

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Horvatovac 102a, Zagreb



Voditelj Projekta:

Izv. prof. dr. sc. Marija Gligora Udovič _____

Dekanica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta:

Prof. dr. sc. Aleksandra Čižmešija _____

Zagreb, 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Horvatovac 102a, Zagreb

**ANALIZA BIOLOŠKIH METODA OCJENE EKOLOŠKOG STANJA ZA
FITOPLANKTON, FITOBENTOS I MAKROZOOBENTOS U JEZERIMA;
ANALIZA UTJECAJA OKOLIŠNIH ČIMBENIKA I ANTROPOGENIH
OPTEREĆENJA**

**Završno izvješće s predloženom metodologijom uzorkovanja i laboratorijskim analizama
te pregledom dostupnih podataka i nedostataka**

Projektni tim:

prof. dr. sc. Anđelka Plenković-Moraj
doc. dr. sc. Petar Žutinić, prof. biol.
Antonija Kulaš, mag. oecol. et prot. nat.
prof. dr. sc. Ivančica Ternjej
izv. prof. dr. sc. Sanja Gottstein
izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner
doc. dr. sc. Marija Ivković
doc. dr. sc. Ana Previšić
dr.sc.Ivana Pozojević
Valentina Dorić, mag. oecl. et prot. nat.
Ivana Grgić, mag. oecl. et prot. nat.
Natalija Vučković, mag. oecl. et prot. nat. Vladimir Bartovsky
Mirjana Dimnjaković

**Voditelj projektnog tima za fitoplanktona i
fitobentos:**

izv. prof. dr. sc. Marija Gligora Udovič

Voditelj projektnog tima za makrozoobentos:

prof. dr. sc. Zlatko Mihaljević

Zagreb, 2020.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	5
1.1. FITOPLANKTON	6
1.2. FITOBENTOS	6
1.3. MAKROZOOBENTOS	9
2. Pregled klasifikacijskih metoda za fitobentos u jezerima zemalja Cross-GIG-a.....	10
3. METODE UZORKOVANJA I LABORATORIJSKE ANALIZE.....	12
(Prikaz bioloških metoda ocjene ekološkog stanja na temelju fitoplanktona, fitobentosa i makrozoobentosa u jezerima, prema poglavljima definiranim u Metodologiji.)	
3.1. Biološki element kakvoće fitoplankton.....	12
3.1.1. Uzorkovanje	12
3.1.2. Konzerviranje i pohrana uzoraka.....	17
3.1.3. Laboratorijska obrada uzoraka.....	18
3.1.4. Kvantitativna analiza.....	20
3.1.5. Pripremanje poduzorka i punjenje sedimentacijske komorice	20
3.1.6. Mikroskopiranje uzorka za kvantitativnu analizu.....	21
3.1.7. Strategije brojanja	22
3.1.8. Čišćenje dijatomejskog uzorka i izrada trajnih preparata	23
3.1.9. Mikroskopiranje uzorka fitoplanktona za kvantitativnu analizu dijatomeja.....	24
3.1.10. Izračunavanje broja stanica	24
3.1.11. Izračunavanje biomase fitoplanktona	24
3.1.12. Terenski protokol za uzorkovanje fitoplanktona u jezerima	26
3.2. Biološki element kakvoće fitobentos	27
3.2.1. Uzorkovanje.....	27
3.2.2. Laboratorijska obrada uzoraka	30
3.2.3. Mikroskopiranje, determinacija i kvantifikacija dijatomeja.....	33
3.3. Biološki element kakvoće makrozoobentos	35
3.3.1. Uzorkovanje	35
3.3.2. Laboratorijska obrada uzoraka	36
4. Prijedlog metoda za ocjenu ekološkog stanja jezera Dinaridske ekoregije na temelju fitoplanktona	39
4.1. Baza podataka	39
4.2. Duboka jezera	39
4.2.1. Koncentracije klorofila a (Chl-a)	39
4.2.2. Indeks za ocjenu sastava zajednice (Q_k).....	40
4.2.3. Primjena indeksa za ocjenu cvjetanja algi	41
4.3. Vrlo plitke stajačice	42
4.3.1. Biomasa	42
4.3.2. Primjena indeksa za ocjenu cvjetanja algi	45
4.4. Ocjena ekološkog stanja istraživanih stajačica temeljem fitoplanktona.....	45

4.5. Opis zajednice fitoplanktona u uvjetima vrlo dobrog ekološkog stanja	50
4.6. Operativna lista svojti (potrebno je dodati još neke vrste iz 2014 i 2016).....	51
5. Prijedlog metoda za ocjenu ekološkog stanja jezera Dinaridske ekoregije na temelju fitobentosa.....	60
5.1. Duboke stajačice	61
5.2. Vrlo plitke stajačice.....	62
5.3. Ocjena ekološkog stanja istraživanih stajačica temeljem fitobentosa	63
5.4. Opis fitobentoske zajednice u uvjetima vrlo dobrog ekološkog stanja.....	64
6. PRIJEDLOG SUSTAVA OCJENE EKOLOŠKOG STANJA PRIRODNIH JEZERA TEMELJEM MAKROZOOBENTOSA	66
6.1. Baza podataka.....	66
6.2. Izračun metrika	66
6.3. Selekcija metrika (indeksa).....	67
6.4. Okolišni parametri i pritisci.....	67
6.5. Opis zajednice makrozoobentosa	73
6.5.1. Opis zajednice makrozoobentosa u uvjetima maksimalnog ekološkog stanja	73
6.5.2. Opis zajednice makrozoobentosa u uvjetima dobrog ekološkog stanja	73
6.5.3. Opis zajednice makrozoobentosa u uvjetima umjerenog ekološkog stanja	74
7. USPOREDBA EKOLOŠKOG STANJA TEMELJEM FITOPLANKTONA ODREĐENOG MORFOLOŠKIM I MOLEKULARNIM METODAMA TE ODREĐIVANJEM KLOROFILA a SPEKTROFOTOMETRIJSKOM I KROMATOGRAFSKOM METODOM (U-HPLC).....	77
8. USPOREDBA KATEGORIJA EKOLOŠKOG STANJA ZA OSNOVNE FIZIKALNO-KEMIJSKE POKAZATELJE U JEZERIMA I EKOLOŠKOG STANJA TEMELJEM FITOPLANKTONA, FITOBENTOSA I MAKROZOOBENTOSA	81
9. ZAKLJUČAK.....	84
10. LITERATURA	94

1. UVOD

Kao dio postavljenog plana provedbe post-interkalibracijskog postupka i usklađivanja metoda za jezera, ciljevi projekta „Analiza bioloških metoda ocjene ekološkog stanja za fitoplankton, fitobentos i makrozoobentos u jezerima; analiza utjecaja okolišnih čimbenika i antropogenih opterećenja“ su revizija i ažuriranje postojećih metoda bioloških elemenata kakvoće za ocjenu ekološkog stanja (fitoplanktona, fitobentosa i makrozoobentosa) te provođenje samostalnog interkalibracijskog postupka za alge kremenjašice na temelju ažuriranog sustava ocjene ekološkog stanja.

Specifični ciljevi koji proizlaze iz navedenog su izrada:

- izvješća o usklađenosti klasifikacijske metode za biološki element fitobentos u jezerima te uklapanje metode u harmoniziranu definiciju dobrog ekološkog stanja,
- izvješća za prijavu metoda ocjene zemalja članica u slučaju kada interkalibracija nije moguća,
- metodologije uzorkovanja, laboratorijskih analiza i određivanja omjera ekološke kakvoće za fitoplankton, fitobentos i makrozoobentos u jezerima, koja će se koristiti kao službena metodologija za klasifikaciju ekološkog stanja, temeljem članka 19. Uredbe o standardu kakvoće voda (NN 96/19).

Prema navedenim ciljevima te prema važećoj tipologiji, definirano je područje istraživanja u Republici Hrvatskoj i to šest tipova prirodnih jezera koji svi pripadaju Dinarskoj ekoregiji, od čega dva Kontinentalnoj subekoregiji i četiri Primorskoj subekoregiji (Tab. 1).

Tablica 1. Tipovi i pripadajuća prirodna jezera u Hrvatskoj.

Oznaka tipa	Naziv tipa	Naziv jezera
	DINARIDSKA EKOREGIJA – KONTINENTALNA SUBREGIJA	
	1. Planinska, duboka, mala jezera na karbonatnoj podlozi	
HR-J_1A	1.a. Oligotrofna	Kozjak, NP Plitvička jezera
HR-J_1B	1.b. Oligotrofno-mezotrofna	Prošće, NP Plitvička jezera
	DINARIDSKA EKOREGIJA – PRIMORSKA SUBREGIJA	
HR-J_2	2. Nizinska, duboka, srednje velika jezera; Kriptodepresije na karbontanoj podlozi	Vransko jezero, Cres
HR-J_3	3. Nizinska, srednje duboka, mala jezera; Kriptodepresije na karbonatnoj podlozi	Crniševo, Oćuša (Baćinska jezera)
HR-J_4	4. Nizinska, plitka, velika jezera; Kriptodepresije na karbonatnoj podlozi	Vransko jezero, PP Vransko jezero
HR-J_5	5. Nizinska, srednje duboka i srednje velika jezera na karbonatnoj podlozi	Visovac, NP Krka

1.1. FITOPLANKTON

Uzorkovanje i laboratorijsku analizu fitoplanktona obavio je Naručitelj jednom mjesečno od travnja do rujna prema planu monitoringa fizikalno-kemijskih pokazatelja vode i fitoplanktona na osam postaja u sedam jezera tijekom 2014., 2016., i 2017. godine (Tab. 2).

Tablica 2 . Popis postaja redovnog monitoringa u jezerima.

Naziv jezera	Naziv postaje	X HTRS	X HTRS
Kozjak, NP Plitvička jezera	Kozjak	429547	4972304
Prošće, NP Plitvička jezera	Prošće	428909	4969468
Vransko jezero, Cres	Vransko jezero, oko 250 m od obale	333460	4970496
Baćinska jezera	Crniševo	574000	4770891
Baćinska jezera	Oćuša	574972	4771389
Vransko jezero, PP Vransko jezero	Motel	423307	4865526
Vransko jezero, PP Vransko jezero	Prosika	429255	4858350

1.2. FITOBENTOS

Uzorkovanje fitobentosa provedeno je u svibnju i lipnju 2018. godine djelomično od strane Naručitelja, a djelomično od strane Izvoditelja te u rujnu 2018. godine isključivo od strane Izvoditelja. Ukupno je prikupljeno 26 uzoraka u svibnju i lipnju u sljedećim jezerima: Prošće (5 uzoraka), Kozjak (5 uzoraka), Visovačko jezero (3 uzorka), Vransko jezero na Cresu (3 uzorka), Vransko jezero kod Biograda (4 uzorka), Oćuša (3 uzorka) i Crniševo (3 uzorka). Uzorkovanje u svibnju provedeno je sukladno ugovoru te su Hrvatske vode (Naručitelj) uzorkovale Baćinska jezera (Crniševo, Oćuša) i Vransko kod Biograda dok je PMF (Izvoditelj) uzorkovao Plitvička jezera (Prošće i Kozjak), Visovačko jezero i Vransko jezero na Cresu (Tab. 3). Uzorkovanje u rujnu 2018. od strane PMF-a (Izvoditelja) obavljeno je u Baćinskim jezerima (Crniševo, Oćuša) (3+3 uzorka), Vranskom jezeru kod Biograda (4 uzorka), Visovačkom jezeru (3 uzorka) te Plitvičkim jezerima (Prošću i Kozjaku) (5+5 uzoraka). Tijekom uzorkovanja, na svakoj istraživačkoj postaji zabilježeni su opći podaci o stanju jezera, GPS koordinate, te su obavljena standardna mjerenja fizikalno-kemijskih pokazatelja i fotografiranje postaja. Kako za većinu jezera nema podataka o fizikalno-kemijskim pokazateljima za mjesec srpanj, kolovoz i rujna 2018., dogovoreno je da se uzorci prikupljeni u rujnu neće analizirati jer se ne mogu usporediti s odgovarajućim fizikalno-kemijskim pokazateljima. Također, dogovoreno je i da uzorke prikupljene u svibnju i lipnju koje su trebali analizirati djelatnici GVL-a (Naručitelj), u konačnici analizira PMF (Izvoditelj) prema Troškovniku i Projektom zadatku.

Tablica 3. Popis postaja uzorkovanja fitobentosa u svibnju i početkom lipnja 2018. godine

Naziv lokacije	tip površinske vode	šifra vodnog tijela	datum uzorkovanja	Geografska širina d.m.s.	Geografska dužina d.m.s.
Plitvička jezera, jezero Kozjak	HR-J_1A	CSLN018	24.5.2018	44° 52' 48.99" S	15° 37' 2.75" I
Plitvička jezera, jezero Kozjak	HR-J_1A	CSLN018	24.5.2018	44° 53' 32.49" S	15° 36' 2.91" I
Plitvička jezera, jezero Kozjak	HR-J_1A	CSLN018	24.5.2018	44° 53' 37.32" S	15° 36' 13.77" I
Plitvička jezera, jezero Kozjak	HR-J_1A	CSLN018	24.5.2018	45° 52' 59.81" S	15° 36' 51.95" I
Plitvička jezera, jezero Kozjak	HR-J_1A	CSLN018	24.5.2018	44° 52' 42.78" S	15° 37' 5.93" I
Plitvička jezera, Prošćansko jezero	HR-J_1B	CSLN022	24.5.2018	44° 51' 56.35" S	15° 35' 46.77" I
Plitvička jezera, Prošćansko jezero	HR-J_1B	CSLN022	24.5.2018	44° 51' 55.20" S	15° 36' 0.40" I
Plitvička jezera, Prošćansko jezero	HR-J_1B	CSLN022	24.5.2018	45° 52' 13.36" S	15° 35' 50.06" I
Plitvička jezera, Prošćansko jezero	HR-J_1B	CSLN022	24.5.2018	44° 52' 2.69" S	15° 35' 45.29" I
Plitvička jezera, Prošćansko jezero	HR-J_1B	CSLN022	24.5.2018	44° 51' 37.86" S	15° 36' 8.52" I
Visovačko jezero	HR-J_5	JKLN002	25.5.2018	43° 51' 44.14" S	15° 58' 45.92" I
Visovačko jezero	HR-J_5	JKLN002	25.5.2018	43° 51' 39.95" S	15° 58' 19.99" I
Visovačko jezero	HR-J_5	JKLN002	25.5.2018	43° 51' 35.85" S	15° 58' 6.18" I
Visovačko jezero - Krka Roški slap	HR-J_5	JKLN002	25.5.2018	43° 54' 13.23" S	15° 58' 23.40" I
Jezero Vrana, Cres, oko 250 m od obale	HR-J_2	JOLN001	8.6.2018	44° 51' 16.62" S	14° 23' 42.8 " I
Jezero Vrana, Cres, oko 250 m od obale	HR-J_2	JOLN001	8.6.2018	44° 52' 18.60" S	14° 22' 56.81" I
Jezero Vrana, Cres, oko 250 m od obale	HR-J_2	JOLN001	8.6.2018	44° 51' 40.45" S	14° 23' 28.86" I
Baćinska jezera, Jezero Crniševo	HR-J_3	JKLN003	16.5.2018	43,077101	17,408421
Baćinska jezera, Jezero Crniševo	HR-J_3	JKLN003	16.5.2018	43,0708007	17,407573
Baćinska jezera, Jezero Crniševo	HR-J_3	JKLN003	16.5.2018	43,0778048	17,414777
Baćinska jezera, Jezero Oćuša	HR-J_3	JKLN003	16.5.2018	43,0697943	17,423359
Baćinska jezera, Jezero Oćuša	HR-J_3	JKLN003	16.5.2018	43,0782483	17,415098
Baćinska jezera, Jezero Oćuša	HR-J_3	JKLN003	16.5.2018	43,0790792	17,425378
Baćinska jezera, Jezero Oćuša	HR-J_3	JKLN003	16.5.2018		
Vransko jezero, motel	HR-J_4	JKLN001	17.5.2018	43°56'7.49"S	15°30'57.80" I
Vransko jezero, Prosika	HR-J_4	JKLN001	17.5.2018	43,8829297	15,609139
Vransko jezero, Prosika	HR-J_4	JKLN001	17.5.2018		15,578821
Vransko jezero, Prosika	HR-J_4	JKLN001	17.5.2018	43,8841969	
Vransko jezero, Prosika	HR-J_4	JKLN001	17.5.2018	43°51'0.84"S	15°37'45.61" I

Za potrebe projekta prema ugovoru ukupno je analizirano svih 26 uzoraka (Dodatak 1).

U svibnju 2019. godine ukupno je uzorkovana 21 postaja. Ovisno o pritiscima, odabrane su po tri postaje uzorkovanja u svakom jezeru. Popis postaja s pripadajućim koordinatama prikazan je u Tablici 4.

Tablica 4. Popis istraživanih postaja fitobentosa na jezerima u 2019. godini.

Šifra lokacije	Naziv lokacije	tip površinske vode	šifra vodnog tijela	datum uzorkovanja	Analitič broj uzorka	Geografska širina d.m.s.	Geografska dužina d.m.s.	Geografska širina d.d.	Geografska dužina d.d.
19001	Plitvička jezera. jezero Kozjak	HR-J_1A	CSLN018	29.05.2019.	041/19	44° 52' 48.99" S	15° 37' 2.75" I	44.880275	15.617431
19001	Plitvička jezera. jezero Kozjak	HR-J_1A	CSLN018	29.05.2019.	042/19	44° 53' 37.32" S	15° 36' 13.77" I	44.893700	15.603825
19001	Plitvička jezera. jezero Kozjak	HR-J_1A	CSLN018	29.05.2019.	043/19	44° 52' 59.81" S	15° 36' 51.95" I	44.883281	15.614431
19000	Plitvička jezera. Prošćansko jezero	HR-J_1B	CSLN022	29.05.2019.	044/19	44° 51' 55.20" S	15° 36' 0.40" I	44.865333	15.600111
19000	Plitvička jezera. Prošćansko jezero	HR-J_1B	CSLN022	29.05.2019.	045/19	44° 52' 13.36" S	15° 35' 50.06" I	44.870378	15.597239
19000	Plitvička jezera. Prošćansko jezero	HR-J_1B	CSLN022	29.05.2019.	046/19	44° 51' 37.86" S	15° 36' 8.52" I	44.860517	15.602367
40420	Visovačko jezero	HR-J_5	JKLN002	23.05.2019.	035/19	43° 51' 44.14" S	15° 58' 45.92" I	43.862261	15.979422
40420	Visovačko jezero	HR-J_5	JKLN002	23.05.2019.	036/19	43° 51' 39.95" S	15° 58' 19.99" I	43.861097	15.972219
40420	Visovačko jezero	HR-J_5	JKLN002	23.05.2019.	037/19	43° 51' 35.85" S	15° 58' 6.18" I	43.859958	15.968383
30120	Jezero Vrana. Cres. oko 250 m od obale	HR-J_2	JOLN001	02.05.2019.	026/19	44° 51' 16.62" S	14° 23' 42.8" I	44.854617	14.395133
30120	Jezero Vrana. Cres. oko 250 m od obale	HR-J_2	JOLN001	02.05.2019.	027/19	44° 52' 18.60" S	14° 22' 56.81" I	44.871833	14.349114
30120	Jezero Vrana. Cres. oko 250 m od obale	HR-J_2	JOLN001	02.05.2019.	028/19	44° 51' 40.45" S	14° 23' 28.86" I	44.861236	14.391351
40520	Baćinska jezera. Jezero Crniševo	HR-J_3	JKLN003	22.05.2019.	029/19	43° 4' 37.56" S	17° 24' 30.32" I	43.0771011	17.408421
40520	Baćinska jezera. Jezero Crniševo	HR-J_3	JKLN003	22.05.2019.	030/19	43° 4' 14.88" S	17° 24' 27.26" I	43.0708007	17.407573
40520	Baćinska jezera. Jezero Crniševo	HR-J_3	JKLN003	22.05.2019.	031/19	43° 4' 40.09" S	17° 24' 53.19" I	43.0778048	17.414777
40523	Baćinska jezera. Jezero Oćuša	HR-J_3	JKLN003	22.05.2019.	032/19	43° 4' 11.25" S	17° 25' 24.09" I	43.0697943	17.423359
40523	Baćinska jezera. Jezero Oćuša	HR-J_3	JKLN003	22.05.2019.	033/19	43° 4' 11.26" S	17° 25' 24.09" I	43.0697943	17.423359
40523	Baćinska jezera. Jezero Oćuša	HR-J_3	JKLN003	22.05.2019.	034/19	43° 4' 41.69" S	17° 24' 54.35" I	43.0782483	17.415098
40311	Vransko jezero. motel	HR-J_4	JKLN001	23.05.2019.	038/19	43° 56' 7.49" S	15° 30' 57.80" I	43.9354138	15.5160566
40316	Vransko jezero. Prosika	HR-J_4	JKLN001	23.05.2019.	039/19	43° 52' 58.55" S	15° 36' 32.90" I	43.8829297	15.6091391
40316	Vransko jezero. Prosika	HR-J_4	JKLN001	23.05.2019.	040/19	43° 51' 0.84" S	15° 37' 45.61" I	43.8502333	15.6293366

Za analizu sastava zajednica algi kremenjašica pripremljeni su trajni preparati od strane Naručitelja.

PROVEDBA INTERKALIBRACIJE

Interkalibracija fitobentosa provedena je prema cross-GIG-u (Cross-Geographical Intercalibration Group) **na temelju jednog uzorkovanja u svibnju 2019.** Izvoditelj je analizirao podatke o alkalitetu i zaključio da hrvatska jezera spadaju u skupinu s visokim alkalitetom te su prema tom tipu i interkalibrirani. Interkalibracijski obrazac: HR_lake_phytobenthos_CROSS GIG_draft1, predan u HV 10. ožujka 2020., u PRILOGU 2.

1.3. MAKROZOOBENTOS

Uzorkovanje makrozoobentosa obavljeno je od strane Izvoditelja u srpnju 2018. godine na 21 postaji: Vransko jezero na Cresu (3 postaje), Vransko jezero kod Biograda (3 postaje), Kozjak (5 postaja), Prošće (5 postaja), Visovačko jezero (2 postaje), Crniševo (2 postaje) i Očuša (1 postaja) te na 21 postaji u 2019. godini: Vransko jezero na Cresu (3 postaje), Vransko jezero kod Biograda (3 postaje), Kozjak (5 postaja), Prošće (5 postaja), Visovačko jezero (2 postaje), Crniševo (1 postaje) i Očuša (2 postaja) (Tab. 5). Na svakoj postaji zabilježeni su opći podaci o stanju jezera, GPS koordinate, analiziran je sastav i struktura podloge (dna) te su obavljena standardna mjerenja fizikalno-kemijskih parametara. Svaka postaja je fotografirana. Obavljena je izolacija i analiza uzoraka. U analizama makrozoobentosa korišteni su raspoloživi podaci o fizikalno-kemijskim pokazateljima vode za 2017. i 2019. godinu, jer su podaci za 2018. godinu nepotpuni.

Tablica 5 . Popis postaja uzorkovanja makrozoobentosa u 2018. i 2019. godini.

	Datum		Koordinate	
	2018.	2019.	2018.	2019.
Kozjak 1	18.7.2018.	11.7.2019.	44,89326	15,60311
Kozjak 2	18.7.2018.		44,89247	15,60093
Kozjak 3	18.7.2018.		44,88329	15,61435
Kozjak 4	18.7.2018.	11.7.2019.	44,87869	15,61835
Kozjak 5	18.7.2018.	11.7.2019.	44,88057	15,61794
Kozjak 6		11.7.2019.	44,87584	15,61530
Kozjak 7		11.7.2019	44,88348	15,61448
Vransko j. Cres 1	19.7.2018.	20.8.2019.	44,85498	14,39513
Vransko j. Cres 2	19.7.2018.	20.8.2019.	44,86091	14,39153
Vransko j. Cres 3	19.7.2018.	20.8.2019.	44,87036	14,38443
Vransko j. Biograd 1	24.7.2018.	26.8.2019.	43,88325	15,60944
Vransko j. Biograd 2	24.7.2018.		43,8854	15,57465
Vransko j. Biograd 3	24.7.2018.	26.8.2019.	43,93604	15,51488
Vransko j. Biograd 4		26.8.2019.	43,88898	15,56707
Visovac 1	24.7.2018.		43,86052	15,98221
Visovac 2	24.7.2018.		43,85654	15,97897
Visovac 3		24.9.2019.	43,86232	15,98007
Visovac 4		24.9.2019.	43,8604	15,9823
Crniševo 1	25.7.2018.	25.9.2019.	43,07955	17,41105
Crniševo 2	25.7.2018.		43,07105	17,40794
Očuša 1	25.7.2018.		43,07681	17,41767
Očuša 2		25.9.2019.	43,071199	17,41980
Očuša 3		25.9.2019.	43,073975	17,42423
Prošće 1	17.9.2018.	26.7.2019.	44,86436	15,59764
Prošće 2	17.9.2018.	26.7.2019.	44,86545	15,60011
Prošće 3	17.9.2018.	26.7.2019.	44,87068	15,59697
Prošće 4	17.9.2018.		44,86746	15,59581
Prošće 5	17.9.2018.	26.7.2019.	44,86042	15,60266
Prošće 6		26.7.2019.	44,85339	15,59539

Izvoditelj je u daljnjem nacrtu izvješća pripremio pregled nacionalnih klasifikacijskih metoda za fitobentos u jezerima zemalja članica koje su sudjelovale u cross-GIG interkalibracijskom postupku. Također, predlaže se i metodologija uzorkovanja i laboratorijskih analiza za fitoplankton, fitobentos i makrozoobentos u jezerima.

2. Pregled klasifikacijskih metoda za fitobentos u jezerima zemalja Cross-GIG-a

Okvirna Direktiva o vodama predstavlja (ODV) zakonodavni okvir za zaštitu svih vodnih tijela (uključujući površinske kopnene, prijelazne, priobalne i podzemne vode) na području EU, odnosno pruža operativne definicije za ocjenu ekološkog stanja te postavlja ciljeve upravljanja i usklađivanja sustava ekološke ocjene zemalja članica EU. Cilj je ODV postizanje najmanje dobrog ekološkog stanja prirodnih vodnih tijela te dobrog ekološkog potencijala jako modificiranih i umjetnih vodnih tijela. Utvrđivanje ekološkog stanja vodnog tijela temelji se na procjeni specifičnih vodenih zajednica, tzv. bioloških elemenata kakvoće (BEK) koji uključuju fitoplankton, makrofitску vegetaciju i fitobentos, bentičke beskralješnjake te ribe. U tom procesu svaka država članica koristi vlastitu nacionalnu metodologiju ocjene koja prati osnovne smjernice ODV, a konačan se rezultat prikazuje kao omjer ekološke kakvoće (OEK) prema referentnim uvjetima.

Kako bi se omogućila usporedivost granica ekološkog stanja i nacionalnih metodologija diljem EU, ODV propisuje proces vrednovanja među državama članicama, odnosno interkalibracijsku vježbu. Postupak interkalibracije provodi se odvojeno na različitim vodnim tijelima (rijeke, jezera, priobalne i prijelazne vode) za svaki pojedini BEK te je dodatno stratificiran različitim antropogenim pritiscima. Interkalibracijski se testovi provode unutar većih zemljopisnih jedinica nazvanih zemljopisne interkalibracijske skupine (Geographic Intercalibration Group - GIG) koje čine države s vodnim sustavima sličnih biogeofizičkih tipova, tzv. "zajednički interkalibracijski tipovi". Interkalibracija pruža mehanizam za usklađivanje pogrešaka u granicama ekološkog stanja pojedinih država članica, ukoliko se te granice znatno razlikuju od granica klasifikacije većine drugih država članica unutar istog GIG-a. Kroz ovaj se postupak mogu uskladiti te po potrebi prilagoditi granice ekološkog stanja nacionalnih metoda ocjenjivanja.

U posljednjoj je interkalibraciji metodologija za fitobentos jezera sudjelovalo je 11 država članica Europske Unije. Metode (metrike) za fitobentos uključenih država određuju potencijalni eutrofikacijski pritisak na osnovu sastava i relativne brojnosti dijatomeja te vrijednosti osjetljivih i tolerantnih svojti dijatomeja (Tab. 6). Postupak interkalibracije proveden je za tri osnovna tipa jezera: jezera visokog alikaliteta (high alkalinity lakes - HA), jezera srednje visokog alkaliteta (medium alkalinity lakes - MA) te jezera niskog alkaliteta (low alkalinity lakes - LA). U tipologijama HA i MA korištena je neizravna usporedba svih metodologija, koje su pokazale značajan odnos s koncentracijom ukupnog fosfora (TP). U tipologiji LA uspoređena su samo dva metrička sustava zbog utjecaja kombinacije kratkog gradijenta i niskog pH (tzv. "confounding pressure"). Trofički indeks prema Rott-u (Rott i sur., 1999.) odabran je kao najprikladnija/odgovarajuća metoda za uključene države te je standardiziran prema principu kontinuiranog vrednovanja ("continuous benchmarking"). Trofički indeks (TI) temelji se na pridruživanju ocjena osjetljivosti svojti ovisno o optimalnoj koncentraciji hranjivih tvari u prirodnim uvjetima. TI predstavlja prosjek osjetljivosti svih prisutnih svojti prema njihovoj relativnoj brojnosti/učestalosti, pri čemu će brojnija/učestalija svojta koja je osjetljiva na promjenu koncentracije hranjivih soli imati veći utjecaj na konačnu vrijednost indeksa, od slabo zastupljene svojte tolerantne na veće promjene koncentracije hranjivih soli.

Tablica 6. Opis interkalibriranih metoda koji koriste fitobentos za ocjenu stanja stajaćica korištenih u zemljama članicama.

Metrika	Opis	Zemlja članica	Referenca
DARLEQ	Indeks temeljen na vrijednostima osjetljivosti na hranjive tvari i broj valvi indikatorskih svojti dijatomeja	Ujedinjeno Kraljevstvo	Bennion i sur., 2014.
EPI-D indeks	Indeks eutrofikacije/zagađenja baziran na indikatorskim vrijednostima dijatomeja, vrijednostima tolerantnosti i relativnoj abundanciji svojti dijatomeja	Mađarska	Dell'Uomo, 2004.
IBD indeks	Biološki indeks dijatomeja, temeljen na trofičkim indikatorskim vrijednostima i relativnoj abundanciji indikatorskih svojti dijatomeja	Mađarska	Lenoir i Coste, 1996., Prygiel i Coste, 2000.
Indeks referentnih vrsta GRJ	Suma relativnih abundancija specifičnih dijatomejskih referentnih svojti	Poljska	Kelly i sur., 2014.
IPS indeks	Indeks specifičnih zagađenja, temeljen na vrijednostima osjetljivosti i relativnim abundancijama indikatorskih svojti	Finska, Švedska	Cemagref, 1982.; Kelly i sur., 2014.
Trofički indeks dijatomeja za jezera	Indeks baziran na vrijednostima za osjetljivost na hranjive tvari i abundanciji valvi indikatorskih svojti dijatomeja	Irska	Kelly i sur., 2008.; UKTAG, 2008.
PISIAD indeks	Indeks temeljen na sumi relativnih abundancija osjetljivih i tolerantnih svojti dijatomeja	Belgija	Hendrickx i Denys, 2005.; Kelly i sur., 2014.
Kvocijent referentnih vrsta RAQ	Omjer broja osjetljivih i tolerantnih svojti dijatomeja	Njemačka	Schaumburg i sur., 2004.
TDIL indeks	Trofički indeks dijatomeja za jezera temeljen na trofičkim indikatorskim vrijednostima, vrijednostima tolerantnosti i abundanciji indikatorskih svojti dijatomeja	Mađarska	Stenger-Kovács i sur., 2007.

3. METODE UZORKOVANJA I LABORATORIJSKE ANALIZE

(Prikaz bioloških metoda ocjene ekološkog stanja na temelju fitoplanktona, fitobentosa i makrozoobentosa u jezerima, prema poglavljima definiranim u Metodologiji.)

3.1. Biološki element kakvoće fitoplankton

Prema definiciji u Dodatku 4 ODV, ocjena kakvoće vode na temelju fitoplanktona određuje se pomoću izračunavanja biomase, određivanja sastava zajednice te cvjetanja cijanobakterija. Budući da je uspješno interkalibrirana, ista se metodologija koristi za sva jezera. Europska komisija provela je interkalibracijsku vježbu u svrhu usklađivanja graničnih vrijednosti kategorija kakvoće vode svih država članica. Također, stručne su provjere pokazale da metodologija u potpunosti udovoljava uvjetima ODV-a. Sve metode ocjene primijenjene u ovoj studiji prošle su prethodnu interkalibraciju uz minimalno prilagođavanje, stoga se mogu smatrati "interkalibriranim metodama". Metode ocjene na temelju fitoplanktona razvijene su kako bi se utvrdili pritisak hranjivih soli (najvećim dijelom ukupnog fosfora i ukupnog dušika). Budući da navedene varijable djeluju kao ključni čimbenici u razvoju fitoplanktona u prirodnim jezerima u Republici Hrvatskoj, primjena ove metodologije daje pouzdane rezultate u svrhu (održivog) upravljanja jezerima.

Metode koje su uspješno interkalibrirane među državama članicama tijekom interkalibracijske vježbe sastoje se od izračunavanja biomase te određivanja sastava zajednice, dok podaci o cvjetanju pojedinih vrsta nisu uzimani u obzir budući da u nekim slučajevima mogu navoditi na pogrešne zaključke.

3.1.1. Uzorkovanje

Vrijeme uzorkovanja

Uzorkovanje fitoplanktona u jezerima obavlja se tijekom dana, jednom mjesečno od travnja do rujna tekuće godine. Razdoblje između dva uzorkovanja treba biti najmanje tri tjedna.

Mjesto uzorkovanja

Uzorci za kvalitativnu i kvantitativnu analizu fitoplanktona uzimaju se iz čamca, na najdubljem dijelu jezera.

Oprema potrebna za uzorkovanje

Popis potrebne terenske opreme za uzorkovanje:

- čamac,
- batimetrijska karta,
- GPS uređaj,
- dubinomjer,
- fotoaparata,

- Secchi disk,
- vitlo s užetom,
- integrirani uzorkivač za kompozitni uzorak stupca vode,
- dubinski uzorkivač za vodu,
- cijev za uzorkovanje u plitkim jezerima,
- planktonska mreža s promjerom oka 10 i 25 μm ,
- plastična kanta volumena 10 - 15 L,
- staklene bezbojne boce sa širokim grlom i podčepom (200 - 250 mL) za spremanje direktnog uzorka označene vodootpornom etiketom,
- plastične bočice (do 100 mL) za spremanje kvalitativnog mrežnog uzorka,
- prijenosni hladnjak,
- terenski protokol i grafitna olovka
- vodootporni flomaster
- elektronička naprava za mjerenje osnovnih fizikalno-kemijskih pokazatelja u vodi (pH metar, konduktometar, oksimetar),
- gumene čizme (ribarske duge, sa i bez naramenica),
- zaštitna i terenska oprema: kabanica, jakna, hlače, terenske cipele, terenske sandale, kapa ili šešir, krema s zaštitnim faktorom protiv UV zračenja,
- kožne rukavice poput onih za vožnju biciklom ili jedrenje,
- papirnati ručnici,
- pojas za spašavanje i
- terenska torbica s prvom pomoći.

Način uzorkovanja

Koordinate mjesta uzorkovanja svaki puta treba zabilježiti GPS-om kako bi se redovito moglo uzorkovati na istom vertikalnom profilu, osim kada je na mjestu uzorkovanja fiksno postavljena bova.

Bez obzira uzorkuju li se duboki ili plitki sustavi, prije početka uzorkovanja uvijek je obavezno izmjeriti temperaturu i koncentraciju kisika u stupcu vode, na svakom metru dubine do 1 m od dna, a u dubokim jezerima po mogućnosti do dna ili do minimalne dubine od 30 m.

Prije početka uzorkovanja fitoplanktona u stratificiranim stajaćicama potrebno je odrediti dubinu eufotičke zone te temperaturnu stratifikaciju u stupcu vode. Dubina eufotičke zone se računa tako što se Secchi dubina pomnoži s koeficijentom 2,5 ($Z_{eu} = \text{Secchi dubina} \times 2,5$).

Reprezentativan uzorak fitoplanktona uzorkuje se prikladnim uzorkivačem.

Tijekom uzorkovanja oprema za uzorkovanje (uzorkivač) ne smije dotaknuti dno jezera kako se ne bi kontaminirao uzorak. U tom slučaju uzorkovanje treba ponoviti podalje od mjesta na kojem je uznemiren sediment kako bi se uzeo ispravan uzorak.

Bočice za uzorke moraju biti označene vodootpornim etiketama prije uzorkovanja kako bi se izbjegla zamjena uzoraka. Vodootporne etikete na bočicama mogu biti i prethodno računalno ispisane s praznim prostorom za dodatne podatke koji se upisuju na terenu. Za ručno pisanje po etiketama treba koristiti vodootporne flomastere.

Bočice s uzorcima trebaju biti dopremljene do laboratorija u neprozirnom, tamnom prijenosnom hladnjaku na 4 °C do 10 °C.

Poduzorci za dodatne analize fitoplanktona te uzorci za sve ostale fizikalno kemijske pokazatelje (npr. klorofil *a*, hranjive tvari itd.) trebaju biti uzeti iz istog izmiješanog uzorka iz kojeg je uzet uzorak fitoplanktona. To znači da uzorkovani volumen kompozitnog uzorka treba biti dovoljno velik za sve prateće analize.

Terenski protokol za uzorkovanje fitoplanktona u jezerima treba pripremiti prije odlaska na teren kao obrazac u klasičnom (papirnatom) obliku ili u elektroničkom obliku (primjerice na tabletu).

Uzorkovanje za kvalitativnu analizu

Kvalitativni uzorci (mrežni uzorci fitoplanktona) se uzorkuju planktonskom mrežicom promjera oka 10 do 25 µm. Uzorak se uzima potezom s jednake dubine s koje se uzima i kompozitni uzorak. Uzorak se uzima na način da se planktonska mrežica spusti do određene dubine te se lagano i jednakomjerno povlači prema površini. Uzorak koji se sakupio u posudi na kraju mrežice prelije se u pravilno označenu bočicu. Nakon uzimanja uzorka mrežicu je neophodno nekoliko puta do ruba obruča uroniti u jezersku vodu kako bi se isprao zaostali materijal na unutarnjim stjenkama mrežice te se i taj sadržaj dodaje u bočicu s uzorkom. Ukoliko se koristi planktonska mrežica koja na svom kraju ima ventil, mora se paziti da prilikom uzorkovanja i ispiranja isti bude zatvoren. Bočica s uzorkom se pohrani u prijenosni hladnjak tijekom transporta do laboratorija.

Nakon svakog uzorkovanja planktonska mrežica se na terenu mora dobro isprati vodom stajaćice, a potom u laboratoriju vodovodnom vodom kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije sljedećih uzoraka. U slučaju da se jedna mrežica koristi za više točaka uzorkovanja, na teren treba ponijeti čistu vodovodnu vodu kako bi se mrežica mogla isprati na samom terenu ili treba ponijeti nekoliko planktonskih mrežica.

NAPOMENA: Ako se kvalitativni, tzv. mrežni uzorci fitoplanktona koriste za kasniju determinaciju dijatomeja tada promjer oka na mrežici mora biti 10 µm. U slučaju visoke gustoće fitoplanktona i planktonske mrežice s promjerom oka 25 µm mogu se koristiti za analizu manjih frakcija jer se pore začepe te u mrežici ostanu i manje frakcije fitoplanktona.

Odabir načina uzorkovanja za kvantitativnu analizu

Kvantitativni uzorak fitoplanktona u jezerima je kompozitni uzorak uzet iz cijelog stupca vode posebnim uzorkivačima. Ovisno o tipu jezera te njegovoj stratificiranosti, prvo se odabire način uzorkovanja. U slučaju:

- a) Faze miješanja vode (nema temperaturne stratifikacije)

Tijekom faze miješanja vode u **plitkim jezerima** treba uzeti kompozitni uzorak iz cijelog stupca vode do dubine od 1 m iznad dna.

Tijekom faze miješanja vode u **dubokim jezerima** treba uzeti kompozitni uzorak najdublje do 20 m dubine ili do dubine 1 m iznad dna.

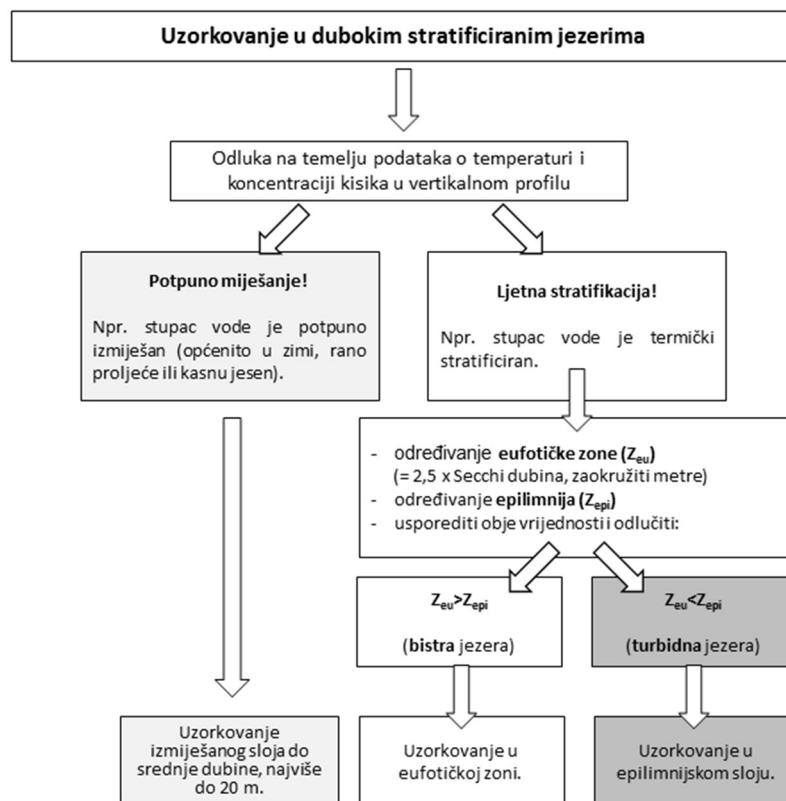
b) Faze ljetne stagnacije

Tijekom ljetne stagnacije u **polimiktičnim (plitkim)** jezerima (s najvećom dubinom ≤ 10 m) uzorkovanje seže do dubine od 6 m ili do dubine 1 m iznad dna.

Za uzorkovanje u stratificiranim (dubokim) jezerima (s najvećom dubinom ≥ 10 m) postoji razlika za uzorkovanje tijekom ljetne stagnacije ovisno o turbiditetu jezera:

- 1) Turbidna jezera kod kojih je dubina eufotičke zone manja od dubine epilimnija ($Z_{eu} < Z_{epi}$), kompozitni se uzorak dobiva uzorkovanjem cijelog stupca epilimnija.
- 2) Bistra jezera kod kojih je dubina eufotičke zone veća od dubine epilimnija ($Z_{eu} > Z_{epi}$), kompozitni se uzorak dobiva uzorkovanjem cijelog stupca eufotičke zone.

Način uzorkovanja u dubokim i stratificiranim jezerima shematski prikazuje slika 1.



Slika 1. Shema načina uzorkovanja fitoplanktona u dubokim i stratificiranim umjetnim stajaćicama i jezerima.

NAPOMENA: Plitka jezera definirana su kao polimiktična jezera. Njihova maksimalna dubina je najčešće ≤ 10 m, a srednja dubina manja od 3 m.

Uzorkovanje i priprema kompozitnog uzorka

Uzorkovanje kompozitnog uzorka integriranim uzorkivačem

Preporučena metoda za uzorkovanje fitoplanktona je uzorkovanje integriranim uzorkivačem. To je reprezentativna i najučinkovitija metoda, jer se uzorak iz cijelog stupca vode uzima kontinuirano. Na integriranom uzorkivaču se pomoću ručne jedinice programira dubina uzorkovanja, a potom se prema naznačenoj brzini na ručnoj jedinici spušta nešto dublje od željene dubine. Elektronički dio na uzorkivaču regulira uzimanje vode tijekom spuštanja, ako brzina nije konstantna zbog ljuljanja čamca, valova na vodi i slično. Sva voda iz uzorkivača se ispusti u plastičnu kantu kako bi se izbjeglo taloženje unutar samog uzorkivača. Kvantitativni uzorak fitoplanktona i uzorci za druge pokazatelje se uzimaju iz plastične kante.

Uzorkovanje i priprema kompozitnog uzorka uz pomoću dubinskog (cjevastog) uzorkivača

Kako bi se uzeo kompozitni uzorak cijelog vodenog stupca moguće je koristiti i standardne dubinske (cjevaste) uzorkivače.

Dubinski profil će biti pokriven uzimanjem poduzoraka u cijelom vodenom stupcu. Kada je dubina uzorkovanja kompozitnog uzorka unaprijed određena da ne prelazi dubinu od 10 m (plitka jezera ili turbidna jezera) udaljenost između poduzoraka ne smije biti veća od 1 m. Kada je dubina uzorkovanja kompozitnog uzorka unaprijed određena da prelazi dubinu od 10 m (duboka bistra jezera u kojima eufotički sloj i/ili epilimij prelaze 10 m), tada udaljenost između poduzoraka može biti najviše 2 m.

Poduzorci sakupljeni s različitih dubina se trebaju izmiješati u plastičnoj kanti s poklopcem kako bi uzorak tijekom miješanja bio zaštićen od direktnih sunčevih zraka ili vremenskih nepogoda poput kiše. Ovisno o broju poduzoraka, ukupni izmiješani volumen mora biti dostatan za uzimanje uzorka fitoplanktona i svih ostalih pratećih uzoraka (uzorci za koncentraciju hranjivih tvari, klorofila *a* itd.).

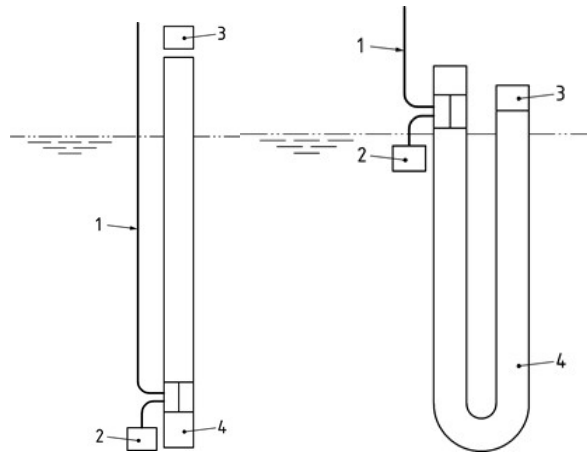
NAPOMENA: Uzorkivači s poklopcem ili čepom samo na jednoj strani pri čemu nije otvoren cijeli presjek uzorkivača prilikom spuštanja u vodu, ne preporučaju se (npr. Ruttnerova boca).

Uzorkovanje kompozitnog uzorka pomoću cijevi

Za uzorkovanje kompozitnog uzorka pomoću cijevi potrebna je silikonska cijev s minimalnim unutarnjim promjerom od 1,6 cm (ne gumena cijev), uže, gumeni čep i uteg (prsten napravljen od nehrđajućeg čelika na ulaznom dijelu cijevi).

Cijev na ulaznom dijelu ima učvršćen uteg od nehrđajućeg čelika na koji je privezano uže. Utog omogućava vertikalno postavljanje cijevi u vodenom stupcu (Slika 2). Uzimanje kompozitnog uzorka se obavlja tako da se cijev lagano okomito spušta u vodu s krajem na kojemu je uteg. Kada se cijev spusti na željenu dubinu, gornji kraj cijevi se začepi, a donji dio cijevi se lagano povuče na površinu pomoću užeta. Tako prikupljen uzorak vode prelije se u plastičnu kantu. Postupak se može ponoviti ako nije uzet dovoljan volumen vode za punjenje svih pratećih uzoraka (npr. klorofil *a* i hranjive tvari).

Nakon upotrebe, oprema se mora isprati vodovodnom vodom i prije pohrane dobro osušiti.



Slika 2. Način uzorkovanja kompozitnog uzorka fitoplanktona pomoću silikonske cijevi. 1 – Uže, 2 – Uteg; 3 – Čep; 4 – Cijev.

NAPOMENA: Uzorkovanje fitoplanktona po dubini ili integrirano uzorkovanje mora biti u skladu s normom za kvantitativno i kvalitativno uzorkovanje fitoplanktona u kopnenim vodama (HR EN 16698:2015).

3.1.2. Konzerviranje i pohrana uzoraka

Konzerviranje uzoraka

a) Direktni kompozitni uzorak

Direktni kompozitni uzorci fitoplanktona pohranjuju se u staklene bočice sa širokim grlom volumena 200-250 mL s dvostrukim čepom. Uzorci se fiksiraju Lugolovom otopinom. Kisela Lugolova otopina se koristi kada je pH vode < 7, a lužnata kada je pH vode > 7.

Standardno, uzorci se konzerviraju u omjeru 5 mL Lugolove otopine na 1 L uzorka što ovisi o gustoći algi u uzorku. Preporuka je za mezotrofna i posebice oligotrofna jezera ne koristiti više od 2 mL Lugolove otopine na 1 L uzorka, jer prekomjerna količina mijenja strukturu algi što otežava determinaciju. Općenito treba slijediti pravilo da konačna boja konzerviranog uzorka bude boja konjaka.

NAPOMENA: Nedostatak bezbojnog stakla bočica za uzorke je taj što je Lugolova otopina fotolabilna te je potrebno pažljivije čuvanje bočica u tami, dok je nedostatak bočica sa zatamnjenim staklom taj što se ne vidi boja uzorka koji je obojan Lugolovom otopinom te je boju uzorka potrebno provjeriti na drugi način, npr. kapalicom. No svakako je bolje uzorke stavljati u bočice od bezbojnog stakla i držati u zatamnjenom hladnjaku.

b) Mrežni kvalitativni uzorak

Mrežni kvalitativni uzorci fitoplanktona se spremaju u plastične bočice volumena do 100 mL. Uzorci se ne konzerviraju na terenu jer se koriste za determinaciju vrsta iz živog materijala. No nakon što je determinacija živog materijala gotova, uzorci se konzerviraju 96%-tnim etilnim alkoholom do konačne koncentracije od 20%. Tako konzervirani uzorci koriste se za izradu trajnih

preparata zbog determinacije dijatomeja. Ukoliko je potrebno sačuvati dio uzorka zbog potvrde determinacija pojedinih vrsta, on se može konzervirati formaldehidom do konačne koncentracije od 4%.

NAPOMENA: Ukoliko se koristi alkohol kao konzervans potrebno je prilikom označavanja bočica zamijeniti alkoholni marker uljnim markerom.

Pohrana uzoraka

a) Mrežni kvalitativni uzorci

Mrežni kvalitativni uzorci, tzv. živi uzorci moraju se čuvati u tami na temperaturi između 4 i 10°C. Uzorci sakupljeni u jezerima s visokom temperaturom vode trebaju se postepeno ohladiti kako ne bi došlo do oštećenja stanica fitoplanktona. Analiza živih uzoraka mora se provesti unutar 36 sati, a najbolje je pregledati ih u roku od 24 sata.

b) Konzervirani uzorci

Uzorci konzervirani Lugolovom otopinom (etilnim alkoholom ili formaldehidom) čuvaju se u tami na temperaturi između 4 i 8°C, osim ako nisu analizirani unutar 3 tjedna, kada mogu biti čuvani u tami na sobnoj temperaturi. Razina uzorka u bočici treba biti označena vodootpornim flomasterom prije skladištenja kako bi se znalo da li je dio uzorka ishlapio, što je vrlo bitno kod kasnijeg preračunavanja broja stanica.

NAPOMENA: Pohrana uzoraka u tami je važna zbog sprječavanja foto oksidacije. Maksimalno vrijeme pohrane uzoraka konzerviranih Lugolovom otopinom u tami na temperaturi između 4 i 8°C je godina dana, ali se uzorci moraju provjeravati s vremena na vrijeme i u njih dodavati Lugolova otopina u slučaju foto oksidacije. Čuvanje i skladištenje u dužem razdoblju od godine dana nije preporučljivo, a ako se mora učiniti tada se u uzorak dodaje formaldehid.

Označavanje i etiketiranje uzorka

Bočice s uzorcima moraju imati etiketu koja sadrži sljedeće podatke:

- šifra uzorka,
- naziv vodnog tijela stajačice,
- datum uzorkovanja,
- dubina uzorkovanja,
- naziv i šifra mjerne postaje.

3.1.3. Laboratorijska obrada uzoraka

Popis potrebne opreme pri mikroskopiranju uzoraka fitoplanktona

Za mikroskopiranje uzoraka fitoplanktona potrebna je sljedeća laboratorijska oprema:

- komorice za sedimentaciju po Utermöhl-u s cilindrima od 10, 50 i 100 mL i promjera 25 mm,

- invertni mikroskop s Nomarski i/ili faznim kontrastom koji sadržava:
- kondenzor s velikom radnom daljinom i numeričkom aperturom > 0,5,
- binokulare 10x ili 12,5x (od kojih jedan ima okularni mikrometar, ako se mjerenje ne vrši pomoću računalnog programa),
- objektivne 10x, 20x, 40x ili 60x i 100x s Nomarski i/ili faznim kontrastom,
- digitalnu kameru povezanu s računalom,
- mehaničko postolje,
- imerzijsko ulje,
- staklene kapalice, staklene čaše, boce štrcalice,
- predmetna i pokrovna stakalca i
- laboratorijski protokol.

NAPOMENA: Uz invertni mikroskop je potrebno imati i uspravan mikroskop s povećanjima 10x, 20x, 40x ili 60x i 100x s Nomarski i/ili faznim kontrastom zbog determinacije algi kremenjašica.

Sva oprema mora biti kalibrirana na određene ponuđene volumene posudica za sedimentaciju, veličine komorica te sva povećanja mikroskopa na kojem se određuje brojnost prema Savjetodavnoj norma za brojenje fitoplanktona pomoću invertnog mikroskopa (Utermöhl tehnikom) HRN EN 15204:2008.

Kvalitativna analiza

Kvalitativna analiza obuhvaća određivanje kvalitativnog sastava fitoplanktona (determinaciju vrsta) i ocjenu relativne brojnosti, što se postiže obradom mrežnog (živog) uzorka fitoplanktona.

Za određivanje kvalitativnog sastava fitoplanktona koristi se invertni ili klasični svjetlosni mikroskop s povećanjima 10x, 20x, 40x ili 60x i 100x s Nomarski i/ili faznim kontrastom. Analizu je potrebno napraviti na živom (nekonzerviranom) materijalu u roku od 24 sata od uzorkovanja, a u iznimnim slučajevima ju je moguće napraviti i u roku od 36 sati. Prilikom determinacije svakoj vrsti se dodjeljuje relativna brojnost od 1 do 5 prema skali u Tablici 7.

Tablica 7. Skala za ocjenu relativne brojnosti fitoplanktona.

Relativna brojnost	Opis
1	Povremena vrsta
2	Rijetka vrsta
3	Umjereno prisutna vrsta
4	Brojna vrsta
5	Masovno prisutna vrsta

3.1.4. Kvantitativna analiza

Postupak kvantitativne analize (određivanje brojnosti fitoplanktona) uključuje bilježenje uočenih vrsta i njihov broj na poznatoj površini komorice za brojanje. Kada su poznati površina i volumen cijele komorice izračuna se koncentracija svake pojedine vrste (broj stanica u litri, br.stan.L⁻¹).

Nadalje, kvantitativna analiza uključuje i mjerenje veličine svake pojedine vrste te izračunavanje njihovog biovolumena i preračunavanje u biomasu, koja se uz poznatu površinu i volumen cijele komorice preračuna u koncentraciju (mg L⁻¹).

NAPOMENA: Kvantitativna analiza uzoraka fitoplanktona se provodi prema Savjetodavnoj normi za brojenje fitoplanktona pomoću invertnog mikroskopa (Utermöhl tehnikom) HRN EN 15204:2008, a mjerenje i računanje biovolumena i biomase prema Savjetodavnoj normi za procjenu biovolumena fitoplanktona (HRN EN 16695:2015).

Priprema uzoraka za analizu

Prije analize, uzorci se izvade iz hladnjaka i ostave na sobnoj temperaturi da se temperiraju.

Homogenizacija uzorka

Tijekom skladištenja uzorka, suspendirane čestice se talože na dno pri čemu može doći do agregacije ili adhezije algi iz fitoplanktona na suspendirane čestice ili na druge alge. Resuspenzija se postiže vrlo nježnim protresanjem uzorka. To se može učiniti ručno ili mehanički, pomoću aparata za trodimenzionalno miješanje uzoraka (npr. po Paul-Schatz načelu).

Ručna homogenizacija uzoraka se uvijek mora obavljati na jednak način kako bi se smanjila standardna pogreška. Preporuča se homogenizirati uzorak kombinacijom vodoravnog kotrljanja bočice i okomitog okretanja. Broj okreta mora jasno biti definiran i identičan za sve uzorke.

NAPOMENA: Naglo protresanje bočice uzrokuje stvaranje mjehurića zraka koji otežavaju ujednačeno taloženje materijala, a također i razara kolonijalne oblike što može dovesti do pogreške u determinaciji ili brojenju te se svakako treba izbjeći.

3.1.5. Pripremanje poduzorka i punjenje sedimentacijske komorice

Nakon homogenizacije, komorica se puni ulijevanjem određenog volumena uzorka u sedimentacijsku kolonu ili cilindar za sedimentiranje. Pravilno punjenje komorice je iznimno važno, jer utječe na krajnju raspodjelu čestica u komorici. Nasumična raspodjela čestica u komorici omogućuje ujednačeno brojenje te osigurava točnost.

Komorica se napuni direktnim prelijevanjem homogeniziranog uzorka iz bočice. Točan volumen uzorka koji se taloži ovisi o gustoći algi. Za oligotrofna jezera najčešće je potrebno istaložiti i do 100 mL uzorka. Kada je u uzorku prisutna velika koncentracija suspendiranog materijala, potrebno je razrijediti homogenizirani uzorak. Razrjeđenje se priprema na način da se

staklenom ili automatskom pipetom uzme određeni volumen uzorka koji se zatim ispusti u cilindar sedimentacijske komorice. Ostatak cilindra se do vrha ispuni filtriranom vodovodnom vodom u koju je dodana otprilike jednaka koncentracija Lugolove otopine u odnosu na koncentraciju u uzorku. Također je preporučljivo sve manje volumene uzorka (npr. 2 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL i 25 mL itd.) sedimentirati u cilindrima od 50 mL s dodatkom vode kako bi se osigurala ravnomjerna raspodjela čestica u sedimentacijskoj komorici.

Za optimalno punjenje sedimentacijske komorice treba paziti da je sav korišten pribor temperiran na sobnu temperaturu. Komorica se postavlja na vodoravnu površinu i puni uzorkom u jednom potezu tako da na površini sedimentacijskog cilindra ne ostane zraka. Sedimentacijski cilindar se zatim poklopi pokrovnim staklom pri čemu se mora izbjeći zadržavanje mjehurića zraka. Sedimentacija se odvija u tami na čvrstoj vodoravnoj površini koja nije podložna utjecaju vanjskih vibracija. Trajanje sedimentacije uzoraka konzerviranih Lugolovom otopinom prikazano je u Tablici 8.

Tablica 8. Vrijeme sedimentacije za uzorke konzervirane Lugolovom otopinom.

Volumen sedimentacijske komorice-cilindra (mL)	Visina cilindra (cm)	Vrijeme potrebno za sedimentaciju (h)
2	1	3
10	2	8
25	5	12
50	10	24
100	20	48

Nakon što je sedimentiranje uzorka završeno, sedimentacijski se cilindar izmakne pomoću kvadratnog stakla za odstranjivanje sedimentacijskog cilindra te se na taj način zatvori komorica. Pri postupku zatvaranja komorice treba izbjegavati stvaranje mjehurića zraka što se može postići tako da se prije uklanjanja cilindra, pomoću kapalice doda malo vode uz rub cilindra i tek tada izmakne. Kada je komorica zatvorena spremna je za mikroskopiranje. Pri tome treba paziti da se komorica do mikroskopa prenese vrlo pažljivo kako ne bi došlo do pomicanja istaloženih čestica.

NAPOMENA: Važno je da je otvor pipete ili nastavka na automatskoj pipeti dovoljno velik kako velikim algama (npr. Ceratium hirundinella) ne bi bio onemogućen ulaz. Predugo sedimentiranje (nekoliko dana) uzrokuje nastajanje mjehurića zraka koji onemogućavaju mikroskopiranje. Ukoliko su u uzorku prisutne vrste koje zbog svoje strukture ne tonu (npr. cijanobakterije sa zračnim vakuolama; Botryococcus sp. s nakupinama lipida) u uzorak se može dodati 5 do 10 kapi ledene octene kiseline direktno prije homogeniziranja.

3.1.6. Mikroskopiranje uzorka za kvantitativnu analizu

Izbor načina brojenja ovisi o gustoći algi u uzorku. Strategije brojenja mogu biti sljedeće:

- brojenje unutar probnih polja – neovisno o povećanju, broje se alge u probnim poljima koje može predstavljati vidno polje ili polje mrežice postavljene u okular (Slika 3a);
- brojenje unutar transekata – neovisno o povećanju, broje se alge u transektu, bilo širine vidnog polja ili mrežice u okularu (Slika 3b);

- c) brojenje unutar cijele komorice – na velikom povećanju od 100x pregledava se pola ili cijela komorica prilikom čega se broje vrste velikih dimenzija, npr. *Ceratium hirundinella* (Slika 3c).

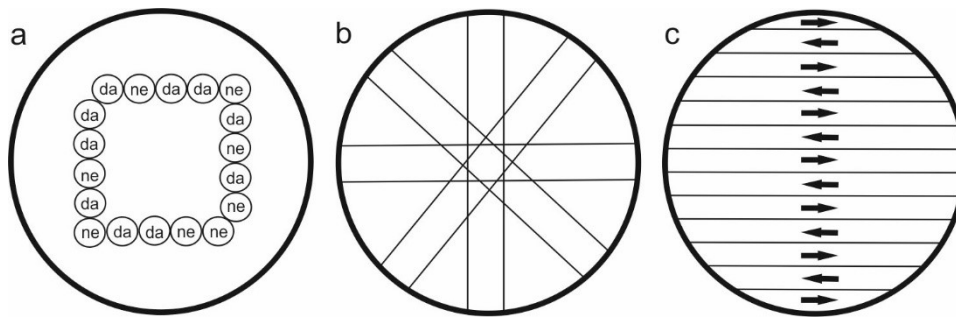
Kvantitativna analiza (brojanje stanica) obuhvaća tri koraka:

1. Na velikom povećanju od 400x korištenjem probnih polja ili transekata treba prebrojati vrste malih dimenzija. Potrebno je prebrojati onoliko vidnih polja ili transekata kako bi se izbrojalo najmanje 400 jedinica (stanica, cenobija, kolonija ili filamenata);
2. Prebrojati 1-4 transekta na povećanju od 200x kako bi se prebrojale srednje velike vrste koje su premale za brojanje na malom povećanju, ali prevelike da bi ih se moglo kvalitetno pregledati korištenjem probnih polja na velikom povećanju;
3. Na malom povećanju od 100x treba prebrojati pola ili cijelu komoricu kako bi se prebrojale velike vrste. Komoricu treba pregledati detaljnim nizom horizontalnih transekata i prebrojati vrste velikih dimenzija (npr. *Ceratium* spp.), velike kolonije ili nitaste oblike (npr. *Microcystis* spp., *Fragilaria* spp. itd.) i rijetke vrste.

Kod brojanja stanica metodom slučajnih polja treba imati dosljedan pristup u odlučivanju koje će se od stanica na rubu mrežice brojati. Jednostavno pravilo usvojeno u metodi HRN EN 15204:2008 glasi: stanice, kolonije ili filamenti koji prelaze ili se sijeku s gornjim rubom i lijevom stranom mrežice se ne broje, dok oni objekti koji prelaze dno ili desnu stranu mrežice se broje. U slučaju kad vidno polje označava probno polje, stanice, kolonije ili filamenti koji prelaze ili se sijeku s rubom lijeve polovice vidnog polja se ne broje, a oni objekti koji prelaze rub desne polovice vidnog polja se broje.

3.1.7. Strategije brojanja

1. brojanje jedinica algi u nasumično odabranim probnim poljima - prikladno za brojanje algi malih i srednjih veličina u uzorcima visoke gustoće
2. brojanje jedinica algi u transektu - prikladno za brojanje algi male i srednje veličine u uzorcima srednje gustoće
3. brojanje jedinica algi u cijelim komoricama - prikladno za brojanje vrsta male i srednje veličine u uzorcima male gustoće i za brojanje vrsta velikih veličina u uzorcima, bez ograničenja na njihovu gustoću u uzorku.



Slika 3. Metoda brojanja u nasumično odabranim probnim poljima, u transektu i u cijeloj komorici (prema Breirley i sur., 2007.).

Posebne smjernice:

- Kolonije roda *Microcystis* broje se u cijeloj komorici ili u transektu, dok se pojedinačne stanice istog roda (prisutne ukoliko su kolonije raspadnute) broje slučajnim odabirom polja. Slični primjeri istih rodova algi s različitim pristupom u brojanju uključuju: kolonijalne oblike (*Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Coelomoron*, *Coelosphaerium*, *Cyanodictyon*, *Cyanonephron*, *Gomphosphaeria*, *Radiocystis*, *Snowella*, *Woronichinia*, *Coelosphaerium*, *Planktosphaeria*, *Sphaerocystis*), vrste prisutne i kao pojedinačne stanice i kao kolonije (*Aulacoseira*, *Dinobryon*, *Melosira*), cenobijalne oblike (*Desmodesmus/Scenedesmus*, *Pandorina*, *Crucigenia*) te nitaste oblike (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*).
- Vrste kod kojih je prisutna visoka varijabilnost u veličini stanica mogu se razvrstati u veličinske kategorije npr. *Cryptomonadales*: <16 μm , 16-26 μm , >26 μm ili *Bacillariophyceae*: <8 μm , 8-14 μm , 14-20 μm , >20 μm . Veličinske kategorije se mogu razlikovati u pojedinim staništima.
- Brojanje kod kolonijalnih i nitastih oblika obuhvaća prebrojavanje svih stanica u cijeloj koloniji odnosno niti. Ukoliko je kolonija izrazito velika ili su pak stanice u koloniji vrlo male, tada se direktno prebrojavanje radi na najmanje 30 manjih segmenata te se izračuna srednja vrijednost broja stanica u odnosu na prosječnu veličinu segmenta. Pomoću tako dobivene mjerne jedinice radi se procjena omjera mjerne jedinice i stvarne kolonije. Kod oblika čiji talus stvara spiralne niti (*Anabaena* spp.), izbroji se srednji broj stanica po navoju spirale te se procijeni broj navoja po niti. Umnožak tih dvaju brojeva daje procijenjeni broj stanica po filamentu. Unatoč informaciji o broju stanica u pojedinim kolonijalnim oblicima, filamentima i cenobijima, kada se primjenjuje pravilo iz prvog koraka koje se odnosi na
- brojenja najmanje 400 jedinica, tada kolonija, filament ili cenobij označavaju jednu jedinicu.
- Prazne silikatne ljušturice algi kremenjašica se ne broje, dok se prazne lorike vrsta poput *Dinobryon* spp. broje jer je najčešći slučaj da je zbog konzerviranja uzorka sama stanica ispala iz lorike.

3.1.8. Čišćenje dijatomejskog uzorka i izrada trajnih preparata

Za precizno određivanje dijatomeja u uzorku fitoplanktona potrebno je pripremiti trajne preparate prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2.

3.1.9. Mikroskopiranje uzorka fitoplanktona za kvantitativnu analizu dijatomeja

Kako je većinu dijatomeja nemoguće determinirati prilikom kvalitativne analize uzorka pri zadanim povećanjima (100, 200 i 400x), one se broje opisno ili u veličinskim kategorijama. Za svaku se pojedinu veličinsku ili opisnu kategoriju dijatomeja (npr. male centrice, srednje velike centrice, tanka *Fragilaria*) odrede udjeli pojedinih vrsta u trajnom preparatu na povećanju od 1000x. Udjeli se dobiju tako da se odrede vrste unutar minimalno 20 nasumično prebrojanih algi. Konačan broj pojedinih vrsta se dobije tako da se dobiveni udjeli veličinske ili opisne kategorije primijene na izbrojenu vrijednost iste.

3.1.10. Izračunavanje broja stanica

Broj prebrojanih stanica potrebno je preračunati na broj stanica po litri (br.stan. L⁻¹). To se radi pomoću sljedeće formule:

$$N = x \cdot \eta$$

gdje je:

N – broj stanica po litri (br. L⁻¹)

x – ukupan broj svih prebrojanih stanica, cenobija, kolonija ili filamenata u transektima, probnim poljima ili komorici

η – koeficijent za preračunavanje

Koeficijent za preračunavanje (η) se računa prema sljedećoj formuli:

$$\eta = \frac{P_k \cdot 1000}{P_x \cdot V_s}$$

gdje je:

η – koeficijent za preračunavanje

P_k – površina komorice izražena u mm² ili u postotku (100 %)

P_x – površina transektu ili svih probnih polja izražena u mm² ili u postotku (x %)

V_s – volumen poduzorka koji se sedimentirao (mL)

3.1.11. Izračunavanje biomase fitoplanktona

Brojnost prebrojanih stanica vrsta u fitoplanktonu ne odražava nužno stvaran omjer jedne vrste u ukupnoj biomasi zajednice fitoplanktona. Nekoliko velikih prebrojanih stanica ili jedinica (cenobiji, kolonije, filamentu) može značajnije doprinijeti ukupnoj biomasi nego mnogo sitnih stanica. Stoga je biomasa relevantnija mjera od brojnosti fitoplanktona kod ocjene ekološkog stanja i važno ju je točno izračunati.

Princip izračunavanja biomase

Svaka vrsta fitoplanktona se opisuje najsličnijim (po mogućnosti što jednostavnijim) geometrijskim tijelom. Ako nije moguće neku vrstu opisati jednostavnim geometrijskim tijelom, tada se koriste kombinacije geometrijskih tijela (npr. stožac s pola kugle) ili njihovi dijelovi (npr. pola kugle). U većini slučajeva dodjela geometrijskog tijela mora biti zasnovana na jednoj stanici, no kod kolonijalnih oblika gdje je teško raspoznati oblik pojedine stanice može se koristiti geometrijsko tijelo cijele kolonije.

NAPOMENA: Popis geometrijskih tijela s formulama za računanje njihovih volumena, popis algi s pripadajućim geometrijskim tijelima te faktori preračunavanja za treću dimenziju koja često nije vidljiva dati su u Savjetodavnoj normi za procjenu biovolumena fitoplanktona (HRN EN 16695:2015). Moguća su odstupanja od preporučenih izračuna zbog specifičnosti oblika pojedinih svojti, a ako se odstupa, to mora jasno biti naznačeno u procesu izračuna.

Određivanje potrebnih dimenzija

Potrebne dimenzije (npr. promjer, visina, dužina, širina itd.) pripadajućeg geometrijskog tijela trebaju se izmjeriti za svaku vrstu. Barem 20 jedinki iste vrste treba izmjeriti kako bi se osiguralo da standardna pogreška bude < 10%. Ako je varijabilnost u veličini pojedine vrste mala, tada se može izmjeriti samo 5-10 stanica. Isto tako, ako je u uzorku utvrđeno samo nekoliko stanica pojedine vrste, moguće je izmjeriti i manje.

Mjerenje stanica zahtijeva puno vremena, stoga se u monitoringu mogu primjenjivati srednje vrijednosti stanica izračunate vlastitim mjerenjima u prijašnjim godinama istraživanja za isto područje. Tijekom ovakvog postupanja s vremena na vrijeme potrebno je provjeravati da li dimenzije odgovaraju trenutnim srednjim vrijednostima.

Mjerenje se provodi pomoću okularnog mikrometra ili digitalne kamere i odgovarajućeg računalnog programa. Obavlja se tijekom brojenja stanica na što većem povećanju zbog što veće preciznosti, ali tako da cijela stanica stane u vidno polje. Okularni mikrometar ili digitalna kamera s odgovarajućim računalnim programom moraju biti kalibrirani pomoću umjerenog mikrometarskog preparata i to za svaki okular svakog mikroskopa posebno.

Izračunavanje biomase

Na temelju računanja volumena pripadajućih geometrijskih tijela algi i cijanobakterija dobiva se volumen koji se naziva biovolumen i on se izražava u jedinicama mm^3L^{-1} . S pretpostavkom da je gustoća algi i cijanobakterija jednaka gustoći vode (1 gcm^{-3}) biomasa se iz biovolumena pretvara na sljedeći način:

$$1 \text{ mm}^3\text{L}^{-1} = 1 \text{ cm}^3\text{m}^3 = 1 \text{ mgL}^{-1}$$

$$1 \text{ mm}^3\text{m}^3 = 10^6 \mu\text{m}^3\text{L}^{-1} = 1 \mu\text{gL}^{-1}$$

Ukupna biomasa stanica pojedine svojte dobije se tako da se izračunata biomasa stanice pomnoži s ukupnim brojem stanica. Ukupna biomasa fitoplanktona jednog uzorka zbroj je svih biomasa utvrđenih svojti.

3.1.12. Terenski protokol za uzorkovanje fitoplanktona u jezerima

Terenski protokol za uzorkovanje fitoplanktona se obavezno popunjava na terenu, a mora sadržavati sljedeće podatke:

- šifra mjerne postaje,
- ime osobe koja uzorkuje,
- vrijeme i datum uzorkovanja,
- dubinu s koje se uzorkuje,
- način uzorkovanja/tip uzorkivača (integrirano, po dubini - integrirani, dubinski, cijev za kompozitno uzorkovanje),
- stupac uzorkovanja (eufotička zona, epilimnij, cijeli stupac za plitka jezera),
- način konzerviranja,
- vrijednosti temperature vode, koncentracije i zasićenja kisika u vodi izmjerene od površine do min 30 m ili do 1 m iznad dna s učestalošću mjerenja od 1 m,
- dubinu epilimnija,
- prozirnost (Secchi dubina) i dubinu eufotičke zone,
- popis uzetih uzoraka (mrežni uzorak, direktni kompozitni uzorak i sl.) i
- ostala opažanja koja nisu obuhvaćena gore navedenim unijeti u rubriku napomene

3.2. Biološki element kakvoće fitobentos

Fitobentos kao indikator ekološkog stanja voda koristi se iz nekoliko razloga:

- lako se uzorkuje standardnim i provjerenim metodama,
- predvidljivo reagira na promjene kakvoće vode te predstavlja taksonomski vrlo raznoliku skupinu unutar zajednica,
- ima generacijsko vrijeme u trajanju od nekoliko sati do nekoliko dana,
- dominantna je komponenta perifitona (obraštaja),
- primarni su producenti te objedinjuje fizikalna i kemijska svojstva vode što ga čini skupinom koja prva reagira na promjene u okolišu,
- vrijeme odgovora na stres je brzo, kao i oporavak od njega,
- zajednica sadrži veliki broj vrsta čime rezultati praćenja postaju prikladni za detaljne statističke analize,
- ponovno naseljavanje supstrata je daleko brže nego kod ostalih skupina,
- većina alga se može odrediti do razine vrste (od strane stručnjaka, algologa), a za mnoge vrste su poznate granice tolerancije ili osjetljivosti na specifične promjene okolišnih uvjeta.

U zajednici fitobentosa posebno dobri pokazatelji, dugoročnih i kratkoročnih okolišnih promjena u jezeru, su alge kremenjašice ili dijatomeje jer su ubikvisti i obitavaju u svim vrstama staništa. Metode ocjene ekološkog stanja samo na temelju dijatomeja, koje se baziraju na trofičkom sustavu, daju dobru informaciju o ekološkom stanju vode.

Pri korištenju fitobentosa u ocjeni tijela površinske vode treba poštovati određena pravila kao što su:

- dobro taksonomsko poznavanje vrsta na uzorkovanom području,
- korištenje standardnih protokola uzorkovanja i njihovo točno izvođenje i
- jasno definiranje korištene metode (indeksa) za ocjenu ekološkog stanja.

Postupci uzorkovanja i analize fitobentoskih alga u jezerima sukladni su uzorkovanjima u akumulacijama i umjetnim stajaćicama te uz manje izmjene i nadopune slijedi metodologiju studije Mihaljević i sur. (2018): "Klasifikacijski sustav ekološkog potencijala za umjetna i znatno promijenjena tijela površinskih voda – 2. dio: Stajaćice Dinaridske ekoregije".

3.2.1. Uzorkovanje

Vrijeme uzorkovanja

Uzorkovanje treba obaviti u proljeće (najpovoljnije u svibnju) u litoralnoj zoni jezera.

Mjesto uzorkovanja

Kao mjesto uzorkovanja izabere se osunčani odsječak od 100 m na kojem se zatim izabere kraći reprezentativni dio. Uzorkuje se do dubine od 60 cm. Pri izboru mjesta uzorkovanja treba izbjegavati mjesta s dotjecanjem, odnosno istjecanjem jezerske vode te dobro procijeniti dionicu na kojoj se planira uzorkovanje (dubina, osvjetljenost, sastav i zastupljenost vrsta podloge i sl.).

Uzorkuje se pri stabilnom vodostaju, što znači da najmanje 4 tjedna razina vode mora biti stabilna kako bi se ponovno uspostavila optimalna kolonizacija potopljenog supstrata algama. Promjene u kvalitativnoj zastupljenosti vrsta alga, često se mogu makroskopski vidjeti kao promjene boje i teksture samog supstrata (tamno zelene, zelene ili smeđe nakupine) Takve je podatke potrebo unijeti u terenski protokol.

Oprema potrebna za uzorkovanje

Popis potrebne terenske opreme za uzorkovanje:

- terenski protokol i grafitna olovka,
- vodootporani flomaster,
- uljni flomaster (otporan na alkohol i vodu),
- grabilo,
- četkica za zube,
- skalpel,
- pinceta,
- škare,
- žličica,
- lopatica,
- plastična kadica,
- plastična ili metalna pločica,
- kapalica,
- staklena čaša,
- boca s sterilnom vodovodnom ili destiliranom vodom,
- bočice sa širokim grlom za spremanje uzoraka označene odgovarajućom oznakom,
- otopina za fiksiranje uzorka,
- vodootporni fotoaparata,
- GPS uređaj,
- elektronička naprava za mjerenje osnovnih fizikalno-kemijskih pokazatelja u vodi (pH metar, konduktometar, oksimetar),
- gumene čizme (ribarske duge i/ili s naramenicama),
- zaštitna i terenska oprema: kabanica, jakna, hlače, terenske cipele, kapa ili šešir, krema sa zaštitnim faktorom protiv UV zračenja,
- pojas za spašavanje i
- terenska torbica za prvu pomoć.

Metoda uzorkovanja

Uzorci se uzimaju sa supstrata koji je stalno potopljen u vodi. Uzorkovanje se obavlja po načelu „uzorkovanje jednog mikrostaništa“ (eng.: „*single habitat sampling*“). Uzorkuje se mineralni supstrat, odnosno 5 kamena s različitih mjesta na uzorkovanom odsječku. U slučaju kada u litoralu jezera nema reprezentativnog mineralnog mikrostaništa, kamena, treba uzorkovati alternativno mikrostanište, poput emerzne vodene vegetacije. Kod kamene podloge se sa skalpelom i četkicom, ostruže nastali obraštaj. Kod uzimaju uzoraka sa makrofita uzrokuju pet komada u dužini od 10 cm koji su bili stalno potopljeni u vodi (Tablica 9, 10).

Uzorkovanje s mineralnog supstrata

Najbolji supstrat za prikupljanje uzoraka fitobentosa je mineralni mesolithal (kamenje promjera od 6 cm do 20 cm). Uzorak fitobentosa prikuplja se s najmanje pet kamena koji moraju

biti potopljeni najmanje četiri tjedna kako bi se prikupio potpuno razvijen biofilm. Ako na mjestu uzorkovanja nije dostupno kamenje navedenih veličina, uzorci se prikupljaju s pet većih kamena (promjera > 20 cm) ili deset manjih kamena (promjera od 2 cm i do 6 cm).

Nakon odabira, mineralna se podloga, kao i svi labavo pričvršćeni površinski elementi, ispiru vodom. Podloga se potom stavlja u plastičnu kadicu koja sadrži 30-50 ml vodovodne ili destilirane vode, a biofilm se pomoću skalpela i četkice ispiru u kadicu. Nakon homogenizacije, uzorak se iz kadice prebaci u bočicu za pohranu i fiksira.

Uzorkovanje s emergentnih makrofita

U slučaju emerznih makrofita uzorci se prikupljaju samo s dijelova koji su trajno potopljeni i koji nisu u doticaju s dnom.

Uzorak s makrofitske vegetacije prikuplja se rezanjem pet stabljika u visini vodene površine i na najnižem dijelu, nakon čega se gornji dijelovi stabljika koji nisu trajno uronjeni uklanjaju.

Nakon toga slijede dvije mogućnosti:

- 1) direktno na terenu sastrugati biofilm s dijelova stabljika pomoću noža, skalpela ili četkice u plastičnu posudu koja sadrži 30-50 ml sterilizirane vode. Nakon homogenizacije, uzorak se iz posude prebaci u bočicu za pohranu i fiksira.
- 2) staviti stabljike u bočice za pohranu sa steriliziranom vodom te uzorak prenijeti u laboratorij. Postupak čišćenja u laboratoriju isti je kao i na terenu.

Tablica 9. Očekivani prirodni supstrata u jezerima

Naziv jezera	Supstrat
Kozjak, NP Plitvička jezera	Mesolithal
Prošće, NP Plitvička jezera	Mesolithal
Vransko jezero, Cres	Mesolithal
Bačinska jezera, Crniševo	Trska (<i>Phragmites australis</i>)
Bačinska jezera, Oćuša	Trska (<i>Phragmites australis</i>)
Visovačko jezero	Mesolithal
Vransko jezero, PP Vransko jezero	Mesolithal

Tablica 10. Postupci uzorkovanja fitobentosa s prirodnog supstrata u jezerima

Tip supstrata	Postupak uzorkovanja
Tvrdi pomični supstrat: kamenje.	1 Izvaditi pet kamena veličine 6 – 25 cm iz litoralne zone jezera
	2 Supstrat staviti u plastičnu kadicu uz dodatak vodovodne ili destilirane vode
	3 Supstrat u kadici fotografirati
	4 Skalpelom ili četkicom potpuno sastrugati gornju površinu supstrata uz ispiranje korištenog alata i supstrata vodom koja se nalazi u kadici
	5 Supstrat vratiti u jezero
	6 Uzorak pohraniti u pravilno označenu bočicu i fiksirati

	<p>Uzorkovanje s emerznih makrofita (<i>Phragmites australis</i> (trska), <i>Scirpus</i> spp. (oblič) i <i>Cladium mariscus</i> (močvarni ljutak))</p>
Mekani pomični supstrat: makrofita.	<ol style="list-style-type: none"> 1 Izvaditi reprezentativne dijelove emergentnih makrofita iz litoralne zone jezera. U slučaju emergentnih makrofita uzorci se prikupljaju samo s dijelova koji su trajno potopljani i koji nisu u doticaju s dnom 2 Dijelove pet stabiljka makrofita staviti u plastičnu kadu uz dodatak 30-50 ml vodovodne ili destilirane vode 3 Supstrat u kadici fotografirati 4 Skalpelom ili četkicom potpuno sastrugati gornju površinu makrofita uz ispiranje korištenog alata i makrofita vodom koja se nalazi u kadici 5 Supstrat vratiti u jezero, a isprani materijal (ukoliko u kadici ima previše vode) nakon sedimentiranja pažljivo dekantirati 6 Uzorak pohraniti u pravilno označenu bočicu i fiksirati <p><i>Napomena: Stabiljke se mogu i pohraniti u bočice za pohranu sa sterilnom vodovodnom ili destiliranom vodom te uzorak prenijeti u laboratorij. Postupak čišćenja u laboratoriju isti je kao i na terenu.</i></p>
	<ol style="list-style-type: none"> 5 Fiksirati uzorak

Svaki sabrani uzorak neophodno je pohraniti u bočice koje moraju biti pravilno označene:

- naziv jezera,
- naziv mjesta uzorkovanja,
- datum i vrijeme uzorkovanja i
- tip supstrata s kojeg je uzet uzorak.

Tijekom uzorkovanja fitobentosa, na mjestu uzorkovanja izmjeri se temperatura vode, pH, električna vodljivost, zasićenost vode kisikom i koncentracija otopljenog kisika u vodi. U terenski obrazac upisuju se i podaci o trenutnom vodostaju.

Ukoliko se za struganje fitobentosa koristi četkica, svakako se preporučuje uvijek koristiti novu četkicu.

Za fiksaciju uzoraka koristi se etilni alkohol uz napomenu da konačna koncentracija u uzorku treba biti 20% (etilni alkohol).

NAPOMENA: Ukoliko se koristi alkohol kao konzervans potrebno je prilikom označavanja bočica zamijeniti alkoholni marker uljnim markerom.

3.2.2. Laboratorijska obrada uzoraka

Oprema potrebna za laboratorijski rad

- električna ploča za zagrijavanje uzorka,
- Erlenmeyerove tikvice od 100 mL,
- kuglice za vrenje,
- staklene epruvete za centrifugiranje (cca 15 mL),
- centrifuga,
- laboratorijska digitalna vaga,
- bočice za pohranjivanje dobivenih uzoraka,
- predmetna stakalca,
- pokrovna stakalca,
- kapalice,
- plamenik,
- Naphrax ili neka druga smola za izradu trajnih preparata,
- drvena štupaljka,
- drveni štapić,
- stakleni štapić,
- zaštitne naočale,
- histološka iglica,
- vakum sisaljka,
- kemikalije,
- destilirana voda i
- imerzijsko ulje.

binokularni mikroskop s Nomarski kontrastom koji sadržava:

- a) binokulare 10x ili 12,5x
- b) objektiv 100x s Nomarski kontrastom,
- c) digitalnu kameru povezanu s računalom i
- d) mehaničko postolje.

Čišćenje dijatomejskog uzorka i izrada trajnih preparata

Za precizno određivanje dijatomeja potrebno je pripremiti trajne preparate.

Ispiranje uzorka - Kod pripreme trajnih preparata iz materijala fiksiranog etilnim alkoholom, ispiranje destiliranom vodom nije potrebno.

Metoda 1.

Uklanjanje organske tvari iz uzorka provodi se u epruvetama ili Erlenmayerovim tikvicama dodavanjem zasićene otopine kalijevog permanganata (KMnO₄). U prethodno označene epruvete, otopina se dodaje u jednakom omjeru (1 mL) u odnosu na uzorak. Ovisno o količini organske tvari, uzorak poprima smeđu boju kao rezultat oksidativnog učinka kalijevog permanganata. Purpurna boja ukazuje na manju količinu organske tvari. Tako pripremljen uzorak, ostavlja se 24 sata kako bi razgradnja organske tvari bila potpuna.

Uklanjanje karbonata iz uzorka provodi se nakon 24 sata dodatkom 37%-tne klorovodične kiseline (HCl). Nakon reakcije koja se razvija dodatkom nekoliko kapi kiseline, u uzorak se dodaje HCl u ukupnom volumenu od 2 mL. Nakon toga, uzorak se stavlja u vodenu kupelj i kuha 45 min na srednjoj temperaturi sve do obezbojenja (ili žućkaste boje). Kuhanjem uzoraka u Erlenmayerim tikvicama obavlja se uz obavezan dodatak kuglica za vrenje. Uzorci se potom moraju ohladiti, na sobnoj temperaturi ili u hladnoj vodi. Ako organska tvar nije u potpunosti razgrađena, u uzorak se dodaje 5 mL 30%-tnog vodikovog peroksida (H₂O₂), koji će kroz daljnje kuhanje oksidirati preostalu organsku tvar i obezbojiti uzorak.

Tako očišćen uzorak potrebno je ispirati dodatkom vodovodne vode te centrifugiranjem (7 min/2000 RPM) dok se ne postigne pH 6-7. Za ispiranje zadnje u nizu koristi se destilirana voda. Nakon postignutog neutralnog pH, uzorak je spreman za izradu trajnih preparata.

Svi navedena dodavanja kiselina, kuhanje uzoraka te prva dva ispiranja uzoraka obavljaju se isključivo u digestoru.

Metoda 2.

Uklanjanje karbonata iz uzorka - da bi se iz materijala uklonio kalcijev ili magnezijev karbonat uzorku se dodaje u jednakom volumenu 25%-tna klorovodična kiselina. Uzorak se kuha oko 30 minuta na 200 °C. Nakon završene reakcije (pjenjenje uzorka) kalcijevog ili magnezijevog karbonata i klorovodične kiseline uzorak se ispire destiliranom vodom (dodaje se destilirana voda i centrifugira (7 min/2000 RPM) koji se ponavlja 4 puta. Ukoliko je uzorak sakupljen u vodotoku s niskom koncentracijom karbonatnih iona, dodavanje klorovodične kiseline nije potrebno.

Uklanjanje organske tvari iz uzorka - provodi se u epruvetama s debelim dnom ili Erlenmeyerovim tikvicama dodavanjem 96% sumporne kiseline u dvostrukom omjeru u odnosu na talog (uzorak). Smjesa uzorka i kiseline pažljivo se zagrijava na plinskom plameniku do pojave bijelih para, kada se uzorak zacrni. Uzorak se potom malo ohladi, doda se H₂O₂ (2 mL ili više, ovisi o uzorku), pa se opet zagrijava. Ukoliko u uzorku ima malo organske tvari smjesa se sama obezboji, a ukoliko ima puno organske tvari smjesa ostaje crna te se uzorku doda još H₂O₂ koji će smjesu obezbojiti. Obezbojeni se uzorak ponovo ispire destiliranom vodom te centrifugiranjem (7 min/2000 RPM) dok se ne postigne pH 6-7.

Izrada trajnih preparata

Uzorak pripremljen na gore opisani način, uz dodatak destilirane vode pohranjuje se u čiste i pravilno označene bočice.

U nastavku izrade trajnih preparata, ukoliko je potrebno obzirom na kvalitetu, pokrovno stakalce treba uroniti u 0,1 M H₂SO₄, isprati u destiliranoj vodi i osušiti.

Na tako pripremljenu pokrovnicu nanese se ona količina uzorka koja u potpunosti prekriva površinu pokrovnog stakalca. Pri nakapavanju uzorka neophodno je procijeniti optimalnu gustoću frustula. Mliječno bijelaj suspenziji dodaje se destilirana voda kako bi se smanjila gustoća frustula. Nakapavanje uzorka optimalne gustoća važno je radi lakšeg određivanja i brojenja frustula. Uzorak raspoređen po cijeloj površini pokrovnog stakalca, ostavi se na ravnoj horizontalnoj površini. Kada sva suspenzija ispari, na pokrovnom stakalcu ostaje tanka bijelo-siva prevlaka. Ako osušena

suspenzija nije jednoliko raspoređena izrađuje se novi preparat. Nejednolika distribucija dijatomeja na pokrovnom stakalcu najčešće je posljedica prebrzog isparavanja, nedovoljno ispranog konzervansa, neravne površine ili vibracija površine na kojoj je pokrovnica postavljena. Kako bi se utvrdila homogenost uzorka, predmetna stakalca s nanesenim i osušenim suspenzijama dijatomeja mogu se prije uklapanja pregledati na povećanju od 400x tako da je uzorak na gornjoj strani pokrovnog stakalca. Ako homogenost i gustoća nisu zadovoljavajući, postupak treba ponoviti.

Kada se postigne zadovoljavajuća gustoća stanica, na predmetno stakalce stavi se kap smole (Naphrax), a na nju se prevrtanjem postavi pokrovno stakalce (strana s osušenom suspenzijom pokriva kapljicu). Preparat se lagano zagrijava na ploči za zagrijavanje ili na plinskom plameniku sve dok se, uz stvaranje mjehurića, smola ne raširi pod cijelim pokrovnim stakalcem. Pokrovno stakalce treba lagano pritisnuti histološkom iglicom ili drvenim štapićem i istisnuti mjehuriće zraka.

Preparat se ostavi hladiti. Laganim pomicanjem pokrovnog stakalca po predmetnom stakalcu provjeri se jesu li stakalca dobro zalijepljena.

Preostali dio očišćenog uzorka fiksira se glicerolom (uz minimalnu količinu destilirane vode) i pohranjuje na hladnom mjestu.

NAPOMENA: U ovom poglavlju su navedene dvije metode čišćenja dijatomeja za izradu trajnih preparata. Ostale metode čišćenja dijatomeja detaljno su opisane u Savjetodavnoj normi za rutinsko uzorkovanje i prethodnu obradu riječnih bentoskih dijatomeja (HRN EN 13946:2014). Primjenjivati se može metoda prema vlastitom izboru i u ovisnosti o čistoći uzorka.

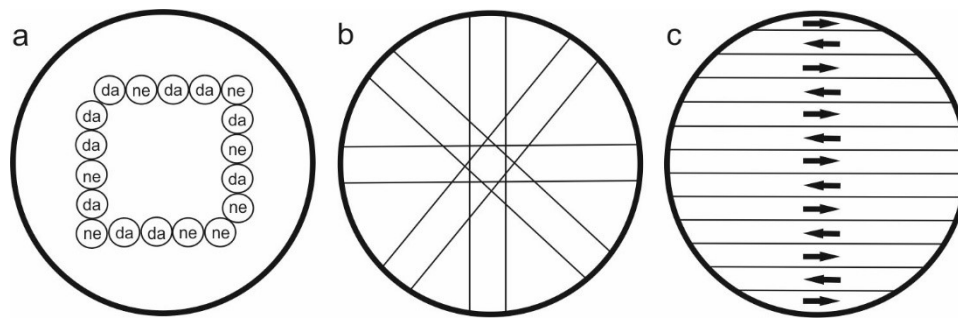
Brojanje i određivanje vrsta se obavlja pregledavanjem trajnih preparata pod svjetlosnim mikroskopom (imerzijski objektiv, povećanje 1000 x) (Slika 4.). Brojnost se izražava kao apsolutan broj valvi dijatomeja izbrojan do ukupno 400 valvi ili relativna zastupljenost, tj. omjer broja jedinki jedne vrste u odnosu na ukupan broj jedinki u uzorku.

3.2.3. Mikroskopiranje, determinacija i kvantifikacija dijatomeja

Kvantitativna analiza uzoraka bentoskih dijatomeja temelji se na valvama kao jedinicama za brojanje. Frustule se broje kao dvostruke valve. Minimalna taksonomski prihvatljiva kategorija za determinaciju je vrsta U iznimnim je slučajevima moguće je determinirati i samo do roda. Objekti se u nemogućnosti točnije determinacije mogu nazvati i kao Centrales ili Pennales - u slučaju pleuralnog položaja kada nije moguće odrediti točan rod kod sličnih rodova.

Određivanje dijatomejskih valvi do razine vrsta mikroskopira se na povećanju od najmanje 1000x uz imerzijsko ulje. Prema međunarodnoj praksi potrebno je prebrojati najmanje 400 valvi (maksimalna pogreška ± 10).

Metode brojanja valvi



Slika 4. Brojanje valvi u nasumično odabranim probnim poljima (a), u transektima (b) i brojanje valvi na čitavom preparatu (c) (prema Breirley i sur., 2007).

Strategije za određivanje neodređenih jedinica

U istraživanjima dijatomeja, neodređena jedinica obično označava da razina taksonomske identifikacije ne prelazi razinu roda. Uzorke u kojima je broj neidentificiranih jedinica veći od 12 % nije preporučljivo koristiti u ocjeni kakvoće vode. U takvim je slučajevima potrebno ponovno pripremiti uzorke (npr. kod frustula u pleuralnom položaju ili oštećenih valvi) ili je potrebno uzorke pregledati pod elektronskim mikroskopom (npr. u slučaju stranih, neobičnih svojti).

Frustule u pleuralnom položaju: Osim nekih svojti (npr. *Rhoicosphenia abbreviata*), dijatomeje nije moguće odrediti do razine vrsta ukoliko su okrenute na pleuralnu stranu. Ukoliko broj takvih frustula u uzorku prelazi 12 %, potrebno je napraviti nove trajne preparate.

Oštećene valve: Takve se valve bilježe i broje samo ukoliko je prisutno približno $\frac{3}{4}$ valvi i ako se mogu lako prepoznati i odrediti. Ako se u uzorcima nalaze brojne oštećene valve, postupak pripreme trajnih preparata treba ponoviti.

3.3. Biološki element kakvoće makrozoobentos

3.3.1. Uzorkovanje

Vrijeme uzorkovanja

Uzorci makrozoobentosa sabiru se od ožujku do sredine svibnja za vrijeme niskih stabilnih vodostaja, što je iznimno bitno za uzorkovanje u području litorala. U jezerima u području Mediterana preporuča se uzorkovanje do kraja travnja.

Oprema potrebna za uzorkovanje

- terenski protokol,
- grafitna i kemijska olovka,
- ručna bentos mreža veličine okvira 25x25 cm, promjera oka 500 µm,
- mjerna traka (metar) sa skalom do 10 m,
- štapni dubinomjer sa skalom od 1 m,
- bočice minimalnog volumena 0,5 l,
- uljni flomaster (otporan na alkohol i vodu),
- vodootporne etikete,
- plastična kanta,
- plastična kadica,
- mrežica za prosijavanje s promjerom pora od 0,5 mm,
- pinceta,
- 96 % etilni alkohol,
- fotoaparata,
- GPS uređaj,
- gumene čizme (ribarske duge, sa i bez naramenica),
- zaštitna i terenska oprema: kabanica, jakna, hlače, terenske cipele, kapa ili šešir, krema sa zaštitnim faktorom protiv UV zračenja,
- terenska torbica za prvu pomoć i
- pojas za spašavanje.

Način uzorkovanja

Na reprezentativnoj postaji uzorkuje se područje litorala. Mjesto uzorkovanja obuhvaća transekt od 25 m širine obale jezera, sve do udaljenosti od 10 m prema otvorenoj vodi ili, alternativno, do točke u kojoj dubina vode doseže 1 m. Maksimalna površina koja može biti uzorkovana iznosi 250 m². Definiraju se četiri dubinska razreda: 0 - 0,25 m, 0,25 - 0,5 m, 0,5 - 0,75 m i 0,75 - 1,00 m. Na svakoj postaji se uzima deset poduzoraka ovisno o postotku zastupljenosti određene dubine i supstrata. Poduzorci s površine 25x25 cm (0,0625 m²) uzimaju se standardnom ručnom bentos mrežom veličine oka 500 µm (AQEM CONSORTIUM 2002). Ručna bentos mreža se postavi uspravno i čvrsto na supstrat s otvorom okrenutim prema smjeru gibanja vode koje je postignuto vrtnjom petama čizme pri čemu se uznemiruje dno supstrata, podiže ga se i takav se hvata u mrežu. Valja dobro ispratiti veće kamenje u ručnu bentos mrežu, a preporuča se i pokupiti drvene ostatke u kadicu, da bi se kasnije pincetom mogle odvojiti pričvršćene životinje na njima. Sadržaj mreže se prebacuje u kantu, uklanja se veći supstrat s kojeg su prethodno odstranjeni svi

organizmi. Na taj se način smanji volumen uzorka. Potom se na terenu sediment ispire i prosijava kroz mrežicu veličine oka 500 µm, pri čemu se pincetama vrši gruba separacija makrofaune. Iz takvog kompozitnog uzorka odstranjuje se voda, prebacuje se u već prethodno označenu bočicu i dodaje se 96 %-tni etilni alkohol kako bi se uzorak konzervirao. Ako se uzorak s jedne mjerne postaje sprema u nekoliko bočica onda se one numeriraju oznakom (npr. 1/2, 2/2, itd.). Po završetku uzorkovanja cijela korištena oprema se dobro opere i pregleda kako ne bi zaostali neki organizmi te pripremi za sljedeće uzorkovanje. Po obavljenom uzorkovanju terenski protokol se pregleda i provjeri sadržava li sve potrebne podatke te se upišu i mogući problemi nastali tijekom uzorkovanja, koji bi mogli utjecati na kvalitetu uzorka.

Na bočice treba napisati:

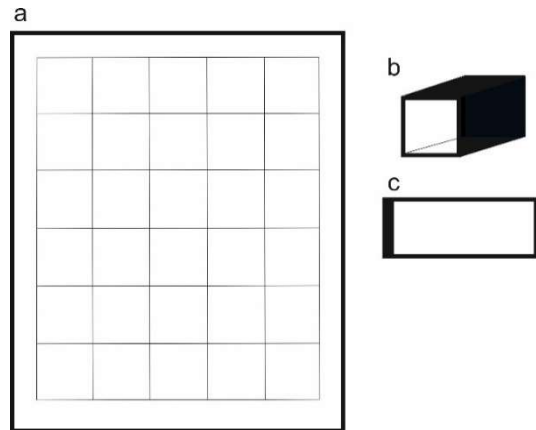
- datum uzorkovanja,
- naziv jezera,
- oznaka mjesta uzorkovanja,
- oznaku bočice ako je potrebno (1/2, 2/2).

3.3.2. Laboratorijska obrada uzoraka

Sakupljeni i pravilno označeni uzorci se dopremaju u laboratorij na daljnju obradu. U laboratoriju se uzorak makrozoobentosa podijeli na manje uzorke s ciljem skraćivanja vremena potrebnog za obradu uzorka. To se prvenstveno odnosi na uzorke s izrazito gustim populacijama makrozoobentosa. Slučajni odabir poduzoraka omogućuje da se iz velikog uzorka odabere manji broj poduzoraka, koji predstavljaju cjelokupni uzorak. Uzorak se prvo homogenizira, a poduzorkovanje se obavlja korištenjem posebne opreme (poduzorkivač). Na taj način, osigurava se proporcionalna zastupljenost organizama.

Oprema za poduzorkovanje u laboratoriju:

- kadica,
- metalna ili plastična mreža s 30 kvadrata jednake veličine; svaki kvadrat predstavlja jedan poduzorak,
- Petrijeve zdjelice čije je dno podijeljeno ne četvrtine,
- žlice ili lopatice za izolaciju materijala iz kadice,
 - plastične posudice, vrećice ili kivete
 - etilni alkohol,
 - rukavice,
 - škare,
 - paus papir i
 - grafitna olovka.



Slika 5. Mreža s 30 kvadrata jednake veličine u kadici (a) s poduzorkivačem (b,C).

Organizmi se izoliraju na sljedeći način:

- U laboratoriju se iz vrećice ili posudice s uzorkom odlije alkohol kroz mrežu promjera oka 500 μm u odgovarajuću posudu, a sabrani materijal se ispere pod tekućom vodom i odloži u kadicu.
- Za analizu nije potrebno izdvajati organizme iz cijelog uzorka te se on raspoređi u kadicu za poduzorkovanje, koja je podijeljena na 30 jednakih kvadrata (Slika 5). Iz pet slučajno izabranih kvadrata/poduzoraka (jedinica za izolaciju), izdvoje se svi makroskopski beskraljješnjaci.
- Izdvajanje organizama je završeno ako u pet poduzoraka nađemo minimalno 700 jedinki, a iz ostatka uzorka izvade se životinje veće od 2 cm. Broj životinja prikupljenih iz pet kvadrata pomnoži se s 6 (da bi se dobio broj životinja u cjelokupnom uzorku, odnosno 30 kvadrata) te se navedenom broju pribroje i životinje veće od 2 cm koje su prethodno prikupljene iz cjelokupnog uzorka.
- U slučaju da se iz 5 kvadrata ne izolira više od 700 jedinki, pregledavaju se dodatni kvadrati sve dok brojnost organizama ne dosegne potrebnih 700 jedinki. Broj jedinki je potrebno preračunati na cijeli uzorak te kasnije na površinu od 1 m^2 .
- Organizam pripada pojedinom poduzorku ako se glava, odnosno veći dio organizma, nalazi u njoj.
- Za organizme, koji leže na gornjoj ili desnoj granici između dva poduzorka, smatra se da pripadaju tom poduzorku.
 - Prazne ljuštore puževa i školjkaša te prazne kućice ličinka tulara se ne broje.
 - Ne broje se svlakovi kukaca i dijelovi organizama (noge, škrge, antene i sl.).
 - Kod maločetinaša se broji cijeli primjerak ili samo prednji dio tijela.
 - Za izolaciju organizama se koristi stereolupa.
 - Bentoski beskraljješnjaci se po taksonomskim skupinama sprema u zasebne kivetice sa 75% etilnim alkoholom u koje se stavljaju etikete od paus papira s naznačenim nazivom skupine, datumom i mjestom uzorkovanja. Tako spremljeni organizmi se kasnije determiniraju do nižih sistematskih kategorija.

Ako su prikupljeni uzorci manjeg volumena, za poduzorkovanje se mogu koristiti i Petrijeve zdjelicu potrebne veličine, čiji je dno podijeljeno na četvrtine. Pomoću stereo mikroskopa (lupe)

izdvoje se sve životinje iz jedne četvrtine, a ostale se pospreme. Ako je u prvoj četvrtini skupljeno 700 jedinki izolacija se prekida, a iz ostale tri četvrtine (ostatak) se izvade životinje veće od 2 cm. U slučaju da je u četvrtini pregledanog uzorka zabilježeno 700 jedinki, broj životinja iz četvrtine uzorka se pomnoži s 4 te se navedenom broju pribroje i ostale životinje veće od 2 cm koje su pokupljene iz ostale tri četvrtine uzorka. Ako nije izdvojeno 700 jedinki izolira se sljedeća četvrtina. Isti proces se nastavlja dok se ne skupi 700 jedinki ili se izolira cijeli uzorak.

Izdvojene i prebrojene jedinice se pohranjuju u plastične epruvete s poklopcem volumena 2 ml sa 70 %-tnim etilnim alkoholom. U plastične epruvete također treba staviti etiketu s podacima o uzorku (datum uzorkovanja, naziv jezera, oznaka lokacije) i nazivu svojte koja se u njoj nalazi.

Nakon toga se pristupi determinaciji do najniže moguće sistematske

4. Prijedlog metoda za ocjenu ekološkog stanja jezera Dinaridske ekoregije na temelju fitoplanktona

4.1. Baza podataka

Za izradu sustava ocjene ekološkog stanja jezera Dinaridske ekoregije korištena je baza podataka Hrvatskih voda koja je uključivala podatke o osnovnim fizikalno-kemijskim pokazateljima, liste svojiti fitoplanktona s podacima o biomasi te podaci o pritiscima, primjerice o korištenju zemljišta unutar slivnog područja.

4.2. Duboka jezera

Metoda ocjene ekološkog stanja se sastoji od indeksa biomase (temelji se na koncentraciji klorofila *a*) i sastava zajednice, koji se izračunava na temelju relativne brojnosti funkcionalnih grupa algi i vrijednosti tolerancije i osjetljivosti algi na okolišne stresore (ukupni fosfor i ukupni dušik). Predložena metoda uključuje i prijedlog izračuna Indeksa za ocjenu cvjetanja algi.

4.2.1. Koncentracije klorofila *a* (Chl-*a*)

Granične vrijednosti koncentracije klorofila *a* (Chl-*a*) za pojedinu kategoriju ekološkog stanja i pripadajuće granične vrijednosti OEK nalaze se u Tablici 11. Granice za kategorije ekološkog stanja Vrlo dobro i Dobro jednake su granicama prema MED GIG interkalibracijskoj grupi (de Hoyos i sur. 2014.), dok su ostale granice prilagođene uvjetima naših jezera.

Tablica 11. Granične vrijednosti klorofila *a* i OEK.

Kategorije ekološkog stanja	Granične vrijednosti Chl- <i>a</i> (µg/L)	Granične vrijednosti OEK
VRLO DOBRO	≤2,0	0,8
DOBRO	≤5,3	0,6
UMJERENO	≤25,0	0,4
LOŠE	≤50,0	0,2
VRLO LOŠE	>50,0	<0,2

Jednadžba koja se koristi za pretvorbu koncentracije klorofila *a* u normalizirane vrijednosti OEK indeksa biomase (OEK_{Chl-a}):

$$Chl-a \leq 5,3; OEK_{Chl-a} = 0,0074x^2 - 0,1149x + 1$$

$$Chl-a > 5,3; OEK_{Chl-a} = 0,00005x^2 - 0,0118x + 0,6617$$

gdje je:

x - koncentracija klorofila a ($\mu\text{g/L}$)

4.2.2. Indeks za ocjenu sastava zajednice (Q_k)

Ocjena sastava zajednice temelji se na podacima dobivenih kvantitativnom analizom sastava fitoplanktona. Indeks se temelji na "Indeksu sastava zajednice" (Q indeks; Padisák i sur., 2006.) koji je primjenjiv nakon što se svim fitoplanktonskim svojstama dodijele odgovarajuće funkcionalne grupe za različite tipove vodnih tijela prema radovima Reynolds i sur., 2002. te Padisák i sur., 2009 te prema operativnoj listi svojti (Tab. 20).

Q_k indeks se izračunava prema jednadžbi:

$$Q_k = \sum_{i=1}^s (p_i F),$$

gdje je:

p_i - relativni udio i -te funkcionalne grupe prema ukupnoj biomasi fitoplanktona i

F - faktor procjene cjelokupne zajednice na temelju brojčanih vrijednosti pridruženih različitim FG u danom tipu jezera.

Ovaj indeks temelji se na pripadajućim kodonima funkcionalnih skupina (FG) algi. Vrijednosti faktora F pridružene su kodonima prema utjecaju hranjivih tvari na svaki pojedini kodon te su utvrđene na EC-GIG Interkalibraciji (Borics i sur., 2018.).

Vrijednosti faktora F

FG	S1	S2	SN	YPh	H1	G	J	M	C	P	T	X1	LM	W1	W2	Q
F	1	1	1	1	1	3	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5
FG	D	Y	E	K	LO	WS	MP	A	B	N	Z	X3	X2	F	U	V
F	7	7	7	7	7	7	7	9	9	9	9	9	9	9	9	9

Q_k indeks se izračunava za svaki analizirani uzorak fitoplanktona. Vrijednost Q_k indeksa standardizira se tako što se izračunata vrijednost Q_k indeksa dijeli s maksimalnom vrijednošću indeksa (9) prema jednadžbi:

$$Q_{k_stand} = Q_k/9$$

Grafične vrijednosti dobivenih vrijednosti prikazane su u Tablici 12.

Tablica 12. Grafične vrijednosti indeksa za ocjenu sastava zajednice Q_{k_stand} i OEK_Q .

Kategorije ekološkog stanja	Grafične vrijednosti indeksa za ocjenu sastava zajednice Q_{k_stand}	Grafične vrijednosti nakon normalizacije polinomskom jednadžbom OEK_Q
-----------------------------	---	---

	HR-J_1A	HR-J_1B	HR-J_2	HR-J_3	HR-J_5	
VRLO DOBRO	≥0,92	≥0,89	≥0,86	≥0,87	≥0,82	0,8
DOBRO	≥0,69	≥0,67	≥0,65	≥0,65	≥0,62	0,6
UMJERENO	≥0,46	≥0,45	≥0,43	≥0,44	0,41	0,4
LOŠE	≥0,23	≥0,22	≥0,22	≥0,22	≥0,21	0,2
VRLO LOŠE	<0,23	<0,22	<0,22	<0,22	<0,21	<0,2

Za normalizaciju dobivenih vrijednosti indeksa Q_k stand koristi se polinomska regresijska jednadžba trećeg reda prema HR tipu jezera (Tab.13) te je rezultat normalizirani OEK sastava zajednice (OEK_Q).

Tablica 13. Polinomska regresijska jednadžba trećeg reda prema HR tipu jezera.

		Tip	Polinomska regresijska jednadžba
Plitvička jezera	Kozjak	HR-J_1A	$y = 7e^{-13}x^3 - 9e^{13}x^2 + 0,8696x - 2e^{-14}$
	Prošće	HR-J_1B	$y = 0,8989x - 4e^{-15}$
CRES	Vransko jezero (Cres)	HR-J_2	$y = -2e^{-13}x^3 - 8e^{-14}x^2 + 0,9302x - 2e^{-14}$
Baćinska jezera	Oćuša	HR-J_3	$y = 7e^{-13}x^2 + 0,9195x - 8e^{-15}$
	Crniševo	HR-J_3	
KRKA	Jezero Visovac	HR-J_5	$y = -2e^{-13}x^3 - 9e^{-14}x^2 + 0,9756x - 8e^{-14}$

gdje je:

x – standardizirana vrijednost Q indeksa, tj. Q_k stand.

Kombinacija metričkih indeksa

Kombinacija normaliziranih vrijednosti OEK-a dvaju indeksa predstavlja konačnu ocjena ekološkog stanja nazvanu HLPI - indeks za fitoplankton jezera, prema formuli:

$$HLPI = \frac{OEK_Q + 2 \times OEK_{Chl\ a}}{3}$$

gdje je:

HLPI - indeks za fitoplankton jezera,

OEK_Q - normalizirani OEK sastava zajednice i

OEK_{Chl-a} - normalizirani OEK indeksa biomase (koncentracije klorofila a).

4.2.3. Primjena indeksa za ocjenu cvjetanja algi

U ocjeni kakvoće vode na temelju fitoplanktona prema nupcima ODV-a potrebno je uzeti u obzir učestalost i intenzitet cvjetanja algi. S obzirom da pojam cvjetanja vode nije jasno definiran u hidrobiološkoj literaturi, predloženi su različiti pristupi, poput relativne ili apsolutne učestalosti

cijanobakterija. Budući da niti relativna niti apsolutna učestalost cijanobakterija nisu primjenjive za izračunavanje indeksa ocjene cvjetanja algi u zemljama EC-GIG (Istočnoeuropska kontinentalna Interkalibracijska skupina), predložena je uporaba samo apsolutne učestalosti cijanobakterija. Carvalho i sur. (2012) su predložili primjenu biomase cijanobakterija koncentracije 2 mg l^{-1} kao granicu niske opasnosti od štetnog razvoja algi te biomasu cijanobakterija koncentracije 10 mg l^{-1} kao granicu visokog rizika od štetnog razvoja algi. U ovom elaboratu predložene su sljedeće granične vrijednosti:

- Biomasa cijanobakterija $< 2 \text{ mg l}^{-1}$: potrebno je primijeniti vrijednosti nacionalnih indeksa
- Biomasa cijanobakterija $> 2 \text{ mg l}^{-1}$:
 - Nacionalna vrijednost OEK $> 0,6$ OEK potrebno sniziti za $0,2$
 - Nacionalna vrijednost OEK $< 0,6$ bez promjene.

4.3. Vrlo plitke stajačice

Metode ocjene ekološkog stanja plitkih jezera izračunava se na temelju relativne brojnosti funkcionalnih grupa algi i vrijednosti tolerancije i osjetljivosti algi na okolišne stresore (ukupni fosfor i ukupni dušik).

4.3.1 Biomasa

Za vrlo plitke stajačice Dinaridske ekoregije predlaže se uporaba granica primijenjenih u interkalibracijskoj skupini LCB-GIG (Lake Central Baltic GIG; Phillips i sur., 2014).

Koncentracije klorofila *a* (Chl-*a*) s graničnim vrijednostima za kategorije ekološkog stanja prema LCB-GIG (Phillips i sur., 2014.) prikazane su u Tablici 14.

Tablica 14. Granične vrijednosti klorofila *a* i OEK.

Kategorije ekološkog stanja	Granične vrijednosti Chl- <i>a</i> ($\mu\text{g/L}$)	Granične vrijednosti OEK
VRLO DOBRO	$\leq 11,0$	0,8
DOBRO	$\leq 23,0$	0,6
UMJERENO	$\leq 35,0$	0,4
LOŠE	$\leq 50,0$	0,2
VRLO LOŠE	$> 50,0$	$< 0,2$

Koristeći polinomsku regresijsku jednadžbu trećeg reda, izmjerene vrijednosti klorofila *a* se mogu pretvoriti u normaliziranu skalu. Ove vrijednosti smatraju se normaliziranim vrijednostima OEK-a (Tablica 13).

Jednadžba za pretvorbu koncentracije klorofila *a* (Chl-*a*) u normalizirane vrijednosti OEK za klorofil *a* ili drugim nazivom normalizirani OEK indeksa biomase (OEK_{Chl-a}) je:

$$\text{Ako } x < 50 \mu\text{/L } OEK_{Chl-a} = -0,0161x + 0,9826$$

$$\text{Ako } x > 50 \mu\text{/L } OEK_{Chl-a} = -0,004x + 0,4$$

gdje je:

x - koncentracija klorofila *a* ($\mu\text{g/L}$)

Indeks za ocjenu sastava zajednice (Q_k)

Ocjena sastava zajednice temelji se na podacima dobivenih kvantitativnom analizom sastava fitoplanktona. Indeks se temelji na "Indeksu sastava zajednice" (Q indeks; Padisák i sur., 2006.) koji je primjenjiv nakon što se svim fitoplanktonskim svojstama dodijele odgovarajuće funkcionalne grupe za različite tipove vodnih tijela prema radovima od Reynolds i sur., 2002. te Padisák i sur., 2009 prema operativnoj listi svojti (Tab. 20).

Q_k indeks se izračunava prema jednadžbi:

$$Q_k = \sum_{i=1}^s (p_i F),$$

gdje je:

p_i - relativni udio *i*-te funkcionalne grupe prema ukupnoj biomasi fitoplanktona i

F - faktor procjene cjelokupne zajednice na temelju brojčanih vrijednosti pridruženih različitim FG u danom tipu jezera.

Ovaj indeks temelji se na pripadajućim kodonima funkcionalnih skupina (FG) algi. Vrijednosti faktora *F* pridružene su kodonima prema utjecaju hranjivih soli na svaki pojedini kodon (Tab.15).

Tablica 15. Vrijednosti faktora *F* za pripadajuće kodone funkcionalnih skupina (FG) algi

FG	S1	S2	SN	YPh	Hi	G	J	M	C	P	T	X1	LM	W1	W2	Q
F	1	1	1	1	1	3	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5
FG	D	Y	E	K	LO	WS	MP	A	B	N	Z	X3	X2	F	U	V
F	7	7	7	7	7	7	7	9	9	9	9	9	9	9	9	9

Q indeks se izračunava za svaki analizirani uzorak fitoplanktona. Vrijednost Q indeksa standardizira se tako što se izračunata vrijednost Q indeksa dijeli s maksimalnom vrijednošću indeksa 9 prema jednadžbi:

$$Q_{k_stand} = Q_k/9$$

Grafične vrijednosti dobivenih vrijednosti prikazane su u Tablici 16.

Tablica 16. Granične vrijednosti indeksa za ocjenu sastava zajednice Q_k_stand i OEK_Q .

Kategorije ekološkog stanja	Granične vrijednosti indeksa za ocjenu sastava zajednice (Q_k_stand)	Granične vrijednosti nakon normalizacije polinomskom jednadžbom OEK_Q
VRLO DOBRO	$\geq 0,81$	0,8
DOBRO	$\geq 0,61$	0,6
UMJERENO	$\geq 0,41$	0,4
LOŠE	$\geq 0,20$	0,2
VRLO LOŠE	$< 0,20$	$< 0,2$

Za normalizaciju vrijednosti indeksa Q_k_stand koristi se polinomska regresijska jednadžba trećeg reda (Tab.17) te je rezultat normalizirani OEK sastava zajednice (OEK_Q).

Tablica 17. Polinomska regresijska jednadžba trećeg reda za normalizaciju vrijednosti indeksa Q_k_stand u vrlo plitkim stajaćicama.

		Tip	Polinomska regresijska jednadžba
Vransko jezero (Biograd)	Motel	HR-J_4	$y = 7e^{-13}x^3 - 9e^{-13}x^2 + 0,9877x - 6e^{-14}$
	Prosika	HR-J_4	

Kombinacija metričkih indeksa

Kombinacija normaliziranih vrijednosti OEK-a dvaju indeksa predstavlja konačnu ocjena ekološkog stanja nazvanu HLPI - indeks za fitoplankton jezera, prema formuli:

$$HLPI = \frac{OEK_Q + 2 \times OEK_{Chl\ a}}{3}$$

gdje je:

$HLPI$ - indeks za fitoplankton jezera,

OEK_Q - normalizirani OEK sastava zajednice i

$OEK_{Chl\ a}$ - normalizirani OEK indeksa biomase (koncentracije klorofila a).

Tablica 18. Granične vrijednosti HLPI indeksa i pripadajuće kategorije ekološkog stanja.

Kategorije ekološkog stanja	HLPI granične vrijednosti
VRLO DOBRO	0.8
DOBRO	0.6
UMJERENO	0.4
LOŠE	0.2
VRLO LOŠE	< 0.2

4.3.2. Primjena indeksa za ocjenu cvjetanja algi

Sukladno prijedlogu EC-GIG Interkalibracijske skupine, u ovom se elaboratu predlaže korištenje sljedećih graničnih vrijednosti indeksa za ocjenu cvjetanja algi:

- Biomasa cijanobakterija < 2 mg l⁻¹: treba primijeniti vrijednosti nacionalnih mjernih podataka
- Biomasa cijanobakterija > 2 mg l⁻¹:
 - Nacionalna vrijednost OEK > 0,6 OEK potrebno sniziti za 0,2
 - Nacionalna vrijednost OEK < 0,6 bez promjene

4.4. Ocjena ekološkog stanja istraživanih stajaćica temeljem fitoplanktona

U Tablici 19 prikazane su ocjene ekološkog stanja temeljem predložene metodologije. Budući da su u svakom od istraživanih jezera uzorci prikupljeni na mjesečnoj bazi od travnja do rujna, za svaki mjesec (uzorak) određen je OEK, odnosno pripadajuće ekološko stanje. Ukupna ocjena za pojedino vodno tijelo prikazana je kao srednja vrijednost OEK-a od šest prikupljenih uzoraka. Kao što je vidljivo u svim istraživanim jezerima, stanje temeljem fitoplanktona je dobro ili vrlo dobro, a glavni pritisak koji se ocjenjuje je eutrofikacija.

Tablica 19. Ocjena ekološkog stanja istraživanih jezera temeljem fitoplanktona (K-Kozjak, P-Prošće, VC-Vransko jezero na Cresu, O-Očuša, C-Crniševo, VI-Visovačko jezero, VM-Vransko jezero kod Biograda postaja Motel, VP Vransko jezero kod Biograda postaja Prosika).

jezero	postaja	godina	Q	Q / 9	normQ/9	chlAspe	norm chlAspe	HLPI (CRO)
K	K4	2014	5,77	0,64	0,56	1,92	0,81	0,72
K	K5	2014	5,69	0,63	0,55	1,08	0,88	0,77
K	K6	2014	6,82	0,76	0,66	1,3	0,86	0,80
K	K7	2014	8,35	0,93	0,81	1,26	0,87	0,85
K	K8	2014	8,45	0,94	0,82	1,32	0,86	0,85
K	K9	2014	8,35	0,93	0,81	1,04	0,89	0,86
Sr.vr.								0,81
K	K4	2016	6,03	0,67	0,58	2,72	0,74	0,69
K	K5	2016	6,31	0,70	0,61	1,24	0,87	0,78
K	K6	2016	8,34	0,93	0,81	1,98	0,80	0,80
K	K7	2016	7,96	0,88	0,77	1,04	0,89	0,85
K	K8	2016	8,11	0,90	0,78	1,39	0,85	0,83
K	K9	2016	8,35	0,93	0,81	0,35	0,96	0,91

Sr.vr.								0,81
K	K4	2017	6,21	0,69	0,60	1,12	0,88	0,79
K	K5	2017	7,31	0,81	0,71	1,78	0,82	0,78
K	K6	2017	7,99	0,89	0,77	0,35	0,96	0,90
K	K7	2017	8,20	0,91	0,79	0,35	0,96	0,90
K	K8	2017	8,29	0,92	0,80	1,75	0,82	0,81
K	K9	2017	7,77	0,86	0,75	1,86	0,81	0,79
Sr.vr.								0,83
P	P4	2014	5,40	0,60	0,54	3,51	0,69	0,64
P	P5	2014	5,53	0,61	0,55	2,58	0,75	0,69
P	P6	2014	7,14	0,79	0,71	3,74	0,67	0,69
P	P7	2014	7,90	0,88	0,79	3,98	0,66	0,70
P	P8	2014	8,01	0,89	0,80	5,52	0,60	0,67
P	P9	2014	7,22	0,80	0,72	0,50	0,94	0,87
Sr.vr.								0,71
P	P4	2016	5,49	0,61	0,55	5,54	0,60	0,58
P	P5	2016	6,92	0,77	0,69	3,32	0,70	0,70
P	P6	2016	7,55	0,84	0,75	1,78	0,82	0,80
P	P7	2016	7,28	0,81	0,73	4,23	0,65	0,67
P	P8	2016	7,72	0,86	0,77	4,80	0,62	0,67
P	P9	2016	8,08	0,90	0,81	3,11	0,71	0,75
Sr.vr.								0,69
P	P4	2017	7,36	0,82	0,74	1,66	0,83	0,80
P	P5	2017	7,39	0,82	0,74	8,14	0,57	0,63
P	P6	2017	8,40	0,93	0,84	4,88	0,62	0,69
P	P7	2017	8,21	0,91	0,82	2,78	0,74	0,77
P	P8	2017	8,74	0,97	0,87	4,20	0,65	0,72
P	P9	2017	8,52	0,95	0,85	4,56	0,63	0,70
Sr.vr.								0,72
VC	VC4	2014	8,27	0,92	0,85	2,06	0,79	0,81
VC	VC5	2014	8,08	0,90	0,84	1,64	0,83	0,83
VC	VC6	2014	6,18	0,69	0,64	0,50	0,94	0,84
VC	VC7	2014	5,76	0,64	0,59	0,50	0,94	0,83
VC	VC8	2014	6,42	0,71	0,66	0,50	0,94	0,85
VC	VC9	2014	7,87	0,87	0,81	1,11	0,88	0,86
Sr.vr.								0,84
VC	VC4	2016	7,46	0,83	0,77	0,35	0,96	0,90
VC	VC5	2016	6,97	0,77	0,72	1,15	0,88	0,83
VC	VC6	2016	6,29	0,70	0,65	0,98	0,89	0,81
VC	VC7	2016	6,66	0,74	0,69	0,35	0,96	0,87
VC	VC8	2016	6,23	0,69	0,64	0,35	0,96	0,86
Sr.vr.								0,85

VC	VC9	2016	6,51	0,72	0,67	0,35	0,96	0,86
VC	VC4	2017	8,37	0,93	0,87	1,01	0,89	0,88
VC	VC5	2017	8,01	0,89	0,83	0,35	0,96	0,92
VC	VC6	2017	7,43	0,83	0,77	1,12	0,88	0,84
VC	VC7	2017	6,49	0,72	0,67	0,35	0,96	0,86
VC	VC8	2017	5,90	0,66	0,61	0,35	0,96	0,84
VC	VC9	2017	5,71	0,63	0,59	0,35	0,96	0,84
Sr.vr.								0,86
O	O5	2014	8,04	0,89	0,82	0,50	0,94	0,90
O	O6	2014	7,70	0,86	0,79	1,52	0,84	0,82
O	O7	2014	6,91	0,77	0,71	3,45	0,69	0,70
O	O8	2014	6,80	0,76	0,70	4,88	0,62	0,64
O	O9	2014	8,14	0,90	0,83	4,26	0,64	0,71
Sr.vr.								0,77
O	O4	2016	7,35	0,82	0,75			
O	O5	2016	7,85	0,87	0,80	3,30	0,70	0,72
O	O6	2016	7,61	0,85	0,78	1,12	0,88	0,85
O	O7	2016	7,09	0,79	0,72	4,21	0,65	0,69
O	O8	2016	5,28	0,59	0,54	2,60	0,75	0,74
O	O9	2016	7,89	0,88	0,81	4,80	0,62	0,59
Sr.vr.								0,72
O	O4	2017	8,64	0,96	0,88	1,43	0,85	0,84
O	O5	2017	6,99	0,78	0,71	0,21	0,98	0,89
O	O6	2017	7,81	0,87	0,80	0,55	0,94	0,89
O	O7	2017	7,20	0,80	0,74	0,21	0,98	0,90
O	O8	2017	7,56	0,84	0,77	0,80	0,91	0,87
O	O9	2017	7,08	0,79	0,72	0,91	0,90	0,84
Sr.vr.								0,87
CR	CR4	2014	5,26	0,58	0,54	9,92	0,55	0,55
CR	CR5	2014	6,92	0,77	0,71	4,47	0,63	0,66
CR	CR6	2014	7,75	0,86	0,79	1,64	0,83	0,82
CR	CR7	2014	6,66	0,74	0,68	2,53	0,76	0,73
CR	CR8	2014	8,39	0,93	0,86	1,92	0,81	0,82
CR	CR9	2014	7,03	0,78	0,72	4,38	0,64	0,67
Sr.vr.								0,71
CR	CR4	2016	8,37	0,93	0,86			
CR	CR5	2016	6,35	0,71	0,65	2,25	0,78	0,74
CR	CR6	2016	7,77	0,86	0,79	2,51	0,76	0,77
CR	CR7	2016	7,40	0,82	0,76	1,77	0,82	0,80
CR	CR8	2016	7,28	0,81	0,74	1,50	0,84	0,81
CR	CR9	2016	7,26	0,81	0,74	1,60	0,84	0,80
Sr.vr.								0,78

CR	CR4	2017	7,77	0,86	0,79	2,01	0,80	0,80
CR	CR5	2017	8,05	0,89	0,82	0,21	0,98	0,93
CR	CR6	2017	8,06	0,90	0,82	0,21	0,98	0,93
CR	CR7	2017	7,85	0,87	0,80	0,21	0,98	0,92
CR	CR8	2017	7,71	0,86	0,79	0,48	0,95	0,89
CR	CR9	2017	7,60	0,84	0,78	0,81	0,91	0,87
Sr.vr.								0,89
VI	VI4	2014	6,72	0,75	0,73	1,26	0,87	0,82
VI	VI5	2014	7,12	0,79	0,77	1,36	0,86	0,83
VI	VI6	2014	7,50	0,83	0,81	1,64	0,83	0,83
VI	VI7	2014	7,14	0,79	0,77	7,16	0,58	0,64
VI	VI8	2014	6,72	0,75	0,73	4,41	0,64	0,67
VI	VI9	2014	7,14	0,79	0,77	3,02	0,72	0,74
Sr.vr.								0,75
VI	VI4	2016	7,11	0,79	0,77	2,60	0,75	0,76
VI	VI5	2016	5,99	0,67	0,65	1,57	0,84	0,78
VI	VI6	2016	8,19	0,91	0,89	1,27	0,87	0,87
VI	VI7	2016	7,44	0,83	0,81	2,42	0,77	0,78
VI	VI8	2016	7,00	0,78	0,76	2,40	0,77	0,76
VI	VI9	2016	7,09	0,79	0,77	3,95	0,66	0,70
Sr.vr.								0,77
VI	VI4	2017	5,28	0,59	0,57	1,18	0,87	0,77
VI	VI5	2017	8,21	0,91	0,89	2,52	0,76	0,80
VI	VI6	2017	8,01	0,89	0,87	4,91	0,61	0,70
VI	VI7	2017	6,68	0,74	0,72	3,46	0,69	0,70
VI	VI8	2017	7,27	0,81	0,79	6,13	0,59	0,66
VI	VI9	2017	6,83	0,76	0,74	5,62	0,60	0,64
Sr.vr.								0,71
VM	VM4	2014	7,37	0,82	0,81	1,05	0,97	0,91
VM	VM5	2014	7,18	0,80	0,79	0,50	0,97	0,91
VM	VM6	2014	5,70	0,63	0,63	2,81	0,94	0,83
VM	VM7	2014	4,91	0,55	0,54	6,07	0,88	0,77
VM	VM8	2014	5,21	0,58	0,57	0,50	0,97	0,84
VM	VM9	2014	5,52	0,61	0,61	4,31	0,91	0,81
Sr.vr.								0,85
VM	VM4	2016	7,12	0,79	0,78	3,16	0,93	0,88
VM	VM5	2016	7,17	0,80	0,79	1,17	0,96	0,90
VM	VM6	2016	6,86	0,76	0,75	1,38	0,96	0,89
VM	VM7	2016	7,40	0,82	0,81	1,70	0,96	0,91
VM	VM8	2016	6,87	0,76	0,75	2,10	0,95	0,88
VM	VM9	2016	6,77	0,75	0,74	5,10	0,90	0,85
Sr.vr.								0,89

VM	VM4	2017	8,47	0,94	0,93	36,25	0,40	0,58
VM	VM5	2017	8,67	0,96	0,95	26,40	0,56	0,69
VM	VM6	2017	8,10	0,90	0,89	19,34	0,67	0,74
VM	VM7	2017	5,41	0,60	0,59	0,71	0,97	0,85
VM	VM8	2017	5,53	0,61	0,61	3,47	0,93	0,82
VM	VM9	2017	5,71	0,63	0,63	3,08	0,93	0,83
Sr.vr.								0,75
VP	VP4	2014	7,83	0,87	0,86	0,50	0,97	0,94
VP	VP5	2014	6,30	0,70	0,69	1,14	0,96	0,87
VP	VP6	2014	5,77	0,64	0,63	3,66	0,92	0,83
VP	VP7	2014	5,53	0,61	0,61	6,10	0,88	0,79
VP	VP8	2014	4,94	0,55	0,54	2,26	0,95	0,81
VP	VP9	2014	5,02	0,56	0,55	1,30	0,96	0,82
Sr.vr.								0,84
VP	VP4	2016	6,29	0,70	0,69	2,86	0,94	0,85
VP	VP5	2016	6,86	0,76	0,75	1,29	0,96	0,89
VP	VP6	2016	7,33	0,81	0,80	1,51	0,96	0,91
VP	VP7	2016	6,25	0,69	0,69	1,21	0,96	0,87
VP	VP8	2016	7,33	0,81	0,80	3,30	0,93	0,89
VP	VP9	2016	7,30	0,81	0,80	4,60	0,91	0,87
Sr.vr.								0,88
VP	VP4	2017	8,82	0,98	0,97	34,82	0,42	0,60
VP	VP5	2017	8,61	0,96	0,94	26,88	0,55	0,68
VP	VP6	2017	7,87	0,87	0,86	24,47	0,59	0,68
VP	VP7	2017	5,35	0,59	0,59	0,76	0,97	0,84
VP	VP8	2017	5,34	0,59	0,59	3,81	0,92	0,81
VP	VP9	2017	5,31	0,59	0,58	2,37	0,94	0,82
Sr.vr.								0,74

U Tablici 20 prikazane su korelacije ocjene ekološkog stanja temeljem fitoplanktona (HLPI indeks) i fizikalno-kemijskih čimbenika na svim postajama na kojima je uzorkovan fitoplankton.

Tablica 20. Prikaz Spearmanovog i Kendallovog koeficijenta korelacije indeksa HLPI s različitim fizikalno-kemijskim čimbenicima. Korelacije označene crveno statistički su značajne (* - korelacija statistički značajna pri $p=0,01$; ** - korelacija statistički značajna pri $p=0,05$).

	SPEARMAN'S RHO		KENDALL'S TAU B		N
	HLPI	HLPI	HLPI	HLPI	
	Correlation Coefficient	Sig. (2-tailed)	Correlation Coefficient	Sig. (2-tailed)	
chlA	-0,795**	5,138x10 ⁻³²	-0,616**	0,000	141
Secchi	0,171*	0,042	0,130*	0,024	141
Temp	0,124	0,143	0,078	0,169	141

pH	0,107	0,206	0,068	0,256	141
Cond	0,172*	0,041	0,107	0,061	141
SUSP	-0,199*	0,018	-0,137*	0,020	141
Alk	-0,253**	0,002	-0,173**	0,002	141
Tvr	-0,044	0,601	-0,018	0,754	141
NTU	-0,154	0,070	-0,102	0,077	140
Sal	0,126	0,393	0,089	0,378	48
O ₂	-0,135	0,110	-0,092	0,108	141
Sat	0,043	0,616	0,022	0,703	136
KPK	0,049	0,562	0,027	0,645	141
BPK	-0,019	0,819	-0,017	0,771	141
N-NH ₄	0,033	0,702	0,021	0,719	141
N-NO ₂	0,240**	0,004	0,164**	0,006	141
N-NO ₃	-0,105	0,214	-0,067	0,246	141
N-TN	0,002	0,984	-0,006	0,915	141
P-OP	-0,036	0,672	-0,025	0,688	141
P-TP	-0,356**	0,147x10 ⁻⁴	-0,253**	0,000	141
TOC	0,192*	0,023	0,123*	0,030	141
DOC	0,179	0,084	0,122	0,081	94

4.5. Opis zajednice fitoplanktona u uvjetima vrlo dobrog ekološkog stanja

Duboke stajačice

U referentnim uvjetima zajednicom fitoplanktona dominiraju funkcionalne grupe s visokim faktorskim vrijednostima (7, 9). To su svojite fitoplanktona koji nastanjuju oligotrofne vodene ekosustave. Reprezentativni predstavnici su: dijatomeje (centrice), dinoflagelati i svojite skupine Chrysophyceae, jednostanične i kolonijalne zelene alge skupine Chlorococcales te planktonske alge skupine Desmidiales. U zajednici fitoplanktona često dominiraju flagelatne vrste iz skupina Chrysophyta i Cryptophyta.

Najveći udio biomase u skupini Chrysophyta imaju vrste roda *Dinobryon* Ehrenberg, dok su nešto manjom biomasom zastupljene vrste rodova *Kephyrion* Pascher i *Mallomonas* Perty te vrste *Chrysocapsella planctonica* (West & G.S. West) Bourrelly i *Bitrichia chodatii* (Reverdin) Chodat itd. Najveću zastupljenost u skupini dinoflagelata čine grupe *Peridinium* Ehrenberg / *Peridiniopsis* Lemmermann / *Parvodinium* Carty te vrsta *Ceratium hirundinella* (O.F.Müller) Duja. Najzastupljenije centrične dijatomejske svojite su *Pantocsekiella* (*Cyclotella*) *costei* (JCDruart & F.Straub) K.T.Kiss & E.Ács, *Stephanodiscus parvus* Stoermer & Håkansson, *Stephanodiscus minutulus* (Kützing) Cleve & Möller, *Stephanodiscus medius* Håkansson, *Pantocsekiella* (*Cyclotella*) *ocellata* (Pantocsek) K.T.Kiss & E.Ács, *Cyclotella distinguenda* Hustedt, *Pantocsekiella* (*Cyclotella*) *comensis* (Grunow) K.T.Kiss & E.Ács, *Cyclotella plitvicensis* Hustedt te *Cyclotella radiosa* (Grunow) Lemmermann, a zajedno sa penatnim dijatomejama rodova *Fragilaria* Lyngbye te *Synedra* Ehrenberg dominiraju tijekom čitavog

istraživanog razdoblja. Kriptofiti (Cryptophyta) se pojavljuju s nižim udjelom biomase, ali velikom učestalošću, čime tipiziraju zajednice fitoplanktona dubokih krških jezera.

Vrlo plitke stajačice

U referentnim uvjetima zajednicom fitoplanktona dominiraju funkcionalne grupe koje imaju visoku faktorsku vrijednost (7, 9, (5)). To su svojte fitoplanktona koje preferiraju oligotrofna i oligomezotrofna vodna tijela. Reprezentativni predstavnici su: dijatomeje, jednostanične i kolonijalne zelene alge skupine Chlorococcales, planktonske alge skupine Desmidiiales, dinoflagelati i vrste skupine Chrysophyceae. Zajednicu ponekad mogu karakterizirati i predstavnici skupine Chlorococcales iz funkcionalne grupe J te flagelatne zelene alge iz funkcionalne grupe G. Cijanobakterije koje cvjetaju mogu se povremeno pojaviti i uspostaviti kratkotrajnu dominaciju u planktonskoj zajednici, ali njihova biomasa ne prelazi vrijednost 2 mg/L.

Zbog blizine Jadranskog mora, plitko Vransko jezero (Biograd na moru) ima drugačiju zajednicu fitoplanktona koja se svake godine mijenja, ovisno o stupnju zaslanjenosti (saliniteta) vode. U godinama nižeg saliniteta jezera, svojte poput *Cosmarium tenue* W.Archer, *Synedropsis roundii* Torgan, Menezes, & Melo, *Fragilaria* spp., *Cyclotella meneghiniana* Kützing, *Kirchneriella contorta* (Schmidle) Bohlin i *Merismopedia* spp. Meyen se mogu pojaviti u velikoj biomasi. U godinama višeg saliniteta jezera, odnosno bočatih uvjeta, zabilježena je velika biomasa svojti *K. contorta*, *Thalassiosira* sp. Cleve i *Elakatothrix gelatinosa* Wille. Bez obzira na stupanj zaslanjenosti, zajednica fitoplanktona ovog plitkog jezerskog sustava uvijek obiluje tihoplanktonskim vrstama, odnosno bentoskim vrstama, koje su resuspendirane iz bentoske zajednice. Najčešća tihoplanktonska vrsta tijekom razdoblja niskog saliniteta je *Envekadea hedinii* (Hustedt) Van de Vijver, Gligora, Hinz, Kralj & Cocquyt. Tijekom razdoblja povišenog saliniteta vrsta *Tetramphora croatica* Gligora Udovic, Caput Mihalic, Stanković & Levkov postaje jedna od dominantnih vrsta u bentoskoj zajednici, kao i u planktonu.

4.6. Operativna lista svojti

Tablica 21. Operativna lista svojiti fitoplanktona u jezerima u Hrvatskoj s pripadajućim kodonima funkcionalnih skupina (FG) algi i vrijednostima faktora (F) pridruženim kodonima prema utjecaju hranjivih soli na svaki pojedini kodon.

FG	Ime vrste	Grupa	F
A	<i>Cyclostephanos invisitatus</i> (Hohn & Hellermann) Theriot, Stoermer & Håkasson	Bacillariophyceae	9
A	<i>Pantocsekiella comensis</i> (Grunow) K.T.Kiss & E.Ács	Bacillariophyceae	9
A	<i>Pantocsekiella costei</i> (J.C.Druart & F.Straub) K.T.Kiss & E.Ács	Bacillariophyceae	9
A	<i>Thalassiosira</i> sp.	Bacillariophyceae	9
A	<i>Conticribra weissflogii</i> (Grunow) Stachura-Suchoples & D.M.Williams	Bacillariophyceae	9
A	<i>Lindavia tenuistriata</i> (Hustedt) T.Nakov et al	Bacillariophyceae	9
B	<i>Cyclotella distinguenda</i> Hustedt	Bacillariophyceae	9
B	<i>Cyclotella plitvicensis</i> Hustedt	Bacillariophyceae	9
B	<i>Cyclotella</i> spp.	Bacillariophyceae	9

B	<i>Discostella stelligera</i> (Cleve & Grunow) Houk & Klee	Bacillariophyceae	9
B	<i>Lindavia radiosa</i> (Grunow) De Toni & Forti	Bacillariophyceae	9
B	<i>Pantocsekiella ocellata</i> (Pantocsek) K. T. Kiss & E. Ács	Bacillariophyceae	9
B	<i>Pantocsekiella polymorpha</i> (B.Meyer & H.Håkansson) K.T. Kiss & E. Ács	Bacillariophyceae	9
B	<i>Stephanodiscus minutulus</i> (Kützing) Cleve & Möller	Bacillariophyceae	9
C	<i>Asterionella formosa</i> Hassall	Bacillariophyceae	7
C	<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing	Bacillariophyceae	7
C	<i>Stephanodiscus neoastraea</i> Håkansson & Hickel	Bacillariophyceae	7
C	<i>Stephanodiscus parvus</i> Stoermer & Håkansson	Bacillariophyceae	7
D	<i>Nitzschia acicularis</i> (Kützing) W.Smith	Bacillariophyceae	7
D	<i>Ulnaria acus</i> (Kützing) M. Aboal	Bacillariophyceae	7
D	<i>Ulnaria capitata</i> (Ehrenberg) Compère	Bacillariophyceae	7
D	<i>Ulnaria delicatissima</i> (W.Smith) Aboal & P.C.Silva	Bacillariophyceae	7
D	<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) P. Compère	Bacillariophyceae	7
E	<i>Dinobryon bavaricum</i> Imhof	Chrysophyceae	7
E	<i>Dinobryon crenulatum</i> West & G.S.West	Chrysophyceae	7
E	<i>Dinobryon cylindricum</i> O.E.Imhof	Chrysophyceae	7
E	<i>Dinobryon divergens</i> O.E.Imhof	Chrysophyceae	7
E	<i>Dinobryon petiolatum</i> Willén	Chrysophyceae	7
E	<i>Dinobryon sertularia</i> Ehrenberg	Chrysophyceae	7
E	<i>Dinobryon sociale</i> (Ehrenberg) Ehrenberg	Chrysophyceae	7
E	<i>Dinobryon</i> sp.	Chrysophyceae	7
E	<i>Dinobryon stokesii</i> var. <i>neustonicum</i> Petersen & Hansen	Chrysophyceae	7
E	<i>Epipyxis polymorpha</i> (J.W.G.Lund) Hilliard & Asmund	Chrysophyceae	7
E	<i>Mallomonas akrokomos</i> Ruttner	Chrysophyceae	7
E	<i>Mallomonas</i> cf. <i>elongata</i> Reverdin	Chrysophyceae	7
E	<i>Mallomonas</i> sp.	Chrysophyceae	7
E	<i>Spiniferomonas cornutus</i> Balonov	Chrysophyceae	7
E	<i>Spiniferomonas</i> sp.	Chrysophyceae	7
F	<i>Botryococcus braunii</i> Kützing	Chlorophyceae	9
F	<i>Coenochloris fottii</i> (Hindák) Tsarenko	Chlorophyceae	9
F	<i>Coenococcus planctonicus</i> Korshikov	Chlorophyceae	9
F	<i>Coenocystis subcylindrica</i> Korshikov	Chlorophyceae	9
F	<i>Dichotomococcus</i> sp.	Chlorophyceae	9
F	<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i> Nägeli	Chlorophyceae	9
F	<i>Dictyosphaerium</i> sp.	Chlorophyceae	9
F	<i>Dictyosphaerium subsolitarium</i> Van Goor	Chlorophyceae	9
F	<i>Elakatothrix acuta</i> Pascher	Charophyta	9
F	<i>Elakatothrix gelatinosa</i> Wille	Charophyta	9
F	<i>Hindakia tetrachotoma</i> (Printz) C.Bock, Pröschold & Krienitz	Chlorophyceae	9
F	<i>Kirchneriella irregularis</i> (G.M.Smith) Korshikov	Chlorophyceae	9
F	<i>Kirchneriella obesa</i> (West) West & G.S.West	Chlorophyceae	9
F	<i>Kirchneriella</i> sp.	Chlorophyceae	9

F	<i>Micractinium quadrisetum</i> (Lemmermann) G. M. Smith	Chlorophyceae	9
F	<i>Mucidosphaerium pulchellum</i> (H.C.Wood) C.Bock, Proschold & Krienitz	Chlorophyceae	9
F	<i>Nephrocytium agardhianum</i> Nägeli	Chlorophyceae	9
F	<i>Oocystis borgei</i> J.W.Snow	Chlorophyceae	9
F	<i>Oocystis lacustris</i> Chodat	Chlorophyceae	9
F	<i>Oocystis marssonii</i> Lemmermann	Chlorophyceae	9
F	<i>Oocystis parva</i> West & G.S.West	Chlorophyceae	9
F	<i>Oocystis solitaria</i> Wittrock	Chlorophyceae	9
F	<i>Oocystis</i> sp.	Chlorophyceae	9
F	<i>Oocystis submarina</i> Lagerheim	Chlorophyceae	9
F	<i>Oonephris obesa</i> (West & G. S. West) Fott	Chlorophyceae	9
F	<i>Planktosphaeria gelatinosa</i> G.M.Smith	Chlorophyceae	9
F	<i>Radiococcus planktonicus</i> J.W.G.Lund	Chlorophyceae	9
F	<i>Radiococcus</i> sp.	Chlorophyceae	9
F	<i>Raphidocelis danubiana</i> (Hindák) Marvan, Komárek & Comas	Chlorophyceae	9
F	<i>Sphaerocystis planctonica</i> (Korshikov) Bourrelly	Chlorophyceae	9
F	<i>Sphaerocystis schroeteri</i> Chodat	Chlorophyceae	9
G	<i>Pandorina morum</i> (O. F. Müller) Bory de Saint-Vincent	Chlorophyceae	3
H1	<i>Anabaena minderi</i> Huber-Pestalozzi	Cyanobacteria	1
H1	<i>Anabaena</i> sp.	Cyanobacteria	1
H1	<i>Aphanizomenon</i> sp.	Cyanobacteria	1
H1	<i>Chrysochloris bergii</i> (Ostenfeld) E.Zapomelová, O.Skáclová, P.Pummann, R.Kopp & E.Janecek	Cyanobacteria	1
H1	<i>Chrysochloris minor</i> (Kiselev) Komárek	Cyanobacteria	1
J	<i>Actinastrum hantzschii</i> Lagerheim	Chlorophyceae	3
J	<i>Acutodesmus obliquus</i> (Turpin) Hegewald & Hanagata	Chlorophyceae	3
J	<i>Centritractus belenophorus</i> Lemmermann	Xanthophyceae	3
J	<i>Coelastrum astroideum</i> De Notaris	Chlorophyceae	3
J	<i>Coelastrum microporum</i> Nägeli	Chlorophyceae	3
J	<i>Coelastrum polychordum</i> (Korshikov) Hindák	Chlorophyceae	3
J	<i>Coelastrum pseudomicroporum</i> Korshikov	Chlorophyceae	3
J	<i>Crucigenia quadrata</i> Morren	Chlorophyceae	3
J	<i>Crucigenia tetrapedia</i> (Kirchner) Kuntze	Chlorophyceae	3
J	<i>Crucigeniella irregularis</i> (Wille) P.M.Tsarenko & D.M.John	Chlorophyceae	3
J	<i>Desmodesmus bicellularis</i> (Chodat) S.S.An, T.Friedl & E.Hegewald	Chlorophyceae	3
J	<i>Desmodesmus communis</i> (E.H.Hegewald) E.H.Hegewald	Chlorophyceae	3
J	<i>Desmodesmus granulatus</i> (West & G.S.West) Tsarenko	Chlorophyceae	3
J	<i>Enallax acutiformis</i> (B.Schröder) F.Hindák	Chlorophyceae	3
J	<i>Franceia amphitricha</i> (Lagerheim) Hegewald	Chlorophyceae	3
J	<i>Franceia breviseta</i> (West & G.S.West) Fott	Chlorophyceae	3
J	<i>Golenkiniopsis longispina</i> (Korshikov) Korshikov	Chlorophyceae	3
J	<i>Hariotina reticulata</i> P. A. Dangeard	Chlorophyceae	3
J	<i>Lagerheimia ciliata</i> (Lagerheim) Chodat	Chlorophyceae	3
J	<i>Lagerheimia genevensis</i> (Chodat) Chodat	Chlorophyceae	3

J	<i>Lagerheimia longiseta</i> (Lemmermann) Printz	Chlorophyceae	3
J	<i>Lagerheimia marssonii</i> Lemmermann	Chlorophyceae	3
J	<i>Lagerheimia</i> sp.	Chlorophyceae	3
J	<i>Pediastrum duplex</i> Meyen	Chlorophyceae	3
J	<i>Pediastrum simplex</i> Meyen	Chlorophyceae	3
J	<i>Pseudopediastrum boryanum</i> (Turpin) E.Hegewald	Chlorophyceae	3
J	<i>Scenedesmus ecornis</i> (Ehrenberg) Chodat	Chlorophyceae	3
J	<i>Scenedesmus ellipticus</i> Corda	Chlorophyceae	3
J	<i>Scenedesmus obtusus</i> Meyen	Chlorophyceae	3
J	<i>Scenedesmus</i> sp.	Chlorophyceae	3
J	<i>Scenedesmus verrucosus</i> Y.V.Roll	Chlorophyceae	3
J	<i>Tetraedron minimum</i> (A.Braun) Hansgirg	Chlorophyceae	3
J	<i>Tetrastrum triangulare</i> (Chodat) Komárek	Chlorophyceae	3
J	<i>Willea rectangularis</i> (A.Braun) D.M.John, M.J.Wynne & P.M.Tsarenko	Chlorophyceae	3
K	<i>Anathece clathrata</i> (W.West & G.S.West) Komárek, Kastovsky & Jezberová	Cyanobacteria	7
K	<i>Anathece minutissima</i> (West) Komárek, Kastovsky & Jezberová	Cyanobacteria	7
K	<i>Anathece smithii</i> (Komárková-Legnerová & Cronberg) Komárek, Kastovsky & Jezberová	Cyanobacteria	7
K	<i>Aphanocapsa delicatissima</i> West & G.S.West	Cyanobacteria	7
K	<i>Aphanocapsa elachista</i> West & G.S.West	Cyanobacteria	7
K	<i>Aphanocapsa holsatica</i> (Lemmermann) G.Cronberg & J.Komárek	Cyanobacteria	7
K	<i>Aphanocapsa incerta</i> (Lemmermann) G.Cronberg & Komárek	Cyanobacteria	7
K	<i>Aphanocapsa nubila</i> Komárek & H.J.Kling	Cyanobacteria	7
K	<i>Aphanocapsa parasitica</i> (Kützing) Komárek & Anagnostidis	Cyanobacteria	7
K	<i>Aphanocapsa planctonica</i> (G.M.Smith) Komárek & Anagnostidis	Cyanobacteria	7
K	<i>Aphanocapsa</i> sp.	Cyanobacteria	7
K	<i>Aphanothece elabens</i> (Brébisson ex Meneghini) Elenkin	Cyanobacteria	7
K	<i>Aphanothece floccosa</i> (Zalessky) G.Cronberg & J.Komárek	Cyanobacteria	7
K	<i>Aphanothece</i> sp.	Cyanobacteria	7
K	<i>Aphanothece stagnina</i> (Sprengel) A.Braun	Cyanobacteria	7
L _M	<i>Gomphosphaeria aponina</i> Kützing	Cyanobacteria	5
L _O	<i>Ceratium hirundinella</i> (O.F.Müller) Dujardin*	Dinophyta	7
L _O	<i>Chroococcus dispersus</i> (Keissler) Lemmermann	Cyanobacteria	7
L _O	<i>Chroococcus minutus</i> (Kützing) Nägeli	Cyanobacteria	7
L _O	<i>Chroococcus obliteratedus</i> Richter	Cyanobacteria	7
L _O	<i>Chroococcus planctonicus</i> Bethge	Cyanobacteria	7
L _O	<i>Chroococcus</i> sp.	Cyanobacteria	7
L _O	<i>Chroococcus turgidus</i> (Kützing) Nägeli	Cyanobacteria	7
L _O	<i>Gymnodinium</i> spp.	Dinophyta	7
L _O	<i>Gymnodinium uberrimum</i> (G.J.Allman) Kofoid & Swezy	Dinophyta	7
L _O	<i>Gyrodinium helveticum</i> (Penard) Y.Takano & T.Horiguchi	Dinophyta	7
L _O	<i>Limnococcus limneticus</i> (Lemmermann) Komárková, Jezberová, O.Komárek & Zapomlová	Cyanobacteria	7
L _O	<i>Merismopedia glauca</i> (Ehrenberg) Naegeli	Cyanobacteria	7
L _O	<i>Merismopedia insignis</i> Skorbatov [Shkorbatov]	Cyanobacteria	7

Lo	<i>Merismopedia punctata</i> Meyen	Cyanobacteria	7
Lo	<i>Merismopedia tenuissima</i> Lemmermann	Cyanobacteria	7
Lo	<i>Parvodinium umbonatum</i> (Stein) S.Carty	Dinophyta	7
Lo	<i>Peridiniopsis borgei</i> Lemmermann	Dinophyta	7
Lo	<i>Peridiniopsis elpatiewskyi</i> (Ostenfeld) Bourrelly	Dinophyta	7
Lo	<i>Peridinium</i> sp.	Dinophyta	7
Lo	<i>Peridinium willei</i> Huitfeldt-Kaas	Dinophyta	7
Lo	<i>Rhabdoderma lineare</i> Schmidle & Lauterborn	Cyanobacteria	7
Lo	<i>Snowella atomus</i> Komárek & Hindák	Cyanobacteria	7
Lo	<i>Snowella lacustris</i> (Chodat) Komárek & Hindák	Cyanobacteria	7
Lo	<i>Snowella litoralis</i> (Häyrén) Komárek & Hindák	Cyanobacteria	7
Lo	<i>Woronichinia compacta</i> (Lemmermann) Komárek & Hindák	Cyanobacteria	7
Lo	<i>Woronichinia naegeliana</i> (Unger) Elenkin	Cyanobacteria	7
M	<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing*	Cyanobacteria	3
M	<i>Microcystis flosaquae</i> (Wittrock) Kirchner*	Cyanobacteria	3
M	<i>Microcystis novacekii</i> (Komárek) Compère*	Cyanobacteria	3
M	<i>Microcystis smithii</i> Komárek & Anagnostidis*	Cyanobacteria	3
M	<i>Microcystis wesenbergii</i> (Komárek) Komárek*	Cyanobacteria	3
MP	<i>Achnanthydium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Achnanthydium pyrenaicum</i> (Hustedt) H.Kobayasi	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Achnanthydium</i> sp.	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Amphora</i> sp.	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Caloneis</i> sp.	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Calothrix</i> sp.	Cyanobacteria	7
MP	<i>Cocconeis pediculus</i> Ehrenberg	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Craticula halophila</i> (Grunow) D.G.Mann	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Cymbella</i> sp.	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Cymbopleura amphicephala</i> (Nägeli) Krammer	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Diatoma moniliformis</i> Kützing	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Diatoma vulgare</i> Bory de Saint-Vincent	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Diploneis krammeri</i> Lange-Bertalot & E.Reichardt	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Encyonema</i> sp.	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Encyonopsis minuta</i> Krammer & E.Reichardt	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Encyonopsis</i> sp.	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Entomoneis paludosa</i> var. <i>subsalina</i> (Cleve) Krammer	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Envekadea hedinii</i> (Hustedt) Van de Vijver, Gligora, Hinz, Kralj & Cocquyt	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Epithemia smithii</i> Carruthers	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Eunotia</i> sp.	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Fragilaria brevistriata</i> Grunow in van Heurck (Pseudostaurosira)	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Gomphonema angustum</i> C. Agardh	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Gomphonema</i> spp.	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Jaaginema metaphyticum</i> Komárek	Cyanobacteria	7

MP	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Cyanobacteria	7
MP	<i>Mastogloia baltica</i> Grunow	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Mastogloia smithii</i> Thwaites ex W.Smith	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Melosira varians</i> C.Agardh	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Navicula</i> cf. <i>trivialis</i> Lange-Bertalot	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Navicula cryptocephala</i> Kützing	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Navicula radiosa</i> Kützing	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Navicula</i> spp.	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Nitzschia elegantula</i> Grunow	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Nitzschia sociabilis</i> Hustedt	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Nitzschia</i> spp.	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Oscillatoria</i> sp.	Cyanobacteria	7
MP	<i>Oscillatoria tenuis</i> C.Agardh ex Gomont	Cyanobacteria	7
MP	Oscillatoriales	Cyanobacteria	7
MP	<i>Phormidium chalybeum</i> (Mertens ex Gomont) Anagnostidis & Komárek	Cyanobacteria	7
MP	<i>Phormidium</i> sp.	Cyanobacteria	7
MP	<i>Pinnularia</i> sp.	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Planktothrix agardhii</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek	Cyanobacteria	7
MP	<i>Rhopalodia gibba</i> (Ehrenberg) Otto Müller	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Salpingoeca frequentissima</i> (Zacharias) Lemmermann	Chrysophyceae	7
MP	<i>Salpingoeca fusiformis</i> W.S.Kent	Chrysophyceae	7
MP	<i>Salpingoeca</i> sp.	Chrysophyceae	7
MP	<i>Stokesiella gracilis</i> Pascher	Chrysophyceae	7
MP	<i>Surirella</i> sp.	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Tetramphora croatica</i> Gligora Udovic, Caput Mihalic, Stankovic & Levkov	Bacillariophyceae	7
MP	<i>Fragilaria capucina</i>	Bacillariophyceae	7
N	<i>Cosmarium laeve</i> Rabenhorst	Charophyta	9
N	<i>Cosmarium phaseolus</i> var. <i>elevatum</i> Nordst.	Charophyta	9
N	<i>Cosmarium protruberans</i> P.Lundell	Charophyta	9
N	<i>Cosmarium</i> sp.	Charophyta	9
N	<i>Cosmarium tenue</i> W.Archer	Charophyta	9
N	<i>Staurastrum oxyacanthum</i> W.Archer	Charophyta	9
N	<i>Staurastrum pingue</i> Teiling	Charophyta	9
P	<i>Aulacoseira granulata</i> (Ehrenberg) Simonsen	Bacillariophyceae	5
P	<i>Aulacoseira</i> sp.	Bacillariophyceae	5
P	<i>Closterium acutum</i> var. <i>variabile</i> (Lemmermann) Willi Kreiger	Charophyta	5
P	<i>Closterium idiosporum</i> West & G.S.West	Charophyta	5
P	<i>Closterium</i> sp.	Charophyta	5
P	<i>Diatoma tenue</i> C.Agardh	Bacillariophyceae	5
P	<i>Fragilaria crotonensis</i> Kitton	Bacillariophyceae	5
P	<i>Fragilaria</i> sp.	Bacillariophyceae	5
P	<i>Fragilaria tenera</i> var. <i>nanana</i> (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot & S.Ulrich	Bacillariophyceae	5
P	<i>Stausirella pinnata</i> (Ehrenberg) D.M.Williams & Round	Bacillariophyceae	5

P	<i>Synedropsis roundii</i> Torgan, Menezes, & Melo	Bacillariophyceae	5
P	<i>Tabularia</i> sp.	Bacillariophyceae	5
S1	<i>Anagnostidinium amphibium</i> (C.Agardh ex Gomont) Strunecký, Bohunická, J.R.Johansen & J.Komárek	Cyanobacteria	1
S1	<i>Jaaginema</i> sp.	Cyanobacteria	1
S1	<i>Komvophoron pallidum</i> (Skuja) Anagnostidis & Komárek	Cyanobacteria	1
S1	<i>Komvophoron</i> sp.	Cyanobacteria	1
S1	<i>Limnothrix redekei</i> (van Goor) M.E.Meffert	Cyanobacteria	1
S1	<i>Planktothrix</i> sp.	Cyanobacteria	1
S1	<i>Pseudanabaena biceps</i> Böcher	Cyanobacteria	1
S1	<i>Pseudanabaena limnetica</i> (Lemmermann) Komárek	Cyanobacteria	1
S1	<i>Pseudanabaena</i> sp.	Cyanobacteria	1
T	<i>Actinotaenium</i> sp./ <i>Mesotaenium</i> sp.	Charophyta	5
T	<i>Binuclearia lauterbornii</i> (Schmidle) Proschkina-Lavrenko	Chlorophyceae	5
T	<i>Mougeotia</i> sp.	Charophyta	5
U	<i>Uroglena</i> sp.	Chrysophyceae	9
W1	<i>Euglena pisciformis</i> Klebs	Euglenophyceae	5
W1	<i>Euglena proxima</i> P.A.Dangeard	Euglenophyceae	5
W1	<i>Euglena</i> sp.	Euglenophyceae	5
W1	<i>Gonium pectorale</i> O.F.Müller	Chlorophyceae	5
W1	<i>Lepocinclis tripteris</i> (Dujardin) Marin & Melkonian	Euglenophyceae	5
W2	<i>Trachelomonas caudata</i> (Ehrenberg) Stein	Euglenophyceae	5
W2	<i>Trachelomonas globularis</i> (Averintsev) Lemmermann	Euglenophyceae	5
W2	<i>Trachelomonas volvocina</i> (Ehrenberg) Ehrenberg	Euglenophyceae	5
W2	<i>Treubaria triappendiculata</i> C.Bernard	Chlorophyceae	5
WS	<i>Synura</i> sp.	Chrysophyceae	7
X1	<i>Ankistrodesmus densus</i> Korshikov	Chlorophyceae	5
X1	<i>Ankistrodesmus falcatus</i> (Corda) Ralfs	Chlorophyceae	5
X1	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda	Chlorophyceae	5
X1	<i>Ankistrodesmus spiralis</i> (W.B.Turner) Lemmermann	Chlorophyceae	5
X1	<i>Ankyra judayi</i> (G.M.Smith) Fott	Chlorophyceae	5
X1	<i>Ankyra</i> sp.	Chlorophyceae	5
X1	<i>Chlorolobion</i> sp.	Chlorophyceae	5
X1	<i>Closteriopsis acicularis</i> (Chodat) J.H.Belcher & Swale	Chlorophyceae	5
X1	<i>Lanceola spatulifera</i> (Korshikov) Hindák	Chlorophyceae	5
X1	<i>Lobomonas</i> sp.	Chlorophyceae	5
X1	<i>Monoraphidium arcuatum</i> (Korshikov) Hindák	Chlorophyceae	5
X1	<i>Monoraphidium circinale</i> (Nygaard) Nygaard	Chlorophyceae	5
X1	<i>Monoraphidium contortum</i> (Thuret) Komárková-Legnerová	Chlorophyceae	5
X1	<i>Monoraphidium dybowskii</i> (Woloszynska) Hindák & Komárkova Legnerová	Chlorophyceae	5
X1	<i>Monoraphidium griffithii</i> (Berkeley) Komárková-Legnerová	Chlorophyceae	5
X1	<i>Monoraphidium irregulare</i> (G.M.Smith) Komárková-Legnerová	Chlorophyceae	5
X1	<i>Monoraphidium minutum</i> (Nägeli) Komárková-Legnerová	Chlorophyceae	5
X1	<i>Pseudodidymocystis fina</i> (Komárek) E.Hegewald & Deason	Chlorophyceae	5

X2	<i>Carteria pseudoglobosa</i> Ettl	Chlorophyceae	9
X2	<i>Carteria</i> sp.	Chlorophyceae	9
X2	<i>Chlamydomonas lapponica</i> Skuja	Chlorophyceae	9
X2	<i>Chlamydomonas</i> spp.	Chlorophyceae	9
X2	<i>Chlamydonephris pomiformis</i> (Pascher) H.Ettl & O.Ettl	Chlorophyceae	9
X2	<i>Chromulina pigra</i> Skuja	Chrysophyceae	9
X2	<i>Chromulina</i> sp.	Chrysophyceae	9
X2	<i>Chroomonas coerulea</i> (Geitler) Skuja	Cryptophyceae	9
X2	<i>Chrysoameba</i> sp.	Chrysophyceae	9
X2	<i>Chrysoamoeba helvetica</i> Reverdin	Chrysophyceae	9
X2	<i>Chrysochromulina parva</i> Lackey	Chrysophyceae	9
X2	<i>Chrysochromulina</i> sp.	Chrysophyceae	9
X2	<i>Chrysolykos plactonicus</i> B.Mack	Chrysophyceae	9
X2	<i>Chrysolykos skujae</i> (Nauwerck) Bourrelly	Chrysophyceae	9
X2	<i>Chroomonas nordstedtii</i> Hansgirg	Cryptophyceae	9
X2	<i>Cryptomonas</i> sp.<20 µm	Cryptophyceae	9
X2	<i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow	Chlorophyceae	9
X2	Haptophyta nedet.	Haptophyta	9
X2	<i>Kephyrion crassum</i> (Hilliard) Starmach	Chrysophyceae	9
X2	<i>Kephyrion littorale</i> J.W.G.Lund	Chrysophyceae	9
X2	<i>Kephyrion ovale</i> (Lackey) Huber-Pestalozzi	Chrysophyceae	9
X2	<i>Kephyrion rubri-claustri</i> Conrad	Chrysophyceae	9
X2	<i>Kephyrion</i> sp.	Chrysophyceae	9
X2	<i>Nephroselmis olivacea</i> Stein	Chlorophyceae	9
X2	<i>Pedinella hexacostata</i> Vysotskii [Vysotskij, Wysotzki, Wysotzki]	Chrysophyceae	9
X2	<i>Plagioselmis nannoplanctica</i> (H.Skuja) G.Novarino, I.A.N.Lucas & S.Morrall	Cryptophyceae	9
X2	<i>Prymnesium parvum</i> N.Carter	Chlorophyceae	9
X2	<i>Pseudokephyrion</i> sp.	Chrysophyceae	9
X2	<i>Pyramimonas</i> sp.	Chlorophyceae	9
X2	<i>Rhodomonas lacustris</i> Pascher & Ruttner	Cryptophyceae	9
X2	<i>Scourfieldia</i> sp.	Chlorophyceae	9
X2	<i>Selenochloris stigmatophora</i> (Korshikov) Ettl	Chlorophyceae	9
X2	<i>Spermatozopsis exsultans</i> Korshikov	Chlorophyceae	9
X3	<i>Bitrichia chodatii</i> (Reverdin) Chodat	Chrysophyceae	9
X3	<i>Bitrichia danubiensis</i> Juri	Chrysophyceae	9
X3	<i>Bitrichia ollula</i> (Fott) Fott	Chrysophyceae	9
X3	<i>Chrysocapsella planctonica</i> (West & G.S.West) Bourrelly	Chrysophyceae	9
X3	<i>Chrysococcus</i> sp.	Chrysophyceae	9
X3	<i>Ochromonas danica</i> E.G.Pringsheim	Chrysophyceae	9
X3	<i>Ochromonas</i> sp.	Chrysophyceae	9
X3	<i>Schroederia setigera</i> (Schröder) Lemmermann	Chlorophyceae	9
X3	<i>Sphaerellopsis mucosa</i> (Korshikov) Pentecost	Chlorophyceae	9
X3	<i>Sphaerellopsis</i> sp.	Chlorophyceae	9

X3	<i>Stichogloea olivacea</i> Chodat	Chrysophyceae	9
X3	<i>Tetraselmis cordiformis</i> (N.Carter) Stein	Chlorophyceae	9
Y	<i>Cryptomonas curvata</i> Ehrenberg	Cryptophyceae	7
Y	<i>Cryptomonas marssonii</i> Skuja	Cryptophyceae	7
Y	<i>Cryptomonas ovata</i> Ehrenberg	Cryptophyceae	7
Y	<i>Cryptomonas platyuris</i> Skuja	Cryptophyceae	7
Y	<i>Cryptomonas</i> sp.>20 µm	Cryptophyceae	7

*ukoliko su u zajednici zajedno prisutne vrste roda *Microcystis* i *Ceratium* tada se funkcionalna grupa definira kao LM

5. Prijedlog metoda za ocjenu ekološkog stanja jezera Dinaridske ekoregije na temelju fitobentosa

Makrofiti i fitobentos su biološki elementi kakvoće (BEK) koji se u ocjeni ekološkog stanja voda prema ODV zajednički koriste kao pokazatelj bentičke zajednice ispitivanog vodnog tijela. U većini se zemalja ova dva BEK-a zasebno ocjenjuju. Budući da se u ocjeni kvalitete na temelju fitobentosa najčešće koriste dijatomeje, indeksi za ocjenu obično se računaju prema njihovom relativnom udjelu (Kelly i sur., 2014.). Prema JRC interkalibracijskom tehničkom izvješću za fitobentos jezera (Kelly i sur., 2014.), metode ocjene koje se temelje na korištenju dijatomeja kalibrirane su prema gradijentima eutrofikacije (uglavnom spojevi dušika i fosfora).

Za ocjenu kakvoće stajaćih voda Dinaridske ekoregije na temelju dijatomeja korišteni su interkalibrirani multimetrijski indeksi. Naime, multimetrijski su indeksi ukazali na jaču korelaciju između stresora i dijatomejskih indeksa nego jednostavniji metrički indeksi (Kelly i sur., 2014.). Multimetrijski indeksi sadrže dijatomejske indekse koji se temelje na jednadžbi Zelinka-Marwan (1961.) koju je modificirao Coste (1982.).

$$index = \frac{\sum_{j=1}^n p_j \times s_j \times v_j}{\sum_{j=1}^n p_j \times v_j}$$

gdje je:

p_j – relativna učestalost vrste “j” u uzorku

s_j – osjetljivost vrste “j” (optimum)

v_j – tolerantnost/indikatorska vrijednost vrste “j”

Računalni program OMNIDIA (Lecointe i sur., 2008.) sadrži vrijednosti s_j i v_j za oko 6500 dijatomejskih svojti te se preporuča njegova upotreba u ocjeni kakvoće vode temeljene na dijatomejama.

Metode koje su uspješno interkalibrirane tijekom stručne provjere sadrže indekse kao što su IBD, EPI-D, SI, TI, IPS i TDIL1-20. Svi se navedeni indeksi, osim TDIL1-20 (Stenger-Kovács i sur., 2007.), mogu izračunati pomoću programa OMNIDIA. Izračun za indeks TDIL1-20 također se temelji na Zelinka-Marwan jednadžbi (1961.) koju je modificirao Coste (1982.). Računalni program DILSTORE (Hajnal i sur., 2009.) sadrži vrijednosti osjetljivosti i pokazatelja za TDIL1-20. Konačni izračun indeksa TDIL1-20 temelji se na sljedećoj jednadžbi (Stenger-Kovács i sur., 2007.):

$$TDIL_{1-20} = 3,8 \times \sum TDIL_{1-20} + 1$$

U Dinaridskoj ekoregiji Republike Hrvatske razlikuju se 6 tipova jezera koji su grupirani vrlo plitke stajaćice i duboke stajaćice. Prema JRC interkalibracijskom tehničkom izvješću za fitobentos jezera (Kelly i sur., 2014.) te izvještaju Ács i sur. (2015.) predloženo je korištenje dva multimetrijska indeksa: indeks za fitobentos vrlo plitkih stajaćica MIB i indeks za fitobentos dubokih stajaćica MIL (Tab. 22). Vrijednosti ovih multimetrijskih indeksa variraju od 1 do 20 i predstavljaju srednju vrijednost

navedenih IBD-a (Biological Diatom Index) i EPI-D-a (Eutrophication Pollution Index- Diatoms) za vrlo plitke stajačice i IBD-a, EPI-D-a i TDIL₁₋₂₀ -a (Trophic Diatom Indeks- Lakes) za duboke stajačice.

Tablica 22. Predloženi multimetrijski indeksi za ocjenu ekološkog stanja stajačica Dinaridske ekoregije.

Tip umjetne stajačice	Korišteni dijatomejski indeksi	Multimetrijski indeksi	Referentne vrijednosti predloženih indeksa
Vrlo plitka stajačica	IBD	$MIB = \frac{IBD + EPI - D}{2}$	17
	EPI-D		
Duboka stajačica	IBD	$MIL = \frac{IBD + EPI - D + TDIL_{1-20}}{3}$	19
	EPI-D		
	TDIL ₁₋₂₀		

5.1. Duboke stajačice

Predloženi multimetrijski indeks za fitobentos dubokih stajačica (MIL) je također prošao interkalibracijski proces. Detalji graničnih vrijednosti multimetrijskog indeksa MIL (Tab. 23) mogu se pronaći u službenom izvješću JRC (Kelly i sur., 2014.).

Tablica 23. Granične vrijednosti indeksa MIL i OEK dubokih stajačica.

Kategorije ekološkog stanja	Granične vrijednosti indeksa MIL	Granične vrijednosti OEK
Vrlo dobro	≥ 16.01	≥ 0.84
Dobro	12.01-16.00	0.63-0.83
Umjereno	8.01-12.00	0.42-0.62
Loše	4.00-8.00	0.21-0.41
Vrlo loše	<4.00	<0.21

Budući da su očekivane granične vrijednosti OEK jedinstvene za sve zemlje članice EU, ove je vrijednosti potrebno prilagoditi prema nalogu Cross GIG Interkalibracije (Tab. 24; Kelly i sur., 2014., Ács i sur., 2015.).

Tablica 24. Ispravljene granične vrijednosti indeksa MIL i OEK dubokih stajaćica.

Kategorije ekološkog stanja	Granične vrijednosti indeksa MIL	Granične vrijednosti OEK	Jednadžba
Vrlo dobro	≥ 15.21	≥ 0,8	$OEK = 0.0526 \times MIL$
Dobro	11.41-15.20	0,6-0,79	$OEK = 0.0526 \times MIL$
Umjereno	7.61-11.40	0,4-0,59	$OEK = 0.0526 \times MIL$
loše	3.80-7.60	0,2-0,39	$OEK = 0.0526 \times MIL$
Vrlo loše	<3.80	≤0,19	$OEK = 0.0526 \times MIL$

Konačnu ocjena ekološkog stanja (OEK) je normalizirana vrijednost MIL-a prema tablici 24. U tablici 24 prikazane su i granične vrijednosti OEK-a i pripadajuće kategorije ekološkog stanja.

5.2. Vrlo plitke stajaćice

Predloženi multimetrijski indeks (MIB) je prošao interkalibracijski proces. MIB je razvijen za ocjenu ekološkog stanja jezera Balaton (Kelly i sur., 2014.), čija su fizikalno-kemijska obilježja vrlo slična vrlo plitkim stajaćicama Dinaridske ekoregije. Obzirom da je Balaton karbonatno, plitko, oligo-mezotrofno jezero, u ovoj se studiji predlaže korištenje MIB-a za vrlo plitka jezera Dinaridske ekoregije. Granične vrijednosti MIB indeksa prikazane u Tablici 25, mogu se naći u službenom JRC izvješću (Kelly i sur., 2014.).

Tablica 25. Granične vrijednosti indeksa MIB i OEK vrlo plitkih stajaćica.

Kategorije ekološkog stanja	Granične vrijednosti indeksa MIB	Granične vrijednosti OEK
Vrlo dobro	≥ 15.70	≥ 0.92
Dobro	11.80-15.69	0.70-0.91
Umjereno	7.80-11.79	0.46-0.69
Umjereno loše	3.90-7.79	0.23-0.45
Loše	<3.90	<0.23

Budući da su očekivane granične vrijednosti OEK jedinstvene za sve zemlje članice EU, ove je vrijednosti potrebno prilagoditi prema naputku Cross GIG Interkalibracije (Tab. 26; Ács i sur. 2015.).

Tablica 26. Ispravljene granične vrijednosti indeksa MIB i OEK vrlo plitkih stajaćica.

Kategorije ekološko	Granične vrijednosti indeksa MIB	Granične vrijednosti OEK	Jednadžba
Vrlo dobro	≥ 13.60	≥ 0,8	$OEK = 0.0588 \times MIB$
Dobro	10.20-13.59	0,6-0,79	$OEK = 0.0588 \times MIB$
Umjereno	6.80-10.19	0,4-0,59	$OEK = 0.0588 \times MIB$
Umjereno loše	3.40-6.79	0,2-0,39	$OEK = 0.0588 \times MIB$
Loše	<3.40	≤ 0,19	$OEK = 0.0588 \times MIB$

Konačnu ocjena ekološkog stanja (OEK) je normalizirana vrijednost MIL-a prema tablici 26. U tablici 26 prikazane su i granične vrijednosti OEK-a i pripadajuće kategorije ekološkog stanja.

5.3. Ocjena ekološkog stanja istraživanih stajaćica temeljem fitobentosa

U Tablici 27 prikazane su ocjene ekološkog stanja temeljem fitobentosa i predložene metodologije, na svim postajama na kojima je uzorkovan fitobentos.

Tablica 27. Ocjena ekološkog stanja istraživanih jezera temeljem fitobentosa.

	OEK	Ekološko stanje
Vransko_Cres 026/19	0,82	Vrlo dobro
Vransko_Cres 027/19	0,78	Dobro
Vransko_Cres 028/19	0,80	Dobro
Oćuša 032/19	0,81	Vrlo dobro
Oćuša 033/19	0,74	Dobro
Oćuša 034/19	0,81	Vrlo dobro
Visovac 035/19	0,80	Dobro
Visovac 036/19	0,79	Dobro
Visovac 037/19	0,81	Vrlo dobro
Kozjak 041/19	0,84	Vrlo dobro
Kozjak 042/18	0,87	Vrlo dobro
Kozjak 043/19	0,92	Vrlo dobro
Prošće 044/19	0,92	Vrlo dobro
Prošće045/19	0,90	Vrlo dobro
Prošće046/19	0,95	Vrlo dobro
Crniševo 030/19	0,82	Vrlo dobro
Crniševo 031/19	0,77	Dobro
Crniševo 029/19	0,86	Vrlo dobro
Vransko jezero (Biograd) – Motel 038/19	0,82	Vrlo dobro
Vransko jezero (Biograd) – Motel 039/19	0,78	Dobro
Vransko jezero (Biograd) – Motel 040/19	0,83	Vrlo dobro

5.4. Opis fitobentoske zajednice u uvjetima vrlo dobrog ekološkog stanja

Bentičke dijatomejske zajednice krških jezera prema udjelu biomase karakteriziraju manje penatne vrste *Achnanthydium minutissimum* (Kützing) Czarnecki, *Encyonopsis microcephala* (Grunow) Krammer i *Fragilaria delicatissima* (W.Smith) Lange-Bertalot i *Gomphonema lateripunctatum* E.Reichardt & Lange -Bertalot, kao pokazatelji vrlo dobrog ekološkog stanja. S nešto nižim udjelom biomase prisutne su *Denticula tenuis* Kützing, *Cymbella subhelvetica* Krammer i *Delicata delicatula* (Kützing) Krammer, vrste koje također ukazuju na vrlo dobro ekološko stanje krških jezera. Nasuprot njima, vrste *Navicula cryptotenelloides* Lange-Bertalot, *Brachysira* sp. Kützing i *Achnanthydium exile* (Kützing) Heiberg opisuju bentičke zajednice u dobrom ekološkom stanju.

Duboke stajačice

U uzorcima dominiraju vrste koji preferiraju oligotrofne vodne sustave. Zbog stalnih oscilacija razine vode zajednica dijatomeja na prirodnim supstratima pokazuje rani stadij sukcesije te prevladavaju stanice malih dimenzija vrsta rodova *Achnanthydium* Kützing i *Fragilaria* Lyngbye.

Vrlo plitke stajačice

U uzorcima dominiraju vrste koji preferiraju mezotrofne i oligotrofne vodene ekosustave. Zbog stalnih oscilacija razine vode zajednica dijatomeja na prirodnim supstratima pokazuje rani stadij sukcesije te prevladavaju stanice malih dimenzija vrsta rodova *Achnanthydium* i *Fragilaria*. U sustavima mogu dominirati vrste rodova *Navicula*, *Nitzschia*, *Gomphonema* i *Cymbella sensu lato*.

U Tablici 28 prikazane su korelacije ocjene ekološkog stanja dubokih jezera temeljem fitobentosa (MIL indeks) s fizikalno-kemijskim čimbenicima i zemljišnim pokrovom na svim postajama na kojima je uzorkovan fitobentos.

Tablica 28. Prikaz Spearmanovog koeficijenta korelacije indeksa MIL s različitim fizikalno-kemijskim čimbenicima te zemljišnim pokrovom. Korelacije označene crveno statistički su značajne pri $p < 0,05$.

	MIL		MIL
Ukupni fosfor [mg L^{-1}]	-0.5161 p=0.2946	BPK ₅ [$\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$]	0.6000 p=0.2080
Ukupni dušik [mg L^{-1}]	0.6957 p=0.1248	Temperatura vode [$^{\circ}\text{C}$]	-0.8286 p=0.0416
N-NO ₃ ⁻ [mg L^{-1}]	0.5429 p=0.2657	Otopljeni kisik [$\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$]	0.6179 p=0.1911
N-NO ₂ ⁻ [mg L^{-1}]	-0.4414 p=0.3809	pH	-0.4058 p=0.4247
Provodljivost [$\mu\text{S cm}^{-1}$]	-0.1429 p=0.4247	Umjetna područja [%]	-0.3479 p=0.4993
Alkalinitet [$\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$]	0.5429 p=0.2657	Intenzivna poljoprivreda [%]	-0.3928 p=0.4411
Suspendirana tvar [mg L^{-1}]	0.1309 p=0.8047	Ekstenzivna poljoprivreda [%]	0.1429 p=0.7872
KPK-Mn [$\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$]	0.8804 p=0.0206	Poluprirodna područja [%]	0.1429 p=0.7872

6. PRIJEDLOG SUSTAVA OCJENE EKOLOŠKOG STANJA PRIRODNIH JEZERA TEMELJEM MAKROZOOBENTOSA

6.1. Baza podataka

Za izradu sustava ocjene ekološkog stanja jezera Dinaridske ekoregije korištena je proširena baza podataka, koja je uključivala i bazu podataka dobivenu u sklopu projekta „Klasifikacijski sustav ekološkog potencijala za umjetna i znatno promijenjena tijela površinskih voda – II. dio: Stajačice Dinaridske ekoregije“. Proširena baza podataka se koristi kako bi se postigao širi gradijent pritiska, neophodan za provođenje statističke analize i izradu modela za utvrđivanje referentnog stanja jezera temeljem makrozoobentosa. Osim podataka o sastavu i gustoći populacija makrozoobentosa prirodnih jezera Dinaridske ekoregije uzorkovanih u 2018. i 2019. godini korišteni su i podaci o sastavu i gustoći populacija odabranih akumulacija Dinaridske ekoregije (Bajer, Brljan, Butoniga, Golubić, Gusić polje, Lepenica, Lešće, Njivice, Opsenica, Ponike, Pranjčevići, Prološko blato, Tribalj i Vlačine). Za statističku analizu korišteni su prikupljeni podaci o sastavu i strukturi zajednice makrozoobentosa u prirodnim jezerima, ali i akumulacijama, za koje je procijenjeno da su reprezentativne za ocjenu utjecaja eutrofikacije te poribljavanja. Za izradu statističkog modela nisu uključeni podaci prikupljeni u akumulacijama koje se odlikuju s velikim oscilacijama vodostaja te posljedično imaju „siromašne“ zajednice makrozoobentosa (Peruča, Kruščica, Lokve i Ričice). Također, referentna baza podataka nije uključivala niti akumulaciju Štikada, koja se radi specifičnog antropogenog utjecaja odlikuje s malom raznolikošću i gustoćom populacija makrozoobentosa. U statističku analizu nisu uključeni niti podaci o sastavu i strukturi makrozoobentosa u akumulacijama Dinaridske ekoregije prikupljeni s postaja koja su imale morfološki izmijenjenu obalu te s postaja gdje su uzorci prikupljeni s tehnilitala uz brane i nasipe.

6.2. Izračun metrika

Temeljem kvalitativnih i kvantitativnih podataka o zajednici makrozoobentosa moguće je pomoću određenih računalnih programa izračunati niz metrika (indeksa) koje su odraz strukture, raznolikosti i funkcioniranja zajednice makrozoobentosa. Metrike su izračunate pomoću programa Asterics 4.04. Ukupno je izračunato 376 metrika, koje se mogu grupirati u četiri glavne kategorije:

1. Metrike koje se odnose na funkcionalne kategorije, a prema Schmedtje i Colling (1996) svrstavaju se u pet dodatnih kategorija.
2. Metrike koje se odnose na sastav, odnosno brojnost pojedinih svojti. Ove metrike daju informaciju o udjelu pojedinih skupina (taksona) u odnosu na ukupnu brojnost bentičkih beskralježnjaka.
3. Metrike koje ukazuju na raznolikost zajednice; npr. Simpson, Shannon – Wiener, Margalef indeksi raznolikosti i sl.
4. Metrike iz skupine osjetljivosti/tolerantnosti, tj. metrike koje uključuju svojte koje su poznate kao indikatori, odnosno osjetljive na pojedine pritiske.

6.3. Selekcija metrika (indeksa)

Slijedeći korak podrazumijeva odabir nekoliko metrika koje najbolje reagiraju na odabrane tipološke pokazatelje i pritiske.

Prvi kriterij isključivanja pojedinih metrika bila je dostatna količina podataka. Za neke metrike, ponuđena baza nije pružala dovoljnu količinu informacija ili nije sadržavala ključne indikatorske svojte te one nisu izračunate za sva istraživana jezera i postaje. U drugom kriteriju odabira metrika isključene su sve metrike koje se primarno odnose na tekućice (npr. *Rhithron Type* indeks). Vrijednosti preostalih metrika testirane su u programu Statistica 12.0 (StatSoft Inc. 2013) za normalnu i/ili linearnu raspodjelu. Metrike odabrane za ocjenu ekološkog stanja jezera, odnosno za izračun omjera ekološke kakvoće su: % Chironomini, Margalef indeks raznolikosti, Broj porodica te EPT [%]. Konačna ocjena ekološkog stanja rezultat je srednje vrijednosti omjera ekološke kakvoće ovih četiriju metrika. Jedina iznimka je jezerski tip HR-L_2, tj. Vransko jezero na Cresu, koje zbog svog ultraoligotrofnog karaktera (ali i izoliranosti), prirodno ima vrlo malu raznolikost. Stoga u izračunu ekološkog stanja za jezerski tip HR-L_2 ne koristimo metriku Margalef indeks raznolikosti.

6.4. Okolišni parametri i pritisci

Sastav zajednice makrozoobentosa odraz je ekoloških prilika koje vladaju na staništu, uključujući i različite stresore: organsko i anorgansko onečišćenje, toksične tvari, zakiseljavanje, poribljavanje te hidromorfološke promjene. Tipološke karakteristike koje mogu značajno utjecati na sastav i strukturu zajednice makrozoobentosa su srednja dubina, nadmorska visina, veličina i volumen jezera te vrijeme zadržavanja vode (engl. retention time) i drift (ukoliko se radi o baražnim jezerima).

Kao glavni okolišni parametri za koje je procijenjeno da značajno utječu na sastav i strukturu makrozoobentosa istraživanih prirodnih jezera su: nadmorska visina, volumen vodnog tijela, vrijeme zadržavanja vode i salinitet (Tab. 29).

Tablica 29. Odabrani abiotički parametri u istraživanim jezerima.

Jezero	Volumen (milijuni m ³)	n.m.v. (m)	v.z.v.* (dani)	Salinitet (‰)
Cres	220	9,25	11680	0,14
Kozjak	11,4	534,40	46	0,11
Oćuša	7	0,75	100	0,17
Prošće	9,1	636,49	46	0,14
Visovac	103	45	27	0,18
Crniševo	7,3	0,75	100	1,03
Biograd	141	-0,17	365	1,27

*vrijeme zadržavanja vode

Hidromorfološki pritisak ima iznimno značajan utjecaj na makrozoobentos litorala, prije svega u akumulacijama koje se odlikuju velikim godišnjim kolebanjima vodostaja. Navedeni pritisak nije imao značajni gradijent u prirodnim jezerima, te posljedično niti značajne korelacije s relevantnim metrikama. Temeljem prijašnjih istraživanja makrozoobentos se pokazao dobrim

pokazateljem hidromorfološkog pritiska (Borics i sur., 2018, de Hoyos i sur., 2014, Poikane i sur., 2011). Stoga, bez obzira na mali gradijent, hidromorfološke ocjene su uključene u model za izračun referentnog stana prirodnih jezera. Ključni pritisci koji značajno utječu na makrozoobentos litorala istraživanih jezera su eutrofikacija i poribljavanje. Kao pokazatelji navedenih pritisaka odabrane su slijedeće varijable: NZP (postotak neprirodnog zemljišnog pokrova u slivnom području vodnog tijela), Chl *a* (koncentracija klorofila *a* u µg/L) te ihtiomasa (masa ribe po hektaru površine jezera).

Spearmanovim koeficijentom korelacije utvrđen je međudnos stresora i pojedinih metrika, od kojih svi stresori (osim hidromorfološke ocjene) imaju značajne korelacije s odabranim metrikama (Tab. 30).

Tablica 30. Spearmanov koeficijent korelacije između pojedinih pritisaka i odabranih metrika. Statistički značajne korelacije ($P < 0,05$) označene su crveno ($N=43$).

Variable	%Chironomini	Margalef indeks raznolikosti	Broj porodica	EPT [%]
Chl <i>a</i>	-0,32	0,35	0,47	0,15
HYMO ocjena	-0,08	0,14	0,12	0,00
Ihtiomasa	0,66	-0,48	-0,54	-0,60
NZP	0,53	-0,51	-0,55	-0,37

Prema odabranim varijablama konstruiran je model abiotičkih parametara (koji predstavljaju skup abiotičkih uvjeta) i stresora koji značajno utječu na zajednicu makrozoobentosa, kako bi se rekonstruirali referentni uvjeti u svim jezerskim tipovima:

$$\text{Metrika} \sim \text{Nadmorska visina} + \text{Volumen} + \text{Salinitet} + \text{Vr. zad. vode} + \text{Ihtomasa} + \text{NZP} + \text{Chl } a + \text{HYMO ocjena}$$

Prema izrađenom linearnom modelu temeljenom na podacima iz prirodnih jezera i odabranih stajaćica Dinaridske ekoregije, izračunate su referentne vrijednosti metrika za ocjenu ekološkog stanja jezera temeljem makrozoobentosa (Tab. 31).

Tablica 31. Model multiple linearne regresije odabranih metrika, okolišnih parametara i stresora radi određivanja vrijednost metrika u referentnim uvjetima.

Metrika	Ekološki uvjeti					Stresori			
	Odsječak na y-osi	Volumen	n.m.v.	Vrijeme zad. vode	Salinitet	Ihtiomasa	NZP	HYMO	chl <i>a</i>
%Chironomini	0,0019	-0,0009	0	0	-0,0806	0,001	0,0014	0,0115	-0,0124
Diversity Margalef	7,6927	0,0124	-0,002	-0,2105	-1,5398	-0,0147	-0,0131	0,1632	-0,0738
EPT (%)	12,2042	-0,0049	0,0074	0,0013	-2,0193	0,0145	-0,0417	-0,7828	0,9344
N porodica	37,1813	0,0512	-0,0005	-0,0022	-7,8707	-0,0435	-0,1579	0,2428	1,0566

Tip specifične referentne vrijednosti izračunate su za svaku metriku, a gornje dopuštene granične vrijednosti za pritiske preuzete su iz literature. Referentne vrijednosti za ihtiomasa (kg/ha) određene su prema odgovarajućim vrijednostima ukupnog fosfora (Gassner et al., 2003). Referentne vrijednosti Chl *a* za istraživane jezerske tipove su poznate i objavljene (Poikane i sur.,

2011). Gornja prihvatljiva granica udjela neprirodnog zemljišnog pokrova u slivnom području iznosi 8% (Ntislidou i sur., 2016), dok je gornja granica za hidromorfološku alternaciju postavljena na 1,5 (Poikane, 2009). Tip specifične referentne vrijednosti za sve pokazatelje pojedinih pritisaka prikazani su u Tablici 32).

Tablica 32. Referentne vrijednosti za pokazatelje pojedinih pritisaka u prirodnim jezerima.

	Chl <i>a</i> (µg/L)	NZP (%)	Ihtiomasa (kg/ha)	HYMO
HR-L_1A	1,8	8	47,37	1,5
HR-L_1B	1,8	8	47,37	1,5
HR-L_2	1,8	8	47,37	1,5
HR-L_3	1,8	8	47,37	1,5
HR-L_4	1,8	8	47,37	1,5
HR-L_5	2,5	8	101,11	1,5

Iz ranije spomenutog modela i granica referentnih vrijednosti za pojedine pritiske, ekstrapolirane su tip specifične referentne vrijednosti za svaku metriku (Tab. 33), dok minimalne vrijednosti (donja granica) predstavljaju najlošije vrijednosti za pojedinu metriku unutar cijelog seta podataka.

Tablica 33. Tip specifične referentne vrijednosti za pojedine metrike.

Tip jezera	Metrika	Referentna vrijednost
HR-J_1A	% Chironomini	0,036
	Margalef indeks	5,88
	EPT (%)	16,80
	Broj porodica	35,47
HR-J_1B	% Chironomini	0,036
	Margalef indeks	5,60
	EPT (%)	17,51
	Broj porodica	35,07
HR-J_2	% Chironomini	0
	Margalef indeks	ne primjenjuje se
	EPT (%)	26,96
	Broj porodica	20,59
HR-J_3	% Chironomini	0,035
	Margalef indeks	6,78
	EPT (%)	12,82
	Broj porodica	34,92
HR-J_4	% Chironomini	0
	Margalef indeks	5,77
	EPT (%)	11,72
	Broj porodica	30,95
HR-J_5	% Chironomini	0
	Margalef indeks	7,90
	EPT (%)	12,57
	Broj porodica	39,90

Najlošije vrijednosti metrika iste su za sve jezerske tipove i iznose:

- 1) % Chironomini – 0,4;
- 2) Margalef indeks raznolikosti – 2,28;
- 3) EPT (%) - 1,02;
- 4) broj porodica - 9.

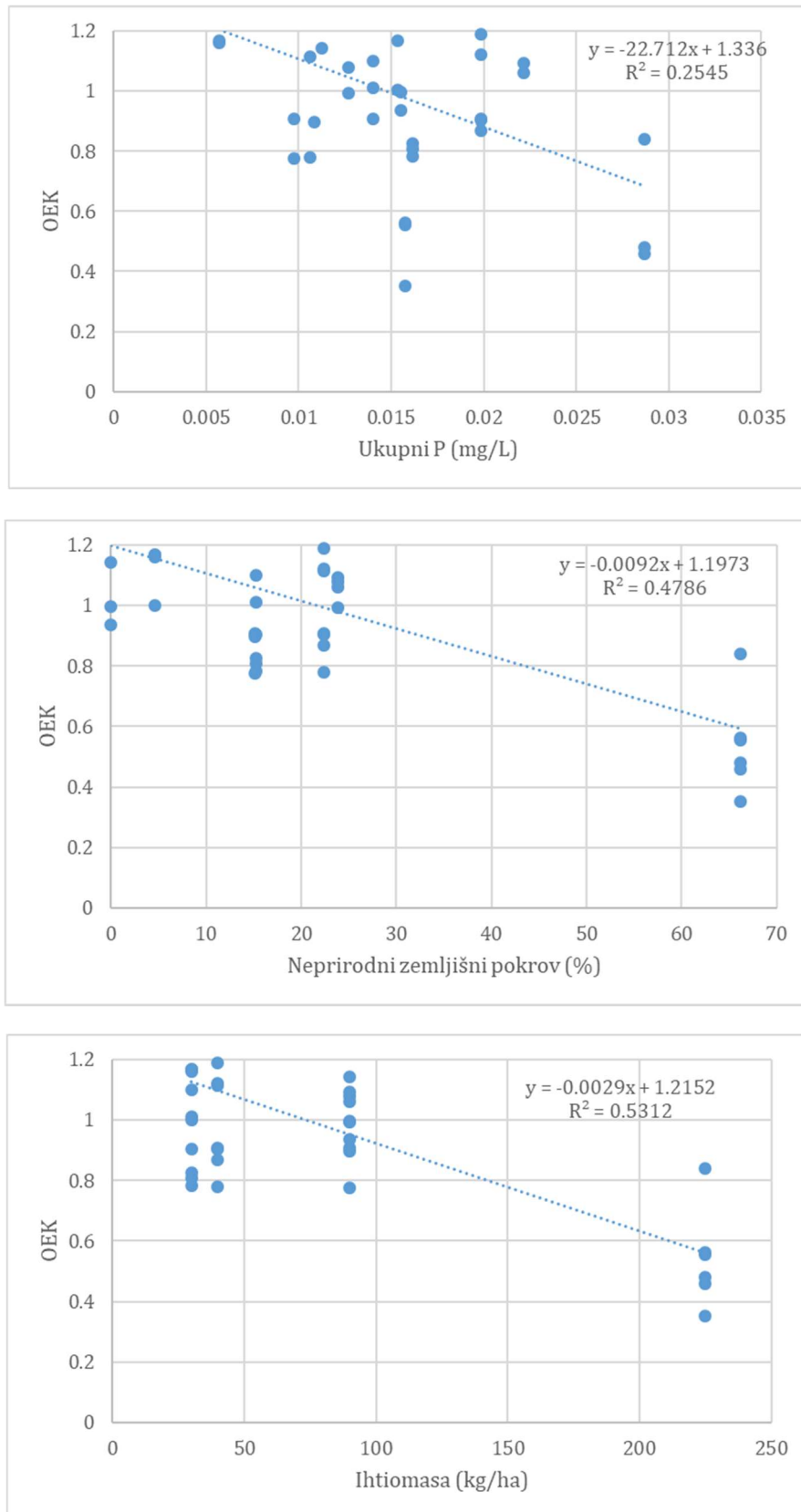
Granične vrijednosti omjera ekološke kakvoće (OEK) svrstane su u pet kategorija ekološkog stanja i prikazane su u Tablici 34.

Tablica 34. Granične vrijednosti omjera ekološke kakvoće i pripadajuće ekološko stanje.

OEK	Ekološko stanje
> 0,8	Vrlo dobro
0,6-0,8	Dobro
0,4-0,6	Umjereno
0,2-0,4	Loše
< 0,2	Vrlo loše

Predloženi multimetrički indeks reagira na način da se u uvjetima povećanih pritisaka (eutrofikacija i poribljavanje) smanjuje vrijednost metrika; broj (N) porodica, Margalefov indeks raznolikosti te udio ETP svojti, a u uvjetima povećanog stupnja eutrofikacije povećava se udio tolerantnog plemena Chironomini (Diptera-Chironomidae).

Konačni test sustava ocjene ekološkog stanja jezera napravljen je usporedbom vrijednosti OEK i vrijednostima stresora: Ihtiomasa, Neprirodni zemljišni pokrov (NZP) i Ukupni fosfor. Svi jednostavni modeli linearne regresije statistički su značajni (Slika 6).



Slika 6. Odnos omjera ekološke kakvoće (OEK) prirodnih jezera i stresora: 1) Ukupni fosfor, 2) Udio neprirodnog zemljišnog pokrova i 3) Ihtiomasa.

6.5. Opis zajednice makrozoobentosa

U opisu zajednice makrozoobentosa različitih kategorija ekološkog stanja, analizirane su promjene postotnog udjela onih skupina makrozoobentosa čiji se udio značajno mijenja s promjenom ekološkog stanja.

6.5.1. Opis zajednice makrozoobentosa u uvjetima maksimalnog ekološkog stanja

U jezerskom tipu HR-L_2 (Vransko jezero na Cresu) u uvjetima maksimalnog ekološkog stanja u zajednici makrozoobentosa gotovo da i nisu prisutni predstavnici trzalaca iz plemena Chironomini. Udio pripadnika skupina Ephemeroptera, Plecoptera i Trichoptera kreće se oko 25% (ili više) od ukupne brojnosti bentičkih makroskopskih beskralješnjaka, dok je udio jedinki pripadnika maločetinaša iz potporodice Tubificinae do 4%.

U ostalim tipovima dubokih jezera u uvjetima maksimalnog ekološkog stanja u zajednici makrozoobentosa gotovo da i nisu prisutni predstavnici trzalaca iz plemena Chironomini. Brojčani udio pripadnika skupina Ephemeroptera, Plecoptera i Trichoptera kreće se oko 25% (ili više). Prisutno je veliko bogatstvo porodica (oko 30-ak porodica) te velika lokalna raznolikost (Margalef indeks s vrijednostima oko 5,5 ili više).

U jezerskom tipu HR-L_4 (Vransko jezero kod Biograda) u uvjetima maksimalnog ekološkog stanja u zajednici makrozoobentosa, brojčani udio pripadnika skupina Ephemeroptera, Plecoptera i Trichoptera kreće se oko 10% (ili više), dok je predstavnika maločetinaša iz potporodice Tubificinae do 14%. Prisutno je veliko bogatstvo porodica (oko 30-ak porodica) te velika lokalna raznolikost (Margalef indeks s vrijednostima oko 5,5 ili više).

6.5.2. Opis zajednice makrozoobentosa u uvjetima dobrog ekološkog stanja

U jezerskom tipu HR-L_2 (Vransko jezero na Cresu) u uvjetima dobrog ekološkog stanja u zajednici makrozoobentosa predstavnici trzalaca iz plemena Chironomini prisutni su sporadično. Udio pripadnika skupina Ephemeroptera, Plecoptera i Trichoptera kreće se oko 20% od ukupne brojnosti jedinki bentičkih makroskopskih beskralješnjaka, dok je udio jedinki pripadnika maločetinaša iz potporodice Tubificinae do 7%.

U ostalim tipovima dubokih jezera, u uvjetima dobrog ekološkog stanja predstavnici trzalaca iz plemena Chironomini prisutni su sporadično. Brojčani udio pripadnika skupina Ephemeroptera, Plecoptera i Trichoptera kreće se oko 20%. Prisutno je veliko bogatstvo porodica (oko 25 porodica) te relativno velika lokalna raznolikost (Margalef indeks s vrijednostima oko 5).

U jezerskom tipu HR-L_4 (Vransko jezero kod Biograda) u zajednici makrozoobentosa brojčani udio pripadnika skupina Ephemeroptera, Plecoptera i Trichoptera kreće se oko 8%, dok je udio predstavnika maločetinaša iz potporodice Tubificinae do 19%. Prisutno je relativno veliko bogatstvo porodica (oko 25 porodica) te relativno velika lokalna raznolikost (Margalef indeks s vrijednostima oko 5,0).

6.5.3. Opis zajednice makrozoobentosa u uvjetima umjerenog ekološkog stanja

U jezerskom tipu HR-L_2 (Vransko jezero na Cresu) u uvjetima umjerenog ekološkog stanja u zajednici makrozoobentosa predstavnici trzalaca iz plemena Chironomini prisutni su s brojčanim udjelom do 4%. Brojčani udio pripadnika skupina Ephemeroptera, Plecoptera i Trichoptera kreće se oko 15%, dok je udio jedinki pripadnika maločetinaša iz potporodice Tubificinae do 10%.

U ostalim tipovima dubokih jezera u zajednici makrozoobentosa predstavnici trzalaca iz plemena Chironomini prisutni su s brojčanim udjelom do 4%. Brojčani udio pripadnika skupina Ephemeroptera, Plecoptera i Trichoptera kreće se oko 15%. Prisutno je i dalje relativno veliko bogatstvo porodica (oko 20 porodica) te relativno velika lokalna raznolikost (Margalef indeks s vrijednostima oko 4).

U jezerskom tipu HR-L_4 (Vransko jezero kod Biograda) u zajednici makrozoobentosa brojčani udio pripadnika skupina Ephemeroptera, Plecoptera i Trichoptera kreće se oko 6%, dok je predstavnika maločetinaša iz potporodice Tubificinae do 24%, a jedinki trzalaca iz plemena Chironomini oko 8%. Prisutno je oko 20-ak porodica te i dalje relativno velika lokalna raznolikost (Margalef indeks s vrijednostima oko 4,0).

U Tablici 35 prikazane su ocjene ekološkog stanja temeljem makrozoobentosa za sve istraživane postaje u prirodnim jezerima tijekom 2018. i 2019. godine.

Tablica 35. Vrijednosti pojedinih metrika, omjera ekološke kakvoće i ocjena ekološkog stanja temeljem makrozoobentosa za istraživane postaje u prirodnim jezerima.

Postaja	% chironomini	Margalef Indeks	EPT [%]	Broj porodica	OEK % chironomini	OEK Margalef Indeks	OEK EPT [%]	OEK Broj porodica	OEK	Ocjena
Vransko Cres 1_2018	0,05	3,50	23,33	17,00	0,87		0,86	0,69	0,81	Vrlo dobro
Vransko Cres 2_2018	0,05	3,21	25,64	15,00	0,88		0,95	0,52	0,78	Dobro
Vransko Cres 3_2018	0,04	3,61	16,95	20,00	0,91		0,61	0,95	0,82	Vrlo dobro
Vransko jezero - Cres 1_2019	0,00	3,63	29,73	21,00	1,00		1,00	1,04	1,01	dobro
Vransko jezero - Cres 2_2019	0,00	2,67	30,21	16,00	0,99		1,13	0,60	0,91	Vrlo dobro
Vransko jezero - Cres 3_2019	0,01	4,39	23,13	26,00	0,99		0,85	1,47	1,10	dobro
Kozjak 1_2018	0,01	6,98	9,32	38,00	1,08	1,31	0,53	1,10	1,00	Vrlo dobro
Kozjak 1_2019	0,00	7,75	11,62	45,00	1,09	1,52	0,67	1,36	1,16	dobro
Kozjak 2_2018	0,02	7,41	17,15	40,00	1,05	1,43	1,02	1,17	1,17	Vrlo dobro
Kozjak 3_2018	0,01	7,79	21,50	41,00	1,07	1,53	1,30	1,21	1,28	dobro
Kozjak 4_2018	0,00	6,90	23,29	39,00	1,09	1,28	1,41	1,13	1,23	Vrlo dobro
Kozjak 4_2019	0,01	8,43	18,73	46,00	1,06	1,71	1,12	1,40	1,32	dobro
Kozjak 5_2018	0,01	8,03	21,99	38,00	1,08	1,60	1,33	1,10	1,28	Vrlo dobro
Kozjak 5_2019	0,01	8,51	12,07	48,00	1,06	1,73	0,70	1,47	1,24	dobro
Kozjak 6_2019	0,00	6,70	22,07	36,00	1,09	1,23	1,33	1,02	1,17	Vrlo dobro
Kozjak 7_2019	0,00	7,43	22,76	38,00	1,09	1,43	1,38	1,10	1,25	dobro
Prošće 1_2018	0,00	5,02	15,79	30,00	1,09	0,82	0,90	0,81	0,90	Vrlo dobro
Prošće 1_2019	0,02	6,20	20,40	37,00	1,03	1,18	1,18	1,07	1,11	dobro
Prošće 2_2018	0,01	6,07	23,08	33,00	1,08	1,14	1,34	0,92	1,12	Vrlo dobro
Prošće 2_2019	0,01	6,55	24,59	36,00	1,08	1,29	1,43	1,04	1,21	dobro
Prošće 3_2018	0,00	6,16	25,10	36,00	1,09	1,17	1,46	1,04	1,19	Vrlo dobro
Prošće 3_2019	0,00	2,47	27,12	19,00	1,10	0,05	1,58	0,38	0,78	Dobro
Prošće 3_2019	0,00	8,19	24,85	50,00	1,10	1,78	1,45	1,57	1,47	Vrlo dobro
Prošće 4_2018	0,00	5,15	12,12	31,00	1,09	0,86	0,67	0,84	0,87	Vrlo dobro
Prošće 5_2018	0,00	5,07	15,17	31,00	1,09	0,84	0,86	0,84	0,91	dobro
Prošće 5_2019	0,01	8,61	19,16	51,00	1,07	1,91	1,10	1,61	1,42	Vrlo dobro
Prošće 6_2019	0,01	8,71	18,51	49,00	1,06	1,94	1,06	1,53	1,40	dobro
Visovac 1_2018	0,04	8,28	17,52	39,00	0,90	1,07	1,43	0,97	1,09	Vrlo dobro
Visovac 2_2018	0,04	8,19	15,45	41,00	0,91	1,05	1,25	1,04	1,06	dobro
Visovac 3_2019	0,01	6,22	21,01	37,00	0,98	0,70	1,73	0,91	1,08	Vrlo dobro
Visovac 4_2019	0,00	5,72	14,91	45,00	1,00	0,61	1,20	1,17	0,99	Vrlo dobro

Oćuša 1_2018	0,08	7,22	9,72	32,00	0,86	1,10	0,74	0,89	0,90	Vrlo dobro
Oćuša 2_2019	0,01	6,29	8,94	35,00	1,06	0,89	0,67	1,00	0,91	Vrlo dobro
Oćuša 3_2019	0,02	4,94	8,87	30,00	1,05	0,59	0,66	0,81	0,78	Dobro
Crniševo 1_2018	0,01	4,74	13,09	29,00	0,97	0,77	1,20	1,04	1,00	Vrlo dobro
Crniševo 1_2019	0,03	4,96	18,23	30,00	0,93	0,84	1,71	1,10	1,14	Vrlo dobro
Crniševo 2_2018	0,10	5,49	10,58	29,00	0,74	1,01	0,95	1,04	0,94	Vrlo dobro
Vransko Biograd 1_2018	0,02	3,25	4,10	16,00	0,96	0,27	0,29	0,32	0,46	Umjereno
Vransko jezero-Biograd 1_2019	0,06	3,10	11,86	12,00	0,84	0,23	1,01	0,14	0,56	Umjereno
Vransko Biograd 2_2018	0,04	3,05	7,78	13,00	0,89	0,22	0,63	0,18	0,48	Umjereno
Vransko Biograd 3_2018	0,15	4,57	14,89	26,00	0,63	0,66	1,30	0,77	0,84	Vrlo dobro
Vransko jezero-Biograd 3_2019	0,19	2,29	10,61	9,00	0,51	0,00	0,90	0,00	0,35	Loše
Vransko jezero-Biograd 4_2019	0,07	3,44	10,20	14,00	0,83	0,33	0,86	0,23	0,56	Umjereno

7. USPOREDBA EKOLOŠKOG STANJA TEMELJEM FITOPLANKTONA ODREĐENOG MORFOLOŠKIM I MOLEKULARNIM METODAMA TE ODREĐIVANJEM KLOROFILA *a* SPEKTROFOTOMETRIJSKOM I KROMATOGRFSKOM METODOM (U-HPLC)

Prema Studiji „Primjena molekularnih i kromatografskih metoda u ocjeni ekološkog stanja jezera u Republici Hrvatskoj” koja opisuje primjenu visokoprotočne tekućinske kromatografije te sekvenciranje sljedeće generacije u procjeni ocjene ekološkog stanja jezera u republici Hrvatskoj u period od travnja do rujna 2017. godine, određene su između ostalog metodom U-HPLCa, koncentracije klorofil *a* te sekvencirana hipervarijabilna V9 regija gena koja kodira za 18S rDNA eukariota. Prema molekularnoj analizi Illumina MiSeq, sekvenciranje 48 uzoraka rezultiralo je dobivanjem 78 504 039 nukleotidnih sljedova (u prosjeku $1\,706\,610 \pm 685\,631$ nukleotidnih sljedova po uzorku). Većina nukleotidnih sljedova uspješno je taksonomski klasificirana (u prosjeku $268\,337 \pm 204\,888$ nukleotidnih sljedova ciljanih svojti po uzorku). Ukupno je taksonomski klasificirano 848 sljedova. Svakom pojedinačnom, taksonomski klasificiranom nukleotidnom slijedu pridružena je funkcionalna grupa prema prijedlogu iz ove studije te radovima Reynolds i sur., 2002. te Padišák i sur., 2009 i prema operativnoj listi svojti (Tab. 21) te su rezultati prikazani u dodatku 6. Također prema ovdje predloženoj metodi izračunat je OEK na temelju rezultata dobivenih molekularnim i kromatografskim metodama te je usporedba prikazana u tablici 36. Statističkim analizama izdvojeni su i OTU koji su participirali s više od 10% u ukupnom broju nukleotidnih sljedova, čime je dobiven manji broj taksonomski klasificiranih nukleotidnih sljedova koji karakteriziraju zajednice fitoplanktona u krškim dubokim jezerima u Hrvatskoj (tablica 36).

U tablici 35 prikazani su usporedno izračuni OEKa za sve prethodno navedene slučajeve te je vidljivo da nema značajnih razlika između izračunatih OEKa, s time da se pri tome, značajno smatra razlika u ekološkom stanju. Jedina vidljiva razlika je u jezerima Kozjak, Očuša i Crniševo te Vranskom jezeru kod Biograda. Nastala razlika rezultat je činjenice da je kod navedenih slučajeva došlo do znatene razlike u određenoj koncentraciji klorofila *a*, spektrofotometrijski i U-HPLCom te su neke od razlika nastale su također jer V9 regija gena kodira za 18S rDNA eukariota te da su ovom molekularnom analizom izostavljeni prokarioti. Dakle u jezerima i/ili mjesecima u kojima su cijanobakterije bile zastupljen u većem postotku nastala je razlika u krajnjoj ocijeni ekološkog stanja, odnosno ekološko stanje razlikuje se u kategoriji izračunom iz morfološki dobivenih rezultata, mikroskopiranjem i izračuna dobivenog iz rezultata dobivenih molekularnim analizama V9 regije, ali razlika nije bila značajna te nije došlo do promjene u kategoriji ekološkog stanja.

Odgovor OEKa dobivenog na temelju fitoplanktona kao biološkog pokazatelja, na okolišni pritisak već je opisan u ovoj studiji te s obzirom na veoma male razlike u izračunatim OEK smatramo da je odgovor izračunatih OEKa objašnjen.

Tablica 36. Usporedba ekološkog stanja temeljem fitoplanktona određenog morfološkim i molekularnim metodama te određivanjem klorofila *a* spektrofotometrijskom i kromatografskom metodom (U-HPLC) u istraživanim jezerima u Hrvatskoj u 2017. godini.

		klorofil <i>a</i> SPEKTROFOTOMETRIJSKI			klorofil <i>a</i> U-HPLC		
		HLPI	HLPI	HLPI	HLPI	HLPI	HLPI
Jezer		biomasa	OTU	OTU 10%	biomasa	OTU	OTU 10%
Kozjak	K4	0,79	0,82	0,81	0,76	0,79	0,78
	K5	0,78	0,76	0,74	0,76	0,74	0,73
	K6	0,90	0,85	0,84	0,87	0,82	0,81
	K7	0,90	0,87	0,87	0,87	0,84	0,83
	K8	0,81	0,80	0,80	0,80	0,79	0,79
	K9	0,79	0,76	0,76	0,74	0,71	0,71
	sr.vr.	0,83	0,81	0,80	0,80	0,78	0,77
Prošće	P4	0,80	0,78	0,77	0,75	0,73	0,73
	P5	0,63	0,62	0,62	0,63	0,63	0,62
	P6	0,69	0,67	0,67	0,68	0,66	0,66
	P7	0,77	0,73	0,73	0,74	0,70	0,70
	P8	0,72	0,68	0,67	0,70	0,66	0,66
	P9	0,70	0,66	0,66	0,68	0,64	0,64
	sr.vr.	0,72	0,69	0,69	0,70	0,67	0,67
Vransko Cres	VC4	0,88	0,85	0,85	0,85	0,82	0,82
	VC5	0,92	0,89	0,89	0,82	0,79	0,79
	VC6	0,84	0,87	0,87	0,86	0,89	0,89
	VC7	0,86	0,94	0,94	0,86	0,93	0,93
	VC8	0,84	0,93	0,93	0,83	0,92	0,92
	VC9	0,84	0,92	0,92	0,79	0,87	0,87
	sr.vr.	0,86	0,90	0,90	0,83	0,87	0,87
Oćuša	O4	0,84	0,80	0,80	0,76	0,70	0,70
	O5	0,89	0,92	0,91	0,75	0,78	0,78
	O6	0,89	0,84	0,84	0,67	0,62	0,61
	O7	0,90	0,89	0,89	0,72	0,71	0,71
	O8	0,87	0,85	0,86	0,66	0,64	0,65
	O9	0,84	0,84	0,84	0,64	0,64	0,64
	sr.vr.	0,87	0,86	0,86	0,70	0,68	0,68
Crniševo	CR4	0,80	0,78	0,77	0,72	0,71	0,70
	CR5	0,93	0,90	0,89	0,77	0,74	0,73
	CR6	0,93	0,85	0,84	0,74	0,66	0,66
	CR7	0,92	0,91	0,91	0,79	0,78	0,78
	CR8	0,89	0,93	0,94	0,73	0,77	0,77
	CR9	0,87	0,90	0,91	0,79	0,83	0,84

sr.vr.		0,89	0,88	0,88	0,76	0,75	0,75
Visovac	VI4	0,77			0,68		
	VI5	0,80	0,74	0,74	0,76	0,70	0,70
	VI6	0,70	0,69	0,70	0,78	0,77	0,78
	VI7	0,70	0,67	0,66	0,66	0,63	0,62
	VI8	0,66	0,64	0,63	0,64	0,62	0,62
	VI9	0,64	0,61	0,59	0,63	0,60	0,58
sr.vr.		0,71	0,67	0,66	0,69	0,66	0,66
Vransko Motel	VM4	0,58	0,53	0,53			
	VM5	0,69	0,66	0,66	0,81	0,78	0,78
	VM6	0,74	0,72	0,72	0,84	0,82	0,82
	VM7	0,85	0,91	0,90	0,82	0,89	0,88
	VM8	0,82	0,88	0,87	0,81	0,87	0,87
	VM9	0,83	0,88	0,88	0,82	0,87	0,86
sr.vr.		0,75	0,76	0,76	0,82	0,84	0,84
Vransko Prosika	VP4	0,60	0,59	0,60	0,43	0,42	0,42
	VP5	0,68	0,66	0,67	0,70	0,68	0,69
	VP6	0,68	0,66	0,68	0,78	0,76	0,77
	VP7	0,84			0,82		
	VP8	0,81	0,88	0,87	0,81	0,88	0,88
	VP9	0,82	0,89	0,89	0,81	0,88	0,88
sr.vr.		0,74	0,74	0,74	0,73	0,72	0,73

Tablica 37. Taksonomski klasificirani nukleotidni sljedovi koji karakteriziraju zajednice fitoplanktona u krškim dubokim jezerima u Hrvatskoj.

FG	F	Vrsta
A	9	Cyclotella cryptica genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5 8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene, culture collection CCAP 1070/2 F1
A	9	Thalassiosira sp CCAP 1085/17 genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5 8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain CCAP 1085/17 F1
C	5	Cyclotella meneghiniana strain G8W7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence F1
C	5	Cyclotella ocellata
D	7	Thalassionema bacillare strain WK54 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence F1
E	7	Dinobryon divergens 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5 8S rRNA gene and ITS2 (partial), strain FU28_3 F1
E	7	Mallomonas tonsurata strain SAG28 92 18S ribosomal RNA gene, partial sequence F1
E	7	Synura curtispina strain SAG29 92 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5 8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence F1
F	9	Nephrochlamys subsolitaria genes for 18S rRNA, ITS1, 5 8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: GM4d F1
Lo	7	Ceratium sp HCB-2005 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence F1
Lo	7	Peridinium inconspicuum genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5 8S rRNA gene, ITS2, culture collection CCAP 1140/3 F1
Lo	7	Woloszynskia cincta 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5 8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain Nam Seon Kang F1
Lo	7	Woloszynskia leopoliensis small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence F1

MP	7	<i>Fragilaria capucina</i> strain A-06 18S ribosomal RNA gene, partial sequence F1
N	9	<i>Cosmarium depressum</i> , partial 18S rRNA gene, internal transcribed spacer 1, 5 8S rRNA gene and internal transcribed spacer 2 F1
U	9	<i>Uroglena americana</i> strain CCMP2769 18S ribosomal RNA gene, partial sequence F1
X2	9	<i>Chlamydomonas raudensis</i> strain SAG 49 72 18S ribosomal RNA gene, partial sequence F1
X2	9	<i>Tetraselmis cordiformis</i> 18S rRNA gene (partial), 5 8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, strain SAG 26 82 F1
X3	9	<i>Ochromonas sphaerocystis</i> small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence F1
X3	9	Spumella-like flagellate JBM06 18S ribosomal RNA gene, partial sequence F1
Y	7	<i>Cryptomonas curvata</i> partial 18S rRNA gene, strain CCAC 0080 F1
Y	7	<i>Cryptomonas marssonii</i> strain WCK01 18S ribosomal RNA gene, complete sequence F1
Y	7	<i>Cryptomonas</i> sp M420 18S rRNA gene, strain M420 F1
Y	7	<i>Asulcocephalum miricentonis</i> genes for 18S rRNA, ITS1, 5 8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: od12-21kt F1
Y	7	<i>Gymnodinium</i> sp LaTo2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence F1
Y	7	<i>Gymnodinium</i> sp NVA/RUS/2008 clone 44 18S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1, partial sequence F1
Y	7	<i>Gyrodinium helveticum</i> gene for 18S rRNA, partial sequence F1
Y	7	Cryptophyta sp CR-MAL01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence F1
Y	7	Cryptophyta sp CR-MAL05 18S ribosomal RNA gene, partial sequence F1

8. USPOREDBA KATEGORIJA EKOLOŠKOG STANJA ZA OSNOVNE FIZIKALNO-KEMIJSKE POKAZATELJE U JEZERIMA I EKOLOŠKOG STANJA TEMELJEM FITOPLANKTONA, FITOBETOSA I MAKROZOOBENTOSA

U Tablici 38 prikazane su trenutno važeće granične vrijednosti kategorija ekološkog stanja za osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje (preuzeto iz Uredbe 96/19). Prema navednoj tablici uspređeno je ekološko stanje i prikazano u tablicama 39, 40 i 41.

Tablica 38. Granične vrijednosti kategorija ekološkog stanja za osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje (preuzeto iz Uredbe NN 96/19)

EKOREGIJA	OZNAKA TIPa	KATEGORIJA EKOLOŠKOG STANJA	Granična vrijednost ekološkog stanja za osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje prosječna godišnja vrijednost *			
			Prozirnost Secchi prozirnost	Režim kisika KPK-Mn mgO ₂ /l	Hranjive tvari Nitrati mgN/l	Ukupni fosfor mgP/l
DINARIDSKA KONTINENTALNA SUBREGIJA	HR-J_1A	vrlo dobro**	≥ 9	ma	0,6	0,015
		dobro***	≤ 6	2,8	0,9	0,035
DINARIDSKA PRIMORSKA SUBREGIJA	HR-J_1B	vrlo dobro	≥ 5,5	1,5	0,55	0,015
		dobro	≤ 3,5	2,8	0,85	0,035
DINARIDSKA PRIMORSKA SUBREGIJA	HR-J_2	vrlo dobro	≥ 11	1,7	0,05	0,009
		dobro	≤ 7	3	0,15	0,02
	HR-J_3	vrlo dobro	≥ 4,5	2	0,15	0,018
		dobro	≤ 2,5	4	0,35	0,045
	HR-J_4	vrlo dobro	≥ 2,1	4	0,5	0,03
dobro		≤ 1	8	1,5	0,07	
HR-J_5	vrlo dobro	≥ 4,5	3	0,25	0,02	
	dobro	≤ 2,5	5,5	0,4	0,05	

* granične vrijednosti odnose se na eufotički sloj u razdoblju od travnja do rujna

U tablici 39, 40 i 41 prikazana je usporedba kategorija ekološkog stanja za osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje u jezerima i ekološkog stanja temeljem fitoplanktona u 2014., 2016. i 2017. godini te temeljem fitobetosa u 2019. godini te temeljem makrozoobentosa u 2019. godini. Na osnovi ove usporedbe raznolike godišnje usporedbe moguće je dati samo prijedlog o pomicanju granica ukupnog fosfora i prozirnost jezera, za vrlo dobro i dobro stanje te usklađivanje sa granicama za trofički status jezera.

Tablica 39. Usporedba kategorija ekološkog stanja za osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje u jezerima i ekološkog stanja temeljem fitoplanktona u 2014., 2016. i 2017. godini.

Fitoplankton						
Jezero	Godina	OEK	Nitrati (mgN/l)	Ukupni fosfor (mgP/l)	KPK-Mn (mgO ₂ /l)	Prozirnost (m)
19001, Plitvička jezera, jezero Kozjak	2014.	0,81	0,571	<0,025	1,1	8,7
19001, Plitvička jezera, jezero Kozjak	2016.	0,81	0,545	0,017	1,0	8,4
19001, Plitvička jezera, jezero Kozjak	2017.	0,83	0,517	0,015	1,1	9,3
19000, Plitvička jezera, Prošćansko jezero	2014.	0,71	0,594	<0,025	1,3	5,9
19000, Plitvička jezera, Prošćansko jezero	2016.	0,69	0,560	0,023	1,1	6
19000, Plitvička jezera, Prošćansko jezero	2017.	0,72	0,525	0,020	1,4	5,7
30120, Jezero Vrana, Cres, oko 250 m od obale	2014.	0,84	0,028	0,016	1,3	11,3
30120, Jezero Vrana, Cres, oko 250 m od obale	2016.	0,85	0,012	0,017	1,3	12,2
30120, Jezero Vrana, Cres, oko 250 m od obale	2017.	0,86	0,027	0,016	1,1	11,5
40523, Baćinska jezera, Jezero Oćuša	2014.	0,77	0,223	0,018	1,8	4,7
40523, Baćinska jezera, Jezero Oćuša	2016.	0,72	0,231	0,006	2,0	4,3
40523, Baćinska jezera, Jezero Oćuša	2017.	0,87	0,147	0,010	1,2	5,3
40520, Baćinska jezera, jezero Crniševo	2014.	0,71	0,108	0,012	2,3	4,6
40520, Baćinska jezera, jezero Crniševo	2016.	0,78	0,093	0,006	2,2	4,5
40520, Baćinska jezera, jezero Crniševo	2017.	0,89	0,145	0,016	2,2	5,2
40420, Visovačko jezero, Visovac	2014.	0,75	0,239	0,013	1,3	5,1
40420, Visovačko jezero, Visovac	2016.	0,77	0,186	0,008	1,3	5,5
40420, Visovačko jezero, Visovac	2017.	0,71	0,128	0,022	1,8	5,2
40311, Vransko jezero, motel	2014.	0,85	0,399	0,020	7,9	1,5
40311, Vransko jezero, motel	2016.	0,89	0,175	0,012	6,0	1,6
40311, Vransko jezero, motel	2017.	0,75	0,029	0,031	15,6	1,0
Vransko jezero, Prošćansko jezero	2014.	0,84	0,278	0,018	5,0	2,1
Vransko jezero, Prošćansko jezero	2016.	0,88	0,221	0,011	6,2	2,2
Vransko jezero, Prošćansko jezero	2017.	0,74	0,025	0,027	19,5	1,2

Tablica 40. Usporedba kategorija ekološkog stanja za osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje u jezerima i ekološkog stanja temeljem fitobentosu u 2019. godini.

Fitobentos					
Jezeri	OEK	Nitrati (mgN/l)	Ukupni fosfor (mgP/l)	KPK-Mn (mgO ₂ /l)	Prozirnost (m)
Kozjak 041/19	0,84	0,505	0,009	1,3	8,3
Kozjak 042/18	0,87	0,505	0,009	1,3	8,3
Kozjak 043/19	0,92	0,505	0,009	1,3	8,3
Prošće 044/19	0,92	0,550	0,014	1,5	5,4
Prošće045/19	0,9	0,550	0,014	1,5	5,4
Prošće046/19	0,95	0,550	0,014	1,5	5,4
Vransko_Cres 026/19	0,82	<0,02	0,016	1,2	11,5
Vransko_Cres 027/19	0,78	<0,02	0,016	1,2	11,5
Vransko_Cres 028/19	0,8	<0,02	0,016	1,2	11,5
Crniševo 030/19	0,82	0,058	0,009	2,9	6,2
Crniševo 031/19	0,77	0,058	0,009	2,9	6,3
Crniševo 029/19	0,86	0,058	0,009	2,9	6,4
Oćuša 032/19	0,81	0,148	0,009	1,5	5,8
Oćuša 033/19	0,74	0,148	0,009	1,5	5,8
Oćuša 034/19	0,81	0,148	0,009	1,5	5,8
Vransko jezero (Biograd) - Motel 038/19	0,82	0,052	0,015	6,7	1,2
Vransko jezero (Biograd) - Motel 039/19	0,78	0,052	0,015	6,7	1,2
Vransko jezero (Biograd) - Motel 040/19	0,83	0,052	0,015	6,7	1,2
Visovac 035/19	0,8	0,180	0,010	1,3	6,1
Visovac 036/19	0,79	0,180	0,010	1,3	6,1
Visovac 037/19	0,81	0,180	0,010	1,3	6,1

Tablica 41. Usporedba kategorija ekološkog stanja za osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje u jezerima i ekološkog stanja temeljem makrozoobentosa u 2018. i 2019. godini.

Makrozoobentos						
	Postaja	OEK	Nitrati (mgN/l)	Ukupni fosfor (mgP/l)	KPK-Mn (mgO ₂ /l)	Prozirnost (m)
19001, Plitvička jezera, jezero Kozjak	Kozjak 1_2019	1,16	0,505	0,009	1,3	8,3
19001, Plitvička jezera, jezero Kozjak	Kozjak 2_2019	1,32	0,505	0,009	1,3	8,3
19001, Plitvička jezera, jezero Kozjak	Kozjak 3_2019	1,24	0,505	0,009	1,3	8,3
19001, Plitvička jezera, jezero Kozjak	Kozjak 4_2019	1,17	0,505	0,009	1,3	8,3
19001, Plitvička jezera, jezero Kozjak	Kozjak 5_2019	1,25	0,505	0,009	1,3	8,3
Plitvička jezera, Prošćansko jezero	Prošće 1_2019	1,11	0,550	0,014	1,5	5,4
Plitvička jezera, Prošćansko jezero	Prošće 2_2019	1,21	0,550	0,014	1,5	5,4
Plitvička jezera, Prošćansko jezero	Prošće 3_2019	0,78	0,550	0,014	1,5	5,4
Plitvička jezera, Prošćansko jezero	Prošće 3_2019	1,47	0,550	0,014	1,5	5,4
Plitvička jezera, Prošćansko jezero	Prošće 5_2019	1,42	0,550	0,014	1,5	5,4
Plitvička jezera, Prošćansko jezero	Prošće 6_2019	1,40	0,550	0,014	1,5	5,4
Jezero Vrana, Cres	Vransko jezero - Cres 1_2019	1,01	<0,02	0,016	1,2	11,5
Jezero Vrana, Cres	Vransko jezero - Cres 2_2019	0,91	<0,02	0,016	1,2	11,5
Jezero Vrana, Cres	Vransko jezero - Cres 3_2019	1,10	<0,02	0,016	1,2	11,5
Baćinska jezera, jezero Crniševo	Crniševo 1_2019	1,14	0,058	0,009	2,9	6,3
Baćinska jezera, Jezero Oćuša	Oćuša 1_2019	0,91	0,148	0,009	1,5	5,8
Baćinska jezera, Jezero Oćuša	Oćuša 2_2019	0,78	0,148	0,009	1,5	5,8
Vransko jezero	Vransko jezero-Biograd 1_2019	0,56	0,052	0,015	6,7	1,2
Vransko jezero	Vransko jezero-Biograd 2_2019	0,35	0,052	0,015	6,7	1,2
Vransko jezero	Vransko jezero-Biograd 3_2019	0,56	0,052	0,015	6,7	1,2
Visovačko jezero, Visovac	Visovac 1_2019	1,08	0,180	0,010	1,3	6,1
Visovačko jezero, Visovac	Visovac 2_2019	0,99	0,180	0,010	1,3	6,1

9. ZAKLJUČAK

Prema postavljenim ciljevima projekta „Analiza bioloških metoda ocjene ekološkog stanja za fitoplankton, fitobentos i makrozoobentos u jezerima; analiza utjecaja okolišnih čimbenika i antropogenih opterećenja“ revidirane su postojeće i predložene nove metode uzorkovanja, analiza i ocijene ekološkog stanja na temelju bioloških elemenata kakvoće za fitoplankton, fitobentos i makrozoobentos.

Za biološki element **fitoplankton**, prema planu izrade studije, preuzeti su rezultati analize sastava zajednice, biomase i klorofila *a* za 2014., 2016. i 2017. godinu od Naručitelja te su revidirane metode uzorkovanja i analize fitoplanktona. Predložena je metoda ocjene ekološkog stanja koja se sastoji od indeksa biomase (temelji se na koncentraciji klorofila *a*) i indeksa sastava zajednice (Q), koji se računa na temelju relativne brojnosti funkcionalnih grupa algi i vrijednosti tolerancije i osjetljivosti algi na okolišne stresore (ukupni fosfor i ukupni dušik). Predloženi indeks za fitoplankton jezera (HLPI) razrađen je za duboke prirodne stajačice te za vrlo plitke prirodne stajačice. Indeks pod nazivom Indeks za fitoplankton jezera (HLPI) predstavlja konačnu ocjena ekološkog stanja koja je rezultat kombinacija normaliziranih vrijednosti OEK-a koncentracije klorofila *a* i Q indeksa.

Predložena metoda uključuje i prijedlog izračuna Indeksa za ocjenu cvjetanja algi. Izrada metode uključuje i izradu operativne sliste svojti koja je s pripadajućim funkcionalnim grupama i faktorima priložena u ovom izvješću.

Metoda ocjene ekološkog stanja na temelju fitoplanktona je predana u obliku izvješća za prijavu metoda ocjene zemalja članica u slučaju kada interkalibracija nije moguća pod nazivom: HR_GAP3_reporting_method_IC_not_feasible_lake_phytoplankton_draft2 (Prilog 1).

Uzorkovanje **fitobentosa** provedeno je prema planu projekta u svibnju i lipnju 2018. godine te dodatno u svibnju 2019. godine zbog izostanka fizikalno-kemijskih analiza u 2018. godini. Ovisno o pritiscima, odabrane su po tri postaje uzorkovanja u svakom jezeru. Svi uzorci su analizirani, ali s obzirom na dostupnost fizikalno-kemijskih parametara u daljnju analizu uzeti su uzorci iz 2019. godine.

Prijedlogu indeksa za ocjenu ekološkog stanja na temelju fitobentosa prethodila je revizija metodologije uzorkovanja, laboratorijske obrade i analize uzoraka. Za ocjenu kakvoće jezera na temelju fitobentosa korišteni su interkalibrirani multimetrijski indeksi dijatomeja. Korišteni indeks su: indeks za fitobentos vrlo plitkih stajačica - MIB i indeks za fitobentos dubokih stajačica - MIL. Indeks za vrlo plitke stajačice predstavlja srednju vrijednost IBD-a (Biological Diatom Index) i EPI-D-a (Eutrophication Pollution Index- Diatoms), dok indeks za duboke stajačice predstavlja srednju vrijednost od IBD-a, EPI-D-a i TDIL1-20 -a (Trophic Diatom Indeks- Lakes). Konačne ocjene ekološkog stanja (OEK) predstavljaju normalizirane vrijednosti MIB-a za vrlo plitke stajačice i MIL-a za duboke stajačice.

Metoda ocjene ekološkog stanja na temelju fitobentos je predana u obliku izvješća za prijavu metoda ocjene zemalja članica pod nazivom: Report on fitting of phytoenthos classification

method with the results of the completed intercalibration of the Lakes cross-GIG (HA, L-M1) (Prilog 2).

Za izradu sustava ocjene ekološkog stanja jezera Dinaridske ekoregije temeljem **makrozoobentosa** korištena je proširena baza podataka, koja je uključivala i bazu podataka dobivenu u sklopu projekta „Klasifikacijski sustav ekološkog potencijala za umjetna i znatno promijenjena tijela površinskih voda – II. dio: Stajačice Dinaridske ekoregije“. Osim podataka o sastavu i gustoći populacija makrozoobentosa prirodnih jezera Dinaridske ekoregije uzorkovanih u 2018. i 2019. godini, korišteni su i podaci o sastavu i gustoći populacija odabranih akumulacija Dinaridske ekoregije (Bajer, Brljan, Butoniga, Golubić, Gusić polje, Lepenica, Lešće, Njivice, Opsenica, Ponike, Pranjčevići, Prološko blato, Tribalj i Vlačine).

Temeljem kvalitativnih i kvantitativnih podataka o zajednici makrozoobentosa izračunate su metrike pomoću programa Asterics 4.04. i grupirane u četiri glavne kategorije: metrike koje se odnose na funkcionalne kategorije, na sastav, odnosno brojnost pojedinih svojti, koje ukazuju na raznolikost zajednice te koje uključuju svojte koje su poznate kao indikatori. Metrike odabrane za ocjenu ekološkog stanja jezera, odnosno za izračun omjera ekološke kakvoće su: % Chironomini, Margalef indeks raznolikosti, Broj porodica te EPT [%]. Konačna ocjena ekološkog stanja rezultat je srednje vrijednosti omjera ekološke kakvoće ovih četiriju metrika. Jedina iznimka je jezerski tip HR-L_2, tj. Vransko jezero na otoku Cresu, koje zbog svog oligotrofnog karaktera (ali i izoliranosti), prirodno ima vrlo malu raznolikost. Stoga u izračunu ekološkog stanja za jezerski tip HR-L_2 ne koristimo metriku Margalef indeks raznolikosti.

Metoda ocjene ekološkog stanja na temelju makrozoobentosa je predana u obliku izvješća za prijavu metoda ocjene zemalja članica u slučaju kada interkalibracija nije moguća pod nazivom: Report on Croatian lake macroinvertebrates classification method in the case where the Intercalibration exercise is not possible (Gap 3) (Prilog 3.)

Prema Studiji „Primjena molekularnih i kromatografskih metoda u ocjeni ekološkog stanja jezera u Republici Hrvatskoj” koja opisuje primjenu visokoprotočne tekućinske kromatografije te sekvenciranje sljedeće generacije u procjeni ocjene ekološkog stanja jezera u republici Hrvatskoj u 2017. godini napravljen je izračun ekološkog stanja u jezerima na temelju rezultata dobivenih molekularnim metodama te uspoređen s ekološkim stanjem temeljem fitoplanktona određenog morfološkim metodama u jezerima Hrvatskoj u 2017. godini. Pri tome je jasno prikazana moguća primjenjivost molekularnim analizama V9 regije eukariota u ocjeni ekološkog stanja.

Kategorije ekološkog stanja za osnovne fizikalno-kemijske pokazatelje u jezerima i ekološkog stanja temeljem fitoplanktona u 2014., 2016. i 2017. godini, temeljem fitobentosa u 2019. godini te temeljem makrozoobentosa u 2018. i 2019. godini također su uspoređene, ali zbog malog broja podataka raspršenih po pojedinačnim godinama nije moguće dati jasne preporuke za korekciju graničnih vrijednosti pratećih fizikalno-kemijskih pokazatelja za vrlo dobro i dobro stanje. Izuzetak je preporuka o usklađivanju vrijednosti ukupnog fosfora i prozirnosti s vrijednostima predloženim za trofičke statuse jezera.

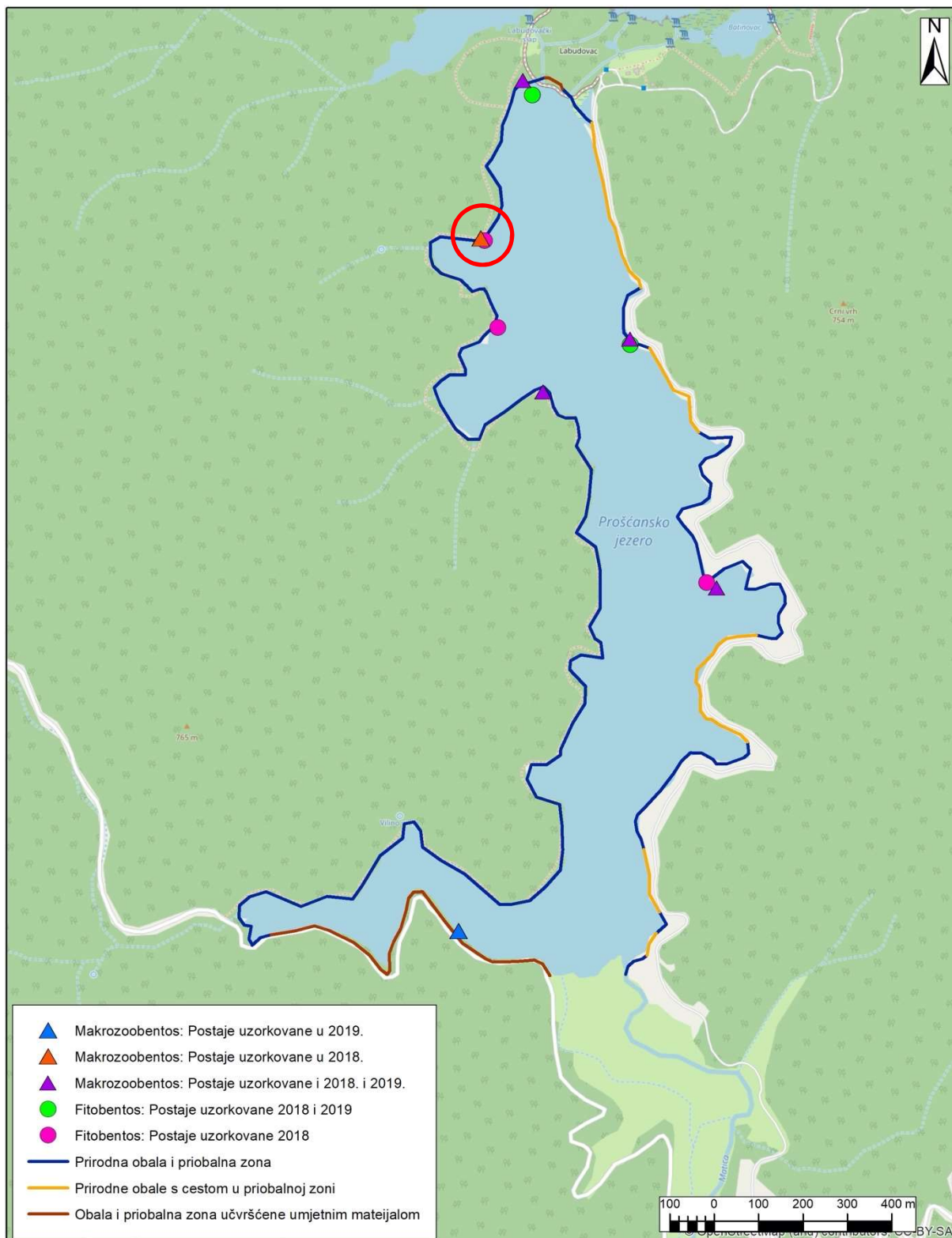
U istraživanim jezerima zabilježena je pojava hipoksije koja može biti posljedica povećanje trofije jezera, ali i dugogodišnje stanje jezera koje se može pratiti geološkim istraživanjima. Predlaže se usporedba recentnih podataka o smanjenim količinama i

nedostatku kisika u vodenom stupcu s dostupnim geološkim rezultatima. U budućem monitoringu jezera potrebno je pratiti povezanost trofičkog statusa, ekološkog stanja i pojave hipoksije u vodenom stupcu.

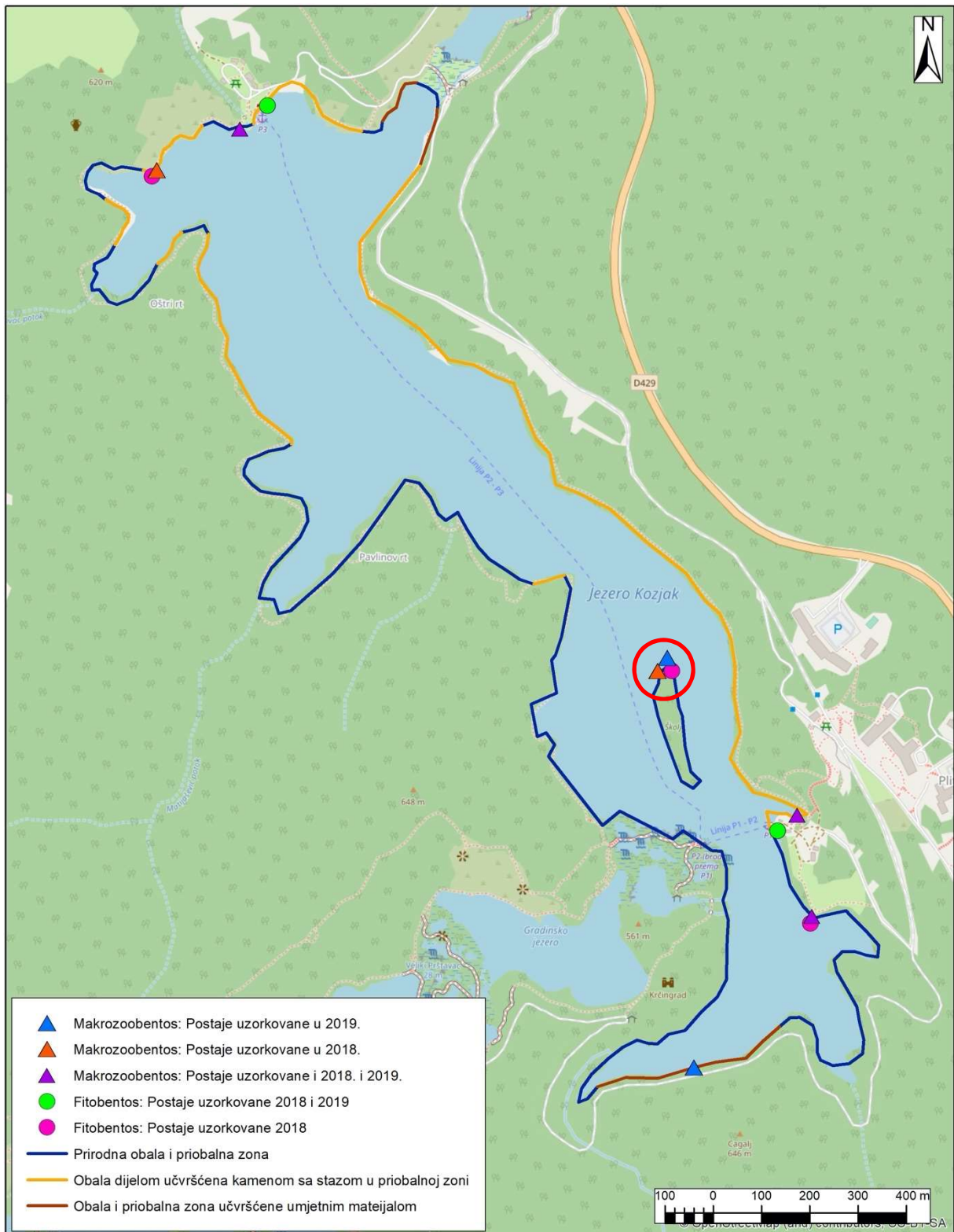
U konačnici predlažemo i istraživačke postaje za fitobentos i makrozoobentos prema tablici 42 i slikama od 7 do 13, uz napomenu da se postaje na Vranskom jezeru na Cresu i Vranskom jezeru kod Biograda pomaknute. U Vranskom jezeru na Cresu monitoring točka je pomaknuta niže od postojeće točke da bi se izbjeglo izmjenjeno stanište kao i u Vranskom jezeru kod Biograda. Sve unešene geografske dužine i širine u tablici 42 približno su upisane prema Google Earth aplikaciji.

Tablica 42. Popis predloženih postaja istraživanja fitobentosa i makrozoobentosa u prirodnim jezerima u Hrvatskoj.

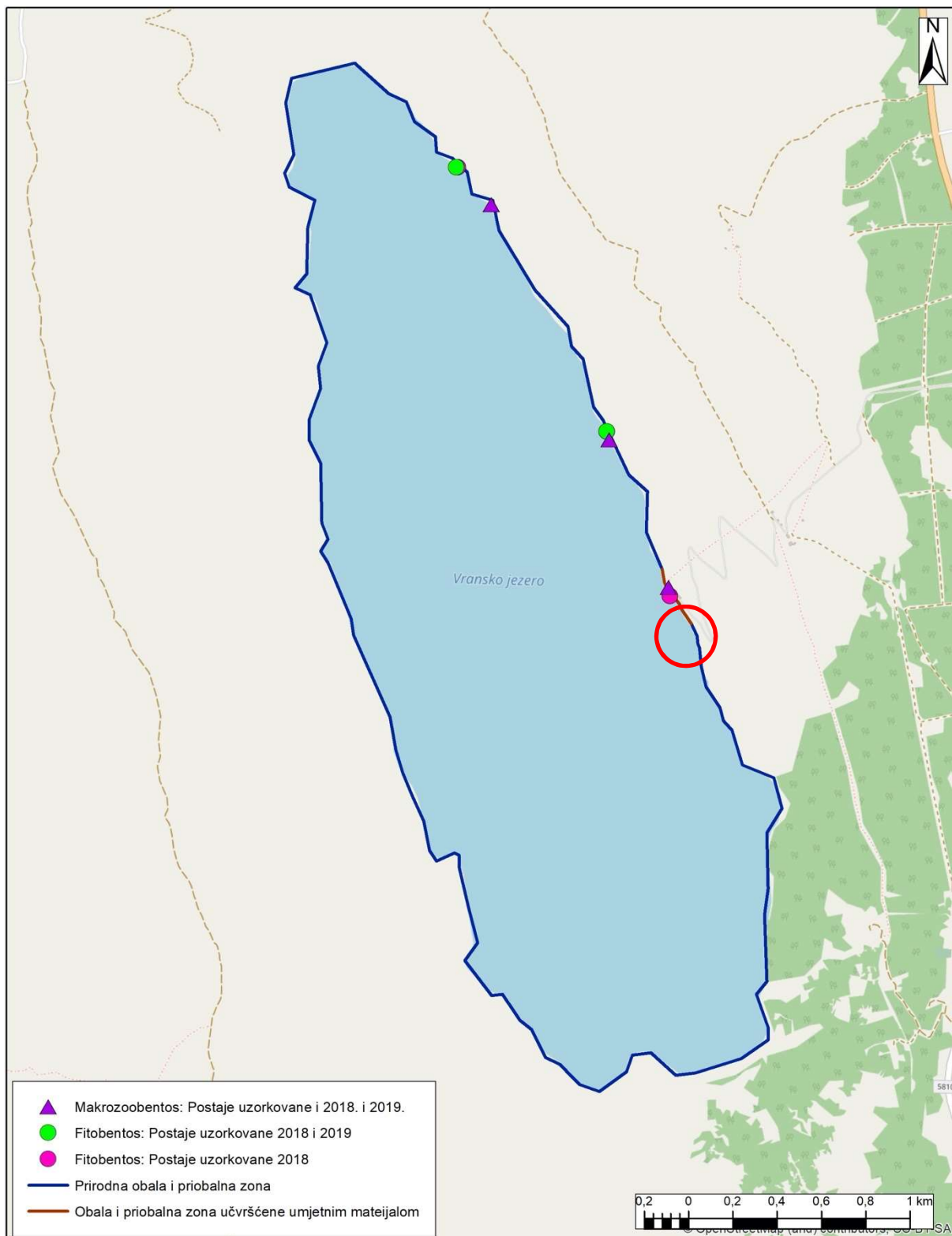
Naziv lokacije	tip površinske vode	šifra vodnog tijela	Geografska širina d.m.s.	Geografska dužina d.m.s.	Geografska širina d.d.	Geografska dužina d.d.
Plitvička jezera jezero Kozjak	HR-J_1A	CSLN018	44° 52' 59" S	15° 36' 43" I	44.8837112	15.6141198
Plitvička jezera Proščansko jezero	HR-J_1B	CSLN022	44° 51' 59" S	15° 38' 43" I	44.8667487	15.5958563
Jezero Vrana. Cres.	HR-J_2	JOLN001	44° 51' 04" S	14° 23' 50" I	44.851506	14.3973143
Visovačko jezero	HR-J_5	JKLN002	43° 51' 42" S	15° 58' 50" I	43.862431	15.9810982
Baćinska jezera Jezero Crniševo	HR-J_3	JKLN003	43° 04' 14." S	17° 24' 24" I	43.0709035	17.4073803
Baćinska jezera Jezero Oćuša	HR-J_3	JKLN003	43° 04' 43" S	17° 24' 54" I	43.0770004	17.4169201
Vransko jezero kod Biograda	HR-J_4	JKLN001	43° 56' 0.2" S	15° 30' 49" I	43.9317866	15.5151321



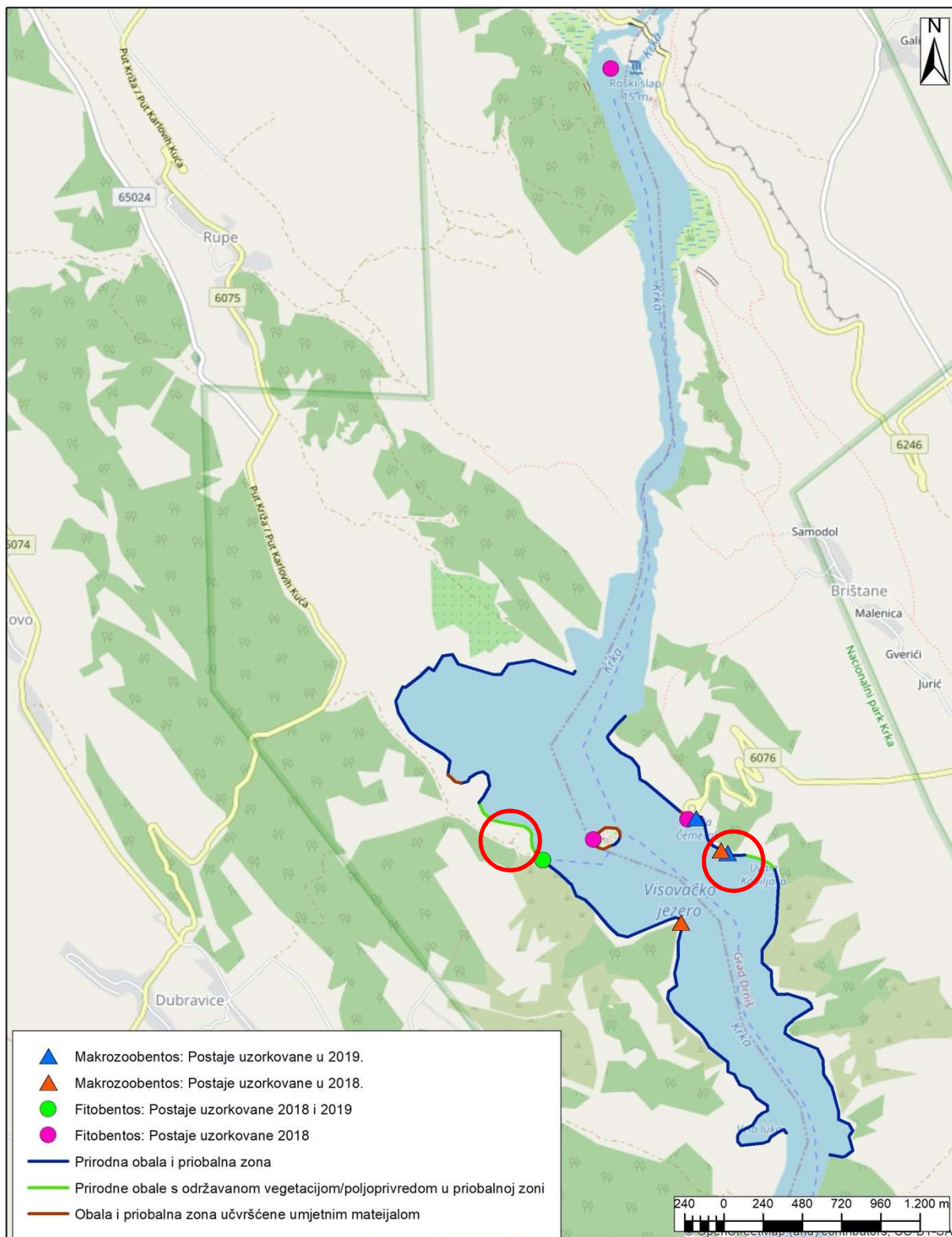
Slika 7. Karta jezera Prošće sa postajama uzorkovanja fitobentosa i makrozoobentosa. Crvenim krugom označena je prodložena buduća monitoring postaja.



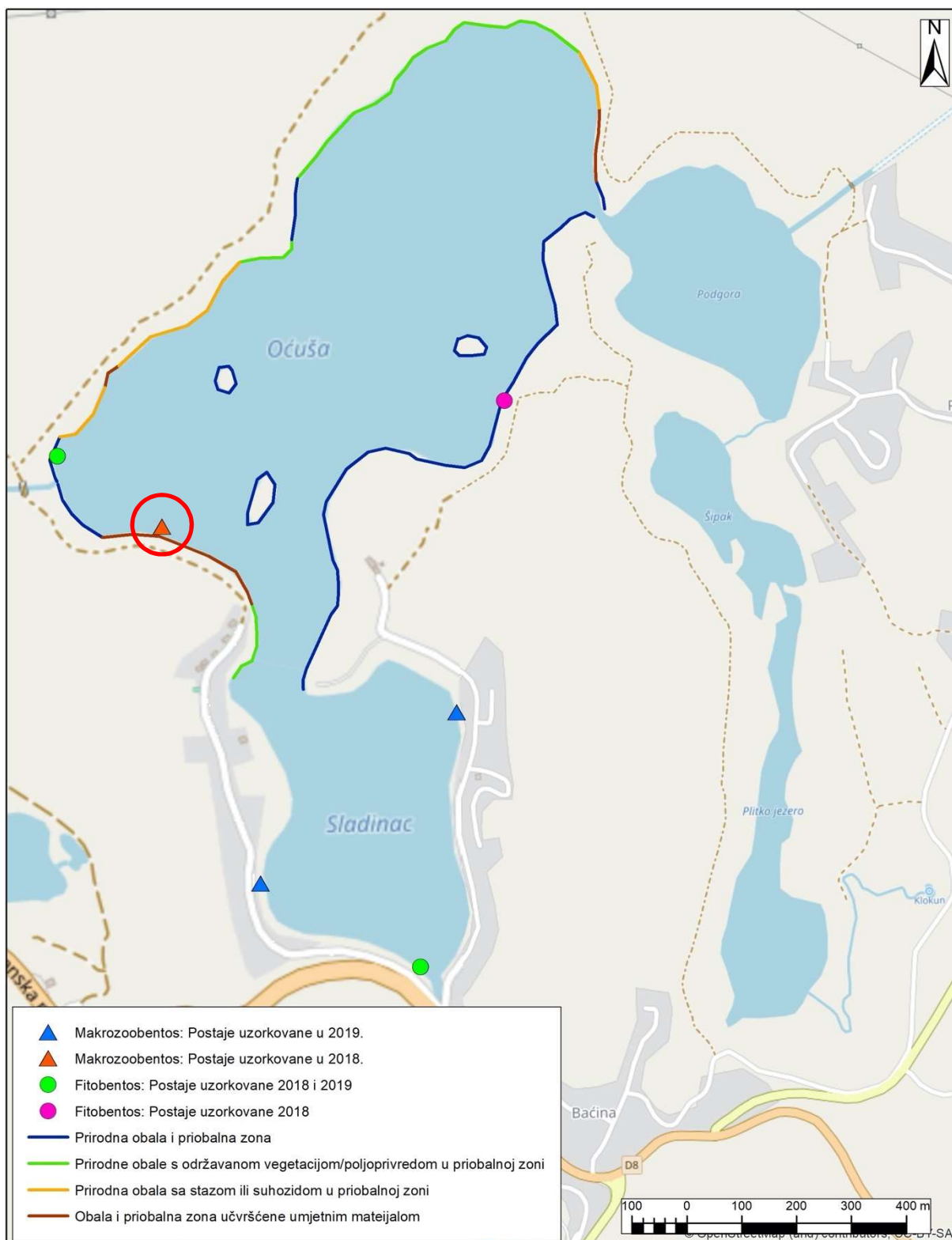
Slika 8. Karta jezera Kozjak sa postajama uzorkovanja fitobentosa i makrozoobentosa. Crvenim krugom označena je prodložena buduća monitoring postaja.



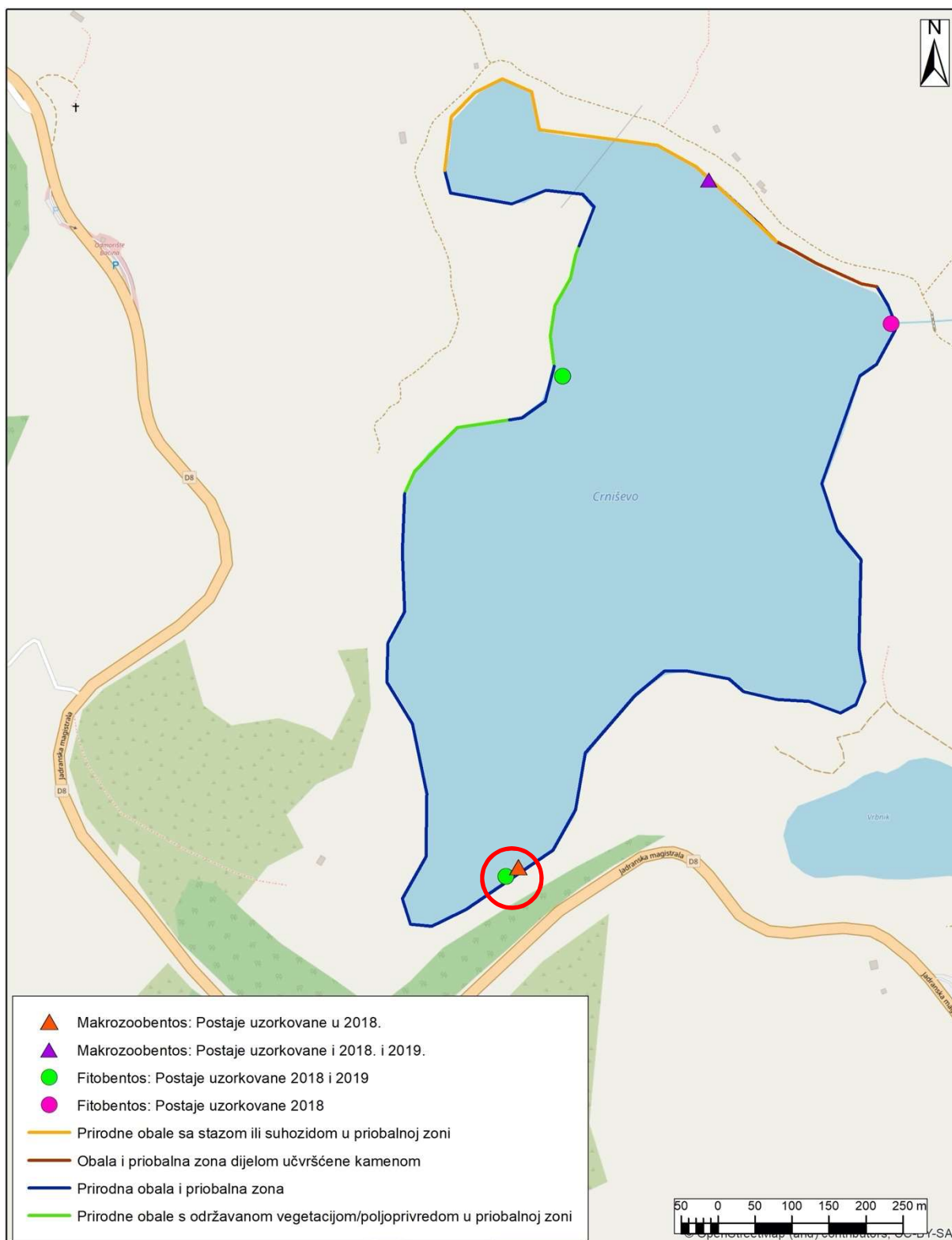
Slika 9. Karta Vanskog jezera na Cresu sa postajama uzorkovanja fitobentosa i makrozoobentosa. Crvenim krugom označena je prodložena buduća monitoring postaja.



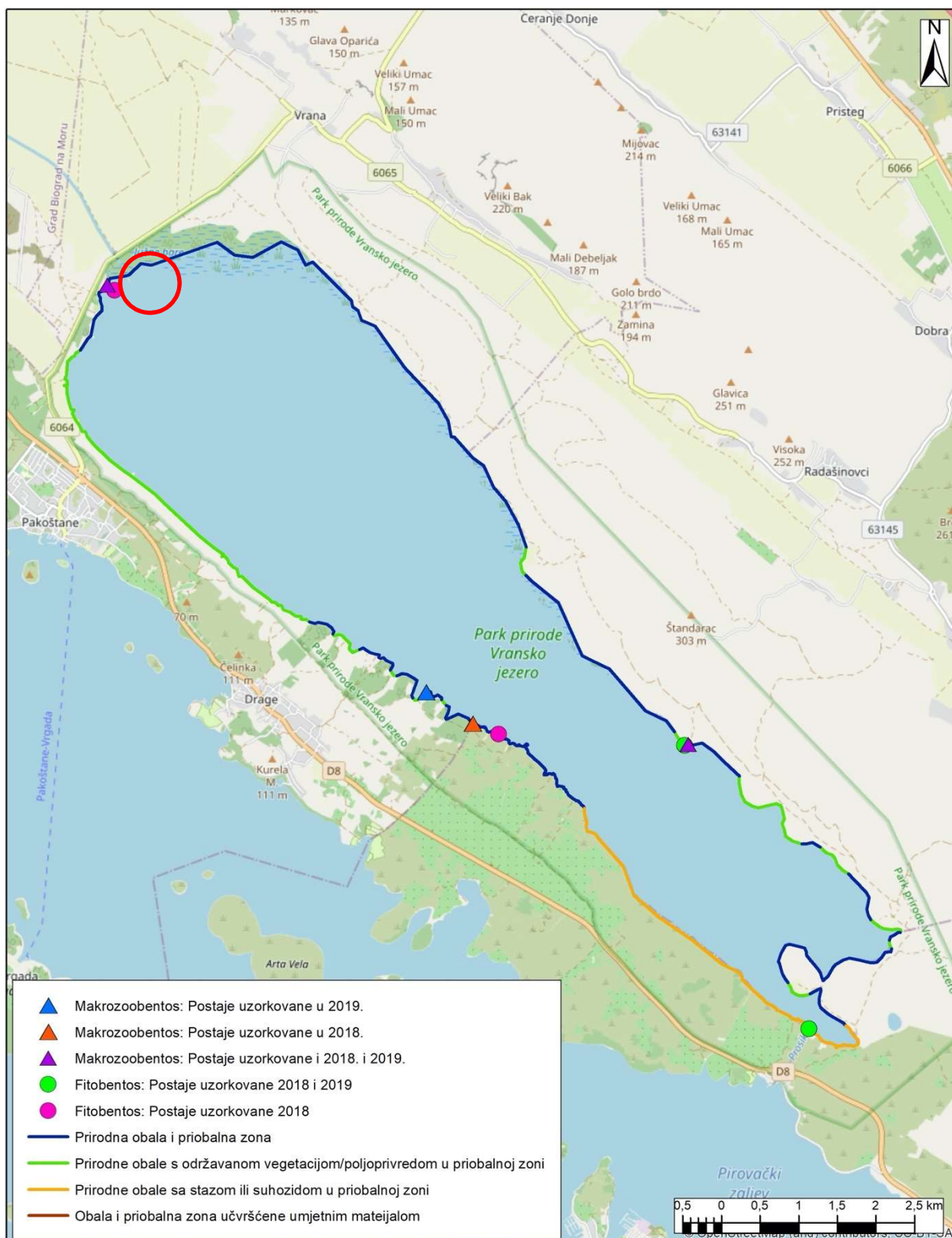
Slika 10. Karta Visovačkog jezera sa postajama uzorkovanja fitobentosa i makrozoobentosa. Crvenim krugom označena je prodložena buduća monitoring postaja.



Slika 11. Karta jezera Oćuša sa postajama uzorkovanja fitobentosa i makrozoobentosa. Crvenim krugom označena je prodložena buduća monitoring postaja.



Slika 12. Karta jezera Crniševo sa postajama uzorkovanja fitobentosa i makrozoobentosa. Crvenim krugom označena je prodložena buduća monitoring postaja.



Slika 13. Karta Vranskog jezera kod Biograda sa postajama uzorkovanja fitobentosa i makrozoobentosa. Crvenim krugom označena je prodložena buduća monitoring postaja.

10. LITERATURA

Borics, G., G. Wolfram, G. Chiriac, D. Belkinova, & K. Donabaum, 2018. Intercalibration of the national classifications of ecological status for Eastern Continental lakes: Biological Quality Element: Phytoplankton. Publications Office of the European Union, Joint Research Centre of the European Commission, Ispra, Italy, <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/11111111/54469>.

Bennion, H., M.G. Kelly, S. Juggins, M.L. Yallop, A. Burgess, J. Jamieson, & J. Krokowski, 2014. Assessment of ecological status in UK lakes using benthic diatoms. *Freshwater Science*, 33(2), 639-654. <https://doi.org/10.1086/675447>

Brierley, B., L. Carvalho, S. Davies, J. Krokowski, 2007. Guidance on the quantitative analysis of phytoplankton in Freshwater Samples. Report to SNIFFER (Project WFD80), Edinburgh, December 2007

Carvalho, L., S. Poikane, A.L. Solheim, G. Phillips, G. Borics, J. Catalan, C. de Hoyos, S. Drakare, B. Dudley, M. Jarvinen, C. Laplace-Treyture, K. Maileht, C. McDonald, U. Mischke, J. Moe, G. Morabito, P. Noges, T. Noges, I. Ott, A. Pasztaleniec, B. Skjelbred, & S. Thackeray, 2012. Strength and uncertainty of lake phytoplankton metrics for assessing eutrophication impacts in lakes. *Hydrobiologia* 704: 127-140.

Cemagref, 1982. Etude des méthodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux, Rapport Q.E. Lyon – Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, Lyon, 218 pp.

de Hoyos C., G. Catalan, J. Dörflinger, D. Ferreira, C. Kemitzoglu, J. Laplace-Treyture, A. Pahissa Lopez, O. Marchetto, G. Mihail, P. Morabito, F. Polykarpou, V. Romão, & V. Tsiaoussi, 2014. Water Framework Directive Intercalibration Technical Report: Mediterranean Lake Phytoplankton ecological assessment methods. Joint Research Centre of the European Commission, Ispra, Italy.

Dell'Uomo, A., M. Torrisi, S. Cavalieri, & A. Corsini, 2004. L'indice diatamico di eutrofizzazione/polluzione (EPI-D) nel monitoraggio delle acque correnti Linne guida. Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per I servizi Tecnici, Centro Tematico Nazionale "Acque Interne e Marino Costiere", pp. 1-101.

Gassner, H., J. Wanzenböck, & G. Tischler, 2003. Ecological integrity assessment of lakes using fish communities. Suggestions of new metrics developed in two Austrian prealpine lakes. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 88: 635–652.

Hendrickx, A., & L. Denys, 2005. Toepassing van verschillende biologische beoordelingssystemen op vlaamse potentële interkalibratielocaties overeenkomstig de Europese kaderrichtlijn water : partim 'fytobenthos'. Rapporten van het instituut voor natuurbehoud, nr. 06, Instituut voor Natuurbehoud.

Kelly, M., E. Acs, V. Bertrin, H. Bennion, G. Borics, A. Burgess, L. Denys, F. Ecke, M. Kahlert, S. M. Karjalainen, B. Kennedy, A. Marchetto, S. Morin, J. Picinska-Fałtynowicz, G. Phillips, I. Schönfelder, J. Schönfelder, G. Urbanič, H. van Dam, & T. Zalewski, 2014. Water Framework Directive intercalibration technical report: lake phyto-benthos ecological assessment methods. European

Commission Joint Research Centre Institute for Environment and Sustainability, Ispra, Italy: 140, <https://op.europa.eu:443/en/publication-detail/-/publication/9e8ec290-95d8-4a1d-8f2b-87aa1d8ac5a1/language-en>.

Lecointe, C., M. Coste, J. Prygiel, 1993. "Omnidia": software for taxonomy, calculation of diatom indices and inventories management. *Hydrobiologia* 269/270: 509-513.

Lenoir, A., & M. Coste, 1996. Development of a practical diatom index of overall water quality applicable to the French National Water Board network, [in:] Whitton B.A., Rott E. (Eds.), *Use of Algae for Monitoring Rivers II*, Universität Innsbruck, Innsbruck, pp. 29-45.

Mihaljević, Z., A. Alegro, I. Ternjej, S. Gottstein, M. Miliša, R. Matoničkin Kepčija, J. Lajtner, V. Hršak, A. Previšić, M. Gligora Udovič, P. Žutinić, V. Šegota, N. Vuković, I. Pozojević, A. Rimac, V. Dorić, M. Dimnjaković, V. Bartovsky, N. Vučković, N. Koletić, M. Vilenica, & V. Mičetić Stanković, 2018. Klasifikacijski sustav ekološkog potencijala za umjetna i znatno promijenjena tijela površinskih voda – 2. dio: Stajačice Dinaridske ekoregije. Studija Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Zagreb, 230 str.

Narodne Novine 96/2019. Uredba o standardu kakvoće voda. Zagreb: Narodne novine d.d., 45 str.

Padisák, J., G. Borics, I. Grigorszky, & É. Soróczki-Pintér, 2006. Use of phytoplankton assemblages for monitoring ecological status of lakes within the Water Framework Directive: the assemblage index. *Hydrobiologia* 553: 1–14.

Phillips, G., G. Free, I. Karottki, C. Laplace-Treyture, K. Maileht, U. Mischke, I. Ott, A. Pasztaleniec, R. Portielje, M. Søndergaard, W. Trodd, & J. Van Wichelen, 2014. Water framework directive intercalibration technical report: Central Baltic Lake phytoplankton ecological assessment methods. European Commission. Joint Research Centre, Ispra, Italy: 190, <https://op.europa.eu:443/en/publication-detail/-/publication/1fca496f-24bd-4be7-98c6-5b4d2498c689/language-en>.

Poikane S., M. van den Berg, S. Hellsten, C. de Hoyos, J. Ortiz-Casas, K. Pall, R. Portielje, G. Phillips, A.L. Solheim, D. Tierney, G. Wolfram, & W. van de Bund, 2011. Lake ecological assessment systems and intercalibration for the European Water Framework Directive: aims, achievements and further challenges. *Procedia Environmental Sciences*, 9:153-168.

Prygiel, J., & M. Coste, 2000. Progress in the use of diatoms for monitoring rivers in France, [In:] Prygiel J., Whitton B.A., Bukowska J. (red.), *Use of algae for monitoring rivers III*, Agence de l'Eau Artois-Picardie, pp. 165-179.

Rott, E., P. Pfister, H. van Dam, E. Pipp, K. Pall, N. Binder, & K. Ortler, 1999. Indikationslisten für Aufwuchsalgen in Fließgewässern Österreichs, Teil 2: Trophieindikation und autökologische Anmerkungen. *Wasserwirtschaftskataster*. – Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft. Wien.

Schaumburg, J., U. Schmedtje, C.H. Schranz, B. Kopf, S. Schneider, P. Meilinger, G. Hofmann, A. Gutowski, J. Foerster, 2004. Instruction Protokoll for the ecological Assessment of Running Waters

for Implementation of the EU Water Framework Directive: Macrophytes and Phytobenthos. Bavarian Water Management Agency. Munchen, pp. 1-89.

Stenger-Kovács, C., K. Buczkó, É. Hajnal, & J. Padisák, 2007. Epiphytic, littoral diatoms as bioindicators of shallow lake trophic status: Trophic Diatom Index for Lakes (TDIL) developed in Hungary. *Hydrobiologia* 589: 141–154.

Zelinka, M., & P. Marwan, 1961. Zur Präzisierung der biologischen klassifikation der Reinheit fließender Gewässer. *Archiv für Hydrobiologie* 57: 389-407.

Prilozi

1. **Prilog 1:** HR_GAP3_reporting_method_IC_not_feasible_lake_phytoplankton_draft2, predan u HV 12. veljače 2020
2. **Prilog 2:** Report on fitting of phytobenthos classification method with the results of the completed intercalibration of the Lakes cross-GIG (HA, L-M1)
3. **Prilog 3:** Report on Croatian lake macroinvertebrates classification method in the case where the Intercalibration exercise is not possible (Gap 3)
- 4.
5. JCR OBRAZAC MAKROZOOBENTOS
6. EXCEL TABLICA FITOBENTOS 2018.
7. EXCEL TABLICA FITOBENTOS 2019.
8. EXCEL TABLICA LISTA OTUSa i PRIPADAJUĆIH FUNKCIONALNIH GRUPA
9. EXCEL TABLICA MAKROZOOBENTOS 2018. I 2019.
10. PROTOKOLI-UZORKOVANJE

Prilog 1.

Report on lake phytoplankton classification method in the case where the Intercalibration exercise is not possible (Gap 3)

Working Group:

Marija Gligora Udovič, Petar Žutinić

Division of Botany, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

Status of the document: Revised version 2.0

Hrvatske vode

Zagreb, 12th February 2020

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

1. Introduction

The goal of this report is to declare that the present Croatian assessment method of the ecological status of lakes based on phytoplankton is compliant with the WFD normative definitions and has good pressure-impact relationship.

2. Description of national assessment methods

Croatia has agreed to use the Hungarian classification method for lake phytoplankton assessment, which was intercalibrated for the Eastern Continental lakes GIG (Borics et al., 2018). Development of this intercalibrated method (setting of boundaries) was carried out with the involvement of national experts of the following countries: Bulgaria, Hungary and Romania (Table 1).

Table 1. Overview of Eastern Continental GIG lake phytoplankton assessment methods (Borics et al., 2018).

MS	Method	Status
BG	Hungarian lake phytoplankton index (HLPI)	Formally agreed national method
HU	Hungarian lake phytoplankton index (HLPI)	Formally agreed national method
RO	Hungarian lake phytoplankton index (HLPI)	Formally agreed national method

Phytoplankton based methods for Mediterranean reservoirs have already been intercalibrated (Poikane 2009), and from these, the methodology was adapted.

All natural lakes in Croatia are situated in the Dinaric Ecoregion. Lakes are classified according to national typology (Official Gazette 96/19), where each lake (except for Lakes Crniševno and Oćuša which belong to the same type) is considered a distinct type due to various abiotic factors - climatic, hydrologic, morphologic and geologic specificities. Besides the national typology classification, the lakes were grouped based on depth profile into shallow and deep lakes (Table 2).

Table 2. General characteristics of Croatian natural lakes

Lake	Maximum depth (m)	Ecoregion/subregion	National type	Lake description	Depth profile
Kozjak (Plitvička jezera)	48	DINARIC Continental	HR-L_1A	carbonate substrate, dimictic, barrage lake	deep

Prošće (Plitvička jezera)	38	DINARIC Continental	HR-L_1B	carbonate substrate, dimictic, barrage lake	deep
Vransko jezero (Cres)	78	DINARIC Mediterranean	HR-L_2	carbonate substrate, monomictic, cryptodepression	deep
Crniševo	31	DINARIC Mediterranean	HR-L_3	carbonate substrate, monomictic, cryptodepression	deep
Oćuša	20	DINARIC Mediterranean	HR-L_3	carbonate substrate, monomictic, cryptodepression	deep
Vransko jezero (Biograd)	4-5	DINARIC Mediterranean	HR-L_4	carbonate substrate, polymictic, cryptodepression	shallow
Visovačko jezero	28-30	DINARIC Mediterranean	HR-L_5	carbonate substrate, monomictic, barrage lake	deep

2.1. SAMPLING AND DATA PROCESSING

The sampling strategy and data processing techniques follow the standard well-acknowledged protocols (Table 3).

Table 2. Overview of the sampling and data processing of the national phytoplankton assessment methods.

Sampling strategy	Data processing
<p>Integrated phytoplankton sample at the deepest point of the lake once a month during the vegetation period (April – September) according to standard EN 16698:2015. Depth profile of the integrated sample is dependent on lake type and stratification.</p> <p>a) Phases of water mixing (no thermal stratification) In shallow (polymictic) lakes (with maximum depth ≤ 10 m): integrated sample from the entire water column down to the depth of 1 m above the bottom. In stratified deep lakes: integrated sample to a maximum depth of 20 m or down to the depth of 1 m above the bottom.</p> <p>b) Summer stagnation phase In shallow (polymictic) lakes: down to the depth of 6 m or to the depth of 1 m above the bottom. In stratified deep lakes: depending on lake turbidity:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Turbid lakes where euphotic zone depth is less than epilimnetic depth ($Z_{eu} < Z_{epi}$): sample from the entire epilimnetic column. 	<p>Phytoplankton samples: inverted microscopy of Lugol-preserved samples according to standard EN 15204:2006; phytoplankton biovolume determination based on the calculation of the volume of each unit from appropriate geometric formulae according to standard EN 16695:2015.</p> <p>Chlorophyll-<i>a</i> samples processed according to standard ISO 10260:1992.</p>

- 2) Clear lakes where euphotic zone depth is larger than epilimnetic depth ($Z_{eu} > Z_{epi}$): sample from the entire euphotic column.

2.2. DESCRIPTION OF NATIONAL METHODOLOGY

The national dataset utilized for intercalibration comprises data coming from a total of 151 samples coming from 7 lakes (Table 4). Hydrochemical data, including basic physico-chemical data (total phosphorus, orthophosphates, total nitrogen, nitrates, nitrites, oxygen saturation, conductivity, alkalinity, total organic carbon (TOC), biological oxygen demand (BOD₅), suspended matter) and land-use data in catchment (urban and artificial areas, intensive and non-intensive agriculture, semi-natural areas), as well as biological data (Q_k , Q_k stand, HLPI, phytoplankton taxa list with biomass) are available for all samples concerned (Table 5).

Table 4. List of data available in the national dataset included in the intercalibration

Lake	Year	Physico-chemical data	Hydro-morphological data	Biological data	Complete dataset
Kozjak	2014	6	-	6	6
	2016	6	-	6	6
	2017	6	1	6	7
Prošće	2014	6	-	6	6
	2016	6	-	6	6
	2017	6	1	6	7
Vransko jezero (Cres)	2014	6	-	6	6
	2016	6	-	6	6
	2017	6	1	6	7
Crniševo	2014	6	-	6	6
	2016	6	-	6	6
	2017	6	1	6	7
Oćuša	2014	6	-	6	6
	2016	6	-	6	6
	2017	6	1	6	7
Vransko jezero (Biograd)	2014	12	-	12	12
	2016	12	-	12	12
	2017	12	1	12	13
Visovačko jezero	2014	6	-	6	6
	2016	6	-	6	6
	2017	6	1	6	7

Table 5. Range of values of different environmental variables at lake sites included in the method description.

(N=151)	MIN	MAX
TP [mg L ⁻¹]	0.0015	0.0460
P-PO ₄ ³⁻ [mg L ⁻¹]	0.0005	0.0015
TN [mg L ⁻¹]	0.1000	1.7900
N-NO ₃ ⁻ [mg L ⁻¹]	0.0050	0.9600
N-NO ₂ ⁻ [mg L ⁻¹]	0.0005	0.5900
O ₂ %	66.9	179.0
Conductivity [μS cm ⁻¹]	366	5300
Alkalinity [mg CaCO ₃ L ⁻¹]	40.0	368.8
TOC	0.59	27.89
BOD ₅	5.9	14.8
Suspended matter	0.8	20.0
Artificial areas [%]	0.0	9.3
Intensive agriculture [%]	0.0	45.2
Extensive agriculture [%]	0.0	22.3
Semi-natural areas [%]	33.8	100.0

The proposed phytoplankton based method for assessment of Croatian deep and shallow lakes consists of three metrics (Poikane, 2009; Borics et al., 2018): 1) biomass metric, which is based on the chlorophyll-*a* concentration, 2) composition metric, which is calculated from the relative abundance of functional groups of algae and their sensitivity and tolerance to environmental stressors (e.g. TP and TN), and 3) algal bloom metric.

The method is not applicable if the salinity exceeds 5 ‰.

1) Biomass metric

Chl-*a* concentration is used as a biomass metric. For the boundary setting the proposed H/G and G/M chlorophyll-*a* values for deep lakes were adopted and adjusted from the MED-GIG IC report (de Hoyos et al. 2014; Table 6), whilst H/G and G/M chlorophyll-*a* values for shallow lakes were adopted and adjusted from the Central Baltic GIG IC report (Phillips et al., 2014 Table 6). The 3rd order polynomial regression equations are used to convert the measured chlorophyll-*a* values into the normalized scale with equal class widths and standardized class boundaries, where the H/G, G/M, M/P, and P/B boundaries are 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, respectively. These converted values are considered as normalised EQR values (Table 7).

EQR_{Chl-*a*}: ecological quality ratio calculated from the Chl-*a* values

Table 6. Boundary values of chlorophyll-*a* and EQR_{Chl-*a*} for Croatian lakes.

	Class categories	Chl- <i>a</i> boundary values (μg L ⁻¹)	EQR _{Chl-<i>a</i>} values
DEEP LAKES	HIGH	≤2.0	0.8

	GOOD	≤5.3	0.6
	MODERATE	≤25.0	0.4
	POOR	≤50.0	0.2
	BAD	>50.0	<0.2
SHALLOW LAKES	HIGH	≤11.0	0.8
	GOOD	≤23.0	0.6
	MODERATE	≤35.0	0.4
	POOR	≤50.0	0.2
	BAD	>50.0	<0.2

Table 7. Equations for converting Chl-*a* to EQR values for Croatian lakes.

		DEEP LAKES		SHALLOW LAKES	
National type	HR-J_1A, HR-J_1B, HR-J_2, HR-J_3, HR-J_5			HR-J_4	
Equation for EQR _{Chl-a}	If Chl- <i>a</i> < 5.3 µg L ⁻¹	If Chl- <i>a</i> > 5.3 µg L ⁻¹	If Chl- <i>a</i> < 50 µg L ⁻¹	If Chl- <i>a</i> > 50 µg L ⁻¹	
	$EQR_{Chl-a} = 0,0074x^2 - 0,1149x + 1$	$EQR_{Chl-a} = 0,00005x^2 - 0,0118x + 0,6617$	$EQR_{Chl-a} = -0,0161x + 0,9826$	$EQR_{Chl-a} = -0,004x + 0,4$	

x: concentration of Chl-*a* (µg L⁻¹)

The proposed boundary values of chlorophyll-*a* (Table 6) were compared to the Chl-*a* range and mean values for each lake (Table 8) to strengthen the benchmark justification.

Table 8. Range and mean values of Chl-*a* for Croatian lakes.

Lake	Chl- <i>a</i> range (µg L ⁻¹)	Chl <i>a</i> mean (µg L ⁻¹)
Kozjak	0.4 – 2.7	1.3
Prošće	0.5 – 8.1	3.8
Vransko (Cres)	0.4 – 2.1	0.7
Oćuša	0.2 – 9.9	2.3
Crniševno	0.2 – 9.9	2.2
Visovac	1.2 – 7.2	3.2
Vransko (Biograd) - station Motel	0.5 – 36.3	6.6
Vransko (Biograd) - station Prosika	0.5 – 34.8	6.8

2) Composition metric (Q_k)

Assessment is based on the quantitative phytoplankton data. The applied composition metric is based on the “Assemblage index” (Q) published by Padisák et al. (2006). This metric is based on the evaluation of functional groups (FG) of algae. Each FG is given a factor number (or F value) by considering the distribution of algae along with the stressor values. The factor numbers of the functional groups were set to reflect the nutrient pressures (Table 9), according to the EC-GIG Lakes

Phytoplankton report (Borics et al., 2018). After the appropriate parametrization of the functional groups of algae in the various types of waters, Q_k is applicable to the ecological state assessment.

Q_k is given as:

$$Q_k = \sum_{i=1}^s (p_i F),$$

p_i : the relative contribution of the i^{th} assemblage to the total biomass,

F : is a factor number that evaluates the given assemblage in the given lake type.

Table 9. Proposed factor numbers (F) of the functional groups (FG).

FG	S1	S2	SN	XPh	H1	G	J	M	C	P	T	X1	LM	W1	W2	Q
F	1	1	1	1	1	3	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5
FG	D	Y	E	K	LO	WS	MP	A	B	N	Z	X3	X2	F	U	V
F	7	7	7	7	7	7	7	9	9	9	9	9	9	9	9	9

The standardization of Q_k is achieved by dividing the calculated Q_k values of each phytoplankton sample with the maximum value of the index (9) according to the formula:

$$Q_{k_stand} = Q_k/9$$

The boundaries of the composition metric were set with regards to Croatian national lake typology, where specific boundary values were assigned to each lake type. The suggested H/G boundary was set as the 75th percentile of all calculated Q_{k_stand} from all 18 samples for each lake type. The remaining degradation of continuum was divided equidistally into four width classes (Table 10).

H/G boundary = 75th percentile of Q_{k_stand}

G/M boundary = H/G * 0.75

M/P boundary = H/G * 0.50

P/B boundary = H/G * 0.25

Table 10. Boundary values of composition metric (Q_{k_stand}) and EQR_Q for Croatian lakes.

Class categories	Boundary values of Q_{k_stand}						EQR_Q values
	DEEP LAKES					SHALLOW LAKES	
	HR-J_1A	HR-J_1B	HR-J_2	HR-J_3	HR-J_5	HR-J_4	
HIGH	≥0.92	≥0.89	≥0.86	≥0.87	≥0.82	≥ 0.81	0.8
GOOD	≥0.69	≥0.67	≥0.65	≥0.65	≥0.62	≥ 0.61	0.6
MODERATE	≥0.46	≥0.45	≥0.43	≥0.44	≥0.41	≥ 0.41	0.4
POOR	≥0.23	≥0.22	≥0.22	≥0.22	≥0.21	≥ 0.20	0.2
BAD	<0.23	<0.22	<0.22	<0.22	<0.21	<0.20	<0.2

The proposed boundaries of Q_{k_stand} (Table 10) are more precautionary than those proposed by the EC-GIG (Table 11), thus supporting their further use.

Table 11. Composition metric and EQR boundaries of the JRC EC-GIG report (Borics et al., 2018).

Class categories	Composition metric (Q) boundaries	EQR values
HIGH	≥0.82	0.8
GOOD	≥0.52	0.6
MODERATE	≥0.40	0.4
POOR	≥0.20	0.2
BAD	<0.20	<0.2

The type-specific 3rd order polynomial regression equations were used for conversion of the composition metric (Q_{k_stand}) into the normalized scale with equal class widths and standardized class boundaries, where the H/G, G/M, M/P, and P/B boundaries are 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, respectively. These converted values are considered as normalised EQR_Q values (Table 12).

Table 12. Equations for converting the composition metric (Q_{k_stand}) to EQR_Q values for Croatian lakes.

	National type	Equation for EQR_Q
DEEP LAKES	HR-J_1A	$y = 7e^{-13}x^3 - 9e^{-13}x^2 + 0.8696x - 2e^{-14}$
	HR-J_1B	$y = 0.8989x - 4e^{-15}$
	HR-J_2	$y = -2e^{-13}x^3 - 8e^{-14}x^2 + 0.9302x - 2e^{-14}$
	HR-J_3	$y = 7e^{-13}x^2 + 0.9195x - 8e^{-15}$
	HR-J_5	$y = -2e^{-13}x^3 - 9e^{-14}x^2 + 0.9756x - 8e^{-14}$
SHALLOW LAKES	HR-J_4	$y = 7e^{-13}x^3 - 9e^{-13}x^2 + 0.9877x - 6e^{-14}$

x: value of Q_{k_norm}

Combination of metrics

In the final EC-GIG report Borics et al. (2018) have shown that when comparing the strength of relationships between the composition and biomass metrics, the biomass metric can be a better predictor of the ecological state. Therefore, they proposed the Hungarian lake phytoplankton index (HLPI), which is composed of the two aforementioned metrics (biomass and composition metric) as the weighted average of the EQR values. HLPI is given as:

$$HLPI = \frac{EQR_Q + 2 \times EQR_{Chl-a}}{3}$$

HLPI: Hungarian lake phytoplankton index

EQR_Q : normalized EQR of the composition metric

EQR_{Chl-a} : normalized EQR of the biomass (Chlorophyll-a) metric

The proposed boundaries of the HLPI as the final metric are presented in Table 13.

Table 13. Hungarian lake phytoplankton index (HLPI) as the final EQR and it's boundaries.

Class categories	HLPI boundaries
HIGH	0.8
GOOD	0.6
MODERATE	0.4
POOR	0.2
BAD	<0.2

3) Bloom metric

The WFD requires that the frequency and intensity of algal blooms are considered in phytoplankton-based quality assessment. For the measure of water bloom several approaches have been proposed, of which the absolute abundance of cyanobacteria was found to be the most applicable. The boundaries proposed by Carvalho et al. (2012) suggested to apply the Cyanobacteria biomass = 2 mg L⁻¹ as the boundary of low risk of harmful development and Cyanobacteria biomass = 10 mg L⁻¹ as high risk of harmful algal development. Since some of the lakes in the Dinaric region are used for drinking water supply and as exceptional natural amenities, the proposed boundary for the bloom metric was set to be more strict. In this report we propose to use the bloom metric as follows:

If Cyanobacteria biomass <2 mg L⁻¹: the values of national metrics should be applied

If Cyanobacteria biomass >2 mg L⁻¹:

National EQR >0.6 The EQR should be reduced by 0.2

National EQR <0.6 No change

2.3. NATIONAL REFERENCE CONDITIONS

The criteria for selecting the lake reference sites were based on the intercalibrated Eastern Continental lakes GIG reference condition criteria (Table 14). Since there were no sites that match the given criteria, alternative benchmark approach had to be applied.

Table 14. Reference criteria for selection of lake reference sites in the EC-GIG (Borics et al., 2018).

Pressure type	Criterion
Diffuse source pollution	Reference" threshold <20% of intensive agriculture in the catchment area. "Rejection" threshold >50% of intensive agriculture in the catchment area (estimated from Corine data). Intensive agriculture between 20% and 50%: Validation with physico-chemical parameters at the site scale.
Point source pollution	No known point source discharge, or very localized impact with self-purification. If point sources are present, a validation with chemical and biological parameters is necessary.
Water abstraction	Only very minor reductions in flow level changes having no more than very minor effects on the quality elements.
Littoral vegetation modification	Only minor modification of the shoreline. Ratio of the natural littoral vegetation >90%. Complete zonation of the macrophytes in the littoral zone.
Biological pressures	No biomanipulation No invasive species, but alien species which are not at the invasive stage are tolerated.

Pressure type	Criterion
Chemical pressures	TP: 76 $\mu\text{g L}^{-1}$ (defined as 25 th percentile of TP values in the benchmark lake population) TN: 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ (defined as 25 th percentile of TN values in the benchmark lake population) BOD: 2.5 mg L^{-1} If values are higher validation with chemical and biological parameters is necessary
Other pressures	No nearby intensive recreational use at the site scale: No regular bathing activities or motor boating. Occasional recreational uses (such as camping, swimming, boating, etc.) should lead to no or very minor impairment of the ecosystem.

2.4. NATIONAL boundary setting

Selection of alternative benchmark sites

Since no lake matched all reference criteria, alternative benchmark criteria relevant for the BQE phytoplankton were chosen in the second step.

The used alternative benchmark criteria were based on the intercalibrated Eastern Continental lakes GIG (Borics et al., 2018):

- no major point sources in catchment, complete zonation of the macrophytes in the littoral zone,
- no (or insignificant) artificial modifications of the shore line,
- no mass recreation (camping, swimming, rowing)
- low/moderate fishing (fish standing stock $< 50 \text{ kg ha}^{-1}$)
- Vegetation period mean TP $< 115 \mu\text{g L}^{-1}$
- Vegetation period mean TN $< 1550 \mu\text{g L}^{-1}$

Furthermore, rejection and reference limits for selection of lake benchmark sites from the JRC Mediterranean Lake Phytoplankton report were also applied (Table 15).

Table 15. Rejection and reference limits for selection of lake benchmark sites in the MED-GIG (de Hoyos et al., 2014).

	Artificial Land Use (%)	Intensive Agriculture (%)	Natural and Semi-natural Land Use (%)	Population density (hab km ²)	Total Phosphorus ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Rejection limits	< 4	< 20	> 70	< 30	< 30
Reference limits	< 1	< 10	> 80	< 10	< 12

2.5. PRESSURES ADDRESSED

Statistical analyses were performed to explore the responsiveness of the national phytoplankton-based assessment method to various anthropogenic stressors.

The pressure-response relationships were tested via:

- (1) non-parametric Spearman rank correlations of the national metric (HLPI index) with environmental parameters (TP, P-PO₄³⁻, TN, N-NO₃⁻, N-NO₂⁻, conductivity, alkalinity, suspended matter, total organic carbon (TOC), oxygen saturation, BOD₅,) and general land-use and hydrology parameters
- (2) linear regressions of the national metric (HLPI) with pressure variables.

The results of Spearman correlation of HLPI with pressure variables are shown in *Table 16*. The coefficient showed statistically significant relationships ($p < 0.05$) between national metric and several different pressures. Some of the pressures that present the strongest relationships with the national metric are presented in *Figure 1*. In general, lakes responded well to several nutrient pressures, in particular to total phosphorus (TP) and nitrites (N-NO₂⁻), as well as to conductivity, alkalinity, suspended matter and total organic carbon. Furthermore, relationships between EQR (HLPI) and chl-*a* and TP were explored in the context of EC-GIG dataset (*Figures 2 and 3*). For the EQR - Chl-*a* regression a statistically significant relationship was found ($p < 0.001$). No statistically significant relationship for TP was found.

Table 16. Summary of the Spearman correlations of the HLPI with different hydro-chemical and environmental pressures. Correlations marked in red are significant at $p < 0.05$.

	HLPI
TP	-0.356 $p=0.147*10^{-5}$
P-PO ₄ ³⁻	-0.036 $p=0.672$
TN	0.002 $p=0.984$
N-NO ₃ ⁻	-0.105 $p=0.214$
N-NO ₂ ⁻	0.240 $p=0.004$
Conductivity	-0.172 $p=0.041$
Alkalinity	-0.253 $p=0.002$
Suspended matter	-0.199 $p=0.018$
TOC	-0.356 $p=0.023$
O ₂ [%]	-0.135 $p=0.110$

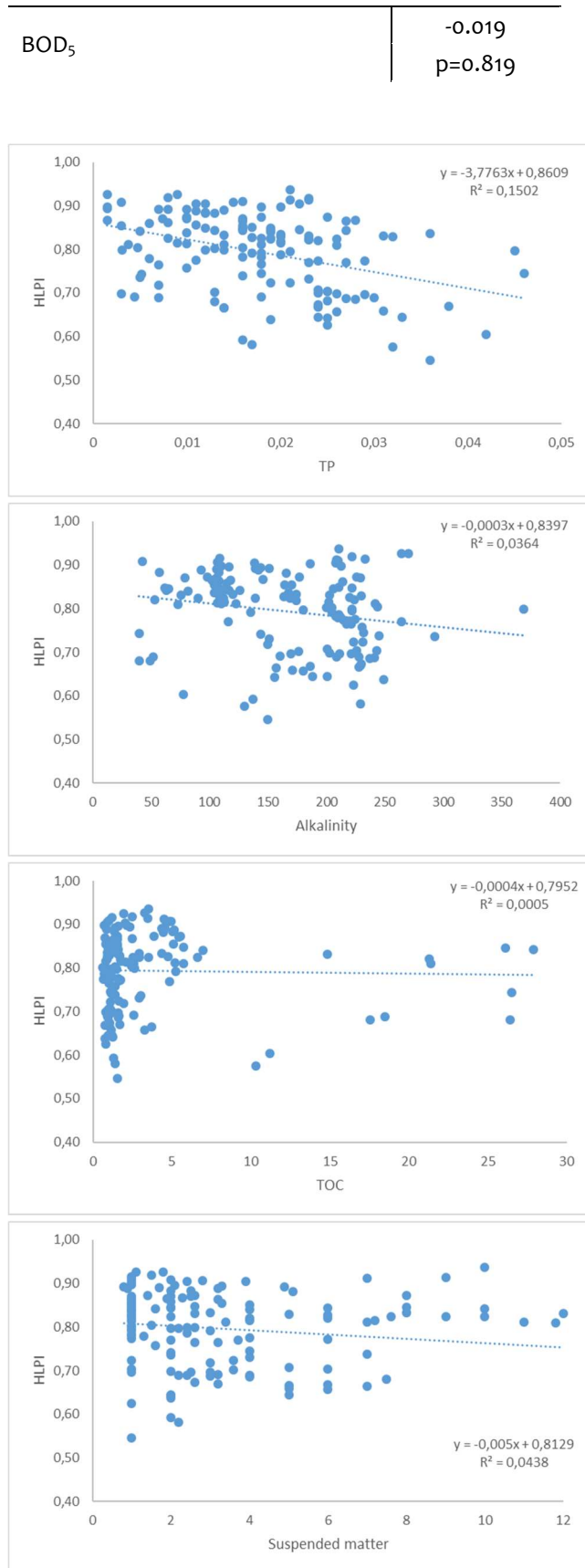


Figure 1. Pressure-response relationship between the most important pressures against the HPLI in Croatian lakes.

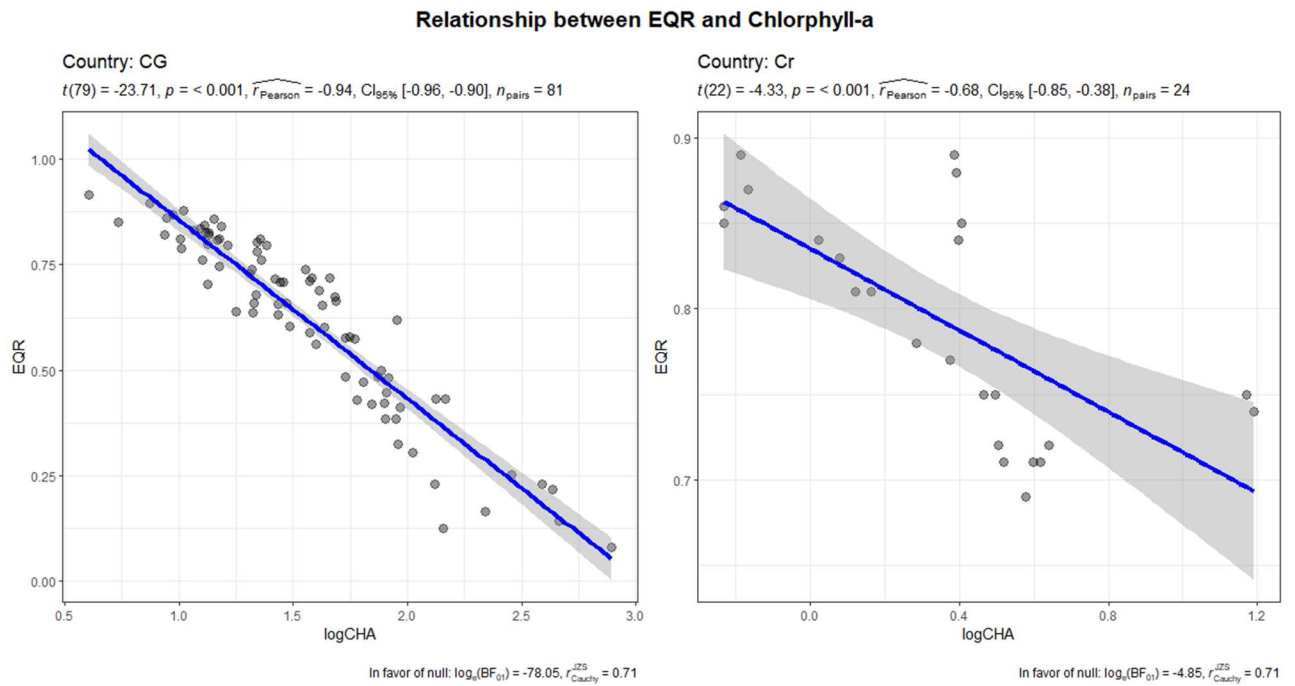


Figure 2. Relationship between EQR (HLPI) and Chl- α : a) whole dataset, b) Croatian data.

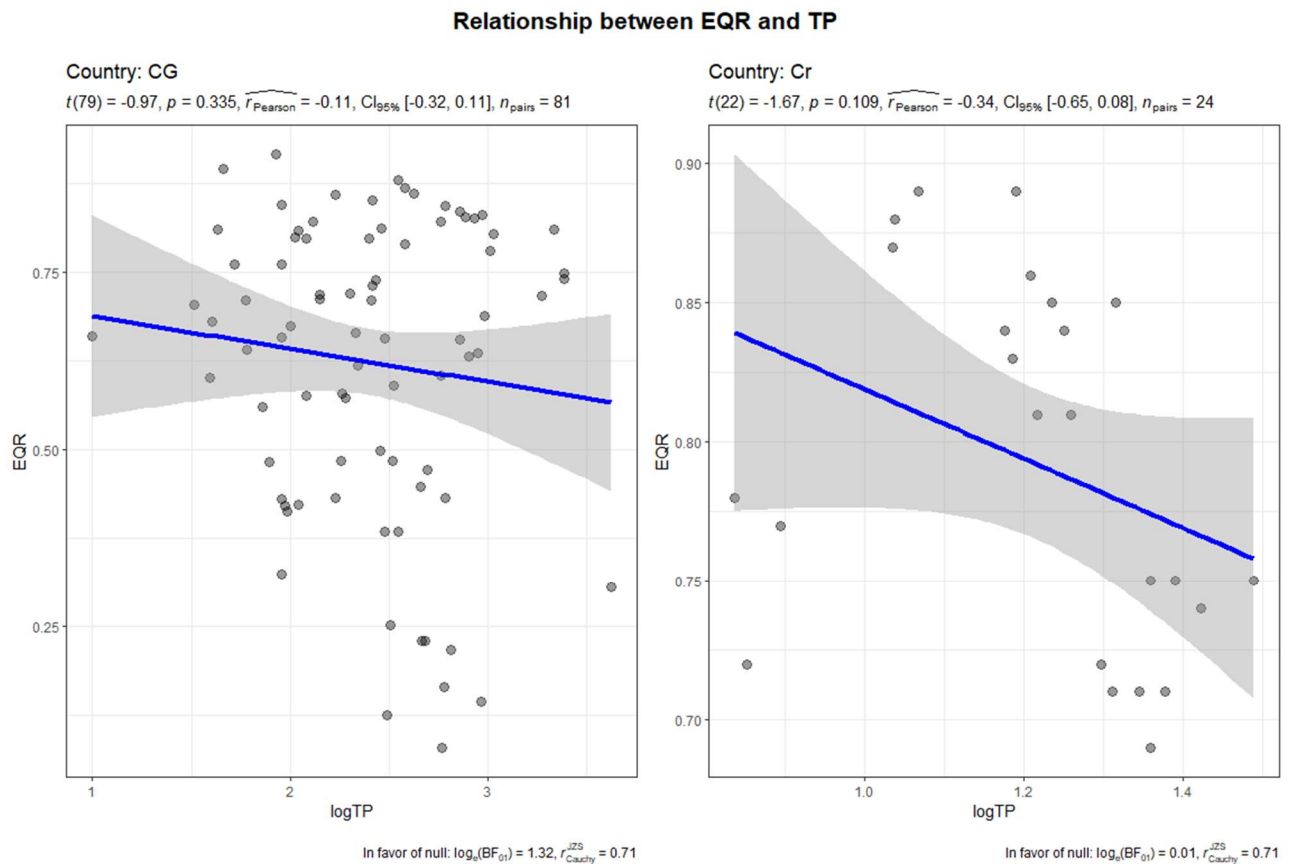


Figure 3. Relationship between EQR (HLPI) and TP: a) whole dataset, b) Croatian data.

3. WFD compliance checking

The first step in the Intercalibration process requires the checking of national methods considering the following WFD compliance criteria (Table 17).

Table 17. List of the WFD compliance criteria and the WFD compliance checking process and results.

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

4. IC Feasibility checking

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

There are no common intercalibration types for both EC-GIG (Dinaric Western Balkan) and MED-GIG natural lakes yet. Croatia decided to classify the ecological quality of natural lakes using the Hungarian classification method for lake phytoplankton assessment, which was intercalibrated for

the Eastern Continental lakes GIG (Borics et al., 2018), with some adaptations from the Mediterranean lakes GIG (Poikane, 2009; de Hoyos et al., 2014).

4.1. Typology

Does the national method address the same common type(s) as other methods in the Intercalibration group? Provide evaluation if IC feasibility regarding common IC types.

There are seven natural lakes in Croatia with surface area larger than 0,5 km². All of them are located in Dinaric ecoregion (5. Dinaric Western Balkan): two of them (Plitvice lakes: Lake Kozjak and Lake Prošće) in Dinaric Continental sub-ecoregion (EC-GIG) and five of them in Dinaric Mediterranean sub-ecoregion (MED-GIG).

4.2. Pressures addressed

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

In the Mediterranean GIG all national methods were calibrated to address eutrophication pressure.

4.3. Assessment concept

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

All assessment methods included in the IC Mediterranean exercise focus on the deepest zone of the lake, by sampling the euphotic zone and evaluating the biomass of the different taxa in biovolume. The Croatian assessment method follows the same assessment concept.

4.4. Conclusion on the Intercalibration feasibility

Provide conclusions on the IC feasibility.

Reasons for not doing the intercalibration was lack of appropriate comparable data, i.e. comparable lake types and reference conditions.

5. Description of of the biological communities

Description of the biological communities at HIGH status

Reference community of phytoplankton in high status deep karstic lakes of Dinaric ecoregion is characterized by the coexistence of chrysophytes (Chrysophyceae), dinoflagellates (Dinophyceae), and diatoms (Bacillariophyta). Chrysophytes are mainly represented with high biomass of *Dinobryon* spp. Ehrenberg, as well as a smaller proportion of *Kephyrion* spp. Pascher, *Mallomonas* spp. Perty, *Chrysocapsella planctonica* (West & G.S.West) Bournelly, *Bitrichia chodatii* (Reverdin) Chodat etc. Dinoflagellates are represented with *Peridinium* Ehrenberg/*Peridiniopsis* Lemmermann/*Parvodinium* Carty group and *Ceratium hirundinella* (O.F.Müller) Dujardin. Centric diatom taxa (*Pantocsekiella* (*Cyclotella*) *costei* (J.C.Druart & F.Straub) K.T.Kiss & E.Ács, *Stephanodiscus parvus* Stoermer & Håkansson, *S. minutulus* (Kützing) Cleve & Möller, *S. medius* Håkansson, *Pantocsekiella* (*Cyclotella*) *ocellata* (Pantocsek) K.T.Kiss & Ács, *Cyclotella distinguenda* Hustedt, *Pantocsekiella* (*Cyclotella*) *comensis* (Grunow) K.T.Kiss & E.Ács, *Cyclotella plitvicensis* Hustedt, *Cyclotella radiosa* (Grunow) Lemmermann) are dominant throughout the investigated

period, supported by pennate taxa belonging to *Fragilaria* spp. Lyngbye/*Synedra* spp. Ehrenberg. Cryptophytes (Cryptophyta) appear with lower biomass but high frequency, thus typifying the phytoplankton communities of deep karstic lakes.

Due to its proximity to Adriatic sea, the shallow Lake Vransko (Biograd) has a different phytoplankton community which is showing yearly changes, depending on the water salinity. In years with lower salinity, taxa like *Cosmarium tenue* W.Archer, *Synedropsis roundii* Torgan, Menezes, & Melo, *Fragilaria* spp., *Cyclotella meneghiniana* Kützing, *Kirchneriella contorta* (Schmidle) Bohlin and *Merismopedia* spp. Meyen can appear in high biomass. During more brackish years, high biomass of taxa like *Kirchneriella contorta*, *Thalassiosira* sp. Cleve and *Elakatothrix gelatinosa* Wille appear. No matter the salinity, shallow lake phytoplankton community is always abundant with benthic species that are resuspended from the benthic community. The most common tychoplanktonic species during the low salinity period is *Envecadea hedinii* (Hustedt) Van de Vijver, Gligora, Hinz, Kralj & Cocquyt. During the higher salinity period *Tetramphora croatica* Gligora Udovic, Caput Mihalic, Stankovic & Levkov becomes one of the dominant species in benthic community, as well as in the plankton.

Description of the biological communities at good status

In deep karstic lakes functionally well adapted phytoplankton groups interchange in dominance during the seasonal cycle from April to September and tolerate the constraining conditions of nutrients more successfully as an aggregated group than as taxonomic units. As was the case with the high status communities, the coexistence of chrysophytes (Chrysophyceae), dinoflagellates (Dinophyceae), and diatoms (Bacillariophyta) is also evident at good status. Dominant centric diatoms are represented with the following species: *Pantocsekiella costei*, *Stephanodiscus parvus*, *S. minutulus*, *S. medius*, *Pantocsekiella ocellata* and *Cyclotella distinguenda*. Furthermore, the appearance and notable biomass contribution of *Fragilaria crotonensis* Kitton, *Nitzschia* sp. Hassall, *Nitzschia acicularis* (Kützing) W.Smith, *Asterionella formosa* Hassall, *Synedra* sp. and *Ulnaria acus* (Kützing) Aboal conform to featured ecological properties of lakes. Such community composition can therefore be used as an indicator of transient ecological conditions towards good status. Considering dinoflagellates higher biomass contribution of *Ceratium hirundinella* is noted. The ecological preferences of karstic lakes favour mixotrophy of *Dinobryon* spp., allowing chrysophytes to effectively dominate the phytoplankton community at different status. Moreover, motile cells can actively control their appearance in water column, thus adapting to availability of nutrients, favourable light conditions or predator avoidance. Several green algae are observed in the community at high ecological status, mostly *Oocystis* spp. Nägeli ex A.Braun and *Elakathotrix* spp. Wille.

In the shallow Vransko Lake (Biograd) phytoplankton community at good status usually tends to shift to cyanobacteria, mostly *Microcystis* spp. Lemmermann as representative species. Some filamentous cyanobacteria also appear, such as *Chrysochloris bergii* (Ostenfeld) E.Zapomelová, O.Skáclová, P.Pumann, R.Kopp & E.Janecek, *Chrysochloris minor* (Kiselev) Komárek and *Phormidium* spp. Kützing ex Gomont.

Description of the biological communities at moderate status

At moderate status the percentage of chrysophytes, dinoflagellates and diatoms, represented by different centric diatoms, pennate group *Ulnaria/Synedra/Fragilaria*, chrysophyte *Dinobryon*, and dinoflagellate *Ceratium/Peridinium* species, decrease and the coexistence is less than 50% of

phytoplankton biomass in all lakes. Green algae (Chlorophyta) and cyanobacteria describe phytoplankton community of deep lakes at moderate status. The most prominent genera are *Ankistrodesmus* Corda, *Dictyosphaerium* Nägeli, *Sphaerocystis* Chodat, *Radiococcus* Schmidle, *Elakatothrix* and *Tetraselmis* F.Stein. During the conditions of fluctuating pH and low salinity *Botryococcus braunii* Kützing appears in the community.

In the shallow Vransko Lake (Biograd) phytoplankton community at moderate status is usually shifted to cyanobacteria with *Woronichinia compacta* (Lemmermann) Komárek & Hindák, *Snowella lacustris* (Chodat) Komárek & Hindák, *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing and *Microcystis natans* Lemmermann ex Skuja as representative species.

6. References

Borics, G., G. Wolfram, G. Chiriac, D. Belkinova, & K. Donabaum, 2018. Intercalibration of the national classifications of ecological status for Eastern Continental lakes: Biological Quality Element: Phytoplankton. Publications Office of the European Union, Joint Research Centre of the European Commission, Ispra, Italy, <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/11111111/54469>.

Carvalho, L., S. Poikane, A. Lyche Solheim, G. Phillips, G. Borics, J. Catalan, C. de Hoyos, S. Drakare, B. Dudley, M. Jarvinen, C. Laplace-Treuture, K. Maileht, C. McDonald, U. Mischke, J. Moe, G. Morabito, P. Noges, T. Noges, I. Ott, A. Pasztaleniec, B. Skjelbred, & S. Thackeray, 2012. Strength and uncertainty of lake phytoplankton metrics for assessing eutrophication impacts in lakes. *Hydrobiologia* 704: 127-140.

de Hoyos, C., J. Catalan, G. Dörflinger, J. Ferreira, D. Kemitzoglu, C. Laplace-Treuture, J. Pahissa Lopez, A. Marchetto, O. Mihail, G. Morabito, P. Polykarpou, F. Romão, & V. Tsiaoussi, 2014. Water Framework Directive Intercalibration Technical Report: Mediterranean Lake Phytoplankton ecological assessment methods. Joint Research Centre of the European Commission, Ispra, Italy, <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/water-framework-directive-intercalibration-technical-report-mediterranean-lake-phytoplankton>.

Official Gazette 2013. Regulation on Water Quality Standard, Official Gazette of the Republic of Croatia No. 96/19.

Padisák, J., G. Borics, I. Grigorszky, & É. Soróczki-Pintér, 2006. Use of phytoplankton assemblages for monitoring ecological status of lakes within the Water Framework Directive: the assemblage index. *Hydrobiologia* 553: 1–14.

Phillips, G., G. Free, I. Karottki, C. Laplace-Treuture, K. Maileht, U. Mischke, I. Ott, A. Pasztaleniec, R. Portielje, M. Søndergaard, W. Trodd, & J. Van Wichelen, 2014. Water framework directive intercalibration technical report: Central Baltic Lake phytoplankton ecological assessment methods. European Commission. Joint Research Centre, Ispra, Italy: 190, <https://op.europa.eu:443/en/publication-detail/-/publication/1fca496f-24bd-4be7-98c6-5b4d2498c689/language-en>.

Water quality - Guidance on the estimation of phytoplankton biovolume (EN 16695:2015).

Water quality - Guidance on quantitative and qualitative sampling of phytoplankton from inland waters (EN 16698:2015).

Water quality - Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique) (EN 15204:2006).

Water quality - Measurement of biochemical parameters - Spectrometric determination of the chlorophyll-*a* concentration (ISO 10260:1992).

Prilog 2.

Report on fitting of phytobenthos classification method with the results of the completed intercalibration of the Lakes cross-GIG (HA, L-M1)

Working Group:

Petar Žutinić, Marija Gligora Udovič

Division of Botany, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

Status of the document: Draft-version 1.0

Hrvatske vode

Zagreb, March 10th 2020

Report on fitting of phytobenthos classification method with the results of the completed intercalibration of the lakes (L-M1)

1. Introduction

The official intercalibration exercise of phytobenthos-based methods of ecological status assessment of lakes within the cross-Geographical Intercalibration Group (cross-GIG) was successfully finalized in 2014 by eleven European countries. Lakes were classified into three broad common types: low, medium and high alkalinity lakes (*Table 1*). Due to the short gradient and confounding factors, it was not possible to perform a full intercalibration on low alkalinity lakes (Kelly et al. 2014). Croatia did not participate in the cross-GIG intercalibration exercise with phytobenthos data during the official exercise.

The goal of this report is to declare that the present Croatian assessment method of ecological status of Mediterranean natural lakes of the IC type (L-M1) based on benthic diatoms is compliant with the WFD normative definitions and its class boundaries are in accordance with the results of the completed intercalibration exercise.

In particular, the classification method was verified for WFD compliance and IC feasibility and the class boundaries were compared with agreed boundaries from the cross-GIG intercalibration exercise following the instructions of the CIS Guidance Document n°30: “Procedure to fit new or updated classification methods to the results of a completed intercalibration exercise” (Willby et al. 2014).

Table 1. Common intercalibration water body types and list of the MS sharing each type (from Kelly et al. 2014)

Common type	Common type characteristics, contributing types, region	MS sharing IC common type
HA	High alkalinity lakes CB-GIG: L-CB1, L-CB2 MED-GIG: L-M1 ALP-GIG: L-AL3	BE-F, DE, HU, IE, IT, PL, SE, SI, UK, HR
MA	Moderate alkalinity lakes CB-GIG: L-CB3 N-GIG: L-N8	BE-F, DE, FR, FI, IE, IT, SE, UK
LA	Low alkalinity lakes	FI, IE, SE, UK

N-GIG: L-N2, L-N3

2. Description of national assessment methods

The Croatian national method for ecological status assessment of lakes considers benthic diatoms as proxies for phytobenthos. It is compliant with normative definitions of WFD used by other MS and takes into account both taxonomic composition and species' relative abundance of benthic diatom assemblages. Sampling, sample treatment, diatom identification and data processing are based on the European standards EN 13946: 2014 and EN 14407: 2014. Ecological status is evaluated using the two multimetric diatom indices (MIL and MIB).

All natural lakes in Croatia are situated in the Dinaric Western Balkan ecoregion (ER5; sensu Illies 1978). Lakes are classified according to national typology (Official Gazette 96/19), where each lake (except for Lakes Crniševno and Oćuša which belong to the same type) is considered a distinct type due to various abiotic factors - climatic, hydrologic, morphologic and geologic specificities. Besides the national typology classification, the lakes were grouped based on depth profile into shallow and deep lakes (Table 2). According to the IC typology the lakes are classified into high alkalinity (HA) lakes of the MED-GIG group L-M1.

The lakes are influenced mostly by Mediterranean and partly Continental climate.

Table 2. General characteristics of Croatian natural lakes

Lake	Maximum depth (m)	Ecoregion/subregion	National type	Lake description	Depth profile
Kozjak (Plitvička jezera)	48	DINARIC Continental	HR-L_1A	carbonate substrate, dimictic, barrage lake	deep
Prošće (Plitvička jezera)	38	DINARIC Continental	HR-L_1B	carbonate substrate, dimictic, barrage lake	deep
Vransko (Cres)	78	DINARIC Mediterranean	HR-L_2	carbonate substrate, monomictic, cryptodepression	deep
Crniševno	31	DINARIC Mediterranean	HR-L_3	carbonate substrate, monomictic, cryptodepression	deep
Oćuša	20	DINARIC Mediterranean	HR-L_3	carbonate substrate, monomictic, cryptodepression	deep
Vransko (Biograd)	4-5	DINARIC Mediterranean	HR-L_4	carbonate substrate, polymictic, cryptodepression	shallow
Visovačko	28-30	DINARIC Mediterranean	HR-L_5	carbonate substrate, monomictic, barrage lake	deep

2.1. SAMPLING AND DATA PROCESSING

Sampling method: Littoral diatoms are sampled from the natural (type specific) bottom, preferably at 0.5 - 1.5 m depth. Stones are preferred (minimum of five), but sampling on emergent or

submersive macrophytic vegetation, rocks, artificial substrate or sand and mud is allowed, if stones are absent.

Sampling time and frequency: Sampling is performed once a year, principally in spring time during favourable and stable water level. A preferred number of sampling points is one per lake.

Sample treatment/data processing: Diatom samples in the laboratory are treated according to European standard EN 13946: 2014, where the hydrochloric acid is used to remove inorganic material, and sulphuric acid or hot hydrogen peroxide are used to remove all the organic material. Permanent slides are prepared by mounting clean diatom suspension with Naphrax on the microscopic slides.

Identification level: 400 valves are counted and identified to the lowest taxonomic level possible on each slide using light microscope with Differential Interference Contrast at 1000 x magnification.

2.2. DESCRIPTION OF NATIONAL METHODOLOGY

Metric calculation: Methods for lake phytobenthos, which were successfully intercalibrated during the professional checking processes of the EU (Kelly et al. 2014), consist of indices like IBD and EPI-D, which can be calculated using the OMNIDIA software (Lecointe et al. 2003, 2008), and index TDIL₁₋₂₀ developed by Stenger-Kovács et al. (2007). The calculation process of these three indices (Table 3) is based on the weighted average equation of Zelinka and Marwan (1961) modified by Coste (1982):

$$Index = \frac{\sum_{j=1}^n p_j \times s_j \times v_j}{\sum_{j=1}^n p_j \times v_j}$$

Where:

p_j : relative abundance of counting units of “j” taxon in sample

s_j : sensitivity of “j” taxon (optimum)

v_j : tolerance/indicator value of “j” taxon

Table 3. Diatom indices used as metrics for lake phytobenthos.

Index	Final calculation	References
EPI-D	$EPI-D = 20 - 4.75 \times \sum EPI-D$	Dell’Uomo 1996
IBD	$IBD = 4.75 \times \sum IBD - 8.5$	Prygiel & Coste 1999
TDIL ₁₋₂₀	$TDIL_{1-20} = 3.8 \times \sum TDIL_{1-20} + 1$	Stenger-Kovács et al. 2007

Croatia has agreed to use two multimetric diatom indices proposed by the Lake Phytobenthos JRC Technical report (Kelly et al. 2014) and Ács et al. (2015). The use of multimetric indices was chosen due to stronger correlations with stressors, in contrast to the use of diatom indices on their own (Kelly et al. 2014). The theoretical values of these multimetric indices vary between 1-19 (Table 4).

Table 4. Proposed multimetric indices for the ecological assessment of Croatian lakes of the IC type L-M1.

Lake type	Indices used for calculation of	Multimetric index	Reference value of multimetric index
-----------	---------------------------------	-------------------	--------------------------------------

	multimetric index		
SHALLOW LAKES	IBD EPI-D	$MIB = \frac{IBD + EPI - D}{2}$	17
DEEP LAKES	IBD EPI-D TDIL ₁₋₂₀	$MIL = \frac{IBD + EPI - D + TDIL_{1-20}}{3}$	19

Ecological status assessment: Assessment is based on EQR values of MIB (shallow lakes) or MIL (deep lakes). Further details in Section "2.4. National boundary setting".

2.3. NATIONAL REFERENCE CONDITIONS

In the Dinaric ecoregion of Croatia, the landscape is mostly dominated by karst deposits, which have historically been seen as harsh habitats for agricultural and urban development. This means that very few lakes and reservoirs are affected by high levels of nutrient enrichment and are mostly in good and high ecological status (or good ecological potential in the case of reservoirs). The criteria for selecting the lake reference sites were based on the intercalibrated Eastern Continental lakes GIG reference condition criteria (Table 5). Since there were no sites that match the given criteria, alternative benchmark approach had to be applied.

Table 5. Reference criteria for selection of lake reference sites in the EC-GIG (Borics et al. 2018).

Pressure type	Criterion
Diffuse source pollution	Reference" threshold <20% of intensive agriculture in the catchment area. "Rejection" threshold >50% of intensive agriculture in the catchment area (estimated from Corine data). Intensive agriculture between 20% and 50%: Validation with physico-chemical parameters at the site scale.
Point source pollution	No known point source discharge, or very localized impact with self-purification. If point sources are present, a validation with chemical and biological parameters is necessary.
Water abstraction	Only very minor reductions in flow level changes having no more than very minor effects on the quality elements.
Littoral vegetation modification	Only minor modification of the shoreline. Ratio of the natural littoral vegetation >90%. Complete zonation of the macrophytes in the littoral zone.
Biological pressures	No biomanipulation No invasive species, but alien species which are not at the invasive stage are tolerated.
Chemical pressures	TP: 76 µg L ⁻¹ (defined as 25 th percentile of TP values in the benchmark lake population) TN: 400 µg L ⁻¹ (defined as 25 th percentile of TN values in the benchmark lake population) BOD: 2.5 mg L ⁻¹ If values are higher validation with chemical and biological parameters is necessary
Other pressures	No nearby intensive recreational use at the site scale: No regular bathing activities or motor boating. Occasional recreational uses (such as camping,

Pressure type	Criterion
	swimming, boating, etc.) should lead to no or very minor impairment of the ecosystem.

Selection of alternative benchmark sites

Since no lake matched all reference criteria, alternative benchmark criteria were chosen in the second step. The used alternative benchmark criteria were based on the intercalibrated Eastern Continental lakes GIG (Borics et al. 2018):

- no major point sources in the catchment, complete zonation of the macrophytes in the littoral zone,
- no (or insignificant) artificial modifications of the shoreline,
- no mass recreation (camping, swimming, rowing)
- low/moderate fishing (fish standing stock <50 kg ha⁻¹)
- vegetation period mean TP <115 µg L⁻¹
- vegetation period mean TN <1550 µg L⁻¹

Furthermore, rejection and reference limits for selection of lake benchmark sites from the JRC Mediterranean Lake Phytoplankton report (de Hoyos et al. 2014) were also applied (Table 6).

Table 6. Rejection and reference limits for selection of lake benchmark sites in the MED-GIG (de Hoyos et al. 2014).

	Artificial Land Use (%)	Intensive Agriculture (%)	Natural and Semi-natural Land Use (%)	Population density (hab km ²)	Total Phosphorus (µg L ⁻¹)
Rejection limits	< 4	< 20	> 70	< 30	< 30
Reference limits	< 1	< 10	> 80	< 10	< 12

2.4. NATIONAL BOUNDARY SETTING

The national dataset utilized for intercalibration comprises data coming from a total of 35 samples coming from 7 lakes (Table 7). Physico-chemical data (total phosphorus, orthophosphates, total nitrogen, nitrates, nitrites, ammonium, dissolved oxygen, conductivity, alkalinity, pH, biological oxygen demand (BOD₅), suspended matter) and land-use data in catchment (urban and artificial areas, intensive and non-intensive agriculture, semi-natural areas), as well as biological data (MIL, MIB, diatom taxalist with relative abundances) are available for all samples concerned (Table 8).

Table 7. List of data available in the national dataset included in the intercalibration.

Lake	Year	Physico-chemical data	Land-use data (catchment)	Biological data	Complete dataset	Benchmark
Kozjak	2019	1	1	3	5	Yes
Prošće	2019	1	1	3	5	Yes
Vransko (Cres)	2019	1	1	3	5	Yes

Crniševo	2019	1	1	3	5	No
Oćuša	2019	1	1	3	5	Yes
Vransko (Biograd)	2019	1	1	3	5	Yes
Visovačko	2019	1	1	3	5	Yes

Table 8. Range of values of different environmental variables at lake sites included in the method description.

(N=7)	MIN	MAX
TP [mg L ⁻¹]	0.003	0.015
P-PO ₄ ³⁻ [mg L ⁻¹]	0.002	0.005
TN [mg L ⁻¹]	0.100	0.850
N-NO ₃ ⁻ [mg L ⁻¹]	0.010	0.660
N-NO ₂ ⁻ [mg L ⁻¹]	0.001	0.011
N-NH ₄ ⁺ [mg L ⁻¹]	0.004	0.015
Conductivity [μS cm ⁻¹]	359	1946
Alkalinity [mg CaCO ₃ L ⁻¹]	136.3	383.5
Suspended matter [mg L ⁻¹]	1.0	8.6
COD-Mn [mg O ₂ L ⁻¹]	0.8	3.6
BOD ₅ [mg O ₂ L ⁻¹]	0.25	1.80
Water temperature [°C]	9.5	19.6
DO [mg L ⁻¹]	8.9	11.0
pH	7.3	8.7
Artificial areas [%]	0.0	9.3
Intensive agriculture [%]	0.0	45.2
Extensive agriculture [%]	0.0	22.3
Semi-natural areas [%]	33.8	100.0

From a total of seven lakes in the L-M1 type, six met the given benchmark criteria. Only Lake Crniševo did not fully comply to the benchmark criteria.

The multimetric index MIL was developed for Hungarian lakes and was successfully intercalibrated. In this report, we propose the use of MIL for Croatian natural lakes in Dinaric ecoregion. The proposed multimetric index MIB was developed, and successfully intercalibrated, for assessment of ecological status of Lake Balaton, which has comparable physico-chemical, geomorphologic, trophic and properties to shallow Lake Vransko (Biograd) in the Dinaric ecoregion. In the present report, we propose the use of MIB for ecological status assessment of shallow Lake Vransko (Biograd) in the Dinaric ecoregion of Croatia.

Setting of reference values and calculation of EQR:

The reference values of MIL and MIB are set as the theoretical maximum values for the Croatian dataset (Table 4).

The calculation of EQR follows the equations:

For deep lakes:

$$EQR = MIL/MIL_{ref}$$

For shallow lakes:

$$EQR = MIB/MIB_{ref}$$

Setting of EQR boundaries:

The High/Good EQR boundary was derived as the 25th percentile of EQR variability at available spatial based benchmark sites. The remaining degradation continuum was divided into four equal width classes. The boundary values of multimetric indices and corresponding EQR values are shown in Table 9.

H/G boundary = 25th percentile of benchmark sites

G/M boundary = H/G * 0.75

M/P boundary = H/G * 0.50

P/B boundary = H/G * 0.25

Table 9. Boundary values of multimetric indices and corresponding EQR values.

	Class categories	MIL boundary values	EQR values
DEEP LAKES	HIGH	≥ 16.01	≥ 0.84
	GOOD	12.01-16.00	0.63-0.83
	MODERATE	8.01-12.00	0.42-0.62
	POOR	4.00-8.00	0.21-0.41
	BAD	<4.00	<0.21
	Class categories	MIB boundary values	EQR values
SHALLOW LAKES	HIGH	≥ 15.70	≥ 0.92
	GOOD	11.80-15.69	0.70-0.91
	MODERATE	7.80-11.79	0.46-0.69
	POOR	3.90-7.79	0.23-0.45
	BAD	<3.90	<0.23

Since the EQR boundaries should be harmonized across the EU countries, the boundaries of both indices were modified according to the suggestion of the cross-GIG Intercalibration group (Table 10; Kelly et al. 2014, Ács et al. 2015).

Table 10. Modified boundary values of multimetric indices and corresponding EQR values.

	Class categories	MIL boundary values	EQR values	Equation for EQR normalization
DEEP LAKES	HIGH	≥ 15.21	≥ 0.80	$EQR = 0.0526 \times MIL$
	GOOD	11.41-15.20	0.60-0.79	$EQR = 0.0526 \times MIL$
	MODERATE	7.61-11.40	0.40-0.59	$EQR = 0.0526 \times MIL$
	POOR	3.80-7.60	0.20-0.39	$EQR = 0.0526 \times MIL$
	BAD	<3.80	≤ 0.19	$EQR = 0.0526 \times MIL$
	Class categories	MIB boundary values	EQR values	Equation for EQR normalization

SHALLOW LAKES	HIGH	≥ 13.60	≥ 0.80	$EQR = 0.0588 \times MIB$
	GOOD	10.20-13.59	0.60-0.79	$EQR = 0.0588 \times MIB$
	MODERATE	6.80-10.19	0.40-0.59	$EQR = 0.0588 \times MIB$
	POOR	3.40-6.79	0.20-0.39	$EQR = 0.0588 \times MIB$
	BAD	<3.40	≤0.19	$EQR = 0.0588 \times MIB$

After the corrections EQR values are used as the national metric in comparison with the intercalibration common metric (ICM).

2.5. PRESSURES ADDRESSED

The different national methods of the MS of the completed intercalibration exercise were reported to mainly address eutrophication, since nutrients are acknowledged as the key factor determining outcomes in lakes (Kelly et al. 2014). Statistical analyses were performed to explore the responsiveness of the national diatom-based assessment method to various anthropogenic stressors.

The pressure-response relationships were tested via:

(3) non-parametric Spearman rank correlations of the national diatom metric (MIL) with environmental parameters (TP, TN, N-NO₃⁻, N-NO₂⁻, conductivity, alkalinity, suspended matter, COD-Mn, BOD₅, water temperature, dissolved oxygen, pH) and general land-use parameters (artificial areas, intensive agriculture, extensive agriculture, semi-natural areas).

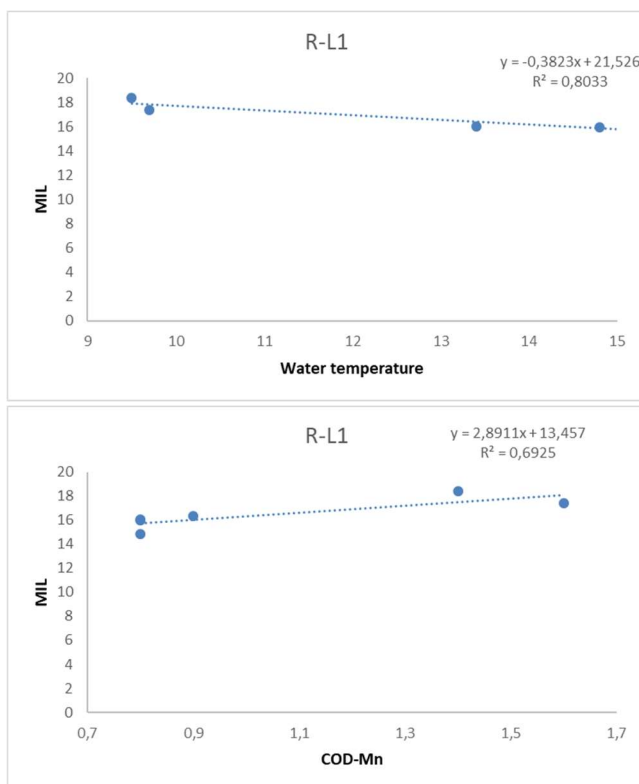
(4) linear regressions of the national diatom metric (MIL) with pressure variables.

Table 11. Summary of the Spearman correlations of the national diatom metric (MIL) with different hydro-chemical, environmental and land-use pressures. Correlations marked in red are significant at $p < 0.05$.

	MIL
TP	-0.5161 p=0.2946
TN	0.6957 p=0.1248
N-NO ₃ ⁻	0.5429 p=0.2657
N-NO ₂ ⁻	-0.4414 p=0.3809
Conductivity	-0.1429 p=0.4247
Alkalinity	0.5429 p=0.2657
Suspended matter	0.1309 p=0.8047
COD-Mn	0.8804 p=0.0206
BOD ₅	0.6000 p=0.2080

Water temperature	-0.8286 p=0.0416
DO	0.6179 p=0.1911
pH	-0.4058 p=0.4247
Artificial areas [%]	-0.3479 p=0.4993
Intensive agriculture [%]	-0.3928 p=0.4411
Extensive agriculture [%]	0.1429 p=0.7872
Semi-natural areas [%]	0.1429 p=0.7872

The results of Spearman correlation of multimetric index MIL with pressure variables are shown in *Table 11*. The coefficient showed statistically significant relationships ($p < 0.05$) between national metric and several different pressures. In general, lakes responded well to several pressures, in particular to water temperature and chemical oxygen demand (COD-M). Although no statistically significant relationships were found between MIL and some nutrient pressures (TN, N-NO₃), BOD₅ and alkalinity, they are as well shown due to relatively high R² values in linear regressions. The pressures that present the strongest relationships with the national metrics are presented in *Figures 1 and 2*.



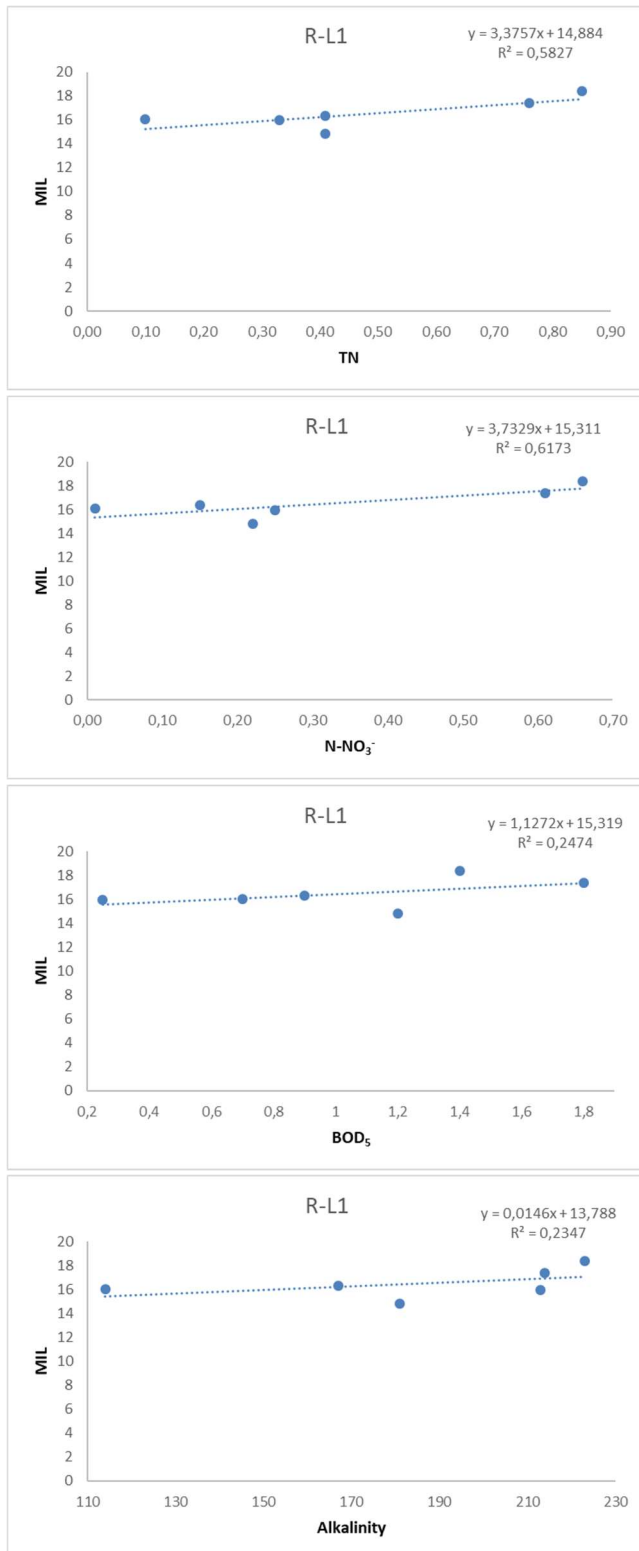


Figure 1. Pressure-response relationship between the most important pressures against the national metric (MIL).

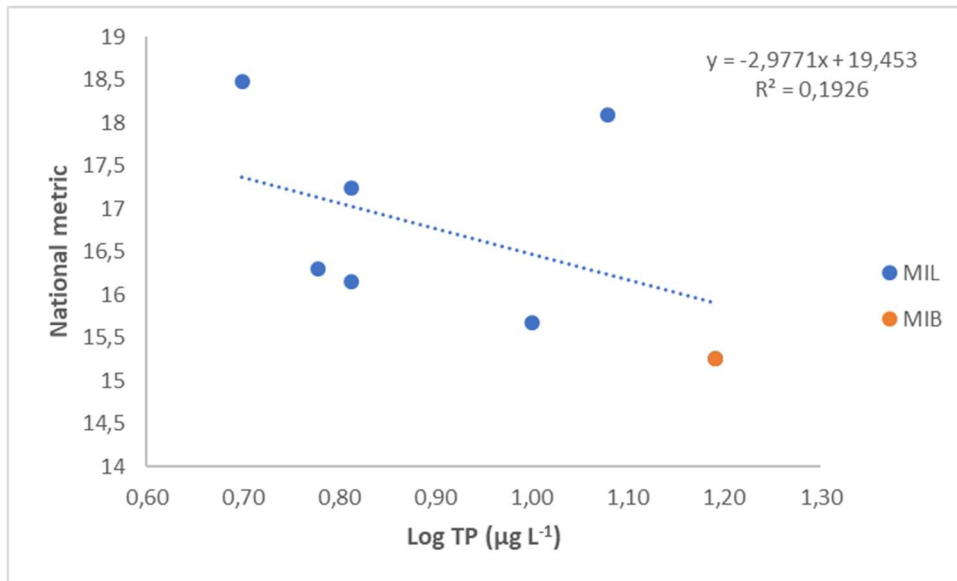
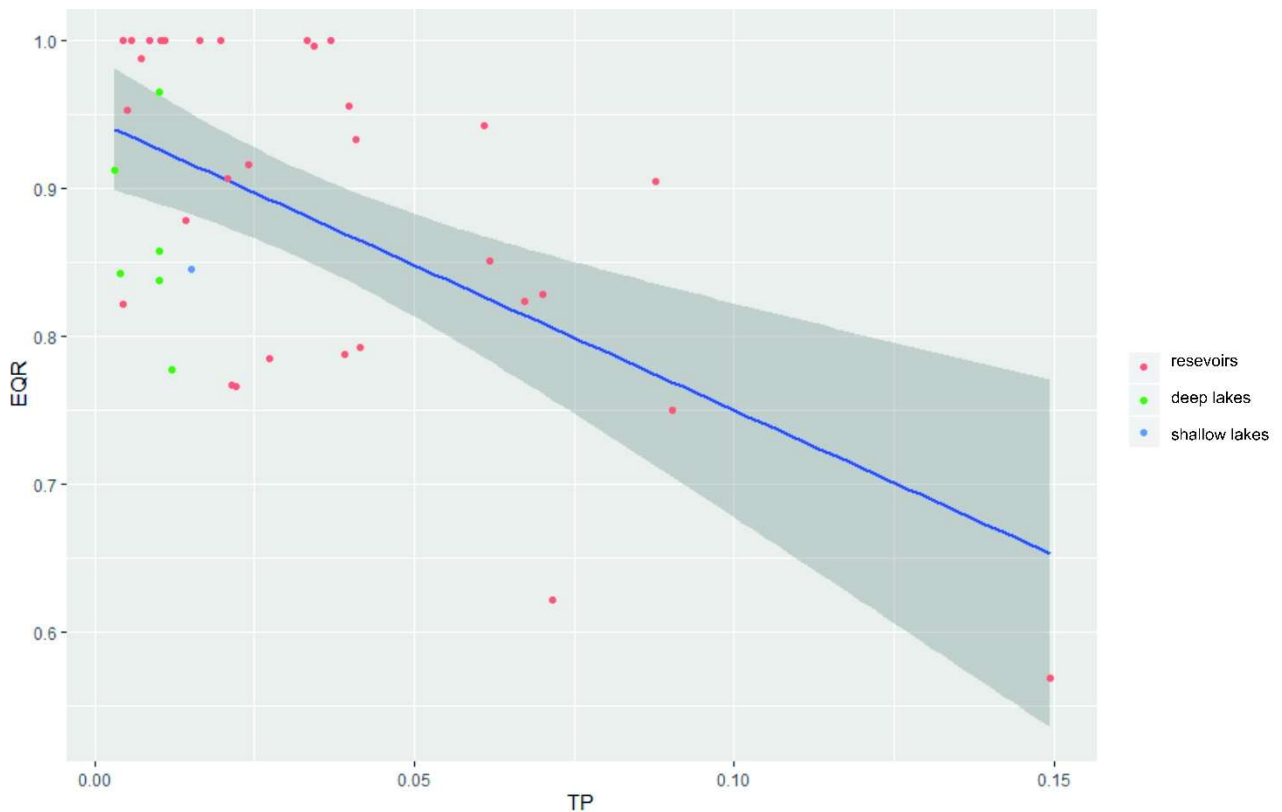


Figure 2. Pressure-response relationship between total phosphorus (Log TP) against the national metric (MIL for deep lakes; MIB for shallow lakes).

Furthermore, data from all Croatian lakes were treated together when building a linear regression. Most of the natural lakes in Croatia are in a very good or near natural states, so to give a gradient of pressure variable (total phosphorus), man-made lakes (reservoirs) from the same geographic region were used in the regression by utilizing the Toolkit Nutrient software (Várbíró et al. 2018; Figure 3).



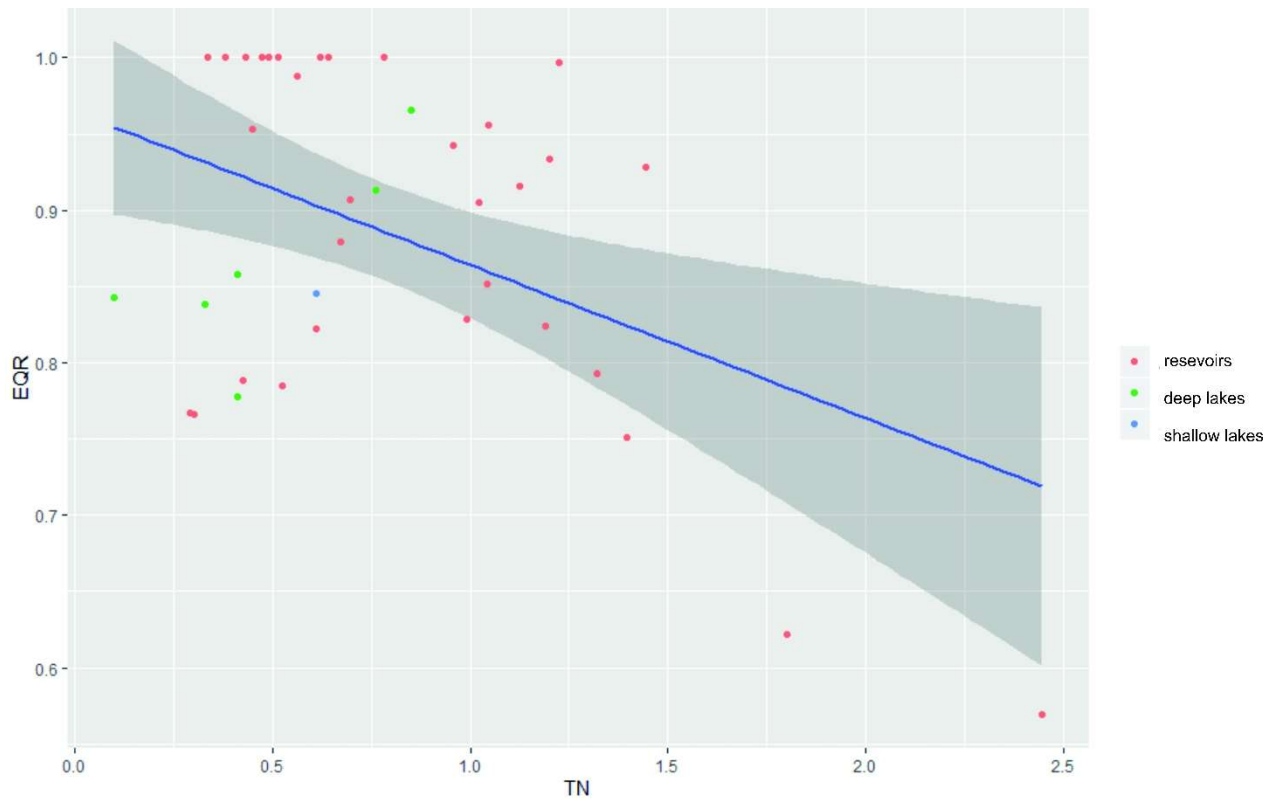


Figure 3. Pressure-response relationship between nutrients (total phosphorus and total nitrogen) against the national EQR.

Due to the small number of natural lakes in Croatia and limited availability of data for intercalibration (see *Table 7*), all Croatian lake data was incorporated into the Lake Phytobenthos cross-GIG dataset to get more representative and stronger pressure-response gradient (*Figure 4*).

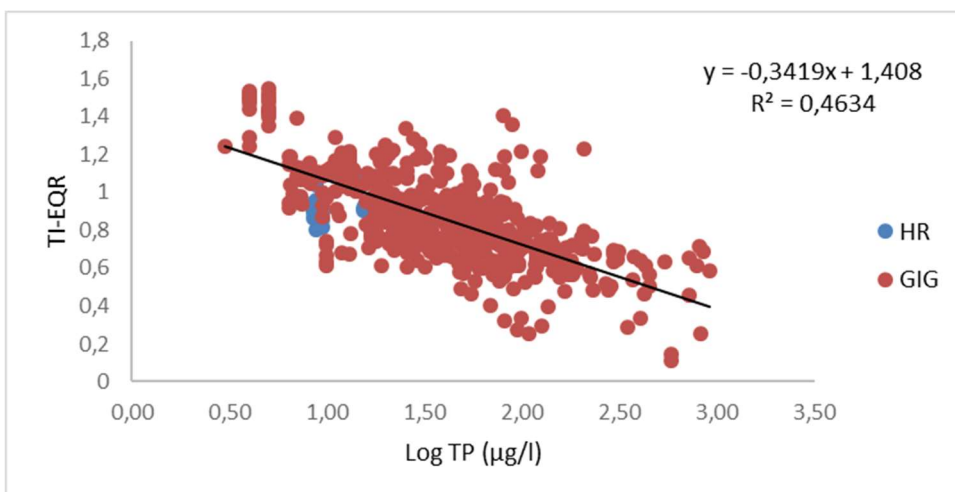


Figure 4. Pressure-response relationship between total phosphorus against the ICM (TI-EQR).

3. WFD compliance checking

The data acceptance criteria defined in the Lake Phytobenthos cross-GIG JRC Technical Report (Kelly et al. 2014) are listed in Table 12. The Croatian data fulfilled the listed criteria in all aspects except for the number of water quality classes represented in the dataset (last criterion). This criterion, however, is not so strictly relevant for the fit-in procedure. The dataset can be therefore considered sufficient for intercalibration.

Table 12. List of the WFD compliance criteria and the WFD compliance checking process and results

Compliance criteria	Compliance checking
Ecological status is classified by one of five classes (high, good, moderate, poor and bad).	Yes
High, good and moderate ecological status are set in line with the WFD's normative definitions (Boundary setting procedure)	Yes. Equidistant division of the EQR gradient. High-good boundary derived from metric variability at near-natural benchmark sites.
All relevant parameters indicative of the biological quality element are covered (see Table 1 in the IC Guidance). A combination rule to combine parameter assessment into BQE assessment has to be defined. If parameters are missing, Member States need to demonstrate that the method is sufficiently indicative of the status of the QE as a whole	Yes; both taxonomic composition and species relative abundance are taken into consideration. Diatom multimetric indices (MIL and MIB) - product of diatom indices which include relative abundance x sensitivity x tolerance/indicator value
Assessment is adapted to intercalibration common types that are defined in line with the typological requirements of the Annex II WFD and approved by WG ECOSTAT	Yes; common lake intercalibration type is used: high alkalinity (HA), L-M1
The water body is assessed against type-specific near-natural reference conditions	Yes
Assessment results are expressed as EQRs	Yes
Sampling procedure allows for representative information about water body quality/ecological status in space and time	Yes; 1 sampling per year during favourable and stable water level. Using brush/scrapper for sampling. Single habitat(s) preferably epilithic phytobenthos – mesolitoral (5 stones/cobbles from different points of streamline) or submerged parts of emerged macrophytes (e.g. <i>Phragmites australis</i> , <i>Scirpus lacustris</i> , <i>Cladium mariscus</i>) where there are no stones.
All data relevant for assessing the biological parameters specified in the WFD's normative definitions are covered by the sampling procedure	Yes.
Selected taxonomic level achieves adequate confidence and precision in classification	Yes; identification in species level or lower.

4. IC Feasibility checking

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

4.1. Typology

The intercalibration typological system of Lake Phytobenthos cross-GIG group was found to be the most appropriate for describing Croatian lakes, where common type: high alkalinity (HA), region: MED-GIG L-M1 is applicable for Croatia (Tables 1, 2).

4.2. Pressures addressed

Diatom assemblages as summarized by the national metrics (MIL and MIB) respond to several pressures, especially temperature, oxygen related pressures and nitrogen compounds.

4.3. Assessment concept

The national diatom-based assessment system consists of two multimetric indices – MIL (for deep lakes and MIB (for shallow lakes), which are based on diatom indices IBD, EPI-D and TDIL₁₋₂₀. These indices take into consideration tolerance and sensitivity of diatom species present in the assemblage and their relative abundances. The indices responded to several pressures addressed (see above Section "2.4. Pressures addressed").

4.4. Conclusion on the Intercalibration feasibility

The LM typology was chosen. The multimetric indices MIL (for deep lakes) and MIB (for shallow lakes) consist of diatom indices IBD, EPI-D and TDIL₁₋₂₀, which take into consideration tolerance and sensitivity of diatom species present in the assemblage and their relative abundances. The proposed indices have already been intercalibrated (Kelly et al. 2014). It is concluded that the fitting of MIL and MIB indices to the results of the Croatian MED-GIG lakes intercalibration was feasible.

5. Demonstrating the compliance with the completed intercalibration exercise

Following Figure 1 in the CIS Guidance No. 30 (Willby et al. 2014), case A1 (Option 2) is applied for fitting the HR assessment method using phytobenthos to the results of the Lake Phytobenthos cross-GIG.

The requirements for case A1 are:

- *Full details of the common metric*
 - The IC common metric applied in the Lake Phytobenthos cross-GIG is composed of one diatom metric (according to Kelly et al. 2014):
 - The Trophic index (TI) (Rott et al. 1999): a trophic index based on a weighted average equation: all taxa are given a sensitivity score, depending on the optimum nutrient concentration under which they are found in nature. The TI is the average of the sensitivities of all taxa present, “weighted” by their relative abundance (so a common nutrient-sensitive taxon will have more influence on the final index value than a nutrient-tolerant taxon that is only sparsely represented in the sample)

ICM = TI-EQR

- *A suitable site x biology dataset covering a range of environmental quality from which the national EQR and common metric can be calculated*
A total of 21 biological samples were available (see Section "2.3. National boundary setting")
- *Accompanying pressure data in the same format as that used in the completed exercise.*
All accompanying pressure data are available (see Table 9).
- *Information on the specific thresholds already used in the completed exercise to define reference or alternative benchmark sites*
The benchmark criteria of abiotic parameters (land-use and hydrochemical criteria) were adopted and adapted from the the Mediterranean lakes GIG (de Hoyos et al. 2014) and the Eastern Continental lakes GIG (Borics et al. 2018) (see Section "2.4. National reference conditions").
- *Details of exactly how benchmarking was undertaken in the complete exercise. If the completed exercise concluded that benchmarking was not necessary the mean value of the benchmark sites from each country must be provided so that the joining Member State can also judge the need to benchmark its own method.*
Given benchmark criteria were applied by each MS in order to identify benchmark sites within each national dataset. The 25th percentile of MIL (for deep lakes) and MIB (for shallow lakes) of the national benchmark dataset were used for setting the H/G boundary and translation to the national EQR H/G boundary. Likewise, the 25th percentile of TI (Rott et al. 1999) of the benchmark sites was set as a reference value for the calculation of national TI-EQR. Linear regression was established between values of the national method (EQR) and the ICM (TI-EQR) so that the national boundaries could be translated to ICM using the equation.
- *Values of the global mean view of the HG and GM boundaries on the common metric scale for Member States who participated in the completed exercise.*
The average boundaries, as TI-EQR, are 0.965 (high/good) and 0.790 (good/moderate).

The process of fitting the HR method to the completed IC exercise:

According to the Willby et al. (2014), the following steps should be followed:

- i. *Calculate the common metric (CM) on the national dataset.*

The ICM applied in the cross-GIG is composed of one diatom metric (according to Kelly et al. 2014):

- TI (Rott et al. 1999): a trophic index based on a weighted average equation: all taxa are given a sensitivity score, depending on the optimum nutrient concentration under which they are found in nature. The TI is the average of the sensitivities of all taxa present, "weighted" by their relative abundance:
TI-EQR = (4-observed value) / (4-reference value)

ICM = TI-EQR

- ii. Use the associated pressure data to identify sites in the national dataset that meet the criteria established by the GIG for the selection of benchmark or reference sites.

Benchmark sites have been identified based on environmental pressures above (see Section "2.3 National boundary setting")

- iii. Standardize the common metric (CM_{bm}) against the benchmark according to the approach used in the completed exercise.

The common metric was calculated for the benchmark sites in the national dataset. For the IC lake type L-M1 the median was $ICM_{LM1}=0.92$. These values were inside the range of the median values of the MS who took part in the intercalibration exercise.

- iv. Use OLS regression to establish the relationship between CM_{bm} (y) and the EQR of the joining method (x).

Since Croatian deep and shallow lakes belong to the same IC type (L-M1), they were treated together. Therefore, for the translation of reference and boundary positions of the national method onto the ICM scale the presented linear regression equation was used. Relationship between national EQR and ICM (TI-EQR) for the Croatian shallow and deep lakes in the HA L-M1 lake type is shown in Table 13 and Figure 5.

Table 13. OLS equations for the relationship between ICM and national EQR.

IC Lake type	No of samples	No of sites	Linear regression	R ²
L-M1	21	7	TI-EQR = 0,9222 x EQR + 0,1735	R ² = 0,3588

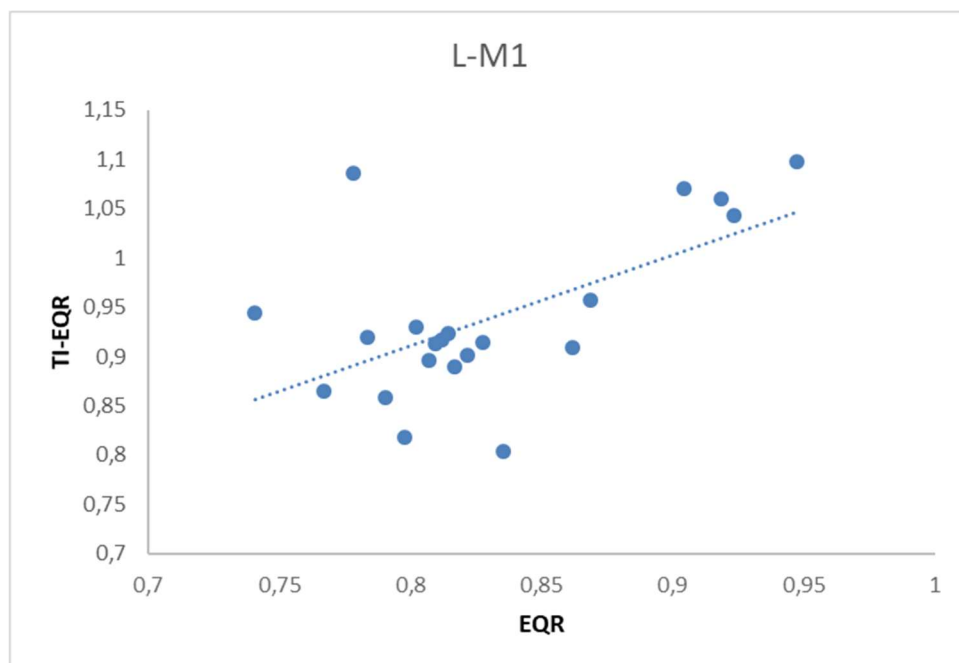


Figure 5. OLS regressions to establish the relationship between ICM (TI-EQR) and the national EQR for Croatian lake type L-M1.

As was the case with pressure-response, in checking the relationship between the national metric and the ICM (TI-EQR), the similar procedure of incorporating the Croatian results into the cross-GIG group dataset was also done (Figure 6).

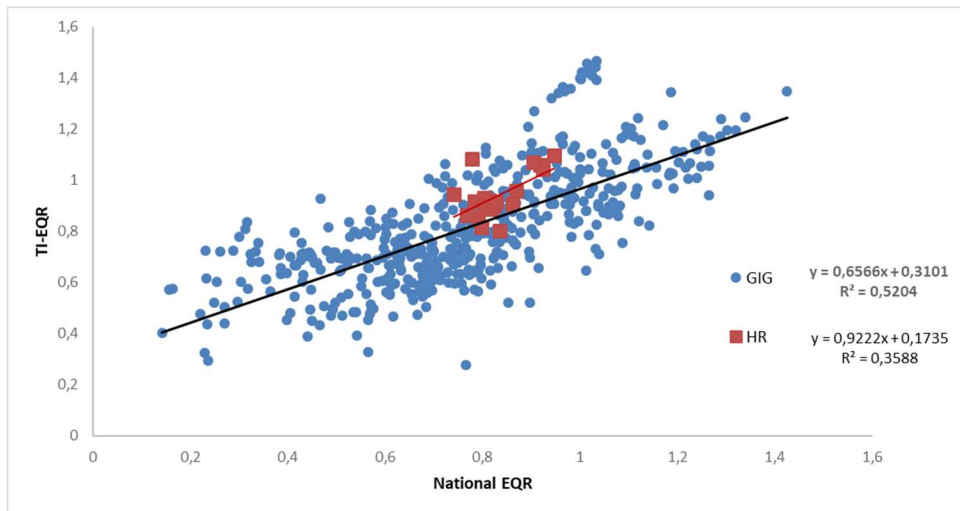


Figure 6. OLS regressions of the relationship between ICM (TI-EQR) and the national EQR together with the cross-GIG dataset.

- v. Predict the position of the national class boundaries (MP, GM, HG and reference) on the CM_{bm} scale.

The prediction of the class boundaries on the CM scale was made using the OLS equations of the relationship between the national and the common metric (Table 14).

Table 14. Translation of the reference and boundary positions of the national method on the basis of OLS regression (see Figure 5, Table 13) into ICM.

IC Type	L-M1	
	EQR	Predicted boundaries on ICM scale
Reference	1.00	1.096
High / good	0.80	0.911
Good / moderate	0.60	0.727
Moderate / poor	0.40	0.542
Poor / bad	0.20	0.358

Table 15. Typological codes used in the boundary bias analysis.

Code	Member State
BE	BELGIUM
DE	GERMANY
IE	IRELAND

SE	SWEDEN
UK	UNITED KINGDOM
SI	SLOVENIA
HR	CROATIA

Table 16. Relationship between national metric and common metric (TI_EQR) for HA lakes.

	BE	DE	IE	SE	UK	SI	HR
Intercept (c)	0.152	0.529	0.303	-0.187	0.320	0.320	0.173
Slope (m)	1.017	0.504	0.748	1.252	0.717	0.858	0.922
Pearson's r	0.877	0.774	0.887	0.634	0.936	0.940	0.599
R²	0.769	0.598	0.786	0.403	0.876	0.884	0.359

The explanation of the typological codes used is given in *Table 15*. Boundaries were compared using IC option 2 with a boundary translation to common metric (TI-EQR). The relationship between national metric and common metric (TI-EQR) for HA lakes is given in *Table 16*.

The outcomes of the regression complied with the following characteristics according to the IC Guidance (Kelly et al. 2014):

- All relationships were highly significant $p \leq 0.001$;
- Assumptions of normally distributed error and variance (homoscedasticity) of model residuals were met;
- Common metric represented all methods ($r > 0.5$);
- Observed minimum $r^2 >$ half of the observed maximum r^2 – this criterion is not fulfilled as $\min r^2 0.36 < \max r^2 0.88/2$, but maximum r^2 may be artificially high as some MS use the intercalibration metric (TI) as their national metric;
- Slopes of the regression lie between 0.5 and 1.5.

The comparison of H/G and G/M original boundary values for the HA Croatian lakes of the L-M1 type with other HA lakes of the cross-GIG intercalibration is presented in *Figures 7 and 8*.

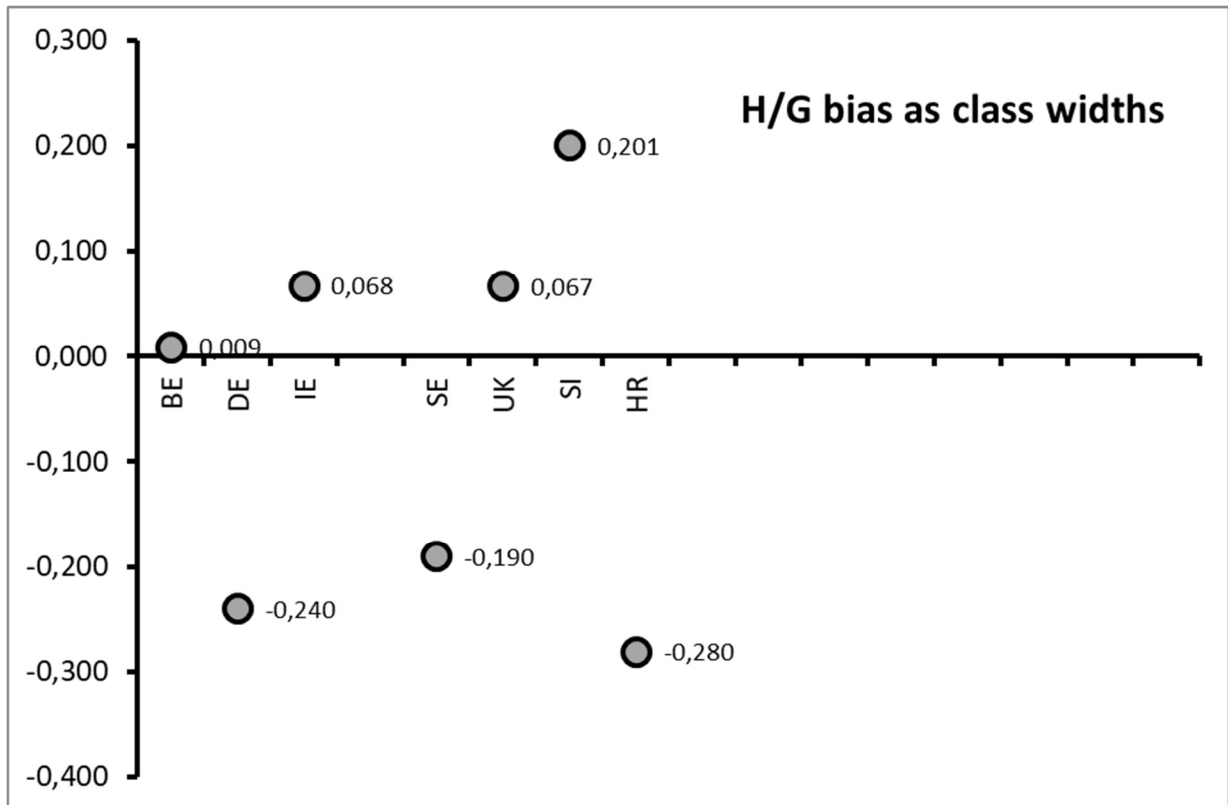


Figure 7. Comparison of H/G original boundaries for the HA lakes.

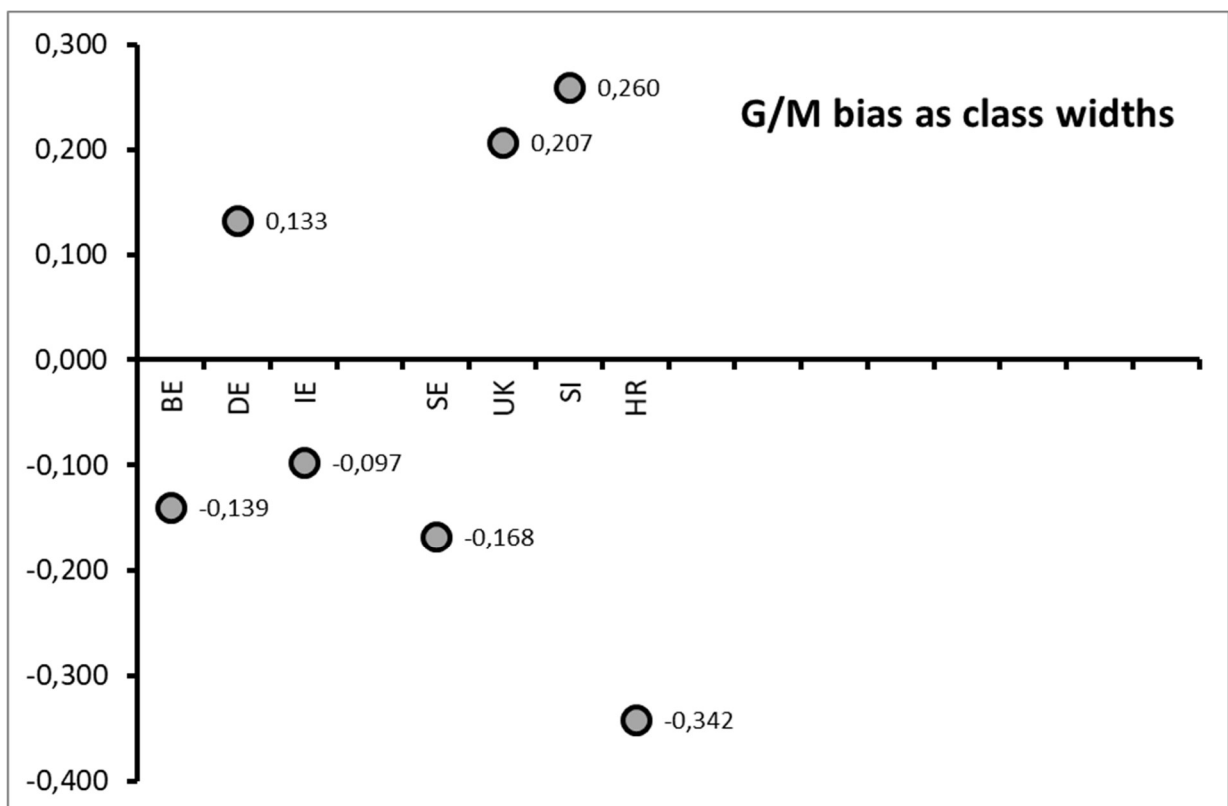


Figure 8. Comparison of G/M original boundaries for the HA lakes.

vi. Apply the comparability criteria as summarized in Chapter 6.

The adjustment of the boundaries follows the fit according to the guidance of chapter 6 (Willby et al. 2014). The main principle is that H/G or G/M statistic must not be $>|0.25|$. Both H/G and G/M boundary biases in HR L-M1 lake types were $>|0.25|$ (Table 17 in red) and thus adjustment in these boundaries was required by adding a value to the respective H/G and G/M boundaries until they reached the appropriate limit. The final boundaries adopted after the harmonization are presented in Tables 18 and 19. The comparison of H/G and G/M adjusted boundary values for the HA Croatian lakes of the L-M1 type with other HA lakes of the cross-GIG intercalibration is presented in Figures 9 and 10.

Table 17. High/Good and Good/Moderate class boundary derived from the OLS regression for HA lake types of the cross-GIG group and Croatian HA lakes of the L-M1 type. Red color represents statistic bias $>|0.25|$.

	BE	DE	IE	SE	UK	SI	HR
Max	1.000	1.000	1.170	1.000	1.283	1.050	1.000
H/G	0.800	0.800	0.900	0.890	0.920	0.800	0.800
G/M	0.600	0.550	0.630	0.740	0.700	0.600	0.600
M/P	0.400	0.330	0.420	0.500	0.460	0.400	0.400
P/B	0.200	0.100	0.210	0.250	0.230	0.200	0.200
CM_Max +Offset	1.168	1.034	1.179	1.065	1.241	1.220	1.096
CM_H/G +Offset	0.965	0.933	0.977	0.927	0.980	1.006	0.911
CM_G/M +Offset	0.762	0.807	0.775	0.739	0.823	0.834	0.727
CM_M/P +Offset	0.558	0.696	0.617	0.439	0.650	0.663	0.542
CM_P/B +Offset	0.355	0.580	0.460	0.126	0.485	0.491	0.358
H width to Max	0.203	0.101	0.202	0.138	0.261	0.214	0.184
G width	0.203	0.126	0.202	0.188	0.158	0.172	0.184
M width	0.203	0.111	0.157	0.300	0.172	0.172	0.184
H/G bias	0.002	-0.030	0.014	-0.036	0.017	0.043	-0.052
G/M bias	-0.028	0.017	-0.015	-0.050	0.033	0.045	-0.063
H/G bias_CW	0.009	-0.240	0.068	-0.190	0.067	0.201	-0.280
G/M bias_CW	-0.139	0.133	-0.097	-0.168	0.207	0.260	-0.342

Table 18. Harmonized High/Good and Good/Moderate class boundary derived from the OLS regression for HA lake types of the cross-GIG group and Croatian HA lakes of the L-M1 type. Green color represents statistic bias of HR boundaries after the harmonization.

	BE	DE	IE	SE	UK	SI	HR
Max	1.000	1.000	1.170	1.000	1.283	1.050	1.000
H/G	0.800	0.800	0.900	0.890	0.920	0.800	0.810
G/M	0.600	0.550	0.630	0.740	0.700	0.600	0.620
M/P	0.400	0.330	0.420	0.500	0.460	0.400	0.400
P/B	0.200	0.100	0.210	0.250	0.230	0.200	0.200
CM_Max +Offset	1.168	1.034	1.179	1.065	1.241	1.220	1.096

CM_H/G +Offset	0.965	0.933	0.977	0.927	0.980	1.006	0.920
CM_G/M +Offset	0.762	0.807	0.775	0.739	0.823	0.834	0.745
CM_M/P +Offset	0.558	0.696	0.617	0.439	0.650	0.663	0.542
CM_P/B +Offset	0.355	0.580	0.460	0.126	0.485	0.491	0.358
H width to Max	0.203	0.101	0.202	0.138	0.261	0.214	0.175
G width	0.203	0.126	0.202	0.188	0.158	0.172	0.175
M width	0.203	0.111	0.157	0.300	0.172	0.172	0.203
H/G bias	0.002	-0.030	0.014	-0.036	0.017	0.043	-0.042
G/M bias	-0.028	0.017	-0.015	-0.050	0.033	0.045	-0.045
H/G bias_CW	0.009	-0.240	0.068	-0.190	0.067	0.201	-0.242
G/M bias_CW	-0.139	0.133	-0.097	-0.168	0.207	0.260	-0.220

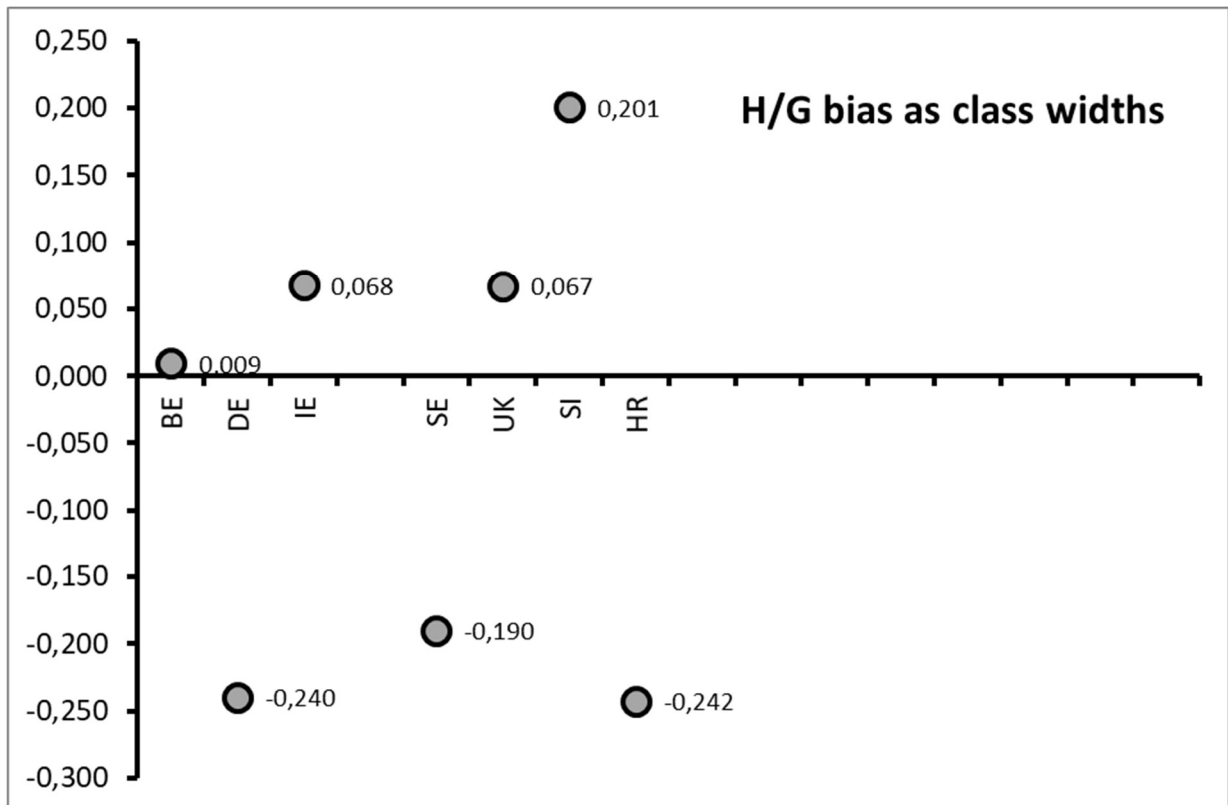


Figure 9. Comparison of H/G harmonized boundaries for the for the HA lakes.

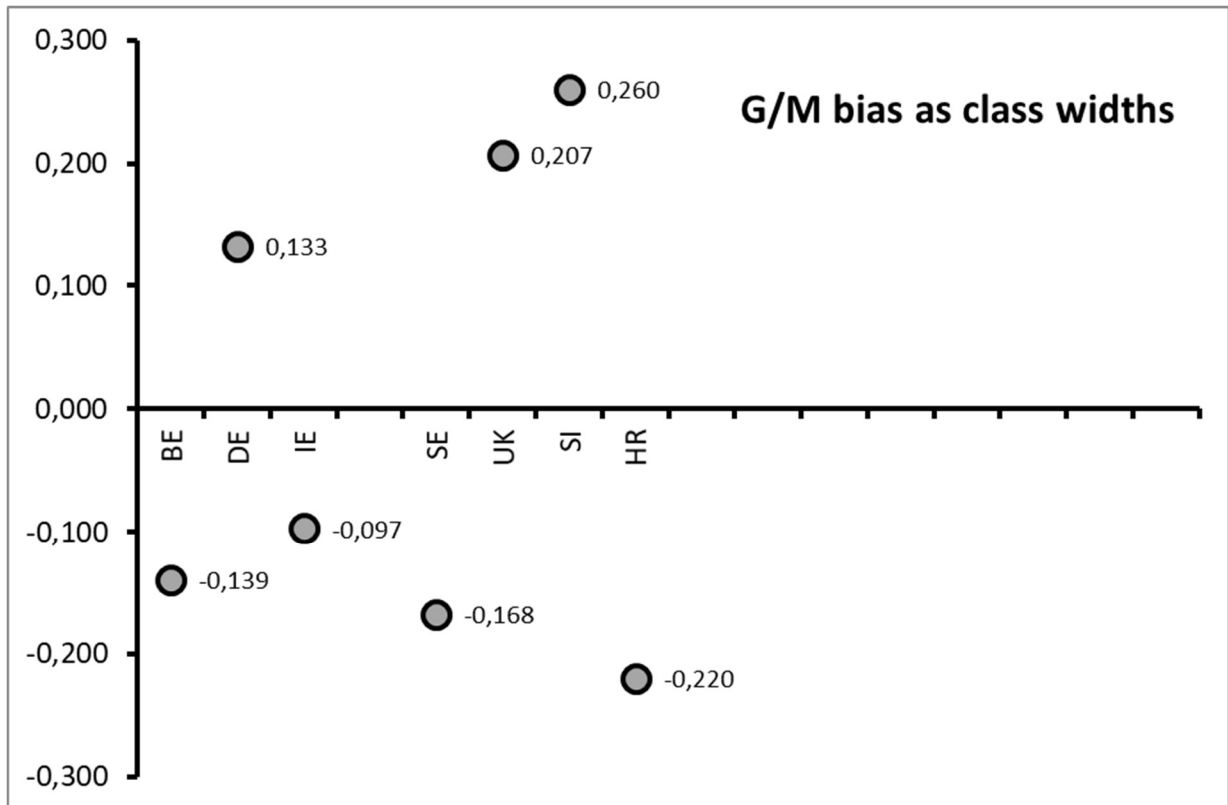


Figure 10. Comparison of G/M harmonized boundaries for the for the HA lakes.

Table 19. Final class boundaries adopted for the national metric and the ICM.

	Boundary	ICM Original	ICM Harmonized	National Original	National Harmonized
HR L-M1	Reference	1.096	1.096	1.00	1.00
	H/G	0.911	0.920	0.80	0.81
	G/M	0.727	0.745	0.60	0.62

Conclusion

This report documents the fitting procedure of the Croatian phytobenthos-based assessment method for the HA lakes of the L-M1 type to the results of the completed cross-GIG lakes phytobenthos intercalibration.

We documented IC feasibility and compliance of the presented assessment method and reported sufficient pressure-response relationships. Following the criteria and steps defined in the fit-in-procedure of Willby et al. (2014), both the high-good boundary and the good-moderate boundary in the lake types L-M1 required adjustments. After adjustment of the aforementioned boundaries, the national assessment method is considered comparable with the already intercalibrated methods and meets the comparability criteria. It is recommended to submit the method to the ECOSTAT group for official approval.

6. Description of of the biological communities

Diatom communities dissimilarity in different ecological status conditions was evaluated similarly to the rivers EC-GIG and rivers MED-GIG intercalibration exercise. The SIMPER analysis (log transformation of abundance data, Bray-Curtis similarity; up to 90% of contribution to av. similarity, Primer v7; Clarke & Gorley 2015) was used to determine the diatom species contributing the most (up to 90% of cumulative contribution) to the average dissimilarity between the sites classified as high and good and to the average similarity of the different status classes.

Three species are contributing the most in the observed similarity, while the rest significantly contributing species presented a low contribution (Table 20). Group similarities were relatively low, indicating a high within ecological status level variability. *Achnantheidium minutissimum* (Kützing) Czarnecki, *Encyonopsis microcephala* (Grunow) Krammer and *Fragilaria delicatissima* (W.Smith) Lange-Bertalot were mainly responsible for the within group similarity for high and good ecological status, and to some extent *Gomphonema lateripunctatum* E.Reichardt & Lange-Bertalot. Dissimilarity between different ecological groups is also presented (Table 21). The two groups differed by the contribution of *Denticula tenuis* Kützing, *Cymbella subhelvetica* Krammer and *Delicata delicatula* (Kützing) Krammer to high status group, and *Navicula cryptotenelloides* Lange-Bertalot, *Brachysira* sp. Kützing and *Achnantheidium exile* (Kützing) Heiberg contributing to good status group. The contribution of *A. minutissimum* as a strong indicator of high status, though also contributing at good and moderate status, for HA lakes has been reported in the cross-GIG intercalibration (Kelly et al. 2014).

Table 20. Species contribution to similarity within and dissimilarity between ecological status levels. The most contributing species (up to 90% contribution) are presented.

Group High Status			
Average similarity: 38.35			
Species	Average Abundance	Contribution %	Cumulative contribution %
<i>Encyonopsis microcephala</i>	3.96	15.20	15.20
<i>Achnantheidium minutissimum</i>	3.98	15.08	30.28
<i>Fragilaria delicatissima</i>	3.23	11.21	41.49
<i>Cymbella vulgata</i>	1.78	5.65	47.14
<i>Gomphonema lateripunctatum</i>	1.91	5.42	52.56
<i>Navicula cryptotenella</i>	1.33	3.88	56.43
<i>Nitzschia</i> sp.	1.27	3.62	60.05
<i>Navicula subalpina</i>	1.20	2.95	63.00
<i>Denticula tenuis</i>	1.40	2.13	65.13
<i>Cymbella subhelvetica</i>	1.21	1.97	67.10
<i>Cymbella lange-bertalotii</i>	1.08	1.87	68.96
<i>Delicata delicatula</i>	1.41	1.84	70.80
<i>Encyonopsis krammeri</i>	1.46	1.79	72.59
<i>Amphora pediculus</i>	1.04	1.73	74.32
<i>Navicula cryptotenelloides</i>	1.22	1.67	75.99
<i>Encyonopsis cesatii</i>	0.87	1.62	77.60
<i>Cyclotella pseudostelligera</i>	1.09	1.46	79.06
<i>Brachysira neglectissima</i>	1.20	1.32	80.38
<i>Cocconeis placentula</i> var. <i>placentula</i>	0.60	1.28	81.66
<i>Achnantheidium caledonicum</i>	1.06	1.19	82.86
<i>Encyonema ventricosum</i>	0.69	1.08	83.93
<i>Cyclotella plitvicensis</i>	0.85	1.07	85.00
<i>Gomphonema</i> sp.	0.81	0.92	85.92

<i>Adlafia bryophila</i>	0.65	0.74	86.66
<i>Cyclotella distinguenda</i>	0.65	0.72	87.39
<i>Navicula dealpina</i>	0.35	0.72	88.11
<i>Fragilaria pinnata</i>	0.71	0.71	88.82
<i>Fragilaria vaucheriae</i>	0.58	0.64	89.46
<i>Cymbella cymbiformis</i>	0.52	0.64	90.09

Group Good Status			
Average similarity: 41.66			
Species	Average Abundance	Contribution %	Cumulative contribution %
<i>Achnantheidium minutissimum</i>	4.20	16.99	16.99
<i>Fragilaria delicatissima</i>	4.26	16.95	33.95
<i>Encyonopsis microcephala</i>	3.90	15.43	49.38
<i>Cyclotella distinguenda</i>	1.72	4.76	54.14
<i>Gomphonema lateripunctatum</i>	1.63	4.44	58.58
<i>Navicula cryptotenelloides</i>	1.76	4.06	62.64
<i>Cyclotella pseudostelligera</i>	1.70	3.73	66.37
<i>Brachysira</i> sp.	1.92	3.70	70.07
<i>Nitzschia</i> sp.	1.26	2.85	72.91
<i>Cymbella vulgata</i>	1.19	2.78	75.70
<i>Navicula subalpina</i>	1.18	2.73	78.43
<i>Cymbella lange-bertalotii</i>	0.97	2.39	80.82
<i>Navicula cryptotenella</i>	1.42	1.97	82.79
<i>Gomphonema</i> sp.	0.90	1.63	84.42
<i>Fragilaria vaucheriae</i>	1.03	1.25	85.67
<i>Achnantheidium exile</i>	1.16	0.77	86.44
<i>Amphora pediculus</i>	0.88	0.68	87.12
<i>Cymbella affiniformis</i>	0.79	0.68	87.8
<i>Nitzschia recta</i>	0.55	0.65	88.44
<i>Fragilaria tenera</i>	0.86	0.64	89.08
<i>Achnanthes</i> sp.	0.70	0.63	89.71
<i>Encyonopsis cesatii</i>	0.67	0.62	90.33

Table 21. Species contribution to dissimilarity between ecological status levels. The 23 most contributing species are presented.

Groups High & Good Status				
Average dissimilarity = 61.82				
Species	Group Good Average Abundance	Group High Average Abundance	Contribution %	Cumulative contribution %
<i>Navicula cryptotenelloides</i>	1.76	1.22	2.34	2.34
<i>Brachysira</i> sp.	1.92	0.59	2.33	4.68
<i>Cyclotella pseudostelligera</i>	1.70	1.09	2.32	7.00
<i>Cyclotella distinguenda</i>	1.72	0.65	2.17	9.17
<i>Encyonopsis krammeri</i>	0.5	1.46	2.10	11.27
<i>Delicata delicatula</i>	0	1.41	1.93	13.20
<i>Denticula tenuis</i>	0	1.40	1.90	15.10
<i>Achnantheidium caledonicum</i>	0.62	1.06	1.90	17.00
<i>Fragilaria delicatissima</i>	4.26	3.23	1.86	18.86
<i>Navicula cryptotenella</i>	1.42	1.33	1.79	20.65
<i>Gomphonema lateripunctatum</i>	1.63	1.91	1.77	22.42
<i>Brachysira neglectissima</i>	0.20	1.2	1.75	24.17
<i>Achnantheidium exile</i>	1.16	0	1.72	25.89
<i>Cymbella subhelvetica</i>	0.16	1.21	1.65	27.54

<i>Amphora pediculus</i>	0.88	1.04	1.63	29.17
<i>Cyclotella pseudocomensis</i>	0.66	0.73	1.61	30.77
<i>Gomphonema calcareum</i>	0.66	0.78	1.55	32.33
<i>Fragilaria pinnata</i>	0.84	0.71	1.54	33.86
<i>Encyonopsis subminuta</i>	1.05	0.38	1.51	35.37
<i>Cyclotella ocellata</i>	1.02	0.36	1.48	36.85
<i>Fragilaria tenera</i>	0.86	0.62	1.48	38.33
<i>Gomphonema sp.</i>	0.90	0.81	1.45	39.79
<i>Cymbella vulgata</i>	1.19	1.78	1.45	41.24

7. References

- Borics, G., G. Wolfram, G. Chiriac, D. Belkinova, K. Donabaum, 2018. Intercalibration of the national classifications of ecological status for Eastern Continental lakes: Biological Quality Element: Phytoplankton. Publications Office of the European Union, Joint Research Centre of the European Commission, Ispra, Italy, <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/111111111/54469>.
- de Hoyos, C., J. Catalan, G. Dörflinger, J. Ferreira, D. Kemitzoglou, C. Laplace-Treytoure, J. Pahissa Lopez, A. Marchetto, O. Mihail, G. Morabito, P. Polykarpou, F. Romão, V. Tsiaoussi, 2014. Water Framework Directive Intercalibration Technical Report: Mediterranean Lake Phytoplankton ecological assessment methods. Joint Research Centre of the European Commission, Ispra, Italy, <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/water-framework-directive-intercalibration-technical-report-mediterranean-lake-phytoplankton>.
- Clarke, K. R., R. N. Gorley, 2015. PRIMER v7: User Manual/Tutorial. PRIMER-E Plymouth.
- European Committee for Standardization, 2014a. EN 13946: 2014. Water quality – Guidance standard for the routine sampling and preparation of benthic diatoms from rivers and lakes.
- European Committee for Standardization, 2014b. EN 14407: 2014. Water quality – Guidance standard for the identification and enumeration of benthic diatom samples from rivers and lakes.
- Illies, J., 1978. Limnofauna Europaea. A checklist of the animals inhabiting European Inland Waters, with an account of their distribution and ecology. 2nd Edition. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 552 pp.
- Kelly, M., E. Acs, V. Bertrin, H. Bennion, G. Borics, A. Burgess, L. Denys, F. Ecke, M. Kahlert, S. M. Karjalainen, B. Kennedy, A. Marchetto, S. Morin, J. Picinska-Fałtynowicz, G. Phillips, I. Schönfelder, J. Schönfelder, G. Urbanič, H. van Dam, T. Zalewski, 2014. Water Framework Directive intercalibration technical report: lake phyto-benthos ecological assessment methods. European Commission Joint Research Centre Institute for Environment and Sustainability, Ispra, Italy: 140, <https://op.europa.eu:443/en/publication-detail/-/publication/9e8ec290-95d8-4a1d-8f2b-87aa1d8ac5a1/language-en>.
- Lecointe C., M. Coste, J. Prygiel, 2003. Omnidia 3.2 Diatom Index Software including diatom database with taxonomic names, reference and codes of 11643 diatom taxa.
- Lecointe C., M. Coste, J. Prygiel, 2008. OMNIDIA version 5.2 software for diatom-based water quality assessment. CDROM.

Official Gazette, 2019. Regulation on Water Quality Standard, Official Gazette of the Republic of Croatia No. 96/19.

Rott, E., P. Pfister, H. van Dam, E. Pipp, K. Pall, N. Binder, K. Ortler, 1999. Indikationslisten für Aufwuchsalgen. Teil 2: Trophieindikation sowie geochemische Präferenz, taxonomische und toxikologische Anmerkungen. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Wien, 248 pp.

Stenger-Kovács Cs., K. Buczkó, É. Hajnal, J. Padisák, 2007. Epiphytic, littoral diatoms as bioindicators of shallow lake trophic status: Trophic Diatom Index for Lakes (TDIL) developed in Hungary. *Hydrobiologia* 589:141-154.

Várbíró, G., H. Teixeira, M. Kelly, G. Phillips, 2018. A Shiny application of a statistical toolkit to assist with the development of nutrient concentrations that would support good ecological status for the Water Framework Directive. http://phytoplanktonfg.okologia.mta.hu:3838/Tkit_nutrient/

Willby, N., S. Birk, S. Poikane, W. van de Bund, 2014. Water Framework Directive Intercalibration Manual – Procedure to fit new or updated classification methods to the results of a completed intercalibration. JRC Technical Report, Luxembourg, Ispra, 33 pp.

Zelinka, M., P. Marwan, 1961. Zur Präzisierung der biologischen klassifikation der Reinheit fließender Gewässer. *Archiv für Hydrobiologie* 57: 389-407.

Prilog 3

Report on Croatian lake macroinvertebrates classification method in the case where the Intercalibration exercise is not possible (Gap 3)

Working Group:

Zlatko Mihaljević, Ivana Pozojević

Division of Zoology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

Status of the document: Draft version 1.0

Hrvatske vode

Zagreb, 28 February 2020

Report on macroinvertebrates classification methods for natural lakes in Croatia in the case where the Intercalibration exercise is not possible (Gap 3)

1. INTRODUCTION

- **Member State:** Croatia;
- **BQE:** Macroinvertebrates;
- **Waterbody category (type):** Lakes.

Benthic invertebrates have been recognized as one of the most difficult biological quality element to use in ecological assessment in lakes because of their heterogeneity in community composition, but also in very different sampling approaches used in different member states (Poikane et al., 2016). Some member states take samples in the littoral zone, while others are taking samples of profundal benthic communities. Assessment metrics based on profundal invertebrate communities usually assess eutrophication and organic enrichment, while littoral macroinvertebrates better assess lake hydromorphological alterations. The present report discusses the progress for the development of a national method for the assessment of the ecological status of Croatian natural lakes, based on the biological quality element benthic macroinvertebrates of the littoral zone.

The macroinvertebrate classification method can be considered as both type-specific and lake-specific, as almost all but two natural lakes in Croatia are considered as different types (Official Gazette 96/19): HR-L_1A (one lake), HR-L_1B (one lake), HR-L_2 (one lake), HR-L_3 (two lakes), HR-L_4 (one lake) and HR-L_5 (one lake). Reference values for each lake type were modeled based on both their natural abiotic and morphometric data and pressures (which were either minimized or set to zero).

Data from all lake types were treated together when building a stepwise multimetric linear model for hindcasting reference conditions. Most of the natural lakes in Croatia are in very good or near natural states, so in order to give a gradient of pressure variables to the model, man-made lakes (reservoirs) from the same geographic region were used in building the model.

The final assessment tool is a multimetric index.

The goal of this report is to declare that the macroinvertebrate classification methods for natural lakes in Croatia are compliant with the WFD normative definitions and have good pressure-response relationships.

2. DESCRIPTION OF NATIONAL ASSESSMENT METHODS

A benthic invertebrate – based index for the assessment of the ecological quality of natural Croatian lakes was developed. Seven natural lakes, representing the six lake types occurring in the country were analyzed (Table 1)

Table 1. General characteristics of Croatian natural lakes.

Lake	Maximum depth (m)	Ecoregion/ subcoregion	GIG	National type	Lake description	Depth profile
Kozjak (Plitvice Lakes)	48	Dinaric/ Continental	EC	HR-L_1A	carbonate substrate, dimictic, barrage lake	deep
Prošće (Plitvice Lakes)	38	Dinaric/ Continental	EC	HR-L_1B	carbonate substrate, dimictic, barrage lake	deep
Vrana Lake (on island Cres)	78	Dinaric/ Mediterranean	MED	HR-L_2	carbonate substrate, monomictic, cryptodepression	deep
Crniševo	31	Dinaric/ Mediterranean	MED	HR-L_3	carbonate substrate, monomictic, cryptodepression	deep
Oćuša	20	Dinaric/ Mediterranean	MED	HR-L_3	carbonate substrate, monomictic, cryptodepression	deep
Vransko Lake (near Biograd)	4-5	Dinaric/ Mediterranean	MED	HR-L_4	carbonate substrate, polymictic, cryptodepression	shallow
Visovac	28-30	Dinaric/ Mediterranean	MED	HR-L_5	carbonate substrate, monomictic, barragelake	deep

The sampling was conducted during the late-spring of 2018 and 2019. Benthic macroinvertebrates were sampled from the littoral zone. Environmental parameters and anthropogenic pressures were assessed for each lake (Table 2). A stepwise linear regression of each metric (calculated with Asterics software, version 4.0.4 or calculated manually in the case of the percentage of Chironomini individuals in the community) against environmental parameters and anthropogenic pressures was conducted for ensuring pressure-response relationships. Reference conditions for each lake type were estimated by the hindcasting procedure. The final index was expressed as the average of the EQRs of four (in the case of HR-L_2 only three) metrics.

Table 2. Environmental parameters and anthropogenic pressures used in the stepwise linear regression.

Environmental /morphometric conditions	Pressures
Lake Volume (in m ³ *10 ⁶)	Fish biomass (in kg/ha)
Altitude (in meters above sea level)	Non-natural land cover (NNLC, in %)
Retention time (in days)	Hydromorphology (morphological degradation scores 1-5)
Salinity (in g/kg)	Concentration of chlorophyll <i>a</i> (mg/L)

2.1. SAMPLING AND DATA PROCESSING

Description of sampling and data processing:

- **Sampling time and frequency:** mid to late spring
- **Sampling method:** Sampling site covered a length of 25 m of lakeshore, up to 10 m towards open water or to the point where water depth exceeded 1 m, depending on the slope of the shore. At each sampling site, 10 samples were collected from a 25 × 25 cm surface with a hand net (mesh size, 500 µm) and four depth levels were defined: 0–0.25 m, 0.25–0.5 m, 0.5–0.75 m and 0.75–1 m. Samples were taken in microhabitats covering at least 10% of the area, proportionately to their coverage at the sampling sites. The substrate categories were defined according to the AQEM consortium (2002). The method is described in detail in Urbanič et al. (2012).
- **Data processing:** EPT [%] (abundance classes), Diversity (Margalef Index) and Number of Families are calculated using ASTERICS 4.04 software, whereas the percentage of Chironomini individuals was calculated as: N of Chironomini individuals / N of all macroinvertebrates (%)
- **Identification level:** It is recommended that identification is conducted as detailed as possible, up to the level of species if possible. Required level of macroinvertebrate identification:

Table 4. Level of identification required for the Croatian national assessment.

Systematic group	Level of identification	Systematic group	Level of identification
Porifera	genera	Ephemeroptera	genera, species
Hydrozoa	genera	Trichoptera	genera, species
Bryozoa	presence	Odonata	genera, species
Turbellaria	genera, species	Megaloptera	genera, species
Oligochaeta	family, genera, species	Heteroptera	genera, species
Hirudinea	genera, species	Coleoptera	genera, species
Mollusca	genera, species	Diptera	family, genera, species
Crustacea	genera, species	Hydrachnidia	presence
Plecoptera	genera, species		

2.2. DESCRIPTION OF NATIONAL METHODOLOGY

Multimetric index was used. It consists of four (in one type three) metrics (Table 3): **1**) percentage of Chironomini individuals in community (% Chironomini); **2**) Diversity (Margalef Index- this metric is not used in one lake type), **3**) - EPT [%] (abundance classes) and **4**) Number of Families. The multimetric index uses the same metrics for all lake types but with different reference values for each type. One exception is the lake type HR-L_2. This lake is a very deep (78 meters) cryptodepression located on an island (surrounded by the sea). Because of this evident isolation, this ultra-oligotrophic lake naturally has low diversity. For this reason, the diversity index (Margalef diversity) is excluded from the evaluation of this lake's ecological status.

Table 3. Overview of the metrics included in the national method

MS	Taxonomic composition and abundance/Major taxonomic groups	Diversity	Ratio tolerant/sensitive taxa
HR	EPT [%] (abundance classes) Number of Families.	Diversity (Margalef Index)	% Chironomini (tolerant taxa)

Combination rule used in the method: The final EQR is calculated as an average of the single EQRs of the four (three) metrics.

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

Method is compliant with the WFD normatives.

2.3. NATIONAL REFERENCE CONDITIONS

The reference conditions were predicted by the hindcasting procedure for each lake. The theoretical value of the metric was estimated after minimizing or setting pressure values to zero (Table 5). Chlorophyll *a* concentrations were set following Poikane et al. (2011) for shallow lakes at: 2.5 µg/L and 1.8 µg/L for deep lakes. The maximum ratio of non-natural land cover was set at 8% following Ntislidou et al (2016), who also defined reference conditions for MED GIG lakes. The hydromorphological alternation reference value was set at 1.5, which “corresponds totally, or nearly totally, to undisturbed conditions” (Poikane, 2009). Reference fish biomasses were calculated from reference values of total phosphorus concentrations, which were: 0.01 mg/L (10 µg/L) for deep lakes and 0.02 mg/L (20 µg/L) for shallow lakes (both values in concordance with de Hoyos et al., 2014). The biomass calculation follows Gassner et al (2003) and is done using the formula: Fish biomass (kg/ha) = 3.8148*TP^{1.0940}, where TP is total phosphorous concentration in µg/L.

Table 5. Maximum pressure values determined for reference conditions.

Pressure:	Chl <i>a</i> (µg/L)	NNLC (%)	Fish biomass (kg/ha)	HYMO
Reference:	Poikane et al. (2011)	Ntislidou et al (2016)	Gassner et al (2003)	Poikane. (2009)
HR-L_1A	1.8	8	47.37	1.5
HR-L_1B	1.8	8	47.37	1.5
HR-L_2	1.8	8	47.37	1.5
HR-L_3	1.8	8	47.37	1.5
HR-L_4	1.8	8	47.37	1.5
HR-L_5	2.5	8	101.11	1.5

In the Dinaric ecoregion of Croatia, the landscape is mostly dominated by karst deposits, which have historically been seen as harsh habitats for agricultural and urban development. This means that very few lakes and reservoirs are affected by high levels of nutrient enrichment and are mostly in good and high ecological status (or good ecological potential in the case of reservoirs). All lakes have mean total phosphorous (TP) concentrations from the vegetation season below 30 µg/L, which theoretically makes them all eligible for reference sites regarding this variable (de Hoyos et al., 2014 and Borics et al., 2018). This means that when correlated to macroinvertebrates or other biological metrics, the TP variable does not show typical stressor trends and, seeing as the concentrations are usually very low, in some cases even acts as a promotor of biodiversity. Similar trends also occur with total nitrogen concentrations. For this reason, as a “pressure” variable we used chlorophyll *a* concentrations which in our opinion best represent the eutrophication pressure and correlates significantly with the used macroinvertebrate metrics.

The addressed pressures were Chl *a* (µg/L), NNLC (%), Fish biomass (kg/ha) and hydromorphological degradation. The parameters of the models (multiple regressions) for the three metrics against environmental parameters and pressures are presented in the following equation for all four used metrics:

Metric	Intercept	Environmental traits				Stressors			
		Volume	Altitude	Retention time	Salinity	Fish biomass	NNLC	HYMO	chl a
%Chironomini	0.0019	-0.0009	0	0	-0.0806	0.001	0.0014	0.0115	-0.0124
Diversity Margalef	7.6927	0.0124	-0.002	-0.2105	-1.5398	-0.0147	-0.0131	0.1632	-0.0738
EPT (%) abundance classes	12.2042	-0.0049	0.0074	0.0013	-2.0193	0.0145	-0.0417	-0.7828	0.9344
N of fam	37.1813	0.0512	-0.0005	-0.0022	-7.8707	-0.0435	-0.1579	0.2428	1.0566

All the metric regressions revealed significant correlations with at least one pressure.

2.4. NATIONAL BOUNDARY SETTING

The national boundaries of the ecological quality classes were set according to Hering et al. (2006).

Boundaries	Class
0.8-1	High
0.6-0.8	Good
0.4-0.6	Moderate
0.2-0.4	Poor
0-0.2	Bad

The reference values for all the metrics used in the equation are derived from the stepwise linear regressions presented in chapter 2.3.

Table 6. Reference values for metrics from six Croatian lake types.

National type	Metric	Reference value
HR-J_1A	% Chironomini	0.036
	Diversity Margalef index	5.88
	EPT (%) abundance classes	16.80
	Number of families	35.47
HR-J_1B	% Chironomini	0.036
	Diversity Margalef index	5.60
	EPT (%) abundance classes	17.51
	Number of families	35.07
HR-J_2	% Chironomini	0
	Diversity Margalef index	not applicable
	EPT (%) abundance classes	26.96
	Number of families	20.59
HR-J_3	% Chironomini	0.035
	Diversity Margalef index	6.78

National type	Metric	Reference value
	EPT (%) abundance classes	12.82
	Number of families	34.92
HR-J_4	% Chironomini	0
	Diversity Margalef index	5.77
	EPT (%) abundance classes	11.72
	Number of families	30.95
HR-J_5	% Chironomini	0
	Diversity Margalef index	7.90
	EPT (%) abundance classes	12.57
	Number of families	39.90

Lower anchors for all the metrics were set as the worst metric value from the whole dataset and equaled: % Chironomini -0.4; Diversity Margalef index -2.28; EPT (%) abundance classes - 1.02 and Number of families - 9.

2.5. PRESSURES ADDRESSED

Statistical analyses were performed to explore the responsiveness of the national macroinvertebrate-based assessment method to various anthropogenic stressors.

The pressure-response relationships were tested via:

- (1) non-parametric Spearman rank correlations of the national EQR with environmental parameters
- (2) linear regressions of the national metric with pressure variables.

The results of a Spearman correlation of the national macroinvertebrate-based assessment method with pressure variables are shown in Table 7. The coefficient showed statistically significant relationships ($p < 0.05$) between national EQR and several different pressures.

Table 7. Summary of the Spearman correlations of the national macroinvertebrate-based assessment method (EQR) with different hydro-chemical and environmental pressures. Correlations marked in red are significant at $p < 0.05$.

Variable	Marked correlations are significant at $p < 0,05$; N=43 (Casewise deletion of missing data)
	EQR
Chl α	0,357223
HYMO	0,150035
Fish biomass	-0,728862
Total P	-0,504506
NNLC	-0,691834

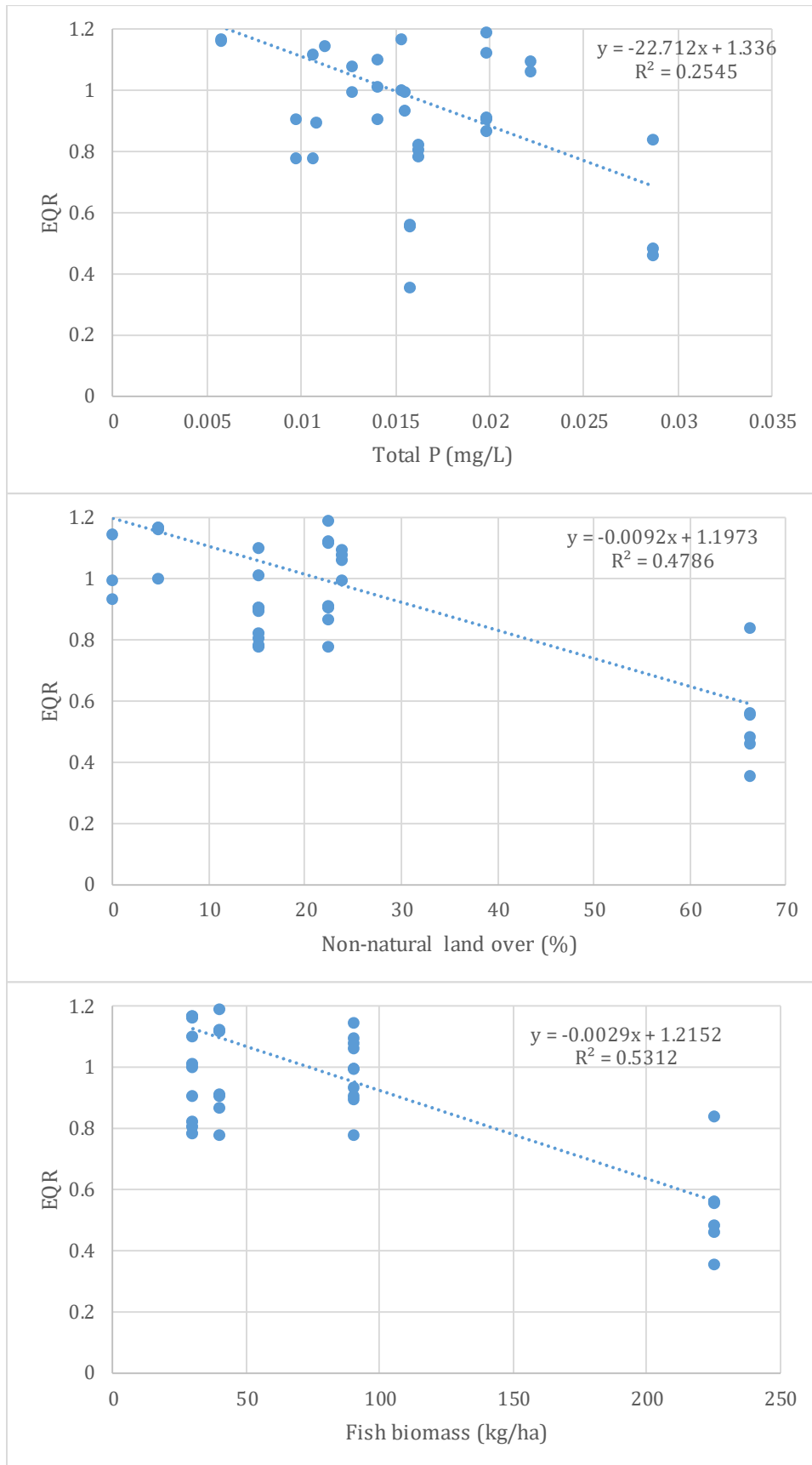


Figure 1. Pressure-response relationship between the most important pressures against the national macroinvertebrate-based assessment method (EQR) in Croatian lakes.

3. WFD COMPLIANCE CHECKING

Table 6. List of the WFD compliance criteria and the WFD compliance checking process and results

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

IC FEASIBILITY CHECKING

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

There are no common intercalibration types for both EC-GIG (Dinaric Western Balkan) and MED-GIG natural lakes yet. Croatia decided to classify the ecological quality of natural lakes following more strict Mediterranean reference thresholds by de Hoyos et al. (2014), as well as adapting some type specificity to the evaluations as described by Ntislidou et al. (2016) in the evaluation of Greek natural lakes (MED GIG).

4.1. TYPOLOGY

Does the national method address the same common type(s) as other methods in the Intercalibration group? Provide evaluation if IC feasibility regarding common IC types.

There are seven natural lakes in Croatia with surface areas larger than 0.5 km². All of them are located in Dinaric ecoregion (Ecoregion 5 - Dinaric Western Balkan): two of them (Plitvice lakes: Lake Kozjak and Lake Prošće) in Dinaric Continental sub-ecoregion (EC-GIG) and five of them in Dinaric Mediterranean sub-ecoregion (MED-GIG).

4.2. PRESSURES ADDRESSED

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

In the Mediterranean GIG all national methods were calibrated to address eutrophication pressure. The Croatian method addresses eutrophication pressure, fish biomass and land use in the catchment.

4.3. ASSESSMENT CONCEPT

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

All assessment methods included in the IC Mediterranean exercise, focus on the littoral zone of the lake, which is in use in some MS, while others use the profundal zone, hence “the case where the Intercalibration exercise is not possible”.

4.4. CONCLUSION ON THE INTERCALIBRATION FEASIBILITY

Provide conclusions on the IC feasibility.

The reason for not doing the intercalibration was lack of appropriate comparable data, i.e. comparable lake types and reference conditions among MS-s.

5. DESCRIPTION OF THE BIOLOGICAL COMMUNITIES

DESCRIPTION OF THE BIOLOGICAL COMMUNITIES AT HIGH STATUS

The macroinvertebrate community in the high status of Croatian type HR-L_2 (deep karstic lake) is characterized by almost no Chironomina individuals present in the macroinvertebrate community. Here, the ratio of Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera individuals equals 25% or more of the total macroinvertebrate abundance, whereas the ratio of Tubificinae individuals is up to 4%, respectively.

The macroinvertebrate community in the high status of all other Croatian “deep” types is characterized by almost no Chironomina individuals present in the macroinvertebrate community. Here, the ratio of Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera individuals equals 25% or more of the

total macroinvertebrate abundance. A high level of local diversity is present with the number of families around 30 and Margalef index values of 5.5 (and more).

In the shallow Lake Vransko near Biograd (HR-J_4) the macroinvertebrate community in high status is characterized by the ratio of Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera individuals equal 10% or more of the total macroinvertebrate abundance, whereas the ratio of Tubificinae individuals is around 14%, respectively. A high level of local diversity is present with the number of families around 30 and Margalef index values of 5.5 (and more).

DESCRIPTION OF THE BIOLOGICAL COMMUNITIES AT GOOD STATUS

The macroinvertebrate community in good status of Croatian type HR-L_2 (deep karstic lake) is characterized by very few Chironomini individuals present in the macroinvertebrate community. Here, the ratio of Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera individuals is around 20% of the total macroinvertebrate abundance, whereas the ratio of Tubificinae individuals is up to 7%, respectively.

The macroinvertebrate community in good status of all other Croatian “deep” types is characterized by few Chironomini individuals present in the macroinvertebrate community. Here, the ratio of Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera individuals is around 20% or more of the total macroinvertebrate abundance. High local diversity is present with the number of families around 25 and Margalef index values around 5.0.

In the shallow Lake Vransko near Biograd (HR-J_4) the macroinvertebrate community good status is characterized by regularly Chironomini individuals present in the macroinvertebrate community. Here, the ratio of Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera individuals is around 8% of the total macroinvertebrate abundance, whereas the ratio of Tubificinae individuals is around 19%, respectively. High local diversity is present with the number of families around 25 and Margalef index values around 5.0.

DESCRIPTION OF THE BIOLOGICAL COMMUNITIES AT MODERATE STATUS

The macroinvertebrate community in moderate status of Croatian type HR-L_2 (deep karstic lake) is characterized by around 4% Chironomini individuals present in the macroinvertebrate community. Here, the ratio of Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera individuals is around 15% of the total macroinvertebrate abundance, whereas the ratio of Tubificinae individuals is up to 10%, respectively.

The macroinvertebrate community in moderate status of all other Croatian “deep” types in the Dinaric ecoregion is characterized by around 4% Chironomini individuals present in the macroinvertebrate community. Here, the ratio of Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera individuals is around 15% or more of the total macroinvertebrate abundance. Local diversity is relatively high, present with the number of families around 20 and Margalef index values around 4.

In the shallow Lake Vransko near Biograd (HR-J_4) the macroinvertebrate community moderate status is characterized by around 8% Chironomini individuals present in the macroinvertebrate community. Here, the ratio of Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera individuals is around 6% of the total macroinvertebrate abundance, whereas the ratio of Tubificinae individuals is around 24%, respectively. Local diversity is relatively high, present with the number of families around 20 and Margalef index values around 4.

6. REFERENCES

- Borics G, Wolfram G, Chiriac G, Belkinova D and Donabaum K. 2018. Intercalibration of the national classifications of ecological status for Eastern Continental lakes: Biological Quality Element: Phytoplankton. Publications Office of the European Union, Joint Research Centre of the European Commission, Ispra, Italy, <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/11111111/54469>.
- de Hoyos C, Catalan J, Dörflinger G, Ferreira J, Kemitzoglu D, Laplace-Treyture C, Pahissa Lopez J, Marchetto A, Mihail O, Morabito G, Polykarpou P, Romão F and Tsiaoussi V. 2014. Water Framework Directive Intercalibration Technical Report: Mediterranean Lake Phytoplankton ecological assessment methods. Joint Research Centre of the European Commission, Ispra, Italy.
- Gassner H, Wanzenböck J and Tischler G. 2003. Ecological integrity assessment of lakes using fish communities. Suggestions of new metrics developed in two Austrian prealpine lakes. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 88:635–652.
- Hering D, Feld CK, Moog O and Ofenböck T. 2006. Cook book for the development of a multimetric index for biological condition of aquatic ecosystems: experiences from the European AQEM and STAR projects and related initiatives. *Hydrobiologia* 566, 311–324.
- Ntislidou Ch, Lazaridou M, Tsiaoussi V and Bobori D. 2016. Report on the development of the national assessment method for the ecological quality of natural lakes in Greece, using the Biological Quality Element “Benthic invertebrates” (GLBil, Greek Lake Benthic invertebrate Index). Aristotle University of Thessaloniki, School of Biology, 25p
- Official Gazette, 2019. Regulation on Water Quality Standard, Official Gazette of the Republic of Croatia No. 96/19.
- Poikane S. 2009. EU-Wide Lake Ecological Classification Based on Phytoplankton. PhD Thesis, University of Latvia, Riga.
- Poikane S, Johnson RK, Sandinc L, Schartau AK, Solimini AG, Urbanič G, Arbačiauskas K, Aroviita J, Gabriels W, Miler O, Pusch MT, Timk H and Böhmer J. 2016. Benthic macroinvertebrates in lake ecological assessment: A review of methods, intercalibration and practical recommendations *Science of the Total Environment* 543:123–134.
- Poikane S, van den Berg M, Hellsten S, de Hoyos C, Ortiz-Casas J, Pall K, Portielje R, Phillips G, Solheim AL, Tierney D, Wolfram G and van de Bund W. 2011. Lake ecological assessment systems and intercalibration for the European Water Framework Directive: aims, achievements and further challenges. *Procedia Environmental Sciences*, 9:153-168.
- Urbanič G, Petkovska V and Pavlin M. 2012. The relationship between littoral benthic invertebrates and lakeshore modification pressure in two alpine lakes. *Fundam Appl Limnol* 180:157–173.