski fitoplankton, kar se kaže kot naraščanje deleža in /ali številčnosti dinoflagelatov (npr. Wasmund in Uhlig, 2003; Marasović *in sod.*, 2005) ali nanoflagelatov (Yunev *in sod.*, 2007).

Za ovrednotenje opisanih sprememb smo za potrebe vrednotenja ekološkega stanja po Okvirni vodni direktivi (Francé *in sod.*, 2011) razvili in poskusno uporabili indeks visokih abundanc fitoplanktona (I_E). Indeks odraža obseg in frekvenco fitoplanktonskih cvetenj, tudi takih, pri katerih ne pride nujno do visokih vrednosti biomase (denimo cvetenja majhnih nanoflagelatov). Po drugi strani preko visokih vrednosti klorofilne biomase zazna cvetenja večjih vrst, ki ne presežejo nujno mejnih abundanc (denimo določene vrste dinoflagelatov). Metodologija vrednotenja z indeksom I_E je še v razvoju, predvsem je

potrebno testiranje tega indeksa v širšem območju severnega Jadrana, za kar je potrebno tudi pridobivanje novih podatkov v slovenskem morju.

Vrstna sestava in abundanca fitoplanktona je pomemben parameter tudi pri ovrednotenju trendov funkcionalno pomembnih trofičnih skupin v morskem prehranjevalnem spletu (kazalnik 4.1.3). Kakršnekoli spremembe pri primarnih producentih v vodnem stolpcu se namreč odražajo na spremembah na višjih trofičnih nivojih. Zato je pomembno spremljanje vrstne sestave in abundance fitoplanktona tudi za potrebe vrednotenja stanja po deskriptorju D4, čeprav metodologija vrednotenja posebej za ta deskriptor še ni razvita. Podobno velja za vrednotenje stanja po deskriptorju 1 (kazalnik 1.6.1).

Fitoplanktonski parametri sestavljajo celoto pri vrednotenju stanja v vodnem stolpcu, zato so izbor mest vzorčenja, shema in metode vzorčenja za parameter biomasa fitoplanktona in parameter vrstna sestava ter abundanca enaki.

1.9.3.2 Predlog mest in globin vzorčenja

Deskriptor D1: Biotska raznovrstnost v vodnem stolpcu (Tabela 1.1.2)

Predlagamo dve (2) mesti vzorčenja: 00BF oz. najbližje obstoječe mesto vzorčenja v mreži merilnih mest nacionalnega monitoringa ekološkega stanja obalnega morja 000F (reprezentativno mesto za priobalni pas) in 00T5 (reprezentativno mesto za območje v mednarodnih vodah).

Globina vzorčenja: predlagamo 3 globine (0 m, 10 m, dno), ki se ponavljajo na vseh mestih vzorčenja, ki vključujejo element fitoplankton.

Deskriptor D4: Morski prehranjevalni spleti (Tabela 1.1.4)

Za ta deskriptor predlagamo eno (1) mesto vzorčenja in sicer na območju oceanografske boje (mesto vzorčenja 00BF, najbližje obstoječe mesto vzorčenja v mreži merilnih mest nacionalnega monitoringa ekološkega stanja obalnega morja je 000F), ki se prekriva s predlogom spremljanja stanja po deskriptorjih D1 in D5.

Globina vzorčenja: predlagamo 3 globine (0 m, 10 m, dno), ki se ponavljajo na vseh mestih vzorčenja, ki vključujejo element fitoplankton.

Deskriptor D5: Evtrofikacija (Tabela 1.1.5)

Za ta deskriptor predlagamo sedem (7) mest vzorčenja. Šest mest je vključenih v mrežo merilnih mest nacionalnega monitoringa ekološkega stanja obalnega morja za vzorčenje fitoplanktona in podpornih splošnih fizikalno-kemijskih elementov po Vodni direktivi: 00MA, 000F, 00C4, 000K, 0DB2, 00CZ. Eno mesto vzorčenja (00F2) pa je vključeno v program spremljanja kakovosti morja po Barcelonski konvenciji in predstavlja najmanj obremenjeno območje Tržaškega zaliva.

Globina vzorčenja: predlagamo 3 globine (0 m, 10 m, dno), ki se ponavljajo na vseh mestih vzorčenja, ki vključujejo element fitoplankton.

1.9.3.3 Čas in frekvenca vzorčenja

Pri izračunavanju indeksa I_E je potreben delež vzorčenj, ko določena podmetrika preseže mejno vrednost, zato je pomembna primerna časovna razporeditev vzorčenj. Torej je najmanjša sprejemljiva frekvenca 12 meritev na leto, tj. 1 krat na mesec v enem koledarskem letu. V nadaljevanju podajamo čas in frekvenco vzorčenja za vsak deskriptor posebej.

Deskriptor D1: Biotska raznovrstnost v habitatu vodnega stolpca (Tabela 1.1.2)

Časovni okvir vzorčenja: eno leto

Frekvenca vzorčenja: 1-krat mesečno

Deskriptor D4: Prehranjevalni spleti (Tabela 1.1.4)

Časovni okvir vzorčenja: eno leto

Frekvenca vzorčenja: 2-krat mesečno

Deskriptor D5: Evtrofikacija (Tabela 1.1.5)

Časovni okvir vzorčenja: eno leto

Frekvenca vzorčenja: 1-krat mesečno

1.9.3.4 Metoda vzorčenja

Metoda vzorčenja za kvalitativno in kvantitativno analizo sestave fitoplanktonske združbe je enaka kot pri biomasi: zajem morske vode z vzorčevalnimi posodami znane prostornine (npr. 5-litrške Niskinove posode) na posameznih globinah vodnega stolpca. Za vzorčenje na več različnih globinah ob enem vertikalnem spustu vzorčevalnika je priporočljiva uporaba standardnega oceanografskega vzorčevalnika – rozete, ki ima na svojem ogrodju vpete Niskinove posode. Iz vsake vzorčevalne posode razdelimo vodo za nadaljnje laboratorijske analize. Vzorce za analize sestave fitoplanktonske združbe (2,5 l) hranimo na temnem in hladnem mestu (ladijski hladilnik) do prihoda v laboratorij.

1.9.3.5 Določanje abundance in vrstne sestave fitoplanktona

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 37% raztopino formalina, nevtralizirano z dodatkom 20 g heksametilentetramina. Raztopino temeljito premešamo, da se dodana snov popolnoma raztopi (po potrebi se uporabi ultrasonična kopel, ki pospeši razbitje delcev) in izmerimo pH, ki mora biti v območju pH morske vode (8,1-8,2). Pred vsakokratno uporabo se tako pripravljeno raztopino filtrira skozi filter v plastičnem ohišju za enkratno uporabo (velikost por 0,22 μm), ker se sicer heksametilentetramin v vzorcih morske vode s časom obori. Volumen dodanega nevtraliziranega formalina je odvisen od volumna vzorcev, velja pa, da naj bo končna koncentracija formalina 2%. Priprava fiksativa in fiksiranje vzorcev poteka v digestoriju.

Zapis in hranjenje vzorcev. V terenski list se na terenu zapiše naslednje podatke: datum, čas, vodno telo, postaja, 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. Fiksirani vzorci za kvantitativno in kvalitativno analizo fitoplanktona se do nadaljnje obdelave hranijo 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, ki služi za dolgotrajno (do 5 let) hranjenje in morebitno preverbo ter se ga prav tako hrani v skladišču za vzorce.

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 (pribl. 100-krat počasi obrnemo steklenico). V sedimentacijski valj znane prostornine s sedimentacijsko komorico natočimo podvzorca ter pustimo usedati od 24 do 72 ur. Volumen podvzorca izberemo glede na predvideno gostoto fitoplanktonskih celic, ki jo lahko ocenimo iz meritev koncentracij Chl *a* (*in situ* fluorescenca, analitska metoda določanja Chl *a*). 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 številčnosti.

Po končanem usedanju nato pod invertnim mikroskopom preštujemo fitoplanktonske celice na dnu sedimentacijske komorice, v kateri je 2 ml koncentriranega vzorca. 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. Priporočilo je pregledati 100 vidnih polj pri 400x povečavi. V primeru zelo redkih vrst je priporočilo pregledati 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 se izračuna po enačbi:

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

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).

Sestava fitoplanktona. 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.

1.9.3.6 Metodologija vrednotenja okoljskega stanja morja po vrstni sestavi in abundanci fitoplanktona

Za vrednotenje stanja predlagamo uporabo indeksa visokih abundanc fitoplanktona (I_E) (prirejeno po Devlin *in sod.*, 2007). Ta indeks upošteva različne podmetrike, ki jih pridobimo iz podatkov o abundanci posameznih funkcionalnih skupin fitoplanktona in posameznih vrst ter podatkov o klorofilni biomasi, nanašajo pa se na število dogodkov (izmed vseh vzorčevanj), ko katera izmed podmetrik preseže določeno mejno vrednost. Metodologija vrednotenja še ni v celoti razvita, zato podajamo samo način izračuna indeksa in poskusno razdelitev v razrede ekološkega stanja.

Izračun indeksa I_E . Indeks I_E ocenjuje pogostost visokih abundanc fitoplanktona in visokih vrednosti fitoplanktonske biomase. Indeks I_E vsebuje tri podmetrike:

1. podmetrika I_T : izraža delež vzorčenj, ko celokupna abundanca fitoplanktona preseže mejno vrednost.

Mejna vrednost je bila določena kot 90. centil vseh abundanc celotnega fitoplanktona v obdobju 1990-2009 na referenčnem mestu vzorčenja 000F. V podmetriki I_T se uporabi

mejno vrednost $1,5 \times 10^6$ celic/l. Abundanca celotnega fitoplanktona je število vseh fitoplanktonskih celic v litru vzorca. Podmetrika I_T se izračuna po naslednji enačbi:

$$I_T = \frac{\text{št. vzorčevanj } z \geq 1,5 \times 10^6 \text{ celic}_{\text{celotnega fitopl.}} l^{-1}}{\text{št. vseh vzorčevanj}}$$

2. podmetrika I_S : izraža delež vzorčenj, ko katerakoli izmed vrst fitoplanktona preseže mejno vrednost.

Mejna vrednost je bila določena s pomočjo 90. centila abundanc skupine diatomej v obdobju 1990-1994 na referenčnem mestu vzorčenja 000F ($9,1 \times 10^5$ celic/l) in 90. centila abundanc skupine nanoflagelatov v obdobju 2005-2009 na referenčnem mestu vzorčenja 000F ($1,0 \times 10^6$ celic/l). V podmetriki I_S se uporabi mejno vrednost $1,0 \times 10^6$ celic l^{-1} . Pri izračunu podmetrike se celotna skupina nanoflagelatov upošteva kot ena vrsta, pri drugih skupinah pa se upošteva abundanco posamezne vrste. Podmetrika I_S se izračuna po naslednji enačbi:

$$I_S = \frac{\text{št. vzorčevanj } z \geq 1,0 \times 10^6 \text{ celic}_{\text{katerakoli vrste}} l^{-1}}{\text{št. vseh vzorčevanj}}$$

3. podmetrika I_{Chl} : izraža delež vzorčenj, ko koncentracija Chl *a* preseže mejno vrednost. Mejna vrednost je bila določena kot 90. percentil letnih geometrijskih povprečij integriranih koncentracij Chl *a* v obdobju 1984-2002 na referenčnem mestu vzorčenja 000F, ki je $1,27 \mu\text{g Chl } a/l$. Podmetrika I_{Chl} se izračuna po naslednji enačbi:

$$I_{Chl} = \frac{\text{št. vzorčevanj } z \geq 1,27 \mu\text{g Chl } a l^{-1}}{\text{št. vseh vzorčevanj}}$$

Indeks I_E predstavlja povprečje vseh treh podmetrik in ga izražamo v odstotkih:

$$I_E = \frac{I_T + I_S + I_{Chl}}{3} \times 100$$

Izračun REK. Vsaka biološka metrika je izražena kot številka med 0 (zelo slabo ekološko stanje) in 1 (zelo dobro ekološko stanje), ki predstavlja razmerje ekološke kakovosti – REK. Izračunamo ga iz razmerja med izračunano vrednostjo I_E za posamezno mesto vzorčenja in referenčno vrednostjo $I_E(RC)$ po naslednji enačbi:

$$REK_{I_E} = \frac{I_E(RC)}{I_E}$$

Referenčna vrednost je poskusno določena kot vrednost indeksa I_E v primeru, da je pri vsaki od treh podmetrik 1-krat na leto presežena mejna vrednost ($I_E=8,33\%$). To je tudi povprečna vrednost indeksa I_E , ki smo jo izračunali na referenčnem mestu vzorčenja v testnem obdobju.

Uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja. Podajamo poskusno določanje okoljskega stanja na podlagi indeksa I_E , saj je metodologija še v razvoju. Za posamezno mesto vzorčenja se REK_{I_E} primerja z mejnimi vrednostmi, ki veljajo za vse obalne vode tipa IIA Adriatic (Tabela 1.9.2.), in se tako uvrsti mesto vzorčenja v ustrezen razred kakovosti ekološkega stanja.

Tabela 1.9.2.: Razredi kakovosti ekološkega stanja, pripadajoče mejne REK vrednosti in mejne vrednosti indeksa I_E .

REK	Razred ekološkega stanja	I_E (%)
1	Ref. vrednost	8,33
0,66	Zelo dober	12,54
0,46	Dober	18,06
0,31	Zmeren	26,92
0,15	Slab	53,69
< 0,15	Zelo slab	> 53,69

1.10 Klobučnjaške meduze

1.10.1 Uvod

Vedno več raziskav v različnih morskih okoljih v zadnjih letih zaključuje, da delež želatinoznega planktona (meduze in rebrače; angl. jellyfish) narašča (Kogovšek *in sod.*, 2010; Brotz *in sod.*, 2012) predvsem v ekosistemih z največjimi antropogenimi vplivi (Purcell, 2012). Zato je ta zooplanktonska skupina med pomembnimi kazalniki stanja morskega okolja. Za meduze je značilno, da se pogosto združujejo v večje skupine - agregacije, kar otežuje njihovo spremljanje v naravnem okolju. V primerjavi z ostalimi planktonskimi organizmi, so klobučnjaki veliko večji, njihovo želatinozno telo pa velikokrat razpade, ko jih vzorčimo s standardnimi vzorčevalnimi metodami za zooplankton (Harris *in sod.*, 2000). Zaradi tega je spremljanje populacijske dinamike klobučnjaških meduz težavno, kvantitativnih podatkov je malo in vpliv masovnega pojavljanja klobučnjaških meduz na pelaški prehranjevalni splet je relativno slabo raziskan. Ob pomanjkanju splošno uveljavljenih metodologij za monitoring klobučnjaških meduz, predlagamo za namen spremljanja stanja okolja po elementu klobučnjaške meduze tri metode: vizualni cenzus, vertikalni pregled vodnega stolpca z video kamero ter spremljanje številčnosti klobučnjaških meduz kot prilov v ribiških mrežah.

Element klobučnjaške meduze je uporaben za vrednotenje stanja po deskriptorjih D1, D2 in D4.

1.10.2 Predlog mest vzorčenja

Vizualni cenzus

Štetje meduz opravljamo na dveh transektih vzdolž slovenske obale. Prvi izbrani transekt je umetna obala od Bernardina do vhoda v Piran, drugi pa ob regionalni cesti med Izolo in Koprom. Vsak transekt je razdeljen na tri odseke (50-100 m), ob katerih v morju ni umetnih struktur (pomolov, valobranov, privezov itd). Vsak odsek transekta je podrobno opisan; določimo globino morja, označimo njegovo začetno in končno točko, izmerimo višino našega stojišča nad morsko gladino ter lokacijo fotografiramo.

Vertikalni profil z video kamero

Zaradi običajno neenakomerne prostorske razporejenosti klobučnjaških meduz je porazdelitev vzorčnih mest po vodnem telesu izredno pomembna, zato predlagamo 5 vzorčnih mest, ki so razporejene vzdolž celotnega Tržaškega zaliva in se nahajajo tako v obalnih kot tudi odprtih vodah (Tabeli 1.1.2 in 1.1.4 in Sliki 1.1.1 in 1.1.4).

Klobučnjaške meduze kot prilov v ribiških mrežah

Spremljanje klobučnjaških meduz kot prilov v ribiških mrežah sovпада s spremljanjem stanja okolja, ki ga bo izvajal Zavod za ribištvo Republike Slovenije, zato se mesto vzorčenja prilagodi transektom, določenim za spremljanje stanja po elementih znotraj D3.

1.10.3 Čas in frekvenca vzorčenja

Vizualni cenzus

Predlagana frekvenca spremljanja klobučnjaških meduz s to metodo je dvakrat mesečno ob dnevni svetlobi, visoki plimi ter stabilnemu vremenu (mirno ali rahlo vzvalovano morje, odsotnost dežja).

Vertikalni profil z video kamero

V primeru spremljanja klobučnjaških meduz v vodnem stolpcu je predlagana frekvenca vzorčenja dvakrat mesečno. Spremljanje stanja po tem elementu mora potekati istočasno s spremljanjem stanja po drugih elementih (Tabela 1.1.2).

Klobučnjaške meduze kot prilov v ribiških mrežah

Čas in frekvenca vzorčenja se prilagodi času in frekvenci spremljanja stanja, ki ga bo opravljal Zavod za Ribištvo Republike Slovenije. Predlagana frekvenca je enkrat mesečno.

1.10.4 Metoda vzorčenja

Vizualni cenzus

Pred začetkom opazovanja na vsakem odseku transeкта določimo razdaljo med gladino morja in našim stojiščem. Številčnost klobučnjaških meduz določamo v pasu morja znane širine ob vsakem odseku transeкта. Širino pasu morja, ki ga opazujemo določimo tako, da

si okoli pasu na bok pritrdimo palico znane dolžine in s pogledom pregledamo zgolj površino gladine, ki ga na eni strani vidnega polja omejuje palica. Iz dolžine palice in razdalje od pasu do višine oči, lahko izračunamo kot, pod katerim pregledujemo okolico. Iz izračunanega kota in razdalje med gladino morja in našimi očmi nato izračunamo širino pasu morja, ki ga spremljamo.

Številčnost meduz določimo na podlagi prešteti organizmov v pasu morja znane ploščine in izrazimo kot število osebkov na enoto površine (št/m²).

Vertikalni profil z video kamero

Kamero opremljeno z globinomerjem spuščamo s plovila na petih postajah vzdolž slovenskega dela Tržaškega zaliva (Tabeli 1.1.2 in 1.1.4, Sliki 1.1.1 in 1.1.3). Na vsaki postaji naredimo dva ločena posnetka, enega ob spuščanju in drugega ob dvigu kamere. Na ohišju kamere je v vidnem polju na znani razdalji pritrjen okvir, s katerim omejimo vidno polje in tako iz površine kvadrata, ki ga zajema okvir in višino vodnega stolpca izračunamo volumen vode, ki smo ga posneli. Število meduz določimo iz posnetka, ki je bil narejen ob dvigu kamere in končno število organizmov izrazimo na volumsko enoto (št/m³).

Klobučnjaške meduze kot prilov v ribiških mrežah

Določanje in štetje klobučnjaških meduz izvajamo na plovilu takoj, ko se oddvoji prilov. Meduze določimo do vrste natančno in preštejemo. Pomembno je, da si zabeležimo koordinate potega mreža ter izračunamo količino prefiltrirane vode in končno število posamezne vrste izrazimo kot število organizmov na volumsko enoto (št/km³).

1.10.5 Laboratorijska obdelava vzorcev

Številčnost organizmov se oceni na terenu ali iz posnetkov video kamere, zato laboratorijsko delo ni potrebno.

1.10.6 Metoda vrednotenja ekološkega stanja

Metodologija vrednotenja ekološkega stanja na podlagi elementa klobučnjaške meduze je še v razvoju.

1.11 Zooplankton

1.11.1 Uvod

Zooplanktonski organizmi so pomemben vezni člen v pelaškem prehranjevalnem spletu med primarnimi producenti (fitoplanktonom) in organizmi višjih trofičnih nivojev od rib do želv in nekaterih sesalcev. Spremembe v biomasi in sestavi zooplanktona pomembno vplivajo na produktivnost in zdravje morskih ekosistemov. Zaradi relativno kratkega življenjskega cikla je odziv zooplanktona na okoljske spremembe hiter in zato predstavljajo dober indikator stanja v pelaškem okolju. Na povišanje biomase zooplanktona vplivata dva pritiska: evtrofikacija in prelov planktivorih rib kot plenilcev zooplanktona, na znižanje pa bi lahko vplivali nekateri drugi ekološki procesi oz. večja prisotnost zooplanktivorih organizmov.

Za redno spremljanje biomase zooplanktona predlagamo splošno uveljavljen protokol vzorčenja in laboratorijske obdelave vzorcev po Harrisu *in sod.* (2000), ter oceno ekološkega stanja z ovrednotenjem geometrijske srednje vrednosti letnih biomas zooplanktona.

Element zooplankton je uporaben za vrednotenje stanja po deskriptorjih D1, D2 in D4.

1.11.2 Predlog mest vzorčenja

Zooplankton vzorčimo na mestu vzorčenja, ki ima dolgo zgodovino vzorčenja in je bilo izbrano na podlagi začetne presoje stanja slovenskega morja (Orlando-Bonaca *in sod.*, 2012a). Mesto vzorčenja je locirano v odprtih vodah slovenskega morja in je od obale oddaljeno približno 1 navtično miljo (Slika 1.1.1). Poleg omenjenega, predlagamo dodatno mesto vzorčenja v odprtih vodah (vodno telo SI-AA-03, Slika 1.1.4), ki predstavlja referenčno mesto (Tabela 1.11.1).

Tabela 1.11.1: Predlog mest vzorčenja za zooplankton.

Mesto vzorčenja	Zemlj. širina (N)	Zemlj. dolžina (E)	Globina (m)	Št. paralelk
00BF	45°32.928'	13°33.032'	dno - 0	1
00T5	45°27.150'	13°12.618'	dno - 0	1

1.11.3 Čas in frekvenca vzorčenja

Ker se za vrednotenje stanja na osnovi elementa zooplankton uporablja letna geometrijska sredina mesečnih meritev, frekvenca vzorčenja ne sme biti nižja od 1x mesečno. Predlagamo, da vzorčenje poteka dvakrat mesečno v dopoldanskem času.

1.11.4 Metoda vzorčenja

Zooplankton vzorčimo s standardno planktonsko mrežo (WP2) z ustjem 0,5 m² in velikostjo okenc 200 µm z vertikalnim potegom od dna do površine. Vzorec že na terenu fiksiramo s 3,5 % nevtraliziranim (heksamin) formalinom (Beers, 1976).

1.11.5 Laboratorijska obdelava vzorcev

V laboratoriju vzorec najprej skoncentriramo in razdelimo na polovici s Folsonovim delilcem. Suho maso zooplanktonskih vzorcev določamo na ½ vzorca, ki ga prej precedimo na mrežico in speremo pod tekočo vodo, da izločimo sol in fiksativ. Mrežico z vzorcem postavimo na papirnato brisačo in vzorec previdno postrgamo v žarilne lončke znane zatehte. Vzorec sušimo na 60°C dokler se masa ne spreminja več; običajno je stalna masa dosežena po 24-urnem sušenju (Harris *in sod.*, 2000). Organski delež v vzorcu določamo kot razliko med suho maso vzorca in maso po sežigu pri 500°C za 4 ure (Harris *in sod.*, 2000). Količino suhe mase in organskega deleža v vzorcu izrazimo v standardni enoti, t.j. mg/m³.

Preostalo polovico vzorca, namenjenega za taksonomijo, razredčimo do standardnega volumna (100 ml). Pogostejše vrste v mrežnem zooplanktonu določimo s pomočjo optičnega mikroskopa v treh podvzorcih (5 ml), za redkejšje organizme pa pregledamo

celoten vzorec. Zooplanktonte določamo na podlagi standardnih določevalnih ključev za sredozemske planktonske organizme (Tregouboff in Rose, 1957) in specializirane ključe za posamezne skupine planktonskih organizmov. Številčnost posameznih vrst oziroma višjih taksonomskih skupin zooplanktonov izrazimo kot številčnost na volumsko enoto (št/m³).

1.11.6 Metoda vrednotenja ekološkega stanja

Za vrednotenje ekološkega stanja na podlagi elementa zooplankton, smo razvili lastno vrednotenje. Iz letnih vrednosti biomase mrežnega zooplanktona izračunamo geometrijsko sredino. Za doseganje dobrega okoljskega stanja, vrednost ne sme presegati vrednosti večletne geometrijske srednje vrednosti referenčnega obdobja za Tržaški zaliv (17,8 mg/m³) (Orlando-Bonaca *in sod.*, 2012a).

Metodologija vrednotenja ekološkega stanja na podlagi vrstne sestave mrežnega zooplanktona je še v razvoju.

1.12 Mikrobnii patogeni v morskem okolju

1.12.1 Uvod

Kakovost priobalnih morskii ekosistemov je v veliki meri odvisna od antropogenega onesnaževanja, predvsem zaradi vnosa hranilnih spojin, organskih polutantov, težkih kovin in fekalnih odplak. Fekalne odplake prinašajo v okolje številne saprofitno - simbiotske črevesne mikroorganizme, patogene bakterije, viruse, glive, parazite, njihove spore in ciste (EPA, 2004). Kvantitativen pokazatelj fekalnega onesnaženja voda so indikatorske koliformne bakterije (npr. *Echerichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*, *Entericoccus*). Mikroorganizmi, ki se prenašajo z vodo, predstavljajo potencialno nevarnost za vse, ki prihajajo v stik z vodo ali uživajo kontaminirano hrano. V poletnih mesecih se poveča število plavalcev, deskarjev, jadralcev in potapljačev in s tem potencialna možnost okužb. V večini primerov lahko pride do trebušnih obolenj, vnetja dihalnih poti, očesnih sluznic in ušes. Epidemiološke študije, ki so proučevale možne okužbe plavalcev v obalnih vodah južne Kalifornije (Cabelli, 1983, Haile in sod., 1999) so pokazale, da prihaja do okužb že pri relativno nizkih koncentracijah koliformnih bakterij (< 35/100mL) v 14 dneh po kopanju na kopališčih v bližini izpustov odpadnih vod ali po nevihtah, ko prihaja do večjega izliva onesnaženih vod, ki se širijo do kopališč. Podobni primeri povečanih koncentracij indikatorskih mikroorganizmov po nevihtah so bili opaženi na kopališčih vzdolž Slovenske obale, ki so v neposredni bližini meteornih izpustov, kot posledica neurejenih kanalizacij. Velika prepreka za pravočasno ukrepanje v primerih večje kontaminacije kopališč predstavlja dejstvo, da rezultate analiz dobimo šele 24-48 ur po odvzemu vzorca. Študije v Kaliforniji so pokazale, da ukrepanja, dan po vzorčenju, ne ustrezajo dejanskemu stanju kakovosti kopališč v 70% primerov (Leecaster in Weisberg 2001). Stroški zdravljenja v primeru okužb so visoki (Dwight in sod., 2005), zato je smiselno izboljšati ukrepe za preprečevanje onesnaženja in hitrega zagotavljanja podatkov.

Monitoring programi določanja mikrobiološke kakovosti morske vode bazirajo na analizah fekalnih indikatorskih bakterij kot so celokupni koliformi (TC), fekalni koliformi (FC), *E. coli* in *Entericoccus* spp. Indikatorski mikroorganizmi sami po sebi niso patogeni za človeka, vendar njihova prisotnost v okolju nakazuje na možno prisotnost mikrobnih patogenov. Vendar pa večina rednih programom rednega spremljanja stanja ni

osredotočena na navzočnost patogenih vrst. Številne študije so pokazale, da se patogene vrste lahko preživijo v okolju brez gostitelja in da odsotnost indikatorski vrst ni nujno tudi povezana z odsotnostjo patogenih vrst. Vsekakor so nujne dodatne analize patogenih vrst tako v vodi kot tudi v sedimentu, kjer se mikroorganizmi lahko zadržujejo in preživijo dlje časa.

V morju nastopajo tudi številne patogen vrste bakterij, ki vplivajo na zdravje morskih organizmov in s tem tudi na zdravje ekosistema. Povečani pritiski, ki vplivajo na evtorifikacija obalnega morja predstavlja nevarnost, da se število »naravnih« morskih patogenov še poveča in s tem okužbe morskih organizmov (e.g., Kueh in sod., 1992). Študije so pokazale, da se abundanca bakterijske skupine *Vibrio* v morski vodi znatno poveča ob povečanju vnosa organskih hranil, znatno se poveča tudi njihovo število v okolici gojišč morskih organizmov, predvsem v sloju nad sedimentom (Eilers in sod., 2000a; La Rosa in sod., 2001). Zato so celo predlagali *Vibrio* in druge aerobne heterotrofe kot indikatorje povečanja vnosa hranil v morska okolja (La Rosa in sod., 2001).

Raziskave vrstne sestave mikrobnih združb v morskih ekosistemi, ki temeljijo na določanju vrstne pripadnosti na podlagi zaporedja 16S ribosomalne RNA (rRNA) so pokazale, da je veliko morskih mikrobov sorodnih človeškim patogenom. Morski ekosistem, s svojo ogromno populacijo mikroorganizmov, ki se učinkovito mešajo, lahko predstavlja pomembno okolje v kateremu lahko nastajajo nove kombinacije virulentnih lastnosti. Poleg tega človeške aktivnosti, kot so povečani vnosi komunalnih voda in transport balastnih voda, predstavljajo način vnosa in lahko pripomorejo k prenosu mikrobnih patogenov tudi preko geografskih meja. Med 23 rodovi v domeni Bakterije, 6 rodov vključuje človeške patogene, od katerih so bili vsi odkriti tudi v morskem okolju (skupina *Bacteroides-Flavobacterium* (Bernardet, 1998), spirohete, Gram-positivne bakterije, klamidije (Johnson in Lepennec, 1995; Kent in sod., 1998), cianobakterije (Carmichael, 2001) in proteobakterije). Velika večina morskih mikrobih patogenov pripada razredu gammaproteobakterij, med katerimi so najbolj zastopani v genusu *Vibrio* (*V. cholera*, *V. vulnificus* in *Vibrio parahaemolyticus*), *Aeromonas* in *Shewanella*. Med pomembne Gram-positivne patogene v morskem okolju spadajo *Mycobacterium* (sem med drugim spadajo povzročitelji tuberkuloze, kožnih bolezni in bolezni rib ter morskih sesalcev) ter *Clostridia*, *Listeria*, *Rhodococcus*, *Streptococcus* in bakterije iz skupine *Mycoplasma*.

Za razumevanje pomena patogenih bakterij v morskem ekosistemu in vplivov le-teh na morske organizme je potrebno posvetiti posebno pozornost izboljšanju tehnik za detekcijo mikrobnih patogenov z uporabo novejših mikrobioloških tehnik in spremljanju vpliva sprememb okoljskih parametrov na ekologijo patogenov. V ta namen nameravamo vpeljati tehnike, ki kot vir informacij izkoriščajo nukleinske kisline in omogočajo bolj natančno raziskovanje mikrobne raznolikosti ter skupaj s klasičnimi in novimi tehnikami omogočajo bolj neposreden pristop k ekološkim raziskavam. Razvoj metod iskanja prstnih odtisov DNA (*DNA fingerprinting*) je omogočil študij raznolikosti mikrobnih združb v naravnih vzorcih. S pomočjo metod iskanja prstnih odtisov DNA lahko spremljamo tudi spremembe sestave mikrobnih združb v prostoru in času. Omenjene metode temeljijo na izolaciji DNA iz naravnih vzorcev in pomnoževanju določenih zaporedij bakterijske 16S rRNA z začetnimi oligonukleotidi s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR). Z namenom izboljšanja detekcije mikrobnih patogenov v morskem okolju nameravamo vpeljati uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov s pomočjo katerih bi lahko iz DNA bakterijske združbe tarčno pomnožili sekvence mikrobnih patogenov. Nato bi preko *DNA fingerprinting* metod, kot so denaturacijska gradientna gelska elektroforeza (*denaturing gradient gel electrophoresis* – DGGE) in/ali 16S rRNA bakterijske klonske knjižnice spremljali prisotnost in spremembe v sestavi združbe mikrobnih patogenov v morskem ekosistemu.

Pri elektroforezi DGGE ločevanje produkta PCR poteka na podlagi razlik v temperaturi tališča dvoverižnih nukleinskih kislin in dejstva, da v matriksu gela enoverižne nukleinske kisline potujejo počasneje kot dvoverižne nukleinske kisline. Temperatura tališča je odvisna predvsem od deleža GC-parov v nukleotidnem zaporedju. Popolno ločitev verig nukleinskih kislin preprečimo z uporabo začetnih oligonukleotidov PCR, ki imajo na 5' koncu dodan GC-repek. Rezultat iskanja prstnih odtisov DNA je poenostavljen prikaz raznolikosti mikrobne skupnosti, omejen s specifičnostjo začetnih oligonukleotidov, ki jih uporabimo pri PCR. Vsaka lisa prstnega odtisa skriva informacijo o določeni sekvenci. Liso lahko izrežemo iz gela, ponovno pomnožimo in analiziramo s sekveniranjem. S poznavanjem sekvenc lahko določimo tudi vrstno sestavo analizirane mikrobne združbe. Rezultat primerjave zaporedij so pogosto filogenetska drevesa, ki ponazarjajo evolucijske razdalje med mikrobnimi vrstami.

Drugi pogosto uporabljen pristop je uporaba označenih sintetičnih oligonukleotidnih sond specifičnih za vrsto mikroorganizma (filogenetske sonde), s katerimi „ciljamo“ točno določene komplementarne sekvence, specifične za določeno skupino ali vrsto organizma. Sonde nukleinskih kislin so enoveržni DNA (ss DNA) ali pa RNA oligonukleotidi, ki so vsaj delno komplementarni določeni sekvenci na ciljnem genu in se lahko s to določeno sekvenco hibridizirajo. Hibridizacija je prileganje identičnih ali podobnih zaporedij nukleinskih kislin preko tvorbe stabilnih baznih parov. Sonda reagira s ciljnim zaporedjem v obliki ss DNA. Sonde so lahko označene radioaktivno (^{32}P , ^{35}S , ^3H), z encimi, z antigeni, na osnovi kemiluminiscence ali fluorescentnim barvilom. Sondo pripravimo na osnovi sekvence 16S rRNA iz sorodnega organizma (heterologne sonde). V mikrobni ekologiji so se razvile številne metode, ki temeljijo na hibridizaciji. S pomočjo sond DNA lahko identificiramo prisotnost specifičnega gena v individualnih mikroorganizmih, detektiramo lahko prisotnost določenega mikroorganizma v naravnih vzorcih ter s vzporednimi sondami določamo raznolikost vrstne sestave v mikrobni skupnosti. Tak pristop uporabimo za hitro in specifično prepoznavo ciljnega mikroorganizma v vzorcu, pa tudi za odkrivanje in proučevanje mikroorganizmov, ki jih iz naravnih habitatov ne znamo izolirati.

Ena od glavnih metod, osnovanih na hibridizaciji je *fluorescentna in situ hibridizacija* (*fluorescent in situ hybridization* – FISH), s pomočjo katere lahko prepoznamo in kvantificiramo specifične mikrobne taksonomske vrste v naravnih vzorcih. Pri metodi FISH se za detekcijo 16S rRNA sekvenc uporablja fluorescentno označene oligonukleotidne sonde, ki prodirajo v celico in hibridizirajo z ribosomalno RNA neposredno na ribosomu. Stopnja konzervativnosti ciljne sekvence sonde določa filogenetsko stopnjo skupine organizmov. Ustvarimo lahko sonde, specifične za vrsto, rod, družino, red in sonde, specifične samo za določeno domeno sekvence. V zadnjih 15-ih letih je bilo objavljenih na stotine oligonukleotidnih rRNA sond za *in situ* detekcijo različnih prokariotov (na različnih nivojih, od domen do vrste), ki so dostopne na spletu. Z uporabo teh sond in priporočenih pogojev hibridizacije lahko v pravilno fiksiranih naravnih vzorcih s pomočjo epifluorescentnega mikroskopa že v nekaj urah zaznamo specifične mikroorganizme. Za zanesljivo detekcijo se priporoča uporabo različnih sond, označenih z različnimi fluorescentnimi barvili, in jih tako lahko uporabimo istočasno na istem vzorcu. Z istočasno uporabo več različno označenih sond lahko z metodo FISH filogenetsko

okarakteriziramo celoten ekosistem. Prednost metode FISH pred ostalimi tehnikami mikrobne ekologije je v neposredni detekciji prisotnosti določenih mikroorganizmov v vzorcu. Poleg uporabnosti v mikrobni ekologiji je metoda FISH postala priljubljena tudi pri identifikaciji specifičnih patogenov v prehrabni industriji in v klinični diagnostiki.

1.12.2 Predlog mest vzorčenja

Za spremljanje prisotnosti mikrobnih patogenov v vodnem stolpcu Tržaškega zaliva predlagamo vzorčevalna mesta, ki so bila vzorčena za potrebe začetne presoje stanja slovenskega morja (Orlando-Bonaca in sod., 2012a); standardna vzorčevalna postaja v območju BF/F ter dve vzorčevalni postaji v neposredni bližini podvodnega izpusta komunalno onesnaženih vod (ČN Piran: postaji CN01, CN02).

Tabela 1.12.1: Predlog mest vzorčenja za mikrobne patogene.

Mesto vzorčenja	Zemlj. širina (N)	Zemlj. dolžina (E)	Globina (m)	Št. paralelk
00BF	45°32.928'	13°33.032'	5 - 20	1
CN01	45°32.030'	13°31.850'	5 - 20	1
CN02	45°32.090'	13°32.102'	5 - 20	1

1.12.3 Čas in frekvenca vzorčenja

Predlagamo, da se vzorce morske vode za analize prisotnosti mikrobnih patogenov v vodnem stolpcu Tržaškega zaliva na standardni vzorčevalni postaji v območju BF/F vzorči mesečno. V neposredni bližini podvodnega izpusta komunalno onesnaženih vod (ČN Piran), postaji CN01 in CN02 pa se vzorči štirikrat letno: zima (januar – marec), v spomladanskem času (april – junij), poleti (julij – september) in jeseni (oktober – december). Vzorčevanje bi potekalo med med 9 in 13 uro.

Frekvenca vzorčevanja: predlagamo, da se vzorčuje enkrat na 3 do 6 let.

1.12.4 Metoda vzorčenja

Vzorčenje poteka s pomočjo specializiranih oceanografskih vzorčevalnikov Niskin (volumen 5L) pripetih na rozeto, katera omogoča vzorčenje na globini 0 m, 5 m, 10 m, 15 m, in 20 m z enim vertikalnim potegom. Vzorec se iz Niskin-a prelije v sterilno posodo, katero se prenese v laboratorij v najkrajšem možnem času (v časovnem intervalu od 1 do 3 ur).

1.12.5 Laboratorijska obdelava vzorcev

Po prihodu v laboratorij vzorec morske vode takoj ustrezno pripravimo za nadaljnje analize: za določanje števila indikatorskih mikroorganizmov (100 mL), za spremljanje sestave bakterijske združbe ter prisotnosti mikrobnih patogenov v bakterijski združbi s pomočjo DNA *fingerprintinga* (1L), ter za analize FISH in QPCR.

1.12.5.1 Določevanje števila fekalnih indikatorskih bakterij

Število *E. coli* in intestinalnih enterokokov določamo z metodo membranske filtracije po kriterijih in navodilih Kopalne directive (2006/7/ES). Ustrezen volumen vode filtriramo skozi sterilne filtre velikosti por 0,45 µm (Millipore) in bakterije gojimo 24 ur na ustreznem gojišču in temperaturi (ISO 7899-1 ali ISO 7899-2, ISO 9308-3 ali ISO 9308—1). Rezultat predstavlja število zraslih kolonij v 100 ml vzorca vode (cfu/100 ml).

1.12.5.2 Določevanje sestave bakterijske združbe

Iz vzorcev morske vode izoliramo bakterijsko DNA po protokolu, opisanem v članku Boström in sod. (2004) z nekaj modifikacijami. Podzvorec morske vode (1L) filtriramo na 0.2 µm polietersulfonski filter (premer 47 mm, PALL Inc.). Bakterijske celice na filtru liziramo z dodatkom pufru za lizo (400 mM NaCl, 750 mM sukroze, 20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl) ter z 30 minutno inkubacijo z lizocimom pri 37 °C. Nato filter inkubiramo pri 55 °C 12 ur z detergentom SDS (končna koncentracija 1%) in proteinazo K (končna

koncentracija $100 \mu\text{g ml}^{-1}$). Po celični lizi odstranimo filter ter prečistimo celični ekstrakt z zaporednim spiranjem peleta z raztopino fenol/kloroform/izoamilalkohola ter kloroform/izoamilalkohola. DNA nato precipitiramo dodatkom 0.1 V NaAc (pH 5.2) in 0.6 V izopropanola pri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 1h. DNA oborimo z dodatkom etanola in ponovno raztopimo v 1X TE pufri ter hranimo pri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

16S rRNA namnožimo s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR) z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov s PCR aparaturom (Applied Biosystems).

- a) Za analizo sestave bakterijske združbe z denuracijsko gradientno gelsko elektroforezo (*denaturing gradient gel electrophoresis* – DGGE) pomnožimo bakterijske 16S rRNA gene z uporabo univerzalnih začetnih oligonukleotidov 907R (5'-CCGTCAATTCMTTGGAGTTT-3', Mulyer *in sod.*, 1998) in 341F (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3', Mulyer *in sod.*, 1993) ter sočasno z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov za mikrobne patogene (za indikatorske organizme).
- b) Za izdelavo 16S rRNA bakterijskih klonskih knjižnic, s katerimi lahko spremljamo prisotnost in spremembe v sestavi celotne bakterijske združbe, vključno z mikrobiimi patogeni, pomnožimo bakterijske 16S rRNA gene s pomočjo univerzalnih začetnih oligonukleotidov:
27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') in
1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3').

Reakcijska mešanica za PCR reakcijo vsebuje 1X reakcijski pufri (Tris KCl, -MgCl₂, Fermentas), 2 mM MgCl_2 (Fermentas), 0.2 mM dNTP (Fermentas), $1 \mu\text{M}$ vsakega začetnega oligonukleotida (Sigma), Taq polimerazo ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ Fermentas) in $2 \mu\text{L}$ of DNA ($50\text{-}100 \text{ ng}$). PCR program se sicer razlikuje za posamezne analize (temperature in čas posameznega koraka in cikla), vendar vedno potekajo naslednji koraki: 1. predhodna denaturacija, 2. amplifikacija (znotraj katere v ciklih potekajo koraki denaturacije, prileganja in pomnoževanja) in končno podaljševanje. Kvaliteto in kvantiteto PCR produkta nato preverimo z agarozno gelsko elektroforezo na $1,5 \%$ agaroznem gelu.

1.12.5.3 Denaturacijska gradientna gelska elektroforeza (DGGE)

DGGE elektroforeza PCR produktov bakterijske 16S rRNA poteka na 6% ali 8% poliakrilamidnem gelu, ki je pripravljen iz 40% acrylamide:N,N'-methylbisacrylamide 37.5:1 (Sigma) in vsebuje empirično določen vertikalni gradient denaturanta. 100% denaturant je definiran kot 7M urea (Sigma) in 40% (v/v) deionizirani formamide (Sigma). Polimerizacija poteče po dodatku amonijevega perfuslfata (APS, Sigma) in TEMED-a (Sigma) v denaturacijske raztopine. V posamezno nanašalno jamico nanese enako količino posameznih PCR produktov. Elektroforeza teče pri 200V 6h v 1X TAE elektroforeznem pufru pri 60 °C. Poliakrilamidni gel se nato barva z 1X SYBR Gold nucleic acid stain (Invitrogen) 30 min v temi. Gele se vizualizira s pomočjo UV transiluminatorja (BioDocAnalyze Gel documentation system, Biometra) z SyBr Green filter setom. Prstne odtise (*DNA fingerprinte*) bakterijskih združb iz posameznih vzorcev se nato lahko primerja s pomočjo statističnih metod. Vrsto pripadnost posameznih bakterijskih skupin, ki jih predstavljajo posamezne lise na gelu, določamo tako, da posamezne lise izrežemo iz gela ter jih prekonoči inkubiramo v 0.02µm prefiltrirani avtoklavirani dH₂O (MilliQ). Nato DNA, ki smo jo preko noči eluirali iz gela, ponovno pomnožimo z specifičnimi začetnimi oligonukletidi, te tako pridobljene PCR produkte sekveniramo. Na sekvencah nato opravimo filogenetske analize.

1.12.5.4 Bakterijske 16 S rRNA klonske knjižnice

Bakterijske 16S rRNA klonske knjižnice izdelujemo s pomočjo komercialno dostopnega TA Cloning kita (Cat. No. K2020-20, Invitrogen) po protokolu proizvajalca. Svež PCR produkt ligiramo v pCR® 2.1 vektor (Invitrogen) in transformiramo s pomočjo principa 'heat shock' v kemično kompetentne *E.Coli* TOP 10 cells (Invitrogen). Transformirane celice gojimo preko noči pri 37 °C na LB gojišču, ki vsebuje antibiotik ampicilin in X-gal 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, Sigma). Na podlagi modro belega testa nato izberemo samo bele kolonije in jih vzgojimo preko noči v svežem LB + Amp gojišču, kateremu dodamo tudi glycerol. Nato izoliramo plazmidno DNA posameznih klonov ter sekveniramo vstavljene 16 S rRNA bakterijske gene.

1.12.5.5 Filogenetske analize – določanje prisotnosti vrst mikrobnih patogenov

16S rRNA bakterijski geni delno sekveniramo z začetnim oligonukleotidov M13F na 23 ABI 3730XLs sekvenatorju podjetja Macrogen Inc. Sekvence se prečistimo s pomočjo prosto dostopnega programa DNA baser (www.DNAbaser.com). Sekvence se prav tako preveri za prisotnost kimernih sekvenc s pomočjo prosto dostopnega programa Bellerophon (<https://greengenes.lbl.gov/>). Identiteto oz. taksonomsko podobnost sekvenc se išče s pomočjo orodja Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) v javno dostopni bazi podatkov National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Benson et al., 2008).

1.12.5.6 Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

V naravnih vzorcih morske vode neposredno določamo prisotnost izbranih skupin indikatorskih bakterij z metodo fluorescentne *in-situ* hibridizacije (FISH). Takoj po vzorčenju vzorec morske vode fiksiramo s formaldehidom (2% končna koncentracija) in jih shranimo preko noči na temperaturi -4 °C. Določen volume podvzorca filtriramo na 0,2 µm polikarbonatni filter, dodamo paraformaldehida in inkubiramo 3 minute. Vzorec na filtru spiramo s PBS pufrom in z destilirano vodo; tako pripravljene vzorce hranimo pri -20 °C. Hibridizacija sonde s celično 16S rRNA na membranskem filtru: filter posameznega vzorca razdelimo na enake dele, za hibridizacijo z različnimi hibridizacijskimi sondami; vsak del filtra označimo, postavimo na objektno steklo in mu dodamo hibridizacijske sonde. Objektno steklo nato vstavimo v 50 ml epruveto in inkubiramo 3 ure v hibridizacijski peči pri 46 °C. Po končani inkubaciji filtre prestavimo v tekočino za spiranje, ki smo jo postavili v vodno kopel (48 °C) za 20 minut; nato filtre spiramo z destilirano vodo in osušimo na zraku. Posušene filtre nato barvamo s fluorescentnim barvilom DAPI (inkubiramo 3 minute); po barvanju filtre ponovno speremo z destilirano vodo in posušimo na zraku; tako pripravljene filtre nato pregledamo z epifluorescentnim mikroskopom s uporabo različnih setov filtrov, glede na različne fluorokrome.

1.12.5.7 Q-PCR

V začetni fazi poteka izolacija RNA po protokolu z uporabo ustreznega RNA izolacijskega kita. Ustreznemu volumnu vzorca (140 μ l) in negativni ekstrakcijski kontroli dodamo reakcijsko mešanico in po mešanju inkubiramo pri sobni temperature 10 minut. Nato dodamo etanol, dobro premešamo in dodamo ustrezen volumen lizata. Po centrifugiranju postopek ponovimo, s tem da vsakokrat zavržemo filtrat in na koncu spiramo še z različnimi pufri (AW1 in AW2) in RNA-čisto H₂O. Nato sledi postopek RT-qPCR amplifikacije z uporabo ustreznih primerjev in ustreznih sond. Reakcijsko mešanico pripravimo z določenim volumnom oligonukleotidov, sond, RNA čiste H₂O, PCR pufrov in mešanice encimov. qPCR reakcija poteka s pomočjo aparature ABI prism 7900HT (Applied Biosystems) po določenem inkubacijskem zaporedju.

1.13 Fizikalno-kemijsko stanje

1.13.1 Uvod

Opis značilnega fizikalno-kemijskega stanja temelji na meritvah temperature, slanosti, prosojnosti, pH vrednosti, alkalnosti, raztopljenega kisika in hranil, pri čemer dobljeni rezultati omogočajo razumevanje in spremljanje trenutnega, sezonskega in več letnega stanja obravnavanega območja kot tudi identifikacijo trendov za posamezne merjene parametre. Parametri kot so temperatura (toplotne razmere), prosojnost in slanosti predstavljajo pogosto nujne spremljajoče parametre, ki so pomembni so za interpretacijo drugih parametrov ter nadalje za razumevanje delovanja ekosistemov, odzivov bioloških elementov kakovosti ter opis ekološkega stanja morja.

Čeprav klimatske spremembe ne sodijo v prevladujoče okoljsko stanje in zato niso predmet morske strategije, morajo biti upoštevani učinki klimatskih sprememb. Zaradi tega je nujna priprava ustreznega programa spremljanja stanja, ki zagotovi širše ozadje sprememb.

Poleg tega pa lahko prej omenjene posamezne meritve predstavljajo le spremljajoče parametre (podatke), ki so nujno potrebni za interpretacijo drugih parametrov oziroma dane situacije. Večja odstopanja od značilnih razmer (poslabšanje stanja) odražajo obremenitev za biološke elemente.

V severnem Jadranu in osrednjem delu Tržaškega zaliva so kisikove razmere v pridnenem sloju ekološko pomemben dejavnik, saj lahko pomanjkanju kisika (predvsem v poznoletnem ali zgodnjejesenskem obdobju) zaznamo hipoksične ali celo anoksične razmere. Pomanjkanje kisika najbolj prizadene organizme.

Razvoj obalnega območja (urbanizem, gradnja infrastruktur kot so pristanišča, turistični objekti, konstrukcije na morju,...) in druge človekove dejavnosti (odlaganje odpadkov v morje, krčenje morskih površin, baraže, gradnja vetrnih elektrarn na morju, naftne in plinske ploščadi in mostovi, bagranje,...) pomenij temeljito spremembo hidrografskih razmer.

Zato v programu spremljanja stanja po ODMS predlagamo spremljanje značilnega fizikalno-kemijskega stanja (izbrani parametri) za vrednotenje stanja po deskriptorjih: D1 (ovrednotenje stanja habitata vodnega stolpca), D5 (ovrednotenje antropogene evtrofikacije) in D7 (ovrednotenje hidrografskih razmer).

1.13.2 Vzorčenje - splošno

Vzorčenje pomeni odvzem vzorca morske vode ali sedimenta oziroma uporabo terenskih merilnih instrumentov.

Splošni princip. Pri vzorčenju je potrebno upoštevati protokol vzorčenja, ki mora biti del sistema kakovosti. Podatke o vzorčenju zapišemo v terenski list, ki je del dokumentacije o vzorčenju. Ti podatki so: datum, čas, šifra vodnega telesa, šifra postaje, geografske koordinate, globina, vrsta vzorca in morebitne opombe in opažanja.

Mesta vzorčenja. Mreža mest vzorčenja je določena posebej za posamezen deskriptor po ODMS ter je usklajena s programom nacionalnega monitoringa za spremljanje kemijskega in ekološkega stanja morja.

In situ meritve. Meritve temperature in slanosti običajno izvedemo s pomočjo oceanografske CTD multiparametrične sonde (CTD = Conductivity, Temperature, Depth) *in situ*, tj. na samem mestu vzorčenja. Dobljeni vertikalni profili izbranih parametrov odražajo razmere v celotnem vodnem stolpcu.

Za določanje parametrov kot so koncentracije hranil pa moramo predhodno vzorčiti morskovo vodo iz izbranega vodnega sloja.

Vzorčenje morske vode poteka v skladu z določeno vzorčevalno shemo za posamezen deskriptor, tj. v dopoldanskem času, običajno med 8. in 15. uro.

Za vzorčenje morske vode praviloma uporabimo Niskinov vzorčevalnik ali drug primeren vzorčevalnik. Za vzorčenje pridnene vode priporočamo uporabo Ruttnerjevega vzorčevalnika. Kontinuirano zajemanje vzorcev na različnih globinah vodnega stolpa izvajamo s pomočjo standardnega oceanografskega vzorčevalnika – rozete z večjim številom vzorčevalnih posod. Vzorce prelijemo v ustrezne posode in jih do transporta v laboratorij hranimo na plovilu, v temnem in hladnem prostoru.

Vzorčenje sedimenta. Opis je podan v poglavju 1.13.10.3.

1.13.3 Temperatura

1.13.3.1 Uvod

Podatki o temperaturi in opis temperaturnih razmer predstavljajo osnovne informacije za pridobitev in razlago oceanografskih, bioloških in kemijskih podatkov oz. stanja morskega okolja. Kljub temu pa pri tem ni možno postaviti meje med razredi za ta parameter, saj se temperatura sezonsko spreminja. Predlagamo, da se temperatura vode obravnava kot »obvezni« spremljevalni parameter. Slednji je vključen v program spremljanja stanja po ODMS za vrednotenje stanja po D1 (ovrednotenje stanja habitata vodnega stolpca), D5 (ovrednotenje antropogene eutrofikacije) in D7 (ovrednotenje hidrografskih razmer).

1.13.3.2 Predlog mest vzorčenja in frekvenc meritev

V slovenskem priobalnem pasu (v polzaprtih zalivih, ob ustju rek, v obalnem pasu in tudi v osrednjih delih Tržaškega zaliva) so značilna velika nihanja in zelo spremenljive temperaturne razmere, ki vodijo do hitrih bioloških odzivov na spremenjene pogoje. Prav zato je potrebno dane razmere v vodnem stolpcu dovolj pogosto in ustrezno spremljati, da bi lahko zaznali realno stanje morskega okolja.

Ker temperatura vpliva na mnoge značilnosti in procese, so te meritve (frekvenca in vzorčevalna mesta) usklajene oz. sovpadajo z vzorčevalno shemo ostalih parametrov (fitoplankton, pH...).

Za vrednotenje stanja (Tabela 1.13.1):

- po deskriptorju D1 (ovrednotenje stanja habitata vodnega stolpca) predlagamo 1-krat mesečno merjenje temperature v celotnem vodnem stolpcu (CTD profil) na štirih vzorčevalnih mestih,
- po deskriptorju D7 (ovrednotenje hidrografskih razmer) pa 1-krat mesečno določitev CTD profila vodnega stolpca na osmih vzorčevalnih mestih.

Tabela 1.13.1: Predlog mest vzorčenja in frekvenc vzorčenja za temperaturo.

Vrednotenje stanja po deskriptorju	Mesto vzorčenja	Vodni stolpec	Frekvenca vzorčenja
D1	00BF, 00T5, CN01, CN02	CTD profil	1-krat mesečno
D7	00MA, 000F, 00C2, 000K, 00B2, 00CZ, 00F2, 00C1	CTD profil	1-krat mesečno

1.13.3.3 Meritve temperature

Meritve temperature izvedemo *in situ* s pomočjo CTD sonde.

1.13.3.4 Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja

Temperaturo opredeljujemo kot spremljevalni parameter.

1.13.4 Slanost

1.13.4.1 Uvod

Podobno kot temperatura je tudi slanost pomembna za morsko okolje. V priobalnih delih se slanostne razmere lahko še posebno hitro spreminjajo (v horizontalni, kot tudi v vertikalni smeri), kar je najbolj vidno v obdobju obilnih padavin in slabega vremena. Rečni vnosi zelo hitro spremenijo slanost celotnega obravnavanega območja. Dane slanostne razmere pa v veliki meri vplivajo tudi na morske organizme. Prav zato je ta element uporaben za vrednotenje stanja po D5 ter tudi po D1 in D7. Zaradi širokega razpona vrednosti in velike časovne variabilnosti predstavlja nujen spremljevalni parameter, pri čemer ni mogoče postaviti mej med razredi ekološkega stanja.

1.13.4.2 Predlog mest vzorčenja in frekvenc meritev

Podobno kot pri temperaturi predlagamo za vrednotenje stanja po deskriptorju D1 (vodni stolpec) 1-krat mesečno vzorčenje na mestih vzorčenja 00BF, 00T5, CN01 in CN02 ter v štirih globinah (0 m, 5 m, 15 m in v pridnenem sloju). Po deskriptorju D7 (ovrednotenje hidrografskih razmer) predlagamo 1-krat mesečno določitev CTD slanostnega profila na vzorčevalnih mestih 00MA, 00F, 00C2, 00K, 00B2, 00CZ, 00F2, 00C1 (Tabela 1.13.2).

Tabela 1.13.2: Predlog mest vzorčenja in frekvenc vzorčenja za slanost.

Vrednotenje stanja po deskriptorju	Mesto vzorčenja	Vodni stolpec	Frekvenca vzorčenja
D1	00BF, 00T5, CN01, CN02	CTD profil	1-krat mesečno
D7	00MA, 000F, 00C2, 000K, 00B2, 00CZ, 00F2, 00C1	CTD profil	1-krat mesečno

1.13.4.3 Meritve slanosti

Slanost merimo v celotnem vodnem stolpcu (z merjenjem prevodnosti oz. konduktometrično, *in situ*) z uporabo CTD sonde. Pri tem slanost vode izračunamo iz izmerjene električne prevodnosti vode, ki je odvisna od narave in količine prisotnih ionov ter temperature.

1.13.4.4 Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja

Slanost opredeljujemo kot spremljevalni parameter.

1.13.5 pH

1.13.5.1 Uvod

Glavni rezervoar ogljika v oceanih in morjih predstavlja raztopljeni anorganski ogljik, ki vključuje v vodi raztopljen ogljikov dioksid (CO_2), hidrogenkarbonatne (HCO_3^-) in karbonatne (CO_3^{2-}) ione. pH morske vode je tako odvisna od prevladujoče, prej omenjene, vrste oz. posredno od koncentracije atmosferskega CO_2 . Pri raztapljanju CO_2 v morski vodi nastaja šibka nestabilna ogljikova kislina (H_2CO_3), ki nadalje tvori (disocira na) hidrogenkarbonatne in karbonatne ione. Večja absorpcija ogljikovega dioksida v morje tako vpliva na karbonatno ravnotežje, ki je pomembno za uravnavanje pH morja. Povečanje koncentracije karbonatnih ionov prispeva k nižji pH vrednosti oz. večji kislosti morja, kar bistveno vpliva na življenje in procese v morskih ekosistemih. Prav zato je tudi nadaljnje spremljanje pH morja izredno pomembno.

Meritve pH morske vode so že vključene v program spremljanja stanja, zato predlagamo, da se meritve ohranijo tudi v programu spremljanja stanja morskega okolja po ODMS. Pri tem pH predvidevamo kot spremljevalni parameter.

Ocena »Zakisanja morja« oziroma dolgoročnega upada pH vrednosti morske vode kot posledico povečanega raztapljanja atmosferskega ogljikovega dioksida pa zahteva drugačen pristop. Samo pH kot podatek v tem primeru ne zadostuje. Za zadovoljiv in popoln opis karbonatnega sistema v morju, ki je obenem tudi puferski system, je potrebno meriti vsaj dva od štirih parametrov karbonatnega sistema omenjenih v uvodu. Poleg merjenja pH vrednosti moramo vzporedno meriti še alkalnost. Omenjen analitski pristop omogoča izredno natančnost in ponovljivost, ki je pomembna pri vseh nadaljnjih analizah podatkov in ugotavljanju dolgoročnih sprememb.

1.13.5.2 Predlog mest vzorčenja in frekvenc meritev

Predlagamo enako shemo vzorčenja kot v primeru parametrov temperatura in slanost (Tabela 1.13.3).

Tabela 1.13.3: Predlog mest vzorčenja in frekvenc vzorčenja za pH ob uporabi CTD sonde.

Vrednotenje stanja po deskriptorju	Mesto vzorčenja	Vodni stolpec	Frekvenca vzorčenja
D1	00BF, 00T5, CN01, CN02	CTD profil	1-krat mesečno
D7	00MA, 000F, 00C2, 000K, 00B2, 00CZ, 00F2, 00C1	CTD profil	1-krat mesečno

1.13.5.3 Določanje pH vrednosti

Meritve pH v celotnem vodnem stolpcu izvedemo *in situ* z uporabo CTD sonde opremljene z ustreznim senzorjem.

1.13.5.4 Laboratorijska obdelava vzorcev

pH vrednost. Vzorcju morske vode lahko določimo pH vrednost tudi elektrometrično (pH meter). V tem primeru vzorčimo morsko vodo (glej poglavje 1.13.2) iz štirih globin (Tabela 1.13.4).

Tabela 1.13.4: Mesta in globine vzorčenja morske vode za določitev pH vrednosti in alkalnosti.

Vrednotenje stanja po deskriptorju	Mesto vzorčenja	Globine
D1	00BF, 00T5, CN01, CN02	0 m, 5 m, 10 m, pridneni sloj
D7	00MA, 000K, 00B2, 00C1, 000F, 00C2, 00CZ, 00F2	0 m, 5 m, 10 m, pridneni sloj 0 m, 5 m, 15 m, pridneni sloj

Upoštevamo navodila za uporabo izbranega laboratorijskega pH metra (spiranje itd.). Za umerjanje uporabimo puferne raztopine, pripravljene z morsko vodo (Grasshoff *et al.*,

1999). Izmerimo temperaturo vzorca in odčitamo pH vrednost v mejah 0–14 ter oba podatka ustrezno zabeležimo.

Alkalnost. Vsoto koncentracij karbonatnega, hidrogenkarbonatnega in hidroksidnega in boratnega iona v morski vodi določamo titrimetrično (Grasshoff *et al.*, 1999).

1.13.5.5 Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja

pH in alkalnost opredeljujemo kot spremljevalna parametra.

1.13.6 Prosojnost

1.13.6.1 Uvod

Poleg organizmov vplivajo na kroženje snovi in druge procese (npr. prosojnostne razmere) tudi vnosi alohtone in avtohtone suspendirane snovi ter resuspenzija sedimenta pomembno. Prosojnost morske vode vpliva na količino razpoložljive svetlobe v vodnem stolpcu in pri dnu ter s tem posledično tudi na primarno produkcijo. Na prosojnost plitvega slovenskega morja bistveno vplivata tako koncentracija raztopljenih kot suspendiranih (partikulatnih) snovi, zato je ta parameter v splošnem uporaben za oceno okoljskega (evtrofičnega) stanja morja. Program spremljanja ekološkega in kemijskega stanja po Vodni direktivi že vključuje spremljanje prosojnosti, prav tako predlagamo, da se ta ohrani tudi v programu spremljanja stanja morja po ODMS. Element je uporaben za vrednotenje stanja po D1, D5 in D7.

1.13.6.2 Predlog mest vzorčenja in frekvenc meritev

Predlagamo 1-krat mesečno določitev prosojnosti (Tabela 1.13.5) na mestih vzorčenja:

- 00BF, 00T5, CN01 in CN02 za ovrednotenje habitata vodnega stolpca (po deskriptorju D1),

- 00MA, 00BF, 00C4, 000K, 0DB2, 00CZ in 00F2 za ovrednotenje antropogene evtrofikacije (po deskriptorju D5) ter
- 00MA, 000F, 00C2, 00K, 00B2, 00CZ, 00F2, 00C1 za ovrednotenje hidrografskih razmer (po deskriptorju D7).

Tabela 1.13.5: Predlog mest vzorčenja in frekvenc vzorčenja za prosojnost.

Vrednotenje stanja po deskriptorju	Mesto vzorčenja	Frekvenca vzorčenja
D1	00BF, 00T5, CN01, CN02	1-krat mesečno
D5	00MA, 00BF, 00C4, 000K, 0DB2, 00CZ, 00F2	1-krat mesečno
D7	00MA, 000F, 00C2, 000K, 00B2, 00CZ, 00F2, 00C1	1-krat mesečno

1.13.6.3 Meritve prosojnosti

Prosojnost (transparenc) morske vode (*in situ*) določamo po standardnem postopku s ploščo Secchi (okrogla bela plošča s premerom 30 cm). Globino (Secchi-jeva globina), pri kateri je oblika plošče še vidna, uporabljamo za izražanje prosojnosti vode.

1.13.6.4 Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja

Metodologija vrednotenja ekološkega stanja na podlagi/osnovi prosojnosti je še v razpravi.

1.13.7 Skupna suspendirana snov (TPM) in suspendirani organski ogljik (POC)

1.13.7.1 Uvod

ODMS pri deskriptorju evtrofikacije predvideva tudi določitev koncentracij suspendiranega organskega ogljika (POC). K višjim vsebnostim organskega ogljika

bistveno prispevajo, fitoplanktonski viški, posebni pojavi kot so sluzenje morja, ter organska onesnaženja. Znižane vrednosti pa so običajno odraz večjega vpliva resuspenzije sedimenta ali/in vnosov anorganskih delcev (preko vodotokov ali/in atmosfere).

Pomemben dodatni parameter, ki je povezan z določitvijo POC je koncentracija skupne suspendirane snovi.

Omenjene meritve so bile v preteklosti del programa spremljanja stanja morja, vendar so bile te kasneje opuščene. Analize kažejo, da ti podatki prispevajo k boljšem razumevanju in razlagi dogajanja (procesov) v morski vodi, zato predlagamo njihovo ponovno vključitev v program spremljanja stanja po ODMS. Element je uporaben za ovrednotenje antropogene eutrofikacije (po deskriptorju D5).

1.13.7.2 Predlog mest vzorčenja, čas in frekvenca vzorčenja

Za vrednotenje stanja po deskriptorju D5 (ovrednotenje antropogene eutrofikacije) predlagamo 1-krat mesečno vzorčenje morske vode v površinskem in pridnenem sloju na treh vzorčevalnih mestih 000K, 00DB2 in 00CZ (Tabela 1.13.6).

Tabela 1.13.6: Predlog mest vzorčenja in frekvenc vzorčenja za koncentracije suspendirane snovi.

Vrednotenje stanja po deskriptorju	Mesto vzorčenja	Globine	Frekvenca vzorčenja
D5	00B2, 00CZ, 00F2	0 m, pridneni sloj	1-krat mesečno

1.13.7.3 Metoda vzorčenja

Opis vzorčenja morske vode je podan v poglavju 1.13.2.

1.13.7.4 Laboratorijska obdelava vzorcev

Vzorec morske vode iz posameznega nivoja prefiltriramo skozi predhodno prežgan filter (4 ure, pri 450°C) iz steklenih vlaken Whatman GF/F pri nizkem tlaku (npr. 0,027 MPa). Volumen vzorca za filtracijo je odvisen od koncentracije suspendirane snovi. Praviloma zadostuje 0,5–2 L vzorca.

Po filtriranju ostane na filtru suspendirana snov, ki je dogovorno opredeljena z velikostnim razredom od 0,45–250 µm. Vzorec na filtru speremo z destilirano vodo ter ga nato shranimo v posebne posodice za shranjevanje filtrov. Vzorce nato zamrznemo (–20 °C). Pred analizo filtre z vzorci posušimo (liofiliziramo ali posušimo v peči pri 60°C) ter suhe vzorce izpostavimo param HCl, da odstranimo anorganski ogljik (Olli *in sod.*, 2002). Nato določimo organski ogljik z uporabo elementnega analizatorja.

Skupno suspendirano snov določimo gravimetrično, tj. s tehtanjem filtra pred in po filtraciji vzorca.

1.13.7.5 Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja

Metodologija vrednotenja ekološkega stanja na osnovi koncentracij suspendiranega organskega ogljika je še v razvoju.

1.13.8 Koncentracija raztopljenega kisika

1.13.8.1 Uvod

Aerobni organizmi potrebujejo za dihanje kisik. Ta se porablja še pri razkrajanju organske snovi in pri drugih oksidativnih procesih. V vodi poteka obnavljanje kisika z difuzijo iz zraka in preko fotosinteze. Na določenem območju je občasno lahko hitrost porabe kisika večja od hitrosti njegovega nastanka, zato pride do pomanjkanja kisika oziroma do hipoksičnih (hipoksija) ali anoksičnih razmer (anoksija).

Meritve koncentracije raztopljenega kisika zagotavljajo osnovne podatke za oceno kisikovih razmer v morju. Nekaterih avtorji opredeljujejo hipoksične vode (npr. Turner in

Rabalais 1994) s koncentracijo raztopljenega kisika manjšo kot 2 mg/L (< 0,063 mmol/L ali < 1,43 mL/L), drugi avtorji (npr. Diaz in Rosenberg, 1995) pa kot mejno koncentracijo navajajo 2 mL/L (0,089 mmol/L ali 2,86 mg/L). Če se koncentracija raztopljenega kisika približa ničli, govorimo o anoksičnih razmerah.

Element je uporaben za vrednotenje stanja po D1, D5 in D7.

1.13.8.2 Predlog mest vzorčenja in frekvenc meritev

Predlagamo razširitev dosedanje vzorčevalne sheme, saj obstoječi program monitoringa ekološkega in kemijskega stanja ni zadosten v smislu spremljanja kisikovih razmer v slovenskem morju. Pri tem predlagamo vključitev dodatnih kontinuiranih avtomatskih meritev koncentracij raztopljenega kisika (namestitvev senzorjev kisika tik nad morskim dnom) v odprtih vodah Tržaškega zaliva (vzorčna mesta 00CZ in 00BF), kar bo omogočilo boljše spremljanje in sledenje hitrim časovnim spremembam.

Predlagamo sledeče meritve koncentracij raztopljenega kisika (Tabela 1.13.7):

- po deskriptorju D1 (ovrednotenje habitata vodnega stolpca): merjenje v celotnem vodnem stolpcu (CTD profil), 1-krat mesečno in na štirih vzorčnih mestih (00BF, 00T5, CN01 in 00CN),
- po deskriptorju D5 (ovrednotenje antropogene eutrofikacije): kontinuirano spremljanje koncentracij raztopljenega kisika v pridnenem sloju na vzorčevalnih mestih 00BF in 00CZ ter
- po deskriptorju D7 (ovrednotenje hidrografskih razmer): merjenje v celotnem vodnem stolpcu (CTD profil), 1-krat mesečno na vzorčevalnih mestih (00MA, 000F, 00C2, 000K, 00B2, 00CZ, 00F2, 00C1).

Tabela 1.13.7: Predlog mest vzorčenja in frekvenc vzorčenja za koncentracije raztopljenega kisika.

Vrednotenje stanja po deskriptorju	Mesto vzorčenja	Vodni stolpec	Frekvenca vzorčenja
D1	00BF, 00T5, CN01, CN02	CTD profil	1-krat mesečno
D5	00BF, 00CZ	pridneni sloj	kontinuirano spremljanje
D7	00MA, 00F, 00C2, 00K, 00B2, 00CZ, 00F2, 00C1.	CTD profil	1-krat mesečno

1.13.8.3 Metoda vzorčenja

Koncentracijo raztopljenega kisika določamo z uporabo CTD sonde, tj. elektrometrično (kisikov senzor).

Na izbrani lokaciji (npr. v pridnenem sloju) lahko podobno meritev izvedemo s pomočjo fiksnega kisikovega senzorja za kontinuirane meritve.

1.13.8.4 Laboratorijska obdelava vzorcev

Koncentracijo raztopljenega kisika v vzorcih morske vode merimo titrimetrično (Winklerjeva metoda). Metoda temelji na določanju koncentracije nastalega joda po oksidaciji jodida s titracijo z Na-tiosulfatom ob prisotnosti škrobovice kot indikatorja. (Grasshoff *in sod.*, 1999).

V tem primeru vzorčimo morsko vodo (glej poglavje 1.13.2) kot je navedeno v spodnji preglednici (Tabela 1.13.8).

Tabela 1.13.8: Predlog mest vzorčenja in globine za vzorčenje morske vode za določanje koncentracije raztopljenega kisika.

Vrednotenje stanja po deskriptorju	Mesto vzorčenja	Globine
D1	00BF, 00T5, CN01, CN02	0 m, 5 m, 10 m, pridneni sloj
D5	00BF, 00CZ	pridneni sloj
D7	00MA, 000K, 00B2, 00C1 000F, 00C2, 00CZ, 00F2	0 m, 5 m, 10 m, pridneni sloj 0 m, 5 m, 15 m, pridneni sloj

1.13.8.5 Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja

Metodologija vrednotenja ekološkega stanja na osnovi koncentracij raztopljenega kisika je še v razvoju.

1.13.9 Koncentracije hranil

1.13.9.1 Uvod

Hranilne snovi so pomembne za rast in razvoj avtotrofov v morskem okolju. Poleg dušika v plinastem agregatnem stanju (N_2) vsebuje morje tudi majhne količine anorganskega in organskega dušika v suspendirani in raztopljeni obliki. Skupni dušik vključuje anorganski in organski dušik (v organskih spojinah). Delež organskih spojin lahko izračunamo iz razlike med skupnim in anorganskim dušikom. Anorganski raztopljeni dušik (DIN) se v morski vodi nahaja v obliki nitratnega (NO_3^-), nitritnega (NO_2^-) in amonijevega iona (NH_4^+), zato vrednosti anorganskega dušika predstavljajo vsoto koncentracij nitrita, nitrata in amonija ($N_{anorg.} = NO_2^- + NO_3^- + NH_4^+$). Skupni fosfor obsega organske in anorganske fosforjeve spojine v raztopljeni in suspendirani obliki. Anorganski raztopljeni fosfor predstavljajo ionizirani produkti fosforjeve(V) kisline (H_3PO_4). Silicij se v morski vodi prav tako nahaja v raztopljeni (predvsem v obliki silikatnega iona; SiO_4^{4-}) in v suspendirani snovi.

Povečan vnos hranil (iz točkovnih ali razpršenih virov) lahko vodi do pojava eutrofikacije. Prav zato je merjenje koncentracij hranilnih snovi (skupnega dušika, nitratov, nitritov, amonija, skupnega fosforja, fosfata in silikata) v vodnem stolpcu že vključeno v program spremljanja ekološkega in kemijskega stanja po Vodni direktivi (2000/60/EC) na postajah obalnega morja in v teritorialnih vodah, zato predlagamo, da se to ohrani. Kot dodatne parametre predlagamo še **razmerja** med posameznimi hranili.

Element je uporaben za vrednotenje stanja po D1, D5 in D7.

1.13.9.2 Predlog mest vzorčenja in frekvenc vzorčenja

Predlog vzorčnih mest in globin ter frekvenc vzorčenja morske vode za nadaljnje analize koncentracije hranilnih soli dušika (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ , skupnega dušika), fosfata (PO_4^{3-} , skupnega fosforja), in silicija (SiO_4^{4-}) je predstavljen v Tabeli 1.13.9.

Tabela 1.13.9: Predlog mest vzorčenja in globine za določanje koncentracije hranil v vodnem stolpcu.

Vrednotenje stanja po deskriptorju	Mesto vzorčenja	Globine	Frekvenca vzorčenja
D1	00BF, 00T5, CN01, CN02	0 m, 5 m, 10 m, pridneni sloj	1-krat mesečno
D5	00MA, 00C4, 000K, 0DB2 00BF, 00CZ, 00F2	0 m, 5 m, 10 m, pridneni sloj 0 m, 5 m, 15 m, pridneni sloj	1-krat mesečno
D7	00MA, 000K, 00B2, 00C1, 000F, 00C2, 00CZ, 00F2	0 m, 5 m, 10 m, pridneni sloj 0 m, 5 m, 15 m, pridneni sloj	1-krat mesečno

Določili smo še dodatna vzorčna mesta v območju z izkazanim slabšim ekološkim stanjem v povezavi z biološkim elementom morske trave, tj. Cy4, Cy6, Cy9. Na slednjih predlagamo meritve koncentracij hranilnih snovi v intersticielnih vodah sedimenta ter določitev vsebnosti skupnega organskega ogljika v sedimentu. Podrobnejši opis vzorčenja sedimenta in prej navedenih analiz je vključen v poglavje 1.13.10).

1.13.9.3 Metoda vzorčenja

Opis vzorčenja morske vode je podan v poglavju 1.13.2.

1.13.9.4 Laboratorijska obdelava vzorcev

Za določanje vsebnosti hranil v morski vodi priporočamo uporabo analiznih metod navedenih v Hansen in Koroleff (1999, 2007), ki so bile tudi uporabljene v okviru dosedanjih monitoringov in drugih raziskav slovenskega morja. Koncentracije hranilnih soli dušika (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ , skupnega dušika), fosfata (PO_4^{3-} , skupnega fosforja), in silicija (SiO_4^{4-}) se v tem primeru določajo kolorimetrično. Uporabimo lahko tudi drugo ustrezno standardizirano/validirano metodo, ki je primerna za določanje hranil v morskem okolju. V primeru uporabe avtomatskega pretočnega analizatorja za hranila je potrebno vzorce morske vode predhodno filtrirati oziroma posamezne analitske metode ustrezno izbrati ali prilagoditi. Koncentracijsko območje posamezne analizne metode mora biti takšno, da so koncentracije merjenih vzorcev vedno v tem območju, razpon koncentracij hranil je podan v poročilu za člen 9 Okvirne direktive o morski strategiji« (Orlando-Bonaca in sod., 2012c). Podatki temeljijo na meritvah hranil določenih na štirih postajah slovenskega morja v obdobju 1990-2010.

1.13.9.5 Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja

Metodologija vrednotenja ekološkega stanja na osnovi koncentracij obravnavanih hranil je še (v razpravi in) v razvoju.

1.13.10 Analize sedimenta (skupni organski ogljik in hranila v intersticijskih vodah)

1.13.10.1 Uvod

Eutrofikacija se odraža tudi v značilnostih sedimenta kar nadalje vpliva na dnu živeče organizme (npr. na morske trave).

1.13.10.2 Predlog vzorčnih mest in frekvenc vzorčenja

Shemo vzorčenja je povzeta v Tabeli 1.13.10.

Tabela 1.13.10: Predlog mest vzorčenja sedimenta.

Vrednotenje stanja po deskriptorju	Mesto vzorčenja	Frekvenca vzorčenja
D5	Cy4, Cy6, Cy9	1-letno (junij/julij)

1.13.10.3 Metoda vzorčenja

Ob zaključku vzorčenja šopov kolenčaste cimodoceje, potapljač na isti globini zapiči gravitacijski korer vsaj 10–12 cm globoko v sediment. Vzorce sedimenta vzamemo s primernim gravitacijskim korerjem (glej primer na spletni strani: <http://www.uwitec.at/html/frame.html>).

Jedra korerja moramo čim hitreje prenesti v laboratorij, kjer je potrebno ločiti tekočo in trdno fazo. Ves čas transporta morajo biti ohranjena na temperaturi vode ob morskem dnu, kjer so bila nabrana.

V ustrezno pripravljeno posodo shranimo zgornjo plast sedimenta debeline 2 cm za analizo skupnega organskega ogljika.

1.13.10.4 Laboratorijska obdelava vzorcev

a) Obdelava vzorcev sedimenta in pornih vod mora potekati po naslednjem postopku

1. Sedimentno jedro v dušikovi atmosferi narežemo na zelene globinske intervale in vzorce ločeno spravimo v zaprte centrifugirke.

2. V centrifugi pri 11000 rpm (cca 30 minut) ločimo trdno fazo sedimenta od porne vode. V dušikovi atmosferi nato ločeno intersticielno vodo prefiltriramo z uporabo 45 µm filtrov.
3. Prefiltrirane vzorce porne vode shranimo v hladilniku v plastičnih stekleničkah za nadaljnje analize.
4. Analize (hranila)* intersticielnih-pornih vod morskih sedimentov morajo biti opravljene v skladu z veljavno metodologijo za morska okolja (npr. Grasshoff *in sod.*, 1999, 2007).

* Poleg hranil se priporoča tudi meritev pH in alkalnosti ter koncentracije sulfata.

b) Obdelava vzorcev sedimenta za analize skupnega organskega ogljika (TOC)

- a) Odrežemo zgornjo plast sedimenta debeline 1-2 cm in vzorec shranimo v ustrezno posodo ter ga zamrznemo. Zamrznjeni vzorec kasneje posušimo v liofilizatorju.
- b) Iz suhega vzorca sedimenta pobereмо vse ostanke organske snovi (liste, vejice) ter lupinice školjk ali polžev, ki jih odstranimo s pinceto. Preostanek vzorca v ahatni tarilnici stremo in presejemo skozi sito z velikostjo por 200 µm.
- c) Analiza za TOC: Presejani vzorec (5–15 mg, odvisno od predvidene vsebnosti organskega ogljika) zatehtamo v srebrne kasule (5x9 mm). Vzorec postopoma nakisamo s HCl (od 0,1 do 6 M). Ko se po nakisanju s 6 M HCl (Pella in Colombo, 1978) (razredčena HCl; razmerje destilirana voda: kislina = 1:1) vzorec ne peni več, je vzorec pripravljen za analizo. Kapsule posušimo v peči, zapremo in analiziramo v CHNS analizatorju. Metodologija je povzeta po Ryba in Burgess (2002).

1.13.10.5 *Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja*

Ker gre za na novo predlagane analize in nezadostnega števila obstoječih podatkov se bo razvoj metodologije vrednotenja ekološkega stanja na podlagi danega parametra šele pričel oz. je šele načrtovan.

1.13.11 Strižna napetost pri morskem dnu

1.13.11.1 Uvod

Katerikoli monitorinški program, ki mora zadovoljiti zahteve deskriptorja 7 se ne sme osredotočiti zgolj na razširjenost ali hitrost širjenja sprememb v bentoški združbi, temveč mora biti osredotočen na spremembe v režimu tokovanja in valovanja, ki te spremembe povzročajo in so rezultat človeške aktivnosti. Pridnena strižna napetost je dober indikator dinamike pridnena sloja. V območju, ki ga pokriva izključno ODMS, je strižna napetost praktično edini parameter (poleg delovanja valov v obalnem pasu), s katerim lahko ocenimo spremembe, seveda, če so te rezultat človeške aktivnosti.

Monitoring učinka takih hidrografskih sprememb se ne sme in ne more osredotočiti zgolj na meritve v obravnavanem območju, temveč je potrebno osredotočiti napore tudi v razvoj **modelov** tokovanja in valovanja, s katerimi je možno napovedovati trajnejši učinek načrtovanih hidrografskih posegov. **Seveda pa je vsak model potrebno ovrednotiti, slednje pa omogočajo le terenske meritve.** Meritve in modelske simulacije lahko zagotovijo zadovoljivo oceno razsežnosti sprememb kateregakoli parametra ali indikatorja. Meritve so potrebne predvsem na območjih, kjer bodo lahko načrtovane hidrografske spremembe imele dovolj velik učinek na spremembe habitata.

Izvajanje monitoringa hidroloških sprememb po vodni direktivi v obalnem pasu je enako pomembno za zagotavljanje zahtev morske strategije, saj je glavnina hidrografskih sprememb vezana na aktivnosti v obalnem pasu. V kolikor takega monitoringa zahteve vodne direktive ne predvidevajo, bi moral to vrzel zapolniti monitoring za potrebe morske strategije in obratno.

Izvajanje meritev pridnene strižne napetosti za izdelavo programa monitoringa naj se izvaja v značilnih situacijah visoke in nizke plime, ter v obdobju močnih vetrov (burja, jugo). Smiselno je izbrati take lokacije, kjer je iz objavljenih prostorskih načrtov razvidno, da so možni posegi v morsko okolje in bi tako načrtovane hidrografske spremembe utegnile spremeniti režim tokovanja in s tem vplivati na spremembe ekoloških razmer v morju. Spremenjene razmere bi bile lahko posledica zmanjšane dotoka sveže morske vode s kisikom ali pa posledica povečane erozije in s tem povečanega nanosa/prenosa suspendiranega materiala zaradi povečanega valovanja ali tokovanja.

V prvi fazi gre za izvajanje meritev hitrosti pridnenih tokov z uporabo visokofrekvenčnih merilnikov tokov. Z meritvami tokov v pridnenem sloju je možno oceniti horizontalne in vertikalne komponente hitrosti in s tem strižno napetost pri morskem dnu. Obenem bodo izmerjene strižne napetosti dobra osnova za drugo fazo – modelno rešitev. Podatek o motnosti v vodnem stolpcu je primarnega pomena, ko govorimo o resuspenziji in transportu morskega sedimenta po dnu, ki je posledica sprememb strižnih napetosti. Element je uporaben za vrednotenje stanja po D1, D6 in D7.

Preliminarne meritve, s katerimi smo testiranje delovanja novih naprav na morskem dnu pa kažejo, da lokalno lahko pomorski promet pomembno vpliva na erozijo in privzdigovanje sedimenta ter stem poveča pridneno motnost in zmanjša prodor svetlobe do morskega dna. V primeru novih gradenj (podaljševanje priveznih pomolov oz. povečevanje in poglobljanje bazenov plovnih poti Luke Koper) je zato potrebno proučiti ne le vpliv samih konstrukcij na spremenjen režim cirkulacije, ampak tudi vpliv spremembe pomorskega prometa v Koprskem zalivu. Določiti je potrebno območja, ki bi postala bolj ranljiva zaradi povečanega ladijskega prometa. Slednji ob nepravilni politiki upravljanja z morskim okoljem, kamor sodi okolju škodljiv režim plovbe, lahko lokalno izjemno vpliva na poslabšanje ekoloških razmer pri morskem dnu. Preliminarne meritve pridnenih napetosti v območju plovne poti so pokazale, da plovila lahko prehodno in lokalno v globini 19 m povečajo pridneno napetost na enoto mase morske vode od 10^{-3} (m/s)^2 ($3 \cdot 10^{-3} \text{ (m/s)}^2$ ob poletni nevihti) do 10^{-2} (m/s)^2 . Konice povečanja pridnene napetosti v trajanju nekaj deset sekund spremljajo izmerjeni sunki povečanja motnosti pri dnu ob določenih prehodih plovil.

Še večje spremembe pričakujemo ob manevrih plovil v plitvinah poleg poglobljenih kanalov plovnih poti, kjer se plovila morajo obrniti, ali ob prihodu v batzen, ali ob njegovem izhodu. Ta vidik vpliva pomorskega prometa, ki ima lahko po nekaterih informacijah resne posledice na morsko okolje v omejenih bazenih (npr. Boka Kotorska, problem erozije morskega dna v Kotorju z vpeljavo prihoda velikih potniških plovil), še ni bil raziskovalno v zadostni meri obravnavan v svetovnem merilu. Sploh pa še ni bil upoštevan pri standardih Morske strategije pri opredelitvi statusa dobrega ekološkega stanja, vendar menimo, da ga je zaradi pomembnosti potrebno v naslednjih letih upoštevati.

Prve preiskave nakazujejo več vplivov povečanja pridnenih napetosti ob prehajanju plovil. Prvi pojav je povezan zgolj z lokalno kratkotrajno spremembo gibanja vodne mase (organizirano gibanje). Druga sprememba je posledica delovanja ladijskega vijaka – vrtinčne sledi za njim, ki pri dnu pomeni povečano vertikalno striženje toka in s tem povečanje pridnene napetosti. Tretji vpliv, ki ni vedno prisoten, pa je povezan s tvrobo vrtincev za gibajočim se plovilom pod določenimi hidrodinamičnimi pogoji gibanja plovil. Gre za zaporedje von-Karmanovih alternirajočih vrtincev, kateri lahko sežejo do morskega dna. Te vplive je potrebno podrobno preučiti, tudi s pomočjo tujih ekspertov.

1.13.11.2 Metodologija meritev

- meritve tokovanja na globinah do 20 m (v pridnenem sloju) z visokofrekvenčnimi merilniki tokov,
- meritve motnosti vodnega stolpca s turbidimetri,
- meritve hitrosti posedanja re-suspendiranih delcev sedimenta z laserskim merilnikom.

Meritve morajo biti opravljene predvidoma na območjih, kjer je iz prostorskih aktov razvidno, da so načrtovane hidrografske spremembe v naslednjih situacijah: V obdobjih izrazitejšega plimovanja ter pred predvidenim močnejšim vnosom sladkovodnih pritokov v morje (pred napovedanim nevihtnim vremenom).

Iz študije (Baeye *et al.*, 2012) in komunikacije s strokovnjakom dr. Legrand-om ocenjujemo, da sta pomembna dva vidika:

- ali se strižna napetost pri dnu spremeni za več kot 10% zaradi konstrukcijskega posega v morsko okolje ter
- nihanje strižne napetosti ob barokliničnih spremembah in spremembah plime.

Robno območje, ki ga je potrebno preveriti naj ustreza kvadratnemu korenu površine, ki ga zavzema, merjeno od zunanlega roba predvidenega obsega nove konstrukcije.

S takimi meritvami, bi lahko v naslednjih dveh letih pripravili referenčne vrednosti strižnih napetosti pri dnu za postavitev modelov za izračun površinske napetosti.

1.13.11.3 Metodologija modeliranja

1. Postavitev cirkulacijskega modela z ločljivostjo do 30 m za vsa izmed omenjenih območij iz prve faze. Model mora biti ugnezden v modele Koprškega zaliva, ta v model Tržaškega zaliva, slednji pa v model severnega Jadrana (NAPOM), ki je ugnezden v model celotnega Jadrana. Z modelno rešitvijo bo moč primerjati izmerjene strižne napetosti pri dnu (vrednosti pridobljene z meritvami) in vrednosti, ki so produkt modela. Model bi poganjali s simulacijo stanja v obdobju visokih in nizkih plim (spomladanskih plim) in simulacijo stanja v glavnih barokliničnih odzivih na najpogostejše vetrove (burja, jugo).
2. Postavitve modela za povečanje pridnene napetosti zaradi gibanja plovil in njihovega manevriranja. Najobičajnejša je raba modela povečanja pridnene napetosti zaradi vrtnične sledi za propelerji. Za modeliranje ostalih pojavov ob prehajanju plovil, ki vplivajo na povečanje napetosti, pa moramo najprej proučiti mehanizme, ki povzročijo povečanje pridnene napetosti s pomočjo izvedenih meritev. Na tej osnovi se postavi novi model. Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja

1.13.11.4 Uvrščanje elementa v razrede ekološkega stanja

Dobro okoljsko stanje za hidrografske razmere je težko določiti. Četudi trenutno stanje ni idealno na nekaterih območjih, ki so že bila močno spremenjena zaradi človekove dejavnosti, pa stanja ne moremo povrniti v preteklost. Zato je potrebno GES opredeliti kot trenutno stanje ob sedanjih hidrografskih razmerah.

Potrebno je oceniti povezave med hidrografijo in biodiverzitetjo, upoštevati je potrebno integriteto morskega dna in prehranjevalne verige.

Referenčne razmere za ta parameter niso poznane in predvsem se zelo spreminjajo z naravo bazena/vodnega telesa, kamor sodijo obalne vode, vode v polzaprtih, oz. odprtih zalivih, ali pa odprto morje. Spremembe in nihanja strižne napetosti pri dnu je potrebno izmeriti in na podlagi meritev postaviti smiselne mejne vrednosti.

Metodologija vrednotenja ekološkega stanja na osnovi obravnavanega parametra je šele v fazi načrtovanja.

1.14 Koncentracije onesnaževal

1.14.1 Uvod

Za potrebe načrtovanja programa monitoringa v okviru deskriptorja 8 smo do sedaj obdelali dosegljive podatke (poročila, strokovni in znanstveni članki, še neobjavljeni rezultati) o koncentracijah onesnaževal v morski vodi, sedimentih in organizmih. Dodatno smo opravili še nekatere analize, predvsem za onesnaževala, ki do sedaj niso bila kaj dosti obdelana. V letu 2012 smo opravili še dodatna vzorčenja sedimentov in organizmov, analize so v teku. S tem želimo pregledati stanje onesnaženosti z določenimi skupinami onesnaževal, ki so bila v preteklosti manj obdelana. Dobili smo/bomo tudi neko sicer skromno informacijo o onesnaženju z nekaterimi skupinami onesnaževal, o katerih do sedaj ni znanih podatkov (npr. dioksini, ostanki zdravil). V tem poročilu predstavljamo izbor vzorčevalnih mest in predlog izbora vrst organizmov za namene monitoringa. Metodologija vzorčenja in laboratorijske obdelave vzorcev je obdelana bolj na kratko, saj obstajajo za te namene splošne, mnoge celo standardizirane metode. Zato menimo, da v tem poročilu ne moremo podrobno opisovati metod dela kot v primeru bioloških parametrov, za katere so bile metode celo razvite v okviru te projektne naloge.

Pregled dosedanjega programa spremljanja in vseh rezultatov (obstoječih in na novo pridobljenih) je pokazal, da je bil nabor onesnaževal do sedaj precej dobro izbran. Tako se predlagani nov nabor ne razlikuje veliko od prejšnjega. Kar bo v nadaljevanju napisano je morda bolj želja raziskovalca, a enkrat bi bilo vseeno dobro narediti en pregled onesnaženja z »novejšimi« prednostnimi onesnaževali, za katera ni nobenih podatkov (v emisijskem monitoringu, težave pri pridobivanju podatkov o uporabi zaščitnih sredstev v kmetijstvu), čeprav lahko sklepamo na možne vire vnosa z rekami in iz komunalnih čistilnih naprav (npr. sodobnejši pesticidi, hormoni, ostanki zdravil).

V letu 2014 bomo predlog programa spremljanja stanja dopolnili in dodali predlog metodologije za vrednotenje stanja okolja. Nekatero dodatno analize bodo pripomogle k določanju ozadja pri nesintetičnih onesnaževalih (npr. kovine) v sedimentih.

1.14.2 Morska voda

1.14.2.1 Izbira mest vzorčenja

Pri izbiri mest vzorčenja smo najprej želeli integrirati določena mesta, ki so bila vključena v dosedanjem monitoringu, da bi dosegli kontinuiteto monitoringa za kasnejše ugotavljanje trendov. Poleg tega smo upoštevali tudi predvideni izbor mest za ugotavljanje učinkov onesnaževal na organizme, kar bi v primeru opaženih učinkov pomagalo pri iskanju vzrokov. Predlagamo še eno novo mesto 00C2, ker je bilo do sedaj to področje precej nepokrito.

Predlagana mesta vzorčenja:

- 000K, 00CZ, 000F, 00MA (obstoječi monitoring),
- 0024, 0035, 0DB2 (učinki na organizme, obstoječi monitoring).

1.14.2.2 Določanje nabora onesnaževal za spremljanje

Onesnaževala, ki jih predlagamo za spremljanje, so v glavnem prednostna onesnaževala, navedena v Prilogi X k Direktivi 2000/60/ES. Izbor onesnaževal temelji na podatkih emisijskega monitoringa o vnosu onesnaževal v naše morje. Poleg izbranih prednostnih onesnaževal lahko izberemo tudi druga onesnaževala, če so poznani potencialni viri njihovega vnosa. Predlagamo določanje izbranih prednostnih organskih onesnaževal, kovin (tudi Hg) in organokositrovih spojin.

1.14.2.3 Čas in frekvenca vzorčenja

Vzorčenje morske vode se izvaja enkrat mesečno.

1.14.2.4 Metoda vzorčenja

Vzorčenje morske vode mora potekati v skladu s protokolom vzorčenja, ki mora biti del sistema kakovosti.

Za vzorčenje uporabljamo Niskinov vzorčevalnik ali drug primeren vzorčevalnik. Priporočljiva je uporaba standardnega oceanografskega vzorčevalnika – rozete, z večjim številom vzorčevalnih posod, kar omogoča kontinuirano zajemanje vzorcev na različnih globinah vodnega stolpca.

Morsko vodo vzorčimo na površini ali pa zajamemo vzorec po celotni globini. V primeru uporabe rozete lahko naredimo tudi kompozitni vzorec iz vzorcev na različnih globinah. Pogosto uporabljena globina za vzorčenje površinskih vzorcev je 1 m, saj je znano, da se hidrofobne snovi koncentrirajo v tankem površinskem sloju.

Vzorce na plovilu hranimo v temnem in hladnem prostoru.

1.14.2.5 Laboratorijska obdelava in analiza vzorcev

Laboratoriji, ki izvajajo analize vzorcev, morajo uporabiti ustrezne postopke priprave vzorca in ustrezne analizne metode, upoštevajoč območje koncentracij določenih OSK in zagotavljanje ustrezne kakovosti dela.

1.14.3 Sediment

1.14.3.1 Izbira mest vzorčenja

Tudi pri izbiri mest vzorčenja sedimenta smo najprej želeli integrirati določena mesta, ki so bila vključena v dosedanjem monitoringu, kar bi omogočilo kasnejše ugotavljanje trendov. Poleg tega smo poskušali do določene mere upoštevati tudi predvidena mesta/področja za spremljanje stanja bentoških nevretenčarjev. Tako smo dodali tri nova mesta 00F2, 00C2 in BNCL10.

Predlagana mesta vzorčenja:

- 000K, 00CZ, 000F, 00MA, 0014 (obstoječi monitoring),
- 00C2, 00F2, BNCL10 (nova mesta).

1.14.3.2 Določanje nabora onesnaževal za spremljanje

Tudi v primeru sedimentov je smislen izbor onesnaževal, za katere lahko predvidimo vire onesnaževanja ali/in obstajajo podatki o njihovih virih iz emisijskega monitoringa. Ker je pomorski promet zelo intenziven, je smiselno še naprej spremljati ogljikovodike, tako alifatske kot policiklične aromatske (PAH). S tem, pa tudi z nekaterimi drugimi viri, so povezane tudi kovine in organokositrove spojine. Slednje so še vedno eden redkih problemov onesnaženja našega morja. Rezultati v primeru sedimentov bodo prispevali k jasnejši sliki onesnaženja našega morja s temi spojinami. Dobljeni rezultati bodo uporabni tudi za ugotavljanje trendov koncentracij teh spojin, glede na to, da za sedimente še nimamo ustreznih OSK. V primeru kovin je gotovo pomembno spremljanje živega srebra, čeprav gre v bistvu za naravni vir vnosa. Ti rezultati bodo pomembni za ugotavljanje trendov in načrtovanje morebitnih posegov v morskem okolju v prihodnje.

Poleg teh skupin onesnaževal lahko izberemo tudi druga prednostna onesnaževala, če so poznani potencialni viri njihovega vnosa. Rezultati analiz vzorcev sedimentov, opravljenih lansko leto, nakazujejo, da verjetno ni smiselno spremljati skupin onesnaževal kot so PCB-ji in DDT z derivati. Podobno je tudi z dialkilftalati, predstavniki katerih so tudi na seznamu prednostnih onesnaževal. Za druga onesnaževala pa ni podatkov o virih in vnosih, ki bi utemeljevali njihovo spremljanje.

Predlagamo spremljanje alifatskih ogljikovodikov, policikličnih aromatskih ogljikovodikov in kovin. Razmisliti velja tudi o spremljanju organokositrovih spojin na določenih mestih, bolj v obalnem morju, saj so druge koncentracije zelo nizke.

1.14.3.3 Čas in frekvenca vzorčenja

Vzorčenje sedimentov se izvaja enkrat letno, na koncu poletnega obdobja.

1.14.3.4 Metoda vzorčenja

Vzorčenje sedimentov mora potekati v skladu s protokolom vzorčenja, ki mora biti del sistema kakovosti. Vzorce sedimenta jemljemo z gravitacijskim jedrnikom ali z Van Veen-ovim grabilom. Slednje je predvsem primerno za zajem večje količine vzorca. V ustrezno pripravljeno posodo, najbolje stekleno, shranimo zgornjo plast sedimenta debeline 2 cm.

Vzorce na plovilu hranimo v temnem in hladnem prostoru.

1.14.3.5 Laboratorijska obdelava in analiza vzorcev

Laboratoriji, ki izvajajo analize vzorcev, morajo uporabiti ustrezne postopke priprave vzorca in ustrezne analizne metode, glede na vrsto onesnaževal. Zagotavljati morajo ustrezno kakovost dela.

1.14.4 Organizmi

1.14.4.1 Izbira organizmov in mest vzorčenja

Glede na rezultate dosedanjega monitoringa in rezultate, pridobljene v okviru pričujoče projektne naloge, predlagamo še naprej uporabo školjk užitnih klapavic (*Mytilus galloprovincialis*). V različnih vrstah rib (sardon, sardela, skuša, cipelj, brancin) so sicer enkratne meritve pokazale, da so koncentracije nižje. Pri ribah je tudi težje zadostiti pomembni zahtevi, da ribe določene vrste živijo samo v našem morju. Tudi zagotavljanje vzorcev s točno določenih mest je lahko težavno. Izbor užitnih klapavic se zdi smiseln tudi zato, ker se bodo učinki onesnaževal sledili na isti vrsti.

Tudi pri izbiri mest vzorčenja školjk smo integrirali določena mesta, ki so bila vključena v dosedanjem monitoringu, kar bi omogočilo kasnejše ugotavljanje trendov. Ta mesta so 0DB2, 00TM, 0024 in 0035. Poleg teh mest bi bilo za razmisliti o enem novem mestu na območju mesta Izola, saj je bilo to področje do sedaj nepokrito, čeprav imamo opravka s pomembnimi viri onesnaževanja (marina, komunalni mandrač).

Predlagana mesta vzorčenja:

- 0DB2, 00TM, 0024 in 0035 (obstoječi monitoring),
- novo mesto ob Izoli (v razmislek).

1.14.4.2 Določanje nabora onesnaževal za spremljanje

Predlagamo nadaljevanje spremljanja koncentracij policikličnih aromatskih ogljikovodikov (alifatski ogljikovodiki v školjkah so precej nespecifični) in kovin; za določanje trendov Cd in Hg. Potencialni viri teh snovi so pomorski promet, kurišča na kopnem, vode iz komunalnih čistilnih naprav in industrijski izpusti.

Rezultati v primeru školjk bodo prispevali k jasnejši sliki onesnaženja našega morja s temi spojinami. Dobljeni rezultati bodo uporabni tudi za ugotavljanje trendov koncentracij teh spojin (kopičenje iz vodnega stolpca). Glede na to, da rezultati monitoringa morske vode ne kažejo pomembnega onesnaženja z drugimi prednostnimi onesnaževali, menimo, da jih ni potrebno redno spremljati v organizmih.

1.14.4.3 Čas in frekvenca vzorčenja

Vzorčenje školjk se izvaja dvakrat letno, na koncu poletnega obdobja in proti koncu zimskega obdobja. Za določanje PAH-ov enkrat letno.

1.14.4.4 Metoda vzorčenja

Vzorčenje školjk mora potekati v skladu s protokolom vzorčenja, ki mora biti del sistema kakovosti. Vzorce školjk v naravi jemljemo z grabilom, na školjčičih pa odvezamo vzorec gojenih školjk. Vzorce je potrebno čimprej pripraviti za nadaljnjo analizo ali zamrzniti.

1.14.4.5 Laboratorijska obdelava in analiza vzorcev

Laboratoriji, ki izvajajo analize vzorcev, morajo uporabiti ustrezne postopke priprave vzorca in ustrezne analizne metode, glede na vrsto onesnaževal. Zagotavljati morajo ustrezno kakovost dela.

1.15 Biološki učinki onesnažil

1.15.1 Uvod

V okviru deskriptorja 8 »Koncentracije onesnažil so na nivoju, ki ne povzročajo učinkov onesnaženja« so neločljivo povezane analize kemijskih onesnaževal in biološki učinki onesnaževal (merilo 8.2). Merilo 8.2 opredeljuje učinke onesnaženja in sicer kot neposredne in/ali posredne škodljive učinke onesnaževal na organizme v morskem okolju, njihov škodljiv vpliv na morske ekosisteme, na izgubo biodiverzitete, škodljiv vpliv na zdravje ljudi in vpliv na morske aktivnosti kot so ribištvo, turizem, rekreacija ter vpliv na znižanje kvalitete morske vode, ki ovira trajnostno uporabo virov iz morja.

Monitoring v okviru deskriptorja 8 obsega vrednotenje koncentracij onesnaževal v okoljskem matriksu (voda, sediment, tkiva organizmov) in kvantifikacijo bioloških učinkov onesnaževal na različnih nivojih biološke organizacije (glej preliminarno poročilo avtorjev Orlando-Bonaca in sod., 2013). Izbira onesnaževal, tarčnih vrst in bioloških učinkov je odvisna glede na regijo in je v pristojnosti držav. Zato je dopuščeno, da se prioritetni matriksi, kemijske in biološke meritve med regijami razlikujejo glede na probleme in okoljske pogoje v regiji. Vendar pa je postavljena zahteva, da je monitoring in vrednotenje rezultatov med regijami usklajeno do najvišje možne stopnje in da je tako omogočena primerjava med regijami (Law in sod., 2010).

Podatki iz monitoringa za deskriptor 8 so izraženi kot koncentracije kemijskih onesnažil in kot nivo biološkega odziva. Pri vrednotenju je potrebno upoštevati Environmental Quality Standards (EQSs), ki so bili narejeni v okviru Water Framework Directive 2000/60/EC (WFD), Environmental Assessment Criteria (EACs) kot jih opredeljuje OSPAR za vodo, sediment in bioto ter regionalne konvencije za interpretacijo podatkov monitoringa. Podatki o bioloških učinkih onesnaženja se morajo zbirati na takšen način, da je možno ugotoviti škodljive učinke v tarčnih organizmih. Namen tega monitoringa je, da lahko na osnovi zbranih podatkov hitro detektiramo učinke onesnaženja, ki se pojavijo na organizmu, populaciji, združbi in na nivoju ekosistema ter nato z nadaljnimi ukrepi preprečimo učinke onesnaženja.

Podatki iz monitoringa morajo biti ovrednoteni glede na koncentracije, ki predstavljajo vrednosti ozadja za onesnaževala (razen za sintetična onesnaževala). Podatki o bioloških učinkih morajo omogočati tudi razlago za vzročne kemikalije, ki povzročajo učinke

onesnaženja in omogočiti zgodnje opozorilo za učinke, ki se lahko razvijejo. Povečane koncentracije onesnaževal povečujejo verjetnost, da bodo škodljivo vplivala na organizme. Da bi lahko interpretirali podatke kemijskega monitoringa v smislu tveganja in posledic za morske organizme so bili razviti standardi in mejne vrednosti (vrednosti ozadja, EQS, Environmental Assessment Criteria (EACs) okviru Vodne direktive, OSPAR). Te vrednosti odražajo vrednosti ozadja in kriterije, ki so opredeljeni tako, da zaščitijo zdravje občutljivih tarčnih organizmov. **V monitoringu morajo biti ti kriteriji uporabljeni skupaj s kriteriji za ocenjevanje bioloških učinkov, kajti na ta način je možna interpretacija podatkov monitoringa na medsebojno povezan način. Monitoring in vrednotenje deskriptorja 8 mora vsebovati kemijske in biološke metode za vrednotenje. Stanje, ki opozarja na zgodnje spremembe mora ustrezati zahtevam deskriptorja in vgrajeno v proces vrednotenja skozi analize časovnih serij podatkov iz monitoringa (Law in sod., 2010).**

Z namenom, da bi zmanjšali koncentracije onesnažil v vodi, sedimentu in v bioti in s tem tudi tveganje za škodljive učinke je potrebno natančno spremljanje in obdelava podatkov. V okviru regionalnih konvencij so bile razvite robustne statistične metode za analizo podatkov iz časovnih serij za detekcijo trendov in takšne metode je potrebno uporabiti tudi v tem monitoringu (glej CEMP Assessment Manual: Co-ordinated Environmental Monitoring Programme Assessment Manual for contaminants in sediment and biota, OSPAR Commission, 2008).

Biološki učinki onesnaženja se nanašajo na različna onesnaževala: kemijski elementi in spojine ali skupine substanc, ki so toksične, obstojne in se lahko bioakumulirajo in na substance ali skupine substanc, ki so lahko v koncentracijah, ki povzročajo biološke učinke (Water Framework Directive 2000/60/EC, definicija OSPAR in HELCOM). Izločeni so toksini morskih alg, ker so naravni proizvodi in ne kontaminanti (Law in sod., 2010).

Deskriptor 8 je preko učinkov onesnaževal povezan z deskriptorjem 9 (koncentracije onesnažil v morski hrani), prav tako kemijsko onesnaženje vpliva na biodiverzitetu, prehranjevalne spletne in bentoške ekosisteme.

Konceptualni pristop

Vrednotenje GEnS temelji na programu monitoringa, ki poteka v vsaki regiji, ki jo ocenjujemo in obsega koncentracije onesnaževal in biološke meritve, ki so povezane z učinki onesnaževal na morske organizme. V monitoringu moramo uporabiti kombinacijo

klasičnih in novih metod in metodologij za vrednotenje okoljskih koncentracij onesnaževal in omogoča prepričljiv in popoln pristop k deskriptorju 8. Pojavljanje stranskih učinkov na različnih organizacijskih nivojih (organizem, populacija, združba in ekosistem) je potrebno preprečiti, shema monitoringa mora pokazati na približevanje kritičnim vrednostim kot zgodnje opozorilo za škodljive učinke. Kjer je možno, morajo biti v monitoring vključeni učinki, ki so povzročeni s sinergističnim ali kumulativnimi interakcijami med različnimi onesnaževali.

V Sredozemlju so se države podpisnice Barcelonske konvencije odločile, da bodo postopoma uvedle ekosistemski pristop v upravljanje človekovih aktivnosti, ki vplivajo na morsko in obalno okolje Sredozemlja in na trajnostni razvoj. V skladu z deskriptorjem 8 to pomeni, da morajo biti učinki onesnaženja ugotovljeni na različnih bioloških nivojih organizacije, ob upoštevanju interakcij med onesnažili in abiotskimi in biotskimi dejavniki (Law *in sod.*, 2010). Prav tako v Sredozemlju poteka »The Programme for the Assessment and Control of Marine Pollution (MEDPOL)« in je del programa »Mediterranean Action Plan« (MAP), njegov namen je občasno ovrednotenje stanja okolja na izbranih vročih točkah in obalnih območjih, določanje časovnih trendov za izbrane kontaminante z namenom, da se ugotovi učinkovitost ukrepov in politik, in da se izboljša nadzor nad onesnaževanjem v skladu z državnimi in mednarodnimi predpisi. V okviru pilotskega monitoringa je na nivoju Sredozemlja vzpostavljen MED POL program v katerega so vključeni tudi biološki učinki (MED POL Phase IV (trajanje od 2006 do 2013) (MSCG/11/2013/09). Slovenija sodeluje samo z dvema biomarkerjema bioloških učinkov.

Detekcija in kvantifikacija učinkov povzročenih zaradi izpostavljanja onesnaževalom

Onesnaževala vplivajo na procese od molekularnega nivoja do nivoja ekosistema. Redko je najti direktno povezavo med koncentracijo onesnažil v tkivih in njihovimi učinki (izjema je izpostavljenost visokim koncentracijam), prav tako je še vedno omejeno razumevanje učinkov mešanic onesnaževal na organizme, interakcij med onesnažili in vpliv drugih okoljskih dejavnikov. Kljub temu, pa je na voljo nabor metod, ki so bile razvite za detekcijo učinkov onesnaževal v bioloških sistemih in nekatere so validirane in se uporabljajo v državnih in mednarodnih monitoringih (ICES, 2007b).

Izbrane metode morajo omogočati razumevanje vzročnih povezav med onesnaževali in opaženimi učinki, in tudi med učinki onesnaževal in naravnimi procesi, to so nujne zahteve za učinkovit monitoring, upravljanje in obnavljanje okvarjenih ekosistemov. Toksični učinki onesnaževal v morskih organizmih so odvisni od sposobnosti organizmov, da akumulirajo in presnavljajo onesnažila. Prenos toksičnih kemikalij skozi prehranjevalni splet se nato kaže v bioakumulaciji kemikalij v ribolovnih virih in v prenosu do človeka (deskriptor 9).

Interpretacija bioloških učinkov onesnaževal

Ugotavljanje učinkov onesnaževal je središče monitoringa za ugotavljanje bioloških učinkov. Poleg metod, ki omogočajo detekcijo toksikološko pomembnih onesnaževal v abiotskih matrikah in detekcijo odziva na onesnažila v organizmih (glej preliminarno poročilo avtorjev Orlando Bonaca in sod., 2013), poznamo tudi za nekatere odzive (biomarkerje) obseg škodljivih učinkov in vplive na preživetveno sposobnost (fitnes) organizma. Metode s katerimi lahko detektiramo učinke v organizmih lahko razdelimo na dve kategoriji:

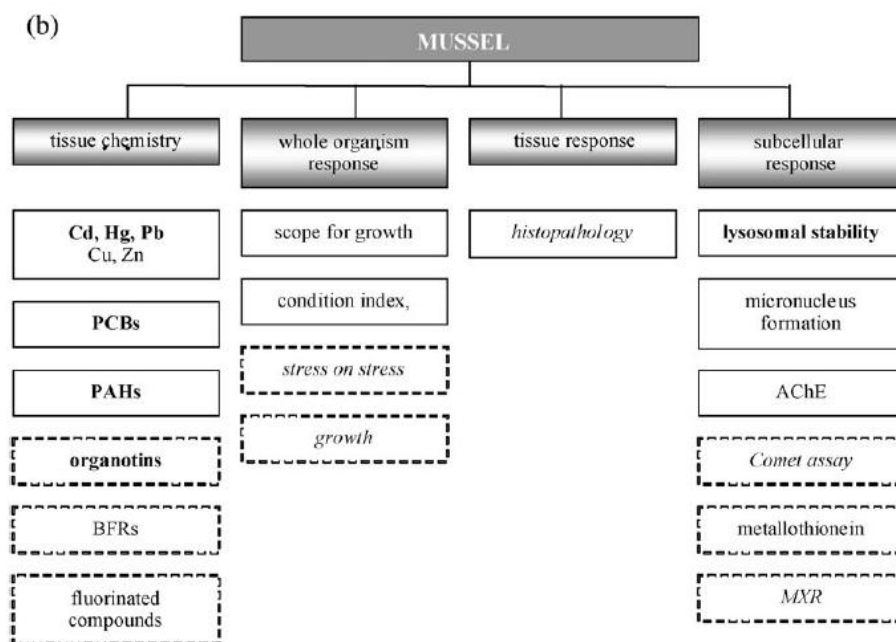
1. Metode, ki kažejo na subletalni odgovor zaradi onesnaževal, vendar s sedanjim znanjem ne moremo predvideti nadaljnjih škodljivih učinkov na zdravje (metaboliti PAHov v žolču, aktivnost citokromov P4501A v tkivih, koncentracija metalotioneinov v tkivih). V tej kategoriji sta možna dva kriterija, ki ločujeta »nep prizadete (normal)« in »prizadete (affected)« osebe.
2. Metode, ki kažejo na subletalne odzive in na podlagi mehanicistične razlage lahko predvidimo škodljive učinke na zdravje organizma (stabilnost lizosomskih membran, nekatere bolezni rib, poškodbe DNA). V tej kategoriji lahko napovemo glede na rezultat tudi stranske učinke na organizme in njihove posledice na višji nivojih.

Zgoraj omenjeni kriteriji so bili postavljeni za nekaj vrst organizmov in metode v okviru ICES/OSPAR (ICES, 2010).

Izbor indikatorjev (biomarkerjev)

Indikatorji za biološke učinke onesnaženja morajo odražati spremembe vzdolž kemijskega degradacijskega gradienta, kar pomeni da indikator detektira odziv na koncentracijski gradient onesnaževal. Biološki odziv na onesnaževala pa je lahko pozitiven ali negativen odvisno od merjenega odgovora, na primer izpostavljenost PAH-om vodi v povečano aktivnost EROD in v krajši čas zadrževanja nevtralnno rdečega barvila v lizosomih.

V splošnem je odziv na subceličnem nivoju povezan s onesnažili, ki povzročijo ta odgovor, medtem ko je merjenje odziva na nivoju organizma manj specifično za kontaminante. Ravno merjenje odziva na nivoju organizma je bolj povezano z učinki na nivoju populacije preko zmanjšane sposobnosti za preživetje in razmnoževanje. Subcelični odziv kot je EROD, koncentracija metabolitov v žolču in metalotioneini so biomarkerji izpostavljenosti, medtem ko je odziv na nivoju celotnega organizma in na nivoju tkiv jasen biomarker učinka (Slika 1.15.1). Takšno hierarhično organiziranost indikatorjev prikazuje Slika 1.15.1, poudariti je potrebno tudi, da koncentracija metabolitov v žolču odraža specifičnost za PAH-e, medtem ko aktivnost EROD odraža odziv na več skupin planarnih kemikalij (PAH, PCB, dioksini itd.)



Slika 1.15.1: Pregled metod, ki morajo biti vključene v integriran program monitoringa za školjke (povzeto po priporočilih WGBEC ICES 2006 in WGBEC ICES 2007).

Glede na znane podatke o kemijskem onesnaženju slovenskega morja in glede na priporočila (Law in sod., 2010, Davies in Vethaak, 2012) smo izbrali naslednje biomarkerje za merjenje bioloških učinkov onesnaženja (glej Tabelo 1.15.1). Izbrani biomarkerji so razdeljeni glede na biološki učinek, ki ga merijo. Ker mora monitoring bioloških učinkov zajeti čimveč možnih učinkov različnih vrst onesnaževal je program monitoringa urejen hierarhično in vključuje kemijski monitoring in monitoring bioloških učinkov. Najbolj splošen vpogled v posledice onesnaževanje dajejo biomarkerji, ki sodijo v skupino biomarkerjev splošnega stresa (npr. stabilnost lizosomskih membran).

Pomembna je tudi izbira tarčnih vrst. Glavna tarčna skupina so mehkužci in med njimi klapavice, ki so uveljavljene že v velikem številu biomonitoringov in so tudi tarčni organizem v okviru MED POL programa. V okviru izvajanja Barcelonske konvencije je le majhen del namenjen biomonitoringu, kjer se izvaja merjenje dveh biomarkerjev (poškodbe DNA z alkalno elucijo in metalotioneini) in kot tarčna vrsta je izbrana klapavica (*Mytilus galloprovincialis*). Predlagamo, da se obstoječi biomonitoring v okviru Barcelonske konvencije vključi v program izvajanja monitoringa v okviru Morske strategije pod deskriptor 8.2. Obstoječi biomonitoring se mora nadgraditi, da bo ustrezal metodološkim zahtevam, zastarelo in nevalidirano metodo alkalne elucije je potrebno zamenjati z validiranimi metodami za ugotavljanje genotoksičnih učinkov (npr. mikronukleusni test, kometni test).

Mesta vzorčenja so izbrana tako, da omogočajo hkratno zbiranje čimveč podatkov (nekatera vzorčna mesta so že v programu biomonitoringa po Barcelonski konvenciji (00TM, 0024, 0035). Za začetni preiskovalni monitoring predlagamo naslednja mesta vzorčenja (glej Tabelo 1.15.2). Vzorčenje mora potekati vedno ob istem času, da je možna primerjava med dobljenimi rezultati in izven stresnih fizioloških dogajanj kot je npr. razmnoževanje (Moore in sod., 2004b). Predlagani sta dve vzorčeni na leti (pozna zima in pozna poletje). V preiskovalnem monitoringu je potrebno določiti meje variabilnosti posameznih predlaganih biomarkerjev in jih primerjati z rezultati z različnih vzorčnih mest v regiji (severni Jadran, morda celo na nivoju celotnega Jadrana).

Tabela 1.15.1: Pregled predlaganih biomarkerjev v klapavicah za monitoring bioloških učinkov (merilo 8. 2).

Biomarker za učinek	metoda	tkivo	onesnažilo	referenca
	Zadrževanje			
Splošni stres	nevtralnno rdečega v lizosomih	hemocite	PAH, PCB, težke kovine	Moore in Lowe, 2004
	Pesticidi			
Nevrotoksični učinki	Aktivnost acetilholin esteraze	škrge	organofosfat ni in karbamatni, težke kovine	Bocquené in Galgani, 1998
	Glutation-S-transferaza			
		prebavna žleza	Težke kovine	Habig in Jacoby, 1981
	Katalaza			
		prebavna žleza	Težke kovine	Cohen <i>in sod.</i> , 1996
Oksidativni stres	TBARS peroksidacija lipidov	prebavna žleza	Težke kovine	Bouskill <i>in sod.</i> , 2005
	SOD			
		prebavna žleza	Težke kovine	Lesser <i>in sod.</i> , 2010
Detoksifikacija kovin	metalotioneini	prebavna žleza	Težke kovine	Viarengo <i>in sod.</i> , 1997
	Mikronukleusni test			
Genotoksični učinki		škrge		Bolognesi in Fenech, 2012
	Komet test			
		škrge		Fenzilli <i>in sod.</i> , 2009

1.15.2 Predlog mest vzorčenja

Predlagana mesta so na standardnih mestih vzorčenja 00TM, 0024, 0035 in 00BF (Tabela 1.15.2).

Tabela 1.15.2: Predlagana mesta vzorčenja za monitoring bioloških učinkov (merilo 8.2).

Mesto vzorčenja	Zemlj. širina (N)	Zemlj. dolžina (E)	Globinski razpon (m)	Št. paralelk
0DB2	45°35.899'	13°42.501'	2	5
00TM	45°33.031'	13°43.609'	2	5
0024	45°31.796'	13°35.751'	2	5
0035	45°29.353'	13°34.966'	2	5
00BF	45°32.928'	13°33.032'	2	5

1.15.3 Čas in frekvenca vzorčenja

Vzorčenje mora potekati izven časa razmnoževanja klapavic. Predlagamo dvakrat letno vzorčenje, ki mora potekati vedno ob istem času, da so rezultati vzorčenj primerljivi. Organizme je potrebno odvzeti pod mejo bibavice.

1.15.4 Metoda vzorčenja

Vzorčenje tarčnega organizma mora biti standardizirano in v nadaljevanju je opisan način vzorčenja. Prvi predlagan tarčni organizem so klapavice, ki so že uveljavljen tarčni organizem v številnih monitoringih bioloških učinkov (ICES 2006, ICES, 2011). V monitoringu je možno uporabiti divježiveče klapavice ali pa se na mesto vzorčenja namesti klapavice v kletkah iz znanega vira (npr. školjčišče). Pred izpostavljanjem je potrebno analizirati onesnaževala in odziv biomarkerjev. Pri tem je pomembno, da so na vzorčnem mestu vedno vzorčene divje živeče ali klapavice nameščene v kletkah. Glede na majhnost slovenskega morja in njegovo intenzivno rabo predlagamo, da se za monitoring uporabijo divje živeče klapavice in klapavice iz gojišč.

Za izvedbo predlaganega integriranega monitoringa, ki vključuje onesnažila in biološke učinke se zahteva standardizirano vzorčenje in analize. Pri tem moramo strogo upoštevati naslednje :

- Vedno je potrebno vzorčiti in analizirati isto vrsto organizma in isto izbrano tkivo;
- Osebkni za biološke učinke in za kemijske analize morajo biti vzorčeni iz iste populacije (isto za ugotavljanje bolezni in populacijske strukture, vzorčeni morajo biti ob istem času);
- Vzorčenje vode, vodnega stolpca in sedimenta mora biti opravljeno ob istem času in na isti lokaciji kot vzorčenje biote;
- Čimbolj istočasno mora biti opravljeno vzorčenje in determinacija podpornih parametrov (temperatura vode, slanost, koncentracija kisika) na izbranem vzorčem mestu.

Klapavice naberejo previdno z roko ali grabilom. Velikost školjk naj bo čimbolj enotna in znotraj specifičnega intervala glede na velikost školjk na mestu vzorčenja. V hladni in vlažni posodi jih čimprej transportiramo v laboratorij, za hlajenje in vlaženje lahko uporabimo vrečke z ledom ali mokre brisače. Klapavice ločimo iz šopa tako, da prerežemo bisusne niti. Trganje bisusnih niti povzroči poškodbe viscere, ki pomenijo stres za organizem, še posebej kadar opravljamo test zadrževanja nevtralnno rdečega barvila (stabilnost lizosomskih membran). Klapavicam takoj izrežemo tkiva (škrge, gonade) in jih globoko zamrznemo v tekočem dušiku ali na -80°C (za acetilholin esterazo, glutation-S-transferazo, katalazo, peroksidacijo lipidov (TBARS), superoksid dismutazo, metalotioneine). Tkiva morajo biti ves čas na ledu. Za nekatere analize potrebujemo žive klapavice (npr. stabilnost lizosomskih membran, komet test, mikronukleusni test) in v tem primeru lahko pustimo klapavice v hladnem in vlažnem prostoru preko noči in nato takoj opravimo analize. Kadar za test uporabimo hemocite (npr. stabilnost lizosomskih membran in kometni test) je potrebno klapavico previdno odpreti in nato z iglo odvzeti hemolimfo iz mišice zapiralke. Kadar uporabimo škrge, le te previdno izrežemo ter tkivo razgradimo na posamezne celice z ustreznim encimom.

Ob vzorčenju tarčne vrste je potrebno zagotoviti še meritve fizikalno kemijskih parametrov: temperatura vode, kisik in slanost na globini. Te parametre je potrebno izmeriti na globini 2 m.

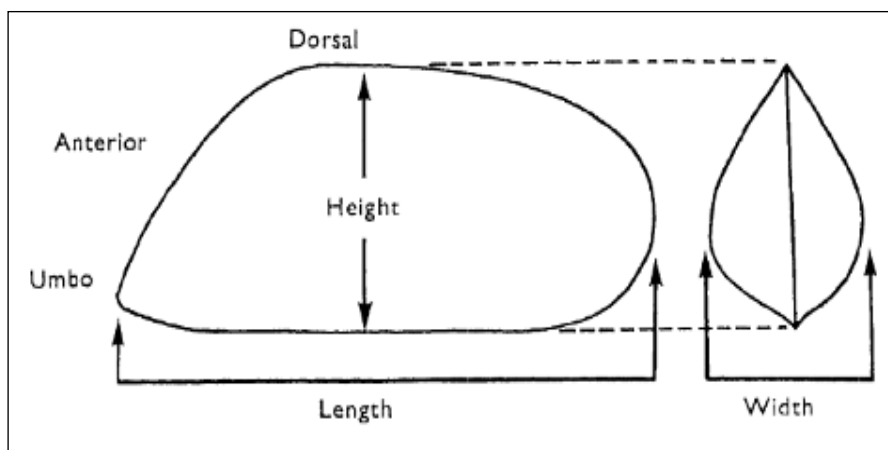
Pri vsakokratnem vzorčenju vzorcu klapavic (20 osebkov) izračunamo kondicijski indeks, ki je mera za splošni stres. Splošnega dogovora po kateri formuli izračunati kondicijski indeks ni, zato je v priporočilih JAMP (ICES, 2011) predlaganih več izračunov. Predlagamo naslednjo formulo za izračun kondicijskega faktorja:

$CI = \text{suha teža telesa} / \text{višina} \times \text{dolžina} \times \text{širina}$ (Lobel, 1991)

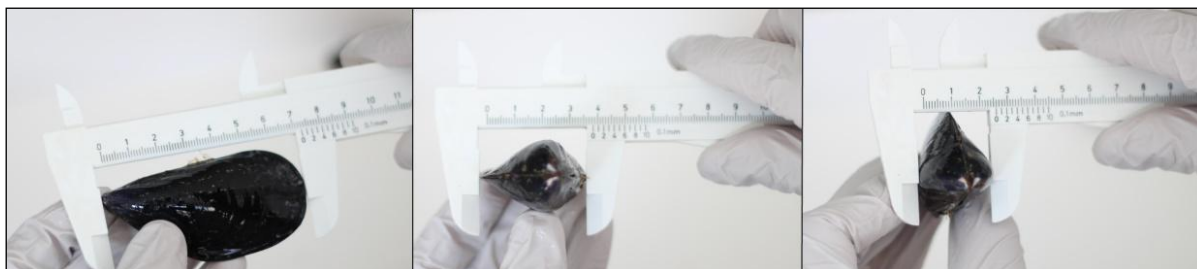
1.15.5 Laboratorijska obdelava vzorcev

1.15.5.1 Standardiziran način merjenja telesa školjk

Standardizirane so tudi meritve telesa školjke, ki jih nato uporabimo za izračun kondicijskega indeksa. Za merjenje uporabimo kljunasto merilo. Dolžina (length) pomeni meritev od anteriornega dela do posteriornega dela lupine, višina (height) je meritev od ventralnega do dorzalnega dela ter širina (width) je mera, ki zajema najdaljšo razdaljo med obema lupinama (Sliki 1.15.2 in 1.15.3; Tabela 1.15.3).



Slika 1.15.2: Standardizirane meritve lupine školjk (Seed, 1968).



Slika 1.15.3: Prikaz merjenja lupine školjk.

Tabela 1.15.3: Predpisan standardiziran način meritev za školjke (ICES, 2011).

Parameter	Natančnost meritve	Komentar
Teža telesa	do 0.1g	
Dolžina/širina/višina lupine	do najbližjega mm	
Mokra teža viscere	do 0,1g	Viscera je odstranjena iz lupine in intervalvarna voda je odcejena na papirju
Suha teža viscere	do 0,01g	Sušenje do stalne teže
Mokra teža lupine	do 0,01g	Voda odcejena na papirju
Suha teža lupine	do 0,01g	Sušenje do stalne teže

1.15.5.2 Splošni stres

Stabilnost lizosomskih membran (test zadrževanja barvila nevtralnno rdeče v hemocitah)

V lizosomih se kopičijo kovine in organska onesnažila (PAH, PBC, kovine, azbest, ipd.), ki v lizosomih povzročijo številne biološke učinke. Zaradi tega je odziv lizosomov uporabljen kot biomarker učinka in odražajo splošni stres, ki je posledica onesnaženja morskega okolja v vseh evkariontskih organizmih od kvasovk do človeka (Cuervo, 2004). Školjke imajo kompleksen lizosomski sistem, ki sodeluje pri sprejemu in razgradnji hrane in tudi pri procesiranju onesnaževal in njihovi detoksifikaciji, glavno vlogo imajo kisle hidrolaze. Nekateri od teh encimov služijo kot občutljiv detekcijski sistem za zaznavanje bioloških učinkov onesnaževal (N-acetil heksoaminidaze, β -glukoronidaze, kisle fosfataze) (Izagirre in Marigómez 2009). Odziv lizosomov na onesnaženje v okolju je viden kot: povečana velikost lizosomov, zmanjšana stabilnost njihovih membran in spremembe v vsebini lizosomov, lipidoza (patološko kopičenje lipidov), lipofuscinoza (patološko kopičenje pigmenta lipofuscina, ki je stresni pigment značilen samo za mehkužce ter se

kopiči s starostjo živali) (Marigómez in Baybay-Villacorta, 2003, Köhler *in sod.*, 2002; Moore *in sod.*, 2006). Kovine kot so baker, kadmij in živo srebro povzročijo destabilizacijo lizosomov v školjkah (Viarengo *in sod.*, 1981; 1985a,b) in kadar nastanejo nato še oksidativni radikali nastane lipofuscinoze .

Stabilnost lizosomskih membran je dober diagnostičen biomarker za oceno zdravstvenega stanja osebka (Cajaraville *in sod.*, 2000; Dondero *in sod.*, 2006b; Galloway *in sod.*, 2002, 2004; Marigomez in Baybay-Villacorta, 2003; Moore *in sod.*, 2004). Okvare njihovega delovanja lahko mehanicistično povežemo s številnimi patološkimi spremembami povezanimi s toksičnostjo in degenerativnimi spremembami (Cuervo, 2004; Köhler *in sod.*, 2002; Moore *in sod.*, 2006a). Novejše študije so potrdile, da je lizosomska avtofagija naslednja obrambna linija zoper oksidativni stres (Cuervo, 2004; Moore *in sod.*, 2006c) in da je sposobnost učinkovite regulacije tega procesa pomemben dejavnik, ki prispeva k sposobnosti organizmov da lahko preživijo v stresnem in onesnaženem okolju.

Biomarkerjev, ki so vezani na delovanje lizosomov je več in jih lahko razdelimo na citokemične metode (ugotavljanje encimske aktivnosti N-acetyl- β -heksoaminidaze in β -glukoronidaze, kopičenje lipofuscina in nevtralnih lipidov) in *in vitro* test zadrževanje barvila nevtralnno rdeče v hemocitah. Za začetni preiskovalni monitoring smo izbrali test zadrževanja barvila nevtralnno rdeče v lizosomih v hemocitah klapavic. Test je standardiziran in je med veljavno metodologijo organizacije ICES (ICES. 2004).

Test smo tudi preizkusili na klapavicah s predlaganih mest vzorčenja ob slovenski obali (glej Tabela 1.15.2). Test temelji na merjenju časa, ko se barvilo nevtralnno rdeče zadrži v lizosomih hemocit iz klapavic. Pri odvzemu hemolimfe iz mišice moramo školjko previdno odpreti in paziti, da ne poškodujemo lupine. V brizgo vzamemo 0,1 ml fiziološke raztopine ter zabodemo v mišico in počasi odvezamemo približno 0,1 ml hemolimfe iz mišice in jo prenesemo v silikonizirano epico. Epico rahlo pretresemo in odpipetiramo 40 μ l vsebine ter kanemo na objektno stekelce z polilizinom. Počakamo približno 10 minut in nato dodamo še 40 μ l delovne raztopine nevtralnno rdečega barvila in pokrijemo s pokrovnim stekelcem ter opazujemo pod svetlobnim mikroskopom. Lizosomi so po privzemu barvila nevtralnno rdeče vidni kot zrnca v citoplazmi. S časom zrnatost upada, ker barvilo prehaja iz lizosomov v citoplazmo in se zrnatost zmanjšuje. Pazljivo opazujemo celico in zabeležimo v kolikšnem času začno lizosomi izpuščati barvilo (zmanjša se zrnatost). Čas variira glede

na stres, v katerem so bile školjke, rezultat testa je čas v katerem pride do razbarvanja v 50% preiskanih hemocit. Najdaljši dopusten čas opazovanja je 180 minut, kasneje postane barvilo toksično za hemocite. Za statistično obdelavo uporabimo Tukey *t*-test na transformiranih podatkih, Mann-Whitney *U*-test ali Kruskal-Wallis test.

Dopolnilni dejavniki

Stabilnost lizosomov je indikator zdravstvenega stanja in nanj lahko vplivajo tudi drugi dejavniki, ki niso povezani z onesnaženjem: hudo pomanjkanje hrane, visoke temperature (hipertermija) in dolga obdobja hipoksije, zaključni stadij gametogeneze in drstitev (Moore *in sod.*, 1980; Moore *in sod.*, 2007). Medtem, ko je pri ribah minimalen vpliv teh dejavnikov na stabilnost lizosomskih membran (Köhler, 1991).

Pri testu zadrževanja nevtralnno rdečega barvila je potrebno paziti, da ima fiziološka raztopina enako ionsko jakost kot morska voda (isto slanost kot okolje) ali pa uporabimo filtrirano morsko vodo iz okolja kjer so bile vzorčene školjke.

Kriteriji za vrednotenje naravnih vrednosti in kriterijev za vrednotenje

Stabilnost lizosomskih membran je biofizikalna lastnost membrane, ki obdaja sekundarne lizosome in je v glavnem neodvisna od taksona. Za citokemične metode je sprejeto merilo, da so testirane živali zdrave, če je čas zadrževanja nad ≥ 20 minut, v stresu, vendar še zmožne kompenzacije če je pod <20 minut, vendar nad ≥ 10 minut in močno pod stresom in kažejo patološke spremembe, če je čas zadrževanja pod <10 minut (Moore *in sod.*, 2006a). Kriteriji za test z nevtralnno rdečim barvilom so: živali so zdrave kadar je čas zadrževanja barvila nevtralnno rdeče nad ≥ 120 minut, v stresu vendar zmožne kompenzacije, če je čas pod <120 minutami vendar nad ≥ 50 minutami in pod močnim stresom, kadar je čas zadrževanja pod <50 minutami (Moore *in sod.*, 2006a) (Slika 1.15.4).

Lysosomal Stability Assessment Criteria

NRR	>/= 120 mins	<120 - >/= 50 mins	< 50 mins
Cyt Ch	>/= 20 min	<20 - >/= 10 mins	<10 mins

Slika 1.15.4: Kriteriji za vrednotenje stabilnosti lizosomskih membran (NRR – zadrževanje barvila nevtralnno rdeče v lizosomih hemocit; Cyt Ch – citokemične metode, povzeto po Law *in sod.*, 2010).

Zagotavljanje kvalitete

Medlaboratorijske primerjave tehnik za ugotavljanje stabilnosti lizosomskih membran so bile opravljene v okviru ICES/UNESCOIOC- GEEP Bremerhaven Research Workshop in UNEP-MEDPOL programa, in za metodo zadrževanje nevtralnno rdečega v okviru GEF Black Sea Environment Programme (Moore *in sod.*, 1998, Viarengo *in sod.*, 2000). Medlaboratorijske primerjave so pokazale, da so metode primerne za uporabo in da je med laboratoriji majhna variabilnost med rezultati. Kot standard se uporablja prebavna žleza klapavic ali hemocite.

1.15.5.3 Genotoksični učinki

Mikronukleusni test na škrgah klapavic (*Mytilus galloprovincialis*)

Biomarkerji genotoksičnih učinkov odražajo poškodbe genetskega materiala v organizmih (Moore *in sod.*, 2004). Poznamo različne metode za detekcijo dvovijačnih in enovijačnih prelomov v DNA (DNA addukti, mikronukleusi, kromosomske aberacije). Nastanek mikronukleusov kaže an prelome v kromosomih, ki se nato lahko pokažejo tudi kot teratogeni učinki na sesalcih (Siu *in sod.*, 2004). Mikronukleusi so acentrični fragmenti kromosomov ali celi kromosomi, ki se niso vgradili v hčerinsko jedro med anafazo. Njihov

nastanek je posledica aneugenih ali klastogenih učinkov, ki jih povzročajo različna onesnažila. Mikronukleusi nastanejo tudi zaradi napak v delitvenem vretenu, poškodb centromere ali kromosomskih aberacij (Fenech, 2000). Klastogeno delovanje onesnažil povzroči prelome v dvojni vijačnici DNA, nastanejo acentrični fragmenti, ki se ne morejo pritrčiti na niti delitvenega vretena in nato integrirati v hčerinsko jedro. Aneuploigene snovi preprečijo tvorbo delitvenega vretena in tako so lahko v mikronukleusih celotne kromatide ali pa nastanejo celo večjedrne celice z različnim številom kromosomov (García in Montero-Montoya, 2001).

Uporaba biomarkerjev genotoksičnosti v tarčnih organizmih (ribe, nevretenčarji in med njimi predvsem školjke) omogočajo ovrednotiti genotoksične učinke. Pojavljanje mikronukleusov je indeks nakopičenih poškodb dednine v življenju celice in omogoča integriran odgovor na delovanje kompleksnih mešanic onesnažil. Mikronukleusni test je zelo uporabljan v različnih programih spremljanja bioloških učinkov onesnaženja in je tudi standardiziran (ICES, 2011, Bolognesi in Fenech, 2012). Tarčno tkivo so običajno eritrociti, škrge, ledvice in jetrne celice v ribah in hemocite ali škrge v školjkah.

Mikronukleusni test je razmeroma enostaven in hitrejši kot mikroskopska analiza kromosomskih aberacij v metafazi, še posebej zato, ker ima veliko vodnih organizmov majhne kromosome kar otežuje pregledovanje. Za mikronukleusni test rabimo celice v interfazi ne glede na kariotip.

Za mikronukleusni test so potrebne žive klapavice. Klapavicam takoj po vzorčenju previdno izrežemo škrge in jih speremo z ustreznim pufrom. Nato jih razrežemo na majhne koščke (1 do 2mm), nato dodamo raztopino ustreznega encima za razgradnjo. Celično suspenzijo naneseemo na objektna stekelca, fiksiramo in obarvamo. Stekelca nato pregledamo pod svetlobnim mikroskopom (Bolognesi in Fenech, 2012, ICES, 2011).

Kriteriji za vrednotenje naravnih vrednosti in kriterijev za vrednotenje

Za ovrednotenje mikronukleusov veljajo kriteriji, ki jih predpisuje ICES (ICES/OSPAR SGIMC REPORT, 2011, Bolognesi in Fenech, 2012, Fenech *in sod.*, 2003). Za določanje mikronukleusov veljajo naslednji kriteriji: velikost mikronukleusa je manjša od tretjine glavnega jedra, ne sme biti fragmentiran, mikronukleus je viden v isti optični ravnini kot glavno jedro, barvno enak glavnemu jedru, mikronukleus je okrogle ali ovalne oblike in se nahaja v citoplazmi celice in niso povezani z glavnim jedrom. Pregledati je potrebno 1000

celic iz vsakega osebka, število pregledanih osebkov je odvisno od jakosti onesnaženja in je lahko od 10 in več osebkov na mesto vzorčenja (Venier in Zampieron, 2005; Baršienė *in sod.*, 2004, 2008a,b).

Kriteriji za vrednotenje naravnih vrednosti in kriterijev za vrednotenje

Rezultati znanstvenih študij in podatki iz baze NRC so bili uporabljeni za izračun kriterijev za ekološko vrednotenje mikronukleusnega testa (ICES, 2011). Mejno vrednost za mikronukleuse predstavlja 90 percentil naravne vrednosti in po veljavnih kriterijih pomeni vsako povišanje frekvence mikronukleusov nad to mejo poslabšanje stanja okolja (ICES, 2011). P90 je bil izračunan iz frekvenc mikronukleusov iz osebkov, ki so bili vzorčeni na neonesnaženih ali zmerno onesnaženih mestih (ICES, 2011). Izračunana meja mikronukleusov za Sredozemlje je bila dobljena iz rezultatov za *M. galloprovincialis* iz vzorčnih mest ob španski obali. Zaradi majhnega števila analiziranih vzorčnih mest velja previdnostno načelo, da je potrebno mejo 90P ponovno preveriti. Tako je postavljena meja za neonesnažena mesta v Sredozemlju za *M. galloprovincialis* 1% pri temperaturi 15°C, 2% med 15°C in 20°C in 3% nad 20°C (Brunetti *in sod.*, 1992, ICES, 2011). Zaenkrat še ni postavljena meja 90P za Jadransko morje.

Dopolnilni parametri

Število mikronukleusov je odvisno od temperature morske vode.

1.15.5.4 Nevrotoksični učinki

Aktivnost acetilholin esteraze

Merjenje aktivnosti acetilholin esteraze (AChE; EC 3.1.1.7) v morskih organizmih je primerna metoda za vrednotenje izpostavljenosti nevrotoksičnim snovem v vodnem okolju. Razvite so občutljive spektrofotometrične tehnike s katerimi lahko merimo aktivnost AChE v morskih organizmih in detektiramo inhibicijo AChE zaradi onesnaževal, ki se nahajajo v morskem okolju (Habig *in sod.*, 1986). Spektrofotometrična metoda za merjenje

AChE je primerna za merjenje v različnih vrstah in ima visoko ekološko relevantno zaradi posledic inhibicije AChE na organizmih.

AChE se nahaja v različnih tkivih, največ v mišicah in v možganih rib, adduktorski mišici, nogi, hemocitah in škrgah školjk, abdominalni mišici pri rakih (Bocquené in Galgani, 1998), kjer je aktivnost tudi najvišja. Mehkužci imajo nižjo aktivnost v primerjavi z vretenčarji (Bocquené *in sod.*, 1998).

AChE je indikator neurotoksičnih učinkov in je specifičen biomarker izpostavljenosti organofosfatom in karbamatnim pesticidom (Bocquené in Galgani, 1998; Printes in Callaghan, 2004; Hoguet in Key, 2007). Inhibicijski učinki teh onesnaževal se pokažejo pri nizkih koncentracijah nevrotoksičnih pesticidov (0.1 to $1 \mu\text{g l}^{-1}$; Habig *in sod.*, 1986). V zadnjih letih je bilo dokazano, da je AChE tudi primeren biomarker za učinke težkih kovin, detergentov (Signa *in sod.*, 2008), kar so potrdili s študijami v Baltiku (Schiedek *in sod.*, 2006; Kopecka *in sod.*, 2006, Baršienė *in sod.*, 2006).

Za meritve aktivnosti AChE je primerna tarčna vrsta klapavica, primerno tkivo pa so škrge. Klapavice je potrebno vzorčiti kot je opisano v poglavju 1.15.4, nato se takoj odvzame škrge, ki jih je potrebno takoj globoko zamrzniti (tekoči N_2 in nato na -80°C). Tkivo nato stehramo, homogeniziramo v pufru in centrifugiramo, da dobimo S9 frakcijo. Supernatant nato lahko shranimo globoko zamrznjen. Aktivnost AChE merimo spektrofotometrično v »in vitro« testu na mikrotiterskih ploščicah (ICES, 2011, Bocquené in Galgani, 1998). Občutljivost metode je zelo visoka in možno je izmeriti inhibicijo AChE, ki jo povzročijo koncentracije 100 ng L^{-1} karbamatov in 10 ng L^{-1} organofosfatov (Kirby *in sod.*, 2000). Aktivnost AChE merimo v supernatantu, ki mu dodamo substrat acetilholin klorid in 5,5 ditiobis-2-nitrobenzojsko kislino. Spremembo absorbance merimo 2 minuti pri 405nm. Aktivnost je izražena v nmol hidroliziranega acetilholin klorida/min/mg beljakovin.

Inhibicija AChE povzroča neprestano stimulacijo v živčnih sinapsah in mišicah kar vodi v tetanijo, paralizo in tudi v smrt. Subletalna izpostavljenost inhibitorjem AChE vodi v spremenjeno vedenje živali in zmanjšano zmožnost gibanja (Vieira *in sod.*, 2009), kar vpliva na razmnoževanje in na sposobnost preživetja in je ekološko pomemben biomarker. Ovrednotenje aktivnosti AChE tako omogoča detekcijo bioloških učinkov onesnaženja na

različna onesnažila in je primeren biomarker kot eden od prvih pokazateljev bioloških učinkov.

Dopolnilni dejavniki

Potrebno je poznati naravne meje variabilnosti AChE v tarčni vrsti, pri tem pa je potrebno upoštevati kateri dejavniki vplivajo na variabilnost. Med prepoznanimi dejavniki so spol, velikost, razmnoževanje, temperatura vode in slanost (Leiniö in Lehtonen, 2005, Rank in sod., 2007). Sezonska variabilnost je odgovor na različne naravne dejavnike in je bila detektirana v različnih vrstah (Dizer in sod., 2001; Burgeot in sod., 2006). V monitoringu je tudi potrebno paziti na prisotnost biotoksinov v morski vodi (npr. toksini cianobakterij), ki lahko inhibirajo aktivnost AChE (Dailianis in sod., 2003; Lehtonen in sod., 2003; Frasco in sod., 2005). Prav tako je potrebno meritve aktivnosti AChE meriti vedno v istem tkivu, ker je aktivnost odvisna od vrste tkiva, v klapavicah so najprimernejše tkivo škrge.

Kriteriji za vrednotenje naravnih vrednosti in kriterijev za vrednotenje

Bazalna vrednost za aktivnosti AChE mora biti določena na nivoju regije na podlagi meritev na referenčnih vzorčnih mestih v vsaj dveh sezonskih ciklih (priporočilo OSPAR Background document and technical annexes for biological effects monitoring, Update 2013). Določena je bazalna vrednost za vrsto *Mytilus edulis* na podlagi 3-letne študije ob obali Atlantika, ki znaša ($35 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$, Bocquené in sod., 2004). Inhibicija AChE za 20% (velja za ribe in nevretenčarje) kaže na izpostavljenost nevrotoksičnim onesnažilom (Zinkl in sod., 1987), medtem ko zmanjšanje aktivnosti za 20% do 50% kaže na subletalne učinke (Dizer in sod., 2001). Vendar pa so do sedaj izmerjene vrednosti v vrstah *Mytilus* spp. različne glede na geografsko regijo in sezono (od 25 to $54 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) (OSPAR, 2013). Zato je potrebno najprej opredeliti vrednosti ozadja, nato opredeliti BAC in nato še EAC vrednost (10P), ki predstavlja pomembno inhibicijo AChE in pomeni subletalne učinke na organizem (OSPAR, 2013).

Zagotavljanje kvalitete

OSPAR priporoča, da se standardizira metodologijo za merjenje aktivnosti AChE in opravi medlaboratorijske primerjave za izbrane tarčne vrste v okviru različnih programov

biomonitoringa (OSPAR, HELCOM, MEDPOL in MSFD). Objavljena metodologija je lahko osnova za standardizacijo (Bocquené in Galgani, 1998). Nadalje je nujno določiti bazalno vrednost za specifična okolja v evropskih morjih in za izbrane tarčne vrste. V okviru te pobude je bila tudi pripravljena delavnica v okviru projekta PERSEUS v letu 2013. V okviru te delavnice smo opravili meritve treh encimov AChE, katalaze in glutation-S-transferaze na večih tarčnih vrstah (ribe in mehkužci) z večih regij ob Sredozemskem morju ("Biochemical biomarker techniques for the assessment of pollution effects in marine organisms" je potekala na Hellenic Centre for Marine Research v Atenah.

1.15.5.5 Detoksifikacija kovin

Metalotioneini

Metalotioneini so nizko molekularni proteini, ki so bogati s cisteinom in so najdeni v vretenčarjih in v nevretenčarjih. Poznamo več izoform, ki se razlikujejo med vrstami in med tkivi. Služijo za sekvestracijo kovin in sodelujejo v različnih procesih:

- v regulacijskih procesih, kjer sodelujeta Zn in/ali Cu,
- za vezavo in detoksifikacijo kovin kot sta Cd, Hg in drugi,
- verjetno sodelujejo pri obrambi pred prostimi radikali (zaradi velikega števila –SH skupin).

Za določanje metalotioneinov so v uporabi različne metode, ki so tudi vključene v programe biomonitoringa. Za tarčne vrste so izbrani mehkužci in ribe, primerna tkiva so jetra (ribe) in prebavna žleza (mehkužci) in škrge (ribe in mehkužci). Najbolj uporabljane metode za določanje metalotioneinov so: diferencialna pulzna polarografija, substitucija kovin in spektrofotometrična sulfhidrilna metoda (Viarengo *in sod.*, 1997). V biomonitoringu v okviru Barcelonske koncencije že od leta 1999 uporabljamo spektrofotometrično metodo za določanje metalotioneinov v klapavicah (Ramšak *in sod.*, 2012) in je tudi vključena v program MEDPOL. Predlagamo, da se obstoječa metoda vključi v program monitoringa v okviru Morske strategije. V okviru MEDPOL so bile tudi organizirane medlaboratorijske primerjave za spektrofotometrično metodo, enako so bile organizirane medlaboratorijske primerjave za določanje metalotioneinov v ribah pod

okriljem BEQUALM (OSPAR, 2013). Rezultati metod med sabo niso primerljivi (spektrofotometrična metoda daje na istih vzorcih previsoke ali prenizke rezultate). Za spektrofotometrično metodo še niso narejeni kriteriji za ekološko vrednotenje koncentracije metalotioneinov (metoda je bila vključena v delavnico organizirano v okviru PERSEUS ("Biochemical biomarker techniques for the assessment of pollution effects in marine organisms").

Dopolnilni dejavniki

V nekaterih študijah so ugotovili sezonsko spreminjanje koncentracije metalotioneinov v tkivih glede na razmnoževalni cikel (Geffard *in sod.*, 2005; Raspor *in sod.*, 2004; Zorita *in sod.*, 2007b), zato je potrebno vzorčiti vedno ob istem času.

1.15.5.6 Biomarkerji oksidativnega stresa

Delovanje onesnažil pogosto sproži nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti in kadar njihova koncentracija preseže obrambne sposobnosti celice nastane oksidativni stres, ki vodi v škodljive posledice (peroksidacija lipidov, poškodbe proteinov in DNA). Najpomembnejši encimi, ki se odzovejo na oksidativni stres so superoksid dismutaza, glutation-S-transferaze, katalaza (Orbea *in sod.*, 2002b; Regoli *in sod.*, 2002; Geret *in sod.*, 2002; Orbea in Cajaraville, 2006). Merjenje encimske aktivnosti katalaze, glutation-S-transferaze, superoksid dismutaze je pogosto v različnih programih biomonitoringa v ribah in v školjkah (Romeo *in sod.*, 2000, Romeo *in sod.*, 2003a,b). Zanje je značilno, da se njihova aktivnost ob onesnaženju poveča, nato pa sledi upad aktivnosti zaradi povečanega katabolizma in/ali inhibicija zaradi neposrednega toksičnega delovanja kemikalij na encimske molekule. Uporaba teh biomarkerjev je vedno v povezavi z biomarkerji splošnega stresa (stabilnost lizoskih membran in kopičenjem lipofuscina) in omogoča bolj integrirano interpretacijo učinkov onesnažil (Viarengo *in sod.*, 2007).

Predlagamo, da se v nabor biomarkerjev vključi tudi merjenje encimske aktivnosti katalaze, glutation-S-transferaze, superoksid dismutaze in tiobarbituratni test (TBARS) za peroksidacijo lipidov.

Klapavice vzorčimo kot je opisano v poglavju 1.15.4, odvezamemo prebavno žlezo jo takoj globoko zamrzujemo. Iz tkiva kasneje pripravimo homogenat in ga centrifugiramo. Meritve encimov opravimo v supernatantu.

Aktivnost glutation-S-transferaze merimo ob prisotnosti 1-kloro-2,4-dinitrobenzena in substrata glutationa pri 340 nm. Rezultat izrazimo v nmolih nastalega reduciranega glutationa/min/mg proteinov (Habig in Jacoby, 1981, Mc Farland *in sod.*, 1999).

Katalaza omogoči razgradnjo H_2O_2 in v encimskem testu dodamo encimskemu ekstraktu znano koncentracijo substrata ter nato 2 minuti merimo razgradnjo H_2O_2 pri 240nm. Aktivnost izrazimo v μ mol razgrajenega H_2O_2 /min/mg proteinov (Cohen *in sod.*, 1996).

TBARS test temelji na reakciji med 2-tiobarbituratno kislino (TBA) in malonaldehidom, pri čemer nastane obarvan produkt, njegov nastanek merimo pri 530nm.

Aktivnost superoksid dismutaze merimo z kolorimetrično metodo, kjer določimo 50% inhibicijo superoksid dismutaze. Absorbanco merimo pri 440nm in je proporcionalna koncentraciji superoksidnega aniona.

Metode še nimajo ovrednotenega razpona naravnih vrednosti (katalaza in glutation-S-transferaza sta bili vključeni v delavnico v okviru projekta PERSEUS, namen je bil ugotoviti njihovo aktivnost na različnih geografskih območjih v Sredozemskem morju).

1.16 Onesnaževala v ribah in drugi morski hrani

1.16.1 Uvod

Tudi za potrebe načrtovanja programa monitoringa v okviru deskriptorja 9 smo do sedaj obdelali dosegljive podatke (poročila, strokovni in znanstveni članki, še neobjavljeni rezultati) o koncentracijah onesnaževal v organizmih. Dodatno smo opravili še nekatere analize, predvsem za onesnaževala, ki do sedaj niso bila kaj dosti obdelana. Podatki dosedanjega monitoringa so bolj skromni, saj se v večji meri nadzira kakovost morskih organizmov v ribarnicah in trgovinah. Menimo, da je po tem deskriptorju pomembno spremljanje morskih organizmov, ki so ulovljeni v našem morju, poleg tega pa so to tudi rezidentne vrste in živijo stalno v našem morju. V nadaljevanju podajamo predlog možnih vrst za spremljanje po deskriptorju 9.

1.16.2 Izbira organizmov

Za spremljanje v okviru tega deskriptorja predlagamo najprej školjke užitne klapavice (*Mytilus galloprovincialis*) na treh naših školjčičih na Debelem rtiču, v Strunjanu in Seči. Tako bi združili spremljanje pod deskriptorjema 8 in 9. V primeru rib podajamo možen izbor vrst, ki so istočasno rezidenčne in pomembne v prehrani ljudi. Gre bolj za bentoške vrste, ker pelaške ribe bolj migrirajo in so zato manj primerne za spremljanje. V razmislek dajemo še izbor morske bogomoljke, saj so opravljene dodatne analize nakazale, da bi bila to lahko primerna vrsta za spremljanje. Tako predlagamo naslednje vrste:

- morski list (*Solea solea*)
- brancin (*Morone labrax*)
- cipel (*Mugil cephalus*)
- orada (*Sparus auratus*)
- sipa (*Sepia officinalis*)
- morska bogomoljka (*Squilla mantis*).

1.16.3 Določanje nabora onesnaževal za spremljanje

V tem primeru mora biti nabor onesnaževal skladen z Uredbama komisije EU 1881/2006 in 1259/2011.

1.16.4 Čas in frekvenca vzorčenja

Vzorčenje školjk poteka dvakrat letno, usklajeno z vzorčenjem v okviru deskriptorja 8. Tudi za druge organizme predlagamo vzorčenje dvakrat letno.

1.16.5 Metoda vzorčenja

Vzorčenje organizmov mora potekati v skladu s protokolom vzorčenja, ki mora biti del sistema kakovosti. Na školjčičih odvezamo vzorec gojenih školjk, vzorce rib pa bo verjetno najlažje kupiti od lokalnih ribičev.

1.16.6 Laboratorijska obdelava in analiza vzorcev

Laboratoriji, ki izvajajo analize vzorcev, morajo uporabiti ustrezne postopke priprave vzorca in ustrezne analizne metode, glede na vrsto onesnaževal. Zagotavljati morajo ustrezno kakovost dela.

1.17 Habitatni tip - kamniti mediolitoral v povezavi s hidromorfološki spremembami

1.17.1 Uvod

Trenutno je poznanih le malo raziskav, ki so obravnavale povezavo med spremenjenostjo bentoške združbe in morfološko spremenjenostjo obalne črte (Benedetti-Cecchi *in sod.*, 2001; Chapman, 2003; Chapman in Bulleri, 2003; Hiscock *in sod.*, 2005; Kalkan *in sod.*, 2007). Zato v sklopu implementacije Vodne direktive zaključujemo razvoj metodologije za vrednotenje hidromorfološke spremenjenosti kamnite morske obale na podlagi bentoških nevretenčarjev. V tem poročilu podrobno predstavljamo metodologijo vzorčenja in laboratorijske obdelave vzorcev.

V letu 2014 bomo predlog programa spremljanja stanja dopolnili z metodologijo za vrednotenje stanja okolja, saj v teh mesecih nadgrajujemo indeks BIRS (Orlando-Bonaca *in sod.*, 2012b) in pripravljamo metodologijo razvrščanja v razrede ekološkega stanja. Nadalje bo potrebna validacija indeksa in sistema razvrščanja, za katero je predvideno vzorčenje na petih mestih vzorčenja v treh pasovih. Zato trenutno ne bomo še podali predloga mest vzorčenja za program spremljanja stanja.

Habitatni tip kamniti mediolitoral je uporaben za vrednotenje stanja po deskriptorjih D1, D2 in D6.

1.17.2 Čas in frekvenca vzorčenja

Vzorčenje mora potekati maja / junija, torej ob koncu pomladi / začetku poletja, pred pričetkom kopalne sezone, ki bi lahko motila tako vzorčenja kot sam razvoj bentoške združbe na nekaterih izbranih odsekih obale. Vzorčenje mora potekati vedno ob plimi, saj se tako pridobi podatke tudi o aktivnih mediolitoralnih vrstah (npr. raki).

Frekvenca vzorčenja: predlagamo, da se vzorči vsaj 2x v 6 letnem ciklusu.

1.17.3 Metoda vzorčenja

Vzorčenje mora biti razdeljeno na tri horizontalne pasove. Prvi pas zavzema zgornji mediolitoral, drugi spodnji mediolitoral, tretji pa zgornji infralitoral. Vsi trije pasovi so potrebni za pravilno oceno stanja.

Širina pasov se spreminja glede na abiotske dejavnike, ki vplivajo na posamezno postajo. Zato se pasove med seboj razlikuje na podlagi indikatorskih organizmov za posamezen pas (Pérès in Gamulin Brida, 1973; Bellan-Santini *in sod.*, 2002).

V mediolitoralalu vzorčimo z metodo kvadrata. Okvir 20 cm x 20 cm (400 cm²) velja za minimalno površino vzorčenja za sredozemske združbe (Bellan-Santini, 1969; Montesanto in Panayotidis, 2001).

V infralitoralalu vzorčimo z okvirjem 20 cm x 20 cm ter s sorbono oz. zračno črpalko.

V vsakem horizontalnem pasu poberemo pet vzorcev oz. paralelk (Chapman in Bulleri, 2003; Bianchi *in sod.*, 2003). torej 15 vzorcev na vsakem mestu vzorčenja.

Terenski postopek:

Pred vzorčenjem s pregledom značilnih sesilnih organizmov za posamezno biocenozo določimo širino zgornjega in spodnjega mediolitorala. Zgornji infralitoral vzorčimo do 1 m globine pod spodnjo mejo mediolitorala. Rezultate meritev zapišemo na terenski list. Na površini, ki je široka toliko kot posamezni pas in dolga 10 m, naključno poberemo 5 vzorcev. Abiotski in biotski substrat upoštevamo kot dve različni plasti.

Ob postavitvi okvirja za vzorčenje posnamemo notranjost okvirja. Če je pokrovnost biološkega materiala zanemarljiva oz. nizka, ocenimo delež pokrovnosti anorganskih substratov pred vzorčenjem (preden premikamo skale in kamne).

Vzorčimo po naslednjem postopku:

- V mediolitoralalu z zidarsko lopatico in geološkim klavivom ves organski material odstranimo s površine in shranimo v plastični vrečki ali gosti mreži (ustrezno označeni).
- V infralitoralalu znotraj okvirja 20 cm x 20 cm z zračno črpalko posesamo vse vagilne organizme. Nato s strgalom postrgamo še vse pritrjene organizme in ponovno posesamo z zračno črpalko. Odstranjeni material ujamemo v najlonsko mrežico, pritrjeno

na koncu cevi zračne črpalke. Po zaključku sesanja, najlonsko mrežico zavežemo in spravimo v plastično vrečko.

Po vzorčenju ponovno posnamemo stanje znotraj okvirja. Pri vzorcih z visoko pokrovnostjo biološkega materiala ovrednotimo delež pokrovnosti anorganskih substratov po vzorčenju (vsota deležev mora biti enaka 100 %). Dejavniki so prirejeni po Larssonneuru (1977 v: Unep, 1998):

- Sestava anorganskega substrata (beton; les; skale (> 2 m; 1 m – 2 m; 0,50 m – 1 m); kamni (10 cm – 50 cm; 2 cm – 10 cm); kamenčki (0,2 cm – 2 cm); pesek (0,05 mm – 2 mm); mulj in glina (< 0,05 mm).

Pokrovnosti izračunane na terenu dodatno preverimo in popravimo s pomočjo analize fotoposnetkov v laboratoriju.

Obdelava vzorca na terenu:

- Organizme odstranimo iz večjih delov substrata, ki jih bomo pustili na terenu (skale, kamni, les, itd.). Kamenčke pregledamo v laboratoriju. V primeru, da je na podlagi pesek, ga pobere le 1 cm globoko.
- Manjše in nežne organizme, ki bi se v večjem kupu poškodovali (npr. goli polži), shranimo v ločeno posodo ali vrečko.
- Večje organizme, ki jih lahko določimo in preštujemo na terenu, popišemo in vrnemo v naravno okolje.
- Vzorce shranimo v formalinu (4 % končna koncentracija formaldehida) ali v 96 % etanolu (končna koncentracija 70 %) in ustrezno označimo.

1.17.4 Laboratorijska obdelava vzorcev

V laboratorijih iz konzerviranih vzorcev speremo konzervirno sredstvo skozi sito 1 mm, nato pa vsebino razprostrimo po banjicah. Iz posameznega vzorca organizme izločimo in po širših taksonomskih skupinah razvrstimo. Upoštevamo samo tiste organizme, za katere smo prepričani, da so bili ob vzorčenju še živi. Tako razvrščene organizme oz. skupine

ponovno shranimo v etanolu. Na etikete napišemo podatke o mestu vzorčenja in zaporedni številki vzorca.

Pri nadaljnjem določanju organizmov praznih lupin polžev, školjk in mnogoščetincev ne upoštevamo. S pomočjo določevalnih ključev in binokularne lupe določamo organizme do najnižje možne taksonomske kategorije.

Za makrozoobentos nato izračunamo abundanco taksonov v vzorcu, z izjemo kolonijskih mahovnjakov (Bryozoa) in spužev (Spongiaria), kjer izračunamo pokrovnost na kvadratu 20 cm x 20 cm.

Določanje postranic (Amphipoda) se je izkazalo za izjemno težavno in zamudno. Zato smo se odločili, da postranice ne uporabimo pri nadaljnjem razvoju metodologije za oceno stanja.

1.18 Habitatni tip - sedimentni mediolitoral v povezavi s hidromorfološkimi spremembami

1.18.1 Uvod

V sklopu implementacije Vodne direktive smo v prejšnjih letih začeli tudi z razvojem metodologije za oceno spremenjenosti strukture in stanja obrežnega pasu zaradi izgradnje objektov in drugih antropogenih posegov na sedimentnem dnu na podlagi bentoških nevretenčarjev. V teh mesecih potekajo zadnje faze razvoja metodologije za vrednotenje hidromorfološke spremenjenosti sedimentne morske obale na podlagi bentoške združbe. V tem poročilu podrobno predstavljamo metodologijo vzorčenja in laboratorijske obdelave vzorcev.

V letu 2014 bomo predlog programa spremljanja stanja dopolnili in dodali metodologijo za vrednotenje stanja okolja, čim bo zaključen razvoj indeksa (po enakem principu, kot je bil narejen za kamnito dno) in bo pripravljena metodologija razvrščanja v razrede ekološkega stanja. Nadalje bo potrebna validacija indeksa in sistema razvrščanja, za katero je predvideno vzorčenje na petih mestih vzorčenja v treh pasovih. Zato trenutno ne bomo še podali predloga mest vzorčenja za program spremljanja stanja.

Habitatni tip sedimentni mediolitoral je uporaben za vrednotenje stanja po deskriptorjih D1, D2 in D6.

1.18.2 Čas in frekvenca vzorčenja

Vzorčenje mora potekati maja / junija, torej ob koncu pomladi / začetku poletja, pred pričetkom kopalne sezone, ki bi lahko motila tako vzorčenja, kot sam razvoj bentoške združbe na nekaterih izbranih odsekih obale. Vzorčenje mora potekati vedno ob plimi, saj se tako pridobi podatke tudi o aktivnih mediolitoralnih vrstah (npr. raki).

Frekvenca vzorčenja: predlagamo, da se vzorči vsaj 2x v 6 letnem ciklusu.

1.18.3 Metoda vzorčenja

Vzorčenje naj bo razdeljeno na tri horizontalne pasove. Prvi pas zavzema zgornji mediolitoral, drugi spodnji mediolitoral, tretji pa zgornji infralitoral. Vsi trije pasovi so potrebni za pravilno oceno stanja.

Širina pasov se spreminja glede na abiotske dejavnike, ki vplivajo na posamezno postajo. Zato se pasove med seboj razlikuje na podlagi indikatorskih organizmov za posamezen pas (Pérès in Gamulin Brida, 1973; Bellan-Santini *in sod.*, 2002).

Vzorčimo z metodo box-korerja na sedimentnem dnu in z metodo kvadrata iste velikosti na kamnitem dnu. Okvir 20 cm x 20 cm (400 cm²) velja za minimalno površino vzorčenja za sredozemske združbe (Bellan-Santini, 1969; Montesanto in Panayotidis, 2001).

V vsakem horizontalnem pasu poberejo pet vzorcev oz. paralelk (Chapman in Bulleri, 2003; Bianchi *in sod.*, 2003), torej 15 vzorcev na vsakem mestu vzorčenja.

Terenski postopek:

Pred vzorčenjem s pregledom značilnih sesilnih organizmov za posamezno biocenozo določimo širino zgornjega in spodnjega mediolitorala. Zgornji infralitoral vzorčimo do 1 m globine pod spodnjo mejo mediolitorala. Rezultate meritev zapišemo na terenski list. Na površini, ki je široka toliko kot posamezni pas in dolga 10 m, naključno poberejo 5 vzorcev. Abiotski in biotski substrat upoštevamo kot dve različni plasti.

Ob postavitvi okvirja za vzorčenje na kamnitem dnu posnamemo notranjost okvirja. Če je pokrovnost biološkega materiala zanemarljiva oz. nizka, ocenimo delež pokrovnosti anorganskih substratov pred vzorčenjem (preden premikamo skale in kamne).

Vzorčimo po naslednjem postopku:

- Na sedimentnem dnu z box-korerjem poberejo sediment (velikost: 20 cm x 20 cm x 10 cm). Na trdi podlagi z zidarsko lopatico in geološkim kladivom ves organski material odstranimo s površine in shranimo v plastični vrečki ali gosti mreži (ustrezno označeni).

Po vzorčenju ponovno posnamemo stanje znotraj okvirja na kamnitem dnu. Pri vzorcih z visoko pokrovnostjo biološkega materiala ovrednotimo delež pokrovnosti anorganskih substratov po vzorčenju (vsota deležev mora biti enaka 100 %). Dejavniki so prirejeni po Larssonu (1977 v: Unep, 1998):

- Sestava anorganskega substrata (beton; les; skale (> 2 m; 1 m – 2 m; 0,50 m – 1 m); kamni (10 cm – 50 cm; 2 cm – 10 cm); kamenčki (0,2 cm – 2 cm); pesek (0,05 mm – 2 mm); mulj in glina (< 0,05 mm).

Pokrovnosti izračunane na terenu dodatno preverimo in popravimo s pomočjo analize fotoposnetkov v laboratoriju.

Obdelava vzorca na terenu:

- Pri vzorcih nabranih na sedimentnem dnu spiranje poteka takoj po vzorčenju, na raziskovalnem plovilu. Skozi sito 0,5 mm z morsko vodo speremo sediment in organski material takoj shranimo v 96 % etanolu (končna koncentracija 70 %) ter ustrezno označimo.
- Pri vzorcih nabranih na trdi podlagi organizme odstranimo iz večjih delov substrata, ki jih bomo pustili na terenu (skale, kamni, les, itd.). Kamenčke pregledamo v laboratoriju. V primeru, da je na podlagi pesek, ga pobremo le do 1 cm globoko. Vzorce shranimo v 96 % etanolu (končna koncentracija 70 %) in ustrezno označimo.
- Manjše in nežne organizme, ki bi se v večjem kupu poškodovali (npr. goli polži), shranimo v ločeno posodo ali vrečko.
- Večje organizme, ki jih lahko določimo in preštejemo na terenu, popišemo in vrnemo v naravno okolje.

1.18.4 Laboratorijska obdelava vzorcev

V laboratorijih iz konzerviranih vzorcev speremo konzervirno sredstvo skozi sito 1 mm nato pa vsebino razprostrimo po banjicah. Iz posameznega vzorca organizme izločimo in po širših taksonomskih skupinah razvrstimo. Upoštevamo samo tiste organizme, za katere smo prepričani, da so bili ob vzorčenju še živi. Tako razvrščene organizme oz. skupine ponovno shranimo v etanolu. Na etikete napišemo podatke o mestu vzorčenja in zaporedni številki vzorca.

Pri nadaljnjem določanju organizmov praznih lupin polžev, školjk in mnogoščetincev ne upoštevamo. S pomočjo določevalnih ključev in binokularne lupe določamo organizme do najnižje možne taksonomske kategorije.

Za makrozoobentos nato izračunamo abundanco taksonov v vzorcu, z izjemo kolonijskih mahovnjakov (Bryozoa) in spužev (Spongiaria), kjer izračunamo pokrovnost na kvadratu 20 cm x 20 cm.

Določanje postranic (Amphipoda) se je izkazalo za izjemno težavno in zamudno. Zato smo se odločili, da postranice ne uporabimo pri nadaljnjem razvoju metodologije za oceno stanja.

1.19 Habitatni tip – kamniti infralitoral

1.19.1 Uvod

Na območju severnega Jadrana je le malo znanega o ekoloških kazalcih, ki bi lahko opredelili stanje skalnatega dna. Zato smo se pri raziskavi možnih dejavnikov, ki bi jih lahko uporabili za opredelitev stanja v slovenskem morju, naslonili na razpoložljiva lastna vzorčevanja in na tak način pridobljene izkušnje. Za opredelitev stanja kamnitega infralitorala je potrebno vzorčiti v obrežnem okolju, kjer je dobro razvita biocenoza fotofilnih alg, saj izhajamo iz predpostavke, da je obraščeno dno normalno stanje, nerazrasle površine pa so posledice določenih naravnih ali antropogenih dejavnikov. Med prve lahko prištevamo populacijske eksplozije določenih rastlinojedih morskih živali kot so npr. črni morski ježki (*Paracentrotus lividus*), med druge pa posledice antropogenih vplivov od sidranja, kočarjenja, onesnaževanja okolja in drugih. Biocenoza fotofilnih alg, ki je značilna in razširjena infralitoralna biocenoza, je med najbogatejšimi življenjskimi okolji v Sredozemskem morju. Tudi v slovenskem delu Jadranskega morja je razširjena v velikem obsegu, predvsem v zgornjem infralitoralu (Lipej *in sod.*, 2006). Poleg biocenoze fotofilnih alg najdemo v infralitoralu kamnitega dna še nekatere druge pomembne biocenoze, med katerimi je še posebej zanimiv prekoraligen, ki je bil še nedavno ovrednoten kot inicialni stadij koraligenske biocenoze, novejša spoznanja in usklajevanje severnojadranskih strokovnjakov, pa so pokazala, da je upravičeno opredeljevati prekoraligen kot pravo koraligensko biocenozo.

Za opredelitev ekološkega stanja kamnitega infralitorala smo izbrali kombinacijo ekoloških dejavnikov, ki po našem mnenju ključno vpliva na kvaliteto danega okolja na obravnavanem območju.

V zvezi s tem smo poskusno razvili indeks (glej Orlando Bonaca *in sod.*, 2012a), ki vključuje tri ekološke dejavnike in sicer prostorsko heterogenost, vegetacijski pokrov in gostoto ribjih združb.

Habitatni tip kamniti infralitoral je uporaben za vrednotenje stanja po deskriptorjih D1, D2, D5 in D6.

1.19.2 Izbira in velikost mesta vzorčenja

Vzorčenje kamnitega infralitorala se izvaja na skalnatem dnu. Na vsakem mestu vzorčenja postavimo dva vertikalna transekta (med njima naj bo 150 m razdalje). Velikost posameznega transekta obsega 100 m² na levo in 100 m² na desno merilnega traka. Seznam mest vzorčenja je predstavljen v Tabeli 1.19.1.

Tabela 1.19.1: Predlog mest vzorčenja za kamniti infralitoral.

Mesto vzorčenja	Zemlj. širina (N)	Zemlj. dolžina (E)
DR5	45°35.457'	13°42.028'
Sve1	45°32.532'	13°39.339'
RR2	45°32.401'	13°36.901'
Pa3	45°31.597'	13°35.294'
Fi3	45°31.579'	13°34.713'
PP5	45°31.854'	13°33.959'

Vzorčenje izvedemo v naslednjih habitatnih tipih, skladno z EUNIS razvrstitvijo habitatov (EEA, 2004):

A3.2 Kamniti infralitoral zmerno izpostavljen valovanju in/ali tokovanju in plimovanju;

A3.3 Kamniti infralitoral zaščiten pred valovanjem in/ali tokovanjem in plimovanjem.

1.19.3 Čas in frekvenca vzorčenja

Vzorčenje mora potekati v poletnih mesecih in sicer julija ali avgusta. Potekati mora v dopoldanskih urah, najbolje med 9. in 12. uro, pred začetkom maestrala. Predlagamo vzorčenje 1 x letno.

Vzorčenje je potrebno načrtovati v skladu z vidljivostjo; če je ta preslaba, je potrebno vzorčenje prestaviti na primernejši dan, ko se razmere izboljšajo.

1.19.4 Metoda vzorčenja

Za opredelitev pestrosti habitatnih tipov v kamnitem infralitoralu uporabljamo nedestruktivne tehnike opazovalnih cenzur, saj lahko tako vzorčujemo tudi znotraj zavarovanih območij. V ta namen je najbolj primerna metoda vertikalnega transekta, ki je pravokoten na obalo. Za opravljanje tovrstnih metod so potrebni izkušeni potapljači, ki so večji uporabljaja podvodne videokamere in dobro poznajo obrežno ribjo združbo.

Za vertikalni transekt uporabimo 100 m merilnega traka na vodoodpornem nosilcu. Raztegnemo ga od obrežja do 100 m oddaljenosti, pravokotno na obalo. Pri tem poskrbimo, da je vzorčevalni meter karseda napet. Na koncu transekta nosilec metra zasidramo s kovinskim klinom ali obtežimo s kamni. Nato začnemo s popisom ribje favne vedno na desni strani merilnega traka, kjer popisujemo vse ribe na razdalji do 1 m. Čeprav smo za biološki element izbrali ribe iz družine ustnač, na transektu popišemo primerke vseh vrst rib. Na tak način dobimo poleg željene gostote različnih vrst ustnač tudi gostoto vseh ribjih vrst na transektu. Plavamo s konstantno hitrostjo tik nad dnom. Časovni potek popisa enega transekta je odvisen od strukturiranosti habitatnih tipov, ki si sledijo vzdolž transekta. Običajno opravimo vertikalni transekt v 15 do 25 minutah. Ko pridemo do konca transekta ponovimo popis ribje združbe še enkrat, na drugi strani merilnega traku, tokrat v smeri proti obali. Po opravljenem popisu rib sledi popis habitatnih in mikrohabitatnih tipov, ki jih potapljač vzdolž transekta popiše v potapljaško beležnico. Nato drugi potapljač z videokamero posname sosledje habitatnih in mikrohabitatnih tipov na transektu. Na tak način opredelimo transekt z vidika dominantnih vegetacijskih in habitatnih tipov.

Za popis obrežne ribje favne moramo opraviti 2 vertikalna transekta (med njima naj bo 150 m razdalje) v obe smeri, skupno torej 4 transekte na vsakem mestu vzorčenja.

Za popis habitatnih in mikrohabitatnih tipov ter posnetek sosledja habitatnih tipov z videokamero je potrebno opraviti celoten dolžinski transekt enkrat (samo v eno smer).

1.19.5 Laboratorijska obdelava vzorcev

Originalne videozapise uredimo in opremimo z ustreznimi označbami. Posnetke pregledamo na monitorju ali TV sprejemniku in določimo ter popišemo vse habitatne tipe. Na tak način dobimo zapis o sosledju različnih makrohabitatnih tipov (biocenoza fotofilnih alg, različne asociacije, prekorališki stadiji in druge oblike trdnega dna) in

mikrohabitatnih tipov (različni tipi posameznega makrohabitatnega tipa, npr. pas goste cistozire, balvani s cistoziro, prekoraligenske skale, itd).

Makrohabitatne tipe geografsko opredelimo s pomočjo računalniškega GIS programa Manifold System. Pri tem s pomočjo digitalnih ortofoto posnetkov (DOF) 100 m pasu obalne črte, določimo izhodiščne točke izmerjenih profilov, na katerih je bilo pod vodo posneto naravno okolje. Nato iz globin in pridnenih razdalj med mejnimi točkami posameznega makrohabitatnega tipa izračunamo ustrezne razdalje na površini morja in jih vrišemo na DOF posnetke.

Prostorska heterogenost

Na podlagi pregleda filmskih zapisov dobimo podatke o prostorski heterogenosti. Prostorsko heterogenost dobimo, ko preštejemo vse mikrohabitatne tipe vzdolž linearnega transektu. Pri tem upoštevamo prav vsak preskok iz enega v drugi mikrohabitat, ne glede na dejstvo, če se je določen mikrohabitat na transektu večkrat pojavljal. Hipotetično je možno (ob dejstvu, da smo za arbitrarno enoto najmanjšega mikrohabitata določili 1 m), da na 100 m linearnem transektu dosežemo največjo vrednost prostorske heterogenosti, ki potemtakem znaša 99. V okolju, kjer je prostorska heterogenost nizka, je vegetacijska odeja običajno enolična, v okolju, kjer pa je prostorska heterogenost visoka, lahko pričakujemo veliko število preskokov iz enega v drugi mikrohabitatni tip. Na podlagi velikega števila analiziranih vertikalnih transektov smo določili vrednost 50 preskokov kot zgornjo mejo možne prostorske heterogenosti na transektu. Ker poskušamo opredeliti samo kamniti infralitoral, upoštevamo samo tiste dele transektu, ki so bili na kamnitem dnu, oziroma dolžino transektu do točke, kjer se je zadnjič pojavil katerikoli tip kamnitega mikrohabitata na transektu.

Vegetacija

Pestrost in pokrovnost vegetacije na transektih dobimo na podlagi pregleda filmskih zapisov in podatkov, ki so jih zapisali potapljači. Vsem različnim vegetacijskim tipom na transektu dodelimo ustrezno oceno stanja na podlagi klasifikacije, ki je prikazana v Tabeli 1.19.2. Klasifikacijski sistem za vegetacijo smo razvili na podlagi podatkov o vseh znanih tipov vegetacijskega pokrova v slovenskem morju in v sodelovanju s specialisti iz tržaške Univerze (glej Orlando-Bonaca in sod., 2012a).

Tabela 1.19.2: Ocena stanja vegetacije v mikrohabitatskih tipih v infralitoralju.

Mikrohabitatski tip	Ocena stanja
Pk_g – prekoraligenska polica	20
Cy₃ – zelo gosta cistozira (> 66% pokrovnosti)	20
Cy₆ – veliki balvani, pokriti s cistoziro	20
Ps₁ – travnik pozejdonke	20
Ps₀ – šopi pozejdonke	18
Cy₂ – gosta cistozira (< 66% pokrovnosti)	18
Cy₁ – redka cistozira (< 33% pokrovnosti)	16
Cy₅ – dominantna vrsta <i>Halopithys incurva</i>	16
Cy₄ – dominantna vrsta <i>Padina pavonica</i> od 3,5 m globine dalje	14
Cy₇ – dominantna <i>Alsidium corallinum</i>	14
Cn₀ – cimodoceja nastopa v posameznih šopih	15
Cn₁ – redka cimodoceja (< 33% pokrovnosti)	14
Cy₄ – dominantna vrsta <i>Padina pavonica</i> do 3,5 m globine	13
Cn₂ – gosta cimodoceja (< 66% pokrovnosti)	13
Cn₃ – zelo gosta cimodoceja (> 66% pokrovnosti)	12
Cy₀ – dominantna <i>Dictyopteris polypodioides</i>	10
K₅ . Pas teras iz peščenjaka (K₅) in TURF	10
K₄ . Pas alohtonih balvanov apnenca	10
K₃ . Pas skal in balvanov in TURF	10
K₂ . Pas golih ali s spužvami zaraslih kamnov	10
K₁ - Pas drobnih kamnov	10
P₁ . peščine	10
P₂ - peščine z drobnimi kamni	10
P₃ . peščine z organskim drobitjem	10
P₀ . Pas mivke	8
Ulva	6
Actinaria - pas vlasulje	4

Gostota obrežne ribje favne

Na podlagi pregleda rezultatov prek 100 opravljenih paralelnih in vertikalnih transektov (Orlando-Bonaca in sod., 2012a) smo ugotovili, da je med ustnačami kosirica (*Symphodus roissali*) najboljša indikatorska vrsta rib za kamniti infralitoral. Zato za izračun indeksa za oceno stanja kamnitega infralitorala upoštevamo le podatke o povprečni gostoti kosiric na 100 m² vertikalnega transekta.

1.19.6 Izračun indeksa za opredelitev stanja kamnitega infralitorala

Vstopni podatki, ki jih potrebujemo za izračun indeksa **I_{HT}** za oceno stanja habitatnih tipov na kamnitem infralitoralu so: povprečna ocena stanja vegetacije na dolžinskem transektu (glede na relativno površino v %, ki jo posamezni vegetacijski tip obsega), povprečna vrednost prostorske heterogenosti, ki ustreza številu preskokov iz enega habitatnega tipa v drugi na dolžini transekta ter povprečna vrednost gostote kosiric na celotni dolžini opravljenega transekta.

Pri začetni presoji smo pri razvoju indeksa vsakemu od treh dejavnikov pripisali enako težo (Orlando-Bonaca in sod., 2012a). Nadaljnje testiranje je pokazalo, da si ekološki dejavniki med seboj niso enakovredni. Gostota kosiric in ocena vegetacije sta se izkazala kot bolj pomembna dejavnika v primerjavi s prostorsko heterogenostjo. Pri tej namreč upoštevamo vse preskoke habitatnih (in mikrohabitatnih) tipov ne glede na to, ali se določeni mikrohabitatni tipi pojavljajo v enem ali več primerih. Zato je v primerih pogoste izmenjave manjšega števila habitatnih tipov možna napaka. Zato smo se odločili, da damo največjo težo gostoti rib, saj le-ta temelji na direktnem zbiranju podatkov, medtem ko gre pri vegetaciji za (sicer na podlagi stroke) preverjeno oceno, ki jo vsakemu vegetacijskemu tipu pripišemo. V Tabeli 1.19.3 so navedene uteži za vsak ekološki dejavnik, ki ga upoštevamo za izračun indeksa **I_{HT}**.

Tabela 1.19.3: Uteži za tri ekološke dejavnike, ki se uporabljajo za izračun Indeksa za oceno stanja habitatnih tipov v infralitoralalu I_{HT}

Ekološki dejavnik	Utež
Prostorska heterogenost Ph	0,33
Kakovost vegetacije V	1
Gostota kosirice $\log D_k$	1,2

Indeks I_{HT} izračunamo po spodnji enačbi:

$$I_{HT} = (G_v * [V/\max(V)] + G_{Ph} * [Ph/\max(Ph)] + G_d * [\log D_k / \log(\max D_k)]) / (G_v + G_{Ph} + G_d)$$

kjer je:

G_v = utež za vegetacijo,

V = ocena kakovosti vegetacije na transektu,

$\max(V) = 20$ (maksimalna vrednost kakovosti vegetacije),

G_{Ph} = utež za prostorsko heterogenost,

Ph = ocena kakovosti prostorske heterogenosti na transektu,

$\max(Ph) = 50$ (maksimalna vrednost prostorske heterogenosti),

G_d = utež za gostoto kosiric na 100 m²,

$\log D_k$ = ocena kakovosti gostote kosiric (logaritmirani podatki) na transektu, in

$\log(\max D_k) = \log(40)$ (log maksimalne vrednosti gostote kosiric).

Vrednost indeksa I_{HT} je od 0 do 1, pri čemer pomeni vrednost blizu 0 slabo stanje, vrednost blizu 1 pa odlično stanje.

1.19.7 Uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja

Za uvrstitev mesta vzorčenja v razred ekološkega stanja na podlagi kamnitega infralitorala izračunamo indeks I_{HT} za posamezen transekt in nato izračunamo aritmetično povprečje

vrednosti dobljenih na dveh transektih. Dobljeno vrednost nato primerjamo z mejnimi vrednostmi med razredi ekološkega stanja (Tabela 1.19.4) in uvrstimo mesto vzorčenja v primeren razred.

Tabela 1.19.4: Mejne vrednosti za indeks I_{HT} , po katerih podamo oceno ekološkega stanja kamnitega infralitorala v slovenskem morju.

Razred ekološkega stanja	I_{HT}
Zelo dober	$0,81 \leq I_{HT} \leq 1$
Dober	$0,61 \leq I_{HT} \leq 0,80$
Zmeren	$0,41 \leq I_{HT} \leq 0,60$
Slab	$0,21 \leq I_{HT} \leq 0,40$
Zelo slab	$0 \leq I_{HT} \leq 0,20$

1.20 Habitatni tip – sedimentni infralitoral

Za vrednotenje stanja habitatnega tipa sedimentni infralitoral se upoštevajo ocene stanja treh bioloških elementov. To so: travnik pozejdonke, travniki kolenčaste cimodoceje in bentoški nevretenčarji mehkega dna infralitorala. Za metodologijo vzorčenja, laboratorijske obdelave vzorcev in metodologijo za oceno stanja posameznih bioloških elementov se upoštevajo poglavja 1.3, 1.4 in 1.5.

Za oceno stanja sedimentnega infralitorala na določenem območju se izračuna povprečje ocen stanja posameznih bioloških elementov, ki smo jih na tem območju vrednotili.

Habitatni tip sedimentni infralitoral je uporaben za vrednotenje stanja po deskriptorjih D1, D2, D5, D6, D7 in D8

1.21 Habitatni tip – sedimentni cirkalitoral

Za vrednotenje stanja habitatnega tipa sedimentni cirkalitoral se upošteva ocena stanja bentoških nevretenčarjev mehkega dna cirkalitorala. Za metodologijo vzorčenja in laboratorijske obdelave vzorcev se upošteva poglavje 1.6.

Habitatni tip sedimentni cirkalitoral je uporaben za vrednotenje stanja po deskriptorjih D1, D2, D6, D7 in D8.

1.22 Habitat vodnega stolpca

Za vrednotenje stanja habitatnega tipa vodnega stolpca se upošteva ocena stanja sedmih okoljskih in štirih bioloških elementov (Tabela 1.1.2). Ti so: temperatura, slanost, pH, kisik, hranila, prosojnost, biomarkerji ter fitoplankton, zooplankton, klobučnjaške meduze in mikrobnimi patogeni. Za metodologijo vzorčenja, laboratorijske obdelave vzorcev in metodologijo za oceno stanja posameznih elementov se upoštevajo poglavja 1.9, 1.10, 1.11, 1.12, 1.13.

Habitat vodnega stolpca je uporaben za vrednotenje stanja po deskriptorjih D1, D2, D4, D5, D7 in D8.

2 RAZVOJ METODOLOGIJ ZA SPREMLJANJE OKOLJSKEGA STANJA SLOVENSКИH MORSКИH VODA

2.1 Uvod

Pomemben del projektne naloge je nadaljevanje razvoja metodologij za spremljanje stanja, saj je bilo pri pripravi začetne presoje, definiciji DOS in postavitvi okoljskih ciljev ugotovljeno, da so določene metodologije pomanjkljive, druge pa še popolnoma nerazvite ter neusklajene na pod-regionalnem nivoju.

V obdobju 2013-2015 na MBP-NIB zato nadaljujemo z razvojem metodologij za oceno stanja po deskriptorjih 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 in 9. Naslednja podpoglavja vsebujejo kratke povzetke za delo, ki je potekalo v letu 2013.

2.2 Razvoj metodologije za oceno stanja kamene korale (*Cladocora caespitosa*) – D1

Za oceno stanja sredozemske kamene korale (*Cladocora caespitosa*) smo poleti 2013 testirali različne biometrične indikatorje v smislu njihovega pomena pri poskusu opredelitve ekološkega stanja. V ta namen smo pionirsko testirali biometrične podatke kot so najmanjši in največji premer kolonije, višina kolonije ter premer čaše. Poleg tega smo na več različnih lokalitetah ugotavljali populacijsko gostoto kamene korale na 100m². Izkazalo se je, da so biološke značilnosti kamene korale v največji meri odvisne od določenih ekoloških dejavnikov kot so tokovanje, razpoložljivost svetlobe, hranilne snovi in nekaterih drugih, kot so npr. nekroze na kolonijah zaradi preraščanja z algami, fizičnih poškodb ali drugih dejavnikov.

2.3 Razvoj metodologije za oceno stanja hrustančnic - D1

Ocena stanja hrustančnic je v največji meri odvisna od razpoložljivih podatkov o ulovu oz. prilovu hrustančnic in analize na tak način pridobljenih primerkov. Obenem lahko metodologija temelji le na maloštevilnih vrstah, za katere je znano, da se (danes) v slovenskem morju redno pojavljajo. Metodologija bi v primeru takih vrst temeljila na ugotavljanju velikostne porazdelitve (juvenilni, mladostni primerki, odrasli), spolni strukturi (delež samci: samice) ter deležu in stanju reproduktivnih samic.

Največji problem pri tem elementu je zagotovitev zadostnega števila podatkov za korektno vrednotenje stanja. Ulov hrustančnic v slovenskem morju je prisoten, prav tako pa se hrustančnice pojavljajo kot prilov, vendar pa primernega zbiranja teh podatkov še ni. Potrebno bi bilo povečati komunikacijo z ribiči, ter tako pridobiti potrebne informacije o pojavljanju in pa konkreten material (ribe). Vsaj v času lova na določene vrste hrustančnic in v času, ko sta njihovo pojavljanje in prilov povečana, bi bilo potrebno izvajati direktni monitoring, tako da bi se zagotovila prisotnost raziskovalcev oz. strokovnjakov pri samem dviganju ulova. V sodelovanju z Zavodom za ribištvo bomo v tem smislu vzpostavili sodelovaje z ribiči in pripravili ter začeli izvajati okvirno shemo programa spremljanja stanja hrustančnic.

2.4 Nadaljevanje razvoja metodologije za oceno stanja cirkalitoralnih habitatnih tipov - D1

Nadaljevanje razvoja metodologije za oceno stanja cirkalitoralnih habitatnih tipov je vezano tudi na vrednotenje velikosti pritiskov in njihove umestitve v prostor. V letu 2013 je bila glavnina razvojnega dela osredotočena prav na to, da v prostor umestimo pritiske vezane na ribištvo in pomorski promet velikih ladij. Na podlagi teh rezultatov bomo poskusili dobiti gradient pritiskov, ki ga bomo primerjali z rezultati o stanju bentoške združbe v cirkalitoralu. Na podlagi vrednotenja velikosti in razporeditve pritiskov v prostoru in razporeditve dveh glavnih biocenoz v cirkalitoralu bomo lahko določili najprimernejša območja za vrednotenje stanja in izvajanje programa spremljanja stanja.

2.5 Razvoj metodologije za spremljanje vrstne pestrosti in abundance tujerodnih organizmov in nivoja pritiska na avtohtone vrste in habitate – D2

V letu 2013 smo nadaljevali z zbiranjem podatkov o tujerodnih vrstah, ki se pojavljajo v slovenskem morju. Poleg tega smo ugotovili prisotnost novih tujerodnih vrst, ki se do sedaj niso pojavljale. Za pripravo programa spremljanja stanja še vedno čakamo na kakršnekoli smernice ostalih sredozemskih strokovnjakov. Za tujerodne vrste se nam namreč zdi nesmiselno, da bi vsaka država članica EU pisala program spremljanja stanja brez

sodelovanja/usklajevanja z ostalimi državami regije ali vsaj pod-regije. V kolikor tovrstne smernice v naslednjih mesecih ne bodo podane, bomo program pripravili na podlagi lastnega znanja in presoje.

2.6 Razvoj metodologije za oceno produktivnosti ključnih vrst ali trofičnih skupin in deleža izbranih vrst na vrhu prehranjevalnih spletov na nivoju sub-regije Jadransko morje - D4

1) Za element zooplankton želimo vpeljati metodo določanja glavnih taksonomskih skupin s pomočjo vizualne identifikacije organizmov z Zooscanom. Prednost te pol-avtomatske metode je v hitrejši obdelavi in digitalizaciji vzorcev. Trenutno je v postopku interkalibracija omenjene metode in metode, ki smo se je posluževali do sedaj (določanje organizmov pod optičnim mikroskopom). Do sedaj je bila z Zooscan-om posneta serija vzorcev mrežnega zooplanktona iz leta 2008, vendar rezultati še niso bili ovrednoteni. Pričakujemo, da bomo z interkalibracijo zaključili v letu 2014.

2) V teku je razvoj metodologije za določanje stanja po elementu zooplankton v sklopu D2. V letu 2013 smo določili vrstno sestavo mrežnega zooplanktona v seriji vzorcev, ki pokriva dobrih 6 let (2004-2010). Rezultate bomo podrobno analizirali v 2014.

3) Do sedaj smo okoljsko stanje znotraj D4 ovrednotili zgolj na podlagi dveh ključnih trofičnih skupin: mrežnega (200 μ m) zooplanktona in klobučnjaških meduz. V prihodnje želimo vključiti tudi druge trofične skupine (hrustančnice in epibentoško združbo nevretenčarjev). V naslednjem letu bomo zbrali razpoložljive podatke in pripravili smernice za sistematično pridobivanje manjkajočih podatkov.

2.7 Interkalibracija metode za števničnost/razporeditev ključnih trofičnih skupin/vrst in ovrednotenje stanja na nivoju severnega Jadrana v sodelovanju z drugimi državami - D4

Kljub pozitivnemu pristopu raziskovalcev sosednih držav k pobudi za čezmejno usklajevanje metodologij, uradnega sestanka še ni bilo. Zato smo se raziskovalci inštitutov na obeh straneh Tržaškega zaliva v Sloveniji in Italiji (NIB-MBP, Piran in OGS, Trst) dogovorili o implementaciji spremljanja stanja po elementu klobučnjaške meduze z

uporabo skupnega protokola, ki smo ga razvili v okviru EU FP7 projekta PERSEUS. V okviru tega sodelovanja bomo tudi uskladili spremljanje meduz z uporabo videokamere in programske opreme LabTrack, kar smo že testirali med našim terenskim delom v slanem jezeru južnojadranskega otoka Mljet.

2.8 Pridobitev satelitskih podatkov in preučitev njihove uporabnosti za ocenjevanje koncentracij klorofila a na nivoju subregije – D5

Preučili smo možnost uporabnosti satelitskih podatkov o površinskih koncentracijah klorofila *a* (Chl *a*_sat). Satelitski podatki omogočajo skoraj trenutno (*near real-time*) sliko o porazdelitvi fitoplanktonske biomase na večji prostorski skali, npr. na nivoju subregije Jadranskega morja ali manjše, na nivoju severnega Jadrana. V poročilu podajamo preliminarne rezultate o poskusnem dostopanju do javno dostopnih podatkov o Chl *a*_sat.

Podatke smo pridobili na spletni strani evropskega projekta MyOcean2, ki uporabnikom portala www.myocean.eu omogoča dostop do različnih morskih aplikacij kot so pomorska varnost, morski viri, morsko in obalno okolje ter napovedovanje klime in vremena.

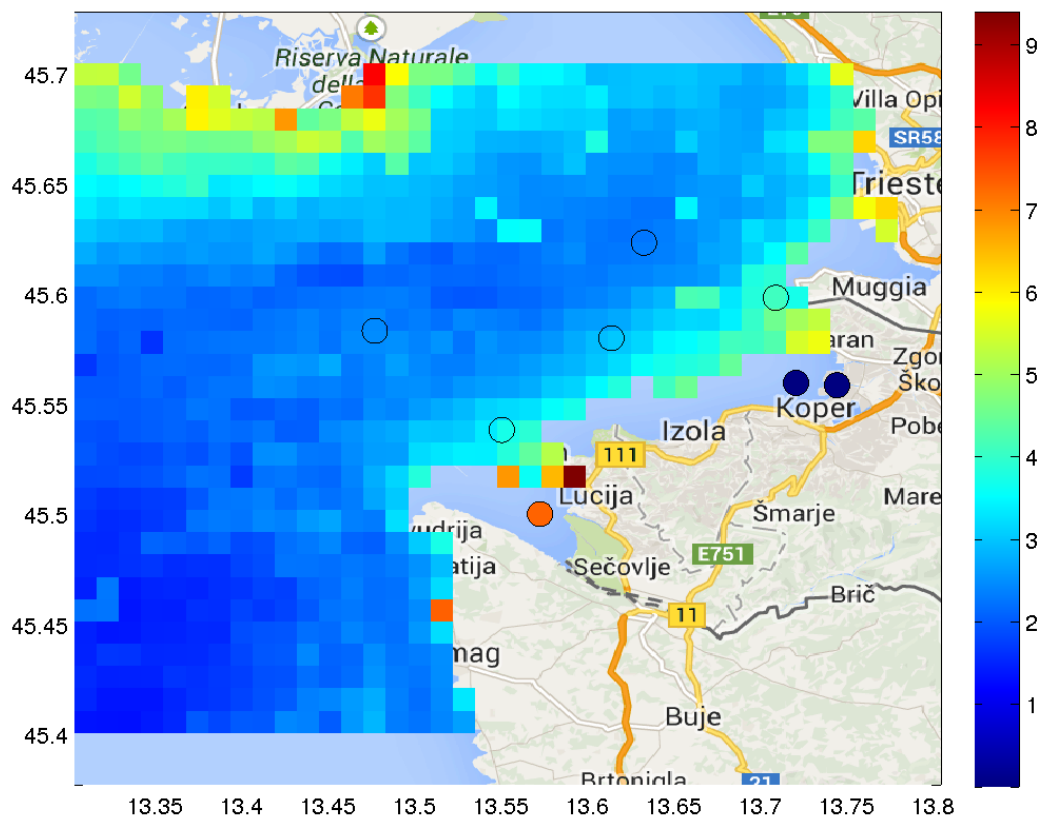
Površinske koncentracije Chl *a*_sat so izmerjene spektrometrično (MODIS merilna naprava) na satelitu Aqua (NASA, EU), ki obide Zemljino površino v enem ali v dveh dnevih. Izbiramo lahko med različnimi produkti – algoritmi za preračunavanje spektrometričnih meritev v koncentracije Chl *a*_sat, dostopnih na strani <http://www.myocean.eu/web/24-catalogue.php>.

Poslužili smo se algoritma, izdelanega za Sredozemsko regijo (GOS-ISAC, CNR Rome): OCEANCOLOUR_MED_CHL_L4_NRT_OBSERVATIONS_009_041 (Mediterranean Sea Monthly and Weekly Interpolated means of Surface Chlorophyll Concentration from Satellite observations), ki ponuja različne podatkovne baze z različno časovno skalo in prostorsko resolucijo.

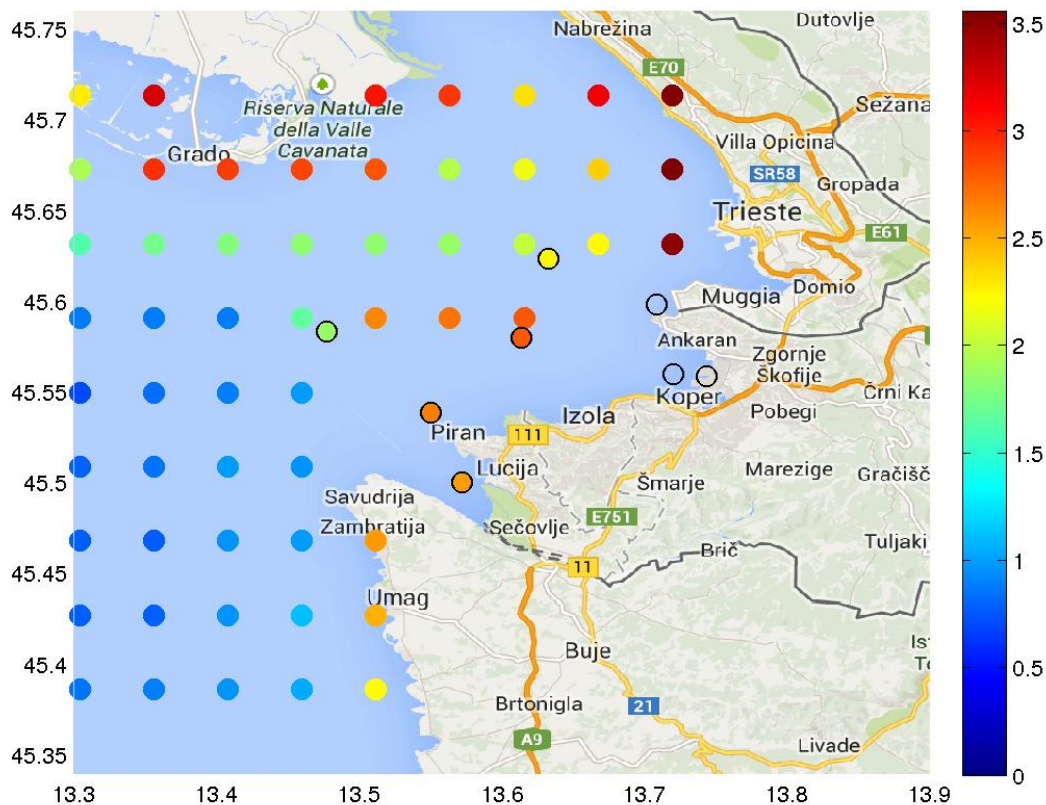
Testirali smo dve varianti:

- 7-dnevni povprečni podatki z resolucijo 1 km: podatkovna baza »dataset-oc-med-chl-modis_a-l4-medoc3_1km_weekly-rt-v01« (Slika 2.8.1),
- Dnevni podatki z resolucijo 4 km: podatkovna baza »dataset-oc-med-chl-modis_a-l4-edoc3dineof_4km_daily-rt-v01« (Slika 2.8.2).

Te rezultate (površinske karte satelitskih koncentracij Chl *a*) smo primerjali s pozicijami obstoječih mest vzorčenja nacionalnega monitoringa in zadnjimi opravljenimi meritvami z analitsko fluorimetrično metodo (18.11.2013).



Slika 2.8.1: Površinska karta satelitsko (MODIS) pridobljenih podatkov o tedenskih površinskih koncentracijah Chl *a* (mg m^{-3}): 7-dnevno povprečje za obdobje 19.11. – 26.11.2013, resolucija meritev $1 \times 1 \text{ km}^2$. Vsi krogi označujejo pozicije mest vzorčenja iz nacionalnega monitoringa ekološkega stanja obalnega morja in spremljanja kakovosti morja v skladu z Barcelonsko konvencijo.



Slika 2.8.2: Površinska karta satelitsko (MODIS) pridobljenih podatkov o dnevni površinski koncentraciji Chl *a* (mg m^{-3}): 20.11.2013, resolucija meritev $4 \times 4 \text{ km}^2$. Krogi s črnim robom označujejo pozicije mest vzorčenja iz nacionalnega monitoringa ekološkega stanja obalnega morja in spremljanja kakovosti morja v skladu z Barcelonsko konvencijo.

V obeh primerih smo satelitske podatke interpolirali na pozicije mest vzorčenja iz nacionalnih monitoringov in dobili vrednosti koncentracij Chl *a*_{sat} prav na teh pozicijah. Na obeh slikah sta iz meritev izpadli postaji v Koprskem zalivu (ERI2 in 000K; temno modra krogca na Sliki 2.8.1), na Sliki 2.8.2 pa še postaja na Debelem rtiču (0DB2) (prazni krogci na Sliki 2.8.2).

Podobno je tudi s pozicijo v Piranskem zalivu (00MA), ki ima sicer na Sliki 2.8.1 numerično vrednost (oranžen krogec), vendar menimo, da je visoka koncentracija na tem mestu ($7,29 \text{ mg m}^{-3}$), ki močno odstopa od ostalih ($2,30 - 3,81 \text{ mg m}^{-3}$), prej posledica napačne interpolacije kot pa dejansko stanje. Ta priobalni pas je (vsaj na teh testnih slikah) izven zajema podatkov s satelitom.

Poleg prostorske pokritosti smo želeli primerjati tudi zanesljivost satelitskih meritev in njihovo morebitno uporabo v bodočih monitoringih namesto časovno zamudnih in dražjih laboratorijskih analiz. Primerjava z laboratorijskimi meritvami koncentracij Chl *a*_lab (18.11.2013) je bila možna samo v primeru dnevni satelitskih meritev (20.11.2013), čeprav z 2-dnevnim časovnim zamikom med obema meritvama. Rezultati kažejo veliko razhajanje (Tabela 2.8.1). Poudariti moramo, da gre le za eno meritev, zato je to le groba primerjava.

Tabela 2.8.1: Primerjava površinskih koncentracij klorofila *a* ($\text{mg m}^{-3} = \mu\text{g L}^{-1}$), izmerjenih s fluorimetrično metodo v laboratoriju (Chl *a*_lab) na postajah nacionalnih monitoringov in s satelitskim zaznavanjem (Chl *a*_sat; dataset-oc-med-chl-modis_a-l4-edoc3dineof_4km_daily-rt-v01). Te meritve so bile matematično interpolirane na postaje monitoringov. NaN – ni numerične vrednosti.

Mesto vzorčenja	Chl <i>a</i> _lab (18.11.2013)	Chl <i>a</i> _sat (20.11.2013)
000F	0,59	2,66
000K	0,92	NaN
00C2	0,59	2,79
00CZ	0,96	2,24
00F2	0,85	1,87
00MA	0,74	2,56
0DB2	0,74	NaN
ERI2	0,44	NaN

Na podlagi tega prvega testiranja uporabnosti satelitskih podatkov o koncentraciji Chl *a* lahko zaključimo sledeče:

- Satelitske meritve površinskih koncentracij Chl *a* so bolj uporabne za odprte (oddaljenost od obale najmanj 1 NM) kot pa priobalne vode;
- časovni okvir zajemanja podatkov s satelitom (tedensko/mesečno povprečje vs. dnevne meritve) se zdi manj pomemben od prostorske resolucije, zato je pomembna pravilna izbira podatkovne baze;

- šibka plat satelitskih meritev: poleg slabega zaznavanja merjenih količin v vodah blizu obale, so tu še krajši ali daljši izpadi meritev v primeru oblačnosti ali izpada meritev zaradi tehničnih težav;
- možnost uporabe satelitskih koncentracij Chl *a* kot »absolutnih« za oceno stanja lahko preučimo le s primerjavo dolgih serij podatkov analizo kvalitete podatkov. Predhodna analiza (opravljena sicer na SeaWiFS podatkih s prostorsko resolucijo 9×9 km², obdobje 1998-2007) je pokazala, da satelitske časovne serije za določena območja severnega Jadrana dokaj dobro reproducirajo laboratorijske časovne serije (korelacijski koeficient > 0,50), kvantitativno pa v povprečju presegajo fluorimetrične meritve Chl *a* za okoli 16% (Mozetič *in sod.*, 2010);
- zaradi zgoraj naštetih značilnosti satelitskih podatkov se nam v bodoče zdi njihova uporabnost dobrodošla za celovito (velika prostorska skala in majhna frekvenca, npr. tedensko povprečje) in kontinuirano spremljanje »relativne« biomase fitoplanktona, za oceno dolgoročnih trendov, za opazovanje nenadnih sprememb in gibanj vodnih mas, nikakor pa ne za natančno vrednotenje okoljskega/ekološkega stanja s fitoplanktonom.

2.9 Razvoj metodologije za oceno stanja biogenega substrata (sekundarno detritno dno) – D6

Nadaljevanje razvoja metodologije za oceno stanja sekundarnega detritnega dna (biogeni substrat), ki se pojavlja na območju cirkalitorala, je vezano tudi na ovrednotenje velikosti pritiskov in njihove umestitve v prostor. V letu 2013 je bila glavnina dela osredotočena prav na to, da v prostor umestimo pritiske zaradi ribištva in pomorskega prometa velikih ladij. Na podlagi tega bomo v nadaljevanju ovrednotili pritisk na območju pojavljanja te vrste biogenega substrata in določili najprimernejša območja za vrednotenje stanja in monitoring.

2.10 Nadaljevanje razvoja metodologije za oceno stanja bentoških nevretenčarjev (infavna in epifavna) v cirkalitoralu – D6

Nadaljevanje razvoja metodologije za oceno stanja bentoških nevretenčarjev (infavna in epifavna) v cirkalitoralu je vezano tudi na vrednotenje velikosti pritiskov in njihove umestitve v prostor. V letu 2013 je bila glavnina dela osredotočena prav na to, da v prostor umestimo pritiske zaradi ribištva in pomorskega prometa velikih ladij. Na podlagi teh rezultatov bomo poskusili dobiti gradient pritiskov, ki ga bomo primerjali z rezultati o stanju bentoške združbe v cirkalitoralu. Na podlagi vrednotenja velikosti in razporeditve pritiskov v prostoru in razporeditve dveh glavnih biocenoz v cirkalitoralu bomo lahko določili najprimernejša območja za vrednotenje stanja in izvajanje programa spremljanja stanja.

2.11 Razvoj metodologije za oceno vplivov na ekosistem zaradi hidrografskih posegov v morsko okolje. Izvajanje meritev hitrosti pridnenih tokov z uporabo visokofrekvenčnih merilnikov tokov - D7

V 2013 smo opravili nekaj preliminarnih meritev pridnenih tokov, s katerimi bo možno oceniti red velikosti pridnene strižne napetosti.

Meritve so bile opravljene v osrednjem delu koprskega zaliva. V 2014 bomo enake meritve opravili še na območjih, kjer so v obalnem pasu predvidene hidrografske spremembe. Analiza podatkov vseh meritev bo dobra osnova za postavitev začetnih kriterijev.

2.12 Nadaljnji razvoj metodologij za D8.1 in D9

V letu 2014 bomo dopolnjevali metodologijo vrednotenja okoljskega stanja, predvsem po deskriptorju 8, in uvrščanja v razrede okoljskega stanja po deskriptorjih 8 in 9. V ta namen smo opravili vzorčevanja sedimentov na 15-ih mestih v slovenskem morju. Poteka tudi zbiranje morskih organizmov (rib, školjk), da bi zagotovili dodatne rezultate za lažjo izbiro/potrditev nabora onesnaževal in nabora vrst za program monitoringa. Vzorčili smo tudi globinske vzorce sedimentov na območju oceanografske boje Vide. Rezultate analiz teh vzorcev bomo uporabili za oceno naravnega ozadja v sedimentih (za kovine in

ogljikovodike; nesintetična onesnaževala). Te rezultate bi povezali z drugimi rezultati globinskih vzorcev (iz literature ali še neobjavljenih naših rezultatov). Načrtujemo tudi analizo zrnivosti vzorčenih sedimentov, saj je znano, da velikost delcev sedimenta vpliva na adsorpcijo nekaterih onesnaževal. Tu bo potreben razmislek, saj morda pogosto uporabljen način (tudi standardiziran) obravnave frakcije pod 63 μm ni najboljši, če želimo kemijske parametre povezati z biološkimi.

V nadaljevanju podajamo kot primer novo tabelo z mejami med različnimi razredi okoljskega stanja. Za novo oceno smo uporabili rezultate zadnjih osem let (2005-2012). V tej fazi smo to naredili samo za PAH-e, saj so rezultati pokazali rahel padajoči trend koncentracij. To se je odrazilo tudi v rahlem znižanju mejnih koncentracij (Tabela 2.12). V naslednjem letu bomo na tak način dokončali metodologijo vrednotenja okoljskega stanja tudi v primeru drugih izbranih onesnaževal.

Tabela 2.12: Predlagane meje med posameznimi razredi stanja okolja za primer PAH v sedimentih in školjkah

Ekološko stanje	Prejšnja ocena (2011)		Nova ocena	
	PAH sediment ng g^{-1}	PAH školjke ng g^{-1}	PAH sediment ng g^{-1}	PAH školjke ng g^{-1}
Ref. razmere	322	690	300	440
Zelo dobro	658	1081	620	900
Dobro	803	1683	810	1210

2.13 Nadaljevanje razvoja metodologije za oceno stanja okolja po deskriptorju 8, merilo 8.2

V letu 2013 smo nadaljevali delo na sezonski dinamiki biomarkerjev splošnega stresa (stabilnost lizosomskih membran), biomarkerjev genotoksičnosti, biomarkerja nevrotoksičnosti aktivnost acetilholin esteraze in biomarkerjih oksidativnega stresa (aktivnost katalaze in glutation-S-transferaze). V klapavicah smo merili encimsko aktivnost acetilholin esteraze, katalaze in glutation-S-transferaze v spomladanskem obdobju

(april), poletnem obdobju (julij) in v jesenskem obdobju (oktober). Meritve smo opravili v tkivu škrg in v prebavni žlezi, klapavice pa smo vzorčili na štirih standardnih mestih vzorčenja. Z meritvami bomo nadaljevali še v januarju 2014, da bomo pridobili podatke iz celotnega enoletnega cikla ter jih nato uporabili za vrednotenje naravnih vrednosti in za izračun BAC in EAC. Pridobili smo še nove podatke o pojavljanju mikronukleusov v jesenskem delu (november), ki so potrebni za ovrednotenje naravnih vrednosti. Nadaljevali bomo z delom na biomarkerjih oksidativnega stresa (peroksidacija lipidov TBARS in superoksid dismutaza) ter na vpeljevanju dodatnega biomarkerja splošnega stresa in sicer z citokemijskim določanjem stabilnosti lizosomskih membran in genotoksičnostjo, ki služijo tudi za identifikacijo bioloških učinkov, ki so posledica delovanja različnih onesnažil – tudi za sedaj še neprepoznanih oziroma tistih, ki niso vključeni v kemijske analize kot so nanodelci.

2.14 Razvoj metodologije za detekcijo mikrobnih patogenov v morskem ekosistemu

Vse pridobljene rezultate mikrobnih patogenih bomo ovrednotili na osnovi njihovega števila in primerjali pridobljene rezultate z literaturnimi podatki in morebitnimi dodatnimi testi patogenosti na izbranih organizmih. Izbrana metoda mora biti dovolj občutljiva da zazna populacijo mikrobnih patogenov pod mejo infektivne doze ter po drugo strani dovolj specifična, da zazna zgolj tarčni organizem in ne daje lažno pozitivnih rezultatov. Sama detekcija pomeni možno identifikacijo pri ali nad določenim koncentracijskim pragom, medtem ko štetje zahteva določeno fleksibilnost pri določevanju razpona nivoja populacije. Pri oceni stanja mikrobiološke kakovosti voda sicer lahko upoštevamo kriterije in priporočila, ki veljajo v državah Evropske unije za kopalne vode (Kopalna direktiva 2006/7/ES). Mikrobiološka kakovost se v tem primeru ocenjuje na osnovi koncentracij *Escherichie coli* in intestinalnih enterokokov (Tabela 2.14).

Tabela 2.14: Ocena mikrobiološke kakovosti morskih vod.

Parameter	Kakovost		
	Odlična	Dobra	Zadostna
<i>Escherichie coli</i>	250*	500*	500**
intestinalni enterokoki	100*	200*	185**

*Na podlagi vrednotenja 95-ega percentila

**Na podlagi vrednotenja 90-ega percentila

Vzorci morske vode ne smejo vsebovati patogenih mikroorganizmov.

**3 PRIPRAVA PODATKOVNE BAZE V SKLADU Z
ZAHTEVAMI EVROPSKE KOMISIJE (ČLENI 8. 11 IN
19.3) OZ. INSPIRE DIREKTIVE**

3.1 Uvod

Projekt razvoja podatkovne zbirke biotske raznovrstnosti in spremljajočih parametrov slovenskega morja (v nadaljevanju *podatkovna baza*, izvajalec DEZO Damir Deželjin s.p.) sestoji iz med seboj prepletenih sklopov kot sledi:

1. zbiranje in analiza naročnikovih zahtev ter definicija funkcionalnosti produkta,
2. izgradnja strukture podatkovne zbirke,
3. uvoz dela historičnih podatkov,
4. razvoj uporabniških in programskih vmesnikov, in
5. dokumentacija in izobraževanje.

3.2 Zaključene aktivnosti

Sklop definicije funkcionalnosti projekta (točka 1 z zgornjega seznama) je zaključen. V nadaljevanju sledi povzetek tega sklopa.

3.2.1 Funkcionalna definicija produkta

Končni produkt bo pokrival sledeče sklope funkcionalnosti:

- Centralna hramba biotskih podatkov in spremljajočih fizikalno-kemijskih podatkov v vodnem stolpcu in sedimentih slovenskega morja.
Funkcionalnost bo omogočila korelacijo vseh podatkov na centralni imenovalec in sicer časa in lokacije. To bo posledično omogočalo sledljivost podatkov, kakor tudi enostavno medsebojno povezovanje z ostalimi podatki, to pa je v končni fazi temelj za izvedbo prihodnjih raziskav.
- Uporabniški vmesnik.
Gre za primarni način uporabnika za dostop do centralnih podatkov. Uporabniški vmesnik bo omogočal enostaven vnos, iskanje in izpis oz. izvoz v naprej definiranih podatkovnih sklopov. Uporabniški vmesnik bo tako zadovoljil večino hitrih poizvedb po podatkih; izvajanje naprednih poizvedb - za katere se korelacije vnaprej ne dajo definirati - bo omogočeno z uporabo namenskih orodij za direkten dostop do podatkovne zbirke.
- Izvoz podatkov.

Uporabnik bo lahko podatke iz podatkovne zbirke izvozil z namenom prenosa podatkov v namenske aplikacije kot so Matlab, Manifold, idr.

- Podpora nestrukturiranim podatkom.

Tekom izvajanja rednega znanstvenega dela in tehničnih aktivnosti povezanih z biotskimi in podatki pritiskov na okolje se poleg strukturiranih podatkov, ki bodo hranjeni v centralni zbirki, generirajo tudi drugi podatki kot so digitalne fotografije, surovi podatki instrumentov, ipd. Vsi ti podatki se bodo obravnavali kot nestrukturirani podatki in bodo hranjeni na namenskem zasebnem oblaku znotraj NIB-a ter povezani s skupnim imenovalcem v podatkovni zbirki. To bo omogočalo kasnejši urejen dostop do takih podatkov.

- Učno gradivo.

Pripravljeno učno gradivo bo vodilo uporabnika skozi prve korake dela z zbirko podatkov biotske raznolikosti slovenskega morja prav tako bo tudi definiralo osnovo za samostojno delo s podatki v drugih programskih orodjih.

3.3 Trenutne aktivnosti projekta

Pred kratkim je bil vzpostavljen zasebni oblak znotraj NIB-a, ki bo služil za hranjenje omenjenih nestrukturiranih podatkov.

Trenutno poteka zasnova strukture podatkovne zbirke ter izgradnja prototipa enega sklopa uporabniškega vmesnika. Ravno slednje opravilo, torej izgradnja prototipa, je ključna za uspešno nadaljevanje projekta, saj bo prototip služil za preverbo arhitekturnih odločitev prav tako bo tudi omogočilo testiranje omenjenega zasebnega oblaka.

3.4 Prihodnje aktivnosti

V prihodnjih tednih bo definiran podroben plan bodočih nalog za izvedbo aktivnosti iz odstavka funkcionalne definicije produkta. Do tedaj bo omenjeni prototip uporabniškega vmesnika zaključen in preverjen. Temu bodo sledile razvojne aktivnosti produkta. S februarjem 2014 se bodo začele izvajati aktivnosti prenosa znanja za delo s podatki. Aprila 2014 bo pripravljeno učno gradivo ter predan projekt.

4 VIRI

AMBI: AZTI MARINE BIOTIC INDEX (AZTI-Tecnalia.www.azti.es).

Arar, E.J. in Collins, G.B. 1997. Method 445.0 »*In Vitro* Determination of Chlorophyll *a* and Pheophytin *a* in Marine and Freshwater Algae by Fluorescence«. Revision 1.2. USEPA, Cincinnati, Ohio, September 1997, 22 s.

Baršienė, J., Lazutka, J., Šyvokienė, J., Dedonytė, V., Rybakovas, A., Bjornstad, A. in Andersen, O.K. 2004. Analysis of micronuclei in blue mussels and fish from the Baltic and the North Seas. *Environmental Toxicology*, 19: 365–371.

Baršienė, J. in Rybakovas, A. 2006. Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus edulis* from the Baltic coast and after 1–3-day maintenance in laboratory. *Acta Zoologica Lituanica*, 16: 191–197.

Baršienė, J., Rybakovas, A., Forlin, L. in Šyvokienė, J. 2008a. Environmental genotoxicity studies in mussels and fish from the Göteborg area of the North Sea. *Acta Zoologica Lituanica*, 18: 240–247.

Baršienė, J., Andreikėnaitė, L., Garnaga, G. in Rybakovas, A. 2008b. Genotoxic and cytotoxic effects in bivalve mollusks *Macoma balthica* and *Mytilus edulis* from the Baltic Sea. *Ekologija*, 54: 44–50.

Battelli, C. 1996. Koliko vrst iz rodu *Codium* živi v Slovenskem obalnem morju? *Annales, Ser. hist. nat.*, 9: 167-176.

Battelli, C. 1997. Prispevki k poznavanju makrobentoških alg slovenskega obalnega morja: rod *Cladophora* (Chlorophyta). *Annales, Ser. hist. nat.*, 11: 47-56.

Battelli, C. 2000. Priročnik za spoznavanje morske flore Tržaškega zaliva ali Kako nabirati. shranjevati in določevati nekatere najpogostejše predstavnice morskih alg in semenk vzhodnega dela Tržaškega zaliva. Zavod Republike Slovenije za šolstvo, Ljubljana, 170 s.

Beers, J.R. 1976. Determination of zooplankton biomass V: Steedman, H. F. (Ur.) Zooplankton fixation and preservation. UNESCO Press, Paris, 37-84.

Bellan-Santini, D., Bellan, G., Bitar, G., Harmelin, J.-G. in Pergent, G. 2002. Handbook for interpreting types of marine habitat for the selection of sites to be included in the national inventories of natural sites of conservation interest. Regional Activity Centre for Specially Protected Areas. Action Plan for the Mediterranean, United Nations Environment Programme, 217 s.

- Bellan-Santini, D. 1969. Contribution a l'étude des peuplements infralittoraux sur substrats rocheaux (étude qualitative et quantitative de la frange supérieure). Recl. Trav. Stn. Mar. Endoume, 47 (=63): 5-294.
- Benedetti-Cecchi, L., Pannacciulli, F.G., Bulleri, F., Moschella, P.S., Airoidi, L., Relini, G. in Cinelli, F. 2001. Predicting the consequences of anthropogenic disturbance: large-scale effects of loss of canopy algae on rocky shores. Mar Ecol Prog Ser, 214: 137-150.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. in Sayers, E.W. 2008. GenBank. Nucleic Acids Res, 37: D26-31.
- Bianchi, C.N., Pronzato, R., Cattaneo-Vietti, R., Benedetti-Cecchi, L., Morri, C., Pansini, M., Chemello, R., Milazzo, M., Frascchetti, S., Terlizzi, A., Peirano, A., Salvati, E., Benzoni, F., Calcinai, B., Cerrano, C. in Bavestrello, G. 2003. I fondi duri. Biol. Mar. Medit., 10 (Suppl.): 199-232.
- Bocquené, G. in Galgani, F. 1998. Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences, No. 22.
- Bocquené, G., Chantereau, S., Raffin, B., Minier, C., Clérendeau, C., Leskowicz, A., Beausir, E. in *ostali*. 2004. The monitoring of the biological effects of the ERIKA oil spill on the blue mussel (*Mytilus edulis*). Aquatic Living Resources, 17: 309–316.
- Bolognesi, C. in Fenech, M. 2012. Mussel micronucleus cytome assay, Nature protocols, 7(6): 1125- 1137
- Bouskill N.J., Handy R.D., Ford T. E. in Galloway T. S. 2006. Differentiating copper and arsenic toxicity using biochemical biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena polymorpha*. Ecotoxicology and environmental safety, 65: 342-349.
- Boström, K.H., Simu, K., Hagström, A. in Riemann, L. 2004. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. Limnology Oceanography Methods, 2: 365-373.
- Bressan, G. in Babbini, L. 2003. Biodiversità marina delle coste Italiane: Corallinales del Mar Mediterraneo: guida alla determinazione. Biol. Mar. Medit., 10 (Suppl. 2), 237 s.
- Brotz, L., Cheung, W.W.L., Kleisner, K., Pakhomov, E. in Pauly, D. 2012. Increasing jellyfish populations: trends in Large Marine Ecosystems. Hydrobiologia, 690: 3–20.

- Brunetti, R., Gabriele, M., Valerio, P. in Fumagalli, O. 1992. The micronucleus test: temporal pattern of the base-line frequency in *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Marine Ecology Progress Series, 83: 75–78.
- Burgeot, T., Faucet, J., Ménard, D., Grosjean, P. in Bocquené, G. 2006. Variations of benzo(a)pyrene hydroxylase and cholinesterase activities in mussels caged in the North Sea (German Bight and Statfjord). V: Biological Effects of Contaminants in Marine Pelagic Ecosystems. pp. 171–188. (Ur: K. Hylland, T. Lang in A.D. Vethaak). Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, FL, USA. 474 s.
- Burkholder, J.M., Tomasko, D.A. in Touchette, B.W. 2007. Seagrasses and eutrophication. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 350: 46-72.
- Cabelli, V.J. 1983. Health Effects Criteria for Marine Recreational Waters. EPA-600/1-80-031. Research Triangle Park, NC: USEPA.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C. in Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian peninsula: a practical approach. Science of the Total Environment, 247: 295–311.
- CEMP Assessment Manual: Co-ordinated Environmental Monitoring Programme Assessment Manual for contaminants in sediment and biota, OSPAR Commission, 2008, SBN 978-1-906840-20-4 Publication Number No. 379/2008.
- Chapman, M.G. 2003. Paucity of mobile species on constructed seawalls: effects of urbanization on biodiversity. Mar Ecol Prog Ser, 264: 21-29.
- Chapman, M.G. in Bulleri, F. 2003. Intertidal seawalls - new features of landscape in intertidal environments. Landscape and Urban Planning, 62: 159-172.
- Cohen, G., Kim, M. in Ogwu, V. 1996. A modified catalase assay suitable for a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. J. Neurosci. Methods, 67: 53-56.
- Cuervo, A.M. 2004. Autophagy: in sickness and in health. Trends in Cell Biology, 14: 70–77.
- Dailianis, S., Domouhtsidou, G. P., Raftopoulou, E., Kalayianni, M. in Dimitriadis, V.K. 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. Marine Environmental Research, 56: 443–470.

- Davies, I.M. in Vethaak, A.D. 2012. Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. ICES Cooperative Research Report, 315, 277 s.
- Devlin, M., Best, M., Coates, D., Bresnan, E., O'boyle, S., Park, R., Silke, J., Cusack, C. in Skeats, J. 2007. Establishing boundary classes for the classification of UK marine waters using phytoplankton communities. *Marine Pollution Bulletin*, 55: 91-103.
- Dewailly, E. in Knap, A. 2006. Food from the oceans and human health. *Oceanography*, 19 (2):85-93.
- Direktiva Evropskega parlamenta in Sveta 2000/60/ES z dne 23. Oktobra 2000 o določitvi okvira za ukrepe Skupnosti na področju vodne politike. UL L 327, 22/12/2000, 73 s.
- Dizer, H., da Silva de Assis, H.C. in Hansen, P-D. 2001. Cholinesterase activity as a bioindicator for monitoring marine pollution in the Baltic sea and the Mediterranean Sea. In *Biomarkers in Marine Organisms: A Practical Approach*, pp. 331–342. Ed. by Ph. Garrigues, H. Barth, C. H. Walker, and J-F. Narbonne. Elsevier, Amsterdam, 491 s.
- Dondero, F., Jonsson, H., Rebelo, M., Pesce, G., Berti, E., Pons, G. in Viarengo, A. 2006. Cellular responses to environmental contaminants in amoebic cells of the slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143C: 150–157.
- Dwight, R.H., Fernandez, I.M., Baker, D. B., Semenza, J.C. in Olsen, B. 2005. Estimating the economic burden from illnesses associated with recreational coastal pollution-A case study in orange Country, California. *Journal of Environmental Management*, 76: 95-103.
- European Environmental Agency. 2004. EUNIS Habitat Classification Revised 2004. <http://eunis.eea.europa.eu/>
- Ercegović, A. 1952. *Jadranske cistozire*. Institut za oceanografiju i ribarstvo. Split, 212 s.
- FAO, IOC, IAEA. 1992. Guidelines for monitoring chemical contaminants in the sea using marine organisms.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. in Zeiger, E. 2003. HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534: 65–75.
- Fenzilli, G., Nigro, M. in Lyons, B.P. 2009. The Comet assay for evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*, 681: 80–92.

- Francé, J., Orlando-Bonaca, M., Mavrič, B., Bajt, O., Flander Putrle, V., Mozetič, P. in Šiško, M. 2011. Program opredelitve ekološkega stanja morja v skladu z Vodno direktivo (2006/60/ES) v letih 2011-2012. Zaključno poročilo. Poročila MBP 131. Morska Biološka Postaja, Nacionalni Inštitut za Biologijo, Piran, 67 s.
- Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F. in Guilhermon, L. 2005. Do metal inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, 10: 360–375.
- Gallardo, T., Gómez-Garreta, A., Ribera, M.A., Cormaci, M., Furnari, G., Giaccone, G. in Boudouresque, C.F. 1993. Check-list of Mediterranean seaweeds. 2. Chlorophyceae. *Botanica Marina*, 36(5): 399-421.
- Galloway, T.S., Sanger, R.C., Smith, K.L., Fillmann, G., Readman, J.W., Ford, T.E. in Depledge, M.H. 2002. Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. *Environmental Science and Technology*, 36: 2219–2226.
- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B. in Depledge, M.H. 2004. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environmental Science and Technology*, 38: 1723–1731.
- Géret, F., Jouan, A., Turpin, V., Bebianno, M.J. in Cosson, R.P. 2002. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquatic Living Resources*, 15: 61–66.
- Giaccone, G. 1973. Elementi di Botanica marina. Pubbl. Ist. Botanico. Università di Trieste, Vol. I: 42 s.; Vol. II: 358 s.
- Gómez Garreta, A., Gallardo, T., Ribera, M.A., Cormaci, M., Furnari, G., Giaccone, G. in Boudouresque, C.F. 2001. Checklist of the Mediterranean seaweeds. III. Rhodophyceae Rabenh. 1. Ceramiales Oltm. *Botanica Marina*, 44: 425-460.
- Grasshoff, K., Kremlingl, K. in Ehrhardt, M. (Ur.) 1999. *Methods of Seawater Analysis*. Weinheim. New York. Chicester. Brisbane. Singapore. Toronto: Wiley-VCH, 600 s. http://gendocs.ru/docs/29/28874/conv_1/file1.pdf
- Habig, W. H. in Jacoby, W.B. 1981. Assays for the differentiation of glutathione-S-transferases. *Meth.Enzymol.*, 77: 389-405.

- Haile, R.W., Witte, J.S., Gold, M., Cressey, R., McGee, C., Millikan, RC. *in ostali*. 1999. The health effects of swimming in ocean water contaminated by storm drain runoff. *Epidemiology*, 10(4):355–363.
- Hansen, H.P. in Koroleff, F. 1999. Determination of nutrients. V: *Methods of Seawater Analysis*, Grasshoff, K., Kremling, K. in Ehrhardt, M. (Ur.), Wiley-VCH Verlag, 159-228.
- Hansen, H.P. in Koroleff, F. 2007. Determination of nutrients. V: *Methods of Seawater Analysis*, Third Edition. Grasshoff, K., Kremling, K. in Ehrhardt, M. (Ur.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany. doi:10.1002/9783527613984.ch10
- Harris, R.P., Wiebe, P.H., Lenz, J., Skjoldal, H.R. in Huntley, M. 2000. ICES Zooplankton Methodology Manual. Academic Press, San Diego, CA, 684 s.
- Haugland, R.A., Sieftring, S.C., Wymer, L.J., Brenner, K.P. in Dufour, A.P. 2005. Comparison of *Enterococcus* measurements in freshwater at two recreational beaches by quantitative polymerase reaction and membrane filter culture analysis. *Water Research*, 39:559-56.
- Hiscock, K., Smith, A., Jenkins, S., Sewell, J. in Hawkins, S. 2005. Development of a hard substratum Benthic invertebrate Water Framework Directive compliant classification tool. Report to the Environment Agency and the Joint Nature Conservation Committee from the Marine Biological Association. Marine Biological Association, Plymouth, 54 s. + Annexes.
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holmes, R.W. in Strickland, J.D.H. 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.*, 30: 3-15.
- IAEA-EL/MESL. 2013. Analysis of petroleum hydrocarbons in biota samples.
- IAEA-EL/MESL. 2013. Analysis of petroleum hydrocarbons in sediment samples.
- ICES. 2004. Biological effects of contaminants: Measurement of lysosomal membrane stability. By M.N. Moore, D. Lowe, and A. Köhler. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, 36, 31 s.
- ICES. 2006. Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC). ICES Document CM 2006/MHC: 04.
- ICES. 2007a. Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WBGEC). ICES Document CM 2007/MHC: 03.
- ICES, 2007b. Report of the Working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms (WGPDMO). ICES Document CM 2007/MCC: 04.

- ICES, 2007c. Report from the ICES/OSPAR Workshop on Integrated Monitoring of Contaminants and their Effects in Coastal and Open-Sea Areas (WKIMON). ICES Document CM 2007/ ACME: 01.
- ICES, 2010. Report of the ICES/OSPAR Workshop on Assessment Criteria for Biological Effects Measurements (WKIMC). Aberdeen, Scotland, UK.
- IOC, UNESCO. 1984. Manual for monitoring oil and dissolved/dispersed petroleum hydrocarbons in marine waters and on beaches.
- Izagirre, U. in Marigómez, I. 2009. Lysosomal enlargement and lysosomal membrane destabilisation in mussel digestive cells measured by an integrative index. *Environmental Pollution*, 157: 1544–1553.
- Jardas, I. 1996. Jadranska ihtiofauna. Školska knjiga, Zagreb, str. 1-533.
- Jardas, I., Pallaoro, A., Vrgoč, N., Jukić-Peladić, S. in Dadić V. 2008. Red Book of sea fishes of Croatia. State Institute for Nature Protection, Ministry of Culture, Republic of Croatia, 396 s.
- Kalkan, E., Karhan, S.Ü., Mutlu, E., Simboura, N. in BekbÖlet, M. 2007. Application of the bentix index in assessing ecological quality of hard substrata: a case study from the Bosphorus Strait, Turkey. *Mediterranean Marine Science*, 8: 15-29.
- Kirby, M.F., Morris, S., Hurst, M., Kurby, S. J., Neall, P., Tylor, T. in Fagg, A. 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 9: 780–791.
- Kogovšek, T., Bogunović, B. in Malej, A. 2010. Recurrence of bloom-forming scyphomedusae: wavelet analysis of a 200-year time series. *Hydrobiologia*, 645:81-96.
- Kopecka, J., Lehtonen, K., Baršienė, J., Broeg, K., Vuorinen, P. J., Gercken, J. in Pempkowiak, J. 2006. Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdańsk (southern Baltic). *Marine Pollution Bulletin*, 53: 406–421.
- Köhler, A. 1991. Lysosomal perturbations in fish liver as indicator for toxic effects of environmental pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C: 123–127.
- Köhler, A., Wahl, E. in Söffker, K. 2002. Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus* (L)). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 2434–2444.

- Law, R., Hanke, G., Angelidis, M., Batty, J., Bignert, A., Dachs, J., Davies, I., Denga, Y., Duffek, A., Herut, B., Hylland, K., Lepom, P., Leonards, P., Mehtonen, J., Piha, H., Roose, P., Tronczynski, J., Velikova, V. in Vethaak, D. 2010. Marine Strategy Framework Directive – Task Group 8 Report Contaminants and pollution effects. EUR 24335 EN. <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/111111111/13624>
- Leecaster, M. in Weisberg, S.B. 2001. Effects of sampling frequency on shoreline microbiology assessments. *Marine Pollution Bulletin*, 42(11): 1150-1154.
- Lehtonen, K.K., Kankaanpää, H., Leiniö, S., Sipiä, V.O., Pflugmacher, S. in Sandberg-Kilpi, E. 2003. Accumulation of nodularin-like compounds from the cyanobacterium *Nodularia spumigena* and changes in acetylcholinesterase activity in the clam *Macoma balthica* during short-term laboratory exposure. *Aquatic Toxicology*, 64: 461–476.
- Leiniö, S. in Lehtonen, K.K. 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 140: 408–421.
- Lesser M.P., Bailey, M.A., Merselis, D.G. in Morrison J. R. 2010. Physiological response of the blue mussel *Mytilus edulis* to differences in food and temperature in the Gulf of Maine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 156: 541-551.
- Lipej, L. 1999. Chondrichthyes. V: Kryštufek, B. in Janžekovič, F. (Ur.). Ključ za določevanje vretenčarjev Slovenije, DZS, Ljubljana, 5-46.
- Lipej, L., Orlando-Bonaca, M. in Šiško, M. 2003. Coastal Fish Diversity in Three Marine Protected Areas and One Unprotected Area in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic). *P.S.Z.N.: Marine Ecology*, 24(4): 259-273.
- Lipej, L. in Orlando-Bonaca, M. 2006. Assessing blennioid fish populations in the shallow Gulf of Trieste: a comparison of four in situ methods. *Periodicum Biologorum*, 108(2): 151-157.
- Lipej, L., Turk, R. in Makovec, T. 2006. Ogrožene vrste in habitatni tipi v slovenskem morju = Endangered species and habitat types in the Slovenian sea. Ljubljana: Zavod RS za varstvo narave, 264 s.
- Lipej, L., Mozetič, P., Orlando-Bonaca, M., Mavrič, B., Šiško, M. in Bettoso, N. 2007. Opredelitev ekološkega stanja morja v skladu z Vodno direktivo (Water Framework

- Directive. 2000/60/EC). Dopolnjeno zaključno poročilo. Poročila MBP 96. Morska biološka postaja, Nacionalni Inštitut za Biologijo, Piran, 180 s.
- Macpherson, E. 1994. Substrate utilization in a Mediterranean littoral fish community. *Marine Ecology Progress Series*, 114: 211-218.
- Marasović, I., Ninčević, Ž., Kuspilić, G., Marinović, S. in Marinov, S. 2005. Long-term changes of basic biological and chemical parameters at two stations in the middle Adriatic. *Journal of Sea Research*, 54: 3-14.
- Marba', N., Duarte, C.M., Alexandre, A. in Cabaço, S. 2004. How do seagrass grow and spread? V: Borum, J., Duarte, C.M., Krause-Jensen, D. in Greve, T. M. (Ur.). *European seagrasses: an introduction to monitoring and management. The M&MS project*, 11-18.
- Marigómez, I. in Baybay-Villacorta, L. 2003. Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals. *Aquatic Toxicology*, 64: 235–257.
- Mavrič, B., Jenko, R., Makovec, T. in Lipej, L. 2004. On the occurrence of the pelagic stingray *Dasyatis violacea* (Bonaparte, 1832) in the Gulf of Trieste (northern Adriatic). *Annales Seies Historia naturalis*, 14(2): 181-186.
- Mc Farland, V.A., Inouye, L.S., Lutz, C.H., Jarvis, A.S., Clarke, J.U. in McCant, D.D. 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 37: 236-241.
- MED-GIG. 2013. Mediterranean Sea GIG: Coastal Waters – Macroalgae. Technical report, 46 s.
- MKO/ARSO 2013. Izvajanje monitoringa bioloških elementov ekološkega stanja obalnega morja ter programa spremljanja kakovosti vode za življenje morskih školjk in morskih polžev v letu 2013. Projektna naloga. MKO, ARSO, Ljubljana, 2.1.2013, 12 s.
- Montesanto, B. in Panayotidis, P. 2001. The *Cystoseira* spp. communities from the Aegean Sea (NE Mediterranean). *Mediterr. Mar. Sci.*, 2(1): 57-67.
- Moore, M.N., Koehn, R.K. in Bayne, B.L. 1980. Leucine aminopeptidase (aminopeptidase-1), N-acetyl- β -hexosaminidase and lysosomes in the mussel *Mytilus edulis* L., in response to salinity changes. *Journal of Experimental Zoology*, 214: 239–249.

- Moore, M.N., Topping, G., Minhea, P-E., Kiryanov, S. in Mikhailov, V. 1998. Design of a monitoring programme for the Black Sea: contaminant levels and biological effects. V: Black Sea Pollution Assessment, s. 293–299. (Ur: L. D. Mee in G. Topping). UN Publications, New York, 380 s.
- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W. in Leonard, P. 2004a. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research*, 552: 247–268.
- Moore, M.N. in Lowe, D. 2004b. Biological effects of contaminants: Measurement of Lysosomal membrane stability. *View TIMES* 36, 31 s.
- Moore, M.N., Allen, J.I. in McVeigh, A. 2006a. Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Marine Environmental Research*, 61: 278–304.
- Moore, M.N., Allen, J.I. in Somerfield, P.J. 2006b. Autophagy: role in surviving environmental stress. *Marine Environmental Research*, 62(Suppl. 1): S420–S425.
- Moore, M.N., Allen, J.I., McVeigh, A. in Shaw, J. 2006c. Lysosomal and autophagic reactions as predictive indicators of environmental impact in aquatic animals. *Autophagy*, 2: 217–220.
- Moore, M.N., Viarengo, A., Donkin, P. in Hawkins, A.J.S. 2007. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquatic Toxicology*, 84: 80–91.
- Mozetič, P., Lipej, L., Mavrič, B., Orlando-Bonaca, M., Šiško, M. in Turk, V. 2008. Spremljanje ekološkega in kemijskega stanja morja in spremljanje kakovosti vode za življenje morskih školjk in morskih polžev v letu 2007. Zaključno poročilo. Poročila MBP 97. Morska Biološka Postaja, Nacionalni Inštitut za Biologijo, Piran, 108 s.
- Mozetič, P., Solidoro, C., Cossarini, G., Socal, G., Precali, R., France, J., Bianchi, F., De Vittor, C., Smoldaka, N. in Fonda Umani, S. 2010. Recent trends towards oligotrophication of the northern Adriatic: evidence from Chlorophyll *a* time series. *Estuaries and Coasts*, 33: 362-375.
- MSCG/11/2013/09, 2013. Technical guidance on MSFD monitoring Marine Strategy Framework Directive (MSFD), *Common Implementation Strategy 11th* meeting of the Marine Strategy Coordination Group (MSCG), JRC.
- Muyzer, G., Waal, E. D. in Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain

- reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 695-700.
- Muyzer, G. in Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. Journal of Genetic Molecular Microbiology*, 73: 127-141.
- NAEL/MESL. 2011. Recommended method on the determination of petroleum hydrocarbons in sediment samples.
- Odločba Komisije z dne 20. septembra 2013 o določitvi vrednosti za razvrščanje po sistemih spremljanja stanja v državah članicah, ki so rezultat postopka interkalibracije, v skladu z Direktivo Evropskega parlamenta in Sveta 2000/60/ES in preklicom Odločbe 2008/915/ES (2013/480/EU). UL L 266/1, 8/10/2013.
- Olli, K., Riser, C.W., Wassmann, P., Ratkova, T., Arashkevich, E. *in ostali*. 2002. Seasonal variation in vertical flux of biogenic matter in the marginal ice zone and the central Barents Sea. *Journal of Marine Systems*, 38: 189-204. doi: 10.1016/s0304-4203(02)00071-3.
- Orlando-Bonaca, M., Turk, R., Ozebek, B. in Lipej, L. 2008. Ovrednotenje asociacij s cistoziro v naravnem rezervatu Strunjan z uporabo ribje favne kot indikatorske skupine. *Varstvo Narave*, 21: 61-72.
- Orlando-Bonaca, M., Lipej, L., Malej, A., Francé, J., Čermelj, B., Bajt, O., Kovač, N., Mavrič, B., Turk, V., Mozetič, P., Ramšak, A., Kogovšek, T., Šiško, M., Flander Putrle, V., Grego, M., Tinta, T., Petelin, B., Vodopivec, M., Jeromel, M., Martinčič, U. in Malačič, V. 2012a. Začetna presoja stanja slovenskega morja. Poročilo za člen 8 Okvirne direktive o morski strategiji. Zaključno poročilo za leto 2012. Poročila MBP 140. Morska biološka postaja, Nacionalni Inštitut za Biologijo, Piran, 345 s.
- Orlando-Bonaca, M., Mavrič, B. in Urbanič, G. 2012b. Development of a new index for the assessment of hydromorphological alterations of the Mediterranean rocky shore. *Ecological Indicators*, 12(1): 26-36.
- Orlando-Bonaca, M., Lipej, L., Malej, A., Francé, J., Čermelj, B., Bajt, O., Kovač, N., Mavrič, B., Turk, V., Mozetič, P., Ramšak, A., Kogovšek, T., Šiško, M., Flander Putrle, V., Grego, M., Tinta, T., Petelin, B., Vodopivec, M., Jeromel, M., Martinčič, U. in Malačič V. 2012c: Določanje dobrega okoljskega stanja. Poročilo za člen 9

- Okvirne direktive o morski strategiji. Zaključno poročilo za leto 2012. Poročila 141. Morska biološka postaja, Nacionalni Inštitut za Biologijo, Piran, 177 s.
- Orlando-Bonaca, M., Lipej, L., Malej, A., Francé, J., Čermelj, B., Bajt, O., Kovač, N., Mavrič, B., Turk, V., Mozetič, P., Ramšak, A., Kogovšek, T., Tinta, T. in Malačič, V. 2013. Izbor elementov za vzpostavitev programa spremljanja stanja morskega okolja (po členu 11 ODMS). Preliminarno poročilo. Poročila MBP 144. Morska biološka postaja, Nacionalni Inštitut za Biologijo, Piran, 29 s.
- Orlando-Bonaca, M., Francé, J., Mavrič, B., Grego, M., Lipej, L., Flander Putrle, V., Šiško, M. in Falace, A. (v recenziji). Assessment of the Ecological Status of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson meadows: development of the MediSkew index according to Marine Strategy Framework Directive requirements. *Poslano v: Marine Ecology*.
- Orfanidis, S., Panayotidis, P. in Stamatis, N. 2001. Ecological evaluation of transitional and coastal waters: A marine benthic macrophytes-based model. *Mediterranean Marine Science*, 2: 45-65.
- Orfanidis, S., Papathanasiou, V. in Gounaris, S. 2007. Body size descriptor of *Cymodocea nodosa* indicates anthropogenic stress in coastal ecosystem. *Transitional Waters Bulletin*, 2:1-7.
- Orfanidis, S., Papathanasiou, V., Gounaris, S. in Theodosiou, T. 2010. Size distribution approaches for monitoring and conservation of coastal *Cymodocea* habitats. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 20: 177–188.
- Orfanidis, S., Panayotidis, P. in Uglund, K.I. 2011. Ecological Evaluation Index continuous formula (EEI-c) application: a step forward for functional groups, the formula and reference condition values. *Mediterranean Marine Science*, 12: 199-231.
- OSPAR Background document and technical annexes for biological effects monitoring, Update 2013.
- Panayotidis, P., Montesanto, B. in Orfanidis, S. 2004. Use of low-budget monitoring of macroalgae to implement the European Water Framework Directive. *J. Appl. Phycol.*, 16: 49-59.
- Pella, E. in Colombo, B. 1978. Simultaneous C-H-N and S Microdetermination by Combustion and Gas Chromatography. *Mikrochimica Acta*, I: 271-286.
- Pérès, J.-M. in Gamulin Brida, H. 1973. Biološka oceanografija. Bentos. Bentoška bionomija Jadranskog mora. Grafični Zavod Hrvatske, Zagreb, 493 s.

- Piccinetti, C., Vrgoč, N., Marčeta, B. in Manfredi, C. 2012. Stanje pridnenih ribolovnih virov v Jadranskem morju. *Acta Adriatica*, IOR, Split, 1: 220 s.
- Purcell, J.E. 2012. Jellyfish and ctenophore blooms coincide with human proliferations and environmental perturbations. *Annual Review of Marine Science*, 4: 209–35.
- Ramšak, A., Ščančar, J. in Horvat, M. 2012. Evaluation of metallothioneins in blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as a biomarker of mercury and cadmium exposure in the Slovenian waters (Gulf of Trieste): a long-term field study. *Acta Adriatica*, 53 (1): 71-86.
- Rank, J., Lehtonen, K.K., Strand, J. in Laursen, M. 2007. DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic Toxicology*, 84: 50–61.
- Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D. in Nigro, M. 2004. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment, *Aquatic Toxicology*, 68: 167–178.
- Ribera, M.A., Gómez-Garreta, A., Gallardo, T., Cormaci, M., Furnari, G. in Giaccone, G. 1992. Check-list of Mediterranean Seaweeds. I. Fucophyceae (Warming 1884). *Botanica Marina*, 35: 109-130.
- Ryba, S.A. in Burgess, R.M. 2002. Effects of Sample Preparation on the Measurement of Organic Carbon, Hydrogen, Nitrogen, Sulfur, and Oxygen Concentrations in Marine Sediments. *Chemosphere*, 48(1): 139-147.
- Serrano-García, L. in Montero-Montoya, R. 2001. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38: 38–45.
- Schiedek, D., Broeg, K., Baršienė, J., Lehtonen, K.K., Gercken, J., Pfeifer, S., Vuontisjärvi, H. in *ostali*. 2006. Biomarker responses as indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the southwestern Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 53: 387–405.
- Sfriso, A. 2010. Chlorophyta multicellulari e fanerogame acquatiche. Ambienti di transizione italiani e litorali adiacenti. In: I Quaderni di ARPA. ARPA Emilia-Romagna, Bologna, Odoya srl., 320 s.

- Sfriso, A. 2011. Ochrophyta (Phaeophyceae e Xanthophyceae). Ambienti di transizione italiani e litorali adiacenti. In: I Quaderni di ARPA. ARPA Emilia-Romagna, Bologna, 234 s.
- Signa, G., Cartes, J.E., Sole, M., Serrano, A. in Sanchez, F. 2008. Trophic ecology of the swimming crab *Polybius henslowii* Leach, 1820 in Galician and Cantabrian Seas: Influences of natural variability and the Prestige oil spill. *Continental Shelf Research*, 28: 2659–2667.
- Simonetti, G. 1966. Variazioni nei popolamenti di Zosteraceae nel Golfo di Trieste durante gli ultimi decenni. *Arch. Oceanogr. Limnol.*, 15 (Suppl.): 107-114.
- Turk, R. in Vukovič, A. 1998. Phenology of *Posidonia oceanica* (L.) Delile in the Gulf of Koper (Gulf of Trieste), North Adriatic. *Rapport du Congres de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée*, 35(2): 592-593.
- UNEP, 1998. Annex I and II. Draft classification of marine habitat types for the Mediterranean region. WG. 149/3. Mediterranean action plan. Meeting of experts on marine habitat types in the Mediterranean region. SPA/RAC, Tunis.
- Uradni list Republike Slovenije (2004): Uredba o zavarovanih prosto živečih živalskih vrstah. Ministrstvo za okolje in prostor.
- Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommung der Quantitativen Phytoplankton-Metodik. *Mitteilungen. Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 9: 1-38.
- Venier, P. in Zampieron, C. 2005. Evidence of genetic damage in grass gobies and mussels from the Venice lagoon. *Environment International*, 31: 1053–1064.
- Viarengo, A., Zanicchi, G., Moore, M.N. in Orunesu, M. 1981. Accumulation and detoxication of copper by the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 1: 147–157.
- Viarengo, A., Moore, M.N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A. in Pipe, R.K. 1985a. Significance of metallothioneins and lysosomes in cadmium toxicity and homeostasis in the digestive gland cells of mussels exposed to the metal in the presence and absence of phenanthrene. *Marine Environmental Research*, 17: 184–187.
- Viarengo, A., Moore, M.N., Pertica, M., Mancinelli, G., Zanicchi, G. in Pipe, R.K. 1985b. Detoxification of copper in the cells of the digestive gland of mussel: the role of lysosomes and thioneins. *Science of the Total Environment*, 44: 135–145.

- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F. in Fabbri, R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, 44: 69–84.
- Viarengo, A., Lafaurie, M., Gabrielides, G. P., Fabbri, R., Marro, A. in Romeo, M. 2000. Critical evaluation of an intercalibration exercise undertaken in the framework of the MEDPOL biomonitoring program. *Marine Environmental Research*, 49: 1–18.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, R. in Koehler A. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.*, 146: 281–300.
- Vieira, L. R., Gravato, C., Soares, A. M. V. M., Morgado, F. in Guilhermino, L. 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere*, 76: 1416–1427.
- Vukovič, A. 1982. Pozidonija v Koprskem zalivu. *Proteus*, 44(9-10): 345-346.
- Vukovič, A. in Turk, R. 1995. The distribution of the seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Del. in the Gulf of Koper. Preliminary report. *Rapport du Congres de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée*, 34: 49.
- Wasmund, N. in Uhlig, S. 2003. Phytoplankton trends in the Baltic Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 60: 177-186.
- Yuney, O.A., Carstensen, J., Moncheva, S., Khaliulin, A., Ærtebjerg, G. in Nixon, S. 2007. Nutrient and phytoplankton trends on the western Black Sea shelf in response to cultural eutrophication and climate change. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 74: 63-76.
- Zampoukas, N., Piha, H., Bigagli, E., Hoepffner, N., Hanke, G. in Cardoso, A.C. 2012. *Monitoring for the Marine Strategy Framework Directive: Requirements and Options*. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 36 s.
- Zinkl, J.G., Shea, P.J., Nakampoto, R.J. in Callman, J. 1987. Technical and biological considerations for the analysis of brain cholinesterase of rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, 116: 570–573.

5 Priloge

Priloga 1: Geografske koordinate mest vzorčenja na morskem dnu.

Mesto vzorčenja	Zemlj. širina	Zemlj. dolžina
Pos1	45°32.889'N	13°41.704'E
Pos2	45°32.893'N	13°41.860'E
Pos3	45°32.879'N	13°42.157'E
Cy1	45°31.609'N	13°36.023'E
Cy2	45°32.306'N	13°36.607'E
Cy3	45°28.921'N	13°35.375'E
Cy4	45°30.214'N	13°35.310'E
Cy5	45°34.927'N	13°43.193'E
Cy6	45°35.649'N	13°42.657'E
Cy7	45°32.900'N	13°41.317'E
Cy8	45°32.469'N	13°40.318'E
Cy9	45°30.915'N	13°34.583'E
Cy10	45°31.060'N	13°34.092'E
DR2	45°35.479'N	13°42.067'E
DR3	45°35.632'N	13°42.697'E
DR4	45°35.170'N	13°42.543'E
KP4	45°34.787'N	13°43.672'E
KP1	45°33.030'N	13°43.528'E
KP3	45°32.804'N	13°42.688'E
PO8	45°32.769'N	13°40.834'E
Iz4	45°32.475'N	13°39.299'E
RR1	45°32.354'N	13°37.137'E
Pa2	45°31.586'N	13°35.336'E
PP4	45°31.841'N	13°33.924'E
Por1	45°30.774'N	13°35.039'E
Por2	45°30.752'N	13°35.094'E
Se1	45°30.234'N	13°35.511'E
RR2	45°32.401'N	13°36.901'E
Pa3	45°31.597'N	13°35.294'E
Fi3	45°31.579'N	13°34.713'E
PP5	45°31.854'N	13°33.959'E
DR5	45°35.457'N	13°42.028'E
Sve1	45°32.532'N	13°39.339'E

se nadaljuje

nadaljevanje

Mesto vzorčenja	Zemlj. širina	Zemlj. dolžina
VT2P2	45°35.699'N	13°42.576'E
VT2P3	45°35.172'N	13°42.405'E
VT3P2	45°33.383'N	13°43.540'E
VT3P4	45°34.275'N	13°43.931'E
VT3P6	45°32.930'N	13°42.494'E
VT4P10	45°31.074'N	13°34.057'E
VT4P11	45°31.949'N	13°35.946'E
VT4P12	45°32.339'N	13°37.264'E
VT4P13	45°32.359'N	13°38.933'E
VT4P14	45°32.835'N	13°40.870'E
VT5P6	45°29.224'N	13°35.137'E
VT5P7	45°30.722'N	13°35.369'E
VT5P8	45°30.891'N	13°34.540'E
BNCL1	45°34.665'N	13°41.568'E
BNCL2	45°33.442'N	13°39.695'E
BNCL3	45°35.606'N	13°37.360'E
00C2 (=BNCL4)	45°34.800'N	13°36.800'E
BNCL7	45°33.792'N	13°29.615'E
BNCL6	45°31.503'N	13°31.803'E
00F2 (=BNCL8)	45°35.000'N	13°28.600'E
BNCL9	45°32.702'N	13°21.883'E
BNCL10	45°27.915'N	13°15.616'E
BNCL11	45°21.235'N	13°12.551'E
00CZ (=BNCL5)	45°37.400'N	13°37.930'E
000K	45°33.579'N	13°43.199'E
00MA	45°30.009'N	13°34.326'E
000F	45°32.300'N	13°33.000'E
0014	45°32.095'N	13°39.061'E

Priloga 2: Geografske koordinate mest vzorčenja v vodnem stolpcu.

Mesto vzorčenja	Zemlj. širina	Zemlj. dolžina
00BF	45°32.928'N	13°33.032'E
000K	45°33.579'N	13°43.199'E
00CZ	45°37.400'N	13°37.930'E
00F2	45°35.000'N	13°28.600'E
00MA	45°30.009'N	13°34.326'E
00C4	45°32.684'N	13°39.089'E
0DB2	45°35.899'N	13°42.501'E
00F2	45°35.000'N	13°28.600'E
000F	45°32.300'N	13°33.000'E
00C2	45°34.800'N	13°36.800'E
00C1	45°33.000'N	13°38.800'E
0024	45°31.796'N	13°35.751'E
0035	45°29.353'N	13°34.966'E
00TM	45°33.031'N	13°43.609'E
CN01	45°32.030'N	13°31.850'E
CN02	45°32.090'N	13°32.102'E
00T5	45°27.150'N	13°12.618'E

ZAHVALA

Avtorji poročila se zahvaljujemo vsem sodelavcem Morske biološke postaje, ki so nam pomagali pri delu na projektu.

Topla zahvala gre tudi zunanjim sodelavcem, ki so v prejšnjih letih sodelovali z nami: dr. Annalisi Falace, dr. Sotirisu Orfanidisu, Nicoli Bettosu, Lisi Faresi, Sari Kaleb, Lorenzu Claudiju Saitzu, Maji Jeromel in Jerneju Uhanu.

Za nasvete in podporo se zahvaljujemo dr. Moniki Peterlin, dr. Leonu Gosarju in mag. Elizabeti Gabrijelčič (Inštitut za vode RS).