

**PROJEKT ZAŠTITE OD ONEČIŠĆENJA VODA U PRIOBALNOM PODRUČJU
2 IBRD 7640/HR**

*DIO 3.2. Sustav za nadzor kakvoće voda MENP/M-C-1 Konzultantske usluge za definiranje sustava
praćenja i promatranja za stalnu procjenu stanja Jadranskog mora*

JADRANSKI MONITORING PROGRAM – FAZA II

PRIVREMENO IZVJEŠĆE

Prosinac, 2013.

PRIVREMENO IZVJEŠĆE

Datum: 24. prosinca 2013.

Broj dokumenta:

Naručitelj: Ministarstvo zaštite okoliša i prirode RH

Projekt: PROJEKT ZAŠTITE OD ONEČIŠĆENJA VODA U
PRIOBALNOM PODRUČJU 2 IBRD 7640/HR

Priredili: Konzorcij od sljedećih institucija:

Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split, vodeći partner
Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj
Hrvatski hidrografski institut, Split
Brodarski Institut, Zagreb

Odobrila: Prof.Ivona Marasović, Ph.D
Voditelj projekta

Za Konzorcij: -----
Ravnatelj: Prof. Nedo Vrgoč, Ph.D
Vodeći partner-Institut za oceanografiju i ribarstvo

3. MJERNA I ANALITIČKA OPREMA I METODE ISTRAŽIVANJA

3.1. Parametri fizičke oceanografije

3.1.1. Temperatura, salinitet i gustoća mora

Temperatura, salinitet i gustoća mora mjeriti će se suvremenim CTD višeparametarskim sondama visoke točnosti Seabird SBE-9 (Slika 3.1.1.1), i SBE-25 tvrtke SEABIRD.

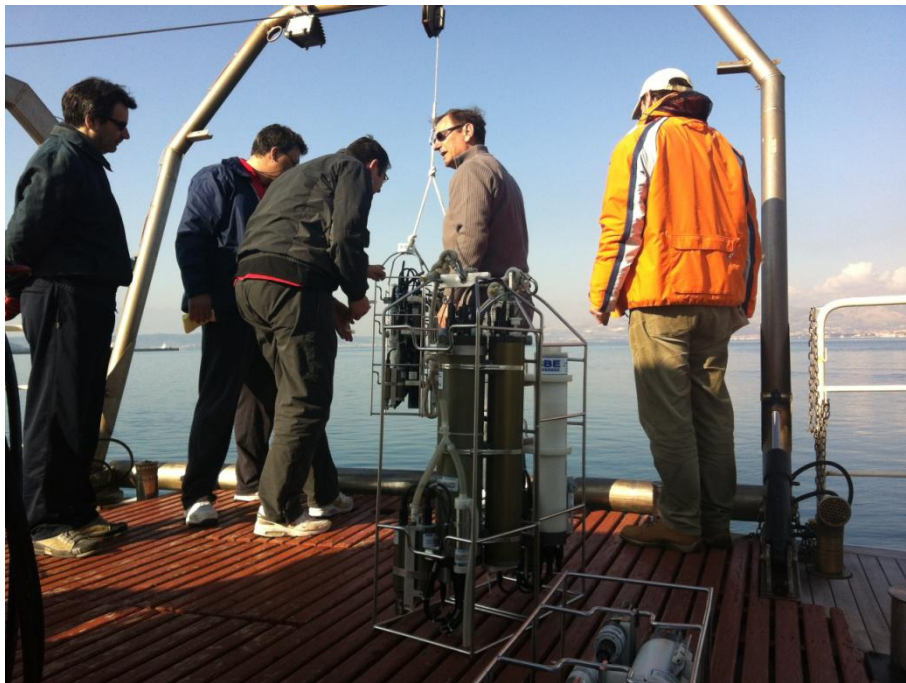
Osnovne karakteristike višeparametarske sonde su:

Senzor:

Temperatura: Raspon: -5 do +35°C
 Točnost: ~ 0.004 °C

Konduktivitet: Raspon: 0-7 S/m
 Točnost: ~ 0.0003 S/m

Dubina: Raspon: 0-1300 m
 Točnost: 0.05% od ukupne dubine.

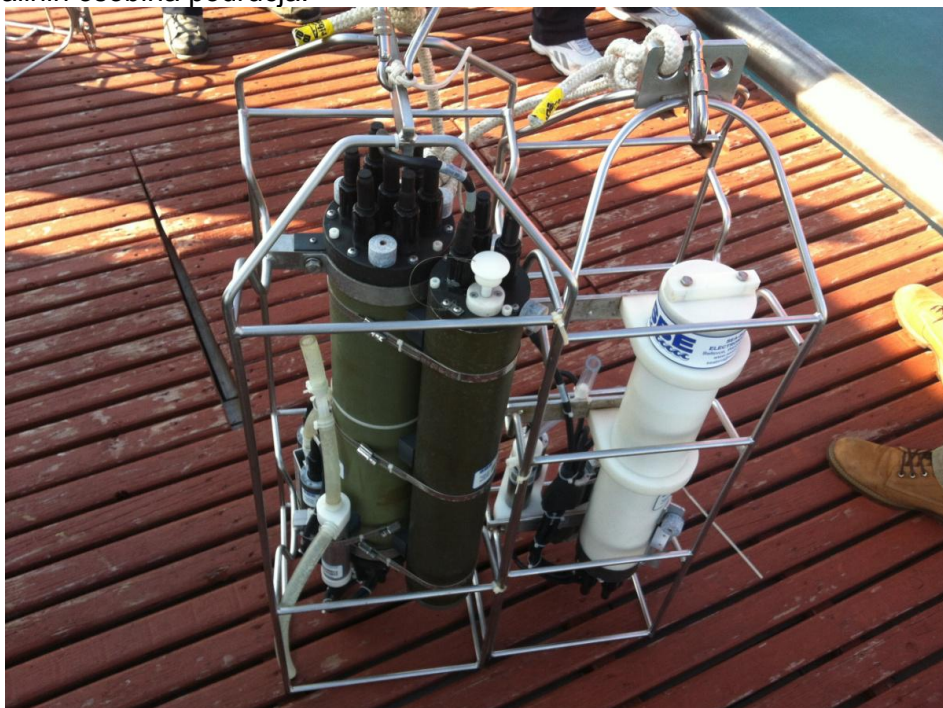


Slika 3.1.1.1. Mjerenje temperature, saliniteta i gustoće mora višeparametarskim sondama SBE-9 i SBE-25

Koristiti će se višeparametarske sonde kalibrirane u laboratoriju tvrtke SEABIRD. Na svakom brodu će biti najmanje dvije sonde, koje će se prije početka terenskih mjerenja usporediti na taj način da se multisonde spoje zajedno i spuste u more (Slika 3.1.1.2).

Neposredno nakon obavljenog mjerenja podaci će se očitati na računalu i obraditi primjenom programskog paketa Seasoft. Analizirati će se vertikalni profili temperature, saliniteta i gustoće morske vode, Brunt-Vaisala frekvencija te TS dijagrami. Koristit će se programski paketi Ocean

Dana View, MatLab i Statistica. Pratiće se odstupanje izmjerenih vrijednosti od uobičajenih termohalinih osobina područja.



Slika 3.1.1.2. Višeparametarske CTD sonde pripremljene za kalibracijsko mjerenje

U slučaju povoljnih vremenskih uvjeta s malim brzinama vjetra i valovima multisonda će se koristiti kao integralni dio rozete, zajedno s crpcima za uzorkovanje morske vode (Slika 3.1.1.3).



Slika 3.1.1.3. Mjerenje višeparametarskom sondom na rozeti sa crpcima

3.1.2. Morske struje

Mjerenja morskih struja se obavljaju s više tipova automatskih mjernih instrumenata ADCP (Acoustic Doppler Current Profiler) koji omogućuju neprekidno mjerenje vertikalnog profila struja do dubina od 500 m. Instrumenti su: WS ADCP 300 proizvođača RD Instruments, SAD (5 strujomjera) i AWAC 600 (1 strujomjer) i Aquadop 600 (4 strujomjera) proizvođača Nortek, Norveška. ADCP strujomjeri koriste Doppler efekt emitirajući zvučni val određene frekvencije (npr. 300, 600 ili 1200 kHz, što ovisi o dubini mora) koji se reflektira od raspršenih čestica u vodi. U vodi zvučni val reflektira o male čestice ili plankton i vraća natrag do ADCP i na osnovu pomaka u frekvenciji reflektiranog i odaslanog zvučnog vala izračunava se brzina čestica u vodi.

ADCP strujomjeri su postavljeni na morsko dno, osim strujomjera na dubokoj postaji S7 koji je usidrene neposredno iznad morskog dna. Pridruženi programski paketi instrumentu koriste se za prikaz i analizu podataka o strujama: vremenske serije mjerenja brzine i smjera struje za svaki "bin", vremenski nizovi vektora struja, ruža struja, hodograma, dijagrama raspršenja i kumulativne distribucija brzine struje. Glavne tehnike i analize upotrijebljene u obradi strujomjernih podataka su: digitalno filtriranje podataka mjerenja, spektralna i rotaciona spektralna analiza, harmonička analiza, wavelet analiza, statistička analiza (najveća, srednja i najmanja brzina struje, rezultantni vektor, faktor stabilnosti).

Tehničke karakteristike ADCP strujomjera su sljedeće:

RD Instruments Workhorse Sentinel ADCP 300/600 kHz

Senzori:

Brzina struje	Tip DOPPLER Sensor 300/600 kHz (ADCP RDI) Raspon: \sim 500 cm/s Točnost: 0.3% brzine strujanja u odnosu na ADCP \sim 0.3 cm/s Rezolucija brzine: 0.1 cm/s
Smjer struje	Tip INDUKCIJSKI KOMPAS Točnost: \sim 2° Preciznost: \sim 0.5° Rezolucija: 0.01° Maksimalni nagib: \sim 15°
Temperatura mora	Tip TERMISTOR Raspon: -5 do 45°C Preciznost: \sim 0.4°C
Način zapisa	Unutarnja memorija, 16 MB
Napajanje	Unutarnja baterija, 42 V, 400 Wh

Nortek AWAC 600 kHz

Senzori:

Brzina struje	Tip DOPPLER Sensor 600 kHz Raspon: \sim 1000 cm/s Točnost: 1% mjerene vrijednosti \sim 0.5 cm/s
---------------	---

Smjer struje	Rezolucija brzine: 0.1 cm/s Frekvencija: 1Hz Tip INDUKCIJSKI KOMPAS Točnost: $\sim 2^\circ$ Rezolucija: 0.1° Maksimalni nagib: $\sim 15^\circ$
Valovi	Tip DOPPLER Sensor 600 kHz Raspon: 20m Točnost/rezolucija (Hs): <1% mjerene vrijednosti / 1cm Točnost/rezolucija (Dir): 2°/0.1° Perid vala: 0.5-30 sec /ovisno o dubini postavljanja
Temperatura mora	Tip TERMISTOR Raspon: -4 do 30°C Točnost 0.1°C Rezolucija: 0.01°C
Način zapisa Napajanje	Unutarnja memorija, 82 MB Vanjska baterija, 12 V, 450/900 Wh

Nortek Aquadop profiler 600 kHz

Senzori:

Brzina struje	Tip DOPPLER Sensor 600 kHz Raspon: ~ 1000 cm/s Točnost: 1% mjerene vrijednosti ~ 0.5 cm/s Rezolucija brzine: 0.1 cm/s Frekvencija: 1Hz
Smjer struje	Tip INDUKCIJSKI KOMPAS Točnost: $\sim 2^\circ$ Rezolucija: 0.1° Maksimalni nagib: $\sim 15^\circ$
Temperatura mora	Tip TERMISTOR Raspon: -4 do 30°C Točnost 0.1°C Rezolucija: 0.01°C
Način zapisa Napajanje	Unutarnja memorija, 33 MB Unutarnja baterija, 12 V, 50 Wh

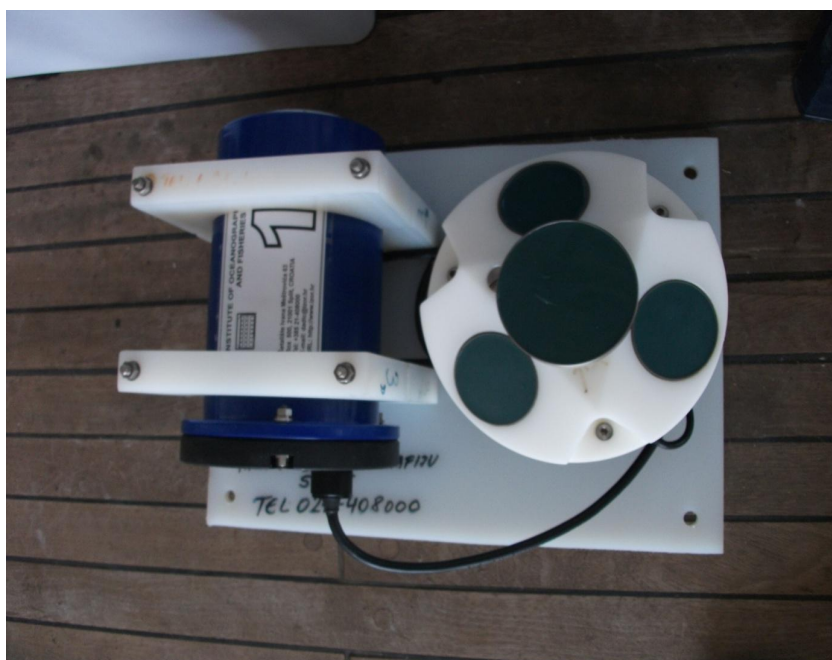
Postavke ADCP strujomjera postavljene su u brodskom laboratoriju neposredno prije sidrenja (Slika 3.1.2.1), kako slijedi:

a) za 300 kHz:

upotrebljavaju se za mjerenja do dubine od 90 m;
prostorni korak od 2 m (34 čelija) koriteći pritom 75 pingova unutar 15 minuta jednoliko raspoređenih (svakih 12 sekundi jedan ping);
standardna devijacija brzine morske struje 0.80 cm/s;
memorijska kartica od 16 MB je potrebna za 6 mjeseci kontinuiranog mjerenja.

b) za 600kHz:

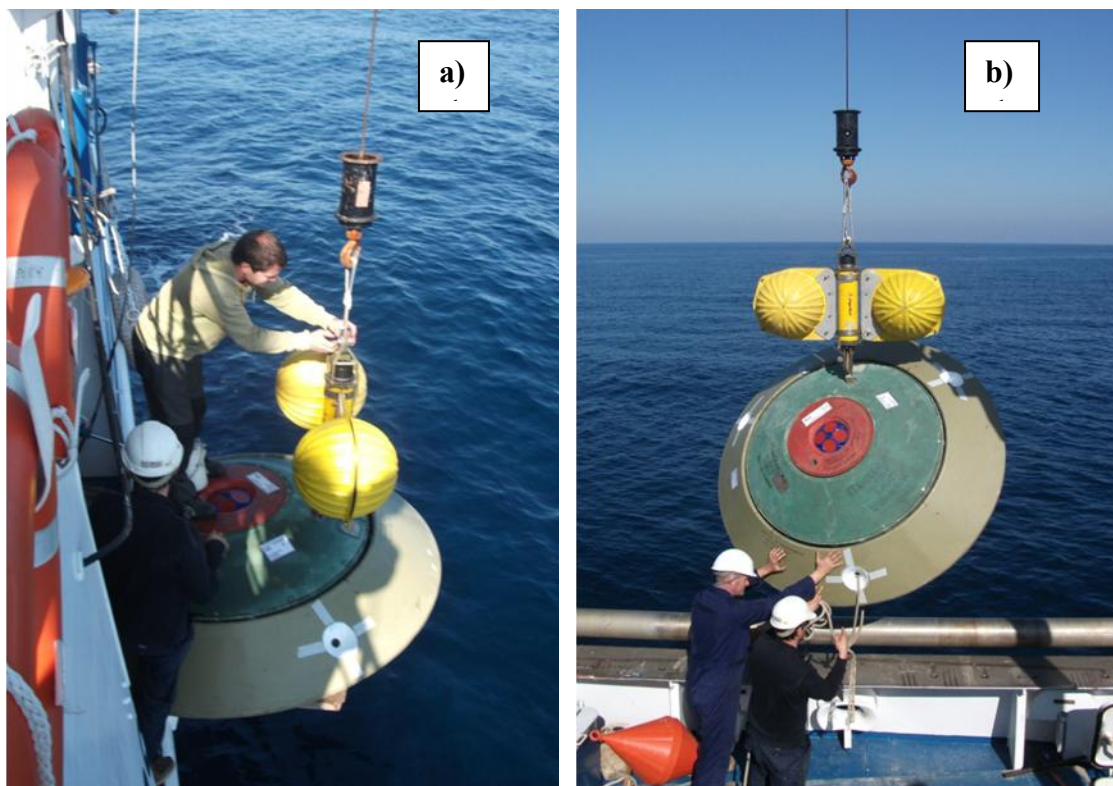
upotrebljavaju se za mjerenja do dubine od 50 m;
prostorni korak od 2 m (25 čelija) koriteći pritom 107 pingova unutar 15 minuta jednoliko raspoređenih (svakih 8.41 sekundi jedan ping).
standardna devijacija brzine morske struje 0.35 cm/s;
memorijska kartica od 16 MB je potrebna za 6 mjeseci kontinuiranog mjerenja.



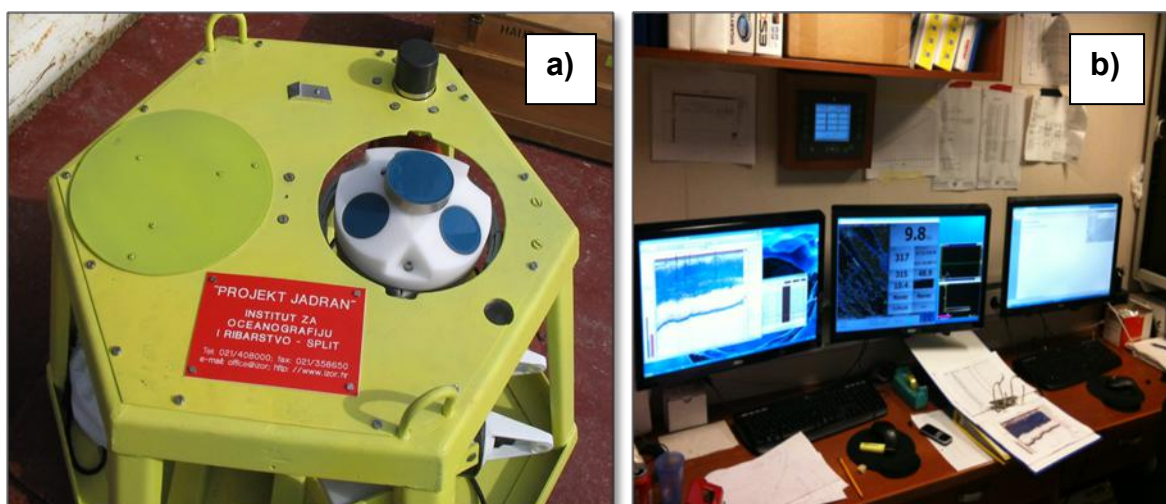
Slika 3.1.2.1. Strujomjer AWAC 600 s vanjskom baterijom na palubi broda pripremljen za montažu na sidreni blok

Kod postavljanja strujomjera korišteni su precizni GPS uređaji za pozicioniranje s dubinomjerom, mjerач nagiba strujomjera postavljenog na dnu mora (najveći dozvoljeni nagib 5°) te uzgonska plutača i akustični odvajač za oslobađanje mehanizma za spuštanje od strujomjera nakon njegovog postavljanja na dno mora. Ovisno o dubini i lokaciji postaje upotrijebljeno je više načina postavljanja strujomjera. U područjima u kojima se odvija koćarski ribolov strujomjeri su postavljeni s teškim uređajima za sidrenje tipa Klis ili Svilaja koji su otporni na potezanje koćarske mreže (Slika 3.1.2.2). U sklopu ovog uređaja nalaze se jedan ili dva odvajača koji omogućuju daljinsko oslobađanje i podizanje strujomjera na palubu broda po završetku mjerenja. U područjima bez koćarskog ribolova strujomjeri su postavljeni s lakšim uređajima za

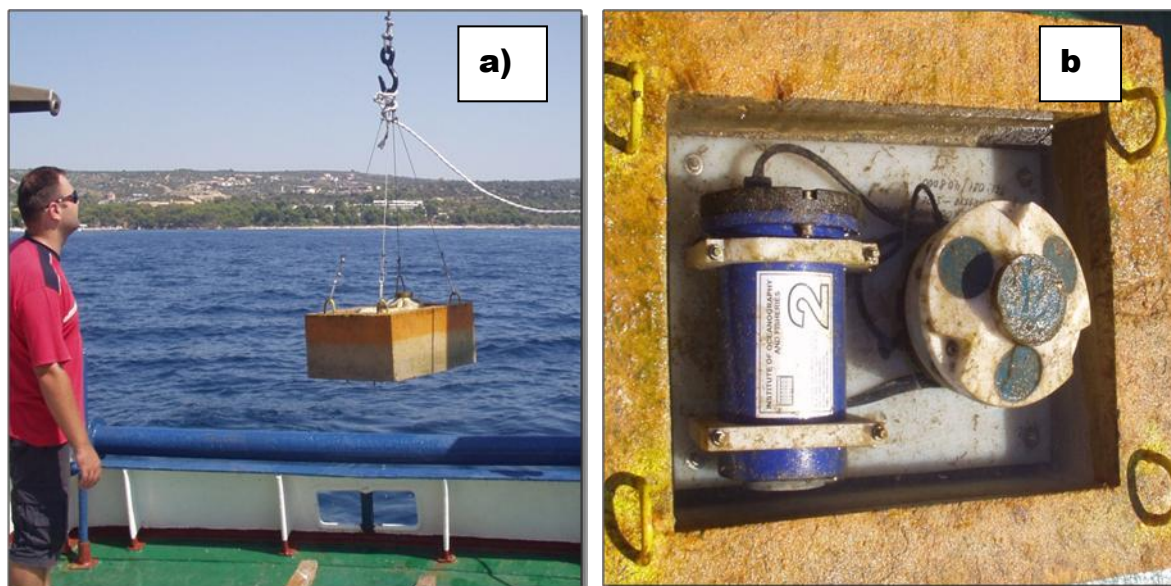
sidrenje (Slika 3.1.2.3 - 3.1.2.4.) ili su usidreni neposredno iznad morskog dna pomoću uzgonske nosive plutače Nin (Slika 3.1.2.5).



Slika 3.1.2.2. Priprema ADCP strujomjera WS ADCP-300 s opremom otpornom na kočarske mreže tipa Klis na palubi broda (a) i početak spuštanja sustava u more (b).



Slika 3.1.2.3. Sidreni uređaj tipa Marjan s AWAC strujomjerom, uzgonskom plutačom i akustičnim odvajanjem pripremljen za polaganje (a) i kontrolni uređaji za praćenje dubine i ispravnosti nagiba strujomjera (b)



Slika 3.1.2.4. Spuštanje strujomjera AWAC s vanjskom baterijom za napajanje i nosećom betonskom konstrukcijom na dno mora (a) i njihov izgled nakon tri mjeseca rada u moru (b)



Slika 3.1.2.5. ADCP 300 s plutačom i akustičnim odvajanjem na palubi broda neposredno nakon podizanja s morskog dna

3.1.3. Prozirnost

Secchi ploča je najčešće korišten i najjeftiniji alat za mjerenje prozirnosti i kvalitete vode a koristi se i za određivanje trofičkog stupnja površinskih voda. Mjerenja prozirnosti na Jadranu sežu još od 19 stoljeća. Na istočnoj se obali Jadrana, na nizu postaja, počinju kontinuirano obavljati mjesečna mjerenja od 1952.godine.

Secchi ploča je uobičajeno sredstvo kojim se mjeri prozirnost otvorenih i priobalnih voda, jezera i rijeka. U oceanografiji je uobičajena bijela Secchi ploča od 30cm promjera, iako se nekada koristila i ploča od 50cm promjera. Pokazano je međutim da nema značajne razlike u istovremenim mjerenjima te dvije ploče. Na rijekama i jezerima uglavnom se koristi ploča s naizmjenično obojenim kvadrantima, crno-bijela dimenzija od 20cm promjera. Ponekad se koristi još i crna ploča (na plitkim rijekama ili jezerima te u mornarici).

Dubina Secchi ploče određuje se spuštanjem ploče, obješene na označenom konopcu, iznad osjenčene površine mora, tako da promatraču ne smeta refleksija s površine mora. Mjerenja bi se trebala obavljati od 9-15h a najbolji se rezultati dobivaju između 10 i 14h.

Ploča se spušta dok ne nestane iz vida promatrača te se podiže i spušta dok se ponovo ne vidi. To se može ponavljati ako je potrebno više puta dok se točno ne utvrdi krajnja dubina na kojoj se ploča još vidi i gdje upravo iščezava iz vida.

Kako su mjerenja obavljana s različitim brodovima, to su na oceanografskim krstarenjima korištene različite ploče (sve promjera 30cm): bijela, crno-bijela i crna, te će se u ovoj studiji povezati rezultati tih različitih mjerenja.

3.1.4. Optički ponderirani klorofil

U oligotrofnim vodama kakav je uglavnom otvoreni srednji i južni Jadran a povremeno i dijelovi priobalnog istočnog Jadrana, na optička svojstva najveći utjecaj imaju klorofilni pigmenti. Stoga je utjecaj klorofilnih pigmenata ključan i u formiranju podpovršinskog povratnog zračenja koje bilježe optički sateliti.

Zbog različite raslojenosti klorofila u moru optički signal mora nije jednoznačno definiran. Za usporedbu satelitski dobivenog klorofila s *in-situ* mjerenim klorofilom potrebno je vertikalnu raspodjelu klorofila u moru prilagoditi tako da se klorofilu površinskih slojeva prida veći značaj od onog u dubini. Primjenjuje se eksponencijalno slabljenje signala klorofila s dubinom, uz pretpostavku da je svjetlost još jedan put na isti način oslabljena na povratku prema površini.

Svjetlost koja prodire u more eksponencijalno je oslabljena s dubinom pri dolasku do nekog sloja. Reflektirana i raspršena svjetlost prema površini dodatno je eksponencijalno oslabljena pri povratku iz tog sloja do površine. Klorofil sadržan u stupcu mora samo do tzv. dubine prodiranja može doprinjeti podpovršinskoj reflektanciji, što je recipročna vrijednost koeficijenta slabljenja difuzne svjetlosti $k(E_d)(m^{-1})$ (Smith, 1981).

Iznos površinskog signala klorofila C_{sat} dobiva se integrirajući vertikalnu raspodjelu klorofila $C(z)$

$$C_{\text{sat}} = \int_0^1 C(z) g(z) dz$$

gdje je $g(z)$ eksponencijalni težinski faktor ovisan o dubini (Gordon and Clark, 1980)

$$g(z) = e^{-2k^* z}$$

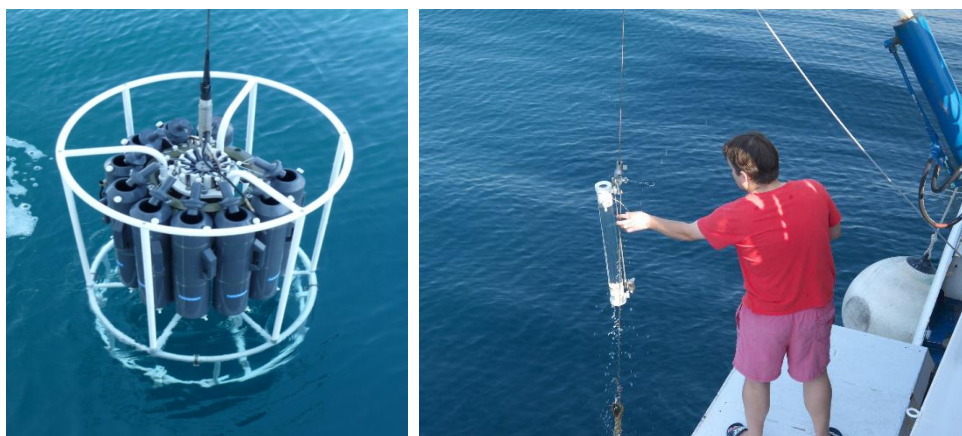
Secchi pločom se mjeri dubina do koje se reflektirano povratno začenje još vidi s površine mora. U nedostatku odgovarajućih mjerenja atenuacije fotosintetski raspoloživog zračenja (PAR), dubina Secchi ploče može poslužiti kao prva aproksimacija za dubinu integracije optičkog signala klorofila.

3.2. Kemijski parametri

3.2.1. Kemijski parametri u vodenom stupcu

Uzorkovanje morske vode za analizu kemijskih parametara

Uzorkovano je Nansenovim i Niskinovim crpcima (Slika 3.2.1.1.) na postajama i dubinama predviđenim projektom. Uzorci su odmah analizirani na istraživačkim brodovima ili zamrznuti ($- 24\text{ }^{\circ}\text{C}$) te analizirani u kemijskim laboratorijima istraživačkih instituta. Pri uzorkovanju, kratkotrajnim (minute, sati) ili dugotrajnim (dani) pohranama uzoraka uvažene su ISO smjernice za uzorkovanje, čuvanje i rukovanje uzorcima (norme (ISO 5667-9, 1992., ISO 5667-14, 1998. and ISO 5667-3, 2003)



Slika 3.2.1.1. Uzorkovanje morske vode pomoću Niskin-ovih crpaca na rozeti te Nansen-ovih crpaca poredanih u vertikalnom nizu

Sadržaj otopljenog kisika

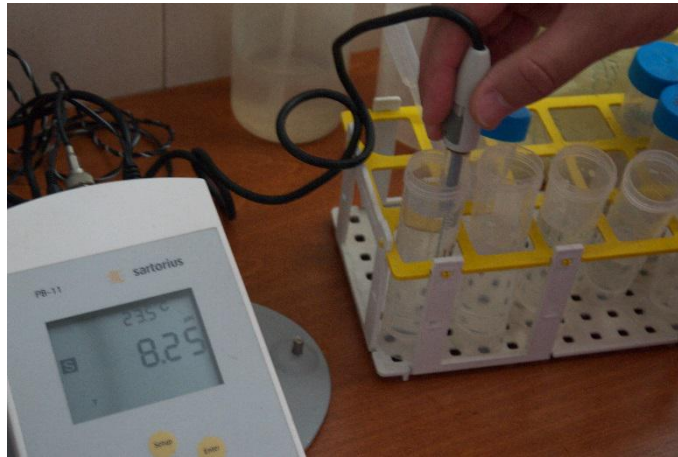
Sadržaj otopljenog kisika u uzorcima morske vode određen je titrimetrijski s tiosulfatom prema normi ISO 5813 (1983). Osnovni postupci analize prikazani su na slici 3.2.1.2.



Slika 3.2.1.2. Dodavanje reagensa (manganovog (II) sulfata i kalij jodida) u uzorke, vezivanje otopljenog kisika u talog $\text{MnO}(\text{OH})_2$ te titracija oslobođenog I_2^- kompleksa s otopinom natrij tiosulfata

pH vrijednost uzoraka morske vode

pH vrijednost uzoraka određena je elektrokemijski pH metrom (Slika 3.2.1.3.) nakon kalibracije staklene elektrode pH puferima.



Slika 3.2.1.3. Mjerenje pH vrijednosti s pH metrom

Koncentracije hranjivih soli

Koncentracije hranjivih soli dušika, fosfora i silicija određeni su fotometrijski na AutoAnalyzer-u III SEAL Analytical (Slika 3.2.1.4.) koristeći automatizirane metode za morsku vodu (Grasshoff, 1976) kao i na spektrofotometru Shimadzu UV mini 1240 (Slika 3.2.1.4.) prema metodama Parsons i sur. (1985) te Ivančić i Degobbis (1984) .



Slika 3.2.1.4. Određivanje hranjivih soli na „AutoAnalyzer-u III“ te na za spektrofotometru Shimadzu UV mini 1240.

Osnovni validacijski parametri za određivanje pojedinih oblika anorganskih hranjivih soli na uređaju AutoAnalyzer III prikazani su u tablici 3.2.1.1.

Tablica 3.2.1.1. Statistički i analitički parametri za pojedine anorganske hranjive soli u moru.

Parametar	Hranjive soli				
	NO ₂	NO ₃	NH ₄	PO ₄	SiO ₂
CV	0,20	0,21	0,3	0,2	0,5
STD	0,003	0,022	0,05	0,012	0,051
KLK	1,000	0,9999	0,999	0,9999	0,999
GD	0,0015	0,010	0,034	0,020	0,016
GK	0,005	0,033	0,133	0,066	0,053

CV: Koeficijent varijacije (%) (10 replikanata pri 50%)

STD: Standardna devijacija (μMol/L)

KLK: Koeficijent linearne korelacije

GD: Granica detekcije (μMol/L)

GK: Granica kvantifikacije (μMol/L)

Ukupno otopljeni anorganski dušik određen je kao zbroj koncentracija nitrata, nitrita i amonijevih soli, dok su ukupno otopljeni dušik i fosfor određeni kao nitrati, odnosno ortofosfati nakon razgradnje i oksidacije uzoraka u Autoklavu (IOR-Split) ili u UV oksidatoru (CIM-Rovinj). Koncentracije otopljenog organskog dušika i fosfora određeni su računski iz razlike koncentracija ukupnog dušika i nitrata te ukupnog fosfora i ortofosfata.

Otopljeni i partikularni organski ugljik

Za određivanje otopljenog i partikularnog organskog ugljika (DOC i POC) uzorci morske vode skupljani su iz Niskin-ovog crpca u staklene boce volumena 1,3 L prethodno oprane krom-sumpornom kiselinom, isprane vodom iz slavine, ekstra čistom vodom bez primjesa organske tvari (Milli-Q voda, Millipore) i na kraju s morskom vodom koja se uzorkuje. Filtrirano je neposredno nakon uzorkovanja uz primjenu on-line filtracijskog sustava (preuređeni stakleni sustav za filtriranje Millipore) uz primjenu staklenog GF/F filtera (Whatman) veličine pora 0.7 μm (slika 3.2.1.5.). Filtrirani uzorci za određivanje DOC skupljani su u triplicatu u staklene posudice volumena 22 mL koje su prethodno oprane u krom-sumpornoj kiselini, isprane u Milli-Q vodi i žarene na 450 °C kroz 4 sata. Uzorci su konzervirani živinim kloridom (10 mg L⁻¹) i spremljeni na +4 °C do mjerenja. Nakon odvajanja filtrata za određivanje DOC, partikularna organska tvar zaostala na filteru isprana je s nekoliko mL Milli-Q vode radi uklanjanja soli i u krio-tubama odložena u tekući dušik na brodu te na -80 °C u laboratoriju do POC analize.



Slika 3 2 1 5. Uređaj za filtraciju uzoraka

Koncentracije otopljenog organskog ugljika određene su primjenom osjetljive metode visokotemperaturne katalitičke oksidacije HTO (Dafner and Wangersky, 2002) na instrumentu TOC-V_{CPH} (Shimadzu) s Pt- silika katalizatorom i NDIR detektorom za mjerenje CO₂ (Slika 3.2.1.6.). Prije oksidacije iz otopine je uklonjen anorganski ugljik zakiseljavanjem s otopinom HCl (~2 % otopina) na pH 2-3 i isplinjavanjem nastalog anorganskog CO₂ strujom čistog zraka kroz 10 minuta. Sustav je kalibriran dnevno sa standardom (K-hidrogenftalat). Svaki uzorak je mjeren u duplikatu, a iz svake kivete DOC je mjeren najmanje tri puta. Prosječni blank instrumenta i ekstra čiste vode (Milly-Q) je odgovarao vrijednosti od 0,03 mg L⁻¹ (n=44) uz visoku ponovljivost mjerenja (1,6%).

Partikularni organski ugljik (POC) je određen na TOC-V_{CPH} (Shimadzu) analizatoru povezanom sa SSM-5000A modulom kalibriranim s glukozom (slika 3.2.1.6.). Anorganski ugljik iz uzoraka je uklonjen prije mjerenja POC s 2M otopinom HCl te se u silika-keramičkim lađicama sušio na 50 °C kroz 12 sati. Oksidacijom organskog ugljika u uzorku u struji čistog kisika na 900 °C nastali CO₂ direktno se kao i DOC odredio NDIR analizatorom. Prosječna vrijednost slijepe probe instrumenta i praznog filtera odgovara sadržaju od 0,005 mg L⁻¹ uz ponovljivost mjerenja glukoze kao standarda $\leq 3\%$.



Slika 3.2.1.6. TOC–V_{CPH} and TOC–V_{CPH} + SSM 5000A Shimadzu analizador.

3.2.2. Teški metali i klorirani ugljikovodici u sedimentu

Uzorkovanje sedimenta za analizu sadržaja teških metala i kloriranih ugljikovodika

Sediment je uzorkovan plastičnim gravitacijskim korerom (uzorci za analizu teških metala) i Van Veen-ovim metalnim grabilom (uzorci za analizu kloriranih ugljikovodika, Slika 3.2.2.1.) na postajama prikazanim na slici 2.6.1.



Slika 3.2.2.1. Uzorkovanje sedimenta plastičnim gravitacijskim korerom te Van Veenovim metalnim grabilom.

Za analize uzima se površinski odsječak sedimenta debljine 2 cm pomoću plastične i metalne špatule (Slika 3.2.2.2.) koji se pohranjuju u plastične vrećice, odnosno aluminijske posude i zamrzavaju na - 20 °C do analize uzoraka.



Slika 3.2.2.2. Uzimanje površinskog sloja sedimenta za analizu sadržaja teških metala i kloriranih ugljikovodika.

Zamrznuti uzorci sedimenta suše se postupkom liofilizacije do konstantne težine te se potom određuju maseni udjeli teških metala i kloriranih ugljikovodika.

Postupci određivanja teških metala (Cd, Cu, Hg_T, Pb and Zn) u sedimentu

Oko 0,1 g liofiliziranog sedimenta za analizu sadržaja Cd, Cu, Pb i Zn potpuno se razgrađuje postupkom mokre razgradnje u mikrovalnoj peći. Postupak razgradnje odvija se kroz nekoliko koraka pomoću smijese kiselina HNO₃ (65 %, Suprapur, Merck), HF (40 %, Suprapur, Merck), i HClO₄ (70 %, Suprapur, Merck). Uzorci za analizu ukupne žive razgrađuju se postupkom mokre razgradnje, tj. zagrijavanjem uzorka u teflonskim posudama sa dušičnom kiselinom, na "vrućoj ploči" pri 80 °C.

Maseni udjeli Cd i Pb u uzorcima određuju se metodom elektrotermičke atomske apsorpcijske spektroskopije pomoću uređaja Perkin Elmer Analyst 800 (Slika 3.2.2.3.), dok se maseni udjeli Cu i Zn u uzorcima određuju metodom plamene atomske apsorpcijske spektroskopije (također uređaj Perkin Elmer Analyst 800). Primijenjene metode i radni uvjeti provjeravaju se korištenjem standardnih referentnih materijala (MESS-1, IAEA-158). Sadržaj ukupne žive određuje se metodom atomske apsorpcijske spektrometrije hladnih para (CV-AAS) pomoću uređaja Perkin Elmer Flow Injection Mercury System, FIMS-100 (Slika 3.2.2.3.). Primijenjene metode i radni uvjeti provjeravaju se korištenjem standardnog referentnog materijala IAEA-433.



Slika 3.2.2.4. Plinski kromatograf uz detektor zahvata elektrona (GC-ECD Ni⁶³, Agilent Technologies, model 6890N).

Kontrola kvalitete analitičkog postupka provodi se redovitom provjerom sa slijepom probom, dodatkom unutarnjeg standarda (PCB-29, ε-HCH) za izračun iskorištenja, te analizom referentnog materijala (RM IAEA za sediment) odnosno učestvovanjem u međulaboratorijskim poredbenim ispitivanjima (IAEA-MEL, Monaco) i IAEA/MED POL testovima osposobljenosti. Osnovni podaci o točnosti, preciznosti, granici detekcije i granici kvantifikacije prikazani su u tablici 3.2.2.1.

Tablica 3.2.2.1. Podaci za točnost, preciznost, granice detekcije (GD), granice kvantifikacije (GK) i proširenu mjernu nesigurnost metode određivanja kloriranih ugljikovodika u sedimentu, izraženi u odnosu na suhu masu uzorka (s.m.).

Parametar	Točnost (%) (N=10)	Preciznost (%) (N=10)	GD (µg/kg s.m.)	GK (µg/kg s.m.)	Proširena mjerna nesigurnost (k=2) (µg/kg s.m.)
Lindan	-8,95	10,5	0,05	0,17	0,04
p,p'-DDE	-11,3	12,8	0,07	0,23	0,39
p,p'-DDD	9,31	14,1	0,08	0,27	0,29
p,p'-DDT	6,66	11,0	0,09	0,30	0,16
Aroklor 1254	2,89	10,3	0,11	0,37	4,12
Aroklor 1260	8,19	5,49	0,11	0,37	1,65

Rezultati analize sadržaja metala i kloriranih ugljikovodika u uzorcima sedimenta na istraženim postajama izraženi su na suhu težinu uzorka.

3.2.3. Teški metali i klorirani ugljikovodici u školjkašima (*Mytilus galloprovincialis*)

Uzorkovanje školjkaša (*Mytilus galloprovincialis*) za analizu sadržaja teških metala i kloriranih ugljikovodika

Uzorkovanje je provedeno tijekom travnja i svibnja 2013. godine (Slika 2.6.1., Tablica 2.6.1.). Školjkaši su, ovisno o uvjetima, prikupljeni ručno s obale ili čamca, ili uz pomoć ronioca. Svaki kompozitni uzorak je sadržavao najmanje 15 jedinki, koje su odmah stavljene u čiste plastične vrećice i u priručnom frižideru prenesene do laboratorija gdje su očišćene od grubog vanjskog obraštaja i secirane prema Bernhardu (1976)(Slika 3.2.3.1.). Sadržaj probavila školjkaša nije pročišćen prije seciranja. Prilikom seciranja svakoj jedinki određeni su masa i duljina ljuštare, te masa ukupnog mekog tkiva.



Slika 3.2.3.1. Dagnja (*Mytilus galloprovincialis*) snimljena tijekom postupka seciranja.

Nakon seciranja kompozitni uzorci ukupnog mekog tkiva (15 jedinki) su zamrznuti u plastičnim posudicama za određivanje sadržaja teških metala, odnosno u Al-foliji za određivanje kloriranih ugljikovodika. Zamrznuti uzorci mekog tkivo školjkaša liofilizirani su i homogenizirani, te im je određen sadržaj vode vaganjem prije i nakon liofilizacije. Indeks kondicije školjkaša izračunat je kao omjer između mase ukupnog mekog tkiva (izražene prema suhoj težini) i dužine ljuštare.

Teški metali (Cd, Cu, Hg_T, Pb i Zn) u školjkašima (*Mytilus galloprovincialis*)

Liofilizirani i homogenizirani uzorci tkiva (~0,2 g) za analizu tragova metala razgrađeni su postupkom mokre razgradnje korištenjem smjese HNO₃ (65 %, Suprapur, Merck), HClO₄ (70 %, Suprapur, Merck) i H₂O₂ (30 %, Suprapur, Merck). Uzorci za analizu ukupne žive razgrađeni su zagrijavanjem uzorka u teflonskim posudama sa dušičnom kiselinom, na "vrućoj ploči" pri 80 °C.

Maseni udjeli Cd i Pb određeni su metodom elektrotermičke atomske apsorpcijske spektrometrije, dok su maseni udjeli Cu i Zn određeni metodom plamene atomske apsorpcijske spektrometrije pomoću uređaja Perkin Elmer Analyst 800 (Slika 3.2.2.3.). Sadržaj ukupne žive određen je metodom atomske apsorpcijske spektroskopije hladnih para (CV-AAS) pomoću uređaja Perkin Elmer Flow Injection Mercury System, FIMS-100 (Slika 3.2.2.3.). Primijenjene metode i radni uvjeti provjereni su korištenjem standardnog referentnog materijala NIST 2976.

Klorirani ugljikovodici u školjkašima (*Mytilus galloprovincialis*)

Klorirani ugljikovodici su ekstrahirani u liofiliziranom i homogeniziranom uzorku školjkaša. Maseni udjeli kloriranih ugljikovodika određeni su prema referentnoj metodi (UNEP/IAEA/IOC, 1996) pomoću plinskog kromatografa uz detektor zahvata elektrona (GC-ECD Ni⁶³, Agilent

Technologies, model 6890N) na kapilarnoj koloni (Slika 3.2.2.4). Kontrola kvalitete analitičkog postupka provedena je redovitom provjerom sa slijepom probom, dodatkom unutarnjeg standarda (PCB-29, ϵ -HCH) za izračun iskorištenja, te analizom referentnog materijala (RM IAEA za biotu) odnosno učestvovanjem u međulaboratorijskim poredbenim ispitivanjima (IAEA-MEL, Monaco) i IAEA/MED POL testovima osposobljenosti. Osnovni podaci o točnosti, preciznosti, granici detekcije i granici kvantifikacije prikazani su u tablici 3.2.3.1.

Tablica 3.2.3.1. Podaci za točnost, preciznost, granice detekcije (GD), granice kvantifikacije (GK) i proširenu mjernu nesigurnost metode određivanja kloriranih ugljikovodika u školjkama, izraženi u odnosu na suhu masu uzorka (s.m.).

Parametar	Točnost (%) (N=10)	Preciznost (%) (N=10)	GD ($\mu\text{g/kg s.m.}$)	GK ($\mu\text{g/kg s.m.}$)	Proširena mjerna nesigurnost (k=2) ($\mu\text{g/kg s.m.}$)
Lindan	-15,9	12,5	0,05	0,17	0,08
p,p'-DDE	0,83	3,89	0,06	0,20	0,72
p,p'-DDD	3,25	10,0	0,08	0,27	0,60
p,p'-DDT	8,33	6,08	0,09	0,30	0,54
Aroklor 1254	8,09	8,49	0,12	0,40	7,14
Aroklor 1260	-6,66	4,82	0,12	0,40	1,68

3.2.4. Analiza morskih biotoksina

Analiza toksina koji uzrokuju gubitak pamćenja (Amnesic Shellfish Poisoning - ASP toxins)

Uzorkovanje dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) iz prirodnih populacija na 8 postaja duž Jadranske obale obavljeno je tijekom travnja 2013. (Slika 2.6.1. i Tablica 2.6.1.). Da bi dobili reprezentativni uzorak prikupljeno je 4 kg školjki po postaji te su pohranjene u polietilenske vrećice i prevezene u tamnim i hladnim kontejnerima u laboratorij unutar 24 sata. Dagnje su očišćene od vanjskih nečistoća i obraštaja, isprane vodom te im odvojeno meko tkivo od ostatka organizma na način kako su opisali Kljaković-Gašpić i sur. (2007).

Domoična kiselina (DA) je amino kiselina topljiva u vodi iz skupine kainata. Djeluju nadražujuće i toksično na neurološki sustav, na način da ometa neurotransmisijske mehanizme u mozgu. Do danas je izolirano deset izomera domoične kiseline, izodomoične kiseline od A do H, kao i epi-domoična kiselina (Jeffery et al., 2004). Prema najnovijim istraživanjima uz dokazanu toksičnost glavnog predstavnika grupe ASP toksina (domoična kiselina), ustanovljeno je u manjoj mjeri toksično djelovanje izodomoičnih kiselina A, B i C (Munday et al., 2008). Određivanje domoične kiseline postalo je izuzetno važno nakon zabilježenog trovanja ljudi koji su konzumirali školjkaše kontaminirane domoičnom kiselinom u Kanadi 1987 (Wright et al., 1989).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) s ultraljubičastim detektorom i detektorom s nizom dioda bila je prva analitička metoda razvijena za određivanje domoične kiseline i još uvijek se primjenjuje pri službenim analizama. Prednosti ove metode su jednostavnost i brzina izvedbe, zadovoljavajuća reproducibilnost i točnost. Važno je navesti da je metoda validirana kroz program AOAC (International Official Methods Program), što je doprinijelo njenoj široj primjeni (AOAC, 2006).

Brzina i selektivnost HPLC metode za određivanje domoične kiseline je naročito zadovoljavajuća pri primjeni reverzne stacionarne faze i kisele mobilne faze. Korištenje kisele mobilne faze sprječava ionizaciju funkcionalnih karboksilnih skupina i doprinosi kromatografskom odvajanju domoične kiseline od njenih izomera. Maksimalna apsorbancija domoične kiseline je pri 242 nm. Detekcijski limit za određivanje domoične kiseline HPLC metodom, ovisno o mogućnostima detektora, iznosi od 10-80 ng ml⁻¹. Također, detekcijski limit za određivanje domoične kiseline u tkivu školjkaša ovisi i o proceduri pripreme ekstrakta. Ako se mjerenje obavlja u „nepročišćenom“ ekstraktu detekcijski limit je oko 1 mg kg⁻¹, a to je zadovoljavajući rezultat, obzirom da je maksimalno dozvoljena količina DA u mekušcima 20 mg kg⁻¹. Međutim kod mjerenja u „nepročišćenom“ ekstraktu moguće su smetnje zbog postojanja spojeva koji „ko-eluiraju“ s DA, kao npr. aminokiselina triptofan (Quilliam et al., 1989). Kod takvih mjerenja potrebno je provjeriti maksimum apsorbancije na DAD detektoru, jer je maksimalna apsorbancija triptofana i DA kod različitih valnih duljina.

Uredba (EZ-a) 853/2004 Europskog parlamenta i Vijeća (EC, 2004), propisuje da živi školjkaši odnosno mekušci ne smiju sadržavati ASP toksina više od 20 mg DA po kg, dok Uredba Komisije (EZ-a) 2074/2005 (EC, 2005), izmijenjena Uredbom Komisije 1244/2007 (EC, 2007), navodi da je HPLC metoda prihvaćena za testiranja ASP toksina.

Laboratorij za plankton i toksičnost školjkaša uspješno je validirao i akreditirao HPLC metodu za određivanje ASP toksina prema zahtjevima norme HRN EN ISO/IEC 17025. Nadalje, laboratorij uspješno sudjeluje u međulaboratorijskim ispitivanjima (PT - proficiency testing) ASP toksina koje jednom godišnje organizira europski referentni laboratorij za morske biotoksine (EURLMB, Vigo, Spain) i „Quasimeme“ .

Priprema uzoraka školjkaša

Metoda za određivanje ASP toksina, domoične i epi-domoične kiseline navedena je u protokolu kojeg su predložili Quilliam i dr. (1995). Potrebno je homogenizirati 100 g mekog tkiva školjkaša da bi uzorak bio prikladan za analizu ASP toksina. Odvažuje se približno 4 g homogeniziranog tkiva i ekstrahira s 16 mL otopine metanola (metanol:voda; 1:1) i centrifugira na 4000 rpm, 40 min. Nakon centrifugiranja filtrira se otopina iznad taloga kroz 0.45 µm metanol kompatibilan filtar. Preporuča se metanolski ekstrakt pročititi na krutoj fazi za ekstrakciju (SAX clean up) da bi se izbjegle smetnje kao npr. „ko-eluiranje“ triptofana s DA. Navedena procedura može se primjenjivati na mrežne uzorke fitoplanktona ili uzorke kultura fitoplanktonskih vrsta.

HPLC analiza

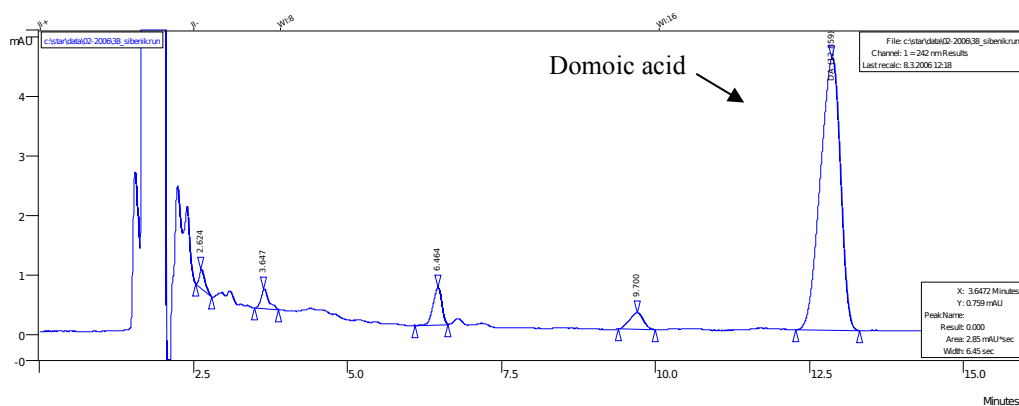
HPLC sustav sastoji se od modula za uklanjanje plinova iz mobilne faze, UV/Vis detektora, detektora s nizom diode, fluorescentnog detektora, kvaterne pumpe i automatskog uzorkivača (Slika. 3.2.4.1.). Za odijeljivanje DA iz ekstrakta koristi se kolona Pinnacle II C18, 250 × 4.6 mm (Restek), s predkolonom C18 Guard Cartridge (20×4 mm), a radna temperatura kolone je 40 °C.

Maksimalna apsorbancija domoične kiseline je pri valnoj duljini 242 nm. Mobilna faza je smjesa otopina acetonitrila (100 mL) i trifluorooctene kiseline (0.2 mL) razrijeđena deioniziranom vodom do ukupnog volumena 1 L. Retencijsko vrijeme domoične kiseline je 12.8 min. Slika 3.2.4.2. prikazuje kromatogram DA u pročišćenom ekstraktu dagnje.



Slika 3.2.4.1. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (Varian) sastavljen od modula za uklanjanje plinova iz mobilne faze, UV/Vis detektora, detektora s nizom diode, fluorescentnog detektora, kvaterne pumpe i automatskog uzorkivača.

Kalibracijski pravac se dobije mjerenjem standardnih kalibracijskih otopina pripremljenih od certificirane kalibracijske otopine domoične kiseline (National Research Council of Canada, Halifax, NS, Canada). Standardne kalibracijske otopine pripremljene su u četiri različite koncentracije: 1.0; 2.5; 10.0 i 25.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i mjerene u triplikatu na HPLC-u.



Slika 3.2.4.2. HPLC-UV kromatogram kontaminiranog tkiva dagnji nakon pročišćavanja na krutoj fazi, vrijeme zadržavanja (DA) = 12,859 min.

Točnost metode koja se primjenjuje za određivanje ASP toksina određuje se usporedbom rezultata mjerenja certificiranog referentnog materijala ASP-Mus-c (National Research Council of Canada, Halifax, NS, Canada) s certificiranim (prihvaćenim) rezultatom.

Granica detekcije je količina analita čiji je signal u omjeru s „šumom“ 3:1, odnosno najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati. Određuje se usporedbom rezultata mjerenja uzorka s poznatom niskom koncentracijom DA i slijepe probe. Granica detekcije DA određena u našem laboratoriju iznosi 0,1025 µg DA po kg [21]. Granica detekcije DA koja je određena usporedbom mjerenja certificirane standardne otopine (poznata koncentracija DA) s slijepom probom iznosi 0,022 µg mL⁻¹ (Ujević et al., 2010).

Analiza toksina koji uzrokuju paralizu (paralytic shellfish poisoning - PSP toxins)

Skupinu PSP toksina čini najmanje 57 različitih prirodnih neurotoksina koji mogu uzrokovati trovanje (Weise et al., 2010). PSP toksini su podijeljeni u tri grupe: najtoksičniji karbamati (STX – saksitoksin, NEO – neosaksitoksin, GTX1,4 – goniatoksin 1,4 i GTX 2,3 – goniatoksin 2,3), manje toksični dekarbamoli (dcSTX - dekarbamolsaksitoksin, dcGTX 2,3 – dekarbamolgoniatoksin 2,3 i dcNEO – dekarbamolneosaksitoksin) i najmanje toksični sulfokarbamoli ili sulfamati (C1,2,3,4 – N.sulfokarbamolgoniatoksin1,2,3,4 ,GTX5 – goniatoksin 5 i GTX6 – goniatoksin 6). Ako čovjek konzumira školjke kontaminirane PSP toksinima može doći do smrti zbog prestanka funkcije disanja. PSP toksini su heterociklički guanidini koji djeluju na živčane stanice kao depolarizirajući reagensi, otvaraju naponski regulirane natrijeve kanale odgovorne za protok natrija, pa se zaustavlja prijenos impulsa (putem živčanih stanica) do mišićnih stanica te nastupa paraliza, kardiovaskularni zastoj, prestanak disanja i smrt.

Metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s fluorescentnim detektorom je metoda prihvaćena za analizu PSP toksina (Lawrence-ova metoda). Pri pripremi uzoraka za analizu potrebno je oksidirati PSP toksine u ekstraktu, prije prolaska ekstrakta kroz kromatografsku kolonu, otopinom peroksidnog i perjodnog oksidansa (AOAC, 2005; Lawrence et al., 2005).

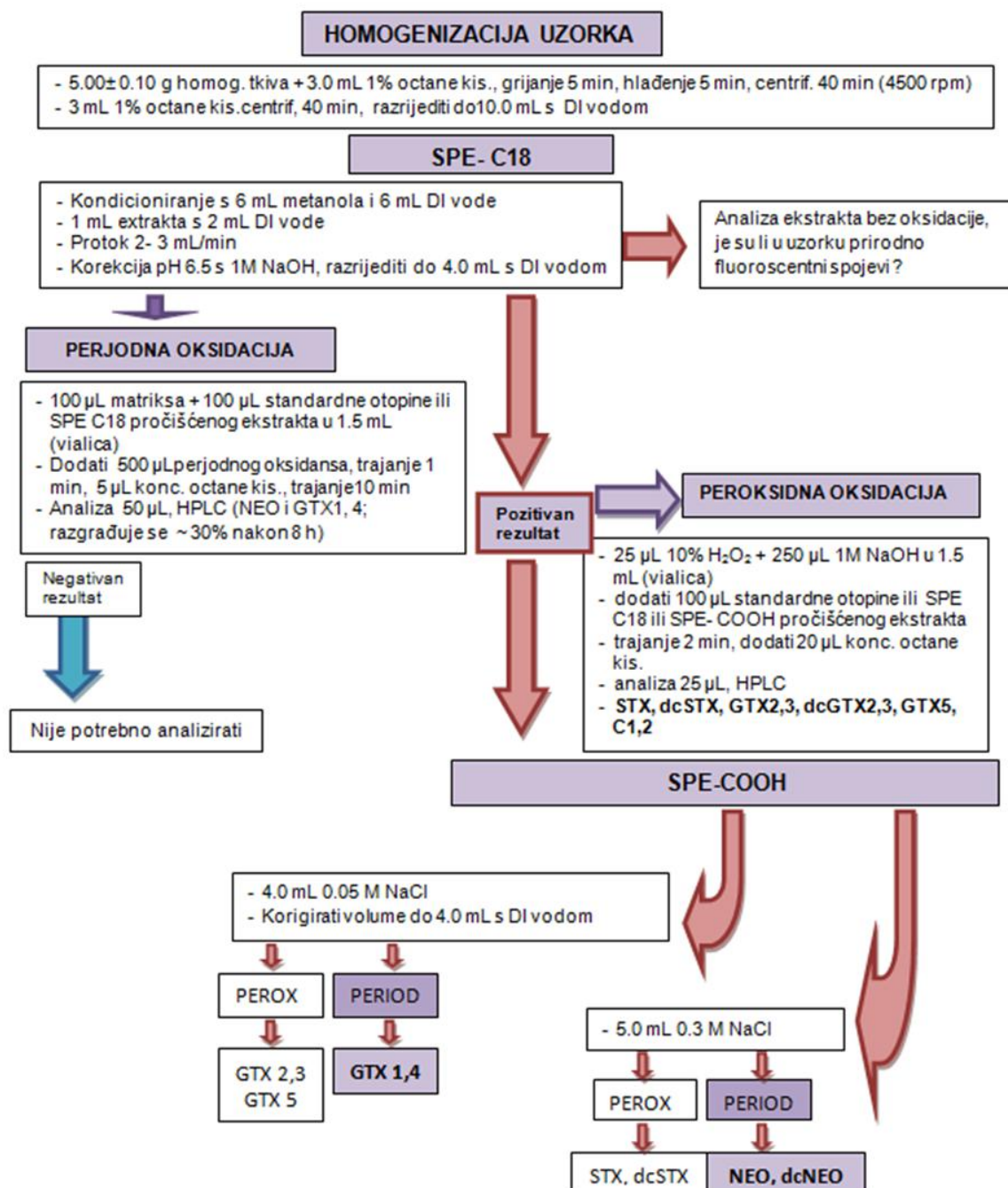
Uredba (EZ) 853/2004 Europskoga parlamenta i Vijeća (EC, 2004), propisuje da živi školjkaši odnosno mekušci ne smiju sadržavati PSP toksina više od 800 mg po kg, dok Uredba Komisije (EZ-a) 2074/2005 (EC, 2005), izmijenjena Uredbom Komisije 1664/2006 (EC, 2006), navodi da je HPLC metoda tzv. Lawrence metoda je prihvaćena za testiranja PSP toksina .

Laboratorij za plankton i toksičnost školjkaša uspješno je validirao i akreditirao HPLC metodu za određivanje PSP toksina prema zahtjevima norme HRN EN ISO/IEC 17025. Nadalje, laboratorij uspješno sudjeluje u međulaboratorijskim ispitivanjima (PT - proficiency testing) PSP toksina koje jednom godišnje organizira europski referentni laboratorij za morske biotoksine (EURLMB, Vigo, Spain).

Priprema uzoraka školjkaša

Homogenizirani uzorci školjkaša ekstrahiraju se 1% otopinom octane kiseline. Ekstrakti se pročišćavaju ekstrakcijom na krutoj fazi (C18). Dio dobivenog ekstrakta u kojem su određuju

NEO, GTX 1,4, C 3,4 and GTX 6 se pročišćava ekstrakcijom na krutoj fazi (SPE-COOH). Metoda se primjenjuje prema Lawrence-ovoj izvornoj metodi prema shemi na slici 3.2.4.3.



Slika 3.2.4.3. Priprema tkiva školjkaša za analizu PSP toksina

HPLC analiza

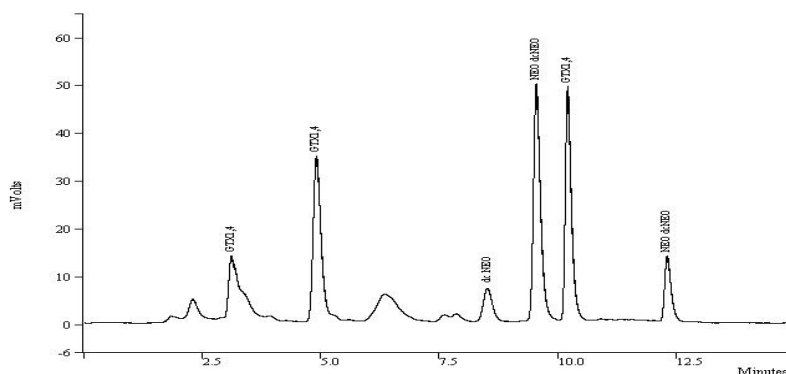
PSP ekstrakti analiziraju su nakon predkromatografske oksidacije na kromatografskom sustavu Varian Prostar 230 u kombinaciji s Prostar 363 fluorescentni detektor (valna duljina pobude je 340 nm i emisije 390 nm) i Prostar 410 automatskim uzorkivačem (Slika 3.2.4.1.). Razdvajanje oksidiranih toksina provodi se na reverznoj fazi C18 (kromatografska kolona, 250x4,6 mm, 5 µm veličina čestica), zaštićenom s predkolonom C18, (20 x 4,0 mm). Temperatura kolone je 30 °C, a vrijeme analize je 15,00 min.

Tijekom analize koriste se dvije mobilne faze: (A) 1 M amonijev formijat i (B) 0,1 M amonijev formijat u 5 % otopini acetonitrila (pH= 6,0). Brzina protoka mobilne faze je 1,5 mL/min. PSP toksini se određuju usporedbom s kromatogramima standardnih otopina (STX, NEO, dcSTX, dcNEO, GTX 1,4, 2,3 GTX, dcGTX 2,3, GTX 5 i 1,2 C, NRC, Halifax, Canada).

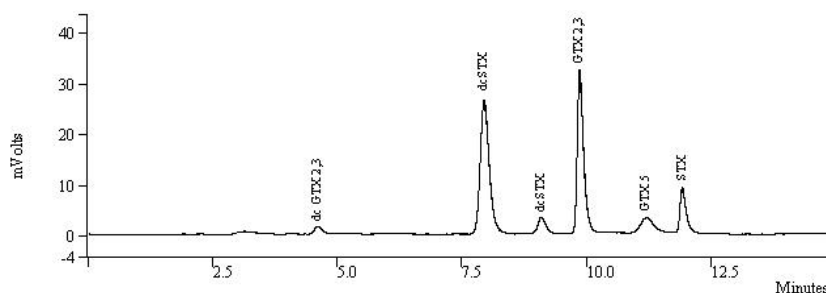
Kalibracijski pravci dobiju se mjerenjem tri različite smjese standardnih otopina pripremljenih u pet različitih koncentracija, također se mjeri smjesa standardnih otopina u kojoj su svi PSP toksini. Sastav smjesa je sljedeći:

- Smjesa I. NEO, dcNEO and GTX 1,4 (perjodna oksidacija, Slika 3.2.4.4).
- Smjesa II. STX, dcSTX, GTX 2,3, dcGTX 2,3 and GTX 5 (peroksidna oksidacija Slika 3.2.4.5),,
- Smjesa III. C 1,2 (perjodna i peroksidna oksidacija, Slika. 3.2.4.6).
- Smjesa IV. STX, dcSTX, NEO, dcNEO, GTX 1,4, GTX 2,3, dcGTX 2,3, GTX 5, C 1,2 (perjodna oksidacija, Slika 3.2.4.7).

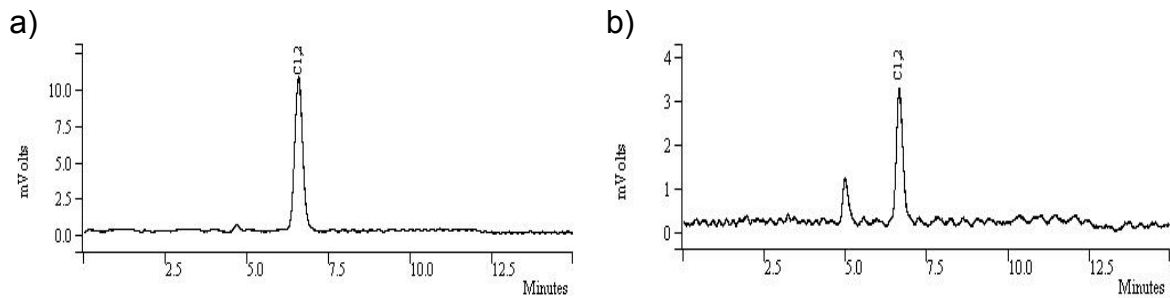
Slika 3.2.4.8. prikazuje kromatogram ekstrakta kontaminiranog uzorka nakon pročišćavanja na krutoj fazi C18 i perjodne oksidacije.



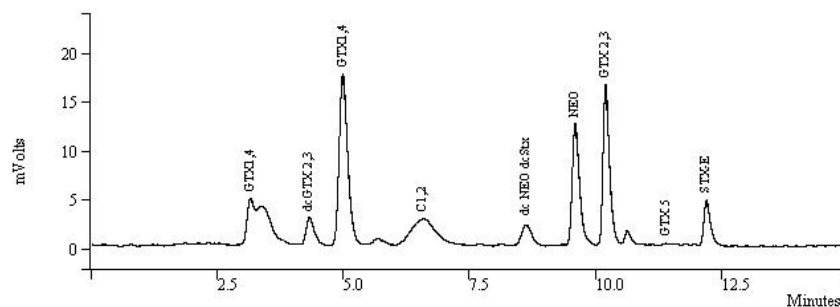
Slika 3.2.4.4. Kromatogram Smjese I koja sadrži NEO, dcNEO and GTX 1,4 nakon perjodne oksidacije



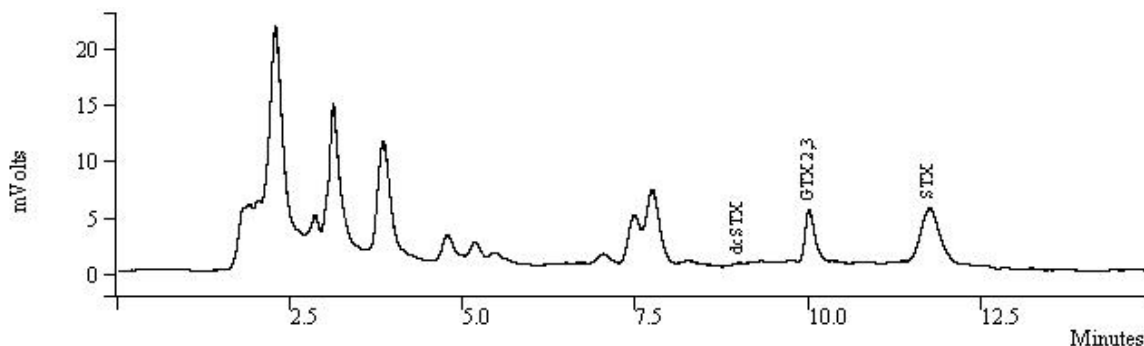
Slika 3.2.4.5. Kromatogram Smjese II koja sadrži STX, dcSTX, GTX 2,3, dcGTX 2,3 and GTX 5 nakon peroksidne oksidacije.



Slika 3.2.4.6. Kromatogram Smjese III koja sadrži C 1,2 nakon peroksidne (a) i perjodne oksidacije (b).



Slika 3.2.4.7. Kromatogram Smjese IV koja sadrži STX, dcSTX, NEO, dcNEO, GTX 1,4, GTX 2,3, dcGTX 2,3, GTX 5 and C 1,2 nakon perjodne oksidacije.



Slika 3.2.4.8. Kromatogram C18 ekstrakta (perjodna oksidacija) uzorka dagnji

Vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni za pojedine toksine, dobivena nakon perjodne i peroksidne oksidacije navedena su u Tablici 3.2.4.1. Neki PSP toksini (GTX1,4, GTX 2,3, C1,2 i dcGTX 2,3) se kvantificiraju zajedno jer se ovom metodom ne mogu odvojiti. Kod izračuna ukupne toksičnosti uzima se viši faktor toksičnosti.

Tablica 3.2.4.1. Vrijeme zadržavanja (RT, minute) PSP toksina nakon oeroksidne i perjordne oksidacije (vremena zadržavanja pikova koji se kvantificiraju su podcrtana).

RT (min)	3,1	3,8	5,4	6,2	6,8	7,8	8,9	9,6	10,2
Perjordna oksidacija	dcGTX2,3	<u>GTX1,4</u> dcGTX2,3 C1,2	C1,2	NEO dcSTX	<u>dcNEO</u> dcSTX	<u>NEO</u> dcSTX dcNEO	GTX1,4 GTX2,3	GTX5	STX NEO dcNEO
Peroksidna oksidacija	<u>dcGTX2,3</u>	dcGTX2,3	<u>C1,2</u>	dcSTX	<u>dcSTX</u>	dcSTX	<u>GTX2,3</u>	<u>GTX5</u>	<u>STX</u>

Faktori za preračunavanje toksičnosti PSP toksina su potrebni za izračun ukupne količine PSP toksina izražene u µg STX ekvivalenata na 1000 g uzorka. Faktori su definirani prema EFSA (2009).

Granica detekcije (LOD) određuje se na temelju omjera signal-šum (3:1), uspoređujući izmjereni signal uzoraka poznate niske koncentracije s signalom uzoraka u kojem nisu određeni toksini. Granice detekcije iznose: STX = 1,072; dcSTX = 1,910; GTX2,3 = 2,143; dcGTX2,3 = 1,065; GTX5 = 0,388; C1, 2 = 4,215; GTX1,4 = 6,810; NEO = 1.776; dcNEO = 2,0882 g kg⁻¹ (Ujević et al., 2012).

Analiza toksina koji uzrokuju probavne smetnje (diarrhetic shellfish poisoning - DSP toxins)

Toksini (diarrhetic shellfish poisoning - DSP toxins) koji uzrokuju probavne smetnje nakon konzumacije kontaminiranih školjkaša, su lipofilni termostabilni polieterski spojevi. Podijeljeni su u četiri grupe:

- OA grupa – Okadaična kiselina (OA), DTX-1, DTX-2 (dinofizistoksini), esteri (OA, DTX-1, DTX-2), PTX-1 i PTX-2 (pektenotoksini),
- Grupa azaspiracida – AZA-1, AZA-2 i AZA-3 (azaspiracidi),
- Grupa jesotoksina – YTX, homo-YTX, 45-OH-YTX i 45-OHhomo-YTX,
- Grupa cikličkih imina – SPX (spiroolidi) i GYM (gimnodimin).

Uredba (EZ) 853/2004 Europskoga parlamenta i Vijeća propisuje da živi školjkaši odnosno mekušci ne smiju sadržavati PSP toksina više od 160 µg OA ekvivalenata okadaične kiseline, dinofizistoksina i pektenotoksina zajedno po kg, 160 µg AZA ekvivalenata azaspiracida zajedno po kg, 1 mg YTX ekvivalenata jesotoksina zajedno po kg. Uredba Komisije (EZ-a) 2074/2005, izmijenjena Uredbom Komisije 15/2011 navodi da je LC-MS/MS metoda europskog referentnog laboratorija za morske biotoksine, referentna metoda za određivanje lipofilnih DSP toksina. Metoda se zasniva na ekstrakciji OA, PTXs, AZAs, YTXs, SPX and GYM toksina iz homogeniziranog tkiva školjkaša 100% metanolom. Filtrirani ekstrakti se analiziraju na vezanom sustavu tekućinski kromatograf i maseni spektrometar. Da bi se odredila ukupna količina toksina OA grupe potrebno je hidrolizirati estere OA ili/i DTX toksina u osnovnom ekstraktu (Mounfort et al., 2001).

Laboratorij za plankton i toksičnost školjkaša uspješno je validirao i akreditirao LC-MS/MS metodu za određivanje DSP toksina prema zahtjevima norme HRN EN ISO/IEC 17025. Nadalje, laboratorij uspješno sudjeluje u međulaboratorijskim ispitivanjima (PT - proficiency testing) DSP toksina koje jednom godišnje Laboratorij za organizira europski referentni laboratorij za morske biotoksine (EURLMB, Vigo, Spain).

Priprema uzoraka školjkaša

Homogenizirani uzorci školjkaša ($2.00 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$) ekstrahiraju se 100% metanolom, ekstrakt se intenzivno miješa (vorteksira) 3 min, zatim se centrifugira 10 min brzinom 2000 g, na temperaturi 20°C. Otopina iznad taloga se prelije u volumetrijsku posudu, a ostatak još jednom ekstrahira s 100% metanolom. Alikvot ekstrakta se hidrolizira radi određivanja ukupne količine OA i DTX toksina. Postupkom hidrolize esteri se prevode u toksine iz kojih su nastali (OA, DTX-1, DTX-2) te se mogu kvantitativno odrediti.

LC-MS/MS analiza

Analiza ekstrakta DSP toksina zasniva se na LC-MS/MS metodi koju preporučuje europski referentni laboratorij (SOP, 2011). Mjerenja se obavljaju na Agilent Technologies LC-MS/MS sustavu koji se sastoji od trostrukog kvadrupola - Triple Quad 6410, odzračivača - Degasser 1200, kvaternerne pumpe - Quaternary Pump 1200, automatskog uzorkivača - Auto sampler 1290, termostata za kolonu i termostatiranog kućišta kolone - Thermostatted Column Compartment 1290 (Slika 3.2.4.9).



Slika 3.2.4.9. Vezani sustav tekućinski kromatograf i maseni spektrometar, Agilent Technologies: trostruki kvadrupol - Triple Quad 6410, odzračivač - Degasser 1200, kvaterna pumpa - Quaternary Pump 1200, automatski uzorkivač - Auto sampler 1290 i termostatirano kućište za kolonu - Thermostatted Column Compartment 1290.

Kromatografski uvjeti rada ovise o mogućnostima instrumenta i potrebno ih je odrediti prije mjerenja uzoraka. Uvjeti rada tekućinskog kromatografa za analizu DSP toksina koji se primjenjuju u našem laboratoriju navedeni su u Tablici 3.2.4.2.

Tablica 3.2.4.2. Uvjeti rada tekućinskog kromatografa za analizu DSP toksina

kolona	Zorbax SB-C8, 50 x 2,1 mm, 3,5 µm		
protok	0,2 mL/min		
Volume injektiranja	5 µL		
Temp. kolone	30°C		
Gradijent	Vrijeme (min)	Mobilna faza A(%)*	Mobilna faza B (%)**
	0	90	10
	8	10	90
	11	10	90
	11.5	70	30
	17	90	10

*Mobilna faza A: 100% voda, 2 mM amonijev formijat i 50 mL mravlje kiseline [30].

**Mobilna faza B: 95 % acetonitril, 5 % voda, 2 mM amonijev formijat i 50 mM mravlje kiseline [30].

Maseni spektrometar mora biti optimiziran prije analiziranja pojedinog analita. Optimiziranje se obavlja primjenom certificiranih standardnih otopina visokih koncentracija (1ppm). Parametri koji su definirani za Agilent 6410 Triple Quad LC-MS/MS (Slika 3.2.4.9.) navedeni su u Tablici 3.2.4.3.

Tablica 3.2.4.3. MS/MS uvjeti rada Agilent 6410 Triple Quad LC-MS/MS sustav

Analit	Prekursor ion	Produkt ion	Polaritet	Fragmentor	Collizijska energija
OA	803,3	255,0	neg.	300	50
		112,8			68
DTX-1	817,2	255,0	neg.	300	74
		112,9			72
DTX-2	803,3	255,0	neg.	250	50
		112,6			66
YTX	1141,2	1061,1	neg.	240	38
		855,1			82
hYTX	1155,6	1075,3	neg.	240	36
		869,0			90
45 OH-YTX	1157,6	1077,6	neg.	240	37
		871,5			90
45 OH-homo YTX	1171,6	1091,6	neg.	240	37
		869,5			90
PTX-1	892,5	821,5	poz.	190	24
		213,2			40
PTX-2	876,1	823,2	poz.	190	24
		212,7			40
AZA-1	842,6	824,3	poz.	230	30
		806,1			42
AZA-2	856,1	838,3	poz.	210	30
		824,3			42
AZA-3	828,2	810,3	poz.	210	28
		792,1			42
GYM	508,0	490,1	poz.	160	22
		392,4			36
SPX	692,2	444,0	poz.	220	38
		163,8			56

Standardne radne otopine za kalibraciju pripremljene su iz početne (stock) otopine u kojoj su koncentracije za OA, DTXs, PTX-2, AZAs, SPX i GYM 400 ng mL^{-1} , a za YTXs 1000 ng mL^{-1} . Početna (stok) otopina dobivena je razrijeđivanjem certificiranih otopina za kalibraciju (National Research Council of Canada, Halifax, NS, Canada) s metanolom. Koncentracije standardnih radnih otopine su od 6 do 80 ng mL^{-1} for OA, DTXs, PTX-2, AZAs, SPX i GYM, te 15 do 200 ng mL^{-1} for YTXs.

3.2.5. Biološki učinci toksičnih i genotoksičnih tvari

Uzorci biološkog materijala dagnje *Mytilus galloprovincialis*, sakupljeni su na 10 postaja od Rovinja do Blaca (Slika 2.6.1., Tablica 2.6.1.) u periodu od 21 do 26 travnja 2013. Trideset jedinki je selekcionirano za određivanje općeg fiziološkog statusa dagnje (SOS). Iz 36 jedinki izolirana je probavna žlijezda za određivanje metalotioneina (Mtion), stabilnost lizosomalnih membrana (LMS) i neutralnih lipida (NL). Iz 15 jedinki izolirane su škrge za određivanje aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE) i cjelovitosti DNA (DNAx). Izolirana tkiva pohranjena su u tekući dušik te prenesena u Centar za istraživanje mora u Rovinju.

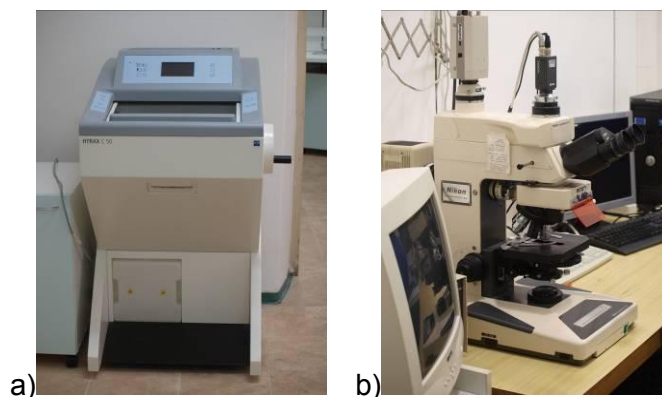
Uzorci morske vode (30 L) sakupljeni su na svim postajama, koncentrirani na kolonama punjenim s XAD-om te preneseni u Centar za istraživanje mora u Rovinju.

Uzorci riba (3 vrste po 5 jedinki po postaji) sakupljeni su na 5 postaja (F1, F4, F5, F8, F9). Jedinke su izvagane, jetra i žuč izolirani, izvagani, pohranjeni na $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Stabilnost lizosomalnih membrana (LMS)

Citokemijska metoda mjerenja stabilnosti lizosomalnih membrana u probavnoj žlijezdi dagnje *Mytilus galloprovincialis* široko je upotrebljavana kao osjetljiv biomarker općeg stresa uzrokovanog izloženošću dagnje onečišćivalima iz mora (Perić et al, 2012).

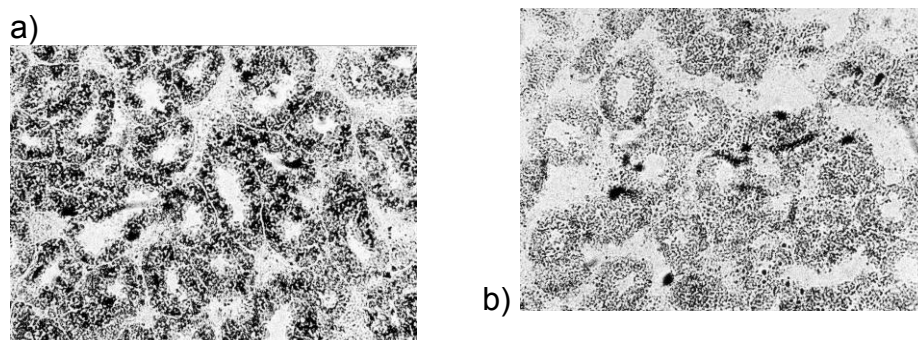
Tkivni presjeci probavne žlijezde dagnji dobivani visoko kvalitetnim kriostatom (Slika 3.2.5.1a.) obrađivani su standardnom procedurom prema Moore i sur., 1976.



Slika 3.2.5.1. a) Kriostat Hyrax C 50, Zeiss, Njemačka, b) Mikroskop Microphot-SA, Nikon, Japan.

Ukratko, niz prereza tkiva je inkubiran kroz različite vremenske periode u puferu za labilizaciju stanične membranene i potom u reakcijskoj otopini sa supstratom. Stabilnost

lizosomalne membrane određena je na temelju purpurnog obojenja lizosoma koje se javlja u reakciji hidrolitičkog lizosomalnog enzima N-acetil- β -heksosaminidaze i substrata naftol AS-BI N-acetil- β -glukozamina. Presjeci su analizirani pod svjetlosnim mikroskopom (Slika 3.2.5.1b) i na temelju maksimalnog intenziteta obojenja određeno je vrijeme potrebno za destabilizaciju lizosomalne membrane (Slika 3.2.5.2. a i b).

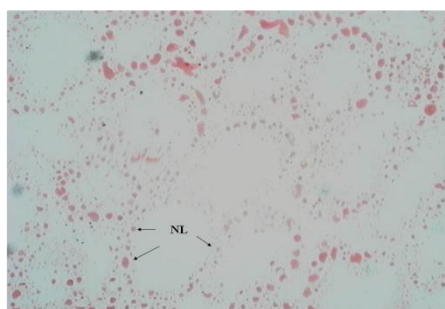


Slika 3.2.5.2. Aktivnost lizosomalnog markera N-acetil- β -heksaminidaze u probavnoj žlijezdi dagnje *Mytilus galloprovincialis*:(a) dagnja sa referentne postaje. (b) dagnja sa zagađene postaje. Povećanje 200x.

Neutralni lipidi (NL)

Akumulacija neutralnih lipida u stanicama probavne žlijezde indikator je izlaganja organskim zagađivačima (Petrović et al, 2004) koji utječu na metabolizam neutralnih lipida dovodeći do njihove abnormalne akumulacije u lizosomima.

Akumulacija neutralnih lipida određivana je u tkivnim presjecima probavne žlijezde prema metodi Bancroft (1967). Uzorci su analizirani pod mikroskopom a količina neutralnih lipida određena pomiču analizatora slika (Slika.3.2.5.3.).



Slika 3.2.5.3. Kapljice neutralnih lipida (NL) određene metodom po Bancroftu, 1967 [34] u presjecima probavne žlijezde dagnje *Mytilus galloprovincialis*.

Sadržaj metalotioneina (Mtion)

Metalotioneini su citosolni polipeptidi niske molekularne težine, bogati cisteinom koji su uključeni u homeostazu esencijalnih odnosno detoksifikaciju ne-esencijalnih metala. Povišena razina metalotioneina indikator je stresa izazvanog zagađenja metalima i određivanje sadržaja metalotioneina u probavnoj žlijezdi dagnje *Mytilus galloprovincialis* koristi se za određivanje biološkog učinka zagađenja metala u morskom okolišu (Perić et al, 2012).

Sadržaj metalotioneina u tkivu probavne žlijezde dagnji mjeri se preciznom i osjetljivom metodom određivanja tiolne - SH grupe metalotioneina. Ukratko, nakon homogeniziranja tkiva,

određuje se ukupna količina protein u homogenate. –SH grupa metalotioneina reagira s DTNB (Ellman - ov reagens: 5.5'-ditiobis-2-dinitrobenzoična kiselina), i nastaje TNB (tionitrobenzoat), žuto-obojen produkt s maksimalnom absorbancijom na 412 nm, koja se mjeri spektrofotometrijski (Slika 3.2.5.4.). Sadržaj metalotioneina se određuje prema kalibracijskoj krivulji reduciranog glutationa.



Slika 3.2.5.4. Spektrofotometar UV/VIS DMS 80, Varian, SAD.

Aktivnost acetilkolinesteraze (AChE)

Acetilkolinesteraza (AChE) neophodna je za normalni prijenos živčanih signala. Enzim je specifično inaktiviran organofosornim i karbamatnim pesticidima (OP's) koji se široko upotrebljavaju u poljoprivredi i marikulturi kao zaštitne tvari protiv insekata i parazita. Prepoznati su kao potencijalne štetne tvari za zdravlje vodenih organizama. Aktivnost AChE u škrgama dagnje se rutinski koristi kao biomarker izloženosti OP i karbamatima u moru (Perić and Petrović, 2011). Određivanje aktivnosti AChE se provodi brzom i osjetljivom kolorimetrijskom metodom prema Ellmanu, (1961). Metoda se osniva na reakciji tiokolina koji je produkt hidrolize substrata DTNB (Ellman-ov reagens: 5.5'-ditiobis-2-dinitrobenzoična kiselina) i AChE. U ovoj reakciji, žuto obojen TNB (tionitrobenzoat) je produkt koji ima koeficijent maksimalne absorbancije na of 412 nm. Nakon hidrolize substrata do koje dolazi djelovanjem enzima AChE, promjene absorbacije TNB mjeri se spektrofotometrijskim mjerenjem u mikropločama (Slika 3.2.5.5.). Aktivnost AChE se izračunava kao brzina reakcije iz nagiba krivulje ovisnosti promjene absorbancije s vremenom.



Slika 3.2.5.5. Spektrofotometar za mikroploče, Multiscan Ascent, Labsystems, Finska.

Microtox® test toksibiomjerenje morske vode (TOXw)

Potencijalna toksičnost organskih ekstrakata morske vode se mjeri bakterijskim Microtox biomjerenjem. Testira se inhibicija luminiscencije morske bakterije *Vibrio fischeri* nakon kratke 15 minutne izloženosti onečišćivalima otopljenim u vodi. Test je široko prihvaćen kao metoda određivanja akutne toksičnosti, standardiziran u mnogim državama (npr. NVN 6516, DIN 38412 en AFNOR T90-320) i uspješno primjenjen za određivanje kvalitete morske vode duž Jadranske obale [39]. Organski ekstrakt morske vode. Organski ekstrakt morske vode se priređuje iz koncentrata nepolarnih spojeva iz 30 L morske vode koja je koncentrirana u kolonama punjenim s Amberlite-om XAD-7 (20 mL) na mjestu uzimanja uzorka i to gravitacijski brzinom od 200 ml/min. Adsorbirani spojevi se eluiraju s 150 ml acetone i ekstrahiraju s diklormetanom. Ekstrakti se upare do suha, otope u 300 µl dimetilsulfoksida (DMSO) i pohrane na -20 °C. Luminiscencija bakterija se mjeri nakon izloženosti bakterija seriji od 8 razrijeđenja ekstrakta prema BioFix® Lumi procedure propisanoj od Macherey-Nagel, Njemačka, u Microtox® Model 500 luminometru (AZUR, Environmental, SAD) (Slika 3.2.5.6). Za mjerenje toksičnosti, 25 µl of the ukupnog organskog ekstrakta koji odgovara količini od 2500 mL morske vode ,u 1 mL pufera za razrijeđivanje (2 % NaCl), smatra se početnom količinom za slijedećih 7 razrijeđenja (1:2) svakog uzorka. Rezultati se izražavaju kao volumen (mL) morske vode koji uzrokuje 50 % smanjenja bioluminiscencije nakon 15 min (EC₅₀). Za izračun EC₅₀ koristio se MicrotoxOmniTM Software paket.



Figure 3.2.5.6. Luminometar Microtox® Model 500, AZUR, SAD.

Microtox® test toksičnost mjerenje sedimenta (TOXs)

Potencijalna toksičnost morskog sedimenta se mjeri bakterijskim Microtox® biomjerenjem. Microtox® solid phase test je test akutne toksičnosti za krute uzorke koji se zasniva na inhibiciji prirodne bioluminiscencije morske bakterije *Vibrio fischeri*. Princip metode je da se toksičnost detektira nakon što bakterije dođu u direktni kontakt sa toksikantima otopljenim i vezanim na površini čestica sedimenta. Rezultati ovog testa su usporedivi s rezultatima testova na bentičkim organizmima. Testiranje toksičnosti sedimenta provedeno je po uputama za Microtox solid phase test (SPT), Azur Environmental, (1998), a EC₅₀ izmjeren u Microtox® Model 500 luminometru (AZUR, Environmental, SAD) (Slika. 3.2.5.6) Morski sediment je po uzorkovanju smrznut na -20 °C. Mokri sediment (7 g) je resuspendiran u 35 mL otopine za razrijeđivanje (Macherey-Nagel, Njemačka) uz mješanje (1000 okr/min) 10 min. Poduzorci (1500 mL) ove suspenzije serijski su razrijeđeni (15 razrjeđenja) u duplikatu. Razrjeđenja su ekvilibrirana

10 min u vodenoj kupelji na $15 \pm 0,2$ °C, a zatim je dodano svakom razrjeđenju 20 μ L bakterija, smjesa promiješana i inkubirana u vodenoj kupelji još 20 min. Potom su bakterije odvojene od suspenzije sedimenta filtracijom (Microtox Solid-Phase Test Filter Columns/tubes, Macherey-Nagel, Njemačka) a 500 μ L vodene faze je prenešeno u staklene kivete za mjerenje luminescencije. Intenzitet emitirane svjetlosti izmjeren je u luminometru i EC_{50} (po gramu suhe težine) izračunat uz pomoć MicrotoxOmni software inačica 1.18 (Azur Environmental).

Preživljavanje na zraku – „Stress on stress“ (SOS)

Fiziološko stanje dagnje *Mytilus galloprovincialis* odražava integrirani učinak kompleksne smjese zagađivala u okolišu. Određivanje preživljavanja dagnji na zraku pokazalo je da dagnje sa područja pod utjecajem ljudskih aktivnosti imaju narušenu sposobnost adaptacije na stress a dagnje koje žive u zagađenom morskom okolišu imaju reducirano vrijeme preživljavanja na zraku. Za određivanje preživljavanja na zraku dagnje su smještene u posude (30 jedinki po posudi) u vlažnoj atmosferi na 16°C. (Slika 3.2.5.7.) i preživljavanje je određivano svakodnevno. Dagnje su se smatrale uginulima na temelju slijedećih simptoma: karakterističan miris, izostanak mišićne aktivnosti i otvorene ljuštore. Prosječno vrijeme preživljavanja (LT_{50}) je za svaku grupu školjaka izračunato pomoću probit analize koristeći Toxicologist Ver. 1.0 računalni program.



Slika 3.2.5.7. Određivanje preživljavanja na zraku.

Test genotoksičnosti morske vode (umu)

Prisutnost genotoksičnih tvari u vodi, sedimentu, elutriatima može biti štetno za vodene i kopnene ekosustave. Najrašireniji test za određivanje genotoksičnosti je SOS/umu-test (umu-test). Koristi se za detekciju primarnih oštećenja DNA, i popravka DNA induciranih onečišćivalima u okolišu (Bulich, 1986, Bihari, 2004). Test je standardiziran (ISO/DIS 13829, 2000) i predložen za uporabu u baterijama testova.

Umu test koristi genetski modificiranu bakteriju *Salmonella typhimurium* (strain TA 1535) s ugrađenim plazmidom koji sadrži umuC gen i lacZ gen (pSK1002), gene koji kodiraju za β -galaktozidazu. Aktivacija umuC gena inducirana agensima koji oštećuju DNA (SOS odgovor) određena je kao porast aktivnosti β -galaktozidaze activity koja se mjerila kolorimetrijski na 420 nm u spektrofotometru (Slika 3.2.5.5.). Rast bakterija je mjen kao turbiditet na 600 nm i uključen u izračun rezultata testa.

Test se izvodio u mikropločama koristeći 30 μ L ekstrakta morske vode u 5 serijskih razrjeđenja (1:1) i koncentracijski faktor (30 litara morske vode ekvivalentno je 300 μ L ekstrakta). Genotoksičnost je izmjerena u jedinicama aktivnosti β -galaktozidaze i izražena kao indukcijski

omjer (IR) obzirom na aktivnost u kontrolnom uzorku. Indukcijski omjeri iznad 1.5 smatrani su pozitivnim rezultatom testa koji određuju minimalnu koncentraciju genotoksičnog uzorka koja izaziva statistički značajno povećanje aktivnosti u odnosu na kontrolu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost triplikata mjerenja. Kao pozitivna kontrola korišten je standardni genotoksin 4- nitrokvinolin-N-oksidi (4-NQO, Sigma, Njemačka).

Test genotoksičnosti na dagnjama (DNAx)

Za određivanje genotoksičnog potencijala u morskom okolišu koriste se mjerenja promjena na DNA kao npr. mjerenje primarnih oštećenja DNA tj. lomova lanaca DNA. Fast Micromethod® analiza detektira promjene obrasca denaturacije uzvojnice DNA u vremenu (integritet DNA) izazvane alkalnim uvjetima (Smodlaka Tanković M. et al., 2012).

Fast Micromethod® primijenjena je kako je opisano u Batel i sur., (1999). Metoda uključuje brzu (40 min) i jednostavnu lizu stanica u prisutnosti EDTA, SDS, visoke koncentracije uree kod pH 10, iza koje slijedi denaturacija DNA nakon dodavanja NaOH (pH 12,4). Genotoksični učinak okoliša na dagnje utvrđen je pomoću određivanja integriteta DNA u stanicama škrga dagnje. Praćena je vremenska ovisnost i intenzitet denaturacije DNA u mikropločama (30 ng DNA po jažici) mjerenjem fluorescencije DNA/PicoGreen kompleksa kroz 30min (Slika 3.2.5.8.). DNA integritet je izračunan nakon 7-10 minuta denaturacije i izražen kao strand scission factors (SSFs).



Slika 3.2.5.8. Fluoroskan Ascent, Labsystems, Finska.

Analiza metabolita u žuči ribe

Nekoliko vrsta riba (*Bobs bobs*, *Mugil auratus*, *Mullus barbatus*) dostupnih na tržnicama duž Jadranske obale (F1, F4, F5, F8, F9) korišteno je za monitoring onečišćenja policikličkim aromatskim ugljikovodicima (PAU). Metaboliti PAU analizirani su mjerenjem fluorescencije na fluorimetru (Slika 3.2.5.9.). Uzorci žuči razrijeđeni su (1:1000) sa smjesom etanol/voda (50:50 v/v) i potom im je izmjerena fluorescencija (FF) za parove valnih duljina 290/335, 341/383, i 380/430 nm koji su izraženi kao FF_{290/335}, FF_{341/383} i FF_{380/430} [49]. Par FF_{290/335}, uglavnom detektira naftalenske metabolite, tipične za naftu, FF_{380/430} metabolite benzo[a]pirena i FF_{341/383} metabolite pirena. Fluorescencija je mjerena u kvarcnim kivetama, a FF vrijednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama obzirom na fluorescenciju otapala [50].



Slika 3.2.5.9. Fluorimetar SFM 25 , Kontron Instruments, Švicarska.

3.3. Biološki parametri

3.3.1. Fitoplankton

Određivanje koncentracije klorofila a

Procjena veličine fitoplanktonske biomase određuje se mjerenjem koncentracije klorofila a. Klorofil a u uzorcima morske vode određivati će se fluorimetrijskom metodom (Strickland i Parsons, 1972).

Uzorcima morske vode filtriraju se na uređaju za filtraciju uz vakuum do 65 Kpa (Slika 3.3.1.1) kroz staklene filtere "Whatman" GF/F (Slika 3.3.1.2), promjera 47 mm i promjera pora oko 0,7 μm . Za ove analize filtrira se 500 ml morske vode osim u slučaju intenzivnih fitoplanktonskih cvatnji kada je dovoljno 100-200 ml morske vode.



Slika 3.3.1.1. Uređaj za vakum filtriranje morske vode

Nakon filtriranja filteri se pohrane u zamrzivač, a fluorometrijska analiza se mora obaviti u roku od mjesec dana. Filter sa sadržajem se homogenizira uz dodatak 90 % acetona. Suspenzija se prelije u epruvetu za centrifugiranje, a homogenizator ispere s 90 % acetonom. Ekstrakt sakupljen u epruveti nadopunjen je acetonom do 10 ml, nakon čega se ostavi u mraku (do 30 min.) da bi se završila ekstrakcija pigmentata. Acetonski ekstrakt se zatim centrifugira 5 –

10 minuta na 5000 G (Slika 3.3.1.3). Nakon toga supernatant se prebaci u kivetu i odredi mu se fluorescencija na laboratorijskom fluorometru TD 700 prije (Slika 3.3.1.3) i nakon zakiseljavanja (2 kapi 0,1M HCl).



Slika 3.3.1.2. Stakleni filteri za filtriranje morske vode za određivanje koncentracije klorofila a



Slika 3.3.1.3. Uređaji koji se koriste za određivanje koncentracije klorofila a: centrifuga, Turner fluorometar i homogenizator.

Koncentracija klorofila *a* izračuna se prema jednadžbi (Strickland i Parsons, 1972):

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

- F_D - faktor vrata izražen u $\text{mg } m^{-3}$ i po jedinici fluorescencije
- T - odnos fluorescencije klorofila *a* prije i poslije zakiseljenja (R_B/R_A)
- R_B - fluorescencija uzorka prije zakiseljenja
- R_A - fluorescencija uzorka poslije zakiseljenja
- v - volumen ekstrakta klorofila *a* u litrama
- V -volumen profiltriranog uzorka u litrama

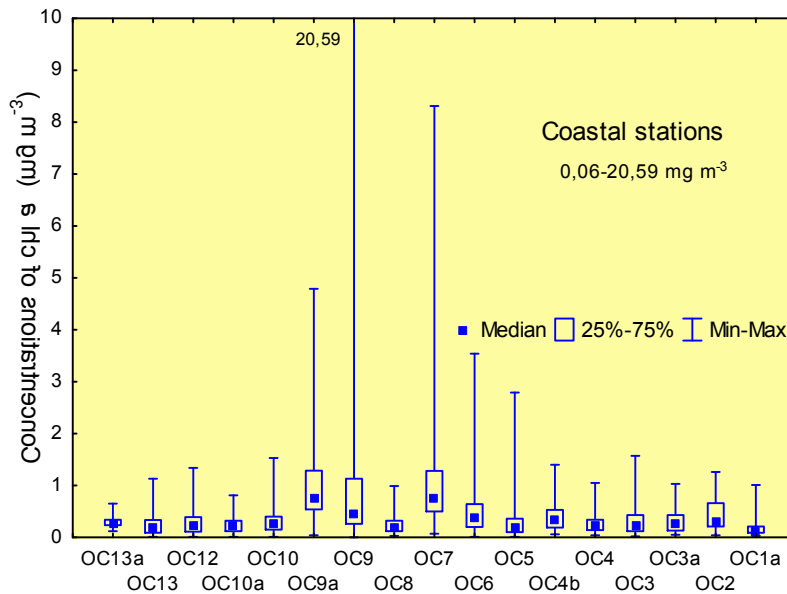
Za procjenu biomase fitoplanktona danas se koristi više metoda, pri čemu se do rezultata može doći posrednim ili neposrednim putem. Najjednostavnija, a istodobno i najčešće korištena metoda je metoda određivanja koncentracije klorofila *a*, preko koje se do rezultata dolazi posrednim putem. Prednosti ove metode su što je brza, jednostavna, ne zahtijeva veliki volumen vode, a budući da je i najčešće upotrebljavana metoda diljem svijeta rezultati su lako usporedivi. Koncentracija klorofila *a*, kao glavnog fotosintetskog pigmenta, pruža veoma dobar uvid u visinu biomase fitoplanktona, ali ne daje uvid u strukturu fitoplanktonske zajednice. Ipak za procjenu trofičkog statusa najbolje su neposredne metode, odnosno mikroskopska analiza uzoraka, koja uključuje brojenje stanica, određivanje njihovog plazmatskog volumena i determinaciju vrsta. Najbolje rezultate pruža kombinacija posrednih i neposrednih metoda, koja daje uvid u visinu biomase fitoplanktona, starosnu strukturu zajednice i raznolikost vrsta unutar zajednice, prema čemu se dosta pouzdano može odrediti trofički status područja.

Trofički stupanj nekog područja veoma se dobro ogledava kroz visinu primarne proizvodnje, odnosno kroz veličinu biomase stvorene procesom primarne proizvodnje. Primarna proizvodnja je proces izgradnje organskih spojeva iz anorganskih, spojeva, odnosno prvi korak u pretvorbi neživog anorganskog materijala u živu organsku tvar. Najveći dio organske tvari proizvodi se fotosintetskim procesom u kojem se koristi svjetlosna energija, ugljični dioksid i hranjive soli (nitrati, nitriti, amonijeve soli, ortofosfati i silikati). Organska se tvar, stvorena procesom primarne proizvodnje, putem hranidbenih lanaca prenosi na više trofičke stepenice, odnosno u procesu sekundarne proizvodnje služi za izgradnju mnogo složenijih organskih spojeva. Bakterijskom razgradnjom organske tvari se zatvara krug u kojem se neprekidno odvija kruženje materije i energije kroz ekosustav. U ovom je kruženju vidljivo značenje primarne proizvodnje, jer se na njoj direktno temelji cjelokupna sekundarna proizvodnja. Proces primarne proizvodnje svojstven je jedino biljnim, autotrofnim organizmima, a u morskom ekosustavu najveći dio biljnih organizama čine fitoplanktonski organizmi. To su jednostanični, mikroskopski sitni organizmi koji predstavljaju najveću količinu organske biomase u moru, a shodno tome, u tom je dijelu vezana i najveća količina energije.

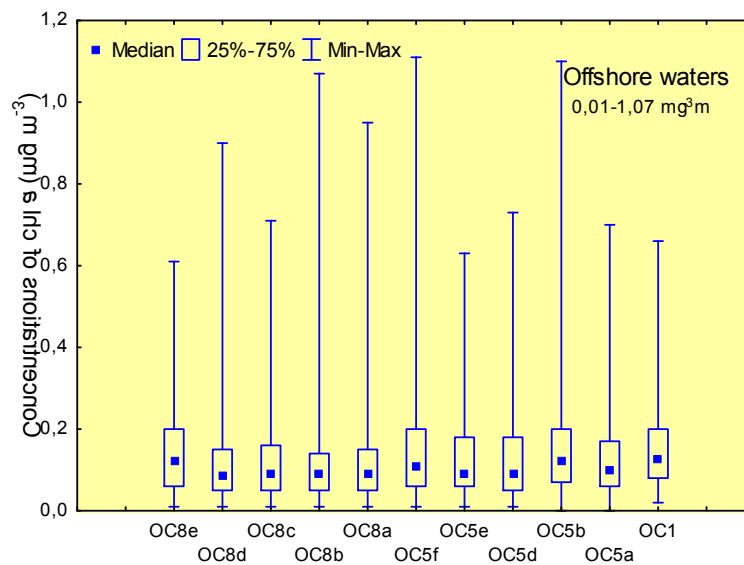
Svaki poremećaj ravnoteže u morskom ekosustavu najprije se odražava na ovoj prvoj trofičkoj stepenici, pa je praćenjem primarne proizvodnje moguće steći vrlo dobar uvid u cjelovito stanje morskog ekosustava. Porast primarne proizvodnje, najčešće je uvjetovan povećanom dostupnošću hranjivih soli, a do određenog stupnja ovaj proces ima pozitivan učinak na sekundarnu proizvodnju i na cjelokupni ekosustav. Ipak, kada se obogaćenje hranjivim solima odvija ubrzano, odnosno kada hranjive soli u povećanoj količini kontinuirano pristižu u morsku sredinu, rast primarne proizvodnje počinje izmicati kontroli, koja se uglavnom odvija putem sekundarne proizvodnje. Taj nesklad između primarne i sekundarne proizvodnje, u pravilu se očituje u vidu neuobičajenih fitoplanktonskih cvatnji. Bakterijska razgradnja velike količine neiskorištene organske mase veoma često izaziva hipoksiju, a ponekad čak i anoksiju u morskoj sredini, što dovodi do pomora morskih organizama, poglavito onih koji obitavaju u

pridnenim slojevima. Učestalost ovih pojava osnovni je pokazatelj degradacije okoliša, koja se najčešće javlja kao posljedica negativnog antropogenog djelovanja.

Visoke koncentracije klorofila *a* (iznad 1 mg m⁻³) ukazuju na veći stupanj trofije. U Jadranskom moru, koncentracije klorofila u obalnim vodama najčešće su ispod 1,00 mg m⁻³. Izuzetak su eutrofizirana područja kao što su Kaštelanski (OC6, OC7) i Šibenski zaljeva (OC9), gdje su znatno više koncentracije klorofila *a* (Slika 3.3.1.4). Koncentracije klorofila, na otvorenom moru su do 1,00 mg m⁻³ (Slika 3.3.1.5).

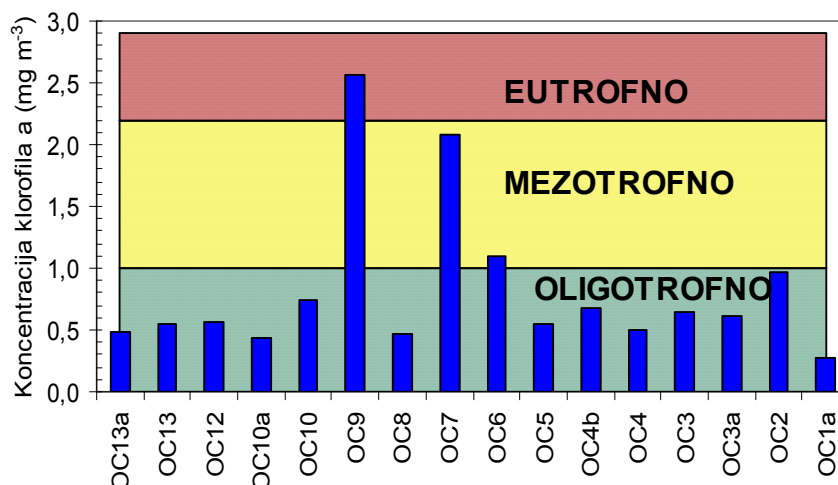


Slika 3.3.1.4. Koncentracije klorofila *a* u obalnim vodama u razdoblju od 2000. do 2010. godine

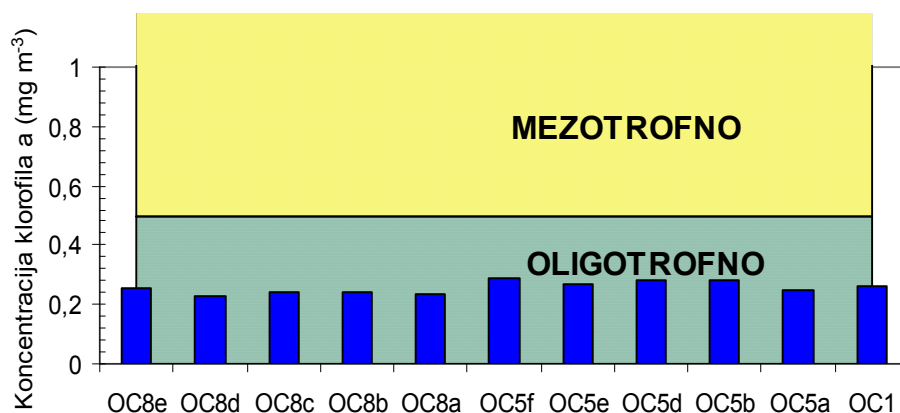


Slika 3.3.1.5. Koncentracije klorofila *a* u otvorenim vodama u razdoblju od 2000. do 2010. godine

Hrvatske obalne vode najvećim su dijelom oligotrofne s obzirom na biomasu fitoplanktona osim nekoliko područja koja su pod jakim slatkovodnim i / ili antropogenim utjecajem (Slika 3.3.1.6). Otvorene vode su oligotrofna područja (Slika 3.3.1.7).

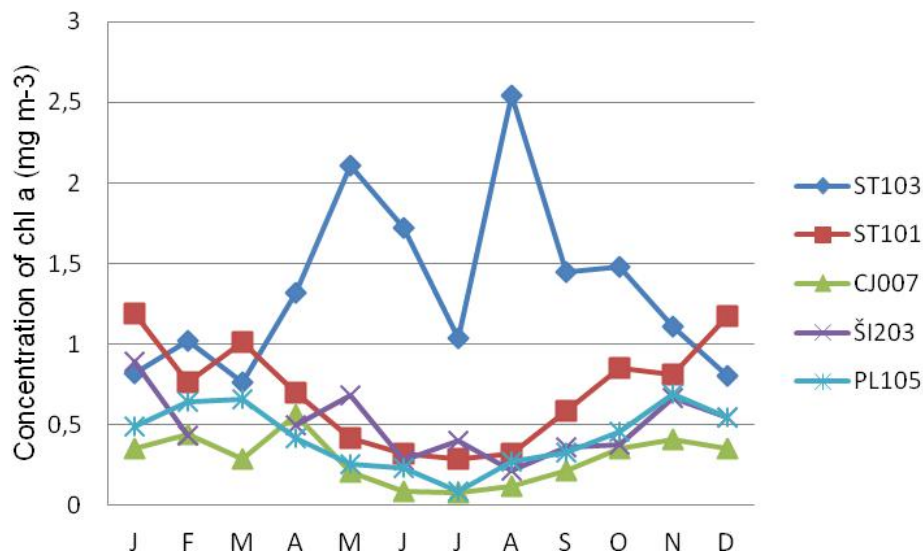


Slika 3.3.1.6. Koncentracije klorofila a (90 percentile) na istraživanim postajama u obalnim vodama u razdoblju od 2000. do 2010. godine



Slika 3.3.1.7. Koncentracije klorofila a (90 percentile) na istraživanim postajama u otvorenim vodama u razdoblju od 2000. do 2010. godine

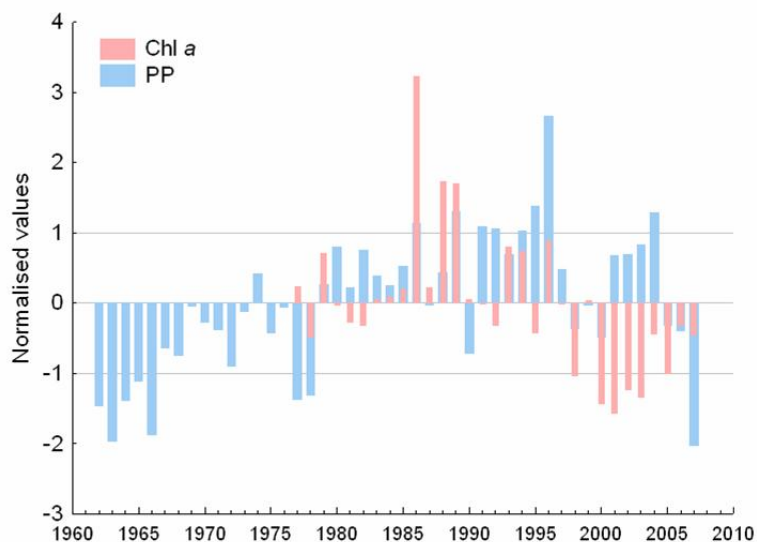
Sezonski ciklus fitoplanktona također je dobar pokazatelj trofičkog stanja nekog područja. Sezonski ciklus fitoplanktona ima dva maksimuma, intenzivniji proljetni i nešto slabiji jesenski maksimum, koji su najvećim dijelom uvjetovani količinom raspoložive svjetlosti i hranjivih soli. U proljetnom razdoblju dani postaju duži i veća je količina svjetlosti na raspolaganju, a koncentracija hranjivih soli je nakon turbulentnog zimskog miješanja homogeno raspoređena u stupcu vode. Ljetno razdoblje karakterizira pad biomase fitoplanktona uzrokovan nedostatkom hranjivih soli u površinskom sloju, a sezonska stratifikacija onemogućava mješanje i dotok nutrijenata u površinski sloj. U jesenskom razdoblju dolazi do hlađenja površinskog sloja koji onda postaje teži od pridnenog i tone na dno dok se pridneni sloj vode bogat hranjivim solima podiže u površinski sloj. Tijekom jeseni još uvijek ima dovoljno svjetlosti da podrži intenzivniji rast fitoplanktona. Jesenski maksimum fitoplanktona u Jadranu često je pomaknut i u zimsko razdoblje ovisno o klimatskim i meteorološkim karakteristikama pojedine godine. Pravilan sezonski ciklus (Slika 3.3.1.8.) ukazuje na zadovoljavajući trofički status neko nekog područja dok nepravilan sezonski ciklus, sa visokim koncentracijama klorofila a u ljetnom razdoblju, ukazuje na postojanje dodatnog izvora hranjivih soli uzrokovanog ljudskom djelatnošću.



Slika 3.3.1.8. Sezonska raspodjela koncentracije klorofila a na postajama smještenim u obalnim vodama

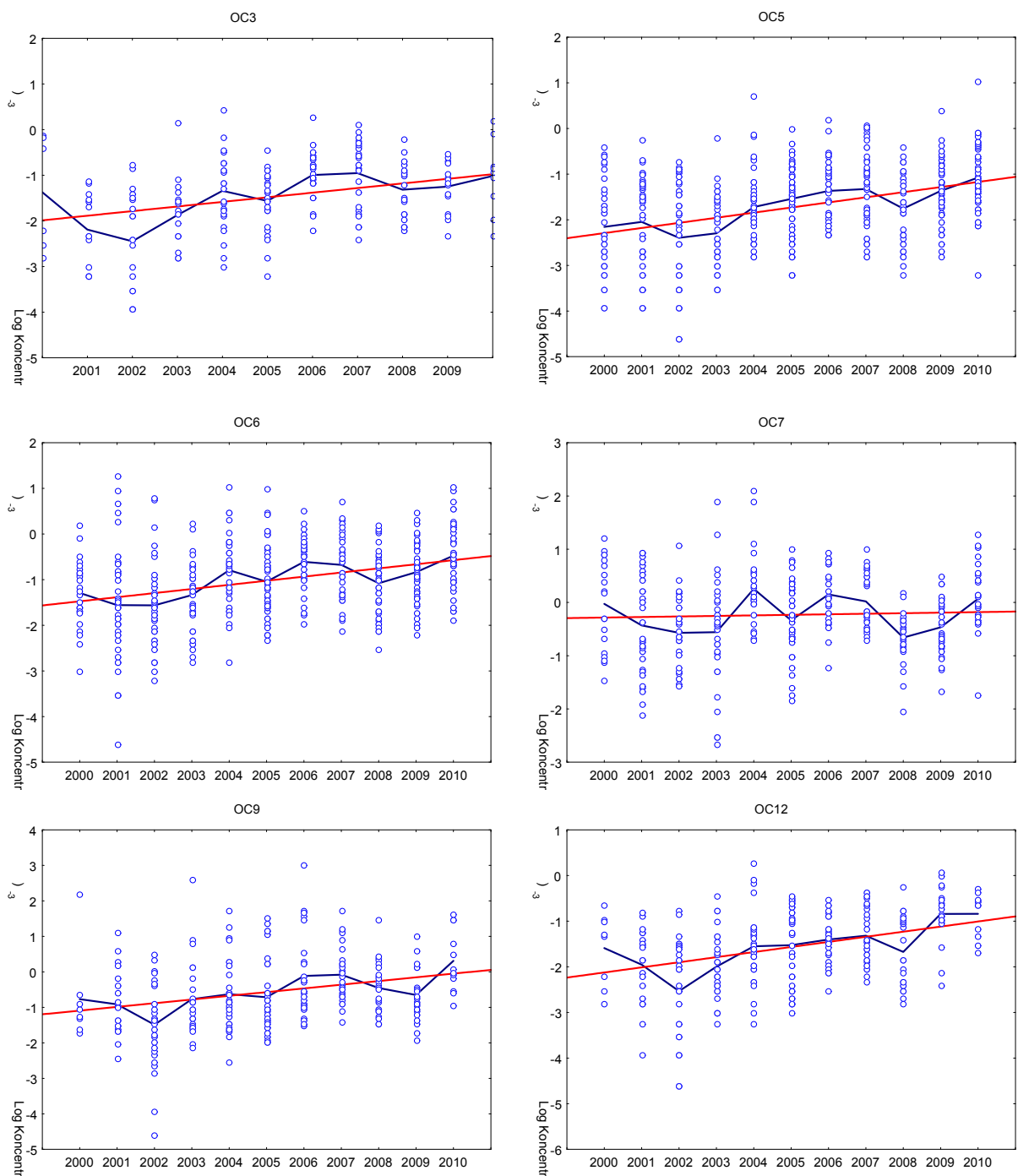
Ljetni maksimum biomase fitoplanktona dugogodišnja je karakteristika istočnog dijela Kaštelanskog zaljeva (ST 103) (Slika 3.3.1.8) koji je pod snažnim antropogenim utjecajem uvjetovanim brojnim industrijskim i kanalizacijskim otpadnim vodama, kao i poljoprivrednom djelatnošću ljudi ovoga područja.

Analiza dugogodišnjih nizova podataka pokazala je visoke koncentracije klorofila a u razdoblju od sredine 80-tih do sredine 90-tih nakon čega je zabilježen trend opadanja biomase (Slika 3.3.1.9).

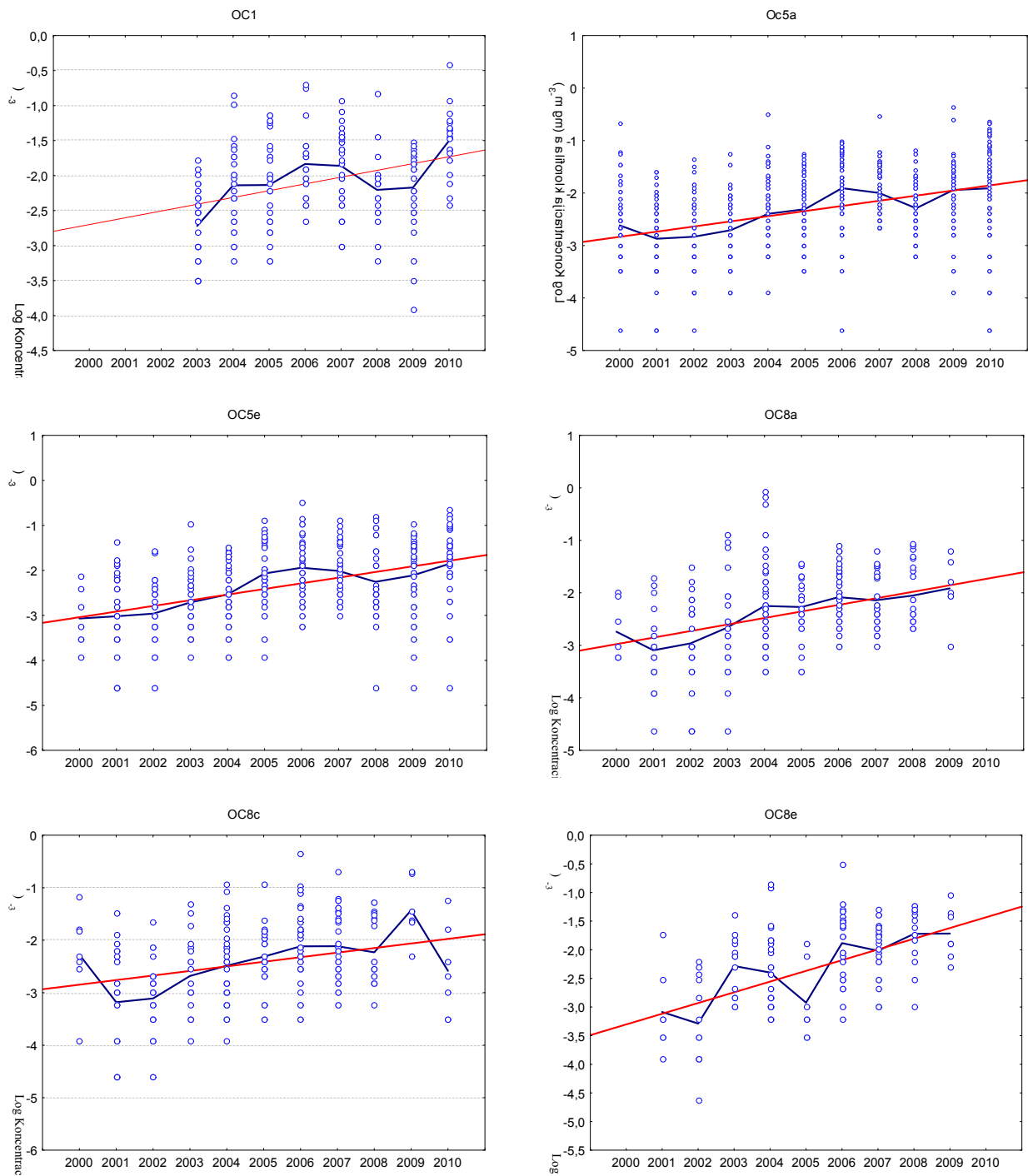


Slika 3.3.1.9. Normalizirane vrijednosti dugogodišnjih nizova podataka za koncentraciju klorofila a i primarnu proizvodnju u Kaštelanskom zaljevu

U posljednjih je deset godina (2000-2010) zabilježen trend porasta biomase u obalnim i otvorenim vodama (Slike 3.3.1.10. i 3.3.1.11.). Iako je zabilježen trend porasta, vrijednosti biomase u obalnim vodama još su uvijek niže od onih iz razdoblja sredine 80-tih i 90-tih godina.



Slika 3.3.1.10. Višegodišnja analiza koncentracije klorofila a na postajama u obalnim vodama srednjeg i južnog Jadrana (plavi kružići-pojedinačna mjerenja; tamnoplava crta-godišnji srednjaci; crvena crta-linearni trend)



Slika 3.3.1.11. Višegodišnja analiza koncentracije klorofila a na postajama u otvorenim vodama srednjeg i Južnog Jadrana (plavi kružići-pojedinačna mjerenja; tamnoplava crta-godišnji srednjaci; crvena crta-linearni trend)

Određivanje sastava i gustoće fitoplanktonske zajednice

Za određivanje sastava fitoplanktonske zajednice koristi se metoda po Ultermöhl-u (1958). Uzorci morske vode uzimaju se crpcima na standardnim oceanografskim dubinama, a zatim se fiksiraju s 0,5 % - tnom otopinom glutaraldehida. Uzorci se do obrade na mikroskopu čuvaju na hladnom i tamnom mjestu. Neposredno prije mikroskopiranja uzorci morske vode sedimentiraju se u komoricama za sedimentaciju (Slika 3.3.1.12). Uzorci obalnog područja sedimentiraju se u komoricama od 25 ml, a uzorci otvorenog mora sedimentiraju se u komoricama od 100 ml. Vrijeme sedimentacije za obalno područje iznosi najmanje 24 sata dok je za otvoreno more najmanje 72 sata.



Slika 3.3.1.12. Komorice za sedimentaciju uzoraka morske vode

Nakon sedimentacije određivanje fitoplanktonskih vrsta i brojenje stanica obavlja se na obrnutom mikroskopu (Slika 3.3.1.13) uz povećanje od 400 puta.

Za određivanje taksonomskog sastava fitoplanktona koriste se slijedeći priručnici: Van Heurck, 1899; Peragallo, 1908; Lebour, 1925; Gemeinhardt i Schiller, 1930; Hustedt, 1930, 1931; Schiller, 1933, 1937; Cupp, 1943; Proškina Lavrenko, 1955; Wall i Dale 1968; Parke i Dixon, 1976; Lassus, 1980; Dodge, 1982; Sournia, 1986; Ricard, 1987; Chrétiennot-Dinet, 1990; Tomas, 1993, 1995.

Strategija brojenja fitoplanktonskih stanica ovisi o cilju istraživanju. Postoje tri strategije brojenja fitoplanktonskih stanica:

1. Brojenje slučajno odabranih polja
2. Brojanje u transektu
3. Brojenje čitavog dna komorice



Slika 3.3.1.13. Analiza uzoraka na obrnutom mikroskopu

Izračunavanje brojnosti

U slučaju brojanja stanica u slučajno odabranim vidnim poljima broj stanica u litri morske vode izračunati prema sljedećoj formuli:

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

N- broj stanica (L⁻¹)

P- površina dna komorice

X- srednja vrijednost broja stanica po vidnom polju

p- površina vidnog polja

V- volumen uzorka (L)

U slučaju brojanja stanica u jednom transektu (Slika 3.3.1.14) broj stanica u litri morske vode dobiva se na sljedeći način:

Broj stanica u jednom transektu pomnožiti s faktorom F, kako bi se dobio broj stanica u analiziranom volumenu poduzorka, odnosno u komorici

Faktor (F) za određeno povećanje mikroskopa izračunati na način da se površina dna komorice (P) podijeli s površinom transekta (p)

Primjer:

Ako je u jednom transektu poduzorka volumena $V=50$ ml izbrojeno 10 stanica vrste A i 5 stanica vrste B, ukupni broj stanica u komorici bit će slijedeći:

$$N_{A,B} = (10+5) \times F = 15 \times F$$

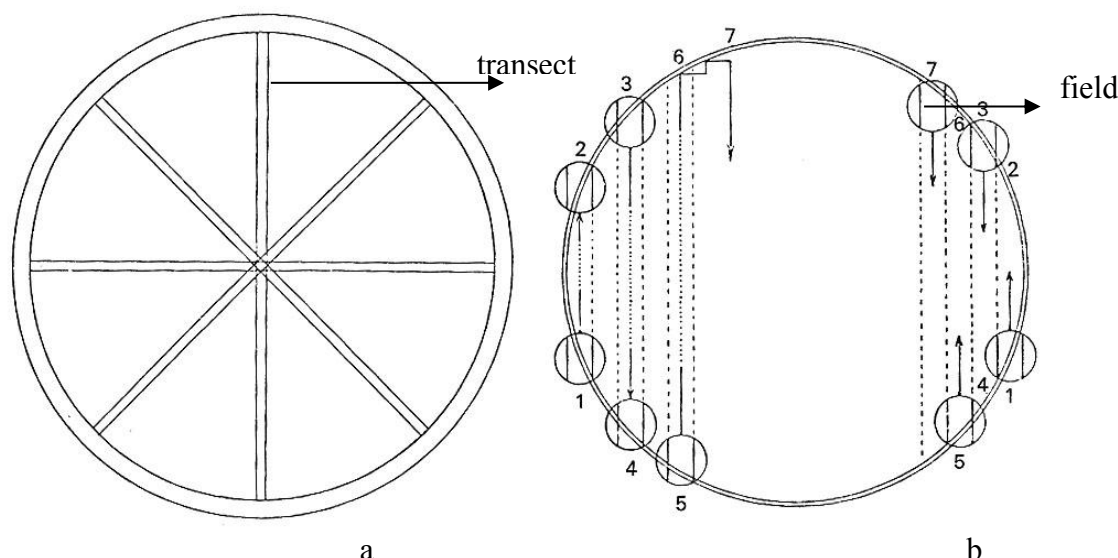
Ukupni broj stanica u litri morske vode računa se na sljedeći način:

$$N_{A,B} \text{ (stanica L}^{-1}\text{)} = 15 \times F \times (1000/50) = 15 \times F \times 20$$

U slučaju brojanja stanica u cijelom dnu komorice, izbrojeni broj stanica se preračuna u broj stanica u litri.

Primjer:

Ako je u čitavoj komorici volumena $V=25$ ml izbrojeno 6 stanica, ukupni broj stanica po litri biti će 6×40 .



Slika 3.3.1.14. a) Poprečni presjek dna komorice i dijametralni transekti b) Pomicanje vidnog polja po transektima po dnu komorice

Kvalitativna nesigurnost

Kvalitativna nesigurnost podrazumjeva pogrešnu identifikaciju ili neodređivanje pojedinih vrsta. Može se izraziti u obliku izjave na osnovu unutarlaboratorijskih i međulaboratorijskih usporedbi. Ova izjava može biti u obliku maksimalnog postotka pogrešnih identifikacija.

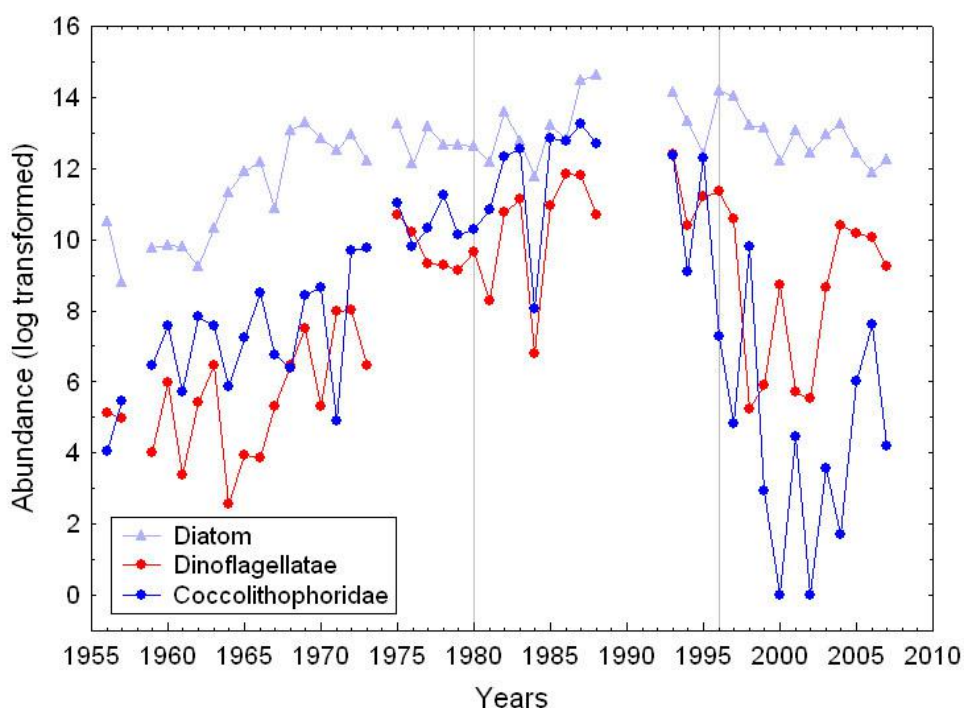
Kvantitativna nesigurnost

Mjerna nesigurnost može se sagledati kroz veći broj unutar laboratorijskih ponavljanja i odstupanje od prave vrijednosti. Točan kvantitativni sastav uzorka je jako teško procijeniti i on zapravo uvijek ostaje nepoznat. Usprkos tome može se izvesti relativna mjerna nesigurnost na osnovu odstupanja od srednje vrijednosti dobivene međulaboratorijskim ispitivanjima (ako je moguće).

Kvantitativna nesigurnost ovisi o brojnosti određene vrste u uzorku, odnosno mjerna nesigurnost procijenjene brojnosti određene vrste može biti veća ili manja nego neke druge

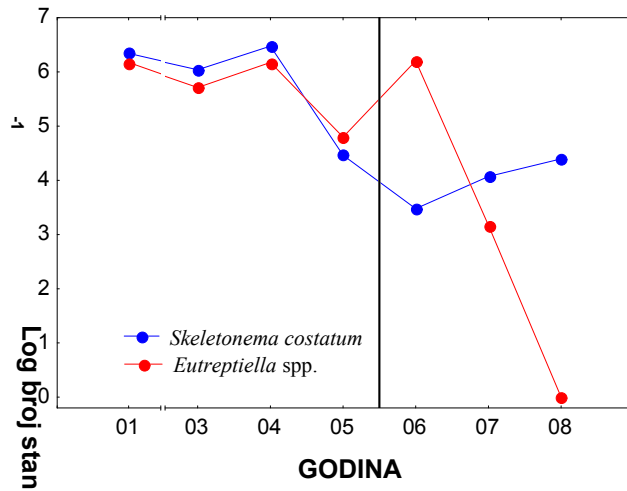
vrste u uzorku. Općenito se mjerna nesigurnost povećava sa smanjenjem brojnosti. Prema tome mjerna nesigurnost ne može se izraziti kao jedna vrijednost za jedan uzorak.

Određivanje sastava i brojnosti fitoplanktonske zajednice daje nam uvid u sezonske promjene sastava fitoplanktonske zajednice kao i u dugogodišnje promjene koje se odvijaju u na nekom području (Slika 3.3.1.15). Dinoflagelati su znatno porasli u zajednici od razdoblja sredine 80-tih do sredine 90-tih. To razdoblje su obilježile intenzivne cvatnje dinoflagelata *Lingulodinium polyedrum* u Kaštelanskom zaljevu (Marasović i sur., 1991, 1995) i *Prorocentrum minimum* u Šibenskom zaljevu (Slika 3.3.1.16). Nakon tog perioda ponovo je uspostavljena dominacija dijatomeja (Ninčević Gladan i sur., 2009). To razdoblje karakteritira visoki NAO indeks popraćen visokim temperaturama. U tom je razdoblju također zabilježena promjena temperaturnog režima u sjevernom Jadranu (Kamburska i Fonda-Umani 2009). Moguće je da je opisana promjena sastava zajednice u Kaštelanskom zaljevu rezultat klimatskih promjena odnosno porasta temperature u Sjevernom Atlantiku u tom razdoblju koji je dobro dokumentiran (Edwards et al. 2002; Barton et al. 2003; Leterme et al. 2005; Kamburska and Fonda-Umani 2009).



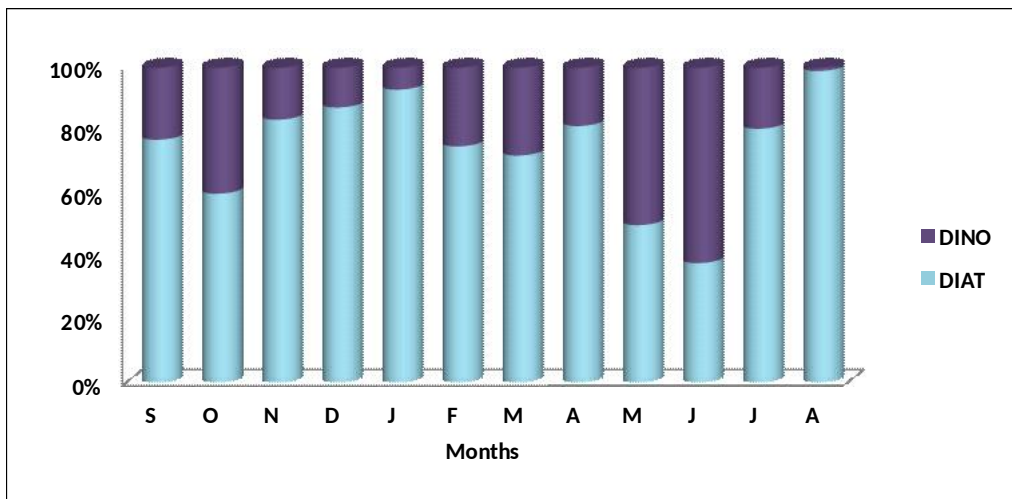
Slika 3.3.1.15. Dugogodišnji nizovi podataka brojnosti glavnih skupina fitoplanktona

Prisustvo pojedinih vrsta može ukazivati na pojačan stupanj eutrofikacije. Kanonička analiza korespondencije (CCA) je pokazala porast brojnosti dijatomeja *Leptocylindrus* spp., *Guinardia flacida*, *Proboscia alata* i dinoflagelata *Prorocentrum* spp., *Scropsiella trochoidea* raste linearno s porastom koncentracije fosfata (Slika 3.3.1.17). Brojnosti vrsta *Skeletonema costatum* i *Eutreptiella* sp. rastu s porastom koncentracije amonijevih soli dok je vrsta *Cyclotella* sp. dobar pokazatelj utjecaja slatkih voda. U Kaštelanskom je zaljevu zabilježen značajan pad brojnosti vrsta *Skeletonema costatum* i *Eutreptiella* sp. nakon 2004. godine kada je završen podmorski ispust koji je značajno smanjio dotok otpadnih voda u zaljev (Slika 3.3.1.18) (Šolić i sur., 2010).



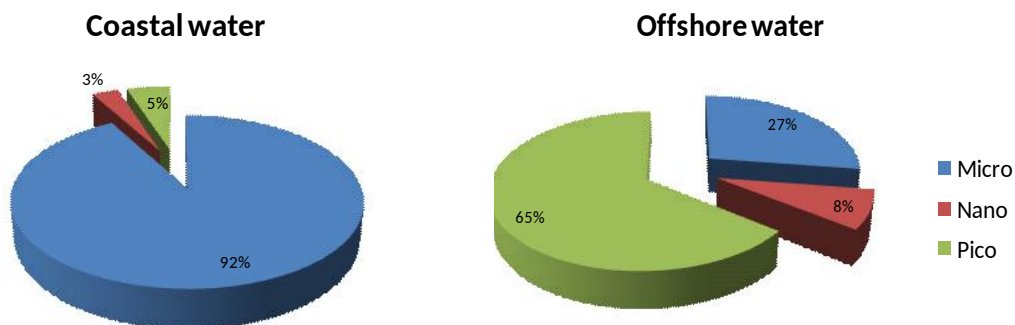
Slika 3.3.1.18. Smanjenje brojnosti vrsta *Skeletonema costatum* i *Eutreptiella* sp. u istočnom dijelu Kaštelanskog zaljeva nakon što je u rad pušten podmorski ispust koji je smanjio dotok otpadnih voda u zaljev

Dosadašnja istraživanja u Jadranu pokazuju da su dijatomeje dominantna skupina fitoplanktona u Jadranu (Slika 3.3.1.19). Dinoflagelati su bolje zastupljeni u toplijem dijelu godine.



Slika 3.3.1.19. Udio pojedinih skupina fitoplanktona u ukupnom sastavu zajednice

Kombiniranjem metoda brojenja fitoplanktonskih stanica i izračunavanja staničnog volumena može se dobiti uvid u biomasu fitoplanktona izraženu u obliku staničnog ugljika. Određivanjem veličinskih kategorija fitoplanktona i njihovog udjela u ukupnoj biomasu može se dobiti uvid u trofički status određenog područja. U obalnim vodama, poglavito u eutrofiziranim područjima, prevladavaju veći fitoplanktonski organizmi (mikroplankton), dok je pikoplankton dominantan u siromašnim oligotrofnim vodama (Slika 3.3.1.20).

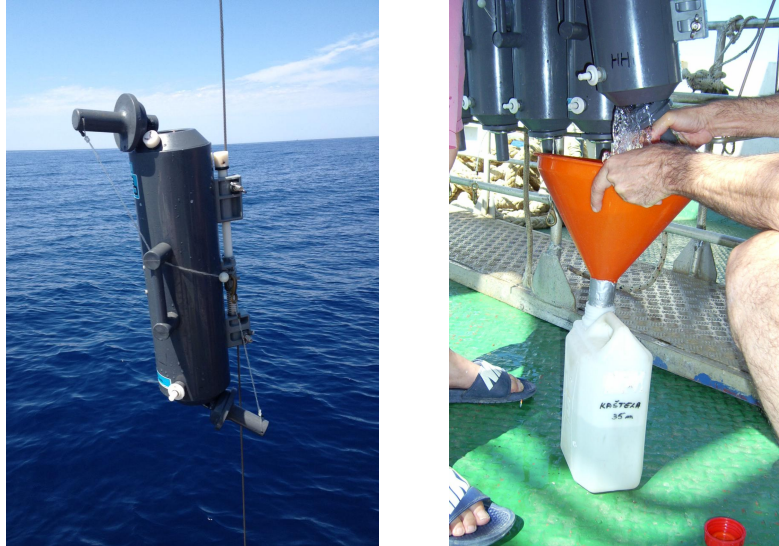


Slika 3.3.1.20. Udio pojedinih veličinskih kategorija fitoplanktona u ukupnom ugljiku fitoplanktona ($\bar{\mu}\text{g l}^{-1}$) u eutrofnim obalnim vodama i otvorenom moru

3.3.2. Mikrozooplankton

Mikrozooplanktonski uzorci su sakupljeni u obalnim i otvorenim vodama Jadranskog mora od zapadne obale Istre na sjeveru do Dubrovnika i Južnojadranske kotline na jugu istraživačkim brodovima “Bios dva”, “Palagruža” i “Vila Velebita”. Tijekom svakog krstarenja sakupljeno je ukupno 69 planktonskih uzoraka na 23 postaje. 10 postaja je smješteno u sjevernom Jadranu, dok se 13 postaja nalazi u srednjem i južnom dijelu Jadranskog mora. Uzimajući u obzir posebnost istraživanog područja primijenjene su dvije metode uzorkovanja mikrozooplanktona. Na 12 postaja plankton se sakupljao Niskin crpcem, dok je na 11 postaja materijal uzorkovan planktonskom mrežom u jednom ili dva sloja.

Na većini obalnih postaja (A6, A7b, A8, A16-A21, A25, A28 i A29) mikrozooplankton je uzorkovan svakih 5 ili 10 m dubine od površine do dna korištenjem Niskin crpca volumena od 5 L (Slika 3.3.2.1). Uzorci su konzervirani u 2,5% otopini formaldehida prethodno neutraliziranoj s CaCO_3 , budući da Lugolova otopina boji detritus, koji u obalnim vodama Jadranskog mora može biti prisutan u značajnim količinama, čime se smanjuje vidljivost (Fonda-Umani and Beran, 2003). Uzorci se u laboratoriju sedimentiraju dva dana u plastičnim kantama i dekantiraju do volumena od približno 2 L. Taj se dio uzorka ponovo sedimentira tijekom slijedećih 48 sati, a potom se volumen reducira na 200 mL. Za dekantiranje se koristi vakuum pumpa i savinuta staklena cjevčica kojom se uklanja voda s površine [Kršinić, 1980; Bojanić et al., 2005]. Nakon 24 sata volumen uzorka je smanjen na 20 mL i pripremljen za daljnje mikroskopske analize.



Slika 3.3.2.1. Niskin crpac prije početka uzorkovanja, i sakupljanje uzorka u plastičnu kantu

S druge strane, na postajama otvorenog mora (A1-A3, A9-A11, A13, A14, A22-A24) za uzorkovanje se koristila Nansen mreža opremljena sistemom na zatvaranje (53 μ m veličina oka, 55 cm dijametar, 272 cm ukupna duljina) (Slike 3.3.2.2 i 3.3.2.3). Uzorci su sakupljeni vertikalnim potegom brzinom od 0.5 m s⁻¹, kako slijedi: u jednom sloju: 0 m do dna na postajama A22, A23 i A24; ili u dva sloja: 0-50 m i 50-100 m na ostalih osam postaja. Mrežni uzorci su također konzervirani 2,5% otopinom formaldehida prethodno neutraliziranoj s CaCO₃.



Slika 3.3.2.2. Nansen planktonska

mreža sa sistemom na zatvaranje



Slika 3.3.2.3. Uzorkovanje Nansenovom mrežom na zatvaranje

Za identifikaciju vrsta i brojanje mikrozooplanktonskih organizama korišten je inverzni mikroskop “Olympus” IMT-2 na povećanjima od 100x i 400x (Slika 3.3.2.4). Oba tipa uzoraka obzirom na metodu prikupljanja (crpac ili mreža) su parcijalno obrađivani u staklenoj komorici (70x45x5 mm). Ukupan broj jedinki je brojen u alikvotu od 1/4 za uzorke iz crpca ili u razrjeđenju od 1/5 do 1/10 za uzorke iz mreže. Kad god je to bilo moguće taksonomska identifikacija je rađena do razine vrste. Za rijetke vrste pregledan je cijeli uzorak. Abundancija organizama sakupljenih Niskim crpcem i Nansenovom mrežom je izražena kao broj organizama po litri (jed.L^{-1}), odnosno po kubičnom metru (jed.m^{-3}).



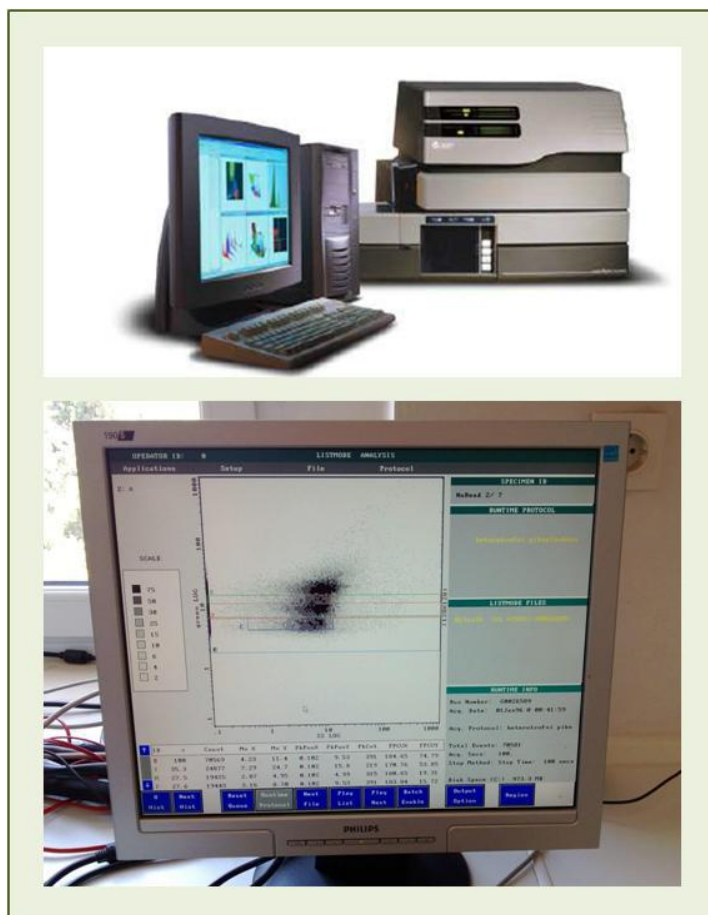
Slika 3.3.2.4. Inverzni mikroskop “Olympus” IMT-2

Zrakaši su identificirani na temelju morfologije njihovog skeleta koristeći taksonomske ključeve Haeckel (1887), Borgert (1906;1911), Boltovskoy (1999) te Kling i Boltovskoy (1999). Tintinidi su identificirani prema morfologiji lorike i opisu vrsta koje su dali Kofoid i Campbell (1929; 1939), Balech (1959), Alder (1999) i Kršinić (2010). Rakovi veslonošci su taksonomski identificirani korištenjem sljedećih priručnika: Sars (1903), Rose (1933), Frost i Fleminger (1968)], Tregouboff i Rose (1957), Heron i Bradford-Grieve (1995), Böttger-Schnack (2001), Vives i Shmeleva (2007).

3.3.3. Mikrobna zajednica

Uzorci za brojanje uzeti su Niskinovim 5 litarskim crpcem, a more je potom prebačeno u sterilne staklene boce, uzorci su odmah fiksirani i analizirani u laboratoriju.

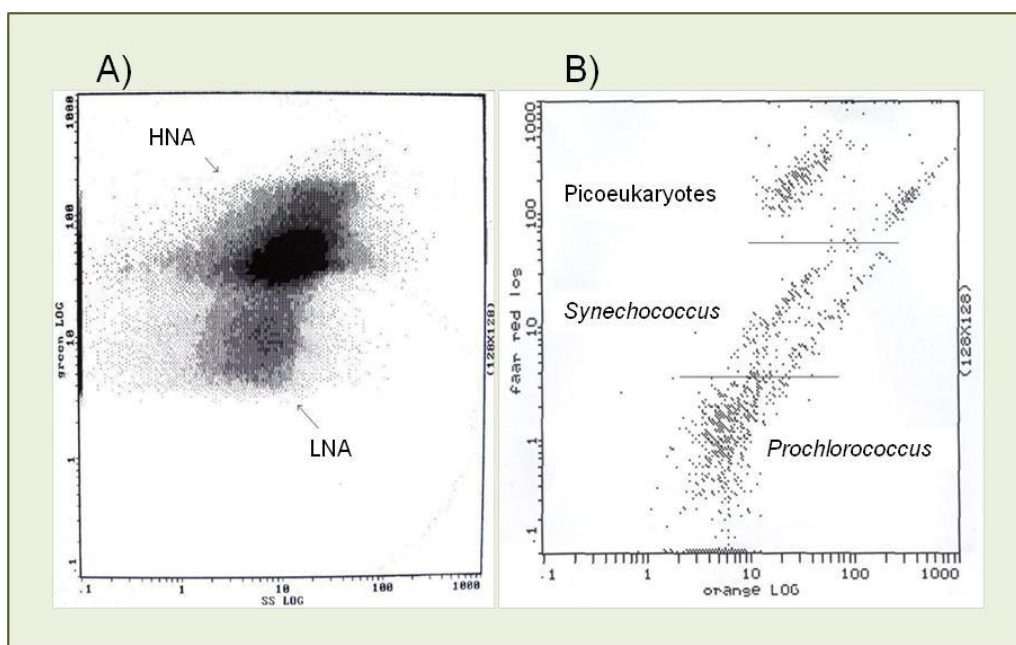
Abundancije heterotrofnih (ne-pigmentiranih) bakterija, cijanobakterija iz rodova *Synechococcus* i *Prochlorococcus*, te heterotrofnih nanoflagelata (HNF) određene su korištenjem metode protočne citometrije (Marie et al., 1999) (Sl. 3.3.3.1). Uzorci volumena 2 ml za brojanje autotrofnih stanica fiksirani su s 0.5% gluteraldehida i smrznuti na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, gdje su čuvani do analize (unutar 5-10 dana), dok su uzorci za brojanje bakterija fiksirani s 2% formaldehida i čuvani na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize (unutar 5-10 dana).



Slika 3.3.3.1. Analiza mikrobnih zajednica metodom protočne citometrije.

Heterotrofne bakterije

Abundancije heterotrofnih (ne-pigmentiranih) bakterija, prethodno obojenih bojom SybrGreen-I, određivane su metodom protočne citometrije (Marie et al., 1997). Uzorci volumena 1 ml (bez replikacija) su analizirani na protočnom citometru Beckman Coulter EPICS XL-MCL. Korištena je velika brzina protoka od 1 do 1.2 $\mu\text{l s}^{-1}$, a analizirani volume je izračunat preko vremena trajanja analize uzorka. Za standardizaciju intenziteta fluorescencije stanica korištene su žuto-zelene kuglice (Level-III Epics Division of Coulter Corporation Hialeah, Florida) koje su dodane uzorku. S obzirom na relativni intenzitet zelene fluorescencije, koji je u korelaciji s količinom nukleinskih kiselina (Jochem, 2001) i raspršivanja svjetlosti, mogle su se razlikovati dvije grupe bakterija koje se označavaju kao bakterije s visokim sadržajem nukleinskih kiselina (HNA) i bakterije s niskim sadržajem nukleinskih kiselina (LNA). (Sl. 3.3.3.2A).



Slika 3.3.3.2. Razlikovanje dviju grupa bakterija koje se označavaju kao bakterije s visokim sadržajem nukleinskih kiselina (HNA) i bakterije s niskim sadržajem nukleinskih kiselina (LNA) (A), te različitih skupina autotrofnog pikoplanktona (B) metodom protočne citometrije.

Autotrofni pikoplankton

Unutar autotrofnih stanica, razdvojene su dvije skupine cijanobakterija (rodovi *Synechococcus* i *Prochlorococcus*), te skupina pikoeukarioti. Ove su skupine odjeljene uz pomoć načina raspršivanja svjetlosti, emisije crvenog svjetla od strane staničnog sadržaja klorofila, te emisije narančastog svjetla od strane stanica bogatih fikoeritriinom (Slika 3.3.3.2B).

Heterotrofni nanoflagelati (HNF)

Abundancija heterotrofnih nanoflagelata (HNF) prethodno obojenih bojom SybrGreen-I, određena je metodom protočne citometrije (Christaki et al., 2011). Analizirani su uzorci volumena 1 ml uz korištenje velike brzina protoka od 1 do 1.2 $\mu\text{l s}^{-1}$, a analizirani volumen je izračunat preko vremena trajanja analize uzorka. Za standardizaciju intenziteta fluorescencije stanica korištene su žuto-zelene kuglice promjera 1.0- μm (Level-III Epics Division of Coulter Corporation Hialeah, Florida).

Procjena biomase

Biomasa analiziranih skupina pikoplanktona i nanoplanktona procijenjena je korištenjem stanica-bimasa ugljika ili volumen-biomasa ugljika faktora konverzije prikazanih u Tablici 3.3.3.1. Za procjenu biovolumena (u slučaju heterotrofnih nanoflagelata), mjerene su dužine i širine stanica uz pomoć okularne mrežice (New Porton G12, Graticules) spojene na epifluorescentni mikroskop Olympus BX 51.

Tablica 3.3.3.1. Pregled faktora konverzije za procjenu biomase.

Skupina	Faktor konverzije	Izvor
Bakterije	20 fgC cell ⁻¹	↙5↘ Kirchman et al. (1993)
<i>Prochlorococcus</i>	36 fgC cell ⁻¹	↙6↘ Buitenhuis et al. (2012)
<i>Synechococcus</i>	255 fgC cell ⁻¹	↙6↘ Buitenhuis et al. (2012)
Pikoeukarioti	2590 fgC cell ⁻¹	↙6↘ Buitenhuis et al. (2012)
HNF	0.22 pgC μm^{-3}	↙6↘ Buitenhuis et al. (2012) ↙7↘ Borsheim and Bratbak (1987)

3.3.4. Bentos

SREDNJI JADRAN

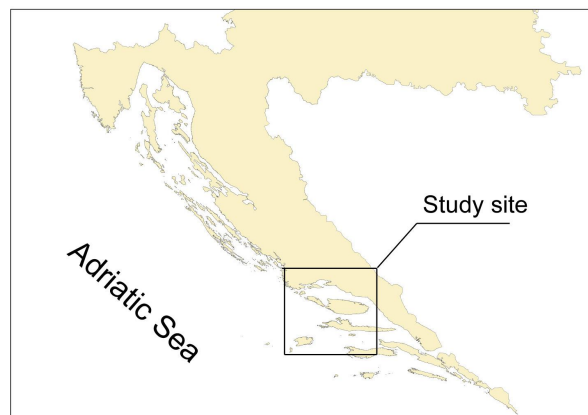
Kartiranje obalnih zajednica stjenovitog dna CARLIT metodom

Kartografija obale je vrlo vrijedna metoda kojom se pomoću plitkovodnih zajednica morskog dna određuje stanje ekosustava i kvaliteta morske vode. Kartografija obalnih zajednica stjenovitog dna (CARLIT) je metoda usklađena s odredbama Okvirne direktive o vodama koja se upotrebljava u zapadnom dijelu Sredozemnog mora. To je nedestruktivna metoda koja se zasniva na promatranju vrste i duljine obale koju zauzimaju određene zajednice stjenovite obale u zoni gornjeg litorala. U okviru ovog projekta planira se testiranje primjenjivosti CARLIT metode u srednjem Jadranskom moru te prilagodba metode kako bi postala usklađena s odredbama Okvirne direktive o morskoj strategiji.

Metoda CARLIT će se primijeniti prema opisu Ballesterosa i suradnika (2007) s izmjenama prema Nikoliću i suradnicima (2013). Obala će se pregledati tijekom kasnog proljeća i ranog ljeta pomoću gumenog čamca kojim se plovi što bliže obali (Slika 3.3.4.1). Kartiranje će se izvesti u području srednjeg Jadrana uzduž pretpostavljenog gradijenta pritiska na okoliš, od obale prema otocima (Slika 3.3.4.2).



Slika 3.3.4.1. Primjena CARLIT metode na terenu, kartiranje zajednica iz gumenog čamca.



Slika 3.3.4.2. Područje testiranja CARLIT metode u srednjem Jadranskom moru.

Dijelovi obale koji su jednaki po vrsti zajednice (Tablica 3.3.4.1) i geomorfološkim čimbenicima (Tablica 2) će se odrediti pregledom obale i zapisati izravno u karte. Podaci će se zatim unijeti u georeferencirane karte pomoću posebno izrađene računalne baze podataka te će se točno izmjeriti svaki sektor obale (Slika 3.3.4.3). U Tablici 3.3.4.1 prikazan je popis karakterističnih zajednica gornjeg litorala u istočnom dijelu Jadranskog mora zajedno s “razinama osjetljivosti” (“sensitivity levels” – SL) na skali od 1 do 20, kao mjerom njihove osjetljivosti na poremećaje. Najveće SL vrijednosti dodijeljene su dobro razvijenim zajednicama algi roda *Cystoseira*, srednje vrijednosti degradiranim zajednicama fotofilnih algi i naseljima dagnji, a najmanje vrijednosti su dodijeljene jako degradiranim zajednicama vrlo onečišćenih područja koje se sastoje uglavnom od zelenih algi i cijanobakterija.

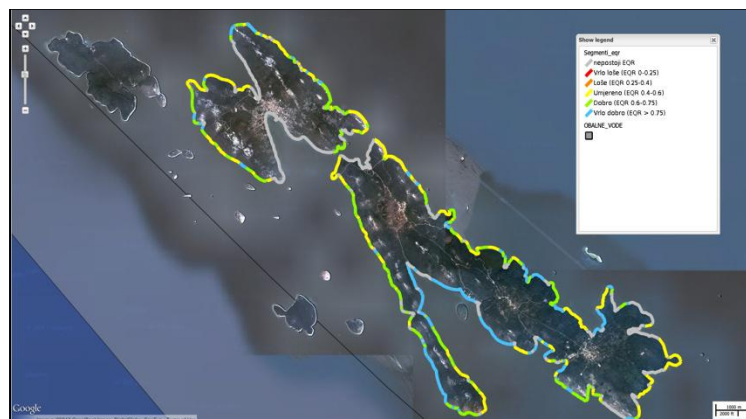
Tablica 3.3.4.1. Popis vrsta zajednica makroalgi i njihovih razina osjetljivosti (SL) u istočnom dijelu Jadranskog mora.

Vrsta zajednice	Opis zajednice	Razina osjetljivosti (SL)
<i>Cystoseira spicata</i> 3	Kontinuirani pojas vrste <i>Cystoseira amentacea</i> var. <i>spicata</i>	20
<i>Cystoseira crinitophylla</i>	Populacije vrste <i>Cystoseira crinitophylla</i>	20
<i>Cystoseira crinita</i>	Populacije vrste <i>Cystoseira crinita</i>	20
<i>Cystoseira corniculata</i>	Populacije vrste <i>Cystoseira corniculata</i>	20
<i>Cystoseira foeniculacea</i>	Populacije vrste <i>Cystoseira foeniculacea</i>	20
Trottoir	Organogene tvorevine vrste <i>Lithophyllum</i>	

	<i>byssoides</i> i drugih koralinskih algi	20
Cystoseira barbata	Populacije vrste <i>Cystoseira barbata</i> bez drugih svojti roda <i>Cystoseira</i>	16
Cystoseira spicata 2	Obilne nakupine vrste <i>Cystoseira amentacea</i> var. <i>spicata</i>	15
Cystoseira compressa	Populacije vrste <i>Cystoseira compressa</i> bez drugih svojti roda <i>Cystoseira</i>	12
Cystoseira spicata 1	Rijetki izolirani talusi vrste <i>Cystoseira amentacea</i> var. <i>spicata</i>	10
Photophilic algae	Zajednica kojom prevladavaju alge rodova <i>Padina/Dictyota/Dictyopteris/Taonia/Halopteris</i>	10
Corallina	Zajednica kojom prevladavaju vrste <i>Corallina elongata</i> i/ili <i>Haliptilon virgatum</i>	8
Mytilus	Zajednica kojom prevladava vrsta <i>Mytilus galloprovincialis</i>	6
Green algae	Zajednica kojom prevladavaju alge rodova <i>Ulva/Enteromorpha/Cladophora</i>	3
Cyanobacteria	Pojas cijanobakterija	1

Tablica 3.3.4.2. Popis geomorfoloških čimbenika i njihovih kategorija za opis obale u istočnom dijelu Jadranskog mora.

Geomorfološki čimbenik	Kategorija
Morfologija obale	Visoka obala
	Niska obala
Podloga	Blokovi
	Vapnenac
	Metamorfna stijena
	Pješčenjak
	Breča
Nagib obale	Horizontalni (0°-30°)
	Subvertikalni (30°-60°)
	Vertikalni (60°-90°)
Orijentacija obale	Prevjjes
	Sjever
	Sjeveroistok
	Istok
	Jugoistok
	Jug
	Jugozapad
	Zapad
	Sjeverozapad
	Struktura podloge
Hrapavo	
Tip obale	Prirodna
	Umjetna
Izloženost valovima	Zaštićeno
	Umjereno izloženo
	Vrlo izloženo



Slika 3.3.4.3. Probna inačica GIS baze podataka za obradu CARLIT podataka.

Uz pomoć prikupljenih podataka o duljini obale koju zauzimaju pojedine zajednice, prema Okvirnoj direktivi o vodama može se odrediti ekološka kvaliteta (ecological quality value, EQ), prema formuli:

$$EQ = \frac{\sum (l_i \cdot SL_i)}{\sum l_i}$$

EQ = ekološka kvaliteta

li = duljina obale koju zauzima kategorija zajednice

SLi = razina osjetljivosti zajednice

Prema odrednicama Okvirne direktive o vodama, ekološko stanje se određuje kao omjer izmjerene vrijednosti nekog indikatora i referentne vrijednosti koja postoji u netaknutim područjima bez poremećaja. Ovaj omjer (ecological quality ratio, EQR) se za CARLIT metodu izračunava kao omjer ekološke kvalitete (EQ) i referentne ekološke kvalitete za isti tip obale, tj. obale s jedinstvenom kombinacijom geomorfoloških čimbenika (GRS). Referentne vrijednosti ekološke kvalitete izračunate posebno za svaki GRS u području istočnog dijela Jadranskog mora osiguravaju točan izračun ekološkog stanja za ovo područje (Tablica 3.3.4.3).

Tablica 3.3.4.3. Prosječne vrijednosti ekološke kvalitete iz referentnih područja (EQ_{ref}) izračunate za geomorfološki relevantne situacije (GRS) u istočnom Jadranskom moru.

GRS	Morfologija obale	Nagib obale	EQ _{ref}
1	Visoka obala	Horizontalni	20.00
2	Visoka obala	Subvertikalni	17.55
3	Visoka obala	Vertikalni	12.96
4	Visoka obala	Prevjes	10.00
5	Niska obala	Horizontalni	19.02
6	Niska obala	Subvertikalni	17.72
7	Niska obala	Vertikalni	14.62
8	Niska obala	Prevjes	9.66
9	Blokovi		12.76

Provjera funkcionalnosti indeksa će se obaviti usporedbom EQR vrijednosti s vrijednošću LUSI indeksa (Land Uses Simplified Index), koji služi kao mjera ljudskog pritiska na obalno područje, a može se izračunati uz pomoć javno dostupnih podataka UNEP/MAP, 2011.

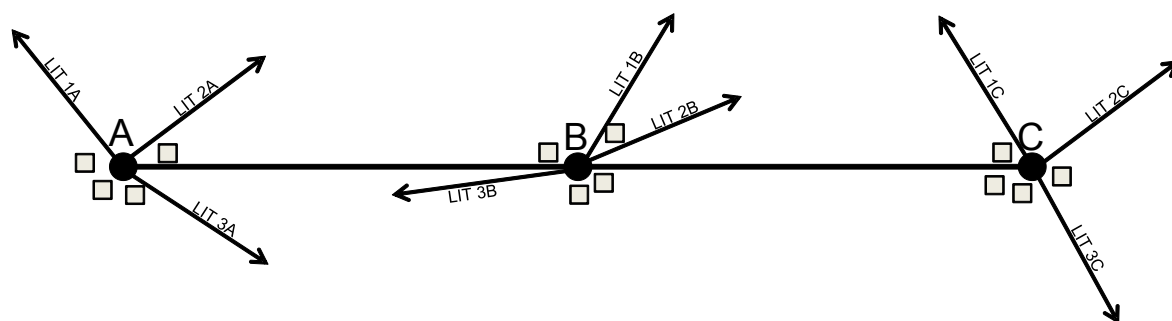
Rezultati će biti kritički promotreni i raspravljeni u cilju prilagodbe CARLIT metode za procjenu dobrog stanja (good environmental status, GES) prema odredbama Okvirne direktive o morskoj strategiji, za deskriptore "biodiversity" i "seafloor integrity". Plitkovodne zajednice mogu biti jako dobri indikatori za navedene deskriptore. Smeđe alge roda *Cystoseira* su ugrožene u nekim dijelovima zapadnog Sredozemnog mora i navedene su u IUCN crvenom popisu ugroženih morskih algi i morskih cvjetnica Hrvatske. Podaci o njihovom stanju u istočnom Jadranskom moru su vrlo oskudni, a mogu biti vrlo vrijedni za procjenu bioraznolikosti i stanja ekosustava u gornjem litoralu. Štoviše, oko 23% obale koja je kartirana metodom CARLIT u 2010. godini je pod jakim utjecajem ježinaca *Paracentrotus lividus* i *Arbacia lixula* koji dovode do nestanka prirodnih zajednica i potpunog ogoljenja morskog dna (Nikolić i sur., 2013), što se smatra znakom poremećaja u ekosustavu. U nekim područjima postotak obale zahvaćene utjecajem ježinaca iznosi od 4 do 85%. Monitoring područja ogoljenog morskog dna, zajedno s praćenjem stanja zajednica algi roda *Cystoseira* može pomoći boljem razumijevanju dinamike plitkovodnih zajednica i pružiti informaciju o stanju okoliša.

Livade morske cvjetnice *Posidonia oceanica*

S ciljem uspostave dugogodišnjeg monitoringa livade morske cvjetnice *Posidonia oceanica*, primjenit će se metode koje uključuju mjerenje gustoće čuperaka, pokrovnost livade te dugoročno praćenje gornjeg i donjeg ruba livade posidonije.

Istraživanja su provedena na tri međusobno udaljena područja: A) otoci Silba i Olib; B) otoci Kaprije, Žirje i Zlarin; C) Dubrovnik. Na području Silbe, Oliba i Dubrovnika istraživanja su obuhvatila dvije livade dok su na području Zlarina, Kaprija i Žirja istraživanjem obuhvaćene četiri livade.

Gustoća izdanaka i pokrovnost livade morske cvjetnice *Posidonia oceanica* mjerena je prema POMI protokolu (*Posidonia oceanica* Multivariate Index) (Romero I sur., 2007) uzduž transekta dužine 50 metara na stalnoj dubini od 15 metara uz pomoć 3 autonomna ronionca. Na svakoj livadi obrađen je po jedan transekt. Početak i kraj svakog transekta obilježeni su metalnom šipkom i plutom. Na taj način omogućen je monitoring posidonije na istim transektima i u budućim istraživanjima. Gustoća izdanaka posidonije je mjerena na početku (točka A), u sredini (točka B) te na kraju svakog transekta (točka C) (Slika 3.3.4.4) koristeći se metodom brojanja u kvadratima (Slika 3.3.4.5) dimenzija 40x40 cm (0.16 m²). Gustoća izdanaka je mjerena u četiri kvadrata na svakoj od tri točke transekta.



Slika 3.3.4.4. Shema uzorkovanja morske cvjetnice *Posidonia oceanica* na jednoj postaji.. A, B i C – točke gdje je mjerena gustoća i pokrovnost. Strelica – LIT. Kvadrati – gustoća izdanaka.

Na svakoj točki transeкта (A, B i C) mjerena je pokrovnost posidonije koristeći se metodom LIT (Line Intercept Transect) (Bianchi et al., 2005). U ovom istraživanju korišten je LIT dužine 10 metara, s oznakama svakih 1 cm. Uzduž ovih transekata zabilježena je pojava čuperaka posidonije te raznih tipova dna (pijesak, stijena, mrtvi rizomi) te je zabilježena udaljenost na transektu na kojoj se ovi tipovi podloge izmjenjuju. Početna točka svakog LIT-a sjekla se s glavnim 50 metara dugačkim transektom u točkama A, B i C, te su na svakoj točki analizirana po tri transekata. Smjer LIT je odabran slučajnim odabirom te je smjer transekata zabilježen ručnim kompasom (Slika 3.3.4.5). Pokrovnost morske cvjetnice je izražen kao postotak ukupne dužine LIT-a koji je pokriven s živom posidonijom, odnosno s izdancima (3.3.4.6). Iz ukupne dužine LIT-a isključeno je stjenovito dno koje je i inače slabo naseljeno s posidonijom. Uz pomoć dobivenog postotka pokrovnosti izračunat je konzervacijski index (CI) za svaki LIT (Moreno et al., 2001; Montefalcone et al., 2006), Ovaj index se koristi za procijenu ekološkog stanja livada, a u svom izračunu povezuje postotak dna prekrivenog s mrtvim rizomima u odnosu na živu posidoniju.

Nadalje, uzduž svakog 50-metarskog transekata i svakog LIT-a ronioci su zabilježiti prisutnost zaštićenog školjkaša *Pinna nobilis*.

Dubinska rasprostranjenost morske cvjetnice *Posidonia oceanica*, odnosno gornji i donji rub, odredit će se na odabranim livadama uz pomoć autonomnih ronioca. U tu svrhu postaviti će se betonski blokovi uzduž rubova. Na svakoj odabranoj livadi postaviti će se najmanje 5 blokova uzduž donjeg ruba svakih 5 metara. Svaki blok će biti označen brojem te će se područje oko blokova detaljno fotografirati. Ista procedura će se ponoviti i za gornji rub posidonije s blokovima postavljenim svakih 5-15 metara.



Slika 3.3.4.5. Određivanje gustoće izdanaka vrste *Posidonia oceanica*.



Slika 3.3.4.6. Određivanje pokrovnosti podloge izdancima vrste *Posidonia oceanica* pomoću LIT metode

Rezultati analize izmjerenih parametara (gustoća, pokrovnost, gornji i donji rub) će se koristiti za procjenu ekološkog statusa livada morske cvjetnice *P. oceanica*, a sve u svrhu utvrđivanja dobrog stanja okoliša – GES (Good Environmental Status). Da bi utvrdili učinkovitost ovih metoda, one će se usporediti s POMI metodom koja se već koristi za utvrđivanja kvalitete hrvatskih obalnih voda u sklopu Okvirne directive o vodama (WFD). U tu svrhu su ronioci uzeli dodatne uzorke posidonije za POMI analizu koja je modificirana (POMI9) te uključuje analizu 9 odabranih parametara (Tablica 3.3.4.4).

Dodatni uzorci za POMI analizu su uzeti uzduž 50-metarskog transekata, a uključivali su barem 10 čuperaka sakupljenih uzduž transekata svakih 12,5 metara.

Za potrebe morfometrijske analize izdvojen je po jedan izdanak sa svake točke transekata. Listovi svakog izdanka odvojeni su od rizoma te im je određena dužina i širina. Svakom listu je zabilježena prisutnost nekroze. Iz zabilježenih podataka određena je srednja lisna površina i srednji postotak listova s nekrozom. Pet izdanaka sa svake točke korišteno je za izdvajanje epifita i za pripremu rizoma za kemijske analize. Struganjem su uklonjeni epifiti sa svih listova te

su homogenizirani i pohranjeni u zamrzivac do laboratorijske analize. Rizomi su osušeni, usitnjeni u električnom tarioniku te pohranjeni za potrebe kemijskih analiza.

Tablica 3.3.4.4. Parameters included in POMI9.

Parametri	Opis
Gustoća izdanaka	Broj izdanaka u kvadratima površine 0,16 m ² (40x40 cm)
Pokrovnost livade	Postotna pokrovnost podloge izdancima, pomoću LIT (Line Intercept Transect) metode
Lisna površina	Srednja površina listova (cm ²)
Nekroza	Srednja vrijednost nekroze listova (%)
Rezervna tvar (saharoza)	Sadržaj saharoze u rizomima (% suhe mase)
Omjer izotopa dušika ($\delta^{15}\text{N}$)	Omjer izotopa dušika u rizomima
Omjer izotopa sumpora ($\delta^{34}\text{S}$)	Omjer izotopa sumpora u rizomima
Olovo u rizomu	Količina olova u rizomima ($\mu\text{g/g}$ suhe težine)
Dušik u epifitima	Količina dušika u epifitima sakupljenima s listova (% suhe težine)

Sadržaj dušika u epifitima analiziran je Carlo-Erba CNH analizatorom. Koncentracija olova u rizomima izmjerena je pomoću atomskog apsorpcijskog spektrometra (Perkin Elmer AS 800). Za analizu sadržaja dušika te omjera izotopa dušika ($\delta^{15}\text{N}$) u rizomima korišten je ThermoFinnigan analizator elemenata i Deltaplus IRMS spektrometar (IRMS – isotope ratio mass spectrometry). Za analizu sadržaja sumpora te omjera njegovih izotopa ($\delta^{34}\text{S}$) u rizomima korišten je EA-IRMS spektrometar. Sadržaj saharoze u rizomima je određen spektrofotometrijski, nakon ekstrakcije u alkoholu [1].

Epifauna (kočarski prilov)

U cilju istraživanja stanja bentoskih zajednica na pomičnim dnima na području istočnog Jadrana u hrvatskim teritorijalnim vodama planirane aktivnosti su uključivale istraživanja na odabranim postajama na području srednjeg Jadrana, u otočnom području i otvorenim vodama. Postaje na kojima je istraživano su bile smještene na dubinama do 250 m na pomičnim dnima. Istraživanje je obavljeno za vrijeme ljeta.

Uzorkovanje bentoskih beskralješnjaka prisutnih na morskom dnu je obavljeno korištenjem znanstvene povlačne pridnene mreže kočice, GOC 73. Tehničke i konstrukcijske značajke pridnene povlačne mreže: veličina oka mreže i otvor mreže, te brzina broda (3 NM) su bile konstantne na svim postajama, s trajanjem potega od 30 minuta. Uzorkovanje je obavljeno za vrijeme dnevnog svjetla.

Na palubi broda su bentoski beskralješnjaci odvajani od komercijalnog ulova (Slika 3.3.4.7). Kadgod je bilo moguće, analiziran je ukupni prilov. Na postajama gdje je količina prilova bila vrlo obilna, korištena je metoda poduzorka. Sve jedinke su određene do najviše moguće taksonomske razine, uglavnom do nivoa vrste. Jedinke koje su zahtijevale dodatnu determinaciju su odijeljene i spremljene u otopinu formalina za daljnju analizu. Vrste sa svake postaje su fotografirane za foto dokumentaciju.

Abundancija pojedinih vrsta na svim postajama će biti izražena kao broj jedinki po km² (N km⁻²; indeks brojnosti) i kao mokra masa po km² (kg km⁻²; indeks biomase), koristeći koeficijent lovnosti, q=1. Svi podaci će biti uneseni u bazu podataka.

Nadalje, prisutnost odabranih vrsta (zaštićene vrste, indikatori globalnog zagrijavanja, invazivne vrste itd.) će biti zabilježene i obrađene.

Ustanovit će se rasprostranjenost različitih bentoskih zajednica na istraživanom području.

Rezultati provedenog istraživanja će se usporediti s već postojećim podacima te će se koristiti mišljenje stručnjaka u procjeni Dobrog stanja okoliša (GES – Good Environmental Status).

Nadalje, dobiveni podaci će biti baza za budući monitoring bentoskih zajednica na istraživanom području.



Slika 3.3.4.7. Ulov i prilov na istraživačkom brodu prije odjeljivanja i analize

SJEVERNI JADRAN

U plićem, priobalnom dijelu sjevernog Jadrana, u pogledu pokrovnosti i biomase, bentoske zajednice čvrstih dna se odlikuju dominacijom makrofitobentosa. Općenito, zajednice najčišćih područja su predstavljene naseljima u kojima dominiraju alge iz reda Fucales, među kojima prevladavaju vrste roda *Cystoseira*. Njihova brojnost ovisi o nizu ekoloških čimbenika i antropogenih utjecaja, uključujući kakvoću morske vode, hranidbenu aktivnost ježinaca, urbanizaciju priobalnih područja te utjecaj ribarenja, kako u prošlosti tako i u sadašnjosti. S druge strane, oko 90% morskog dna je prekriveno sedimentima tj. mekim dnima na kojima su karakteristične zajednice u kojima dominira fauna bentoskih beskralješnjaka. Struktura i funkcija tih zajednica je uvjetovana prvenstveno tipom sedimenta.

Ovim istraživanjem je obuhvaćeno 5 glavnih svojstava D6 deskriptora: supstrat (podloga tj. tip dna), edifikatorske vrste, taksonomski sastav bentosa, veličinski sastav bentosa te funkcionalne značajke bentoskih zajednica temeljene na životnoj strategiji, odnosno životnom ciklusu vrsta. Biološki indikatori preporučeni Okvirnom direktivom o morskoj strategiji (ODMS) će biti testirani na temelju: rastućeg udjela oportunističkih vrsta, povećanja/smanjenja udjela malih/velikih jedinki, smanjenja funkcionalne raznolikosti zajednica te smanjenja/povećanja relativne brojnosti osjetljivih i oportunističkih vrsta. Kako bi se testirala osjetljivost, odnosno primjerenost izabраниh indikatora u procjeni Cjelovitost morskog dna, istraživanje će se unutar svakog tipa staništa provoditi usporedno na dvije lokacije – referentnoj (bez vidljivih/mjerljivih znakova poremećaja) i lokaciji izloženoj antropogenim pritiscima. Završna procjena Cjelovitost morskog dna će se temeljiti na integraciji rezultata ovog istraživanja (biološki indikatori) s rezultatima mjerenja kemijskih i fizičkih indikatora predviđenih za testiranja vezana uz D6 Deskriptor, kao i na iskustvu i saznanjima stečenim u provedbi prethodnih monitoringa te implementaciji Okvirne direktive o vodama (ODV) i morskim staništima (Tablica 3.3.4.5).

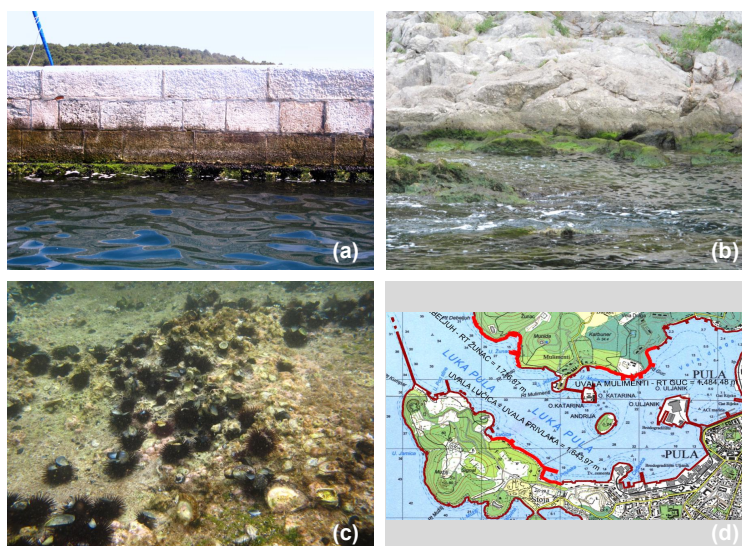
Tablica 3.3.4.5. Procjena Cjelovitost morskog dna (Deskriptor D6) korištenjem bioloških elemenata kakvoće (bentos) u priobalnom području sjevernog Jadrana: svojstva, kriteriji i indikatori u skladu s preporukama ODMS.

SVOJSTVA	KRITERIJI ZA PROCJENU DESKRIPTORA	INDIKATORI	BIOLOŠKI ELEMENTI KAKVOĆE
1- Podloga	Redukcija prirodne trodimenzionalne strukture staništa	Bentoska staništa na čvrstim dnima	- Makroalgae - Morske cvjetnice
2- Edifikatorske vrste	Smanjenje brojnosti i/ili prostorne raspodjele edifikatora	Brojnost edifikatorskih vrsta	- Makroalgae - Morske cvjetnice - Zoobenthos
5 – Taksonomski (vrsni) sastav bentosa	Rastući udio oportunističkih i/ili trajni gubitak vrsta	- Raznolikost i bogatstvo - Oblik krivulja kumulativne brojnosti (CA) - Kategorizacija temeljem multivariante strukture zajednica	- Makroalgae - Makrozoobentos (makrofauna) - Meiobentos (meiofauna)
6 – Veličinski sastav bentosa	Porast/opadanje udjela malih/velikih jedinki u zajednici	- Udio brojnosti ili biomase vrsta iznad određene veličine - Oblik CA krivulja prema brojnosti vrsta po veličinskim skupinama	- Makrozoobentos
8- Osobitosti životnog ciklusa	Porast/opadanje relativne brojnosti osjetljivih/oportunističkih vrsta	- Udjeli i odnosi osjetljivih i oportunističkih vrsta (AMBI, M-AMBI, MI) - Integracija testiranih indikatora	- Makrozoobentos - Meiobentos

Makrofitobentos (alge i morske cvjetnice)

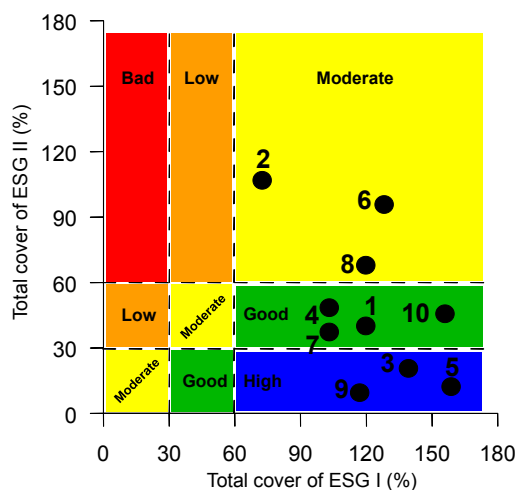
Makrofitobentos mediolitorala i gornjeg infralitorala će se proučavati duž zapadnoistarske obale u njenom sjevernom, središnjem i južnom sektoru (Umag, Rovinj i Medulin). Unutar svakog sektora, istraživanje će se provoditi duž šest transekata - tri na stjenovitom dnu bez vidljivih antropogenih utjecaja te tri na umjetnim konstrukcijama u zoni antropogenog utjecaja (Tablica D2). Na svakom transektu testirati će CARLIT (engl. **C**artography of **l**ittoral and upper-sublittoral rocky-shore communities) i EEI (engl. **E**cological **E**valuation Index) metoda (Bianchi et al., 2004; Buia et al., 2004; Balesteros et al., 2007; Mangialajo et al., 2007; Asnaghi et al., 2009; Orfanidis et al., 2011). U cilju detekcije stresnog stanja, po potrebi će se koristiti i drugi indikatori temeljeni na taksonomskom sastavu algi, odnosno sastavu morfološko funkcionalnih skupina. CARLIT je metoda kartiranja zajednica pomoću **G**eografskog **I**nformacijskog **S**ustava koja se provodi plovidbom malog čamca duž stjenovite obale te *in situ* prikupljanjem bilješki o dominantnim zajednicama makroalgi te geomorfološkim osobinama dna duž istraživanog transekta. Na temelju zastupljenosti dominantnih zajednica određuje se stupanj osjetljivosti (engl. **S**ensitivity level, SL) na skali 1-20 te se procjenjuje vrijednost ekološke kakvoće **E**cological **Q**uality **V**alue (EQV) na istraživanom području. Kod primjene EEI metode uspravno rastuće alge se odstranjuju s kvadrata površine 20x20 cm (3 replikata po postaji), a njihova postotna pokrovnost se određuje u laboratoriju. Pokrovnost najdonjeg sloja izgrađenog od inkrustrirajućih algi će biti procijenjena *in situ*. Taksonomska identifikacija će biti provedena do razine vrste ili gdje to ne bude moguće, do razine roda. Makroalge će se pažljivo sortirati u dvije morfološko funkcionalne skupine (ESG I = jednogodišnje, oportunističke vrste, ESG II = trajnice, vrste koje se sukcesivno smjenjuju). U procjeni EEI i ESC (**E**cological **S**tatus **C**lass) će se koristiti unakrsna usporedna metodologija (Orfanidis et al., 2001, 2003; Sala et al. 2012). 3.3.4.8. dat je

vizualni prikaz dominantnih vrsta makroalgi na konstruiranim (a) i prirodnim obalama (b,c) s primjerom kartiranja ekološkog statusa korištenjem CARLIT metode u Pulskoj luci (d), 2011. godine.



Slika 3.3.4.8. Dominantne vrste makroalgi i primjer kartiranja ekološkog statusa

Na Slici 3.3.4.9. prikazan je primjer rezultata dobivenih EEI metodom (destruktivno uzorkovanje makroalgi; kvadrat 20x20 cm, 3 replikata po postaji) duž zapadnoistarske obale na dubini od 1 metra. Kategorički dijagram raspršenja ukupne pokrovnosti makroalgi (%) prikazuje grupiranje vrsta u dvije ekološke statusne skupine ESG I i ESG II. Vertikalne i horizontalne linije dijele dijagram raspršenja u pet klasa ekološkog statusa.



Slika 3.3.4.9. Primjer rezultata dobivenih EEI metodom

Bentoski beskralješnjaci: Makrozoobentos (makrofauna) i meiobentos (meiofauna)

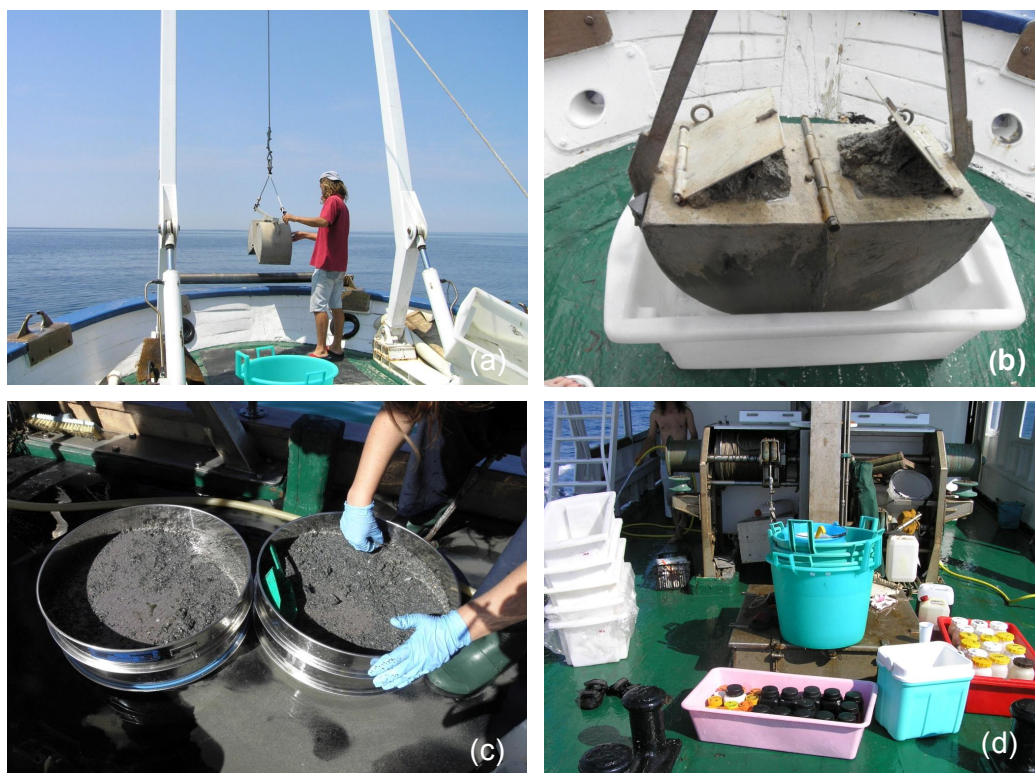
Kvalitativni (taksonomski sastav) i kvantitativni sastav bentoskih zajednica (brojnost, duljina i/ili biomasa vrsta) u kojima dominira fauna beskralješnjaka, istraživati će se na tri različita tipa pomičnih dna (biogeni sedimenti, pijesak, mulj) u središnjem dijelu zapadnoistarskog priobalja.

S ciljem procjene cjelovitosti morskog dna, analizirati će se taksonomski, biocoenološki i funkcionalni sastav meio- i makrobentosa na dva ekološki oprečna lokaliteta (lokalitet pod antropogenim utjecajem vs. lokalitet bez vidljivog antropogenog utjecaja) na svakom tipu podloge. Istraživanja će biti usmjerena na područja pod utjecajem intenzivnog kočarenja, prirodne eutrofikacije, marikulture i lučkih aktivnosti tj. na područja izložena različitim vrstama antropogenih pritiska na bentoska staništa uključujući fizički gubitak staništa (zatrpavanje, začepljenje), fizički poremećaji staništa (siltizacija, abrazija, lokalna eksploatacija sedimenta, rekreativna plovidba, onečišćenje naftom, uljima i nesintetskim tvarima, unos hranjivih soli s poljoprivrednih površina, obogaćenje organskom tvari te biološke poremećaje koji se odnose na utjecaj marikulture i selektivni izlov bentoskih vrsta).

Makrofauna: Uzorci (4 replikata po postaji) će biti prikupljeni Van Veen grabilom i na terenu podvrgnuti preliminarnoj obradi koja uključuje separaciju makrofaune iz sedimenta, njeno odvajanje od meiofaune prosijavanjem na 500 μm situ (Slika 3) i fiksaciju uzoraka 4% otopinom formaldehida u morskoj vodi. Slijedi standardna laboratorijska procedura koja se odvija u nekoliko koraka: sortiranje, brojanje, identifikacija i klasifikacija na razini viših svojti te determinacija do razine vrste, kada god je to moguće provesti (Castelli et al. et al., 2004).

Meiofauna: Uzorci (3 replikata po postaji) će biti prikupljeni ručnim PVC korerima (unutrašnji promjer 3,5 cm, zahvatna površina 10 cm^2 , duljina 15 cm) i podvrgnuti standardnoj laboratorijskoj proceduri: 1) fiksacija i bojenje (4% formalin s dodatkom Rose Bengala) 2) centrifugiranje u gradijentu gustoće (Ludox HS 40), 3) sijanje (sita veličine oka 500 i 63 μm), 4) brojanje i klasifikacija konstitutivnih svojti meiofaune, 5) separacija, uklapanje i determinacija Nematoda – dominantne svojte koje obično sačinjava oko 90% meiofaune (Danovaro et al., 2004).

Slika 3.3.4.9. prikazuje uzorkovanje i terensku obradu sedimenta namijenjenu kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi bentoskih makroinvertebrata.



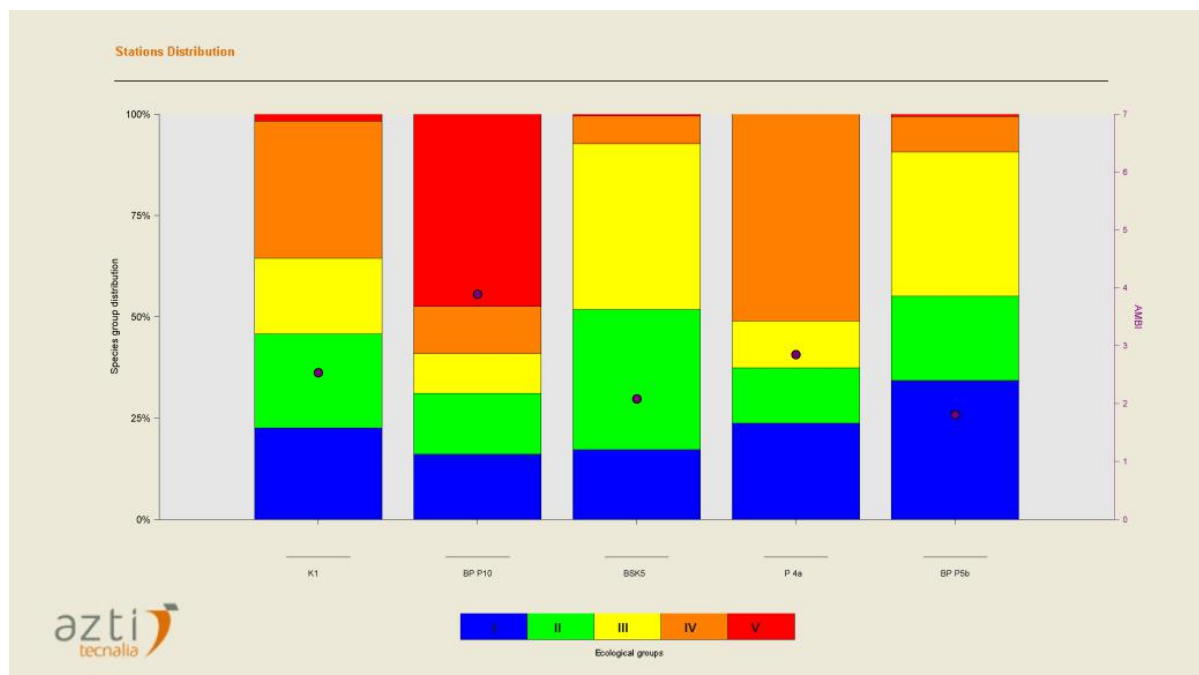
Slika 3.3.4.9. Uzorkovanje i terenska obrada makrofaune: uzorkovanje sedimenta Van Veen grabilom (a,b); preliminarnu separaciju makrofaune – sijanje na 500 μm situ (c) i pohranu fiksiranog materijala do provođenja taksonomske analize(d).

Rezultati će biti obrađeni univariatnim i multivariatnim statističkim metodama korištenjem softverskih paketa PRIMER v5 (Plymouth Marine Laboratory) i AMBI v5 (AZTI' Marine Biotic Index). Posebna pažnja će biti posvećena analizi relativne brojnosti osjetljivih, tolerantnih i oportunističkih vrsta bentoskih beskralješnjaka (Bongers et al., 1991; Grall and Grémalec 1997; Borja et al., 2000). Prema ekspertnom mišljenju i preglednoj kategorizaciji bentoske faune (Grall and Grémalec, 1997; Bongers i sur., 1991), svaka vrsta makrobentoske faune, kao i svi rodovi slobodnoživućih nematoda (dominantna svojta meiofaune) pripadaju jednoj od pet ekoloških skupina prema osjetljivosti na organsko onečišćenje i poremećaje (EG I – vrlo osjetljive vrste, EG II- indiferentne vrste, EG III -tolerantne vrste, EG IV- oportunisti 2. reda i EG V - oportunisti 1. reda. U ovom istraživanju, prisutne makrobentoske vrste kao i vrste Nematoda prisutne u uzorcima će biti svrstane u jednu od pet gore navedenih funkcionalnih skupina s ciljem izračunavanja indeksa baziranog na odnosima i relativnoj brojnosti skupina različite osjetljivosti prema poremećajima. Za procjenu ekološkog statusa na temelju makrofaune koristiti će se AMBI indeks, a u istu svrhu, za faunu Nematoda računati će se **Maturity Index – MI**.

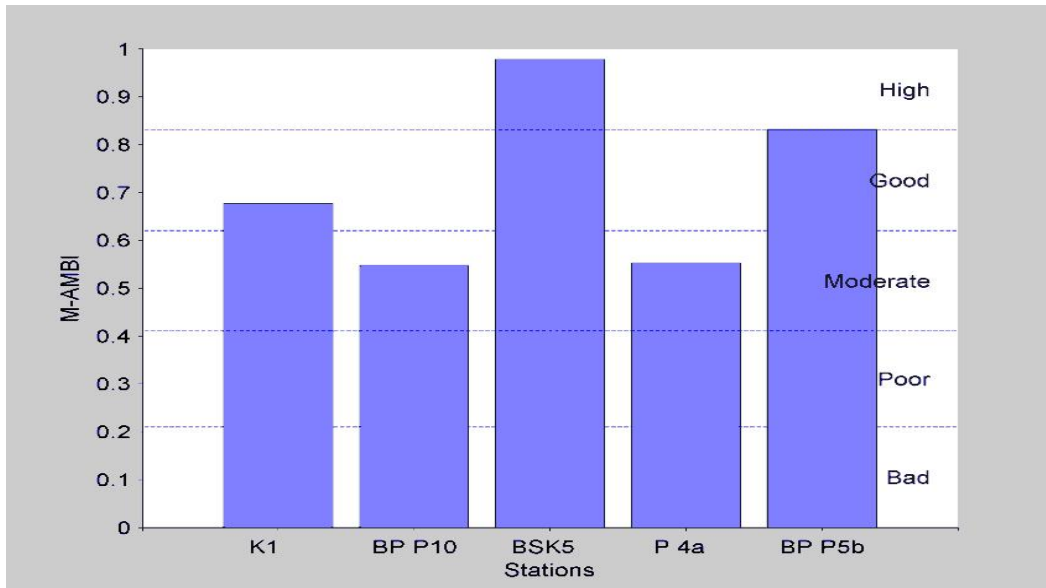
Cjelovitost morskog dna će se procijeniti faktorijalnim (FA) i diskriminacijskim analizama (DA) odabranih deskriptora strukture bentoskih zajednica (taksonomski i funkcionalni sastav, bogatstvo vrsta i Shannon-Wiener indeks diverziteta) integriranih u multimetrički biotički indeks M-AMBI (Borja i sur., 2000).

Na Slici 3.3.4.10. Prikazan je primjer rezultata dobivenih AMBI metodom (AZTI' Marine Biotic Index) na pet postaja duž Dalmatinske obale. Slika prikazuje postotak vrsta makrobentoskih beskralješnjaka koji pripadaju jednoj od pet ekoloških skupina s obzirom na osjetljivost prema organskom onečišćenju i drugim poremećajima u bentoskim zajednicama.

Primjer procjene stanja ekološke kvalitete korištenjem bioloških elemenata kakvoće (BEQ) bentoski beskralješnjaci (makrofauna) prikazan je na Slici 3.3.4.11. Slika prikazuje omjer ekološke kvalitete (engl. **Ecological Quality Ratio; EQR**) na pet postaja duž dalmatinske obale.



Slika 3.3.4.10. Primjer rezultata dobivenih AMBI metodom



Slika 3.3.4.11. Primjer rezultata dobivenih primjenom M-AMBI biotičkog indeksa.

Bentoske nezavičajne vrste (NZV)

Prijašnja su istraživanja bentoskih NZV u Hrvatskoj pokazala kako su glavni putovi i vektori unosa stranih vrsta u Jadransko more:

- morske struje
- balastne vode
- obraštaj brodova - sidra
- marikultura.

vrsta u Hrvatskoj (projekti "Nulto stanje mora", "Caulerpa", "CIESM Tropical Signals program", "Uzimajući u obzir ove putove i vektore, moguće je pretpostaviti "hot-spot" područja mogućeg pojavljivanja stranih vrsta:

- jug Hrvatske obale i vanjski otoci Dalmacije (mjesto prvog mogućeg naseljavanja NZV prenesenih glavnom Jadranskom strujom)
- teretne luke
- putničke luke i luke kruzera
- marine
- remontna brodogradilišta
- tovilišta tuna.

Prema dostupnim podacima dosadašnjih monitoring projekata stranih Jadranski projekt"), razvidno je kako je većina "hot-spot" lokaliteta neistraženo ili slabo istraženo.

To su prvenstveno putničke luke, luke i sidrišta kruzera, marine, remontna brodogradilišta te jug hrvatske i vanjski otoci Dalmacije.

Tijekom ovog projekta provest će se procjena stanja NZV na odabranim "hot-spot" područjima. Cilj je razviti pogodnu metodologiju za potrebe monitoringa te načiniti pregled trenutnog stanja NZV.

Na područjima gdje su NZV već pronađene, posebno na lokalitetima s invazivnim NZV, provest će se kartiranje te utvrđivanje utjecaja s ciljem da se prati trend širenja NZV i njen utjecaj na

zavičajne zajednice. Za sve poznate NZV izradit će se globalna karta rasprostranjenosti u GIS aplikaciji.

Za NZV koje će biti pronađene tijekom provedbe projekta, biti će napravljena procjena utjecaja i karte rasprostranjenosti te istražene biološke značajke koliko je to najbolje moguće.

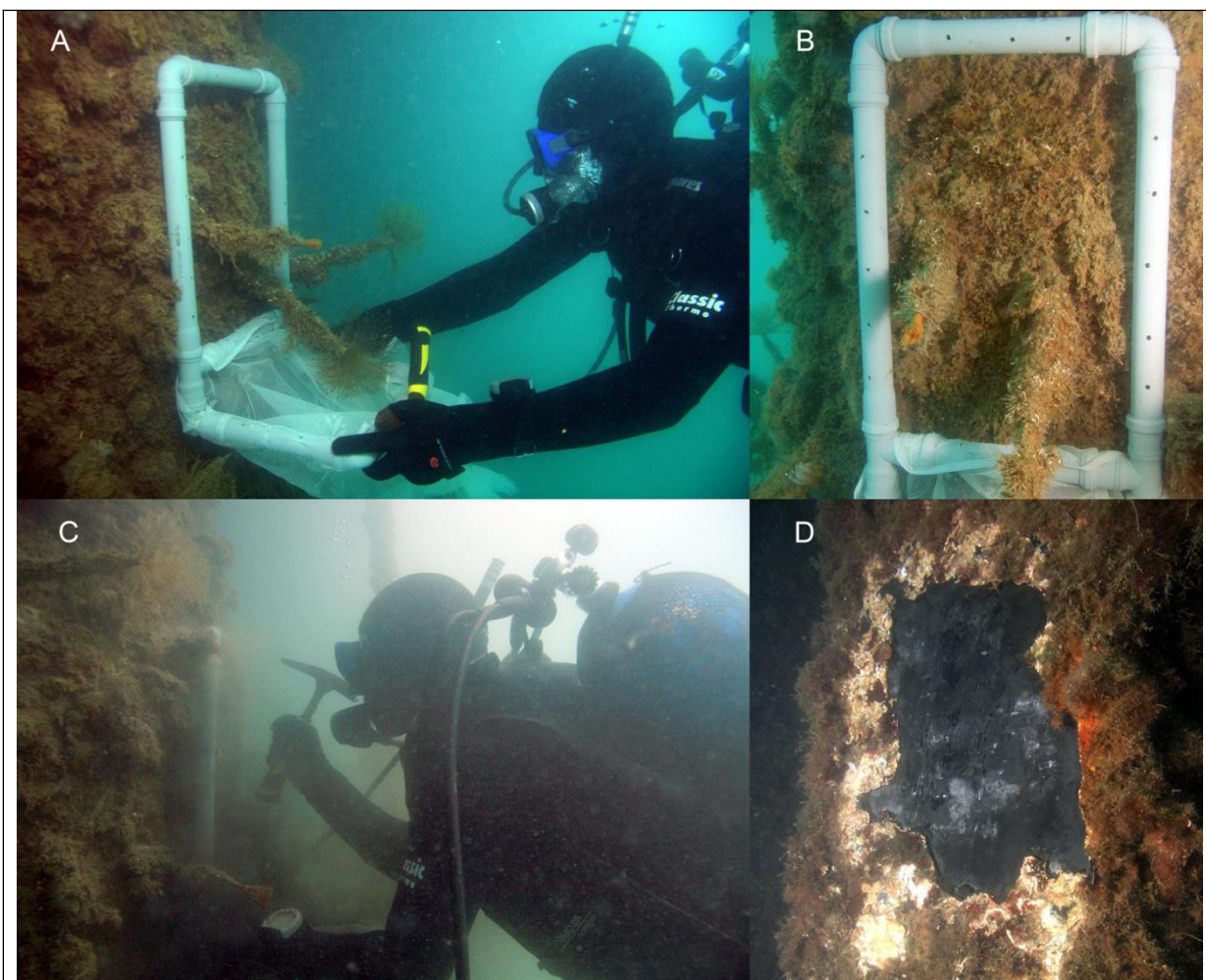
Monitoring "hot-spot" područja

Na odabranim "hot-spot" područjima (Tablica 3.3.4.6, Slika 3.3.4.12), morsko dno i stupac mora biti će pregledani uz pomoć samostalnih ronioaca na utvrđenim profilima. Uzorci bentoske flore i faune biti će sakupljeni slučajnim uzorkovanjem uzimajući u obzir da se sakupi dovoljan uzorak za daljnje laboratorijsko istraživanje. U koliko je to moguće, upotrijebit će se modificirani PBSS protokol (Inglis et al., 2008) (Slika 3.3.4.12).

Nepoznate vrste biti će fotografirane u prirodi, njihova brojnost procijenjena, a primjerci sakupljeni za daljnju laboratorijsku obradu i taksonomsku provjeru.

Determinacija sakupljenih uzoraka flore i faune u laboratoriju biti će načinjena standardnom metodologijom koristeći osnovnu taksonomsku literaturu (Barletta, 1981; Coppejan, 1983; Ercegović, 1949; 1952; 1955; 1956; 1957; Feldmann-Mazoyer, 1940; Hauck, 1885; Parenzan, 1970; 1974; 1976; Riedl, 1983; Sarà, 1971; Tortonese, 1965), znanstvene radove objavljene u različitim znanstvenim časopisima te online bazu podataka (AlgaeBase (AlgaeBase <http://www.algaebase.org>).

Dodatne informacije o NZV u Sredozemnom moru prlbavit će se putem različitih online baza (DAISIE, CIESM, NOBANIS, GISD, itd.) (CIESM <http://www.ciesm.org/online/atlas/index.htm>; DAISIE <http://www.europe-aliens.org/>; GISD <http://www.issg.org/database/welcome/>; NOBANIS <http://www.nobanis.org/>)



Slika. 3.3.4.12. Uzorkovanje u luci korištenjem PBSS protokola. A) kvadrat za određivanje veličine uzorka i mreža sa sakupljanje uzoraka; B) fotografija uzorkovane površine; C) uzorkovanje; D) površina nakon uzorkovanja.

Terenska istraživanja biti će provedena tijekom različitih sezona ali najviše tijekom proljeća i jeseni kada je većina NZV u maksimumu razvoja.

Ovaj monitoring će omogućiti:

- inventarizaciju NZV
- utvrđivanje vektora i putova povezanih s unosom NZV
- izradu GIS karata rasprostranjenosti
- izračun brojnosti novih nalaza NZV kao rezultat primarne introdukcije i sekundarnog širenja
- procjenu utjecaja novo naseljenih NZV
- izradu plana/sugestija za daljnji monitoring i uklanjanje.

Tablica 3.3.4.6. „Hot-spot“ područja koja će biti obrađena tijekom provedbe projekta.

„Hot-spot“ područje	Vjerojatan put/vektor unosa NZV	GPS
Molunat	Morske struje	42°26'58"N - 18°25'43"E
Dubrovnik - Porporela	Morske struje, Kruzeri	42°38'18"N - 18° 6'45"E
Dubrovnik (luka)	Kruzeri	42°39'40" N - 18° 4'43"E
Split (luka)	Kruzeri	43°30'4"N - 16°26'13"E
Trogir (remontno brodogradilište)	Brodovi	43°30'27"N - 16°14'19"E
Nautička luka Hvar	Nautički brodovi	43°10'12"N - 16°26'23"E
Tovilište tuna	Obraštaj kaveza	43°17'16"N - 16°28'56"E
Palagruža	Morske struje	42°23'26"N - 16°15'44"E
Vis/Biševo	Morske struje	42°58'54"N - 16° 1'12"E

Monitoring već poznatih područja zahvaćenih NZV

Na odabranim područjima na kojima je već poznato prisustvo NZV, terenska promatranja, kartiranja i uzorkovanja biti će provedena korištenjem autonomnih ronioaca (Tablica 3.3.4.7, Slike 3.3.4.13, 3.3.4.14). Cilj je dobiti kartu rasprostranjenosti NZV, procijeniti utjecaj na zavičajne zajednice te opisati osnovne biološke značajke NZV.

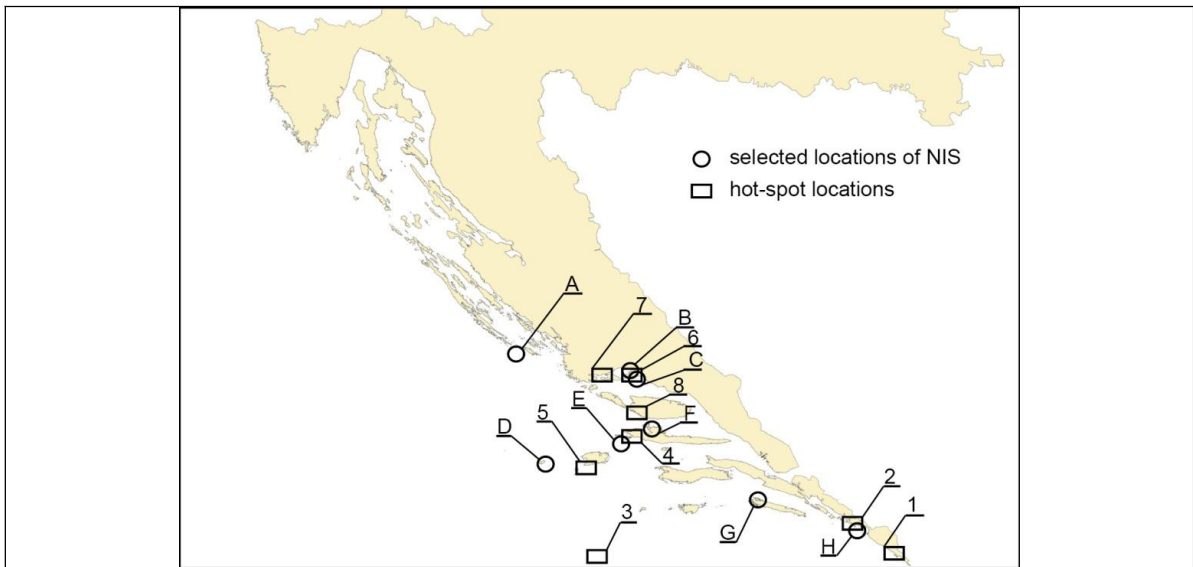
Kartiranje će biti obavljeno za svaku pojedinačnu lokaciju odnosno vrstu na način da se dobije najpreciznija karta uz razuman utrošak ronilačkog vremena. Završna karta prostorne rasprostranjenosti biti će načinjena u GIS aplikaciji.

Ovaj će monitoring omogućiti:

- izradu detaljnih karata rasprostranjenosti NZV na odabranim područjima
- procjenu utjecaja NZV
- utvrđivanje promjene utjecaja NZV (ako raniji podaci postoje)
- procjenu daljnjeg širenja s odabranog područja
- plan i sugestije za monitoring i uklanjanje.

Tablica 3.3.4.7. Odabrana već poznatih područja zahvaćenih NZV koja će biti obrađena tijekom provedbe projekta.

NZV	Područje	GPS	Vjerojatan status NZV
<i>Caulerpa taxifolia</i>	Stari Grad	43°10'56"N - 16°34'56"E	invazivna
<i>Caulerpa racemosa</i> <i>var. cylindracea</i>	Marinkovac	43° 9'6"N - 16°25'7"E	invazivna
<i>Aplysia dactylomela</i>	Brusnik/Svetac	43° 0'20"N - 15°48'0"E	nije invazivna
<i>Lophocladia lallemandii</i>	Blitvenica	43°37'27"N - 15°34'26"E	invazivna
<i>Acrothamnion preissii</i>	Dubrovnik	42°38'18"N - 18° 6'45"E	invazivna
<i>Asparagopsis taxiformis</i>	Dubrovnik Mljet	42°38'18"N - 18° 6'45"E 42°44'26"N - 17°36'17"E	invazivna nije invazivna
<i>Siphonaria pectinata</i>	Split	43°30'4"N - 16°26'13"E	invazivna
<i>Oculina patagonica</i>	Kaštelanski zaljev	43°31'40"N - 16°27'56"E	nije invazivna



Slika. 3.3.4.13. Karta „hot-spot“ područja i odabranih već poznatih područja naseljenih NZV koja će biti obrađena tijekom provedbe projekta. „Hot-spot“ područja: 1) Molunat, 2) područje Dubrovnika, 3) Palagruža, 4) luka Hvar, 5) Vis/Biševo, 6) luka Split, 7) Trogirsko remontno brodogradilište, 8) tovilište tuna. Odabrana područja: A) *Lophocladia lallemandii*, B) *Oculina patagonica*, C) *Siphonaria pectinata*, D) *Aplysia dactylomela*, E) *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea*, F) *Caulerpa taxifolia*, G) *Asparagopsis taxiformis*, H) *Acrothamnion preissii*.

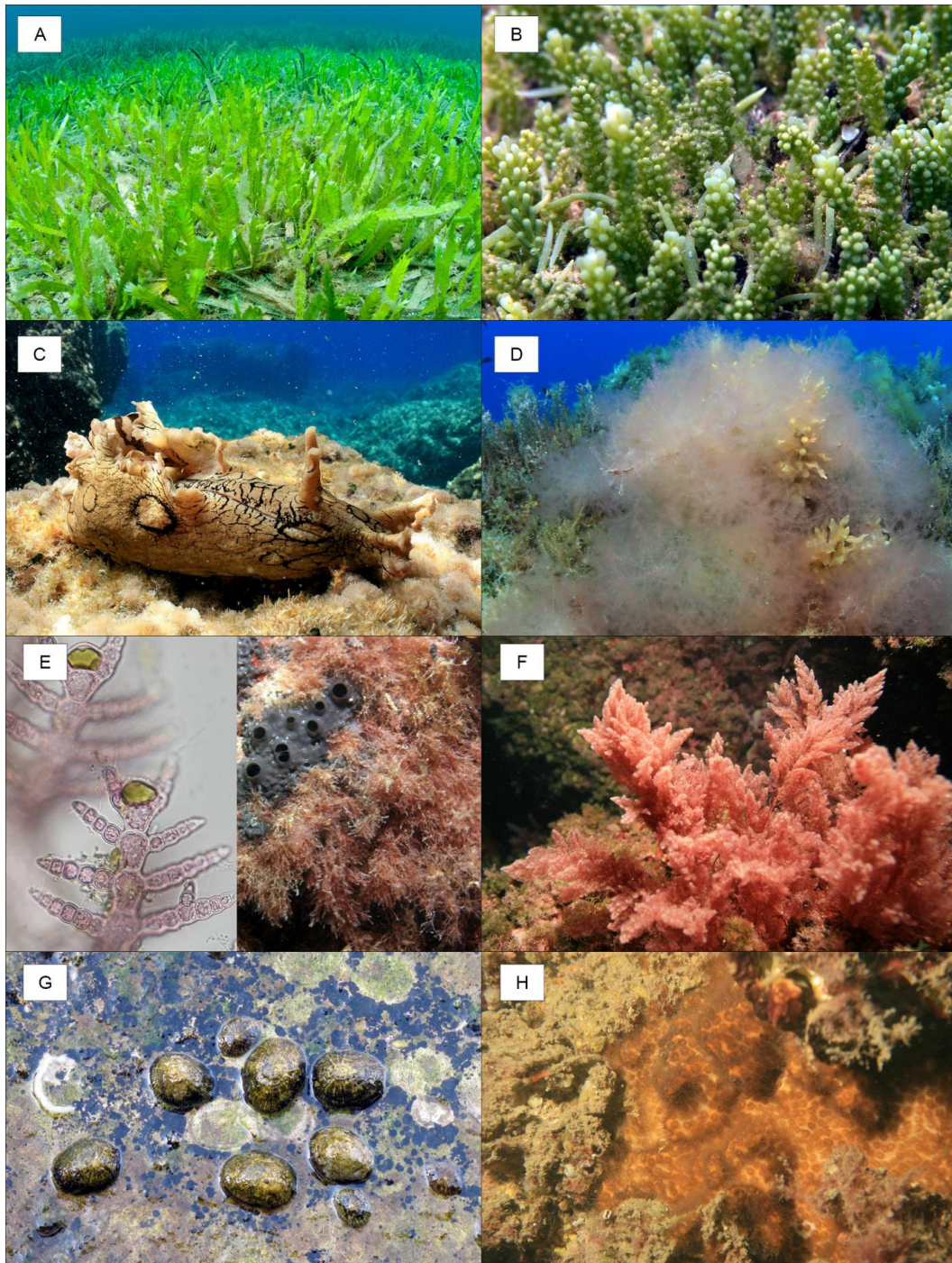


Fig. 3.3.4.14. Već zabilježene NZV za koje će procjena biti obavljena na odabranim područjima prema Tablici 2. A) *Caulerpa taxifolia*, B) *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea*, C) *Aplysia dactylomela*, D) *Lophocladia lallemandii*, E) *Acrothamnion preissii*, F) *Asparagopsis taxiformis*, G) *Siphonaria pectinata*, H) *Oculina patagonica*.

Javna prezentacija i podizanje svijesti o problematici

U cilju javne prezentacije te prikupljanja informacija o NZV od raznih korisnika mora, informacije o NZV koje mogu biti prepoznate u prirodi bez ekspertnog znanja, biti će prezentirane putem interneta (Slika 3.3.4.15). Ciljane vrste su one već zabilježene u Hrvatskom dijelu Jadrana ali i one za koje se sumnja da bi se mogle pojaviti.

Za svaku vrstu dat će se opis te informacije o biologiji, ekologiji i razini invazivnosti te karta poznate rasprostranjenosti. Internet stranica imati će aplikaciju za dojavu eventualno novih nalaza ili zabilježenih nepoznatih vrsta odnosno potencijalno NZV.

Planira se i objavljivanje preglednog popularnog članka u časopisima koji pokrivaju teme vezane uz more u kojem će se čitatelji i različiti korisnici mora pozvati na suradnju i dojavljivanje o pojavi NZV.



Slika 3.3.4.15. Online informacija o stranoj vrsti morskog puža golača *Aplysia dactylomela*. Facebook i web stranica Instituta za oceanografiju i ribarstvo.

Literatura i online baze:

- [1] PBBS - Training Course on Port Biological Baseline. G. English, O. Floerl. edit. National Institute of Water & Atmospheric Research Ltd. Christchurch. New Zealand. October 2008.
- [2] Barletta, G. 1981. Gasteropodi nudi. Quad Civ Stn Idrobiol Milano, 9: 1 - 124.
- [3] Coppejan, E. 1983. Iconographie d'Algues Méditerranéennes. Bibliotheca Phycologica, 63:1.
- [4] Ercegović, A. 1949. Sur quelques algues rouges, rares ou nouvelles de l'Adriatique. Acta Adriat., 4(3): 1-81.
- [5] Ercegović, A. 1952. Jadranske cistozire. Fauna et Flora Adriatica, 2(1): 1-212.
- [6] Ercegović, A. 1955. Contribution a la connaissance des Ectocarpes (Ectocarpus) de l'Adriatique moyenne. Acta Adriat., 3(5): 1-74.
- [7] Ercegović, A. 1956. Famille des Champiacées (Champiaceae) dans l' Adriatique moyenne. Acta Adriat., 8(2): 1-63.
- [8] Ercegović, A. 1957. La flore sous-marine de l'ilot Jabuka. Acta Adriat., 8 (8): 1-130.
- [9] Feldmann-Mazoyer, G. 1940. Recherches sur les Céramiacées de la Méditerranée occidentale. Alger, 510 pp.
- [10] Hauck, F. 1885. Des Meeresalgen Deutschlands und Österreichs. Rabenhorst Kryptogamenflora, 2 Auf., Bd., 2, Leipzig.
- [11] Parenzan, P. 1970. Carta d'identita delle conchiglie del Mediterraneo. Vol. I: Gasteropodi. Bios Taras, Taranto: 283 pp.
- [12] Parenzan, P. 1974. Carta d'identita delle conchiglie del Mediterraneo. Vol. I: Bivalvi. Bios Taras, Taranto: 277 pp.
- [13] Parenzan, P. 1976. Carta d'identita delle conchiglie del Mediterraneo. Vol. II: Bivalvi. Bios Taras, Taranto: 283 – 546.

- [14] Riedl, R. 1983. Fauna und Flora des Mittelmeeres. P. Parey, Hamburg und Berlin: 836 pp.
- [15] Sarà, M. 1971 – 1972. Guida ai Poriferi della fauna Italiana. Quad Civ Stn Idrobiol Milano, 3 – 4: 53 – 97.
- [16] Tortonese, E. 1965 Fauna d'Italia: Echinodermata. Calderoni, Bologna: 422 pp.
- [17] AlgaeBase <http://www.algaebase.org/>
- [18] CIESM <http://www.ciesm.org/online/atlas/index.htm>
- [19] DAISIE <http://www.europe-aliens.org/>
- [20] GISD <http://www.issg.org/database/welcome/>
- [21] NOBANIS <http://www.nobanis.org/>

3.3.5. Zračni pregled kitova u Jadranu

Zračni pregled kitova u Jadranskom moru biti će proveden u sklopu istraživačkih aktivnosti EU IPA Adriatic project „Network for conservation of Cetaceans and sea turtles in the Adriatic sea – NETCET“. Projektni partneri su u Italiji Institute for Environmental Protection and Research (ISPRA, Italy) te u Hrvatskoj Institut Plavi svijet u suradnji s Hrvatskim prirodoslovnim muzejom i Institutom za oceanografiju i ribarstvo te International Whaling Commission. Pregled će biti obavljen s ciljem dobivanja druge informacije o brojnosti i rsprostranjenosti kitova na cijelom području Jadranskog mora, primarno dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) ali i drugih zakonom zaštićenih vrsta poput glavate želve (*Carreta carreta*), prugastog dupina (*Stenella coeruleoalba*) (Slika 3.3.5.1) i goluba uhana (*Mobula mobular*). Ovi podaci će biti osnova za procjenu njihovog statusa i pokretanja aktivnosti na poboljšanju njihove zaštite i upravljanja na razini cijelog Jadrana.

Ciljana vrsta

Glavna ciljana vrsta ovog pregleda je dobri dupin (*Tursiops truncatus*), ali i duge vrste kitova te morske kornjače. Prikupljati će se podaci i o hrskavičnjačama posebice o golubu uhanu (*Mobula mobular*).

Dizajn pregleda

Zasnovano na oceanografskim značajkama Jadranskog mora i poznatim podacima o zastupljenosti, rasprostranjenosti i raznolikosti ciljanih vrsta, primarno dobrog dupina, pregled je organiziran tako da pokrije što veći dio Jadrana.

Jadransko će more biti pokriveno od sjevera do juga kroz seriju od 54 paralelna transekta međusobno udaljena 15 km (vidi Sliku 3.3.5.2).

Avion Partenavia-P68 opremljen dvostrukim setom sjedala s ispuččemin staklima koristit će se kao promatračka platforma (Slika 3.3.5.3). Avion će letjeti na visini od oko 650 stopa brzinom od 90-100 km h⁻¹ ovisno o trenutnim uvjetima.

Sakupljanje podataka

Sakupljanje podataka će biti obavljeno prema standardnoj proceduri zračnog pregleda prema metodologiji udaljenog promatranja uzimajući u obzir opažanja i promatrački napor.

Primarni parametri od interesa su: vrsta, veličina skupine, udaljenost od transekta, vrijeme promatračkog napora, značajke okoliša (stanje mora, naoblaka, odsjaj, subjektivnost promatrača, itd.).

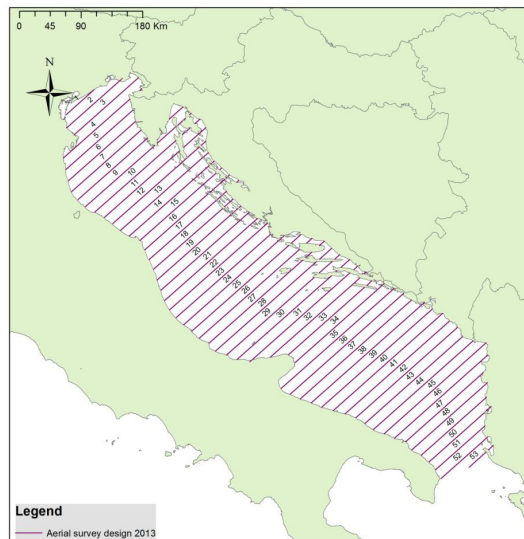
Dvostruka promatračka platforma će biti korištena kako bi se omogućila korekcija procjene brojnosti.

Analiza

Analiza podataka će biti načinjena korištenjem programa DISTANCE i standardne metode udaljenog promatranja. Rezultat će omogućiti procjenu ukupne brojnosti ciljanih vrsta ispravljene za korekciju dostupnosti organizma i promatračke pogreške.



Slika 3.3.5.1. Brojni prugasti dupini (*Stenella coeruleoalba*) zabilježeni tijekom zračnog pregleda tijekom 2010. godine.



Slika 3.3.5.2. Predefinirani profili za zračni pregled kitova tijekom 2013. godine.



Slika 3.3.5.3. Avion Partenavia-P68 opremljen dvostrukim nizom sjedala s ispupčenim prozorima biti će korišten kao promatračka platforma.

Eufauzidi kao potencijalna hrana velikim planktonotrofima

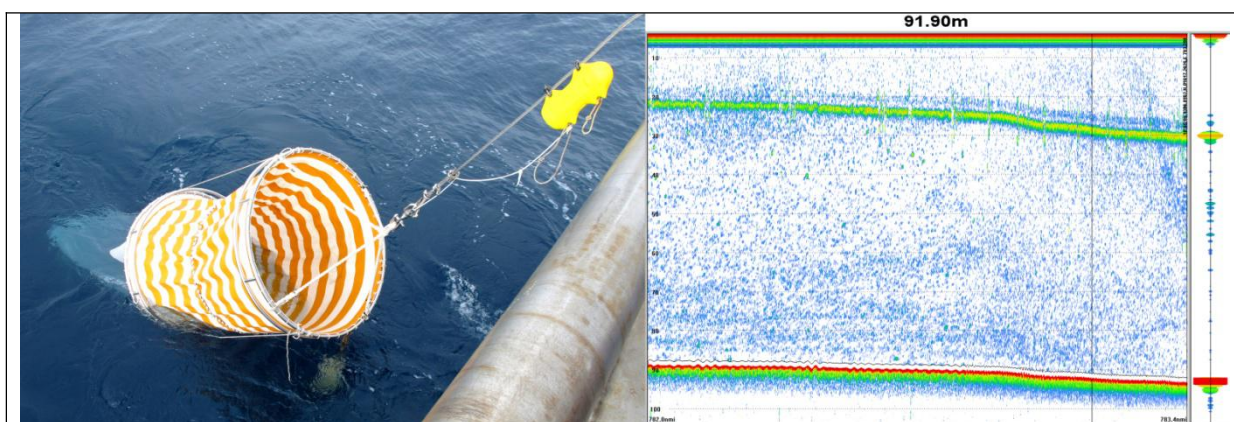
U cilju utvrđivanja pojave eufauzida *Nyctiphanes couchii* na području Vis-Jabuka, terenska istraživanja će biti obavljena korištenjem istraživačkog broda tijekom proljeća i jeseni. Područje Vis-Jabuka uzeto je zbog podatka kako je to mjesto učestalog pojavljivanja velikog kita (*Balaenoptera physalus*) i goluba uhana (*Mobula mobular*).

Materijali i metode

Zooplanktonske agregacije u obliku difuznog sloja pratit će se preko eho sondera Ek 60. Kako bi se vrsta identificirala, za lov će se koristiti planktonska mreža s vertikalnim i horizontalnim potegom. Vertikalni poteg biti će načinjen korištenjem Nansen mreže (200 μm promjer oka mreže, 75 cm diametar otvora) na sljedećim dubinskim profilima: 0-50 m i 50 m - dno.

Horizontalni poteg biti će napravljen korištenjem Nansen mreže (1000 μm promjer oka mreže, 120 cm diametar otvora), na dubini za koju je eho sonder pokazao visoku gustoću zooplanktona (Slika 3.3.5.4). Prosječna brzina vertikalnog potega predviđa se $0,5 \text{ m s}^{-1}$ a horizontalnog 2 Nm h^{-1}

Uzorci se pohranjuju za daljnju laboratorijsku obradu i identifikaciju vrsta u 2,5% morsku otopinu formalina puferiranu sa CaCO_3 .



Slika 3.3.5.4. Horizontalni poteg s Nansen mrežom (lijevo) biti će napravljen u nakupinama zooplanktona koje će se identificirati uz pomoć eho sondera (desno). Dubina mreže prati se uz pomoć sonde pričvršćene uz otvor mreže (žuti uređaj na lijevoj fotografiji).

3.4. Ribarstveni parametri

3.4.1. Monitoring Jabučke kotline – kritično područje za pridnene vrste

Područje istraživanja stanja pridnenih naselja obuhvaća otvoreni srednji Jadran, tj. šire područje Jabučke kotline, koje je definirano kao dio srednjeg Jadrana dublji od 100 metara. Ukupna površina Jabučke kotline iznosi oko 11.500 km², a uključuje hrvatsko teritorijalno more, Zaštićeni ekološko ribolovni pojas, te dio talijanskog epikontinentalnog pojasa. Uzorkovanje se obavlja dva puta godišnje i to: u toplijem (ljetnom) dijelu godine (lipanj-srpanj), te u zimskom razdoblju (prosinac-siječanj). Tijekom istraživanja prikupljaju se podatci sa 20-ak nasumično raspoređenih postaja u hrvatskom ribolovnom moru (stratificirano nasumično uzorkovanje prema dubinskim stratumima, a jednom određen položaj postaja (koordinate) ostaje stalan tijekom svih istraživanja (ljetno, zima)

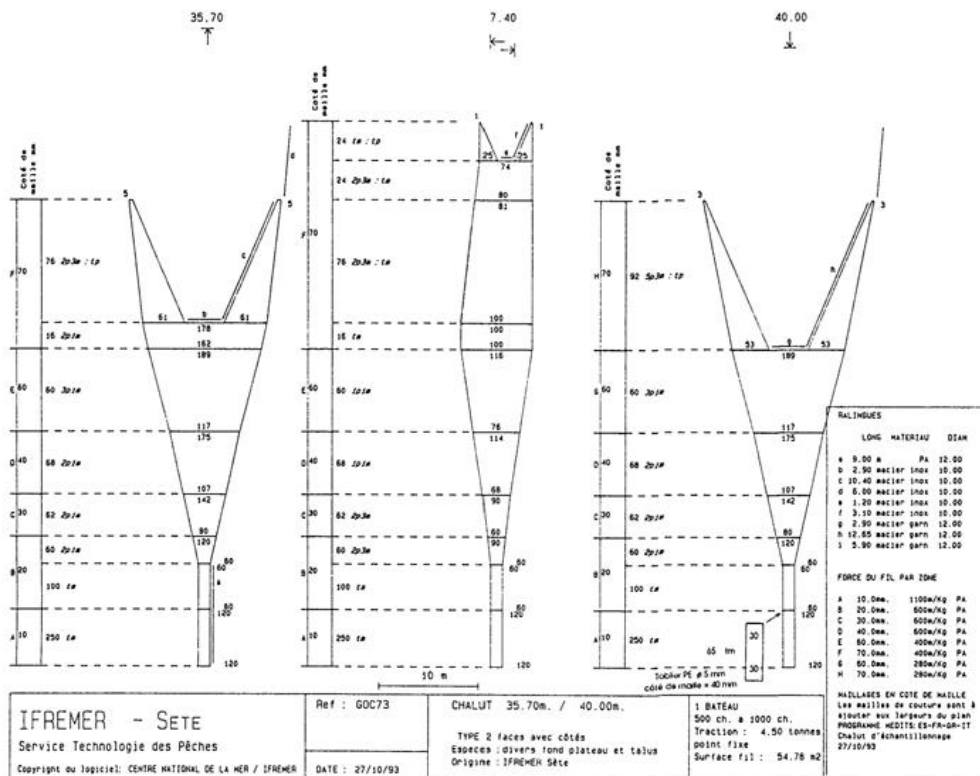
Uzorkovanje se obavlja korištenjem znanstveno istraživačkog broda BIOS DVA uz upotrebu pridnene povlačne mreže kočice. Kočica se povlači isključivo tijekom dana (dok još postoji dnevno svjetlo), a trajanje potega je 30 minuta na dubinama manjim od 200 metara, a 60 minuta na dubinama većim od 200 metara.

Uz ribarstveno biološke podatke vezane uz pridnene vrste i pridnene zajednice, tijekom istraživanja prikupljaju se i različiti dodatni podatci kao što su hidrografija (dubina, temperature, slanost) i biološki podatci (mala plava riba, analiza bentosa, uzorkovanje zooplanktona).

Uzorkovanje se obavlja specijalno konstruiranom pridnenom povlačnom mrežom kočicom tipa GOC 73 (koja je standardna za europska istraživanja pridnenih naselja – ekspedicija MEDITS), a shematski prikaz mreže nalazi se na slici 3.4.1.1. U odnosu na klasičnu, komercijalnu mrežu, ova mreža ima veći vertikalni (oko 2 metra) i horizontalni otvor (oko 20 metara), te slabiji kontakt sa podlogom (stoga slabije lovi organizme zakopane na površini morskog dna).

U svakom potegu obavljat će se analiza makrofaune, što uključuje ciljane vrste kočarskog ribolova, slučajne brste u lovinama, prilov, odbačeni ulov te anorganski i organski otpad. Za sve vrste bilježi se broj komada i njihova masa, te se uzima poduzorak za laboratorijske analize.

Za sve ciljane vrste (gospodarski najvažnije vrste u kočarskom ribolovu), uzima se poduzorak od za detaljne laboratorijske analize (Tablica 3.4.1.1). Laboratorijske analize uključuju mjerenje totalne dužine (za rakove još i glavopršnjaka, a za glavonošce plašta), vaganje mase, određivanje spola i stupnja zrelosti gonada (Tablice 3.4.1.2, 3.4.1.3, 3.4.1.4 i 3.4.1.5), te vađenje otolita radi određivanja starosti. Svi podatci o potegu i ulovu, kao i podatci koji potječu od laboratorijske analize spremaju se bazu podataka ATRIS, koja služi i za osnovnu statističku obradu i GIS prezentaciju podataka.



Slika 3.4.1.1. Eksperimentalna pridrena koća MEDITS GOC73

Tablica 3.4.1.1. Glavne vrste koćarskog ribolova u Jabučkoj kotlini

Oslić (<i>Merluccius merluccius</i>)	
Trlja blatarica (<i>Mullus barbatus</i>)	
Arbun (<i>Pagellus erythrinus</i>)	
Grdobina (<i>Lophius bidegassa</i>)	
Bijeli muzgavac (<i>Eledobe cirrhosa</i>)	
Škamp (<i>Nephrops norvegicus</i>)	
Kozica (<i>Parapenaeus longirostris</i>)	

Brojnost, biomasa i dužinske frekvencije vrsta računaju se korištenjem „swept area method“ (metode ulova na jedinicu površine), a svi podatci se standardiziraju na jediničnu

površinu (na kilometar kvadratni). Kako tijekom istraživanja nije određivan koeficijent lovnosti ribolovnog alata (*catchability coefficient*), u računima je uzeto da je on 1, te se umjesto apsolutne biomase i abundancije koriste indeksi biomase i indeksi abundancije. Indeksi biomase i brojnosti računati su na sljedeći način:

$$W_i = \frac{A_i}{A} \quad \bar{x} = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} x_{i,j}}{n_i} \quad I = \sum_{i=1}^N W_i \bar{x}$$

Gdje je:

- \bar{x} srednja vrijednost varijable x (broj ilimasa) na jedinicu površine u stratumu i ,
- W_i relativna biomasa (ili broj) u stratumu i ,
- A površina istraživnog područja,
- N broj stratuma u istraživnom području (A)
- A_i površina pojedinog stratuna i ,
- n_i broj potega u stratumu i ,
- $A_{i,j}$ površina potega j u stratunu i ,
- f_i udio uzoraka u stratunu i ,
- $x_{i,j}$ izmjerene vrijednosti j .u pojedinim startumima

Srednja vrijednost indeksa biomase i brojnosti

Srednja vrijednost indeksa na jedinicu površine u pojedinom stratumu može se računati korištenjem ulova s obzirom na ukupnu prijeđenu površinu ili kao srednjak vrijednosti pojedinih uzoraka u pojedinom stratumu:

$$y_{i,j} = \frac{x_{i,j}}{A_{i,j}}; \quad \bar{y}_{i,j} = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} y_{i,j}}{n_i}$$

Varijanca pojedine vrijednosti u stratumu i je:

$$\tilde{S}_{xi}^2 = \frac{1}{n_i - 1} \sum_{j=1}^{n_i} A_{i,j} \frac{x_{i,j}^2}{A_{i,j}} - \bar{x}_i^2$$

Varijanca procjene ukupnog srednjaka je:

$$Var(\bar{x}_i) = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} A_{i,j} \tilde{S}_{xi}^2$$

Varijanca pojedinog indeksa iznosi:

$$var(I) = \sum_{i=1}^N W_i^2 \frac{\tilde{S}_{xi}^2}{n_i} (1 - f_i)$$

Za opisivanje promjena u rasprostranjenosti pojedinih vrsta koristi se indeks učestalosti pojavljivanja (broj pozitivnih postaja u odnosu na ukupan broj postaja u datoj godini ili istraživanju):

Srednja masa lovljenih primjeraka računa se po sljedećoj formuli:

$$W(g) = \frac{IB \left(\frac{kg}{km^2} \right)}{IN \left(\frac{N}{km^2} \right)} \times 1000$$

Spol i stupnjevi spolne zrelosti određuju se makroskopskim pregledom gonada i korištenjem skale koja je propisana za ribarstveno biološka istraživanja na razini STCEF-a i MEDITS-a, a posebne skale postoje ta ribe koštunjače, hrskavičnjače, te rakove i glavonošce (Tablice 2, 3, 4 i 5)

Tablica 3.4.1.2. Stupnjevi zrelosti kod koštunjača

SEX	GONAD ASPECT	MATURATION STATE	STAGE	MEDITS	
U	Sex not distinguished by naked eye. Gonads very small and translucent, almost transparent. Sex undetermined.	UNDETERMINED	0	0	
F	Small pinkish and translucent ovary shorter than 1/3 of the body cavity. Eggs not visible by naked eye.	IMMATURE = VIRGIN	1	1	
M	Thin and whitish testis shorter than 1/3 of the body cavity.				
F	Small pinkish/reddish ovary shorter than 1/2 of the body cavity. Eggs not visible by naked eye.	VIRGIN-DEVELOPING *	2a	2	
M	Thin whitish testis shorter than 1/2 of the body cavity.				
F	Pinkish-reddish/reddish- orange and translucent ovary long about 1/2 of the body cavity. Blood vessels visible. Eggs not visible by naked eye.	RECOVERING *	2b		
M	Whitish/pinkish testis, more or less simmetrical, long about 1/2 of the body cavity.				
F	Ovary pinkish-yellow in colour with granular appearance, long about 2/3 of the body cavity. Eggs are visible by naked eye through the ovaric tunica, which is not yet translucent. Under light pressure, eggs are not expelled.	MATURING	2c		
M	Whitish to creamy testis long about 2/3 of the body cavity. Under light pressure, sperm is not expelled.				
F	Ovary orange-pink in colour, with conspicuous superficial blood vessels, long from 2/3 to full length of the body cavity. Large transparent, ripe eggs are clearly visible and could be expelled under light pressure. In more advanced conditions, eggs escape freely.	MATURE/SPAWNER	3		3
M	Whitish-creamy soft testis long from 2/3 to full length of the body cavity. Under light pressure, sperm could be expelled. In more advanced conditions, sperm escapes freely.				
F	Reddish ovary shrunked to about 1/2 length of the body cavity. Flaccid ovaric walls; ovary may contain remnants of disintegrating opaque and/or translucent eggs.	SPENT	4a		4
M	Bloodshot and flabby testis shrunken to about 1/2 length of the body cavity.				
F	Pinkish and translucent ovary long about 1/3 of the body cavity. Eggs not visible by naked eye.	RESTING *	4b		
M	Whitish/pinkish testis, more or less simmetrical, long about 1/3 of the body cavity.				

 Adult specimens

Tablica 3.4.1.3. Stupnjevi zrelosti kod hrskavičnjača

SEX	GONAD ASPECT	MATURATION STATE	STAGE	MEDITS
N	The specimens aren't sexed.	NOT DETERMINED	0	0
F	Ovary is barely discernible with small isodiametric eggs. Distal part of oviducts is thick-walled and whitish. The nidamental glands are less evident.	IMMATURE / VIRGIN	1	1
M	Claspers are small and flaccid and do not reach the posterior edge of the pelvic fins. Spermducts not differentiated. Testis small and narrow .			
F	Whitish and/or few yellow maturing eggs are visible in the ovary. The distal part of oviducts (uterus) is well developed but empty. The nidamental glands are small.	MATURING	2	2
M	Claspers are larger, but skeleton still flexible. They extend to the posterior edge of the pelvic fins. Spermducts well developed eventually beginning to meander.			
F	Ovaries contain yellow eggs (large yolk eggs). The nidamental glands are enlarged and oviducts are distended.	MATURE	3a	3
M	Claspers extends well beyond the posterior edge of the pelvic fin and their internal structure is generally hard and ossified. Testis greatly enlarged. Spermducts meandering over almost their entire length.			
F	Ovary walls transparent. Oocytes of different sizes, white or yellow. Nidamental glands large. Egg-cases more or less formed in the oviducts (Extruding Stage).	MATURE/EXTRUDING-ACTIVE	3b	
M	Clasper longer than tips of posterior pelvic fin lobes, skeleton hardened with axial cartilages hardened and pointed. Spermducts largely. Sperm flowing on pressure from cloaca (Active Stage).			
F	Ovary walls transparent. Oocytes of different sizes, white or yellow. Oviducts appear much enlarged, collapsed and empty. The nidamental glands diameter are reducing.	RESTING	4	4
M	Clasper longer than tips of posterior pelvic fin lobes, skeleton hardened with axial cartilages still hardened. Spermducts empty and flaccid.			

 Adult specimens

Tablica 3.4.1.4. Stupnjevi zrelosti kod rakova

SEX	REPRODUCTIVE APPARATUS ASPECT	COLOURING OF FRESH OVARY	MATURATION STATE	STAGE	MEDITS
U	Sex not distinguished by naked eye. Sex undetermined	translucid	UNDETERMINED	0	0
F	Ovary hardly visible in transparence. After dissection of the tegument ovary is small and lobes are flaccid, stringy and poorly developed. <i>A. foliacea</i> and <i>A. antennatus</i> no spermatophores on thelycum.	Whitish or traslucid	IMMATURE = VIRGIN *	1	1 FEMALE
M	Petasma is not much visible, and there are not spermatoph masses (emi-spermatophores) on the seminal ampullae, located on side of the V pair of pereopods. <i>A. foliacea</i> and <i>A. antennatus</i> : long rostrum.				
F	Ovary status to develop. Cephalic and lateral lobes are small but distinguishable by naked eye. Abdominal extension are thin and just visible.	<i>A. foliacea</i> : flesh coloured; <i>A. antennatus</i> : Ivory coloured with orange pink-violet dotting. <i>N. norvegicus</i> : cream. <i>P. longirostris</i> : cream orange.	VIRGIN DEVELOPING **	2a	2 FEMALE
M	Petasma appears visible and nearly or completely joined, but there are no spermatoph masses in the seminar ampullae. <i>A. foliacea</i> & <i>A. antennatus</i> : long or intermediate rostrum.				
F	Ovary status to re-develop. Cephalic and lateral lobes are small but distinguishable by naked eye. Abdominal extension are thin and just visible. Occasionally presence of spermatophores in <i>A. foliacea</i> and <i>A. antennatus</i> .	<i>A. foliacea</i> : flesh coloured; <i>A. antennatus</i> : Ivory coloured with orange pink-violet dotting. <i>N. norvegicus</i> : cream. <i>P. longirostris</i> : cream orange.	RECOVERING**	2b	
M	Petasma appears completely joined, but there are no spermatoph masses in the seminar ampullae. <i>A. foliacea</i> & <i>A. antennatus</i> : short rostrum.				
F	Ovary developed and occupies almost entirely the dorsal portion. The cephalic and lateral lobes are much developed and have a turgid consistence.	<i>A. foliacea</i> : light and dark grey; <i>A. antennatus</i> : lilla; <i>N. norvegicus</i> : light green; <i>P. longirostris</i> : light green or grey green.	MATURING OR ALMOST MATURE	2c	
M					
F	Turgid ovary extends to the whole dorsal portion, cover the organs below. Lobes and extensions well developed, in particular the abdominal extention are much evident. Oocytes well visible.	<i>A. foliacea</i> : black; <i>A. antennatus</i> : violet; <i>N. norvegicus</i> : dark grey; <i>P. longirostris</i> : brigh green or olive green.	MATURE	2d	
M	Petasma is perfectly visible and completely joined. Spermatoph masses in seminar ampullae. <i>A. foliacea</i> & <i>A. antennatus</i> : small rostum.				
F	Resting ovary. Presence of spermatophores in <i>A. foliacea</i> and <i>A. antennatus</i> .	Uncoloured.	RESTING ADULT*	2e	
F (<i>N. norvegicus</i>)	Eggs on pleiopods		BERRIED	3	3 <i>N. norvegicus</i> , FEMALE

 Adult specimens

Tablica 3.4.1.5. Stupnjevi zrelosti kod glavonožaca

SEX	REPRODUCTIVE APPARATUS ASPECT	EGGS SIZE (mm)	SPERMATOPHOSES DEVELOPMENT	MATURATION STATE	STAGE	MEDITS
U	Sex not distinguished by naked eye. Sex undetermined.	Total absence of eggs.	Total absence of spermatophores.	UNDETERMINED	0	0
F	Small and translucent Nidamental Glands (NG) / Oviducal Glands (OG). Ovary is semi-transparent, stringy and lacking granular structure Small semi-transparent NG / OG. Oviduct meander not visible.	<i>L. vulgaris</i> & <i>I. coindetii</i> : no eggs <i>S. officinalis</i> : $\varnothing < 2mm$ <i>E. moschata</i> : $\varnothing < 4mm$	Total absence of spermatophores	IMMATURE = VIRGIN	1	1
M	Testis small. Spermatophoric complex (SC) semi-transparent with not visible Vas deferens. Penis appears as a small prominence of SC.	<i>E. cirrhosa</i> $\varnothing < 2mm$ <i>O. vulgaris</i> $\varnothing < 1mm$				
F	NG / OVG enlarged. NG covering some internal organs. Whitish ovary with granular structure clearly visible, not reaching the posterior half of the mantle cavity. Oviduct meander clearly visible.	Very small eggs	Absence of spermatophores	DEVELOPING	2a	2
M	Enlarged testis with structure not clearly visible. The Vas deferens whitish or white and the spermatophoric organ with white streak.					
F	Large NG covering the viscera below. Ovary occupies the whole posterior half of mantle cavity, containing reticulated oocytes of all sizes tightly packed and probably a few ripe ova at its proximal part. Oviducts fully developed but empty.	<i>L. vulgaris</i> & <i>I. coindetii</i> : maturing eggs visible by naked eye. <i>S. officinalis</i> : $2,1mm < \varnothing < 4mm$ <i>E. moschata</i> : $4mm < \varnothing < 11mm$ <i>E. cirrhosa</i> : $2mm < \varnothing < 5mm$ <i>O. vulgaris</i> : $1mm < \varnothing < 2mm$	<i>L. vulgaris</i> , <i>I. coindetii</i> and <i>S. officinalis</i> : few immature spermatophores in Needham's sac. <i>E. moschata</i> , <i>E. cirrhosa</i> , <i>O. vulgaris</i> : few spermatophores, barely developed and not functional	MATURING	2b	
M	The Vas deferens white, meandering, enlarged. The Needham's sac (SS) with structureless whitish particles inside. Normally the Needham's sac is without functional spermatophores but sometimes some immature/abortive ones could occur. The testis tight, crispy, with visible structure.					
F	Large NG as previously. Ovary containing higher percentage of large reticulated eggs and some large ripe ova with smooth surface. In Teuthoidea ripe ova in oviducts.	<i>L. vulgaris</i> & <i>I. coindetii</i> : amber-colored and isodiametric eggs in oviducts and in part of the ovary ($\varnothing = 2mm$ in <i>Loligo</i> and $\varnothing = 1mm$ in <i>Illex</i>). <i>S. officinalis</i> : medium eggs ($4,1mm < \varnothing < 6,0mm$) and big eggs ($6,1mm < \varnothing < 8mm$) <i>E. moschata</i> : $\varnothing > 11mm$ (striped eggs). <i>E. cirrhosa</i> : $\varnothing > 5mm$ <i>O. vulgaris</i> : $\varnothing > 2mm$	Well developed spermatophores	MATURE	3a	3
M	Testis as before. Spermatophores packed in the Needham's sac.					
F	NG/OG large but soft and running. Ovary shrunk and flaccid, with only immature oocytes attached to the central tissue and a few loose large ova in the coelom. In Teuthoidea oviduct may contain some mature ova but is no longer packed.	Few large ova	Disintegrating spermatophores	SPENT	3b	
M	Disintegrating spermatophores in the Needham's sac and the penis.					

 Adult specimens

3.4.2. Monitoring glavnih mrijestilišta srdele i incuna

U svrhu ovog projekta provest će se dvije znanstvene ekspedicije (s obzirom da se srdela i incun mrijeste u različito doba godine) istraživačkim brodom BIOS DVA u vrijeme mrijješćenja ispitivanih vrsta. Tijekom ekspedicija uzorkovat će se ihtioplankton te će se izvršiti snimanje ehosonderom.

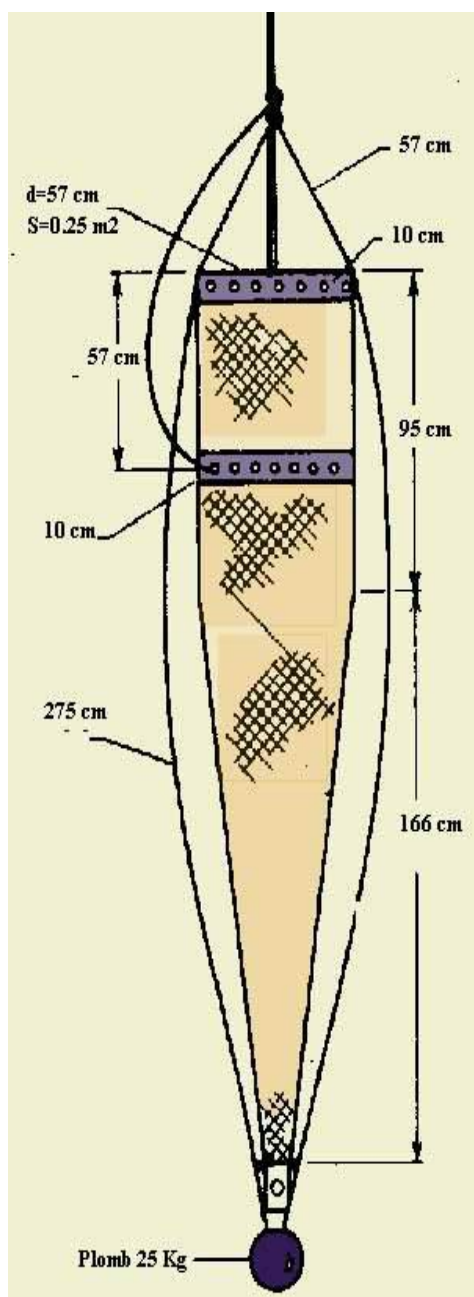
Prva ekspedicija će se odvijati tijekom toplijeg (uzorkovanje jaja i larvi te adulta incuna), a druga u hladnijem dijelu godine (uzorkovanje jaja i larvi te adulta srdele). Tijekom toplijeg dijela godine, točnije u srpnju 2013. godine, uzorkovanje će se odvijati na unaprijed definiranom pilot području Kvarnera i Kvarnerića, dok će se u hladnijem dijelu godine uzorkovati na području srednjedalmatinskih otoka s transektom prema Palagruži.

Vertikalni ihtioplanktonski uzorak će se uzorkovati na svakoj postaji standardnom zooplanktonskom mrežom WP2 (otvor usta, 0.255 m²; oko mreže, 0.200 mm; SI. 3.4.2.1). Uzorkovanje planktonskog materijala će se odvijati na način da se mreža vertikalno spusti (do 100 m dubine ili do 5 m iznad dna u slučaju da se radi o području plićem od 100 m) s istraživačkog broda u stanju mirovanja. Na svakoj postaji će se mjeriti i temperatura mora sondom na dubinama od 0 i 5 m. Planktonski uzorci će se pohraniti u prethodno označene plastične posude s 4 % formalinom.

Prikupljeni uzorci ihtiopelagijala će se naknadno obraditi u Laboratoriju Instituta za oceanografiju i ribarstvo, gdje će se jaja i larve ciljanih vrsta, točnije srdele i incuna, izdvojiti iz čitavog uzorka. Razvojni stadiji jaja srdele će biti određeni u 11 stadija prema Ahlstromovoj skali (1943), dok će se stadiji razvoja jaja incuna determinirati prema Regner (1985). Jaja u svakom razvojnom stadiju kao i larve, će se prebrojati te će se definirati abundancija istih po m².

Tijekom ekspedicije povlačnom mrežom će se prikupiti i uzorci adultnih jedinki srdele i incuna. Nasumični uzorak činilo bi 1 – 1,5 kg adultnih jedinki, s tim što će se tijekom toplijeg dijela godine uzimati uzorci incuna a tijekom hladnijeg dijela godine uzorci srdele. Prikupljene adultne jedinke će se spremati u plastične posude (10 l) s 10 % formalinom, kako bi se sačuvale za daljnju analizu. Laboratorijska analiza adultnih jedinki će uključivati mjerenje ukupne dužine tijela (\sim 0.1 mm), bilježenje ukupne mase tijela (\sim 0.01 g) te određivanje spola analiziranih jedinki. Makroskopskom analizom će se odrediti spol i stadij spolne zrelosti. Histološkom analizom gonada (polovica gonade odnosno jedan režanj gonade će se spremati za histološku analizu a drugi za izračunavanje fekunditeta) će se potvrditi prethodno utvrđeni stadiji spolne zrelosti te će se ujedno procjeniti fekunditet ispitivanih vrsta. Histološki preparati će se pripremiti prema sljedećem protokolu; (i) po jedan režanj gonade jedinki srdele i incuna će se spremati u plastične tubice s 4 % formalinom; (ii) nakon fiksacije, uzorci će se dehidrirati uzastopnim prebacivanjem tkiva u sve koncentriraniju otopinu etanola te (iii) će se na kraju uzorak uklopiti u parafin. (iv) Longitudinalni ili poprečni presjeci (debljine 10 μ m) uklopljenog tkiva gonade će se rezati mikrotomom, nakon čega (v) će se uzorak bojati haematoxylinom i eozinom. Napravljeni histološki preparati će se promatrati pod mikroskopom, dok će se klasifikacija razvojnog stadija oocita utvrditi s obzirom na morfologiju istog (Yamamoto i Yamazaki, 1961). U obzir će se uzeti smo oni ovariji kod kojih na histološkom preparatu nije uočena prisutnost postovulatornih folikula (POF) koji ukazuju na to da je analizirana jedinka jedan dio jaja već ispustila. Drugi režanj gonade istih jedinki će se analizirati pod lupom (Olympus - povećanje 1,6 x 144) za koju je pričvršćen i fotoaparatom kojim će uzorak biti i snimljen. Analiza uzetih slika će se izvršiti na računaru preko OLYMPUS DP-softwarea pomoću kojeg će se odrediti broj zrelih jaja (oocite s migrirajućom jezgrom i hidratizirani oociti) kao i njihov dijametar (dužina najduže osi; D). Batch fekunditet (F, broj oocita ispuštenih pri jednom mrijestu) će se odrediti gravimetrijskom

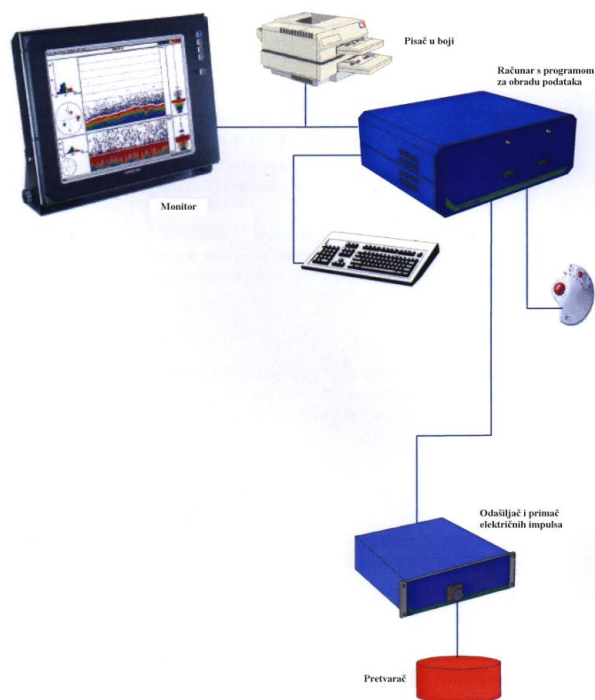
metodom prema Hunter i sur. (1985), koja se temelji na određivanju broja zrelih oocita u ovariju. Sami batch fekunditet će se izračunati preko broja zrelih jaja u analiziranom poduzorku koji će biti podignut na ukupnu masu promatranog ovarija.



Slika 3.4.2.1. Shematski i fotografski prikaz standardne planktonske mreže WP2 kojom će se prikupiti uzorci ihtiopleačijala

Pored navedenih uzorkovanja ihtiipelagijala i adultnih jedinki, distribucija i abundancija ciljanih vrsta će se odrediti i preko akustične metode odnosno ehosondiranjem s ehosonderom SIMRAD EK60 frekvencije 38 kHz (sl 3.4.2.2).

Po završetku ekspedicija kao i svih navedenih analiza svi prikupljeni podaci će biti pohranjeni u institutsku bazu podataka.



Slika 3.4.2.2. Shematski prikaz hidroakustičkog sustava eho-sondera EK60 instaliranog na istraživačkom brodu „BIOS DVA“.

Literatura

Ahlstrom E.H. 1943. Studies on the Pacific pilchard or sardine (*Sardinops caerulea*). Influence of temperature on the rate of development of pilchard eggs in nature. U.S. Fish. Wildl. Serv.. Spec. Sci. Rep. 23. 26 p.

Hunter JR, Lo NCH, Leong RJH (1985) Batch fecundity in multiple spawning fishes. In: Lasker R (ed) An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: Application to the northern anchovy *Engraulis mordax*. NOAA Tech Rep NMFS 36: 67-78

Regner S. (1985) Ecology of planktonic stages of the anchovy, *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758), in the central Adriatic. Acta Adriatica, 26 (1, Series Monographiae, 1), pp. 1–113.

Yamamoto K, Yamazaki F (1961) Rhythm of development in the oocyte of the gold-fish. Bull Facul Fish Hokkaido University 12: 93-110

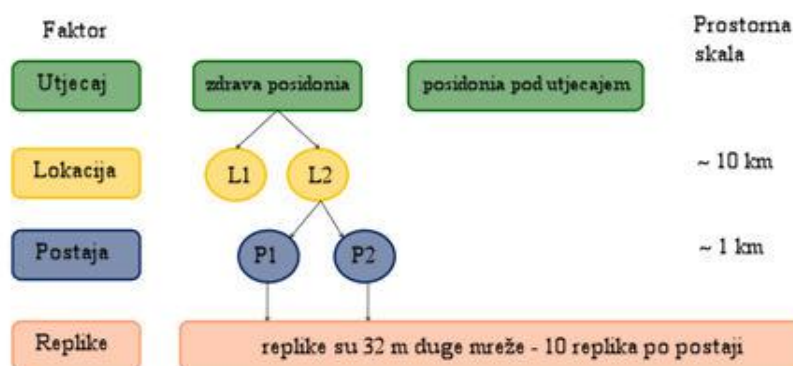
3.4.3. Monitoring livada morskih cvjetnica kao kritičnih područja za obnavljanje priobalnih populacija riba

Deset povezanih mreža „poponica“, svaka visine 1,5 m i dužine 32 m sa promjerom oka mahe 28 mm i popona 150 mm, potapljane su na postajama u sumrak, a iz mora su izvlačene u zoru. Mreže su spuštane na dubinama od 10 do 30 m. Nakon identifikacije, svim jedinkama je izmjerena ukupna dužina (do najbližeg 1 mm) i ukupna masa (do najbližeg 1 g).

Nedorasle ribe lovljene su malom obalnom potegačom dužine 25 m. Veličina oka sake ove mreže je 4 mm, dok je veličina oka na krilima 8 mm. Nakon ulova, uzorci su pohranjeni u plastične bočice, te fiksirani u 4% morskoj otopini formaldehida. U laboratoriju je nakon identifikacije, svim jedinkama je izmjerena ukupna dužina (do najbližeg 1 mm) i ukupna masa (do najbližeg 1 g).

Ihtioplankton je uzorkovan planktonskom mrežom promjera obruča 80 cm i finoće tkanja 200 μ m okomitim potezima od dna do površine. Organizmi su konzervirani neutraliziranim formaldehidom konačne koncentracije 2.5%. U laboratoriju su uzorci analizirani korištenjem stereomikroskopa Olympus uz povećanje od 16 do 100 puta. Prebrojana su sva jaja i ličinke riba u uzorku, a njihova je brojnost izražena prema formuli $N=2,0 \times n$; gdje je N broj jedinki po m^2 . Identifikacija jaja i ličinki riba je izrazito kompleksna, pa su determinirana do najnižeg mogućeg taksonomskog stupnja. Za determinaciju su korišteni slijedeći ključevi: Lo Bianco (1937), Russell (1976), Ré i Meneses (2009) te baza podataka www.larvalbase.org.

Područje je uzorkovano upotrebom strukturiranog ugnježđenog dizajna. Uzorci su prikupljeni na dva nivoa utjecaja (zdrava posidonia i posidonia pod antropogenim utjecajem) (Slika 3.4.3.1). Lokacije uzorkovanja odabrane su slučajnim odabirom te su na svakom odabranom području ribe uzorkovane na dvije udaljene lokacije pomoću istog alata (trostruke mreže stajačice, mala obalna potegača).



Slika 3.4.3.1. Procedura uzorkovanja u istraživanju antropogenog utjecaja na ihtiozajednice na livadama *Posidonia oceanica*

Istraživanje je obavljeno na području srednjeg i južnog Jadrana. Lokacije uzorkovanja na području srednjeg Jadrana bile su na području otoka Zirje, Kaprije and Zlarin, dok su lokacije uzorkovanja na području južnog jadrana bile na području Dubrovnika i otoka Dakse.

Uzorkovanje trostrukim mrežama „poponicama“ obavljeno je u razdoblju od lipnja do srpnja 2013 na 8 postaja na području otoka Zirje, Kaprije and Zlarin, te na 4 postaje na području Dubrovnika i otoka Dakse.

Uzorkovanje ihtioplanktona obavljeno je u razdoblju od lipnja do srpnja 2013 na 3 postaje na području otoka Zirje, Kaprije and Zlarin, te na 3 postaje na području Dubrovnika (Orsan, Daksa I and II Daksa).

Statistička analiza

Za svaku od lovina izračunat je niz pokazatelja koji su podvrgnuti statističkim analizama kako bi se procjenile razlike između postaja sa 'zdravim' livadama posidonije i onih koji su pod utjecajem. Sve statističke analize provedene su primjenjujući računalni program PERMANOVA + for PRIMER razmatrajući 'utjecaj' kao fiksni faktor, 'lokaciju' kao nasumični faktor ugniježđen unutar 'utjecaja', a ulov na svakoj od postaja uziman je kao pojedinačna replika.

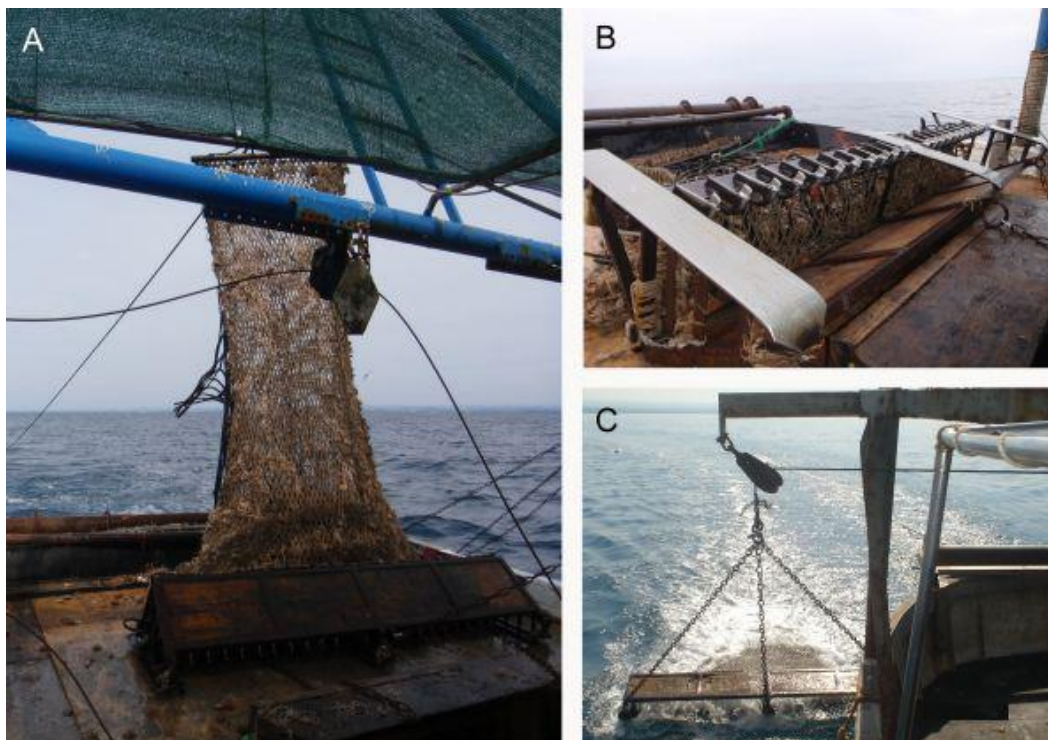
Ukupna brojnost i biomasa riba izražene su kao ulov po jedinici napora (CPUE) s obzirom na broj jedinki (NCPUE) i masu jedinki u kilogramima (BCPUE) po jednoj mreži (32 m dužine). Shannon-Wiener indeks korišten je za testiranje bioraznolikosti, a Pielouov indeks za testiranje ravnornjnosti raspodjele vrsta. Također, izračunati su i kvalitativni te kvantitativni indeksi taksonomske udaljenosti zajednica. Svi navedeni univarijantni indeksi analizirani su (sukladno opisanom dizajnu istraživanja) neparametarskom permutacijskom analizom varijance (PERMANOVA) temeljenoj na matrici Euklidske udaljenosti.



Slika 3.4.3.2. Uzorkovanje i obrada materijala

3.4.4. Monitoring izlova školjkaša ramponom

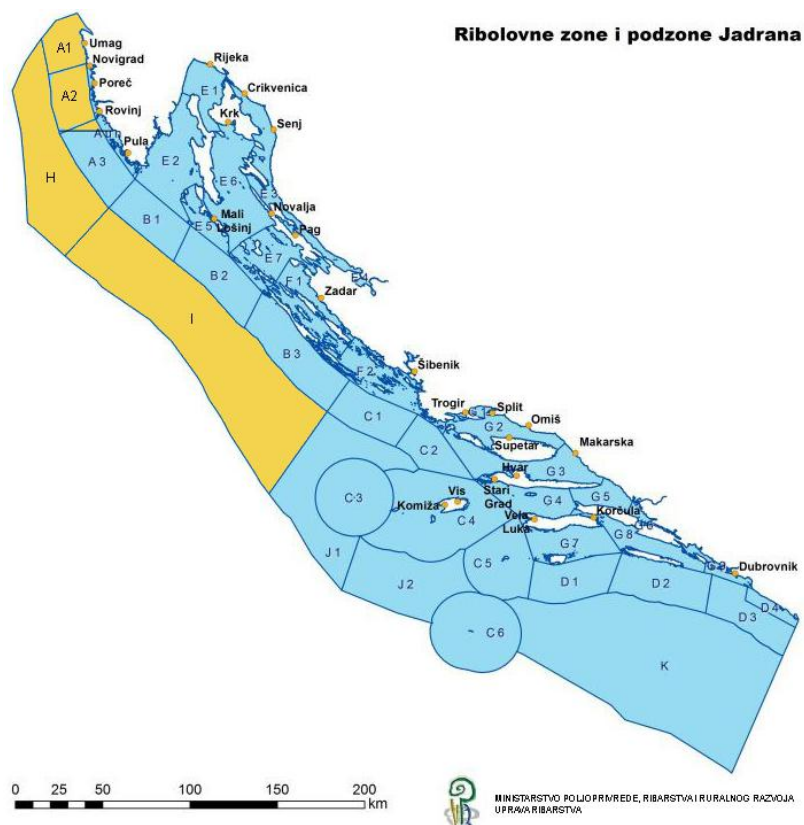
Rampon se svrstava u povlačne ribolovne alate, a sastoji se od metalnog okvira s depresorom na koji je pričvršćena vreća od mrežnog tega (Slika 3.4.4.1). Prema Pravilniku o ribolovnim alatima i opremi za gospodarski ribolov na moru (NN 148/10) najveća duljina donjeg, nazubljenog dijela metalnog okvira ne smije prelaziti četiri metra, a veličina oka mrežnog tega vreće rampona ne smije biti manja od 40 mm (u ribolovnoj zoni A).



Slika 3.4.4.1. Rampon – (A) vreća od mrežnog tega, (B) metalni okvir s depresorom, (C) spuštanje rampona.

Analiza ulova rampona provodi se svaka dva mjeseca ukrcavanjem djelatnika Instituta za oceanografiju i ribarstvo na komercijalne brodove koji obavljaju ribolov ramponom u ribolovnoj zoni A (3.4.4.2). Ovisno o području ribolova dnevno se napravi od 12 do 24 potega trajanja između 20 i 30 minuta. Pored trajanja potega zabilježe se i koordinate te brzina broda. Odmah po izvlačenju rampona sav ulov se iskrca na krmu broda te se procijeni ukupna masa ulova i masa pojedinih grupa organizama u prilovu (npr. trpova, zmijača, zvjezdača, mješićnica, spužvi, puževa itd.) (Slika 3.4.4.3). Pored procjene prilova na terenu, kada je to moguće, uzima se poduzorak prilova koji se zamrzne te analizira u laboratoriju na Institutu za oceanografiju i ribarstvo.

Nakon procijene prilova slijedi izdvajanje gospodarski značajnih vrsta iz ulova. U gospodarski najznačajnije vrste u ulovu spadaju uglavnom školjkaši i to Jakovljeva kapica (*Pecten jacobaeus*), kamenica (*Ostrea edulis*) i kunjka (*Arca noae*). Gospodarski značaj različitih vrsta malih kapica (*Aequipecten opercularis* i *Flexopecten glaber*) nije velik međutim neki ribari i njih prikupljaju te plasiraju na tržište. Pored školjkaša u ulovu rampona često je prisutna riba list (*Solea vulgaris*) te muzgavac (*Eledone moschata*) i sipa (*Sepia officinalis*). Kako se radi o komercijalnom brodu koji obavi veliki broj potega po danu manipulacija uzorcima može biti otežana. Na brodu se provede što je moguće više mjerenja pazeći da se pri tome ne ometa normalan rad posade broda.



Slika 3.4.4.2. Ribolovne zone u Republici Hrvatskoj. Ribolovne zone u kojima je dozvoljen ribolov ramponom su označene žutom bojom



Slika 3.4.4.3. (A) Iskrcavanje ulova na krmu broda; (B) Sastav ulova.

Analiza gospodarski značajnih vrsta u ulovu

Detaljna analiza gospodarski značajnih vrsta u ulovu razlikuje se ovisno o vrsti organizma. Kod Jakovljeve kapice (*Pecten jacobaeus*) se na terenu, kada je to moguće, pored jedinki većih od 10 cm što predstavlja minimalnu dozvoljenu dužinu za lov (NN,63/10) prikupe i jedinke manje od 10 cm. Svim jedinkama izmjeri se dužina te se izvaže ukupna masa jedinki većih od 10 cm te jedinki manjih od 10 cm. Nakon mjerenja jedinke manje od 10 cm vrate se u more. Ukoliko na terenu nije moguće izdvojiti jedinke manje od 10 cm analizira se samo dužina i biomasa jedinki većih od 10 cm.

Kod kamenice (*Ostrea edulis*) i kunjke (*Arca noae*) se također kada je to moguće, pored jedinki većih od minimalne dozvoljene dužine za lov (NN,63/10) prikupe i manje jedinke. Izvaže se biomasa manjih i većih jedinki te se jedinke manje od minimalne dozvoljene dužine za lov vrate u more. Minimalna dozvoljena dužina za lov za kamenicu iznosi 7 cm, a za kunjku 5 cm (NN, 63/10).

Ukoliko ribari izdvajaju male kapice (*Aequipecten opercularis* i *Flexopecten glaber*) za plasman na tržište tada se izvaže njihova biomasa. Kako u nekim slučajevima ribari ne izdvajaju ove vrste njihova biomasa u ulovu se procijeni, te detaljnije analizira tijekom laboratorijske obrade prilova.

Ostalim gospodarski značajnim vrstama kao što su riba list (*Solea vulgaris*), muzgavac (*Eledone moschata*) i sipa (*Sepia officinalis*) izmjeri se dužina te ukupna biomasa.

Laboratorijska obrada prilova

Laboratorijska obrada prilova obavi se unutar tjedan dana od samog uzorkovanja. Prikupljeni poduzorci prilova se odmrznu te se svi prisutni organizmi svrstaju u taksonomske skupine, zabilježi se njihova brojnost te se izvaže masa. Ukoliko se u prilovu nalaze i male kapice (*Aequipecten opercularis* i *Flexopecten glaber*), pored mase i brojnosti, izmjeri se i dužina svih jedinki.

Obrada prikupljenih podataka

Svi prikupljeni podatci uneseni su u bazu podataka koristeći se Microsoft Excel program. Na osnovu prikupljenih podataka opisan je sastav zajednice te su izračunati brojčani i maseni udijeli gospodarski značajnih vrsta u ulovu te su konstruirani grafički prikazi veličinskog sastava gospodarski značajnih vrsta. Nadalje, prijeđena površina izračunata je primjenom SWEPT area metode:

$$P=a*b$$
$$b=v*t$$

gdje je P-prijeđena površina, a-širina otvora rampona, b-prijeđeni put, V-brzina i t-vrijeme trajanja potega.

Indeksi biomase (IB) gospodarski značajnih vrsta izračunati su pomoću formule:

$$IB=(b*P)/q$$

gdje je b-ulov po jedinici površine, P-površina izračunata SWEPT area metodom, q-koeficijent lovnosti (q=1)

Literatura :

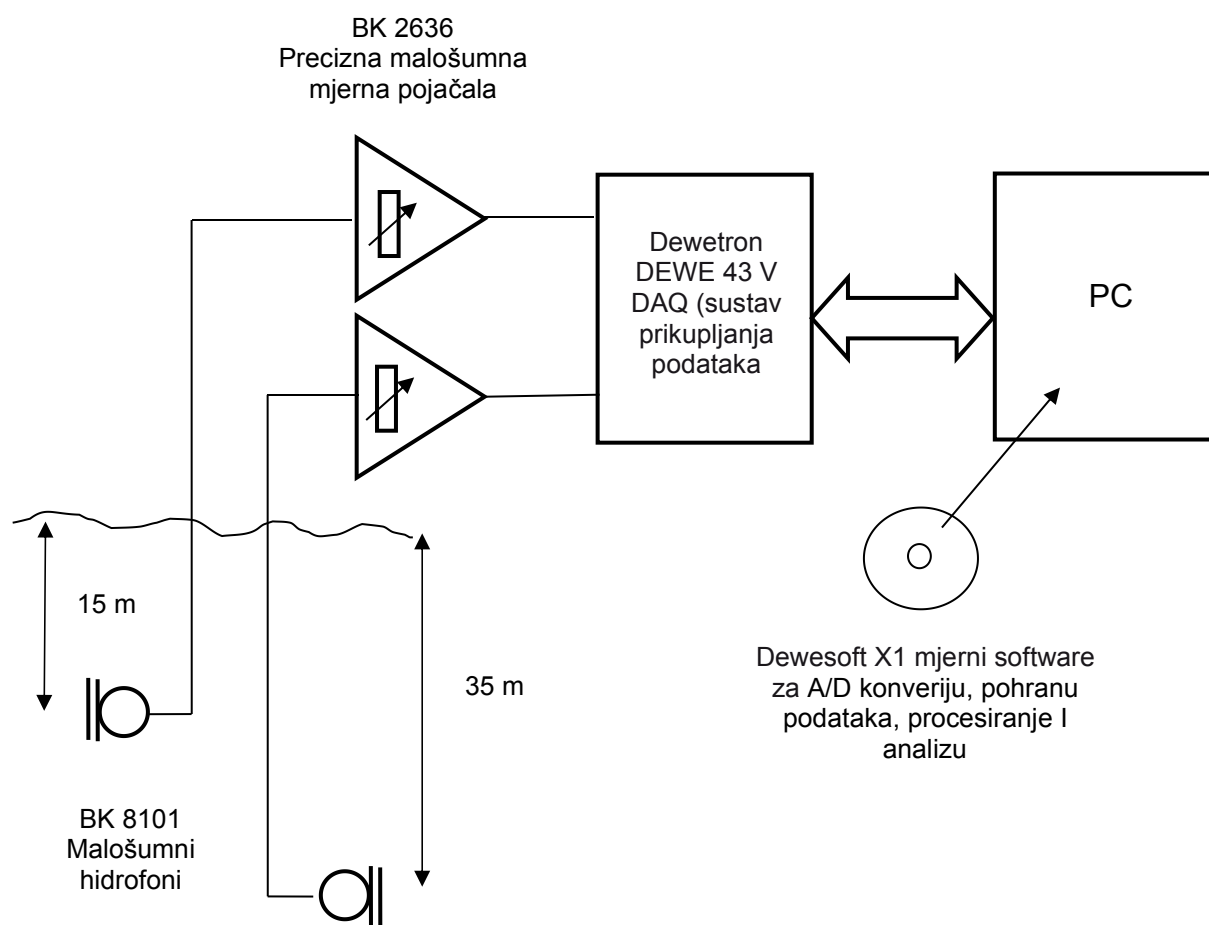
NN 63/10, Naredba o zaštiti riba i drugih morskih organizama

NN 148/10, Pravilnik o ribolovnim alatima i opremi za gospodarski ribolov na moru

3.5. Buka u moru

Podvodna buka se sluša malošumnim hidrofonomi Bruell & Kjaer 8101 koji služe kao pretvornici zvučnog tlaka u električni napon. Hidrofoni su uronjeni u more na dvije različite dubine 15 i 35 m. Precizna malošumna pojačala Bruell & Kjaer 2636 pojačavaju slabi signal na potrebu razinu i filtriraju frekvencijski odziv s gornjom graničnom frekvencijom od 22,5 kHz optimizirajući signal za A/D pretvorbu. A/D pretvorba, procesiranje i pohranjivanje signala odvijaju se u sustavu za prikupljanje podataka Dewetron DEWE 43 V DAQ koji je kontroliran mjernim software-om Dewesoft X1. Isti software se koristi za analizu pohranjenih podataka. Mjerni sustav se napaja iz istosmjernih baterija da se izbjegne brujanje i šum iz izmjeničnog napajanja.

Blok shema mjernog sustava za mjerenje podvodne buke prikazana je na slici 3.5.1

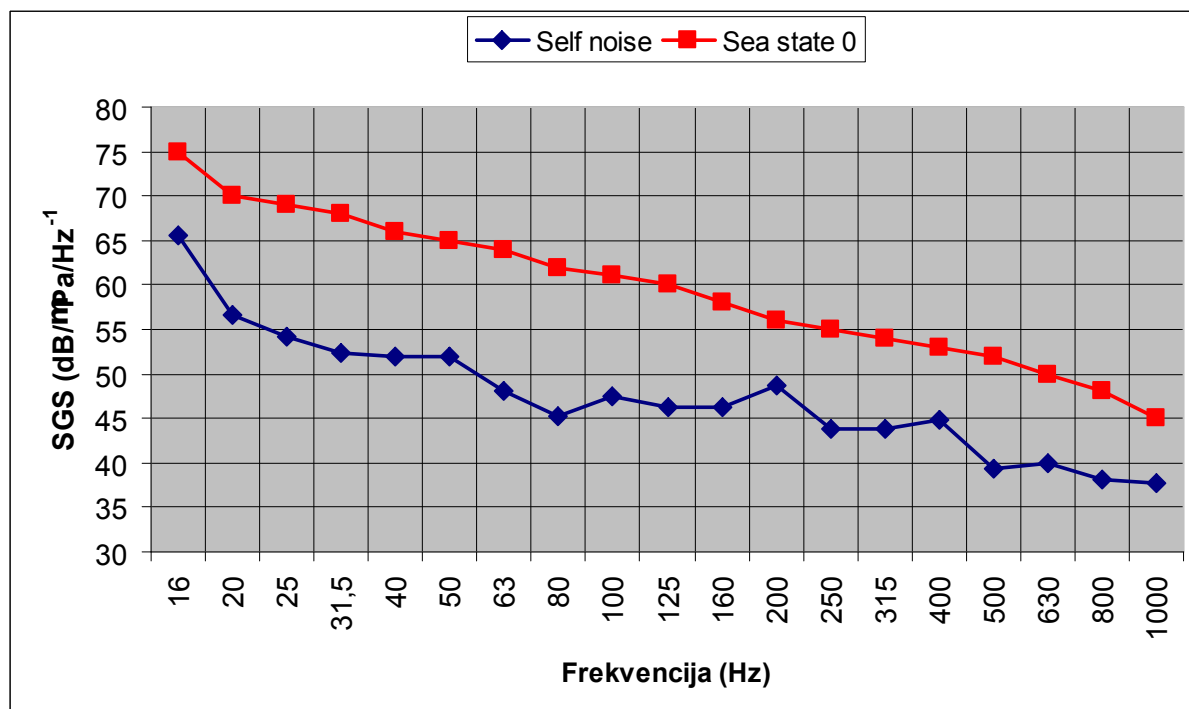


Slika 3.5.1. Blok shema mjernog sustava za mjerenje podvodne buke

Dodatno se prikupljeni podaci svakog mjerenja (izmjernog uzorka podvodne buke) exportiraju kao Excell datoteke za daljnju analizu i usporedbu podataka sa različitim lokacija i vremena mjerenja.

Tijekom mjerenja promatran je pomorski promet kao i sve ostale bučne aktivnosti. Bilježeni su svi bučni događaji (npr. prolaz plovila, lučke aktivnosti itd.) skupa s vremenom događanja da se omogući korelacija događaja sa izmjerenom razinom buke.

Vlastiti šum mjernog sustava je kritičan jer treba biti siguran da vlastiti šum mjernog sustava ne utječe na mjerene razine buke. Vlastiti šum mjernog sustava je izmjeren i utvrđeno je da je nizi od najnižeg očekivanog šuma mora (stanje mora 0 bez prisustva antropogenih izvora podvodne buke). Dijagram spektralne gustoće za vlastiti šum mjernog sustava i šuma mora kod stanja mora 0 prikazan je na slici 3.5.2



Slika 3.5.2. Spektralne gustoće za vlastiti šum mjernog sustava i šuma mora kod stanja mora 0

Mjerenja podvodne buke provedena su sa usidrenog broda. To nije idealni mjerni postav jer hidrofoni "čuže" zvuk uzrokovan gibanjem broda, pomicanjem hidrofonskog kabela te svaki zvuk na brodu koji se prenosi na brodski trup. To sve utiče na izmjerene razine podvodne buke pogotovo ako su one niske. Uložen je svaki trud da se neželjeni zvuk uzrokovan mjernom platformom (brodom) minimizira. Izabran je tip broda koji prizvodi najmanji hidrodinamički šum i pljuskanje (zvuk uzrokovan gibanjem broda dok je usidren), svi strojevi i brodska oprema (glavni i pomoćni motor, navigacija i sl.), osim mjernog sustava bili su ugašeni i nisu radili tijekom mjerenja, posada je smanjena na minimum i nije stvarala nikakav zvuk tijekom mjerenja. Također sidreni lanac je zamijenjen konopom da se minimizira buka koju stvara sidreni lanac radi pomicanja broda dok je usidren.

Značajke mjerne opreme su kako slijedi:

Malošumni mikrofoni (2 komada) Bruell & Kjaer 8101 sa dodatnih 50 metara kabla. Oba hidrofona (zajedno s dodatnim kabelom) su kalibrirani pomoću Bruell & Kjaer 4223 kalibratora hidrofona.

- Naponska osjetljivost tipično – 184 dB re 1V/ μ Pa (svaki hidrofon je individualno kalibriran)
- Frekvencijski pojas 1 Hz to 80 kHz (\pm 2 dB)
- Usmjerenost neusmjeren (\pm 2 dB horizontalno na 100 kHz, vertikalno na 15 kHz)
- Ugrađeno pretpojačalo sa 1000 M Ω ulazne impedancije, 0 dB pojačanja i frekvencijskim pojasome 0.5 Hz do 300 kHz

Precizno malošumno mjerno pojačalo Bruell & Kjaer 2636 (2 komada)

- Mjerni opseg 10 μ V to 30 V FSD
- Frekvencijski pojas 1 Hz do 200 kHz (\pm 0.5 dB)
- Ulazna impedancija 1 M Ω / 90 pF
- Harmonička izobličenja < 0.1 %
- Odnos signsl šum 100 dB (< 5 μ V noise referred to input)

Dewetron DEWE 43 V DAQ sustav za prikupljanje podataka

- Osam analognih kanala sa 200 kS/s uzorkovanja sigma-delta ADCs s 24-bit dinamičkim opsegom.
- Osam super-brojača s mogućnošću 1x brojanja pojave, encoder, period, širina impulsa, duty-cycle, frekvencijska mjerenja po kanalu ili 3x TTL digitalni impulsni ulazi.
- Dva izolirana, high-speed CAN 2.0b kanala sabirnice (1 Mbit/sec/ch). Podržava OBDII, J1939, CAN izlaz.
- Prihvaća mostne (full-bridge) and \pm 10V sensoes (prihvaća \pm 200V, ACC, charge, RTD, TH, mostne (quarter- and half-bridge) sensore s dodatnim MSI i ADAP adapterima).
- Uključena mini-USB priključnica s zaključavanjem.

Dewesoft mjerni software za A/D pretvorbu, pohranu podataka, procesiranje i analizu.

Mjerni sustav zajedno s izvorom napajanja i dodatnim hidrofonskim kabelima prikazan je na slici 3.5.3. Detalj koji prikazuje pokazivač s otvorenim prozorom za obradu signala je na slici 3.5.4.



Slika 3.5.3. Mjerni sustav s izvorom napajanja i dodatnim hidrofonskim kabelima

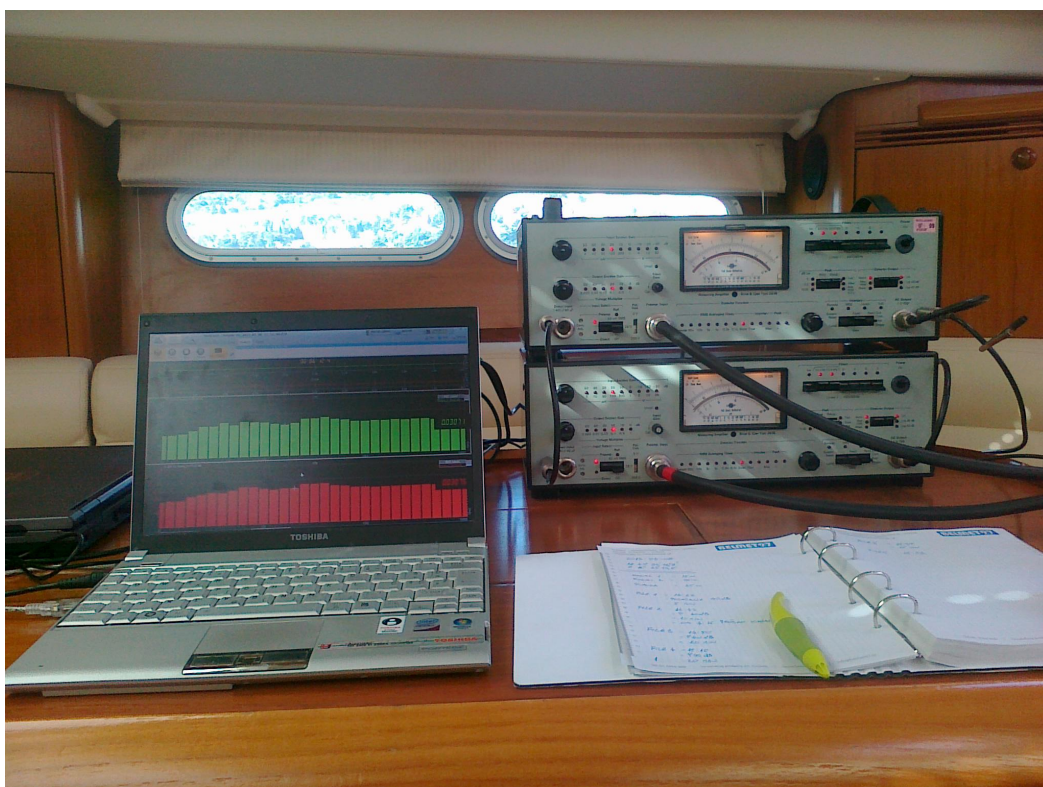


Figure 3.5.4 Detalj sustava s prikazom prozora za obradu signala

4. Numerički modeli

4.1. Uvod

Numerički modeli se često koriste pri opisivanju različitih aspekata dinamike Jadranskog mora. Jedan od najstarijih numeričkih proračuna su proveli Sterneck [1] i [2] i Defant [3] u predračunalnoj eri, gdje su koristili hidrodinamičke jednadžbe, ne uzimajući u obzir trenje, da bi opisali Jadranske morske mjene. Češća upotreba numeričkih modela u proučavanju dinamike Jadranskog mora koincidira s uvođenjem računala u oceanografiju u ranim sedamdesetim godinama 20. stoljeća. Prvi računalni model su uspostavili Accerboni i Manca [4] u svojoj studiji jadranskih morskih mjena. Rani računalni modeli nisu simulirali cirkulaciju, nego su bili jednostavni modeli vjetrovnih valova s homogenom raspodjelom gustoće mora izrađeni da bi izračunavali razinu mora u međudjelovanju s vjetrovnim događajima [5]-[9]. Djelomična pažnja je posvećena simulaciji bure i predviđanjima plavljenja Venecije. Sljedeći važan iskorak u numeričkom modeliranju u Jadranu su poduzeli Hendershott i Rizzoli [10]. Koristili su vertikalno integrirani model da bi pokazali utjecaj topografije na širenje dobokovodnih masa formiranih na kontinentalnom šelfu sjevernog Jadrana. U kasnim osamdesetima numeričko modeliranje je bilo usmjereno na cirkulaciju mora uzrokovanu vjetrom u sjevernom Jadranu [11]-[13] s osobitim naglaskom na odaziv pri djelovanju bure. Od tada je provedeno mnogo regionalnih i lokalnih studija koje su koristile *in situ* mjerenja i/ili tehnike daljinskog očitavanja podataka.

Suvremeni modelski sustavi za Jadransko more su razvijani većinom unutar okvira međunarodnih projekata, primjerice *Project Adricosm*, *Mediterranean Forecasting system Pilot Project* i drugih. Načelno, moderni modelski sustavi s realnim forsiranjem se sastoje od hijerarhije više numeričkih modela združenih međusobno tehnikama ugnježđenja da bi se omogućio prijelaz s polja strujanja krupnijeg mjerila na priobalna polja strujanja veće rezolucije. Koriste se podatci *in situ* i daljinskih mjerenja za procjenu učinkovitosti modelskih sustava, osobito setovi prikupljenih CTD mjerenja i satelitskih mjerenja površinske temperature mora (SST). Tako se može ocijeniti kvaliteta punog trodimenzionalnog modelskog sustava.

Primjerice, numerički modelski sustav pokrenut u sklopu projekta *Adricosm* (2001-2005) je uspostavljen da bi načinio točne prognoze kratkoročnih promjena u cirkulaciji Jadranskog mora, također uzimajući u obzir relevantne procese u priobalnim područjima. *In situ* mjerenja pojedinih parametara vezanih uz atmosferu (meteorološki parametri) i uz more (fizikalni, kemijski i biološki parametri) te njihova vremenska i prostorna dinamika uzorkovanja se provodila kako slijedi: *in situ* VOS podatci (temperaturni profili s mjesečnom dinamikom uzorkovanja), CTD podatci (temperatura, salinitet i koncentracija kisika prikupljeni dvotjedno) satelitski podatci (SST s visokom rezolucijom i površinska koncentracija klorofila - SeaWiFS), podatci s oceanografskih plutača (temperatura, salinitet, koncentracija kisika, pH, prozirnost i brzina strujanja) i podatci atmosferskog forsiranja (brzina vjetra, temperatura zraka, temperatura kondenziranja i vrijednost naoblake).

Drugi nedavno uspostavljeni modelski sustavi cirkulacije mora za jadransko područje također koriste *in situ* mjerenja kao alat za verifikaciju s gore navedenim setovima podataka prikupljenim isključivo u područjima otvorenog mora. *In situ* mjerenja provedena u istočnom dijelu Jadrana (kanalsko područje), primjerice neprekinuta ADCP snimanja, nisu uključena u postupke verifikacije.

Numerički modeli ekosustava se također mogu koristiti kao sredstvo predviđanja i ocjenjivanja ljudskih aktivnosti. Njima se mogu analizirati buduće promjene koje se mogu dogoditi u ekosustavima zbog utjecaja izvanjskih faktora [14]. Biogeokemijski modeli koji predstavljaju trofičke i kemijske interakcije u morskom sustavu su predmet široke rasprave u posljednjih 20 godina, djelomično se fokusirajući na opis pelagičkog sustava temeljen na biomasi [15]-[17]. Brzine biogeokemijskih promjena su načelno opisane parametrima koje sadrži *European Regional Seas Ecosystem Model* (ERSEM) [18], [19] koji je bio prvi sveobuhvatan model ekosustava koji je uključivao fiziološke značajke u definiciji divergencije toka materije. S druge strane, nekoliko implementacija ovog modela pokazalo ga je uspješnim u priobalnim područjima s velikim unosima s kopna kao i u oligotrofnim mediteranskim regijama [20]-[23]. Isti

pristup se koristio i u kontekstu klimatskih studija, osobito za hvatanje i analizu klimatskih varijabiliteta u Jadranskom moru [24]. Direktan nasljednik ERSEM modela, *Biogeochemical Flux Model* (BFM) se razvija u okviru EU projekta MFSTEP (*Mediterranean Forecasting System Toward Environmental Predictions*) i primjenjuje na čitavo područje Mediterana i subregionalnih mora.

Postojeći ekološki modelski sustavi za Jadransko more su validirani i verificirani samo pomoću *in situ* mjerenja i daljinski očitanih podataka na područjima otvorenog mora. Isključivani su setovi podataka prikupljeni na istočnom djelu Jadrana (kanalsko područje).

Tijekom implementacije *Faze I Jadranskog projekta (Phase I of The Adriatic Sea Monitoring Program)*, koji će se od sada u tekstu označavati *JP-07/09*, prvi puta su se postavile sonde za mjerenje morskih struja (25 lokacija) i sonde za mjerenje fizikalnih, bioloških i kemijskih svojstava mora (45 lokacija) na relativno malim udaljenostima od obale. To je omogućilo verifikaciju rezultata cirkulacije mora na razini lokalnih modela koji su pokrivali hrvatski dio Jadrana i koji se imali prostornu rezoluciju do 200 m.

Fazom I JP-07/09 se uspostavilo istraživanje neophodno za uspostavu modela za analizu nekih od osnovnih parametara kvalitete mora (priobalnog ili otvorenog) na istočnom dijelu Jadrana. Rezultati redovitih mjerenja (monitoringa), zajedno s rezultatima uspostavljenih modela, služe za procjenu utjecaja planiranih postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Negativan utjecaj na morski okoliš se događa izlivanjem efluenta, u prvom redu fekalnih otpadnih voda. Ipak, treba istaknuti da upuštanje otpadnih voda nije jedini način onečišćenja u priobalnim područjima Jadranskog mora.

Kroz *JP-07/09* mjereni su sljedeći parametri: temperatura mora, salinitet i gustoća, morske struje, prozirnost mora, otopljeni kisik, pH, hranjive tvari (amonij, nitriti, nitrati, ortofosfati, ortosilikati, ukupni fosfor, ukupni dušik), sastav biomase i fitoplanktona (klorofil-a), broj bakterija (izravno brojanje pomoću mikroskopa) i pokazatelji fekalnog zagađenja (fekalni koliformi, fekalni streptokoki). S druge strane, samo su sljedeći parametri bili modelirani: temperatura mora, salinitet i gustoća, morske struje, otopljeni kisik, fekalni koliformi i fekalni streptokoki. Nadalje, uspostavljeni modeli unutar *JP-07/09* ne mogu doprinijeti optimiziranu mreže mjernih postaja kao cjeline i ne dopunjavaju tekuća mjerenja prema procedurama i metodologijama definiranim kroz *Marine Strategy Framework Directive*.

Da bi se dali odgovori na pitanja i ciljeve postavljene u *Fazi II Jadranskog projekta (Phase II of The Adriatic Sea Monitoring Program)* te da bi se osigurali uvjeti za uspostavu Sustava za monitoring i promatranje za tekuću procjenu (*Monitoring and Observation System for Ongoing Assessment*) koje je definiralo Ministarstvo zaštite okoliša i prirode, koristit će se modelske metodologije i plan rada koji podupire i dopunjuje monitoring planiran u sklopu ovog zadatka.

Uspostavljeni numerički modeli i provedene odgovarajuće simulacije s njima trebaju poslužiti kao podrška predloženom monitoring sustavu u okviru ovog projekta, poglavito u domeni deskriptora kojim se obuhvaća problem eutrofikacije.

Numerički modeli pogodni su za testiranje hipoteza o antropogenom učešću u eventualnim situacijama neželjenog statusa stanja okoliša (Bad Environmental Status - BES) te o benefitima koje je moguće postići primjenom odgovarajućih mjera s ciljem postizanja dobrog stanja okoliša (Good Environmental Status - GES). Primijenjena metodologija numeričkog modeliranja u okviru ovog projekta temelji se upravo na tom konceptu.

Prema ponudbenoj dokumentaciji i prema projektnom zadatku (TOR/JP-13/14), u ovoj fazi projekta se numeričkim analizama obuhvaća veći broj parametara za opis stanja morskog okoliša u odnosu na prethodnu fazu projekta (JP-07/09): brzine morskih struja (u,v,w), temperatura i salinitet mora (T,S) koncentracije parametara kvalitete mora (DO, NH₄, NO₂, NO₃, PO₄, CHL).

U provedbi modelskih aktivnosti korištena su dva različita pristupa:

- a) uspostava modelskog sustava cirkulacije mora i dinamike ekoloških parametara s visokim stupnjem autonomnosti, oslonjenog na raspoložive klimatološke baze podataka o stanju mora, atmosfere i riječnih utoka;
- b) uspostava modelskog sustava cirkulacije mora i dinamike ekoloških parametara koji se u značajnoj mjeri oslanja na rezultate drugih modelskih sustava i/ili permanentnog monitoringa.

U prvom pristupu variraju se područja obuhvata prostornim domenama numeričkih modela te prostorna i vremenska rezolucija u definiranim modelskim simulacijama. Modelska parametrijacija optimizira se temeljem rezultata mjerenja na oceanografskim postajama iz JP-07/09. Provedenim analizama dobiva se i temeljni skup konstanti ekološkog modula za svaku analiziranu modelsku domenu, za razdoblje pokriveno mjerenjem u JP-07/09 (1.1.2008.-1.10.2008.). Varijacija korištenih prostornih domena u modelskim simulacijama omogućuje uvid u homogenost „optimalnih“ konstanti ekološkog modula (kvalitete mora) i utjecaj izbora prostorne domena s pripadnom rezolucijom na točnost modelskih rezultata. Analizira se i antropogena komponenta utjecaja na kvalitetu mora, te eventualno potrebne potencijalne mjere za postizanje GES.

U drugom pristupu koristi se tehnika ugnježđenja, pri čemu se lokalni priobalni modeli cirkulacije mora direktno oslanjaju na rezultate modela cijelog Jadrana. Nadalje, model cirkulacije mora za cijeli Jadran forsiran je poljima temperature i saliniteta iz šireg modela Mediterana. Parametrijacija priobalnih modela i modela Jadrana optimizira se temeljem rezultata mjerenja na oceanografskim postajama iz JP-13/14. Simulacije se provode za razdoblje pokriveno mjerenjem na 11 strujomjernih postaja u sklopu JP-13/14 (15.3.2013.-15.3.2014.). Analize kvalitete mora provode se samo s priobalnim modelima, a inicijalno se koristi skup konstanti dobiven iz prethodno provedenog (prvog) pristupa modeliranju. Ponavlja se procedura optimizacije konstanti ekološkog modula (kvaliteta mora) za korištene lokalne domene i razdoblje 15.3.2013.-15.3.2014., te se istražuju razlozi eventualnog značajnijeg odstupanja „optimalnih“ konstanti u odnosu na vrijednosti dobivene za razdoblje 1.1.2008.-1.10.2008. Prema potrebi ponavlja se i analiza antropogenog utjecaja na kvalitetu mora, te potrebne mjere za postizanje GES.

U nastavku se daju detaljnija objašnjenja vezana uz uspostavu modela prema dvije prethodno spomenute metodologije.

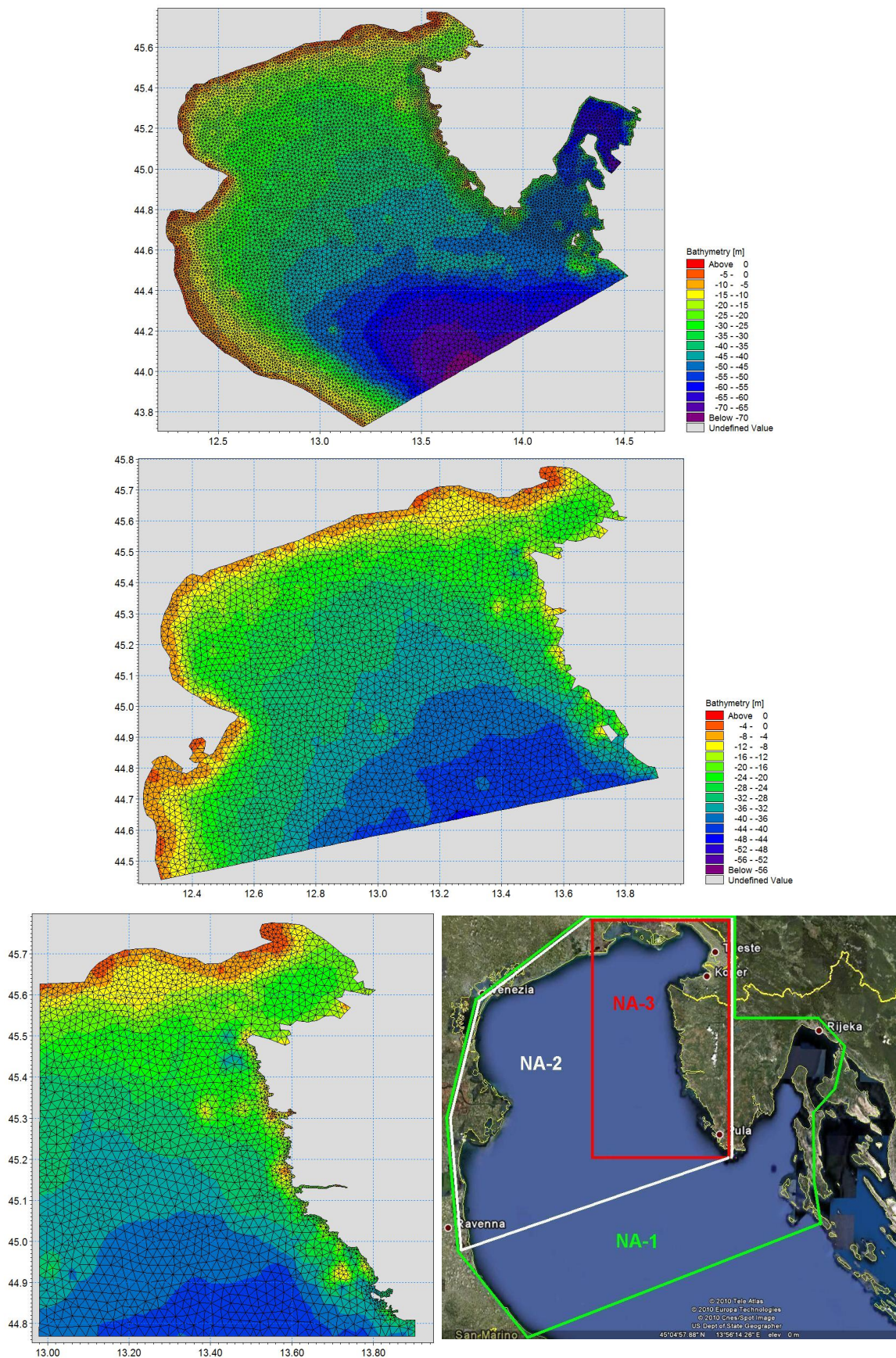
4.2 Uspostava autonomnih numeričkih modela cirkulacije i kvalitete mora (metodologija I)

Uspostavljaju se 3D numerički modeli cirkulacije mora kao osnova za daljnju provedbu dinamike koncentracija parametara kvalitete mora (otopljeni kisik-DO, ortofosfati-PO₄, amonij-NH₄, nitriti-NO₂, nitrati-NO₃ i klorofil-a-CHL). Modelskim prostornim domenama obuhvaća se područje sjevernog, srednjeg i južnog Jadrana, a numeričke simulacije cirkulacije i kvalitete mora provode se za razdoblje 1.1.2008. - 1.10.2008.

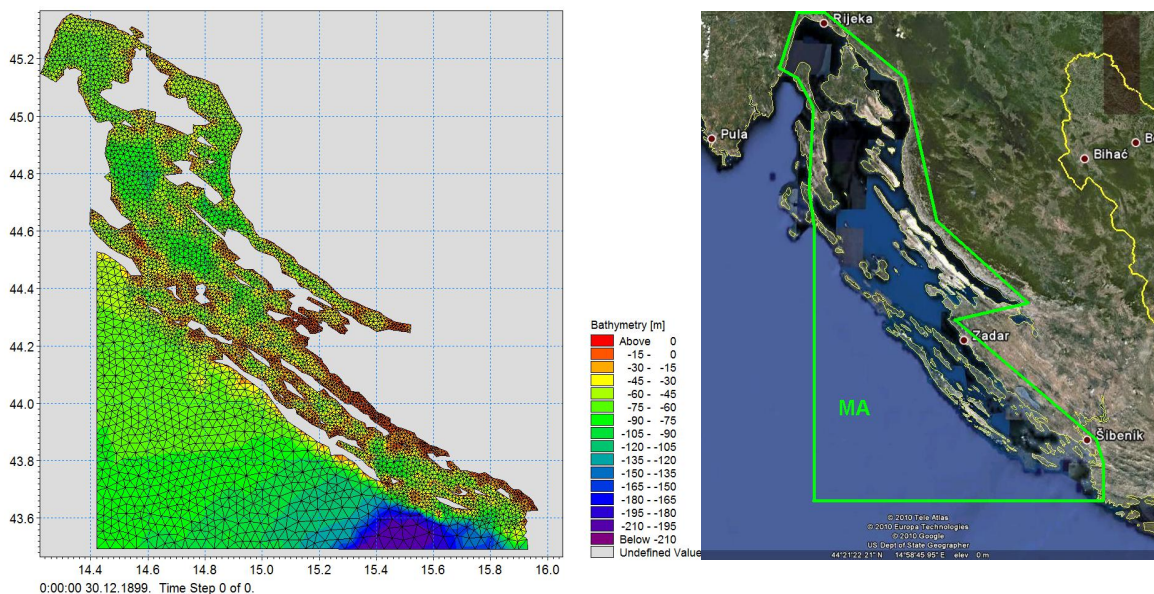
Koriste se tri modelske domene u području sjevernog Jadrana (Slika 4.2.1). Prva domena (NA-1) koristi proračunsku mrežu s varijabilnim prostornim korakom od 2100m do 400m, druga (NA-2) od 1600m do 400m, a treća (NA-3) od 1200m do 150m.

Komparativna prednost izbora prve domene NA-1 je sadržana u mogućem razlučivanju zajedničkog utjecaja mlazova bure kroz Kvarner i Tršćanski zaljev na cirkulaciju mora sjevernog Jadrana. Nedostatak je slaba pokrivenost podacima o parametrima kvalitete mora uzduž južne otvorene granice modela (transekt Senigallia - Susak). Pri izboru domene NA-2 gubi se utjecaj mlaza bure kroz Kvarner na cirkulaciju mora, no povećava se broj oceanografskih postaja s registriranim podacima o kvaliteti mora u blizini otvorene granice. Domenom NA-3 nije direktno obuhvaćena rijeka Po, koja predstavlja važan čimbenik u cirkulaciji mora i pronosu tvari u području sjevernog Jadrana. S druge strane, na otvorenim granicama modela moguće je korištenje podataka o parametrima kvalitete mora iz više recentnih nacionalnih programa monitoringa (Projekt Jadran, JP-07/09, JP-13/14).

Za područje srednjeg Jadrana (Slika 4.2.2) koristi se jedna prostorna domena (MA-1), diskretizirana varijabilnim proračunskim prostornim korakom od 4500m do 300m.

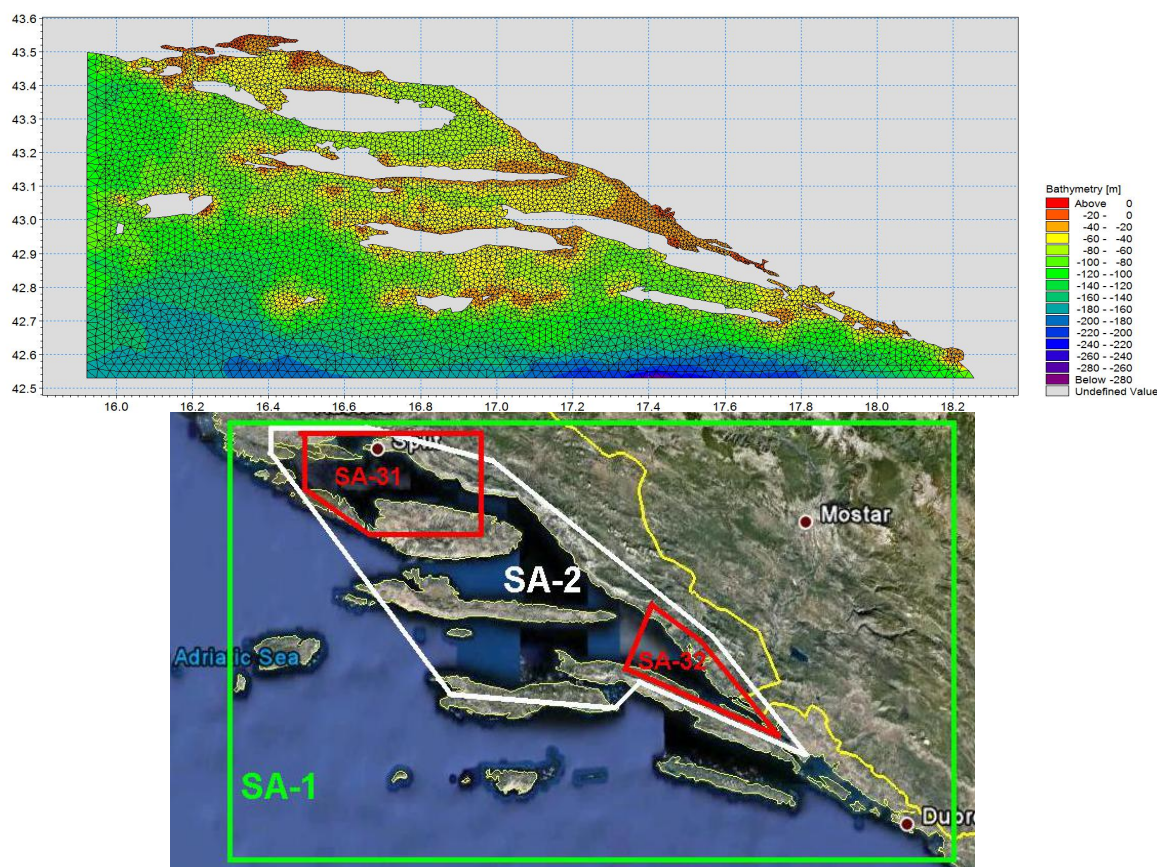


Slika 4.2.1 Prostorne domene modela NA-1 (gore), NA-2 (sredina), NA-3 (dolje) i pripadne diskretizacije s konačnim volumenima (metodologija I)

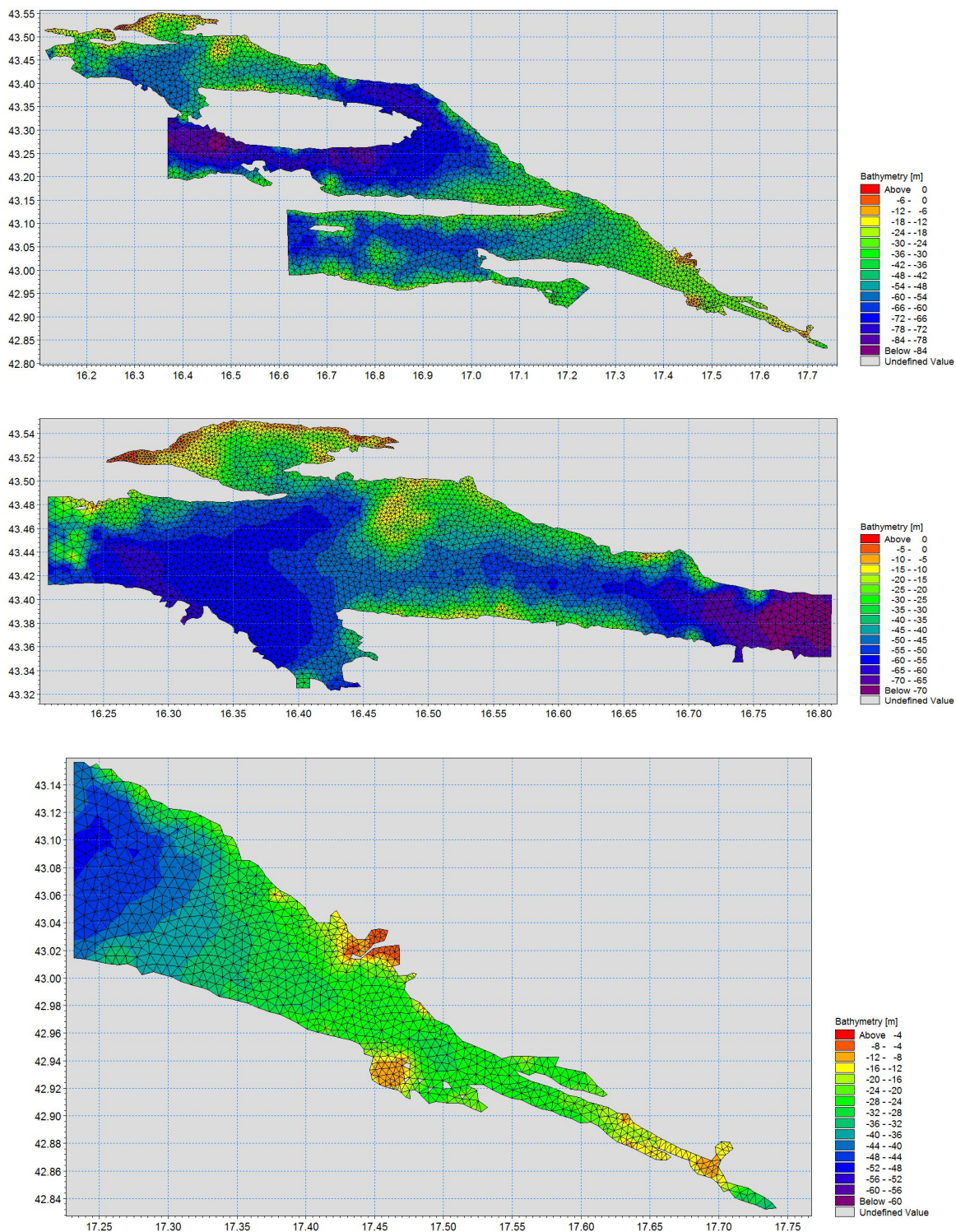


Slika 4.2.2, Prostorna domena modela MA-1 i pripadna diskretizacije s konačnim volumenima (metodologija I)

Područje južnog Jadrana pokriveno je s četiri prostorne domene (Slike 4.2.3a i 4.2.3b). Domena SA-1 koristi proračunsku mrežu s varijabilnim prostornim korakom od 2100m do 250m, domena SA-2 od 1400m do 200m, a domene SA-31 i SA-32 od 600m do 100m, donosno od 600m do 150m.



Slika 4.2.3a Prostorna domene modela SA-1 i pripadna diskretizacija s konačnim volumenima (metodologija I)



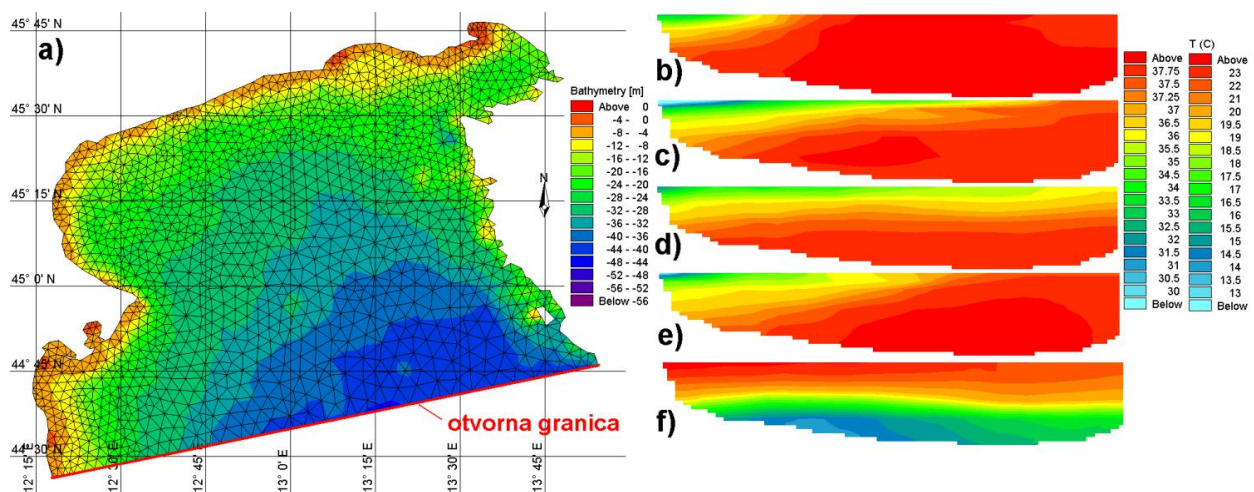
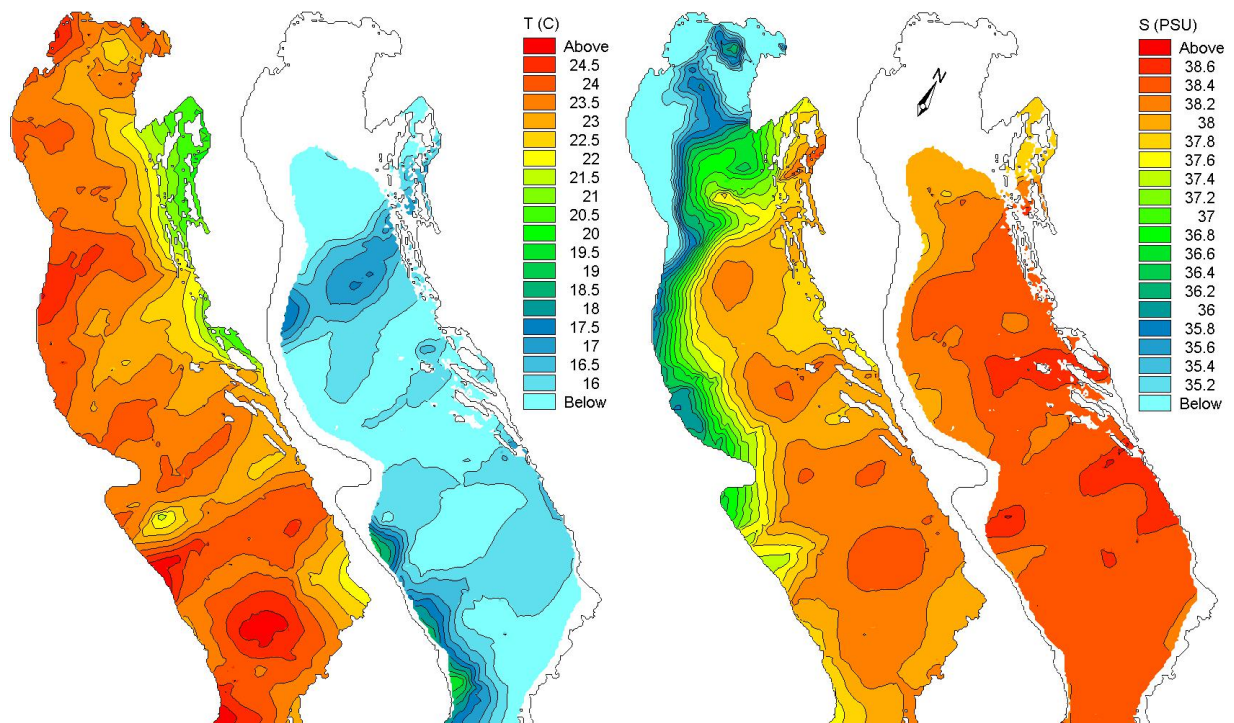
Slika 4.2.3b. Prostorne domene modela SA-2 (gore), SA-31 (sredina), SA-32 (dolje) i pripadne diskretizacije s konačnim volumenima (metodologija I)

Najvećom domenom (SA-1) obuhvaćeno je područje južnojadranskog šelfa s kojom se omogućuje analiza međudjelovanja otvorenog mora i kanalskog sustava (Splitški, Brački, Hvarski, Korčulanski i Neretljanski kanal). Mjerenje parametara kvalitete mora na oceanografskim postajama uzduž otvorenih granica ove prostorne domene je relativno slabo zastupljeno. Domena SA-2 pokriva samo kanalski sustav hrvatskog dijela južnog Jadrana, no na raspolaganju je veći skup podataka o parametrima kvalitete mora uzduž otvorenih granica.

Domenom SA-31 pokriveno je područje većeg dijela Splitskog i Bračkog kanala, a domenom SA-32 područje Neretljanskog kanala. U blizini pripadnih otvorenim granicama postoji bar jedna monitoring postaja s koje je moguće preuzimanje podataka o rubnim uvjetima parametara kvalitete mora tijekom simulacijskog razdoblja.

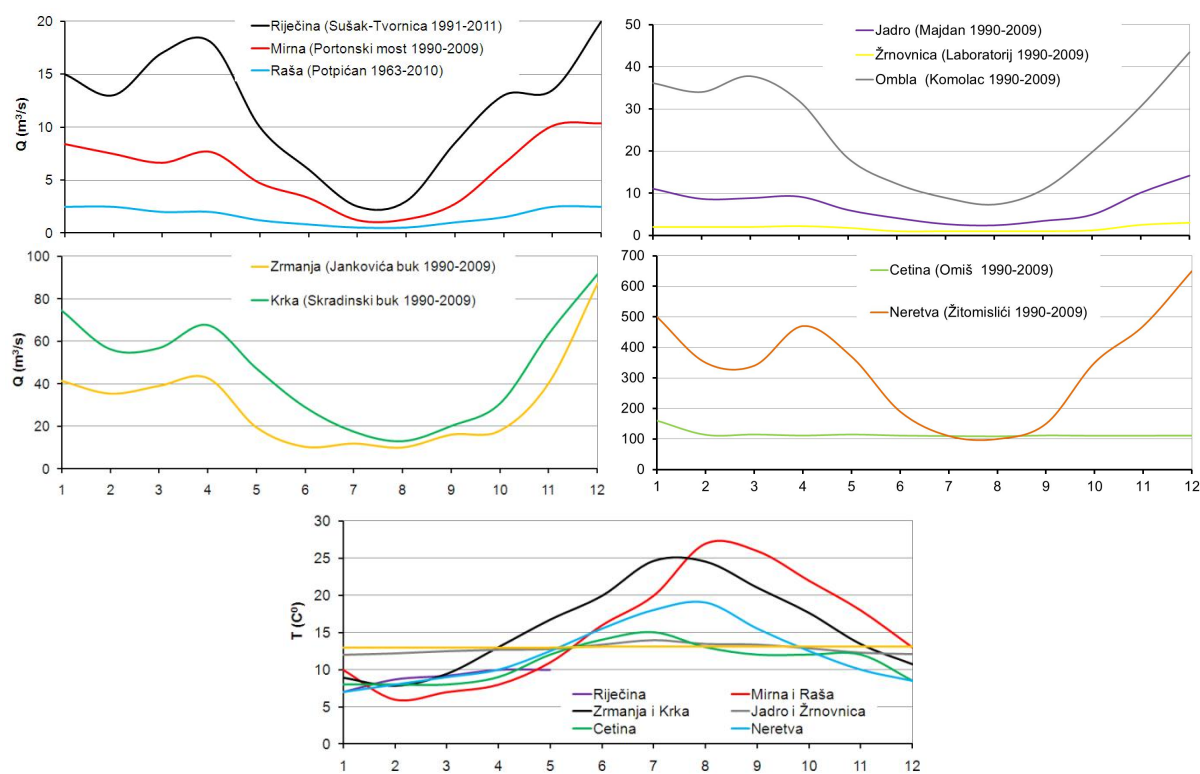
Numerička integracija modela cirkulacije je započeta 1.1.2008. inicijacijom s istovjetnim srednjim poljima temperature i saliniteta mora na standardnim oceanografskim dubinama iz oceanografske baze podataka Sveučilišta Dartmouth (DADB). Baza podataka je formirana temeljem dva postojeća seta podataka [25], iz Mediteranske oceanografske banke podataka (MODB) i Jadranske banke podataka za temperaturu, kisik i salinitet (ATOS2). Sezonska polja temperature i saliniteta mora referencirana su na razdoblje zime (siječanj-ožujak), proljeća (travanj-lipanj), ljeta (srpanj-rujan) i jeseni (listopad-prosinac) [26].

Modeli su na otvorenim granicama forsirani sa satnom dinamikom morskih razi [27]-[29] te sezonskim poljima temperature i saliniteta mora (Slika 4.2.4).

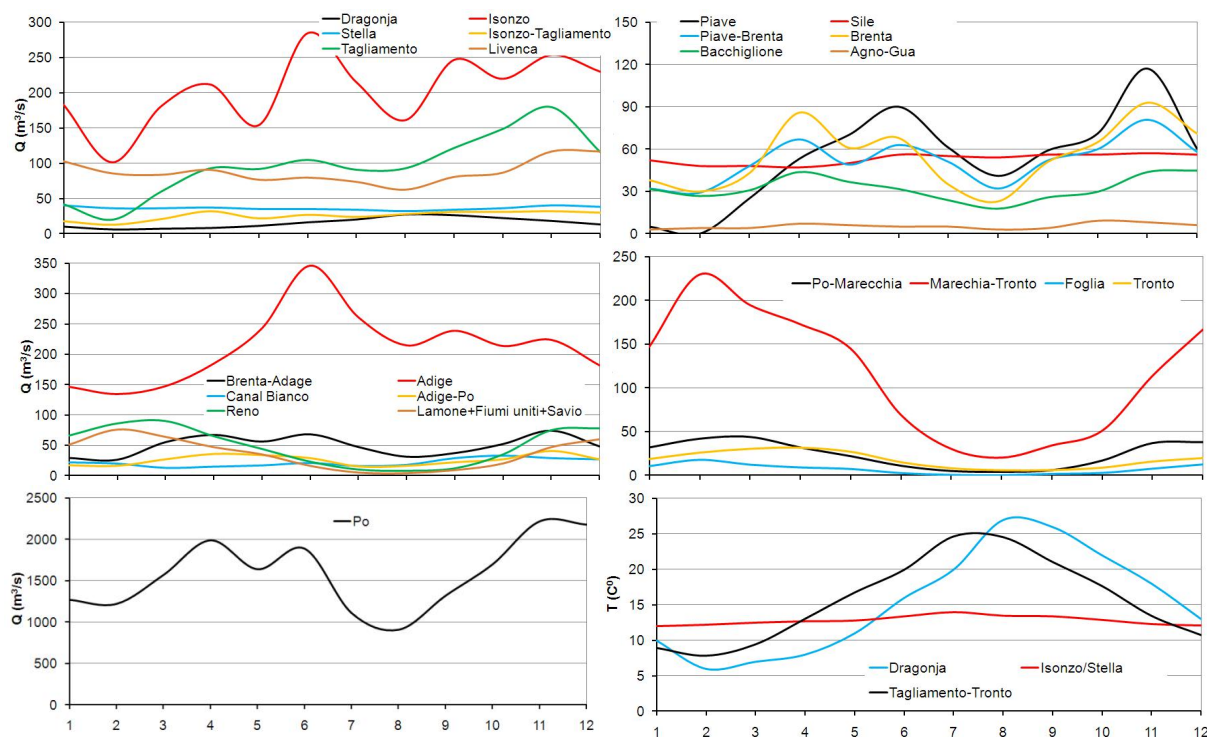


Slika 4.2.4. Polja temperature i saliniteta mora u površinskom sloju i na dubini 50m za područje cijelog Jadrana (gore) te polja temperature i saliniteta mora u vertikalnom profilu otvorene granice modela NA-2 (ljetni period-1.7.08. [25])

Slatkovodni riječni utoci definirani su s klimatološkim mjesečnim srednjacima za protok i temperaturu, temeljem raspoloživih i recentno objavljenih podataka (Slike 4.2.5a i 4.2.5b). Salinitet je parametriziran s 0 PSU.



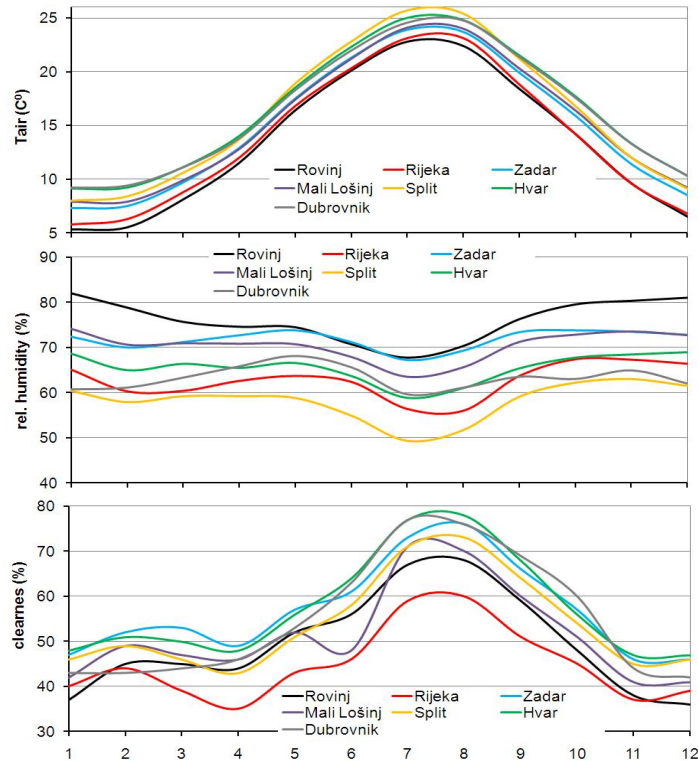
Slika 4.2.5a. Mjesečni klimatološki protoci i temperature rijeka (hrvatski slivovi)



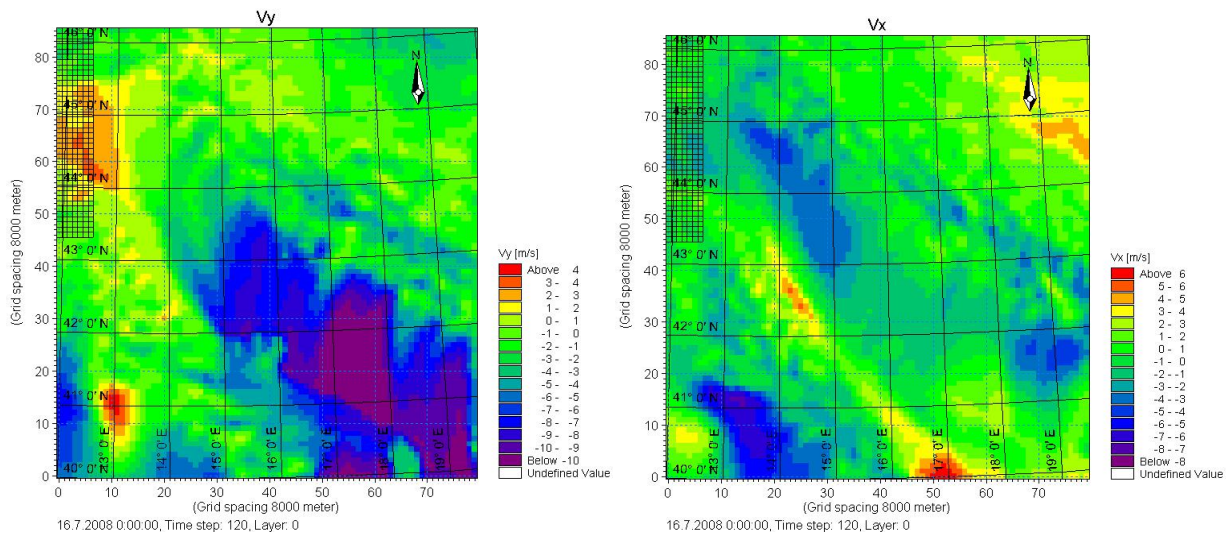
Slika 4.2.5b. Mjesečni klimatološki protoci i temperature rijeka (talijanski slivovi [30])

U atmosferskom forsiranju (temperatura zraka, vlažnost zraka i naoblaka) korišteni su klimatološki vremenski nizovi s najbliže meteorološke postaje [31] (Slika 4.2.6).

Polje vjetra je jedini atmosferski element za koji nisu korištena klimatološka obilježja i definirano je temeljem rezultata atmosferskog numeričkog modela Aladin-HR [32]-[36] za razdoblje 1.1.2008.-1.10.2008. Korištena polja vjetra iz modela Aladin-HR imaju prognostički karakter (+12h) te prostornu i vremensku rezoluciju od 8 km i 3 h (Slika 4.2.7).



Slika 4.2.6. Mjesečne klimatološke vrijednosti temperature zraka, vlažnosti zraka i inverzne naoblake [31]

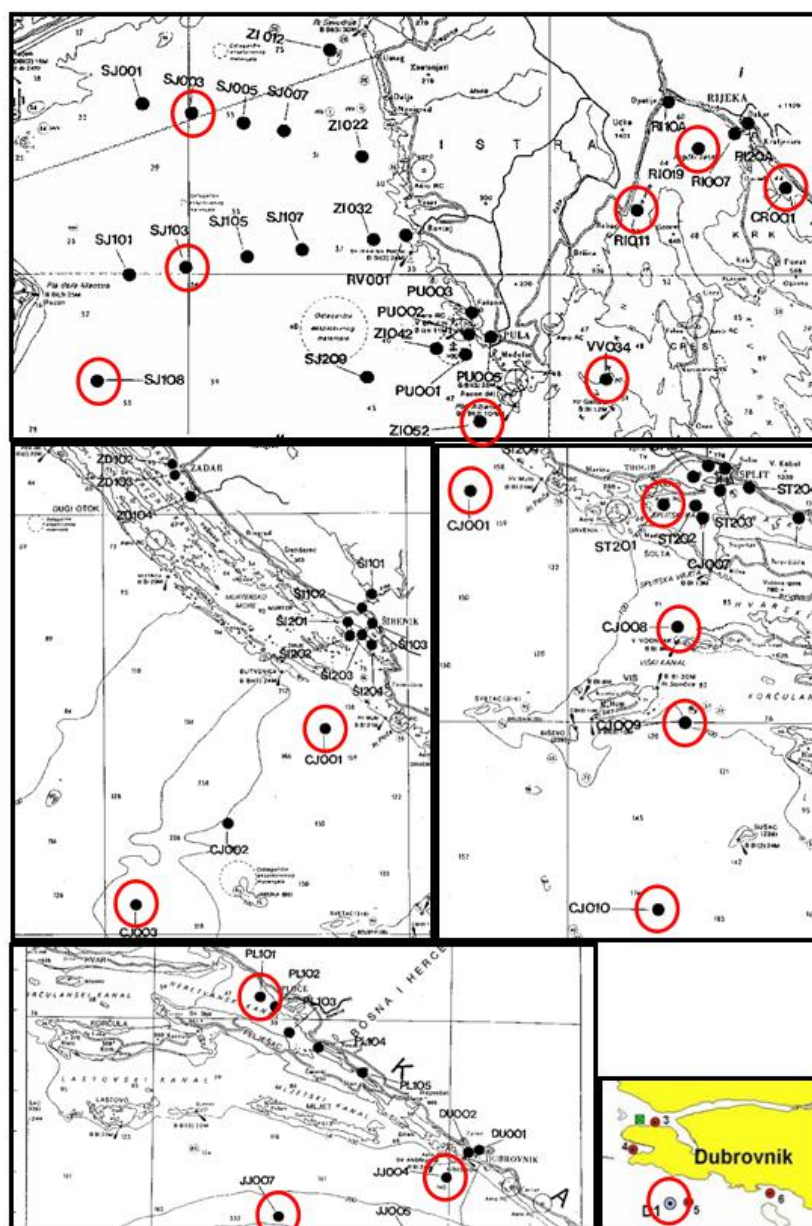


Slika 4.2.7. Primjer resultantnih polja brzine iz atmosferskog modela Aladin-HR u terminu 16/7/08 0:00 (lijevo - Vx komponenta brzine vjetra na 10m poviše površine mora; desno - Vy komponenta brzine vjetra na 10m poviše površine mora)

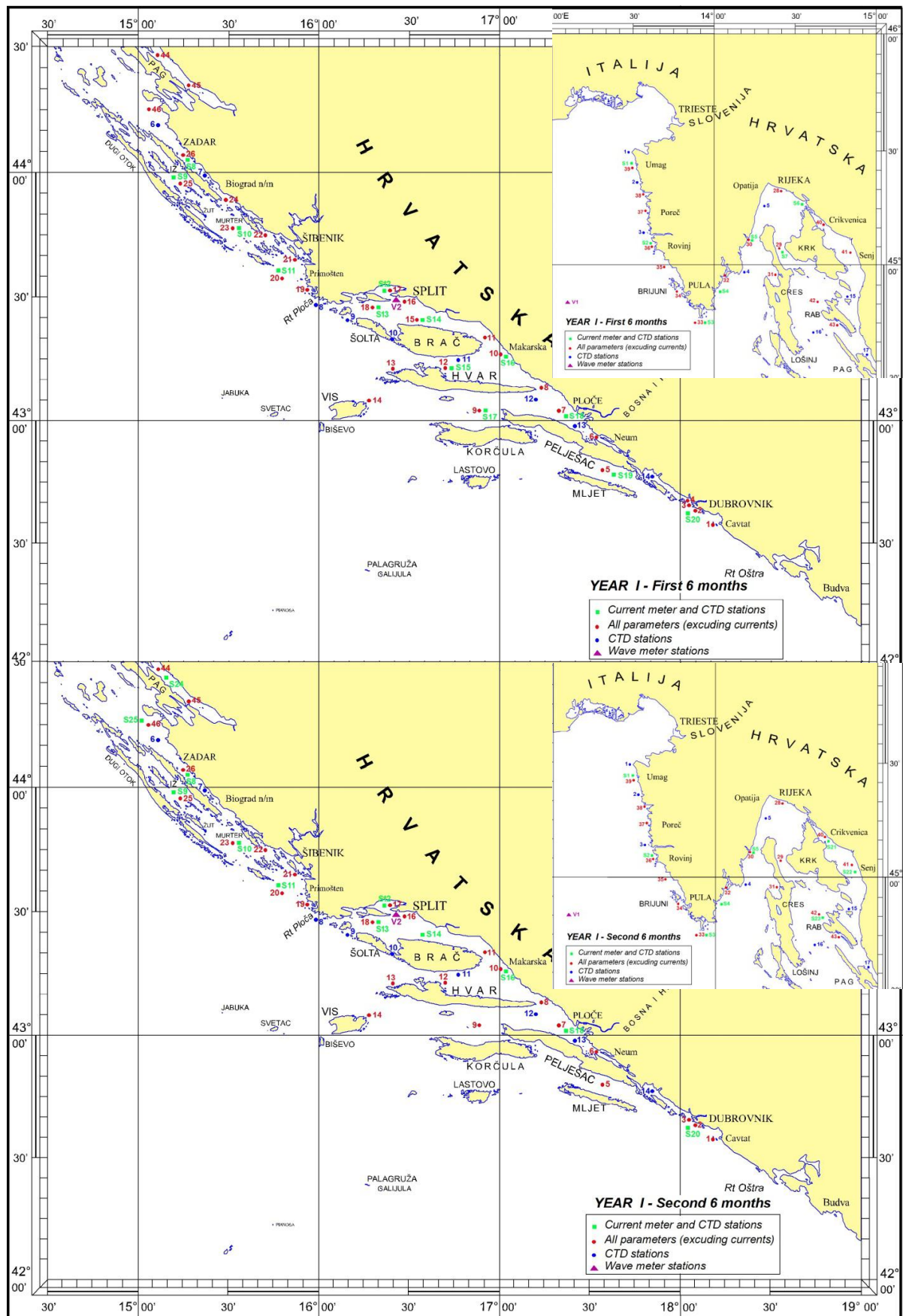
Prema tome, ovakav pristup modeliranju cirkulacije mora ne oslanja se na provedbu pojedinačnog i povremenog monitoringa, a implementirana prostorno i/ili vremenski varijabilna polja/vrijednosti preuzimaju se iz već uspostavljenog i verificiranog operativnog atmosferskog modela (Aladin-HR), iz literaturnih podataka ili sa internetskih stranica sa slobodnim pristupom setovima oceanografskih podataka.

Rezultati numeričkih simulacija cirkulacije mora služe kao osnova za daljnju implementaciju ekološkog modula s kojim se analizira prostorna i vremenska dinamika parametara kvalitete mora (DO, PO₄, NH₄, NO₂, NO₃ i CHL).

Definiranje rubnih uvjeta za parametre kvalitete mora na otvorenim modelskim granicama oslanja se na izmjerene vertikalne razdiobe koncentracija na najbližoj oceanografskoj postaji korištenoj u sklopu provedbe nacionalnih programa monitoringa: Projekt Jadran (2003.-2007.), Vir-Konavle (2003.-2007.), JP-07/09 (2007.-2008.). Pozicije oceanografskih monitoring postaja prikazane su na slikama 4.2.8a i 4.2.8b.



Slika 4.2.8a. Pozicije oceanografskih postaja u sklopu provedbe *Projekt Jadran* i *Vir-Konavle* (2003-2007). Crvenim kružićima označene su postaje korištene u sintezi rubnih uvjeta modela kvalitete mora (Tablica 4.2.1)



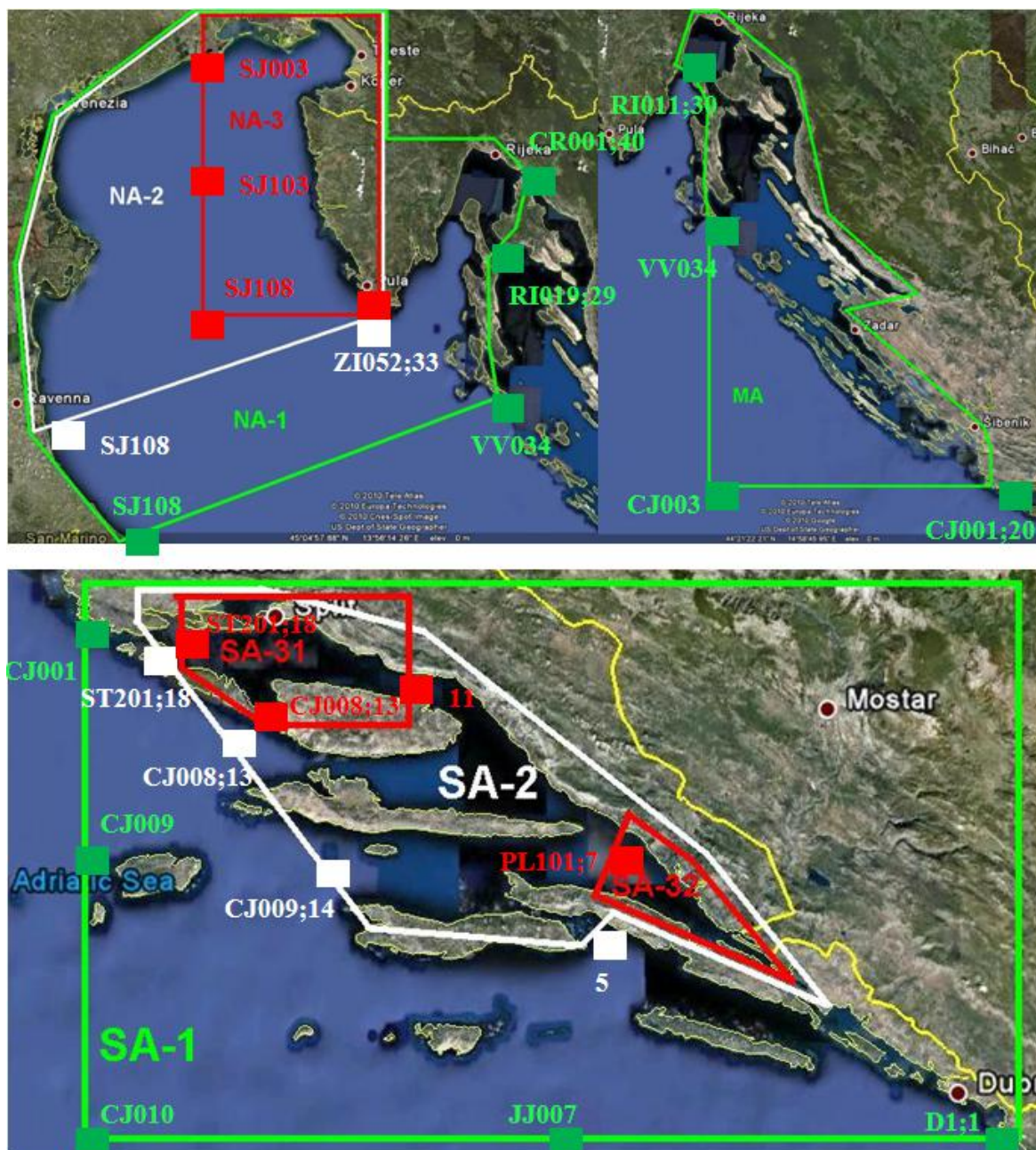
Slika 4.2.8b. Pozicije oceanografskih postaja u sklopu provedbe *Programa praćenja stanja Jadranskog mora (JP-07/09)*

Tablica 4.2.1 Zastupljenost mjerenja parametara kvalitete mora (po mjesecima) na postajama nacionalnih programa monitoringa (2003-2008), temeljem kojih se definira prostorna raspodjela parametara kvalitete mora u modelskim vertikalnim profilima otvorenih granica (vidi sliku 4.2.9)

station	model boundary	I					II					III					IV					V					VI									
		2003	2004	2005	2006	2007	2003	2004	2005	2006	2007	2003	2004	2005	2006	2007	2003	2004	2005	2006	2007	2003	2004	2005	2006	2007	2003	2004	2005	2006	2007	2003	2004	2005	2006	2007
SJ003	NA-3 NA-3(1)																																			
SJ103	NA-3 NA-3(1)																																			
SJ108	NA-3 NA-3(1,2) NA-2 NA-2(1) NA-1 NA-1(1)																																			
ZI052:33	NA-3 NA-3(2) NA-2 NA-2(1)																																			
R1019:29	NA-1 NA-1(2)																																			
C001:40	NA-1 NA-1(3)																																			
R1011:30	MA MA(1)																																			
VV034	MA MA(2)																																			
C:001:20	MA MA(3) SA-1 SA-1(1)																																			
C:003	MA MA(2,3)																																			
C:009:14	SA-1 SA-1(1) SA-2 SA-2(3)																																			
C:010	SA-1 SA-1(1,2)																																			
J:007	SA-1 SA-1(2)																																			
J:004=D1:1	SA-1 SA-1(2)																																			
STZ01:18	SA-2 SA-2(1) SA-31 SA-31(1)																																			
C:008:13	SA-2 SA-2(2)																																			
5	SA-2 SA-2(4)																																			
11	SA-31 SA-31(3)																																			
PL101:7	SA-32 SA-32(1)																																			

station	model boundary	VII					VIII					IX					X					XI					XII									
		2003	2004	2005	2006	2007	2003	2004	2005	2006	2007	2003	2004	2005	2006	2007	2003	2004	2005	2006	2007	2003	2004	2005	2006	2007	2003	2004	2005	2006	2007	2003	2004	2005	2006	2007
SJ003	NA-3 NA-3(1)																																			
SJ103	NA-3 NA-3(1)																																			
SJ108	NA-3 NA-3(1,2) NA-2 NA-2(1) NA-1 NA-1(1)																																			
ZI052:33	NA-3 NA-3(2) NA-2 NA-2(1)																																			
R1019:29	NA-1 NA-1(2)																																			
C001:40	NA-1 NA-1(3)																																			
R1011:30	MA MA(1)																																			
VV034	MA MA(2)																																			
C:001:20	MA MA(3) SA-1 SA-1(1)																																			
C:003	MA MA(2,3)																																			
C:009:14	SA-1 SA-1(1) SA-2 SA-2(3)																																			
C:010	SA-1 SA-1(1,2)																																			
J:007	SA-1 SA-1(2)																																			
J:004=D1:1	SA-1 SA-1(2)																																			
STZ01:18	SA-2 SA-2(1) SA-31 SA-31(1)																																			
C:008:13	SA-2 SA-2(2)																																			
5	SA-2 SA-2(4)																																			
11	SA-31 SA-31(3)																																			
PL101:7	SA-32 SA-32(1)																																			

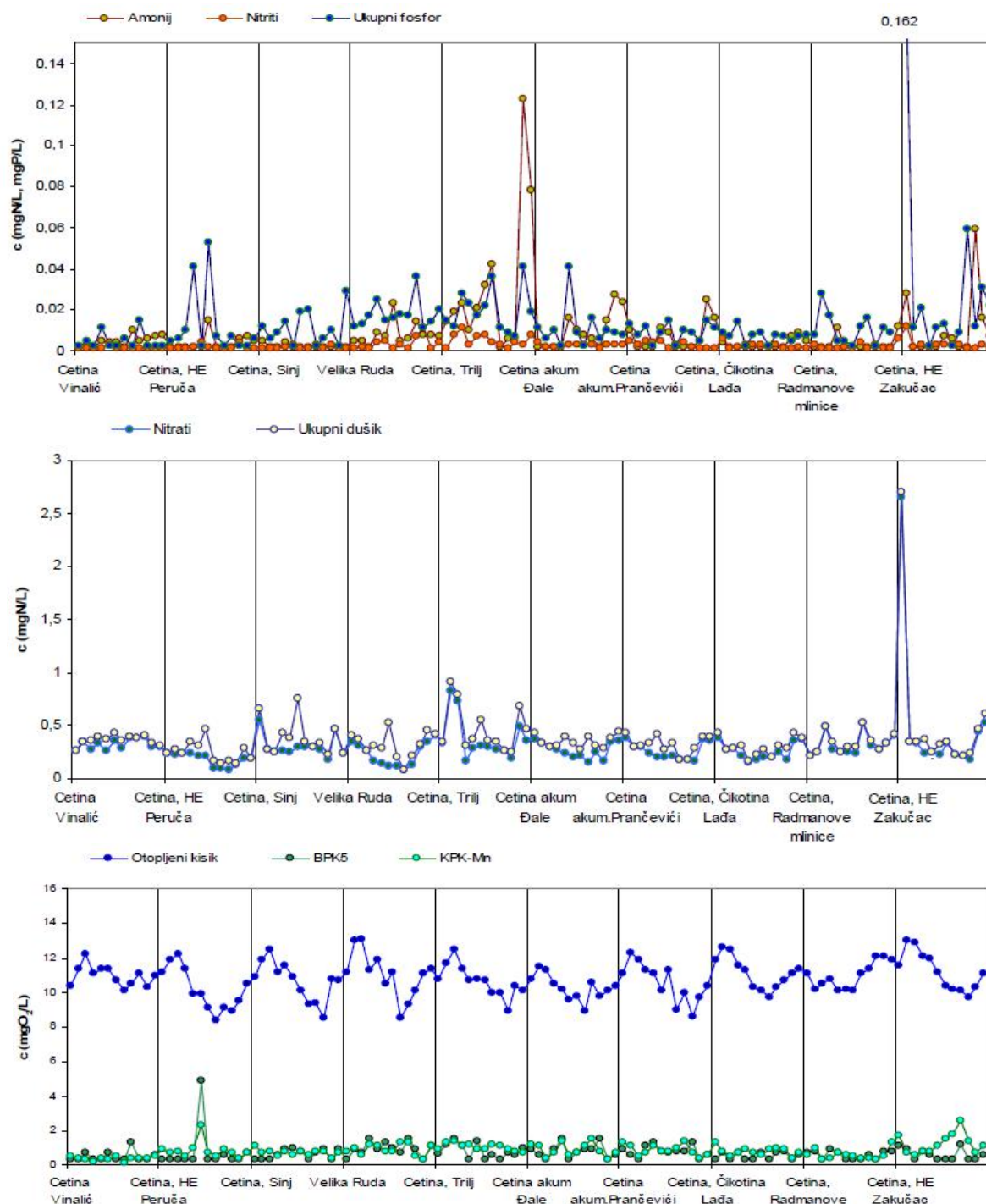
Termini uzorkovanja parametara kvalitete mora za postaje korištene u sintezi modelskih otvorenih granica (rubni uvjeti) prikazane su u tablici 4.2.1. Izmjerene vrijednosti na standardnim dubinama se prvotno osrednjuju za razdoblje 2003.-2008. Time se dobivaju mjesečne srednje vrijednosti (15.1.;15.2.;....15.12.) na standardnim oceanografskim dubinama, a kontinuirana prostorna raspodjela parametara kvalitete mora u vertikalnim profilima otvorenih granica modela dobiva se bilinearnom interpolacijom. Prema tome, za analizirani period 1.1.2008.-1.10.2008., model se oslanja na vrijednosti parametara kvalitete mora koje imaju klimatološka obilježja.



Slika 4.2.9 Postaje iz nacionalnih programa monitoringa provedenih u razdoblju 2003-2008, temeljem kojih se definira prostorna raspodjela parametara kvalitete mora u modelskim vertikalnim profilima otvorenih granica

Obogaćivanje analiziranih akvatorija s nutrijentima putem riječnih utoka parametrizirano je izmjerenim vrijednostima koncentracijama na mjernim profilima vodotoka. Osnovni skup podataka sačinjen je od vremenskih serija koncentracija s mjesečnom rezolucijom po godinama

u razdoblju 2003.-2011. (Slika 4.2.10). U modelskim simulacijama za razdoblje 1.1.2008-1.10.2008. korištene su osrednjene vrijednosti po mjesecima (I, II, III, ..., X).



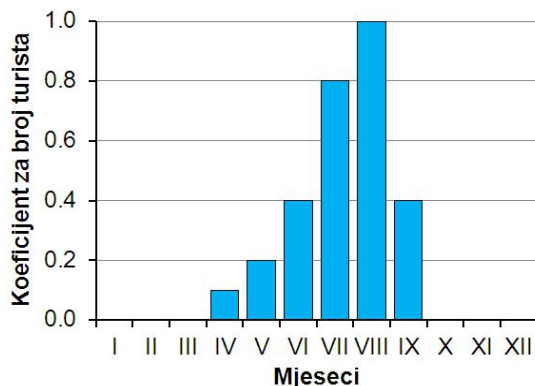
Slika 4.2.10 Primjer koncentracije amonija, nitrita, ukupnog fosfora, nitrata, ukupnog dušika i otopljenog kisika u slivu rijeke Cetine prema rezultatima mjerenja u 2009. godini [37]

Doprinos konglomeracija u unosu nutrijenata definira se temeljem broja stanovnika/turista u gradovima i općinama (Tablica 4.2.2). Unos je izražen srednjim dnevnim protokom za odgovarajući broj stanovnika/turista te odgovarajućom koncentracijom. Usvojeno je da svaki stanovnik/turist ostvaruje dnevnu potrošnju 300l/dan vode, od čega 70% prvotno dopijeva u sustav javne odvodnje, a nakon toga i u morski recipijent.

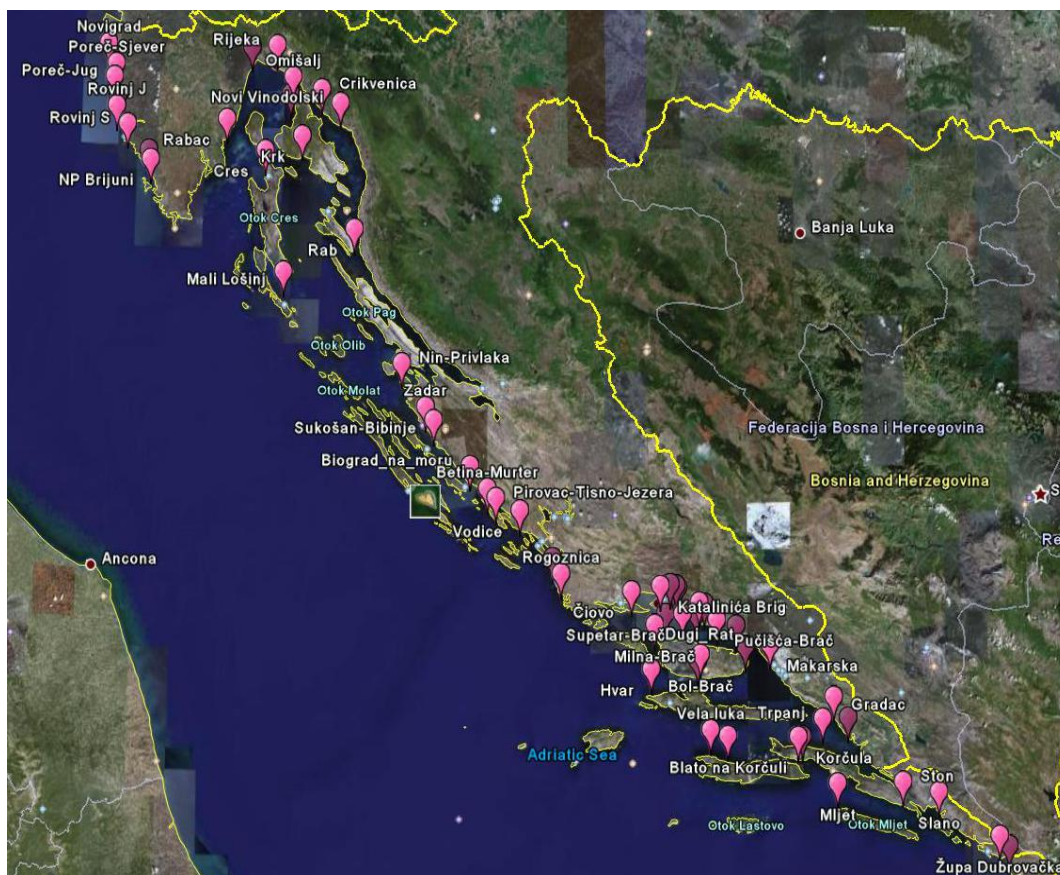
Tablica 4.2.2 Doprinos konglomeracija u unosu nutrijenata temeljem broja stanovnika-turista po gradovima-općinama s dnevnim protokom ($Q_{unos}=0.21m^3/dan/stanovnik-turist$) i odgovarajućim koncentracijama, uzimajući u obzir domicilno stanovništvo i turiste tijekom ljetnog razdoblja.

Grad/Općina	Stanovnici	Turisti (max VIII)	LONG - WGS	LAT - WGS	$Q_{unos} (m^3/s)$												
					I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	
Umag	12900	30000	13.5022	45.4281	0.031	0.031	0.031	0.039	0.046	0.061	0.090	0.104	0.061	0.031	0.031	0.031	0.031
Novigrad	4300	15000	13.5325	45.3187	0.010	0.010	0.010	0.014	0.018	0.025	0.040	0.047	0.025	0.010	0.010	0.010	0.010
Poreč	17460	23000	13.5705	45.2041	0.042	0.042	0.042	0.048	0.054	0.065	0.087	0.098	0.065	0.042	0.042	0.042	0.042
Rovinj	14300	30000	13.5880	45.1036	0.035	0.035	0.035	0.042	0.049	0.064	0.093	0.108	0.064	0.035	0.035	0.035	0.035
Pula	57800	15000	13.7668	44.9532	0.140	0.140	0.140	0.144	0.148	0.155	0.170	0.177	0.155	0.140	0.140	0.140	0.140
Opatija-Lovran	15900	7000	14.3041	45.3104	0.039	0.039	0.039	0.040	0.042	0.045	0.052	0.056	0.045	0.039	0.039	0.039	0.039
Rijeka	128600	5000	14.4374	45.3185	0.313	0.313	0.313	0.314	0.315	0.317	0.322	0.325	0.317	0.313	0.313	0.313	0.313
Crikvenica	11300	11000	14.6868	45.1675	0.027	0.027	0.027	0.030	0.033	0.038	0.049	0.054	0.038	0.027	0.027	0.027	0.027
Novi Vinodolski	5100	6000	14.7800	45.1217	0.012	0.012	0.012	0.014	0.015	0.018	0.024	0.027	0.018	0.012	0.012	0.012	0.012
Senj	6000	5400	14.8836	45.0078	0.015	0.015	0.015	0.016	0.017	0.020	0.025	0.028	0.020	0.015	0.015	0.015	0.015
Nin-Prilaka	6800	3000	15.1172	44.2378	0.017	0.017	0.017	0.017	0.018	0.019	0.022	0.024	0.019	0.017	0.017	0.017	0.017
Zadar	72700	9000	15.2424	44.0910	0.177	0.177	0.177	0.179	0.181	0.185	0.194	0.199	0.185	0.177	0.177	0.177	0.177
Vodice	8900	16000	15.7304	43.7416	0.022	0.022	0.022	0.026	0.029	0.037	0.053	0.061	0.037	0.022	0.022	0.022	0.022
Šibenik	34200	6000	15.8022	43.0078	0.083	0.083	0.083	0.085	0.086	0.089	0.095	0.098	0.089	0.083	0.083	0.083	0.083
Primosten	3000	4000	15.8977	43.5803	0.007	0.007	0.007	0.008	0.009	0.011	0.015	0.017	0.011	0.007	0.007	0.007	0.007
Trogir	11000	5000	16.2081	43.6953	0.027	0.027	0.027	0.028	0.029	0.032	0.036	0.039	0.032	0.027	0.027	0.027	0.027
Kaštela	40000	2000	16.3692	43.5197	0.097	0.097	0.097	0.098	0.098	0.099	0.101	0.102	0.099	0.097	0.097	0.097	0.097
Split	180000	5000	16.4484	43.4854	0.438	0.438	0.438	0.439	0.440	0.442	0.447	0.450	0.442	0.438	0.438	0.438	0.438
Omiš	16000	15000	16.6726	43.4238	0.039	0.039	0.039	0.043	0.047	0.054	0.070	0.078	0.054	0.039	0.039	0.039	0.039
Makarska	17000	15000	17.0057	43.2812	0.041	0.041	0.041	0.045	0.049	0.056	0.070	0.078	0.056	0.041	0.041	0.041	0.041
Gradac	1200	3000	17.3282	43.1005	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.006	0.009	0.010	0.006	0.003	0.003	0.003	0.003
Ploče	11000	1000	17.4256	43.0151	0.027	0.027	0.027	0.027	0.027	0.028	0.029	0.029	0.028	0.027	0.027	0.027	0.027
Ston	2400	2000	17.6774	42.8042	0.006	0.006	0.006	0.006	0.007	0.008	0.010	0.011	0.008	0.006	0.006	0.006	0.006
Slano	500	800	17.8599	42.7667	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002	0.003	0.003	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001
Dubrovnik	42000	15000	18.0800	42.6293	0.102	0.102	0.102	0.106	0.109	0.117	0.131	0.139	0.117	0.102	0.102	0.102	0.102
Župa Dubrovačka	8300	7000	18.1688	42.6079	0.020	0.020	0.020	0.022	0.024	0.027	0.034	0.037	0.027	0.020	0.020	0.020	0.020
Cavtat	2200	3000	18.2173	42.5720	0.005	0.005	0.005	0.006	0.007	0.008	0.011	0.013	0.008	0.005	0.005	0.005	0.005
Omišalj	1800	500	14.5258	45.2102	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.005	0.006	0.005	0.004	0.004	0.004	0.004
Malinska-Njivice	3900	2000	14.5141	45.1506	0.009	0.009	0.009	0.010	0.010	0.011	0.013	0.014	0.011	0.009	0.009	0.009	0.009
Krk	5500	8000	14.5800	45.0091	0.013	0.013	0.013	0.015	0.017	0.021	0.029	0.033	0.021	0.013	0.013	0.013	0.013
Cres	3000	11000	14.3857	44.9580	0.007	0.007	0.007	0.010	0.013	0.018	0.029	0.034	0.018	0.007	0.007	0.007	0.007
Rab	8000	10000	14.8633	44.6917	0.019	0.019	0.019	0.022	0.024	0.029	0.039	0.044	0.029	0.019	0.019	0.019	0.019
Mali Lošinj	8500	25000	14.4933	44.5450	0.021	0.021	0.021	0.027	0.033	0.045	0.069	0.081	0.045	0.021	0.021	0.021	0.021
Pag	4500	13000	15.0862	44.4628	0.011	0.011	0.011	0.014	0.017	0.024	0.036	0.043	0.024	0.011	0.011	0.011	0.011
Čiovo	6100	4000	16.3033	43.4717	0.015	0.015	0.015	0.016	0.017	0.019	0.023	0.025	0.019	0.015	0.015	0.015	0.015
Supetar	3300	2000	16.5604	43.3888	0.008	0.008	0.008	0.009	0.009	0.010	0.012	0.013	0.010	0.008	0.008	0.008	0.008
Milina	1100	1000	16.4186	43.3531	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.005	0.005	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003
Bol	1600	3000	16.6518	43.2507	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005	0.007	0.010	0.011	0.007	0.004	0.004	0.004	0.004
Sumartin	500	400	16.8802	43.2774	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001
Hvar	4100	7000	16.4217	43.2100	0.010	0.010	0.010	0.012	0.013	0.017	0.024	0.027	0.017	0.010	0.010	0.010	0.010
Stari Grad	2800	4000	16.6379	43.2282	0.007	0.007	0.007	0.008	0.009	0.011	0.015	0.017	0.011	0.007	0.007	0.007	0.007
Blato na Korčuli	3700	3000	16.7933	42.9800	0.009	0.009	0.009	0.010	0.010	0.012	0.015	0.016	0.012	0.009	0.009	0.009	0.009
Korčula	5900	4000	17.1464	42.9657	0.014	0.014	0.014	0.015	0.016	0.018	0.022	0.024	0.018	0.014	0.014	0.014	0.014
Mljet	1100	800	17.3450	42.8037	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003

Usvojene koncentracije nutrijenata su: amonij (NH₄) - 20 mg/l, nitriti (NO₂) - 2 mg/l, nitrati (NO₃) - 10 mg/l i otrofosfati (PO₄) - 7mg/l. [38]. Obzirom na turističke aktivnosti uzduž obalne crte analiziranog područja, broj turista je varijabilan tijekom godine (Slika 4.2.11). Navedene konglomeracije imaju različite stupnjeve izgrađenosti sustava javne odvodnje s pripadnim uređajima za pročišćavanje i podmorskim ispustima. Svi gradovi/općine koji imaju već izgrađeni sustav javne odvodnje („Eko Kaštelski zaljev“) ili plansku dokumentaciju o izvedbi sustava javne odvodnje („Jadranski projekt“) tretirani su na način da se odgovarajući protoci i koncentracije upuštaju na mjestu difuzorske dionice pripadnog podmorskog ispusta (Slika 4.2.12).



Slika 4.2.11. Vrijednosti koeficijenata za izračun broja turista u ukupnom broju korisnika sustava javne odvodnje. Maksimalni broj turista javlja se u VIII mjesecu (vrijednost koeficijenta je 1.0)



Slika 4.2.12 Pozicije difuzorskih dionica ispusta postojećih i planiranih sustava javne odvodnje u kojima se unose nutrijenti s količinama definiranim u tablici 4.2.2 (obuhvat antropogene komponente unosa nutrijenata)

4.3. Uspostava ugnježđenih modela cirkulacije i kvalitete mora (*Metodologija II*)

Uspostavlja se 3D numerički modeli cirkulacije mora za područje cijelog Jadrana (Slika 4.3.1). Iz tog modela se, koristeći tehniku ugnježđenja, generiraju rubni uvjeti (T, S, razi, u i v) za otvorene granice detaljnih modela cirkulacije i kvalitete mora (NA-4, SA-31 i SA-32), s prostornim domenama prikazanim na slici 4.3.1. Rezultati modelskih simulacija cirkulacije mora na detaljnim modelima služe kao osnova za daljnje modelske proračune koncentracija parametara kvalitete mora. (DO, PO₄, NH₄, NO₂, NO₃ i CHL). Analizama je obuhvaćeno kontinuirano vremensko razdoblje 15.3.2013.-15.3.2014., tijekom kojeg se provodi i program *in situ* mjerenja u sklopu JP-13/14.



Slika 4.3.1. Prostorna domena modela Jadrana i ugnježđenih domena modela NA-4, SA-31, SA-32 (metodologija II)

Model cijelog Jadrana (ROMS) koristi prostornu rezoluciju od 2km u horizontalnom smjeru i 30 sigma slojeva u vertikalnom smjeru. Početni uvjeti prostorne raspodjele strujnog polja, temperature i saliniteta mora dobiveni su na temelju rezultata operativnog mediteranskog modela. Rubni uvjeti na otvorenoj granici definirani su temeljem ugnježđenja u mediteranski model (Slika 4.3.1), iz kojeg se preuzimaju vrijednosti razi, te trodimenzionalna polja brzine, temperature i saliniteta mora s horizontalnom rezolucijom od 6.5km i 72 sloja u vertikalnom smjeru. Podatci iz mediteranskog modela imaju dnevnu vremensku rezoluciju. Na kontaktu mora i atmosfere koriste se izlazna polja iz atmosferskog modela Aladin-HR, s prostornom rezolucijom od 8km (temperatura zraka, relativna vlažnost zraka, tlak, oborine, kratkovalno zračenje), odnosno 2km (polje vjetra) i vremenskom rezolucijom od 3 sata. Utoci rijeka su

parametrizirani klimatološkim mjesečnim srednjacima protoka i temperatura, te salinitetom 0. Izuzeće je rijeka Neretva, za koju su korištene izmjerene i osrednjene polusatne vrijednosti protoka te trosatno osrednjene vrijednosti temperatura.

Detaljni modeli (Slika 4.3.1), ugnježdjeni u model Jadrana, imaju prostornu rezoluciju od 500m (ROMS), odnosno proračunsku mrežu s varijabilnim prostornim korakom od 600m do 200m (MIKE 3). Početni uvjeti - prostorna raspodjela struja, temperature i saliniteta mora - definiraju se na temelju rezultata jadranskog modela, a rubni uvjeti na površini mora i na pozicijama riječnih utoka oslanjaju se na isti skup podataka kao i model Jadrana. U vertikalnim presjecima otvorenih granica koriste se proračunate vrijednosti iz modela Jadrana (ugnježđenje), s prostornom rezolucijom od 600m u horizontalnom smjeru i vertikalnom rezolucijom od 2m. Rezultati numeričkih simulacija cirkulacije mora na detaljnim modelima služe kao osnova za daljnju implementaciju ekoloških modula (MIKE, IMPAS) kojim se analizira prostorna i vremenska dinamika parametara kvalitete mora (DO, PO₄, NH₄, NO₂, NO₃ i CHL). Rubni uvjeti za parametre kvalitete mora na otvorenim granicama oslanjaju se na izmjerene vertikalne razdiobe koncentracija na najbližoj oceanografskoj postaji korištenoj u sklopu provedbe ovog programa monitoringa. Unos nutrijenata s riječnim utocima i iz konglomeracija parametriziran je na isti način kao i u prethodno objašnjenom metodologiji I.

4.4. Primijenjeni numerički modeli

4.4.1. MIKE 3 fm - Hydrodynamic

Jedan od modela koji će se koristiti biti će MIKE 3 fm koji koristi nestrukturiranu prostornu mrežu. Razvijen je za primjenu u dubokomorskim, priobalnim i estuarijskim područjima. Hidrodinamički modul je temeljna računalna komponenta čitavog MIKE 3 fm modelskog sustava koja predstavlja hidrodinamičku osnovu za transportni i ekološki modul.

Hidrodinamički modul (HD modul) se temelji na numeričkom rješenju trodimenzionalne Navier-Stokesove jednadžbe s Reynoldsovom osrednjenjem za nestišljivu tekućinu temeljene na pretpostavci Boussinesqove i hidrostatske raspodjele tlaka. Hidrodinamički modul sadrži jednadžbe kontinuiteta, količine gibanja, temperature, saliniteta i gustoće i zatvoren je modelom turbulencije.

$$\frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial v}{\partial y} + \frac{\partial w}{\partial z} = S \quad (1)$$

$$\frac{\partial u}{\partial t} + \frac{\partial u^2}{\partial x} + \frac{\partial uv}{\partial y} + \frac{\partial wu}{\partial z} = fu - g \frac{\partial h}{\partial x} - \frac{1}{r_0} \frac{\partial p_0}{\partial x} - \frac{g}{r_0} \frac{\partial p}{\partial x} dz + F_u + \frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{\partial u}{\partial z} \right) + u_s S \quad (2)$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} + \frac{\partial v^2}{\partial y} + \frac{\partial uv}{\partial x} + \frac{\partial wv}{\partial z} = -fv - g \frac{\partial h}{\partial y} - \frac{1}{r_0} \frac{\partial p_0}{\partial y} - \frac{g}{r_0} \frac{\partial p}{\partial y} dz + F_v + \frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{\partial v}{\partial z} \right) + v_s S \quad (3)$$

$$F_u = \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{\partial u}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(\frac{\partial u}{\partial y} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{\partial u}{\partial z} \right) + \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{\partial v}{\partial x} \right) \quad (4)$$

$$F_v = \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{\partial v}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(\frac{\partial v}{\partial y} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{\partial v}{\partial z} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(\frac{\partial u}{\partial y} \right) \quad (5)$$

$$r = r(T, S) \quad (6)$$

$$\frac{\partial T}{\partial t} + u \frac{\partial T}{\partial x} + v \frac{\partial T}{\partial y} + w \frac{\partial T}{\partial z} = F_T + \frac{\partial}{\partial z} \left(D_v \frac{\partial T}{\partial z} \right) + \hat{H} + T_S S \quad (7)$$

$$\frac{\partial S}{\partial t} + u \frac{\partial S}{\partial x} + v \frac{\partial S}{\partial y} + w \frac{\partial S}{\partial z} = F_S + \frac{\partial}{\partial z} \left(D_v \frac{\partial S}{\partial z} \right) + S_S S \quad (8)$$

$$(F_T, F_S) = \frac{\partial}{\partial x} \left(D_h \frac{\partial}{\partial x} (T, S) \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(D_h \frac{\partial}{\partial y} (T, S) \right) \quad (9)$$

$$D_h = \frac{u_{tH}}{S_T} ; D_v = \frac{u_{tV}}{S_T} \quad (10)$$

$$v_{tV} = c_m \frac{k^2}{e} \quad (11)$$

$$\frac{\partial k}{\partial t} + \frac{\partial uk}{\partial x} + \frac{\partial vk}{\partial y} + \frac{\partial wk}{\partial z} = F_k + \frac{\partial}{\partial z} \left(v_{tV} \frac{\partial k}{\partial z} \right) + P + B - e \quad (12)$$

$$\frac{\partial e}{\partial t} + \frac{\partial ue}{\partial x} + \frac{\partial ve}{\partial y} + \frac{\partial we}{\partial z} = F_e + \frac{\partial}{\partial z} \left(v_{tV} \frac{\partial e}{\partial z} \right) + \frac{e}{k} (c_{1e} P + c_{3e} B - c_{2e} e) \quad (13)$$

$$P = \frac{t_{xz}}{r_0} \frac{\partial u}{\partial z} + \frac{t_{yz}}{r_0} \frac{\partial v}{\partial z} \gg v_{tV} \left(\frac{\partial u}{\partial z} \right)^2 + \left(\frac{\partial v}{\partial z} \right)^2 \quad (14)$$

$$B = - \frac{v_{tV}}{S_t} N^2 \quad (15)$$

$$N^2 = - \frac{g}{r_0} \frac{\partial r}{\partial z} \quad (16)$$

$$(F_k, F_e) = \frac{\partial}{\partial x} \left(D_h \frac{\partial}{\partial x} (k, e) \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(D_h \frac{\partial}{\partial y} (k, e) \right) ; D_h = \frac{u_{tH}}{S_k} ; D_h = \frac{u_{tH}}{S_e} \quad (17)$$

$$u_{tH} = c_s^2 I^2 \sqrt{2 S_{ij} S_{ij}} \quad (18)$$

$$S_{ij} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right) ; (i, j = 1, 2) \quad (19)$$

Slobodna površina je uzeta u obzir koristeći transformaciju u sigma koordinatni sustav. Prostorna diskretizacija je izvedena koristeći metodu konačnih volumena. Prostorna domena je diskretizirana pomoću diobe kontinuuma u nepreklapajuće elemente. U horizontalnoj ravnini korištena je nestrukturirana mreža, dok je u vertikalnom smjeru upotrijebljena strukturirana diskretizacija. Prostorni diskretizacijski elementi mogu biti prizme čije su horizontalne baze trokuti ili paralelogrami.

Diskretizacijske mreže se stvaraju unutar alata *MIKE Zero Mesh Generator* koji služi za generiranje nestrukturiranih mreža, kao i za definiranje granica modela. Rezolucija u diskretizaciji prostorne domene se odabire prema kriteriju stabilnosti modela.

Hidrodinamički modul računa rezultatno strujanje te distribuciju saliniteta i temperature koji su pod utjecajem vanjskih djelovanja i rubnih uvjeta. Baroklini efekt i turbulencija su sastavni dijelovi HD modula. Gustoća se definira kao funkcija saliniteta u temperature pa se stoga transportne jednačbe za temperaturu i/ili salinitet rješavaju simultano. Izračunata temperatura i salinitet se vraćaju u hidrodinamičke jednačbe za uzgon koji se javlja zbog gradijenta gustoće.

Raščlamba prognostičkih varijabli na srednje vrijednosti i turbulentne oscilacije dovodi do dodatnih članova za naprezanje u vladajućim jednačbama da bi se uvažili neriješeni procesi u vremenu i prostoru. Usvajanjem koncepta turbulentne viskoznosti, ti procesi se izražavaju preko turbulentne viskoznosti i gradijenta srednje vrijednosti tako da efektivno posmično naprezanje u jednačbi količine gibanja sadrži laminarno naprezanje i Reynoldsovo naprezanje (turbulencija).

Utjecaj riječnih utoka u modelu je definiran u obliku izvora, a njihov se doprinos uzima u obzir i u jednačbi kontinuiteta i u jednačbi očuvanja količine gibanja.

Toplina u vodi može međudjelovati s toplinom iz zraka. Izmjena topline se proračunava na temelju četiri fizikalna procesa: dugovalne radijacije, toka senzibilne topline (konvekcija), kratkovalne radijacije i toka latentne topline (evaporacija). Za izračun utjecaja izmjene topline, koriste se temperatura zraka, relativna vlažnost i prozirnost u vidu vremenski promjenjivih serija. Za tok latentne topline definiraju se konstante u Daltonovom i Angstromovom zakonu i zajedno s vremenskim pomakom od standardnog lokalnog meridijana u odgovarajućoj vremenskoj zoni, uključuju se računsku proceduru. Zagrijavanje kratkovalnom radijacijom se također uključuje u proračun. Prodor kratkovalnog zračenja koje je ovisno o prozirnosti, definirano je preko koeficijenta svjetlosnog odumiranja.

Model turbulencije se uključuje specificiranjem vrtložne viskoznosti u vertikalnom smjeru, a odabran je $k-\epsilon$ model [39]. Ovaj model turbulencije koristi transportne jednačbe za turbulentnu kinetičku energiju - k i njenu disipaciju - ϵ .

4.4.2 MIKE 3 fm - Water quality

Za ekološko modeliranje korišten je numerički modul koji predstavlja otvoreni i generički alat za oblikovanje akvatičkih ekosustava vezanih za probleme kvalitete mora. Korisnik ovog modula sam kreira matematički obrazac kojim se interpretira vremenska dinamika otopljene ili suspendirane tvari, čestica, žive ili odumrle materije kao i živih ili odumrlih organizama odnosno biološki i ekološki procesi sa svim interakcijskim vezama pojedinih varijabli u procesu. Definirane procesne varijable mogu biti prostorno prijenosne kroz vezu s konvektivno disperzivnim modulom odnosno hidrodinamičkim modulom ili fiksirane, primjerice, za dno.

U svakom kreiranom matematičkom obrascu koriste se procesne varijable, konstante, parametri prisile i pomoćne varijable, objedinjene kroz jednačbe procesa. Procesne varijable su one koje daju najbolji uvid u stanje nekog ekosustava, a korisnik ih sam odabire kako bi se praćenjem njihove dinamike mogla ostvariti predikcija budućeg stanja. Konstante se koriste kao argumenti u matematičkim izrazima procesa i ne mijenjaju se u vremenu, ali mogu biti prostorno varijabilne. Parametri prisile koriste se kao argumenti u matematičkim izrazima procesa te mogu biti prostorno i vremenski varijabilni. Njima se obuhvaćaju vanjski utjecaji koji djeluju na ekosustav poput temperature, solarne radijacije i vjetera. Pomoćne varijable su također argumenti u formiranim i korištenim matematičkim, odnosno numeričkim izrazima procesa u ekosustavu, a ponekad se koriste samo za direktnu specifikaciju rezultata. Tipični primjeri pomoćnih varijabli su faktori solarne radijacije za dnevnu varijaciju ili relativna duljina dana. Procesni daju matematički opis transformacije procesne varijable, što znači da su procesi korišteni kao argumenti u diferencijalnim jednačbama koje rješava ovaj modul u svrhu određivanja stanja procesne varijable.

Za svaku procesnu varijablu specificirana je odgovarajuća obična diferencijalna jednačba kojom se obuhvaćaju procesi bitni za promjenu koncentracije specificirane procesne varijable. Ukoliko pojedini proces pogađa više od jedne procesne varijable ili ukoliko postoje interakcijska

djelovanja više procesnih varijabli, jednačbe su međusobno ovisne. Dinamika pronosa procesnih varijabli može se izraziti setom transportnih jednačbi. Procesne varijable su međusobno spregnute linearni ili nelinearno preko člana izvor/ponor. Definirane numeričke jednačbe se rješavaju pomoću ugrađenog solvera koji provodi eksplicitnu vremensku integraciju transportnih jednačbi dok računa koncentracije za sljedeći vremenski korak. Aproksimativno rješenje se dobije kada se član advekcija-disperzija tretira kao konstanta u svakom koraku. Definirani spregnuti set običnih diferencijalnih jednačbi se rješava integracijom brzine promjene zbog samih procesa modela kvalitete mora i advektivno-disperzivnih procesa.

U slučaju koncentracije DO vladajuća ravnotežna jednačba uključuje procese reaeracije, fotosinteze, respiracije, sedimentne potrošnje kisika (SOD) i nitrifikacije. Izraz za reaeraciju uključuje nivo saturacije vode kisikom koji ovisi o temperaturi i salinitetu mora. Proces reaeracije također ovisi i o brzini vjetrova, brzini cirkulacije i dubini mora. Kisik proizveden fotosintezom se opisuje u odnosu na maksimalnu produkciju u podne. Proces varira tokom dana i ovisi o relativnoj dužini dana. Fotosintetička proizvodnja i autotrofna potrošnja (respiracija) varira po dubini zbog količine svjetla. Varijacije po dubini su modelirane pomoću Beer-Lambertovog zakona. Respiracija (disanje) autotrofa i heterotrofa troši kisik i u funkciji je temperature. Degradacija (raspadanje) organske tvari je također proces koji zahtjeva kisik i ovisan je o temperaturi i koncentraciji kisika te količini organske tvari. Sedimentna potrošnja kisika (SOD) zbog raspadanja organske tvari koja ne dolazi iz izvora onečišćenja se opisuje odvojeno. Pretpostavlja se da SOD ovisi samo o koncentraciji kisika i temperaturi. Michaelis-Mentenov izraz se koristi za stimulaciju procesa pri uvjetima malih koncentracija kisika. Model uključuje potrošnju kisika zbog procesa nitrifikacije. Proces se definira kao linearan (prvog reda) u odnosu na amonij i Michaelis-Mentenov proces vezan za kisik.

$$\frac{d(DO)}{dt} = \text{reaer} + \text{photosyn} - \text{respir} - (BOD)_{\text{deg rad}} - (SOD) - \text{nitrif}_{DO} \quad (20)$$

$$\text{reaer} = K_2(C_s - DO) \quad (21)$$

$$C_s = 14.652 - 0.0841S + T[0.00256S - 0.41022 + T(0.007991 - 0.0000374S - 0.000077774T)] \quad (22)$$

$$K_2 = 3.93V^{0.5} / H^{1.5} + W / H \quad (23)$$

$$W = 0.728W_V^{0.5} - 0.371W_V + 0.0372W_V^2 \quad (24)$$

$$\text{photosyn} = \begin{cases} \frac{P_{\max} F_1(H) \cos \theta_p \frac{1}{24} \frac{1}{2\pi} \frac{2\pi}{24} H}{\cos \theta_p \frac{1}{24} \frac{1}{2\pi} \frac{2\pi}{24} H}, & \text{if } SD > 0 \\ 0, & \text{else} \end{cases} \quad (25)$$

$$\text{respir} = \text{resp}T = \frac{DO}{DO + M_{DO}} \text{resp}q_2^{(T-20)} / H \quad (26)$$

$$(BOD)_{\text{deg rad}} = K_{d3}q_{d3}^{(T-20)} BOD \frac{DO}{DO + H_{DO_BOD}} \quad (27)$$

$$SOD = \frac{DO}{DO + H_{DO_SED}} B_{1_sed}q_{B1}^{(T-20)} / H \quad (28)$$

Deleted[M]:

$$\text{nitrif}_{DO} = y_1 \text{nitrif} + y_2 \text{nitri} \quad (29)$$

$$\text{nitrif} = K_4 q_4^{(T-20)} NH_4 \frac{DO}{DO + H_{DO_NIT}} \quad (30)$$

$$\text{nitri} = K_7 q_7^{(T-20)} NO_2 \frac{DO}{DO + H_{DO_NIT}} \quad (31)$$

U slučaju koncentracije NH_4 vladajuća ravnotežna jednačba sadrži procese: amonij dobiven biološkom degradacijom organske tvari, transformaciju amonija u nitrate, konzumaciju amonija od strane morske flore i konzumaciju amonija od strane bakterija. Proces nitrifikacije je pretpostavljen kao proces prvog reda obzirom na koncentraciju amonija s direktnom pretvorbom amonija u nitrate. Proces je ovisan o temperaturi i koncentraciji kisika. Kao dio fotosinteze i respiracije, konzumacija amonija od strane morske flore je definirana kao konstanta u gramima po neto produkciji kisika (fotosinteza - respiracija). Tijekom noći konzumacija amonija od strane morske flore se smatra konstantnom. Tijekom dana njezin intenzitet ovisi o koncentraciji amonija kako je to definirano u Michaelis-Mentenovoj kinetici.

$$\frac{d(HN_4)}{dt} = BOD_N - \text{nitrif} - \text{plant}_N - \text{bact}_N \quad (32)$$

$$BOD_N = Y_{2d} (BOD)_{deg\ rad} \quad (33)$$

$$\text{plant}_N =$$

$$\text{IF} \quad (\text{photosyn} - \text{resp}T) > 0.8(P_{\max} / h - \text{resp}T) \quad (34)$$

$$\text{THEN} \quad N_{\text{plant}} (\text{photosyn} - \text{resp}T) f_{NP}$$

$$\text{ELSE} \quad 0.8 N_{\text{plant}} (P_{\max} / h - \text{resp}T) f_{NP}$$

$$f_{NP} = \frac{\frac{NH_4 + NO_2 + NO_3}{NH_4 + NO_2 + NO_3 + K_{SN}} \frac{PO_4}{PO_4 + K_{SP}}}{\frac{NH_4 + NO_2 + NO_3}{NH_4 + NO_2 + NO_3 + K_{SN}} + \frac{PO_4}{PO_4 + K_{SP}}} \quad (35)$$

$$\text{bact}_N = N_{\text{bact}} (BOD)_{deg\ rad} \frac{NH_4}{NH_4 + H_{S_NH_4}} \quad (36)$$

U slučaju koncentracije NO_2 vladajuća ravnotežna jednačba sadrži sljedeće procese: transformaciju amonija u nitrite i transformaciju nitrita u nitrate.

$$\frac{d(NO_2)}{dt} = \text{nitrif} - \text{nitri} \quad (37)$$

U slučaju koncentracije NO_3 vladajuća ravnotežna jednačba sadrži sljedeće procese: transformaciju nitrita u nitrate i denitrifikaciju. Denitrifikacija u kojoj se nitrati pretvaraju u slobodni atmosferski dušik je anaerobni proces koji se odvija uglavnom u pridnenom sloju (sedimentu). Interpretira se kao proces prvog reda koji ovisi o temperaturi.

$$\frac{d(NO_3)}{dt} = \text{nitri} - \text{deni} \quad (38)$$

$$\text{deni} = K_6 NO_3 q_6^{(T-20)} \quad (39)$$

U slučaju koncentracije PO_4 vladajuća ravnotežna jednačba sadrži procese: ortofosfate dobivene biološkom degradacijom organske tvari, konzumaciju ortofosfata od strane morske flore i konzumaciju ortofosfata od strane bakterija. Kao dio fotosinteze i respiracije, potrošnja ortofosfata od strane morske flore je definirana kao konstanta pomnožena neto proizvodnjom kisika (fotosinteza - respiracija). Ovisnost intenziteta potrošnje u odnosu na dostupnu koncentraciju ortofosfata je opisana pomoću Michaelis-Mentenove kinetike. Potrošnja ortofosfata od strane bakterija u procesu mineralizacije organske tvari se definira kao dio procesa biološke degradacije.

$$\frac{d(PO_4)}{dt} = BOD_P - \text{plant}_P - \text{bact}_P \quad (40)$$

$$BOD_P = Y_{3d} (BOD)_{\text{deg rad}} \quad (41)$$

$$\text{plant}_P =$$

$$\text{IF} \quad (\text{photosyn} - \text{resp}T) > 0.8(P_{\text{max}} / h - \text{resp}T) \quad (42)$$

$$\text{THEN} \quad P_{\text{plant}} (\text{photosyn} - \text{resp}T) f_{NP}$$

$$\text{ELSE} \quad 0.8 P_{\text{plant}} (P_{\text{max}} / h - \text{resp}T) f_{NP}$$

$$\text{bact}_P = P_{\text{bact}} (BOD)_{\text{deg rad}} \frac{PO_4}{PO_4 + H_{S_PHOS}} \quad (43)$$

U slučaju koncentracije CHL vladajuća ravnotežna jednačba sadrži procese: neto produkciju klorofila-a, opadanje koncentracije klorofila-a zbog odumiranja fitoplanktonskih stanica i sedimentacije klorofila-a. Pretpostavlja se da je produkcija klorofila-a proporcionalna proizvodnji ugljika, a samim time i proizvodnji kisika. Pretpostavit će se i konstantni omjer koncentracije klorofila-a naspram koncentracije ugljika.

$$\frac{d(CHL)}{dt} = \text{prod}_{CHL} - \text{resp}_{CHL} - \text{death}_{CHL} - \text{sedi}_{CHL} \quad (44)$$

$$\text{prod}_{CHL} = \text{photosyn} K_{10} K_{11} f_{NP} \quad (45)$$

$$\text{resp}_{CHL} = K_{10} K_{11} f_{NP} \text{resp}T \quad (46)$$

$$\text{death}_{CHL} = K_8 CHL \quad (47)$$

$$\text{sedi}_{CHL} = CHL K_9 / H \quad (48)$$

Analiza osjetljivosti i metodologija za definiranje optimalnog seta parametara u ekološkom modulu se provodi prema sljedećim koracima: a) definiranje seta vrijednosti parametara za numerički model koji će se koristiti u određenoj modelskoj simulaciji, b) provedba modelske

simulacije koristeći definirane vrijednosti modelskih parametara, c) izračun statističkih obilježja modelskih rezultata.

Potrebno je odrediti učinkovitost modelske simulacije sa zadanim vrijednostima parametara bilo da se ona koristi za analizu osjetljivosti, optimizaciju parametara ili upravljanje scenarijima modela. To se provodi izračunom statističkih obilježja modelske simulacije. Navedena obilježja su obično usporedbe rezultata modela s mjerenjima ili, u općem slučaju, s nekim ciljanim vrijednostima.

Parametri za statističku obradu se definiraju u sklopu rutine objektivne funkcije. Temeljna statistička obrada uključuje usporedbu između simulirane i ciljane vremenske serije podataka. Te se temeljne statističke obrade mogu grupirati u različite objektivne funkcije. Konačno, definirane objektivne funkcije se spajaju u jednu statističku obradu koju koristi optimizacijski algoritam. Obrada koristi dvije temeljne statističke usporedbe: srednju grešku i korijen srednje kvadratne greške. Računske procedure uključuju samo lokalnu analizu osjetljivosti koja za rezultat daje osjetljivost modelskog parametra u okolini specificiranog seta parametara te tako pruža informaciju o značajnosti parametra samo na određenoj lokaciji u parametarskom prostoru.

4.4.3. Regionalni oceanografski modelski sustav (ROMS)

Fizikalna svojstva Jadrana u okviru ovog projekta simulirana su hidrodinamičkim numeričkim modelom ROMS (Regionalni oceanografski modelski sustav). U simulacijama je korištena verzija modela sa Sveučilišta Rutgers [40]. ROMS model je danas jedan od najčešće korištenih oceanografskih modela s javno dostupnim kodom, ima veliku bazu korisnika, koja ga je prepoznala kao napredni i pouzdan alat u hidrodinamičkim studijama bazena čije se dimenzije kreću od cijelih oceana, preko regionalnih mora pa sve do malih priobalnih područja. Osim hidrodinamičkih svojstava jadranskog bazena, ROMS modelom određena su i fizikalna svojstva srednjeadranske priobalne domene SA-31, a dobiveni rezultati koriste se u IMPAS modelu kojim se simulira dinamika niza parametara kvalitete mora.

ROMS model sadrži potpunu trodimenzionalnu nelinearnu hidrodinamiku i termodinamiku koja se temelji na primitivnim jednadžbama gibanja, na jednadžbi kontinuiteta, na jednadžbama očuvanja topline i soli i na jednadžbi stanja. Model koristi s koordinatni sustav u kojem je gornja ploha slobodna površina mora, a donja koordinatna ploha je morsko dno. ROMS model je do danas korišten u nizu znanstvenih aplikacija u mnogim oceanskim i morskim bazenima [41]-[48], a postoji i nekoliko primjena modela za Jadran [49]. Nelinearni numerički algoritmi koje koristi ROMS detaljno su opisani u radovima Shchepetkina i McWilliamsa [50] i [51]. ROMS model koristi niz preciznih i efikasnih fizikalnih i numeričkih algoritama i ima mogućnost združivanja s modelima za simuliranje biogeokemijskih i optičkih svojstava, te s modelima koji opisuju dinamiku morskih sedimenata. Zbog povećanja efikasnosti rješavanja primitivne jednadžbe gibanja koristi se tehnika razdvajanja barotropnih (brzih) i baroklinih (sporih) modova. U svakom vremenskom koraku baroklinog moda rješava se određeni broj barotropnih vremenskih koraka u kojima se računaju denivelacije i vertikalno osrednjene brzine. Da bi se izbjegle numeričke greške povezane s činjenicom da se frekvencije koje se mogu razlučiti u barotropnom koraku ne mogu razlučiti u baroklinom, računaju se vremenski srednjaci svih barotropnih polja prije nego se ona uključe u proračune sporog baroklinog moda. Pri računanju osrednjenih barotropnih polja koristi se kosinusni vremenski filter centriran na novi vremenski korak [51]. Nadalje, korištene odvojene vremenske petlje imaju svojstvo očuvanja volumena i konzistentnosti potrebne u jednadžbama topline i soli [51]. Sve dvodimenzionalne i trodimenzionalne jednadžbe modela diskretizirane su u vremenu robusnom i vrlo stabilnom kombinacijom centralne i Adams-Moltonove sheme trećeg reda točnosti. Visoka stabilnost korištene vremenske sheme omogućava korištenje dužih vremenskih koraka, za gotovo četiri puta u odnosu na klasične sheme, čime se višestruko opravdava korištenje računski zahtjevnijeg algoritma u vremenskoj diskretizaciji. U vertikalnom smjeru primitivne jednadžbe su diskretizirane korištenjem s koordinate koja prati batimetriju [50] i [51]. Vertikalna s koordinata omogućava povećanja rezolucije u područjima od posebnog interesa, kao što je na primjer područje termokline, pridneni sloj i sl. Numerički modeli s vertikalnim koordinatama koje prate

batimetriju imaju veliku mogućnost pojavljivanja grešaka u proračunima gradijenta tlaka. Ove greške se javljaju zbog razdvajanja gradijenta tlaka na član koji prati s koordinatu i član s hidrostatskom korekcijom [52]. Numerički algoritam koji se koristi u ROMS modelu da bi se reducirala ova vrsta numeričke pogreške detaljno je opisan u radu [50].

U horizontalnom smjeru jednadžbe modela rješavaju se korištenjem ortogonalnih krivolinijskih koordinata na razmaknutoj C-mreži prema Arakawi. Krivolinijski koordinatni sustav definiran je tako da omogućava korištenje i Kartezijevih i sfernih koordinata. Obalna linija može se precizno definirati korištenjem maske 'kopno-more' u diskretiziranoj mreži. Kao i u vertikalnom smjeru, i u horizontalnom se koristi centralna shema drugog reda točnosti, premda postoji mogućnost relativno jednostavnog uvođenja shema višeg reda. Kod modela je napisan tako da advekcijaska shema može biti centralna shema drugog ili četvrtog reda, ali i 'upstream' shema trećeg reda. U slučajevima u kojima je zbog ekoloških, bioloških i kemijskih aplikacija važno zadržati pozitivnu definiranost skalarnih polja koristi se iterativna advekcijaska shema višeg reda MPDATA.

U ROMS modelu koristi se nekoliko parametrizacija procesa na skalama manjim od prostornog koraka mreže. Horizontalno miješanje impulsa i skalarnih veličina može se odvijati duž s razina, geopotencijalnih ploha ili duž ploha konstantne gustoće. Operatori koji definiraju miješanje mogu biti harmonijski ili biharmonijski i detaljno su opisani u [52].

Parametrizacija vertikalnog miješanja u ROMS modelu može biti zadana lokalnom ili nelokalnom shemom zatvaranja. Lokalne sheme zatvaranja temelje se na 'level 2.5' jednadžbama za turbulentnu kinetičku energiju Mellora i Yamade [53] i na GLS (Generic Length Scale) parametrizaciji [54]. Nelokalne sheme zatvaranja temelje se na formulaciji graničnih slojeva korištenjem K-profila prema [55]. Sheme s K-profilom koriste se za formuliranje i površinskih i pridnenih graničnih slojeva u moru. Model zatvaranja GLS sastoji se od dvije jednadžbe i omogućuje korištenje niza različitih shema: k-kl [53], k-e i k-w. Radi povećanja fleksibilnosti modela dodano je još nekoliko funkcija stabilnosti [56]-[58]. U radu [47] testirane su nabrojene sheme u idealiziranim eksperimentima širenja morskog sedimenta. U primjeni ROMS modela u ovom projektu korištena je GLS shema turbulentnog zatvaranja, koja je testirana u prethodnoj fazi projekta (JP-07/09) i dala je dobre rezultate na numeričkoj domeni Jadrana.

Interakcija na granici mora i atmosfere parametrizirana je prema [59]. Korišteni algoritam COARE (Coupled Ocean-Atmosphere Response Experiment) omogućava proračun protoka impulsa, topline i vlage na temelju rezultata atmosferskog i oceanografskog modela.

4.4.4 IMPAS

U okviru Projekta poduzet je razvoj potpuno novog korisničkog programa akronimskog naziva IMPAS (Integrated modeling of processes in the Adriatic Sea, autor: dr. sc. Mladen Tudor). Program se temelji na podacima hidrodinamičkih modela POM (Princeton Ocean Model) ili ROMS (Regional Ocean Modeling System) čiji rezultati se prevode na z-koordinatni sustav. Ulazni podaci su indeksi 3D mreže (i, j, k), komponente brzine struja (u, v, w), koeficijenti horizontalnog i vertikalnog miješanja (D_h, D_v) te temperatura i salinitet. Napravljeni su algoritmi za prevođenje podataka hidrodinamičkog modela u mrežu za IMPAS. Strujno polje se u IMPAS softveru može razmatrati kao stacionarno i nestacionarno. U grafičkom prikazu nestacionarnih struja vektori struje su animirani tako da se prostorne promjene smjera i brzine struje mogu promatrati u realnom vremenu. Vremenska interpolacija struja u svakoj točki mreže se može izvesti linearnim ili kubnim splineom.

Lagrangeovom metodom se može, pomoću konzervativnih čestica u posebnom modulu, odrediti vrijeme zadržavanja vode za cijelu domenu ili samo za jedan odabrani dio. Za izbor numeričke difuzije čestica napravljeno je nekoliko numeričkih shema: „naive“ (Euler1), Euler2, Visser, Milstein, Heun, a generator slučajnog koraka može biti po jednolikoj ili Gaussovoj razdiobi. Početni položaji čestica može se postaviti u središtu ili nasumično u elementu mreže.

Prema zadanim geografskim koordinatama u modulu za zračenje sunca izračunava se globalno zračenje unutar 24 sata tijekom cijelog razdoblja simulacije. Stanje naoblake unosi se prostornim i vremenskim podacima za konkretno područje simulacije.

Osnovno načelo modela kvalitete vode je održanje mase tvari. Vodeni sustav se može podijeliti u volumne elemente (box) koji postaju računске ćelije. Za volumni element postoji održanje mase svake varijable s kojom se opisuje stanje vode. Brzine promjena stanja (dc/dt) u elementu vode su izazvane fizikalnim, (bio)kemijskim i biološkim procesima. Model kvalitete vodenog stupca (WaterQualityMod) sastoji se od sedam varijabli (Tablica 4.4.4.1), a moneta modela je dušik.

Tablica 4.4.4.1. Varijable za opis kvalitete morske vode WaterQualityMod

Varijabla	Oznaka	Jedinica
Fitoplankton	$c(Phy)$	mmol N m ⁻³
Zooplankton	$c(Zoo)$	mmol N m ⁻³
Nitrat	$c(NO3)$	mmol N m ⁻³
Amonijak	$c(NH4)$	mmol N m ⁻³
Fosfat	$c(PO4)$	mmol P m ⁻³
Detritus	$c(Det)$	mmol N m ⁻³
Kisik	$c(O2)$	mmol O ₂ m ⁻³

U WaterQualityMod se pretpostavlja da fitoplankton u vodenom stupcu konzumira amonijak, nitrate i fosfate. Uginule alge i zooplankton tvore komponentu detritusa. Mineralizacija detritusa proizvodi anorganske hranjive tvari. Oksidacija odnosno mineralizacijom detritusa u vodenom stupcu troši kisik. U model je pridodan zooplankton kao potrošač fitoplanktona.

WaterQualityMod je napravljen kao objekt (Delphijska klasa) koja se implementira u 3D mrežu softvera IMPAS. Promjene koncentracija izazvane biokemijskim i biološkim procesima su opisane odgovarajućim jednadžbama.

Brzina promjene koncentracije fitoplanktona opisan je jednadžbom:

$$\frac{dc(Phy)}{dt} = R_{growth}^{Phy} - R_{resp}^{Phy} - R_{settling}^{Phy} - R_{grazing}^{Zoo} \quad (49)$$

Članovi s desne strane jednadžbe (49) su redom brzine rasta fitoplanktona (50), respiracije (51), umiranja (52), tonjenja (53) i potrošnja hranjenjem zooplanktona (54):

$$R_{growth}^{Phy} = k_{growth}^{Phy}(T) \cdot f_{light}^{Phy} \cdot \min(f_N^{Phy}, f_{PO4}^{Phy}) \cdot f_{O2}^{Phy} \cdot c(Phy) \quad (50)$$

$$R_{resp}^{Phy} = k_{maxresp}^{Phy} \cdot B^{Phy}(T) \cdot c(Phy) \quad (51)$$

$$R_{death}^{Phy} = k_{death}^{Phy} \cdot \Theta_{death}^{(T-20)} \cdot c(Phy) \quad (52)$$

$$R_{settling}^{Phy} = \frac{w_s^{Phy}}{h} c(Phy) \quad (53)$$

$$R_{grazing}^{Zoo} = k_{grazing}^{Zoo}(T) \cdot \frac{c(Phy)}{K_{grazing}^{SPhy} + c(Phy)} \cdot c(Zoo) \quad (54)$$

Brzina promjena koncentracija dušika zooplanktona je rezultat brzine hranjenja zooplanktona fitoplanktonom (54), izlučivanja metabolita (56) i fecesa (57) te umiranja zooplanktona (58):

$$\frac{dc(Zoo)}{dt} = R_{grazing}^{Zoo} - R_{excretion}^{Zoo} - R_{feces}^{Zoo} - R_{death}^{Zoo} \quad (55)$$

$$R_{excretion}^{Zoo} = f_{excr}^{Zoo} \cdot R_{grazing}^{Zoo} \quad (56)$$

$$R_{feces}^{Zoo} = f_{feces}^{Zoo} \cdot R_{grazing}^{Zoo} \quad (57)$$

$$R_{death}^{Zoo} = k_{death}^{Zoo} \Theta_{death}^{(T-20)} \cdot c(Zoo) \quad (58)$$

Koncentracija amonijaka se mijenja (59) ugradnjom u fitoplankton (60), nitrifikacijom (61), mineralizacijom detritusa (62) i izlučivanjem zooplanktona (56):

$$\frac{dc(NH_4)}{dt} = -R_{uptake}^{NH_4} - R_{nitrif}^{NH_4} + R_{miner}^{NH_4} + R_{excretion}^{NH_4} \quad (59)$$

$$R_{uptake}^{NH_4} = p^{NH_4} \cdot R_{growth}^{Phy} \quad (60)$$

$$R_{nitrif}^{NH_4} = k_{nitrif}^{NH_4}(T) \frac{c(O_2)}{K_{nitrif}^{SO_2} + c(O_2)} \cdot c(NH_4) \quad (61)$$

$$R_{miner}^{NH_4} = k_{miner}^{NH_4}(T) \cdot c(Det) \quad (62)$$

Promjene koncentracije nitrata (63) ovise o brzinama ugradnje nitrata u fitoplankton (64), nitrifikacije (61) i denitrifikaciji (65):

$$\frac{dc(NO_3)}{dt} = -R_{uptake}^{NO_3} + R_{nitrif}^{NO_3} - R_{denitrif}^{NO_3} \quad (63)$$

$$R_{uptake}^{NO_3} = (1 - p^{NH_4}) \cdot R_{growth}^{Phy} \quad (64)$$

$$R_{denitrif}^{NO_3} = k_{denitrif}^{NO_3}(T) \cdot \frac{c(NO_3)}{K_{denitrif}^{NO_3} + c(NO_3)} \cdot \frac{K_{denitrif}^{SO_2}}{K_{denitrif}^{SO_2} + c(O_2)} \cdot c(NO_3) \quad (65)$$

Brzinu promjene koncentracije fosfata (66) određuju brzina ugradnje u fitoplankton (67) i mineralizacija detritusa (68):

$$\frac{dc(PO_4)}{dt} = -R_{uptake}^{PO_4} + R_{miner}^{PO_4} \quad (66)$$

$$R_{uptake}^{PO_4} = r_{P/N} \cdot R_{growth}^{Phy} \quad (67)$$

$$R_{miner}^{PO_4} = r_{P/N} \cdot R_{miner}^{Det} \quad (68)$$

Promjene koncentracije detritusa (69) određena je brzinom stvaranja detritusa (70) iz uginulog fitoplanktona (52) i zooplanktona (58), mineralizacijom (62) te tonjenjem (71):

$$\frac{dc(Det)}{dt} = R_{death}^{Det} - R_{miner}^{Det} - R_{settling}^{Det} \quad (69)$$

$$R_{death}^{Det} = R_{death}^{Phy} + R_{death}^{Zoo} \quad (70)$$

$$R_{settlng}^{Det} = \frac{W_s^{Det}}{h} \cdot c(Det) \quad (71)$$

Brzina promjena koncentracija kisika u površinskom sloju mora (72) ovisi o brzini reaeracije (74), brzinama potrošnje kisika nitrifikacijom (75) i stvaranja fotosintezom odnosno trošenja respiracijom fitoplanktona (76). U slojevima mora ispod površinskog (73), ovisi samo o nitrifikaciji i fotosintezi/respiraciji:

$$\left. \frac{dc(O_2)}{dt} \right|_{surface} = R_{reair}^{O_2} - R_{nitrif}^{O_2} + R_{fot/resp}^{O_2} \quad (72)$$

$$\frac{dc(O_2)}{dt} = R_{fot/resp}^{O_2} - R_{nitrif}^{O_2} \quad (73)$$

$$R_{reair}^{O_2} = \frac{V_{O_2}}{h} [1.025 \cdot C_s(T, S) - c(O_2)] \quad (74)$$

$$R_{nitrif}^{O_2} = r_{O/N} \cdot R_{nitrif}^{NH_4} \quad (75)$$

$$R_{fot/resp}^{O_2} = r_{O/N} \cdot (R_{growth}^{Phy} - R_{resp}^{Phy}) \quad (76)$$

Koeficijent reaeracije ili prijenosa kisika između zraka i vode kisika V_{O_2} naziva se „piston velocity“, a ovisi o brzini vjetrova, temperaturi i salinitetu morske vode koji su povezani preko Schmidtovog broja (jednadžbe 77, 78 i 79).

$$V_{O_2} = \left(\frac{1}{3.6 \cdot 10^5} \right) \cdot 0.31 \cdot U_{10}^2 \left(\frac{Sc}{660} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (77)$$

$$Sc = Sc_o (1 + 3.14 \cdot 10^{-3} \cdot S) \quad (78)$$

$$Sc_o = 1800.6 - 120.1T + 3.7818T^2 - 0.047608T^3 \quad (79)$$

Rast fitoplanktona (50) ograničen je koncentracijama nutrijenata (NH_4 , NO_3 , PO_4) i svjetlom. To se opisuje članovima u jednadžbi (50) za inhibiciju rasta nutrijentima u jednadžbama (80), (81), (82), (83) i (84):

$$f_{NO_3}^{Phy} = \frac{c(NO_3)}{K_{NO_3}^{SPhy} + c(NO_3)} \quad (80)$$

$$f_{NH_4}^{Phy} = \frac{c(NH_4)}{K_{NH_4}^{SPhy} + c(NH_4)} \quad (81)$$

$$f_{O_2}^{Phy} = \frac{c(O_2)}{K_{O_2}^{SPhy} + c(O_2)} \quad (82)$$

$$f_{PO_4}^{Phy} = \frac{c(PO_4)}{K_{PO_4}^{SPhy} + c(PO_4)} \quad (83)$$

$$f_N^{Phy} = f_{NO3}^{Phy} + f_{NH4}^{Phy} \quad (84)$$

Inhibicija fitoplanktona svjetlom dana je slijedećim relacijama:

$$f_{light}^{Phy} = \frac{I_{PAR}}{I_{opt}} \exp \left(1 - \frac{I_{PAR}}{I_{opt}} \right) \quad (85)$$

$$I_{PAR}(x, y, z, t) = f_{PAR} I_o(x, y, t) \exp(-K_{depth}^{Phy} z) \quad (86)$$

$$I_{opt}(x, y, t) = \max(I_{opt}^{min}, f_{opt} \cdot I_o(x, y, t)) \quad (87)$$

$$K_{depth}^{Phy} = K_w + \alpha_{Kd} \cdot c(Phy) \quad (88)$$

Koeficijenti brzina promjena koncentracija varijabli koji ovise o temperaturi morske vode su dati jednadžbama (89) za rast fitoplanktona, (90) za hranjenje zooplanktona, (91) mineralizaciju i (92) za denitrifikaciju:

$$k_{growth}^{Phy}(T) = k_{maxgrowth}^{Phy} \cdot [B^{Phy}(T)]^{b_{Phy}} \quad (89)$$

$$k_{grazing}^{Zoo}(T) = k_{maxgrazing}^{Zoo} \cdot [B^{Zoo}(T)]^{b_{Zoo}} \quad (90)$$

$$k_{miner}^{NH4}(T) = k_{maxminer}^{NH4} [B^{miner}(T)]^{b_{miner}} \quad (91)$$

$$k_{denitrif}^{NO3}(T) = k_{maxdenitrif}^{NO3} [B^{denitrif}(T)]^{b_{denitrif}} \quad (92)$$

Oznaka $\hat{=}$ odnosi se na posebnu funkciju koja je određena s tri temperature za biokemijske ili fiziološki sustav. Svojstva i parametri $\hat{=}$ funkcije opisat će se kasnije. To su minimalna, maksimalna i optimalna temperatura u kojima živi sustavi funkcioniraju. Parametri $\hat{=}$ funkcije za fitoplankton su (93), hranjenje zooplanktona (94), nitrifikaciju (95), mineralizaciju (96) i denitrifikaciju (97):

$$B^{Phy}(T) = B(T; T_{min}^{Phy}, T_{opt}^{Phy}, T_{max}^{Phy}) \quad (93)$$

$$B^{Zoo}(T) = B(T; T_{min}^{Zoo}, T_{opt}^{Zoo}, T_{max}^{Zoo}) \quad (94)$$

$$B^{nitrif}(T) = B(T; T_{min}^{nitrif}, T_{opt}^{nitrif}, T_{max}^{nitrif}) \quad (95)$$

$$B^{miner}(T) = B(T; T_{min}^{miner}, T_{opt}^{miner}, T_{max}^{miner}) \quad (96)$$

$$B^{denitrif}(T) = B(T; T_{min}^{denitrif}, T_{opt}^{denitrif}, T_{max}^{denitrif}) \quad (97)$$

Funkcija $\hat{=}$ je posebnost u jednadžbama za WaterQualityMod programa IMPAS. Tradicionalno se u modelima koeficijenti procesa ovisnih o temperaturi uglavnom iskazuju jednadžbom:

$$k_T = k_{20} \Theta^{(T-20)} \quad (98)$$

gdje je k_T vrijednost koeficijenta pri temperaturi T , k_{20} vrijednost koeficijenta pri temperaturi 20°C . Vrijednost Θ proizlazi iz povećanja brzine reakcije za povećanje temperature od 10°C :

$$\Theta = e^{\frac{\ln Q_{10}}{10}} \quad (99)$$

gdje Q_{10} pokazuje koliko puta brzina reakcije poveća za porast temperature od 10°C . Formula je pogodna za kemijske reakcije. Međutim, za biokemijske odnosno biološke sustave (organizme) može imati ograničenja i pogreške pri dovođenju u vezu brzina biokemijskih procesa i temperature.

Funkcija brzine procesa biokemijskih sustava u ovisnosti temperature obično ima zvonoliki izgled. Biokemijski procesi djeluju između donja i gornja limitirajuće temperatura $[T_{min}, T_{max}]$, a između njih je optimalna temperatura za koju je proces najbrži. Stoga je uvedena funkcija koje se temelje samo na tri fiziološke ili biokemijske temperature. Funkcija je zvonolikog oblika slična Beta funkciji slučajne razdiobe pa je kolokvijalno nazvana „Beta“ (β). Parametri funkcij su vrijednosti minimalne (T_{min}) i maksimalne (T_{max}) te optimalne (T_{opt}) temperature. „Beta“ funkcija ima vrijednosti $\beta \in [0,1]$. Oblik „Beta“ funkciji se dodatno može podešavati njenim potenciranjem

$$B_b(T) = [B(T)]^b \quad (100)$$

gdje se potencija $b > 0$ naziva se parametar oblika. Vrijednost parametra oblika se može izvesti indukcijom te analogijom s parametrom Q_{10} kod čisto kemijskih reakcija. Kada je $b=1$ Beta funkcija pri nekoj temperaturi označenoj kao $T_{0.5}$ ima vrijednost $1/2$ ili $1/(Q=2)$. Ako se pri istoj temperaturi ($T_{0.5}$) Beta funkcija promjeni na vrijednost $\beta = 1/Q$ ($Q > 0$) to se može napraviti jedino ako je $b = 1$. U tom slučaju je potencija b ili parametar oblika

$$b = \frac{\ln Q}{\ln 2} \quad (101)$$

a vrijednost Q ima značenje koliko puta se poveća ili smanji funkcija Beta za razliku temperature $T_{opt} - T_{0.5}$.

U nizu tablica (Tablice 4.4.4.2 – 4.4.4.6) prikazani su simboli svih parametara primijenjenih u jednadžbama za kvalitetu vode, njihove jedinice i opis svakog od parametara.

Tablica 4.4.4.2. Parametri jednadžbi u *WaterQualityMod* za fitoplankton

Parametar	Jedinica	Opis
$k_{maxgrowth}^{Phy}$	dan ⁻¹	Maksimalni koeficijent brzine pri optimalnoj temperaturi rasta
$B^{Phy}(T)$	bezdin.	„Beta“ funkcija temperature za parametre fitoplanktona T_{min} , T_{opt} , T_{max}
$f_{NO_3}^{Phy}$	bezdin.	Ograničenje rasta fitoplanktona nitratom
$f_{NH_4}^{Phy}$	bezdin.	Ograničenja rasta fitoplanktona amonijakom
f_N^{Phy}	bezdin.	Ograničenja rasta fitoplanktona dušikom
$f_{PO_4}^{Phy}$	bezdin.	Ograničenja rasta fitoplanktona fosfatom
$f_{O_2}^{Phy}$	bezdin.	Ograničenja rasta fitoplanktona kisikom
f_{light}^{Phy}	bezdin.	Ograničenja rasta fitoplanktona svjetlom
$K_{NO_3}^{SPHy}$	mmol N m ⁻³	Konstanta poluzasićenja fitoplanktona nitratom
$K_{NH_4}^{SPHy}$	mmol N m ⁻³	Konstanta poluzasićenja fitoplanktona amonijakom
$K_{O_2}^{SPHy}$	mmol O ₂ m ⁻³	Konstanta poluzasićenja fitoplanktona kisikom
$K_{PO_4}^{SPHy}$	mmol P m ⁻³	Konstanta poluzasićenja fitoplanktona fosfatom
$k_{maxresp}^{Phy}$	dan ⁻¹	Koeficijent maksimalne brzine respiracije pri optimalnoj temperaturi za fitoplankton
k_{death}^{Phy}	dan ⁻¹	Koeficijent brzine mortaliteta pri 20 °C
w_s^{Phy}	m dan ⁻¹	Brzina tonjenja
h	m	Visina stupca mora u kojem se događa tonjenje
I_0	W m ⁻²	Zračenje sunca na morskoj površini
I_{opt}	W m ⁻²	Optimalno svjetlo za fotosintezu
I_{opt}^{min}	W m ⁻²	Minimum za optimum svjetla
I_{PAR}	W m ⁻²	Fotosintetski aktivno zračenje (PAR)
K_{depth}^{Phy}	m ⁻¹	Koeficijent smanjenja svjetla po dubini mora ovisan o koncentraciji fitoplanktona
K_w	m ⁻¹	Koeficijent smanjenja svjetla za morsku vodu
$I \rightarrow K_d$	m ⁻¹ (mmol N m ⁻³) ⁻¹	Koeficijent smanjenja svjetla po jedinici koncentracije dušika fitoplanktona
f_{PAR}	bezdin.	PAR udio zračenja Sunca na površini mora (I_0)
f_{opt}	bezdin.	Optimalni udio upadnog zračenja

Tablica 4.4.4.3. Parametri jednadžbi u *WaterQualityMod* za zooplankton

Parametar	Jedinica	Opis
$k_{grazing}^{Zoo}(T)$	dan ⁻¹	Koeficijent brzine grazinga ovisan o temperaturi
$k_{maxgrazing}^{Zoo}$	dan ⁻¹	Koeficijent maksimalne brzine grazinga pri optimalnoj temperaturi
$B^{Zoo}(T)$	bezdin.	„Beta“ funkcija temperature za parametre zooplanktona T_{min} , T_{opt} , T_{max}
$K_{grazing}^{SPhy}$	mmol N m ⁻³	Konstanta poluzasićenja grazinga fitoplanktona
f_{excr}^{Zoo}	bezdin.	Udio hrane izlučen metabolizmom
f_{feces}^{Zoo}	bezdin.	Udio hrane izlučen fecesom
k_{death}^{Zoo}	dan ⁻¹	Koeficijent brzine mortaliteta pri 20 °C

Tablica 4.4.4.4. Parametri jednadžbi u *WaterQualityMod* za amonijak, nitrat i fosfat

Parametar	Jedinica	Opis
p^{NH4}	bezdin.	Preferencija fitoplanktona za amonijak
α	(mmol N m ⁻³) ⁻¹	Koeficijent inhibicije ugradnje nitrata
$k_{maxnitrif}^{NH4}$	dan ⁻¹	Koeficijent brzine nitrifikacije pri optimalnoj temperaturi
K_{nitrif}^{SO2}	mmol O ₂ m ⁻³	Konstanta poluzasićenja nitrifikacije
$k_{maxminer}^{NH4}$	dan ⁻¹	Koeficijent brzine mineralizacije pri optimalnoj temperaturi mineralizacije
$B^{nitrif}(T)$		„Beta“ funkcija temperature za parametre nitrifikacije T_{min} , T_{opt} , T_{max}
$K_{denitrif}^{SN02}$	mmol N m ⁻³	Konstanta poluzasićenja denitrifikacije nitratom
$K_{denitrif}^{SO2}$	mmol O ₂ m ⁻³	Konstanta poluzasićenja denitrifikacije kisikom
$B^{denitrif}(T)$		„Beta“ funkcija temperature za parametre denitrifikacije T_{min} , T_{opt} , T_{max}
$r_{P/N}$	bezdin.	Omjer fosfora i dušika (0,0625)

Tablica 4.4.4.5. Parametri jednadžbi u *WaterQualityMod* za detritus i kisik

Parametar	Jedinica	Opis
w_s^{Det}	m dan ⁻¹	Brzina tonjenja detritusa
h	m	Visina stupa mora u kojem se događa tonjenje
V	m s ⁻¹	"Piston velocity" kisika
h	m	Debljina sloja mora u dodiru sa zrakom
U_{10}	m s ⁻¹	Brzina vjetrova na visini 10 m
$C_s(T, S)$	mmol O ₂ m ⁻³	Koncentracija zasićenja kisika (funkcija temperature i saliniteta)
Sc	bezdin.	Schmidov broj
T	°C	Temperatura morske vode
S	psu	Salinitet
$r_{O/N}$	bezdin.	Molarni omjer kisika i dušika (9.33)

Tablica 4.4.4.6. Parametri funkcije temperature fitoplankton, zooplankton, mineralizaciju i denitrifikaciju.

Parametar	Jedinica	Opis
T_{min}^{Phy}	°C	Donja granična temperatura za fitoplankton
T_{opt}^{Phy}	°C	Optimalna temperatura za fitoplankton
T_{max}^{Phy}	°C	Gornja granična temperatura za fitoplankton
b_{phy}	bezdin.	Parametar oblika „Beta“ funkcije za rast fitoplanktona
Θ_{death}	bezdin.	Parametar povećanja mortaliteta za porast temperature od 10 °C
T_{min}^{Zoo}	°C	Donja granična temperatura za zooplankton
T_{opt}^{Zoo}	°C	Optimalna temperatura za zooplankton
T_{max}^{Zoo}	°C	Gornja granična temperatura za zooplankton
b_{zoo}	bezdin.	Parametar oblika „Beta“ funkcije za rast zooplanktona
Θ_{death}	bezdin.	Parametar povećanja mortaliteta za porast temperature od 10 °C
T_{min}^{miner}	°C	Donja granična temperatura za mineralizaciju
T_{opt}^{miner}	°C	Optimalna temperatura za mineralizaciju
T_{max}^{miner}	°C	Gornja granična temperatura za mineralizaciju
b_{miner}	bezdin.	Parametar oblika „Beta“ funkcije za mineralizaciju
$T_{min}^{denitrif}$	°C	Donja granična temperatura za denitrifikaciju
$T_{opt}^{denitrif}$	°C	Optimalna temperatura za denitrifikaciju
$T_{max}^{denitrif}$	°C	Gornja granična temperatura za denitrifikaciju
$b_{denitrif}$	bezdin.	Parametar oblika „Beta“ funkcije za denitrifikaciju