





































## 1 UVOD

### 1.1 Opis problema

Ladje za zagotovitev stabilnosti in ustreznih razmer za varno plovbo nujno potrebujejo dodatno obtežitev, kadar niso polno naložene s tovorom. Danes se v ta namen uporablja balastna voda, tj. voda iz okolice ladje s snovmi v suspenziji, ki jo ladja prek črpalk načrpa v balastne tanke za uravnavanje vzdolžnega naklona, prečnega nagiba, ugreza, stabilnosti ali napetosti ladje. Večja kot je ladja, večje količine tovora lahko transportira in posledično potrebuje balastne tanke z večjo kapaciteto, ki služijo kot protiutež, kadar ladja ni polno ali ustrezno obtežena s tovorom. Na ta način se na leto prenese približno 3,1 milijona ton balastnih vod po vsem svetu (ocena za leto 2013, David, 2015).

V okolju najdemo avtohtone vrste organizmov, vrste neznanega<sup>1</sup> izvora ter tujerodne vrste, ki so bile vnesene v neko vodno okolje. Največjo skrb je treba posvetiti invazivnim vrstam, ker ogrožajo raznolikost in številčnost avtohtonih vrst, negativno vplivajo na ekološko stabilnost in z ekonomskega vidika negativno vplivajo na ribiško, komercialno in rekreacijsko dejavnost. Posredno preko morske hrane ali tudi neposredno lahko povzročijo škodo človeškemu zdravju. Balastna voda vsebuje usedline, organizme in povzročitelje bolezni iz okolice, ki se s plovo prek balastne vode prenašajo iz ene geografske lokacije na drugo, predvsem iz enega pristanišča v drugega. Ladje so tako eden glavnih prenašalcev vodnih organizmov in povzročiteljev bolezni, zato je treba vsako ladjo obravnavati kot potencialno prenašalko vodnih organizmov (Gollasch et al., 2015c).

Ob zavedanju te problematike je Mednarodna pomorska organizacija (IMO) sklenila Mednarodno konvencijo za nadzor in ravnanje z ladijsko balastno vodo in usedlinami (v nadaljevanju Konvencija), ki predstavlja ključni mednarodni pravni akt za nadzor in ravnanje z ladijsko balastno vodo in usedlinami na državni in mednarodni ravni. Namen Konvencije je zagotoviti potrebne ukrepe za zaščito se vodnega okolja<sup>2</sup> pred negativnimi posledicami škodljivih vodnih organizmov in povzročiteljev bolezni, ki se prenašajo z balastno vodo, ter s tem prispevati k ohranjanju avtohtone biološke raznovrstnosti. Za odkrivanje učinkovitih metod v boju proti prenosu škodljivih vodnih organizmov in povzročiteljev bolezni ter nadzorom izvajanja ukrepov se izvajajo številne študije, ki jih sofinancirane države, različne

---

<sup>1</sup> vrste, ki se jim ni mogoče točno določiti izvora, tj., ni zanesljivo, ali so tujerodne ali avtohtone (angl. »cryptogenic species«, Carlton 1996)

<sup>2</sup> vodna okolja, kamor plujejo ladje in prenašajo organizme, tj., oceani, morja, reke in jezera

organizacije in industrija. Prizadevajo si oblikovati ustrezne smernice za izvajanje nadzora skladnosti s standardi Konvencije. Konvencija vsebuje dva pomembna standarda – D-1 (standard izmenjave balastne vode) in D-2 (standard kakovosti balastne vode). Standard D-1 temelji na popolni (najmanj 95 %) zamenjavi balastne vode ladje, pridobljene v pristaniščih, z vodo iz odprtega morja (odprto morje je tukaj definirano kot območje najmanj 50 navtičnih milj od obale z globino najmanj 200 m. Ko bo konvencija stopila v veljavo (12 mesecev po tem, ko jo bo ratificiralo 30 držav, katerih skupno trgovsko ladjevje zajema vsaj 35 % svetovne trgovske ladijske bruto tonaže) bo začel veljati standard D-2, tj. standard kakovosti izpusta balastne vode, ki narekuje, da smejo ladje izpustiti le dovoljeno število za preživetje sposobnih organizmov na določen volumen izpuščene balastne vode (preglednica 1). Konvencija še po dvanajstih letih ni stopila v veljavo, je pa zelo blizu izpolnitve zahtev. Po zadnjem pregledu 7. julija 2016 je konvencijo ratificiralo 51 držav s skupno trgovsko ladijsko bruto tonažo 34,87 % (IMO, Status of Conventions<sup>3</sup>).

Z namenom doseči omejitve standarda se razvijajo različne metode ravnanja z ladijsko balastno vodo, ki vključujejo posamezne ali kombinirane mehanske, fizikalne, kemijske in biološke procese za odstranjevanje, odpravljanje škodljivosti ali preprečevanje črpanja ali izpusta škodljivih vodnih organizmov in povzročiteljev bolezni v balastni vodi in usedlinah. Kot ovira pri ratifikaciji konvencije v nekaterih državah pa se kaže pomanjkanje zanesljivih metod vzorčenja in analiz balastnih vod za izvajanje nadzora konvencije (Gollasch and David, 2010b; David, 2013; Gollasch and David, 2015; Gollasch et al. 2015a; Golja 2016).

Pogodbence se zavezujejo, da bodo izvajale nadzor nad prenosom škodljivih vodnih organizmov in povzročiteljev bolezni z ladijsko balastno vodo in usedlinami. Nadzor skladnosti je proces, ki služi kot podpora zahtevam pristaniških oblasti. Osredotoča se na primerno in učinkovito izvajanje potrebnih ukrepov ravnanja z balastno vodo (David, 2007). V 9. členu te Konvencije je za ugotavljanje skladnosti balastne vode s Konvencijo predpisan inšpekcijski nadzor ladij, ki naj bi ga opravljala od pogodbenice pooblaščen oseba. Pomorski inšpektor po zahtevah Konvencije pregleda ladijsko spričevalo,<sup>4</sup> skladnost spričevala z napravami za ravnanje z balastno vodo, opravi pogovor z odgovornimi na ladji za ravnanje z balastno vodo, pregleda knjigo o balastni vodi oziroma vzorči in analizira ladijsko balastno vodo po smernicah G2 (IMO, 2008a), da bi ugotovil skladnost s Konvencijo. Pred podrobnim testiranjem ladje pri nadzoru skladnosti je moč izvesti indikativno analizo vzorcev, s katero ugotovimo potencialno skladnost ali neskladnost s Konvencijo. Takšno

---

<sup>3</sup> <http://www.imo.org/en/About/Conventions/StatusOfConventions/Pages/Default.aspx>

<sup>4</sup> mednarodno spričevalo o ravnanju z balastno vodo

testiranje je zelo pomembno za hitro prepoznavanje potencialne neskladnosti, zato je treba v ta namen uporabljati indikativne inštrumente/metode, ki omogočajo hitro oceno stanja in so dovolj zanesljivi, prenosljivi ter enostavni za uporabo (Gollasch et al. 2015a).

Leta 2008 so bile sprejete smernice za vzorčenje balastne vode G2 (IMO, 2008a), katerih namen je bil zagotoviti ustrezne postopke za vzorčenje in analizo balastne vode z namenom ugotavljanja skladnosti s Konvencijo. Smernice so dokaj pomanjkljive,<sup>5</sup> zato se študije vzorčenja in analiz še vedno izvajajo z različnimi raziskavami, da bi odpravili vse nastale nejasnosti za izvajanje vzorčenja. Če izsledki vzorčenja pokažejo, da balastna voda ni skladna z zahtevo standarda D-2 zaradi prevelike vsebnosti organizmov, mora pogodbenica ladji prepovedati izpust balastne vode, dokler grožnja ni odstranjena (IMO, 2004). Posledica ugotovljene neskladnosti je, da pogodbenica ladji prepove izpust neskladne balastne vode, s čimer pa lahko povzroči ekonomske posledice za mednarodno trgovino, če ta ladja ne more nadaljevati s predvidenimi tovornimi operacijami.

Zaradi strogih ukrepov ob ugotovitvi neskladnosti ladje s Konvencijo je pomembno zagotoviti ustreznost in zanesljivost metod vzorčenja in analiz, saj bi bilo nedopustno, da se pojavljajo napake oz. oškodovanje ladij, gospodarska škoda ter ne nazadnje vplivi na okolje in zdravje ljudi zaradi nepravilnih ali neprimernih metod vzorčenja in analiz. Študije kažejo, da je še vedno nemogoče popolnoma zajeti vse organizme, prisotne v balastnih tankih, kar pomeni, da so lahko rezultati vzorčenja balastne vode zavajajoči (Gollasch in David, 2010a). Nepravilna uporaba inštrumentov vzorčenja in analiz lahko vodi v neprimerne rezultate (Gollasch in David, 2015), saj so z raziskavami odkrili, da različne metode in načini vzorčenja in analiz podajo različne rezultate (Gollasch in David, 2013). Zato so potrebne še dodatne študije in analize za ugotovitev najustreznejše metode, da bo vzorčenje zanesljivo in skladno na globalni ravni. Dodatne študije so potrebne tudi zaradi težav pri doseganju reprezentativnosti vzorca celotnega izpusta, ki je v tem primeru ključnega pomena (Gollasch in David, 2013), saj ocenjujemo ladjo kot celoto, odvzeti vzorci pa ne morejo biti večji od nekaj litrov. Napačna izbira metode vpliva na rezultat, s katerim nadzorujemo skladnost s Konvencijo. Torej lahko to privede do podcenjenih koncentracij organizmov, kar lahko povzroči, da neučinkovit sistem ravnanja z balastno vodo ladje označimo za skladen, ali nasprotno, koncentracije organizmov precenimo in učinkovit sistem ravnanja z balastno vodo prepoznamo za neskladnega.

---

<sup>5</sup> Ne definirajo natančno postopkov vzorčenja in analiz, zato ostaja veliko možnosti za uporabo različnih metod in s tem odpirajo možnosti različnih rezultatov

Različni pristopi k vzorčenju za izvajanje nadzora po svetu lahko vodijo v neustrezne ocene skladnosti s standardom D-2 med pristanišči, saj bi lahko v takem primeru ladja prestala nadzor skladnosti v enem pristanišču, medtem kot bi v drugem, z drugačnimi uporabljenimi metodami, lahko pri isti ladji ugotovili neskladnost. Metode in inštrumenti so še v fazi razvoja in v fazi testiranja so indikativne analize metode, ki bi na ladji najhitreje podale natančno in predvsem zanesljivo oceno skladnosti oz. neskladnosti njene balastne vode. Vzorce in analize potekajo za potrebe pridobitve novih znanj, podatkov, analiznih metod in njihovega preverjanja ter reševanja nejasnosti. Z rednim vzorčenjem, opazovanjem, preizkušanjem in analiziranjem metod in inštrumentov bi v bodoče izboljšali učinkovitost in zagotovili verodostojnost nadzora z vzorčenjem balastnih vod.

## 1.2 Dosedanje delo

Vzorčenje balastne vode se bistveno razlikuje od vzorčenja vode v drugih okoliščinah oz. za drugačne potrebe. Inštrumenti za vzorčenje prvotno niso bili zasnovani za namene nadzora skladnosti s standardi, določenimi v Konvenciji za nadzor in ravnanje z ladijsko balastno vodo in usedlinami. Strokovnjaki imajo tako zahtevno in pomembno nalogo pri razvoju metod vzorčenja, ki bodo podale točne in zanesljive rezultate. Reprezentativni vzorci morajo biti pridobljeni v skladu z zahtevami standardov Konvencije.

Delovna skupina<sup>6</sup> IMO je za potrebe dokazovanja skladnosti s Konvencijo razvila smernice G2 (IMO, 2008a) za vzorčenje balastne vode. Smernice so omejene na splošne informacije, manjkajo pa jim tehnične podrobnosti, ki se nanašajo na nadzor skladnosti s standardi D-1 in D-2, sprejetimi v Konvenciji za nadzor in upravljanje z ladijsko balastno vodo in usedlinami.

Kasneje so bili spisani še naslednji dokumenti:

- Opomnik (IMO, 2009a) z naslovom Začetni razvoj okrožnice Mednarodne pomorske organizacije (IMO okrožnica) za zagotovitev protokolov analiz vzorčenja in svetovanje pri enotni uporabi protokolov. Opomnik je bil razvit na BLG 13 (Pododbor IMO za tekočine in pline v razsutem<sup>7</sup> stanju) in je omejen na tipe analiz vzorcev vključno s priporočili indikativne in podrobne obdelave vzorcev.

---

<sup>6</sup> Ballast Water Working Group (BWWG)

<sup>7</sup> niso embalirani/pakirani, ampak se natovarjajo na ladje preko cevni vodov in prevažajo v ladijskih tankih

- 
- Dokumenti (IMO, 2010a, b, c, d) za okrožnico Vzorčenje balastne vode (BWS circular). Cilj dokumentov je zagotoviti potrebne smernice pri vzorčenju in analiziranju vzorcev, vključno z reprezentativnostjo vzorca, ter protokole analiziranja vzorcev.
  - Poročilo delovne skupine za raziskavo balastne vode in delovne skupine obraščanja organizmov (Biofouling working group), BLG 17 (2013), ki vsebuje osnutek okrožnice Vzorčenje balastne vode, pripravljen za obravnavo na MEPC 65 (IMO Marine Environment Protection Committee); sestavljen je iz dveh delov – razprava o principih vzorčenja ter osnovne informacije o metodologiji in pristopih vzorčenja in analiz. V dokumentu je navedeno, da se metode za reprezentativno vzorčenje še razvijajo.

Balastno vodo lahko vzorčimo za znanstvene namene, za testiranje in certificiranje sistemov za ravnanje z balastno vodo ter za izvajanje nadzora skladnosti s Konvencijo. Študije vzorčenja in analiz se izvajajo v sklopu različnih nacionalnih in mednarodnih raziskav, kot tudi neposredno za državne institucije ali neposredno za industrijo. V teh študijah so izpostavljeni različni vidiki vzorčenja balastne vode – biološki, navtični, tehnični in logistični (Gollasch in David, 2015). Zaradi nejasnosti pri pridobitvi verodostojnega reprezentativnega vzorca celotnega izpusta, pri katerem imajo pomembno vlogo način odvzema vzorca, volumen vzorca, število vzorcev, čas trajanja vzorčenja in dostopne točke vzorčenja, se študije še vedno izvajajo in se bodo izvajale, dokler ne bodo ugotovljene primerne metode vzorčenja, ki bi zagotavliale pogoje in potrebe preverjanja skladnosti vzorca z zahtevami Konvencije.

V različnih pregledanih raziskavah in poročilih (ICES, 2010; David, 2013; David et al., 2007; Frazier et al., 2013; Gollasch in David, 2010a, b; 2012; 2013, Gollasch et al., 2015) so navedeni rezultati študij vzorčenja in analiz, ugotovitve in predlagana priporočila ter izboljšave za vzorčenje in analizo balastne vode. Namen teh študij je testiranje metod za ugotavljanje primerne metode za uveljavitev Mednarodne konvencije za nadzor in upravljanje z ladijsko balastno vodo in usedlinami (IMO, 2004).

V seminarju (Golja, 2016) z naslovom »Nadzor ravnanja z balastno vodo – indikativne metode« smo predstavili balastno vodo in njeno funkcijo na ladjah, kje v različnih tankih na ladjah ta voda je, opisali smo problematiko prenosa organizmov z balastno vodo, Konvencijo za ravnanje z balastno vodo in usedlinami ter predstavili možne rešitve ravnanja z balastno vodo s sistemi za ravnanje z balastno vodo na ladjah. Seminar daje splošen pregled problematike prenosa organizmov z balastno vodo ter predstavlja uvod v metode indikativnega vzorčenja in analizo vzorcev po zahtevah Konvencije za potrebe nadzora skladnosti z določili Konvencije.

Indikativni inštrumenti prikažejo oceno stanja balastne vode (predvideno prisotnost za življenje sposobnih organizmov), na kateri temelji nadzor skladnosti z določili Konvencije. Nadzor skladnosti z vzorčenjem neposredno vpliva na izvajanje ladijskih operacij v pristanišču in lahko te tudi onemogoči v primeru ugotovljenih neskladnosti. Po drugi strani pa je ustrezen nadzor zelo pomemben za varovanje naravnega okolja, zdravja ljudi in gospodarstva, zato morajo biti inštrumenti in metode kar se da zanesljivi, da podajo pravo sliko stanja in omogočijo pravičen ter pravilen nadzor skladnosti z določili Konvencije.

Povzeli smo rezultate meritev treh študij metod vzorčenja za namen nadzora skladnosti balastne vode na ladjah z določili Konvencije (IMO, 2009a; Gollasch in David, 2010; Gollasch in David, 2013). Vzorčenje je bilo izvedeno na vzorčevalnih mestih v balastnih cevnih vodih (In-Line) za potrebe iskanja pravih metod in postopkov reprezentativnega vzorčenja balastne vode in analize vzorcev za nadzor skladnosti z določili Konvencije.

Zanimali so nas rezultati analiz za velikostni razred organizmov v najmanjšem premeru večji ali enaki od 10  $\mu$ m in manjši od 50  $\mu$ m. Študije so namreč pokazale (npr. Gollasch in David, 2010; Gollasch et al. 2015), da je to za sedaj edina skupina organizmov po standardu D-2, za katero sploh imamo instrumente za indikativne (hitre) meritve. Indikativno analizo vzorcev so v študijah najprej izvedli z inštrumentom Walz Water PAM ter nato vzorce še podrobno analizirali v laboratoriju z mikroskopom. Indikativni inštrument Walz Water PAM je naravnan za ugotavljanje prisotnosti živega fitoplanktona v vzorcu (v velikostnem razredu večji ali enaki od 10  $\mu$ m in manjši od 50  $\mu$ m je velika večina fitoplanktonskih organizmov, kar po standardu D-2 pomeni ena skupina organizmov po velikostnih razredih od treh). Ne šteje organizmov, ampak kot rezultat poda oceno količine biomase v vzorcu ter njeno vitalnost, kar nakazuje, da inštrument ni primeren za dokazovanje skladnosti/neskladnosti za vse skupine organizmov po velikostnih razredih, določenih v standardu D-2. Po standardu D-2 je za določitev neskladnosti dovolj, da dokažemo, da ena skupina organizmov presega zadano mejo števila organizmov v vzorcu. V primeru skladnosti te skupine ni možnosti za hitro dokazovanje (tudi indikativno) neskladnosti drugih dveh skupin organizmov (organizmov velikostnega razreda večji ali enaki od 50  $\mu$ m ter indikatorskih mikrobov in povzročiteljev bolezni), saj trenutno še ni na voljo ustreznih metod in inštrumentov za indikativno dokazovanje skladnosti/neskladnosti. Rezultate indikativne analize smo analizirali in primerjali z rezultati podrobne analize vzorcev, da bi ugotovili ustreznost meritev z izbranim inštrumentom za indikativno analizo, ter postavili temeljno hipotezo, da preizkušan indikativni inštrument lahko ustrezno oz. zadovoljivo oceni neskladnost ene velikostne skupine organizmov z zahtevami Konvencije.

### **1.3 Cilji naloge**

Za cilje smo si izbrali:

- temeljit pregled metod vzorčenja in analiz za nadzor skladnosti vzorcev z zahtevami Konvencije,
- ugotovitev ustreznosti oz. reprezentativnosti meritev z izbranim inštrumentom Walz Water PAM za indikativno analizo balastne vode,
- potrditev (ali ne) hipoteze o ustreznosti indikativnega inštrumenta za odločanje o neskladnosti z določbami Konvencije.

## 2 TEORETIČNE OSNOVE

### 2.1 Vzorčenje balastne vode za nadzor skladnosti

Mednarodna konvencija za nadzor in ravnanje z ladijsko balastno vodo (IMO, 2004) cilja na zmanjšanje tveganja prenosa škodljivih vodnih organizmov in povzročiteljev bolezni prek izpusta balastne vode. Zato standard D-2 določa kakovost balastne vode na iztoku glede na maksimalno število prisotnih preživetja sposobnih organizmov in indikatorskih mikrobov na volumen vzorca v izpustu balastne vode, ki jih ladje smejo dosežati.

Glavni cilj vseh analiz je določitev števila preživetja sposobnih osebkov v vzorcu. S to oceno lahko podamo zaključek o skladnosti ali neskladnosti z zahtevami standarda D-2. Za potrebe ocene skladnosti so potrebne ustrezne študije za ugotovitev, ali so razpoložljive metode sploh smotrne in učinkovite pri ugotavljanju skladnosti s standardom. Ker obstajajo različne metode in pristopi, morajo biti študije usmerjene v podajo slike razpoložljivosti, uporabnosti ter zanesljivosti metod.

V nadaljevanju so podana priporočila vzorčenja, pridobljena skozi različne študije, pri katerih so primerjali uporabnost in reprezentativnost različnih vzorčevalnih orodij in metod. Študije so bile izvedene tako, da so vsebnost pridobljenih vzorcev po različnih metodah analizirali s podrobno analizo (v laboratoriju), ki je podala zanesljivo stanje vsebnosti vzorcev, na podlagi katere so lahko skleпали o reprezentativnosti na različne načine odvzetih vzorcev (David, 2013; Gollasch in David, 2010b; 2015).

#### ***2.1.1 Vzorčenje za nadzor skladnosti s standardom D-1***

Zahteve konvencije za doseganje standarda D-1 so, da ladja izvrši izmenjavo balastne vode na odprtem morju, tj. najmanj 50 navtičnih milj (obstajajo izjeme) od obale na območju, kjer morje globoko vsaj 200 m (IMO, 2004). Po standardu je zahtevana izmenjava vsaj 95 % volumna balastne vode. Metoda za možno preverjanje spoštovanja standarda D-1 je test slanosti balastne vode. Če so na testu slanosti vrednosti pod 30 psu, lahko z visoko stopnjo verjetnosti sklepamo, da balastne vode izvirajo iz obalnih območij, kjer obstaja velik vpliv celinskih voda. Sklepamo lahko, da ladja ni spoštovala pravila in ni izmenjala balastne vode na odprtem morju, kjer je slanost vode visoka, tj. običajno 35 psu ali več. Pomanjkljivost te metode nadzora je, da ni uporabna, kadar ladja uporablja predvsem morsko vodo za balast, saj ima ta slanost že tako nad 30 psu.



Vzorčenje izvajamo z vzorčevalnikom vodnega stolpca, vzorčevalnikom točkovnega vira ali črpalko prek odprtih, kjer zadostuje že majhna količina vode, cca. 50 ml.

### 2.1.2 Vzorčenje za nadzor skladnosti s standardom D-2

Standard D-2.1 vsebuje kvantitativne omejitve glede količine izpuščenih organizmov, sposobnih preživetja, po velikostnih razredih, standard D-2.2 pa vsebuje omejitve količine glede posameznih vrst indikatorskih mikrobov in povzročiteljev bolezni (preglednica 1).

Preglednica 1: Zahteve za kakovost izpusta balastne vode po standardu D-2 (IMO, 2004)

Organizmi	Mejna vrednost
$\geq 50 \mu\text{m}$ v najmanjši dimenziji	< 10 primerkov sposobnih preživetja na $1 \text{ m}^3$ balastne vode
$\geq 10 \mu\text{m}$ in $< 50 \mu\text{m}$ v najmanjši dimenziji	< 10 primerkov sposobnih preživetja na 1 ml balastne vode
<i>Vibrio cholerae</i>	< 1 formirajoča kolonija na 100 ml balastne vode
<i>Escherichia coli</i>	< 250 formirajočih kolonij na 100 ml balastne vode
Črevesni enterokoki	< 100 formirajočih kolonij na 100 ml balastne vode

Pri velikostnih razredih organizmov je izpostavljena pomembna omejitev – velikost organizma v najmanjši dimenziji. Najmanjša dimenzija je v smernicah definirana kot najmanjša dimenzija telesa organizma, pri čemer se ne upošteva velikosti nitk, dolgih okončin, razraslih anten itd. Torej je minimalna dimenzija najožji del telesa organizma, gledano z vseh perspektiv. Za organizme sferične oblike predstavlja ta dimenzija premer organizma.

Različni velikostni razredi organizmov zahtevajo različne pristope vzorčenja. Načeloma moramo pri večjih organizmih, ki jih preučujemo, analizirati oz. prefiltrirati večje količine vode, da bi bil vzorec reprezentativen. To pa zato, ker so koncentracije večjih organizmov v vodi ponavadi manjše kot pri manjših velikostnih razredih, kjer lahko v kaplji vode najdemo veliko število organizmov majhnih velikostnih razredov. Posledično zahtevajo indikativni testi različne metode vzorčenja za različne velikostne razrede, ki se razlikujejo po času vzorčenja, časovni dolžini vzorčenja, volumnu vzorca ter različnih dostopnih točkah vzorčenja. Predlagana je tudi metoda, ki omogoča analize vseh velikostnih razredov. Standard D-2 gre razumeti kot standard izpusta dovoljenih količin organizmov. V smernicah G2 na podlagi

razumevanja standarda D-2 kot standarda, ki se nanaša na izpust balastnih vod in ne vsebine tankov za balastno vodo, priporočajo vzorčenje iz balastnega cevne voda v najbližji točki izpusta, med samim izpustom balastne vode v okolje, vendar pa imamo kljub tej določitvi primere, ko je vzorčenje v tankih edina možna rešitev (David, 2015).

Poznamo dve vrsti vzorčenja – vzorčenje za indikativni test in vzorčenje za podroben test vzorca. Podrobno vzorčenje (angl. detailed sampling) mora biti reprezentativno za celoten izpust balastne vode in cilja na vse skupine organizmov v balastni vodi skladno z zahtevo standarda D-2, zato je veliko bolj kompleksno. Analize za podroben test pa lahko praktično izvedemo le v laboratorijih na kopnem.

Smernice G2 (IMO, 2008) med drugim narekujejo, naj se vzorčenje izvaja na varen in praktičen način ter naj se vzorce koncentrira v obvladljivo velikost.

#### *2.1.2.1 Indikativno vzorčenje za nadzor skladnosti s standardom D-2*

V smernicah G2 (IMO, 2008), ki so bile zapisane na podlagi 9. člena (inšpekcijski pregled ladij) Konvencije, so priporočila za vzorčenje. V odstavku 6.3 je priporočeno, da je prvi korak indikativna analiza izpusta balastne vode za ugotovitev, ali je ladja potencialno skladna ali neskladna z zahtevami Konvencije. Smernice G2 priporočajo, da pred izvedbo podrobnega vzorčenja in analiz opravimo indikativni test (v smernicah G2 angl. »indicative analysis«), da bi preprečili morebiten vnos škodljivih vodnih organizmov v primeru neustrezne obravnave balastne vode, saj je to edini način, da se neustrezno stanje ugotovi, preden se balastna voda izpusti v okolje. Indikativni test je hiter test, ki poda oceno, indikacijo, ali je balastna voda v skladu z zahtevami. Vendar nikjer ni eksplicitno pojasnjeno, kako naj bi se to vzorčenje izvajalo. Implicitno naj bi se tako indikativna analiza izvedla na vzorcu, namenjenem podrobni analizi, ali pa kot prva faza podrobnega vzorčenja (David, 2013; Gollasch in David, 2015).

Smernice G2 vsebujejo splošna priporočila za vzorčenje balastne vode. Predlagane metode so napisane na način, da avtoriziranemu inšpektorju omogočajo pregled, ki bo varen tako za ladjo kot tudi za posadko in izvajalca pregleda. Uporabljene metode morajo biti preproste, izvedljive, hitre ter uporabne med izpuščanjem balastne vode iz ladje. Čas, potreben za analizo vzorcev, pa ne sme biti vzrok za nepotrebno zadrževanje delovanja, premikov ali odplutja ladje (IMO, 2004).

Razumeti je treba, da izvajamo indikativno vzorčenje za indikativni test (analizo) z indikativnim inštrumentom. To pomeni, da moramo imeti na voljo inštrumente, ki bodo na sami ladji hitro podali indikacijo stanja vzorcev balastne vode. Ker v standardu naslavljajo dve skupini organizmov po velikostnih razredih in indikatorske mikrobe, gre razumeti, da potrebujemo inštrument/e, ki bo/bodo ocenil/i vzorce za vse ciljne skupine, naslovljene v standardu D-2. Če samo ena ciljna skupina presega zadano, s standardom D-2 predpisano mejo, lahko to sprejmemo kot jasno indikacijo o neskladnosti z zahtevami Konvencije. Če je prva analizirana ciljna skupina v dovoljenih mejah standarda D-2, pa se lahko odločimo za nadaljevanje z analizami drugih skupin, dokler ne potrdimo skladnosti oz. neskladnosti. Tukaj je treba poudariti, da trenutno nimamo na voljo takih indikativnih inštrumentov/metod, da bi opravili indikativni test v vseh ciljnih skupinah standarda D-2. PAM metoda (pulzno-amplitudna modulacija; glej poglavje »Analiza vzorcev balastne vode«) se je izkazala za trenutno edino primerno indikativno metodo, s katero zelo hitro in enostavno opravimo analizo fitoplanktona v vzorcu, ki spada v večini v velikostno skupino večji ali enaki od 10  $\mu\text{m}$  in manjši od 50  $\mu\text{m}$  (Gollasch et al., 2015a). Poleg tega je vzorčenje vode sorazmerno enostavno, saj potrebujemo zelo majhno količino vzorca (Gollasch et al., 2015a).

### ***Indikativno vzorčenje v tankih za nadzor skladnosti s standardom D-2***

Za vzorčenje v tankih se odločamo predvsem ali najprej, kadar sumimo, da ladja prenaša balastno vodo z območij, kjer so prisotni škodljivi vodni organizmi in povzročitelji bolezni. Za podajo »suma« je treba opraviti oceno tveganja, ki kaže na stopnjo nevarnosti. Dostopnost vzorčnega mesta je ključnega pomena za izbiro metode vzorčenja.

- *Metode vzorčenja za indikativne teste v tankih*

Dostopne točke na ladji so cevi za merjenje količine vode v tankih, t. i. cev za sondiranje, oddušnik tanka ter odprtine za dostop v tank, ki so velikokrat nedostopne.

Z vzorčevalnikom točkovnega vira (slika 1) dobimo vzorec na treh različnih globinah vode v tanku (blizu površine, v sredini, na dnu). Za pridobivanje integriranega vzorca iz vodnega stolpca balastnega tanka lahko uporabimo tudi vzorčevalnik vodnega stolpca, ki ga spuščamo do najnižje točke tanka. Voda začne vstopati v vzorčevalnik skozi odprtino na vrhu vzorčevalnika in tako dobimo proporcionalni vzorec celotnega vodnega stolpca. Za analizo zadošča že vzorec volumna 50 ml.



Slika 1: Vzorčenje preko cevi za sondiranje z vzorčevalnikom točkovega vira (Avtor slike: David)

Druga možna metoda za to skupino organizmov je z uporabo črpalke (slika 2), prek katere izčrpamo balastno vodo iz vodnega stolpca tanka.



Slika 2: Ročna črpalka – spuščena v tank balastne vode prek cevi za sondiranje (avtor slike: David)

Črpalko uporabljamo za doseganje integriranega vzorca na treh različnih globinah iz vodnega stolpca (na vrhu, na sredini ter na najgloblji točki tanka). Lahko jo uporabimo tudi tako, da začnemo črpati na gladini in se počasi s konstantno hitrostjo pomikamo proti dnu. Črpalka pride v poštev predvsem, če obstaja kakšna ovira za vzorčenje z vzorčevalniki, npr. takrat, ko je sonda, skozi katero dostopamo do vode, ukrivljena.

### ***Indikativno vzorčenje balastne vode v balastnem cevnom vodu za nadzor skladnosti s standardom D-2***

- *Metode vzorčenja prek balastnega cevnege voda za indikativni test skladnosti*

Ker se indikativno vzorčenje lahko razvije v kasnejšo podrobno analizo, uporabljamo enake metode za indikativno vzorčenje in za podrobno vzorčenje (glej poglavje Podrobno vzorčenje za nadzor skladnosti s standardom D-2, prek balastnih cevni vodov). Za pridobitev enega vzorca je potreben kratek čas vzorčenja. Možnih je veliko različnih metod analiziranja vzorca. Na tak način pridobljeni rezultati tvorijo trdno podlago za nadaljnje odločanje pomorskega inšpektorja (PSC) v primeru neskladnosti. Odločitve so odvisne od vrednosti vzorca, npr. če bi vzorec presegal dovoljene vrednosti, zapisane v standardu D-2 (IMO, 2004), bi to nakazovalo, da so potrebne nadaljnje raziskave. Če vrednost močno presega omejitve oz. dovoljeno vrednost standarda, lahko dobi ladja prepoved nadaljevanja izpusta balastne vode.

#### *2.1.2.2 Podrobno vzorčenje za nadzor skladnosti s standardom D-2*

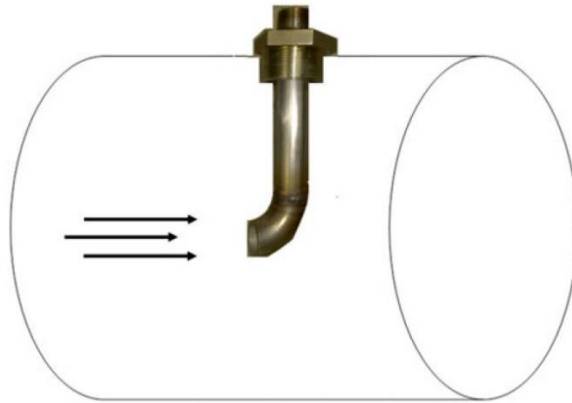
### ***Podrobno vzorčenje v tankih za nadzor skladnosti s standardom D-2***

Kot pri indikativnem vzorčenju v tankih, D-2 standard razumemo kot standard izpusta, zato vzorčimo v tankih samo v primerih, ko nimamo druge možnosti.

### ***Podrobno vzorčenje prek balastnih cevni vodov za nadzor skladnosti s standardom D-2***

Za omogočanje vzorčenja na ladijskih balastnih cevni vodih je treba urediti ustrezno permanentno inštalacijo vzorčevalne opreme z dovolj prostora za varno izvajanje vzorčenja balastne vode. Glede na ustrezna mesta vzorčenja so v smernicah G2 priporočila za inštalacijo cevi v bližini iztoka na balastnem cevnom vodu, ki omogoča izokinetičen odvzem vzorca. Premer izokinetične cevi je v korelaciji s premerom balastnega cevnege voda, na katerem je inštalirana. Izokinetična cev je vstavljena v cevni vod prečno do sredine cevi (slika

3), kjer koleno cevke omogoča neprekinjeno vtekanje s konstantno hitrostjo. Pod izokinetičnimi pogoji je na točki vtoka v izokinetično cev hitrost vzorčenega in glavnega toka enaka.



Slika 3: Izokinetična cev za vzorčenje balastne vode v balastnem cevnem vodu (Gollasch in David, 2015, str. 207)

- *Metode vzorčenja*

Različne metodologije vzorčenja dajejo različne rezultate o koncentracijah preživetja sposobnih organizmov, kar pomeni, da izbira primerne metode pomembno vpliva na rezultate za nadzor skladnosti (David, 2013).

Na cevnih vodih zato vzorčimo z najmanj dvema sekvencama vzorčenja (dve ponovitvi), z izjemo začetka ter konca balastiranja (prvih 5 min in zadnjih 5 min). Za vzorčenje organizmov velikostnega razreda večjih ali enakih 50  $\mu\text{m}$  je predlagana uporaba planktonske mreže, skozi katero prefiltriramo in skoncentriramo od 300 do 500 litrov balastne vode z zaporednimi vzorčenji po 10 minut za vsako sekvenco vzorčenja.

Pri drugi velikostni skupini organizmov (od 10 do 50  $\mu\text{m}$  v najmanjši dimenziji) priporočajo uporabo vedra, kjer shranimo od 5 do 6 litrov neprekinjenega balastnega izliva, zbranega istočasno z vzorčenjem organizmov večjih ali enakih 50  $\mu\text{m}$ , vsako sekvenco. Iz premešanega vedra vzamemo dva podvzorca z volumnom 60 do 100 ml. Za analizo indikatorskih mikrobov potrebujemo samo en liter neprekinjenega podvzorca v vsaki sekvenci.

### **2.1.3 Priporočila vzorčenja**

David (2013) navaja, da so glavni dejavniki, ki vplivajo na rezultate vzorčenja, trajanje vzorčenja, čas vzorčenja, število vzorcev in količina balastne vode, ki se vzorči.

Ugotovljeno je bilo (Gollasch in David, 2015), da na organizme, večje ali enake 50  $\mu\text{m}$ , negativno vplivajo dolgi časi vzorčenja, zato predlagata, da se vzorči največ 10 minut.

Organizmi so v balastni vodi zelo neenotno porazdeljeni. Največje anomalije so na začetku in na koncu vzorčenja, zato je smotrno, da izpustimo prvih in zadnjih pet minut izpusta balastne vode v okolje in vzorčimo naključno med praznjenjem tankov. Zaradi neenotne porazdelitve organizmov en vzorec ne bi bil reprezentativen. Opažanja kažejo, da povprečje dveh naključnih vzorcev daje podobne rezultate kot povprečje treh vzorcev, zato se priporoča pridobitev vsaj dveh naključnih vzorcev, kot rezultat pa izračunamo njuno povprečje.

Ugotovljeno je bilo, da tudi velikost pretoka vpliva na koncentracijo preživetja sposobnih organizmov. Pretok vzorčenja zmanjšamo tako, da delno zapremo ventile na cevni vodu in s tem povečamo sile, kar lahko škodi organizmom v procesu vzorčenja. Podoben negativen vpliv dobimo ob visokih vrednostih pretokov, ki vplivajo predvsem na organizme, ki so večji ali enaki 50  $\mu\text{m}$ . Zato priporočajo vzorčenje pri pretoku 50 l/min, tako da tlak vode v planktonski mreži ni previsok, kar bi lahko vplivalo na rezultate.

#### **2.1.3.1 Oprema za vzorčenje**

Oprema za vzorčenje je mišljena kot vsi pripomočki, ki jih rabi pomorski inšpektor in ki jih bo prinesel za vzorčenje in nadzor skladnosti na ladjo. Zato priporočajo lahke in robustne pripomočke majhnih dimenzij za lažji in enostavnejši transport ter uporabo na ladji.

- *Planktonska mreža za vzorčenje prek balastnih cevni vodov (in-line sampling)*

Planktonske mreže so v obliki konusa, premer mreže naj bi bil manjši od 30 cm, dolžina pa ne daljša od enega metra. Priporočene odprtine mreže so okenca kvadratne oblike s stranico 36  $\mu\text{m}$ , kar daje diagonalo 50  $\mu\text{m}$ , v skladu s priporočili G8 (IMO, 2008b), kjer je zapisano, da za koncentriranje vzorca uporabimo sito, kjer odprtina mreže ni večja od 50  $\mu\text{m}$  po diagonali.

Mreža v obliki konusa naj bi bila opremljena z odstranljivim dnom, najbolje s filtrirno ploščo, kjer se lahko organizmi učinkovito zgostijo (slika 5). V primerih večkratnega vzorčenja bi bilo

najbolje, da imamo na razpolago več odstranljivih filtrirnih konic, ki jih menjamo ob vsakem vzorčenju, da ne pride do mešanja organizmov.



Slika 4: Planktonska mreža za vzorčenje preko balastnih cevnih vodov z odstranljivo filtrirno ploščo (David, 2013, str. 32)

Z laboratorijsko puhalko izpiramo organizme iz mreže, tako da vbrizgavamo curek iz zunanje strani, da se organizmi skoncentrirajo v odstranljivo dno.

- *Planktonska mreža za vzorčenje v tankih (in-tank sampling)*

Za vzorčenje v tankih se uporablja kratka planktonska mreža v obliki konusa (slika 5) z majhnim premerom, da jo enostavno spustimo skozi odprtino. Stožčast vrh povečuje učinkovitost vzorčenja in zmanjša tveganje, da bi se mreža kje v tanku zataknila (Gollasch in David, 2015). Odstranljivo dno je priporočljivo menjati med vzorčenji, da se organizmi med posamezni vzorci ne mešajo.





Slika 5: Planktonska mreža za vzorčenje v tankih prek odprtin (David, 2013, str. 34)

- *Vzorčevalnik vodnega stolpca*

Vzorčevalnik vodnega stolpca (slika 6) so oblikovali na tako dimenzijo, da lahko z njim vzorčimo balastno vodo prek cevi za sondiranje in ga lahko uporabljamo tudi prek odprtin.



Slika 6: Vzorčevalnik vodnega stolpca, primeren za vzorčenje prek cevi za sondiranje (Gollasch in David, 2015, str. 197)

Vzorčevalnik spustimo v tank in skozi zgornjo odprtino voda vstopa vanj. Spuščamo ga počasi, dokler vzorčevalnik ne doseže dna tanka (potrebuje cca. 10 s, da se napolni), nato ga potegnemo ven. Spuščamo ga s konstantno hitrostjo in tako dosežemo proporcionalen vzorec celotnega vodnega stolpca. Vzorčevalnik lahko naenkrat vzorči 0,2 l balastne vode. Če želimo povečati volumen vzorca, povečamo število ponovitev vzorčenja.

- *Vzorčevalnik točkovnega vira*

Oblikovan je tako, da lahko z njim vzorčimo prek cevi za sondiranje (slika 7) ter prek odprtin. Spustimo ga lahko na željeno globino, odpremo ventil in voda priteče vanj. Da se vzorčevalnik napolni, potrebuje približno eno minuto, vzorec je pa velik 0,225 litra. Vzorčevalnik lahko uporabljamo tudi za vzorčenje balastne vode z usedlinami. Spustimo ga na dno tanka in pri stiku s tlemi se ventil sam odpre in vzorčevalnik se napolni na mestu, kjer je največ usedlin (pri dnu tanka). Ponovitve omogočajo povečanje volumna vzorca.



Slika 7: Vzorčevalnik točkovnega vira (Gollasch in David, 2015, str. 198)

- *Vedro*

Vedro z volumnom 10 litrov je primerno za nekatere vzorčevalne metode. Da bi se izognili kontaminaciji z delci iz okolice (npr. prah) ter za lažji transport, priporočajo vedro s pokrovom. Na vedru je priporočena tudi vidna volumenska lestvica, ki nam pomaga pri odčitavanju količine vzorčene balastne vode.

### *2.1.3.2 Transport vzorcev*

Vsi vzorci morajo biti transportirani v laboratorij za podrobno analizo v izolacijskih stiropornih škatlah s hladilnimi elementi. Ko vzorce dostavimo v laboratorij, se tam shranijo na temperaturi, ki je enaka temperaturi balastne vode, ki smo jo izmerili v tankih med vzorčenjem. Vzorci morajo biti analizirani čim prej, najkasneje po šestih urah vzorčenja, da se izognemo poginu organizmov.

Organizme, ki so večji ali enaki 50  $\mu\text{m}$ , skoncentriramo v najmanj enem litru vode, da omogočimo lažji transport. Pazimo, da svetloba in toplota med transportom ne prodirata v vzorec.

Pri organizmih od 10 do 50  $\mu\text{m}$  vzorca ne koncentriramo. Tri podvzorce z manjšim volumnom od 100 ml vzamemo iz glavnega vzorca, da olajšamo transport. Tudi tukaj pazimo na temperaturo ter svetlobo.

Pri indikatorskih mikrobih je transport enak kot pri prejšnjih dveh velikostnih skupinah, s tem da vzamemo tri podvzorce, ne manj kot en liter, da olajšamo transport.

## **2.2 Analiza vzorcev balastne vode**

Poznamo dva pristopa analiziranja balastne vode za dokazovanje skladnosti z določili Konvencije (IMO, 2004). Prvi pristop je indikativna analiza, drugi pristop pa podrobna analiza balastne vode oz. količine organizmov v njej. Tehnologije zaznavanja organizmov obstajajo tako za indikativne kot tudi za podrobne teste. Metode za analiziranje vzorcev za oba pristopa so izbrane po merilih, opisanih v nadaljevanju.

### **2.2.1 Merila za izbiro metode in naprav za analizo vzorcev**

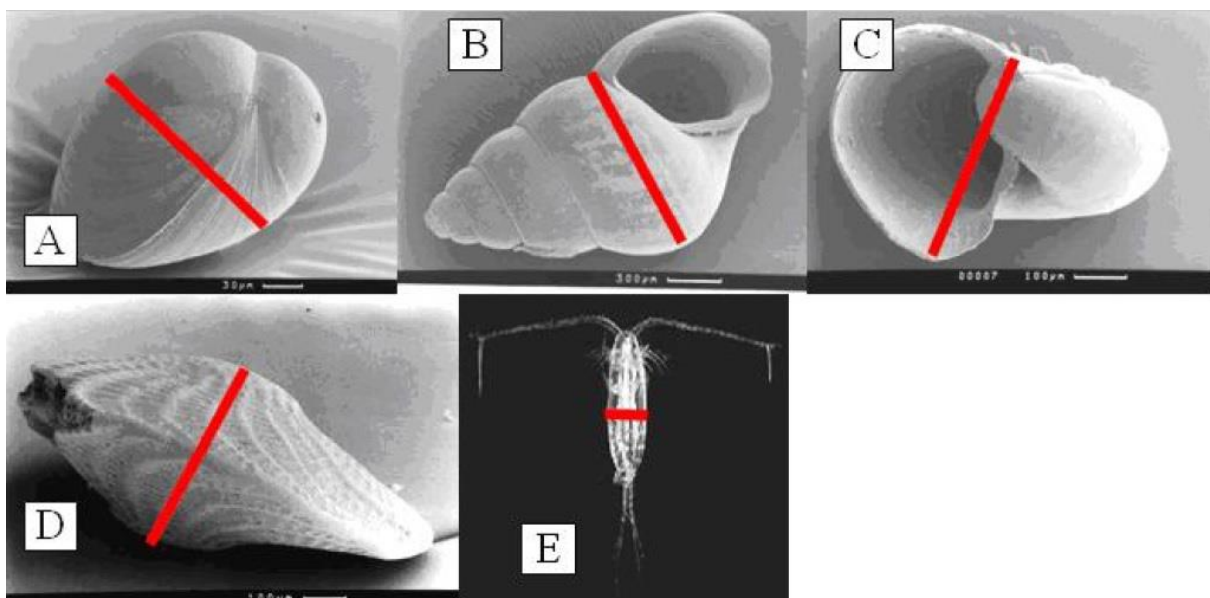
- *Natančnost metod*

Natančnost in točnost analiznih metod je bistvenega pomena, saj neprecizne metode lahko povzročijo napačno ugotavljanje ustreznosti s standardi. Metode morajo biti zanesljive, da lahko z neko stopnjo verjetnosti sprejemamo odločitve. Uporabljajo se samo preizkušene metode, priznane metode oz. metode, ki so podprte s standardom (ISO metode).

Metode za analizo bakterij obstajajo, vendar je treba za fito- ter zooplankton metode še razviti ali pa prilagoditi obstoječe metode potrebam vzorčenja balastne vode za določitev skladnosti s standardom D-2. Razlog je v tem, da so v standardu D-2 omejitve izpusta preživetja sposobnih organizmov, medtem kot to doslej še ni bilo obravnavano v nobenem standardu in se metode niso razvijale s temi zahtevami.

Obstajajo metode, pri katerih se uporablja barvilo, ki obarva žive ali nežive organizme, ki jih lahko v nadaljnji analizi preštejemo. Težave nastopijo pri organizmih, ki zaradi neugodnih razmer preživijo kot ciste v mirujočem stadiju in se ne obarvajo z barvilom ter nam tako povzročajo težave pri štetju. Ena od možnih rešitev za dokazovanje vitalnosti je nadaljnje valjenje cist in mirujočih stadijev.

Poleg vitalnosti, standard zahteva analizo po velikostnih razredih v najmanjši dimenziji organizma. Najmanjša dimenzija je tista, ki daje najmanjši prerez organizma (slika 8), z izključitvijo nitk, dolgih okončin, razraslih anten itd. Pri analizah lahko ta zahteva predstavlja velik izziv za naprave, ki same štejejo organizme (pretočne kamere, citometrije ...), saj metode nimajo celostnega 3D pogleda, da bi lahko na vsakem organizmu iskale najmanjšo dimenzijo. Kjer imamo organizme, ki tvorijo kolonije, se ta problem samo še poveča. Merimo velikosti posameznih osebkov, ne pa celotne kolonije, kar je problematično za naprave za štetje organizmov.



Slika 8: Najmanjša dimenzija organizma (Gollasch et al., 2012, str. 14)

- *Umerjanje*

Nekatere naprave potrebujejo umerjanje (kalibracijo) po vsaki analizi, kar predstavlja problem pri analizi vzorcev balastne vode, saj vsako umerjanje zahteva čas ter nam onemogoča zaporedne analize v smotrnem časovnem okviru. So naprave, ki zahtevajo umerjanje celo v laboratorijskem okolju, kar je ovira za indikativne analize, ki jih izvajamo neposredno na ladji po vzorčenju. Najprimernejši inštrumenti za analizo so tisti, ki ne potrebujejo umerjanja.

- *Čas do rezultata*

Scenarij, ki bi nam ustrezal, je imeti metodo, ki omogoča takojšnje rezultate. Hitreje kot dobimo rezultate, prej lahko ustavimo izpust balastne vode pri morebitnih neskladnostih. Prednost imajo metode, ki dajo hitre rezultate, kar nam omogoča pravočasne odločitve pri možnih neskladnostih.

- *Strokovnost*

Ker je mišljeno, da bi na ladji vzorčil in nato indikativno analiziral balastno vodo pomorski inšpektor, imajo prednost metode, ki jih lahko uporablja oseba z opravljenim posebnim usposabljanjem za vzorčenje in analizo brez zahtev predhodne akademske izobrazbe s področja biologije ali kemije.

- *Prenosnost*

Prenosne aparature, ki jih lahko prenaša en sam človek, so zaželeni, saj olajšajo transport na ladjo, uporabo na ladji ter transport z ladje skupaj z vsemi vzorci za nadaljnje podrobne analize. Pripomočki in naprave naj bi bile lahke, kompaktne ter praktičnih dimenzij z možnostjo izvajanja analiz na samem mestu vzorčenja ali blizu vzorčenja na plovilu.

- *Stroški*

Izbrane metode naj ne bi bile predrage oz. morajo biti stroškovno učinkovite v primerjavi z obratovalnimi stroški. Vendar je še vedno bolj smotrna uporaba drage metode, ki daje točne ter zanesljive rezultate, kot pa uporaba poceni tehnologije z manj natančnimi rezultati, kar lahko vodi v napačne interpretacije rezultatov o skladnosti s standardi in povzroči škodo drugačnih razsežnosti.

---

### **2.2.2 Metode za indikativno analizo za dokazovanje skladnosti z D-2 standardom**

Pri prepoznavi potencialno neskladnih balastnih vod je indikativna analiza mišljena kot prva, ki v zgodnji fazi odkrije neskladnost ter na ta način prepreči izpust take balastne vode v okolje.

Najlažja pot za indikativno analizo vzorca je dokaz prisotnosti ali odsotnosti organizmov v vzorcu. To je mogoče z zaznavo DNK, RNK, ATP in klorofila-a. Vendar s takšno zaznavo ne zadostimo pogojem številčnosti organizmov, nekatere metode pa niti ne ločijo med živimi in umrlimi organizmi, kar ni v skladu z zahtevami konvencije, ki narekuje največje število prisotnih preživetja sposobnih organizmov na volumen balastne vode (D-2 standard) (Gollasch in David, 2015). Po izvedenih študijah je jasno, da ni na razpolago niti ene metode za identifikacijo organizmov, naslovljenih v D-2 standardu (Gollasch et al., 2012).

Za večje zooplanktone in bakterije se še nobena indikativna metoda ni izkazala za dovolj zanesljivo in ustrezno. Noben inštrument se še ni izkazal pri analizi tako velike raznolikosti vrst v velikostnem razredu večjih ali enakih 50  $\mu\text{m}$  v najmanjši dimenziji brez strokovne presoje o vitalnosti organizmov. Standard se nanaša tudi na formirajoče kolonije bakterij, ki zahtevajo inkubacijsko dobo od osem ur pa do nekaj dni, kar je izven dosega hitrih indikativnih testov. Ostale organizme v velikostnem razredu večji ali enaki 10  $\mu\text{m}$  in manjši od 50  $\mu\text{m}$  v minimalni dimenziji lahko analiziramo z metodo, ki se je izkazala za najprimernejšo pri analiziranju živih fitoplanktonskih vrst in je trenutno edini inštrument, primeren za izvedbo indikativne analize balastne vode. To je pulzno-amplitudna modulacija (PAM) (Gollasch et al., 2015a).

V nadaljevanju so predstavljene nekatere možne indikativne metode za indikativno analizo vzorca balastne vode (Gollasch in David, 2010b; Gollasch et al., 2012):

- *DNK metoda*

Deoksiribonukleinska kislina (DNK ali DNA) je dolga molekula, ki spada med nukleinske (jedrne) kisline in je nosilka genetske informacije v živih organizmih. Njena glavna naloga je shranjevanje bistvenih bioloških informacij. Prisotnost DNK bi lahko razumeli kot indikator življenja in organizmi so obravnavani kot živi. Opozoriti je treba na dejstvo, da prost DNK lahko najdemo v vodi ter tudi v mrtvih organizmih, kar lahko popači rezultate. Prisotnost prostega DNK lahko interpretiramo kot dejstvo, da je življenje v vodi obstajalo, kadar ni prisotnosti DNK, pa lahko sklepamo, da v balastni vodi ni oz. ni bilo prisotnih nobenih

---

organizmov ter da je bil proces ravnanja z balastno vodo ustrezen, uspešen ter je bil izpolnjen pogoj v standardu D-2 o vsebnosti organizmov. Proizvajalci so razvili različne sisteme za odkrivanje DNK in trenutno so na voljo celotni avtonomni sistemi, ki so sposobni merjenja količine DNK oz. ocenijo, ali je prisotna visoka ali nizka vsebnost DNK. S tako tehnologijo je mogoče dokazati prisotnost organizmov vključno z indikatorskimi mikrobi, vendar prisotnosti in količine formirajočih kolonij ni mogoče oceniti.

- *RNK metoda*

Ribonukleinska kislina (RNK ali RNA) je biološko pomembna dolga molekula, ki opravlja vrsto ključnih funkcij v živih organizmih. Njena najpomembnejša naloga je posredovanje genetske informacije med DNK in proteini. Tako kot pri DNK metodi je prisotnost RNA indikator, da je oz. je bilo prisotno življenje v vodi. Formirajočih kolonij tudi s to metodo ni mogoče dokazati.

- *ATP metoda*

Adenozin trifosfat (ATP) je molekula, ki je v celici uporabljena kot koencim in služi kot vir energije pri različnih procesih. ATP je prisoten v visokih koncentracijah v celicah z aktivnim metabolizmom, zato je indikator vitalnosti organizma. Koncentracije hitro upadejo, ko celice odmrejo. Prisotnost ATP lahko torej interpretiramo kot približek prisotnosti živih organizmov. To ni kvantitativna metoda, zato ne moremo oceniti števila organizmov.

Metoda za odkrivanje ATP temelji na proizvodnji svetlobe, ki jo povzroči reakcija ATP na dodane luciferaze (aktivni encimi) in luciferine (substrat). Proizvedena svetloba je sorazmerna s koncentracijo ATP. Metoda je kompleksna ter zamudna.

- *Merjenje kisika*

Za identifikacijo živih fitoplanktonskih organizmov lahko uporabimo metodo z merjenjem kisika, saj svetlobi izpostavljene žive fitoplanktonske celice proizvajajo kisik kot stranski produkt fotosintetske dejavnosti. V vzorec postavimo primeren senzor zaznavanja kisika in ga izpostavimo svetlobi za eno uro ter merimo razliko v porastu kisika. Če raven kisika naraste, lahko sklepamo, da so v vzorcu prisotni fitoplanktonski organizmi. Na žalost tudi ta metoda ne poda številčnosti organizmov.

- *Metoda klorofila-a*

Klorofil-a je glavni in najpomembnejši fotosintetski pigment, saj ima zmožnost pretvoriti svetlobno energijo v kemično. Prisotnost klorofila-a v vodi kaže na prisotnost fitoplanktona. Načeloma visoke koncentracije klorofila-a nakazujejo na sorazmerno višjo številčnost fitoplanktona v analizirani vodi. S to metodo ne moremo šteti celic.

Inštrumenti za merjenje klorofila-a v vodi so standardni fluorometri različnih proizvajalcev. Testi so hitri in inštrumenti enostavni za uporabo. Standardnih metod za merjenje klorofila-a ne moremo uporabiti za določevanje vitalnosti organizmov. Z aktivnimi fluorometri, kot je pulzno amplitudna modulacija PAM, lahko merimo vsebnost klorofila-a v živih celicah s sprožanjem odziva verig elektronov v fitoplanktonu. Takšen odziv je možen le pri vitalnih celicah.

- *Fluorometrija*

PAM – pulzno amplitudno modulirana fluorometrija meri fotosintetično učinkovitost fotosistema tipa II v fitoplanktonu. Omogoča hitre meritve fotosintetične dejavnosti in poda rezultate o vitalnosti fitoplanktona v vzorcu. Vitalne vrednosti (vitalnost organizmov) se določajo kot razlika med kvantnim izkoristkom vzorca na osnovni fluorescenci na temo adaptiranega vzorca (reakcijski centri v fotosistemu tipa II so pripravljene na sprejetje svetlobe)  $F_0$  ter maksimalne donosne fluorescence (vsi fotosistemski reakcijski centri so zasičeni)  $F_m$ . Vzorci morajo biti adaptirani na temo pred meritvami. Ko vzorec vstavimo v PAM inštrument, se sproži pulz svetlobe, ki inštrumentu omogoča merjenje odziva alg na nastalo stimulacijo. Naslednja močnejša meritev sproži svetlobo do maksimuma  $F_m$  ter meri odziv. Maksimalna variabilna fluorescenca  $F_v$  je razlika med  $F_m$  in  $F_0$ , ki prikaže različne odzivnosti alg na svetlobne pulze različnih jakosti. Razmerje med  $F_v$  in  $F_m$  izraža fotosintetično vrednost, ki jo interpretiramo kot oceno vitalnosti alg (Gollasch et al., 2015a). Ugotovljeno je bilo, da obstaja korelacija med  $F_0$  (osnovna fluorescenca vzorca, adaptiranega na temo) in številom manjših živih fitoplanktonskih organizmov (Gollasch in David, 2010b). Metoda je kvalitativna, kar pomeni, da rezultatov ne interpretira v številu organizmov (Gollasch et al., 2012). Obstajajo pa danes že novi instrumenti, ki podajo indikacijo o številu celic (Gollasch et al., 2015a).



### 3 METODE IN MATERIALI

Za analizo vzorca balastne vode je treba najprej pridobiti vzorec. Po pregledu opravljenih študij o reprezentativnem vzorčenju balastnih vod za potrebe nadzora ladij skladno s Konvencijo (Gollasch in David, 2015; David, 2013; Gollasch in David, 2013) ugotavljamo, da je metod za indikativno vzorčenje in analizo vzorcev več, vendar vse metode ne podajo enakih rezultatov. Priporočila za vzorčenje balastne vode, ki jih vsebujejo smernice G2, ne narekujejo eksplicitno, kako naj bi proces indikativnega vzorčenja potekal. Namen smernic G2 je podati priporočila, kako izpeljati vzorčenje balastne vode za pridobitev reprezentativnih vzorcev balastne vode za ugotavljanje skladnosti z zahtevami Konvencije.

Različne skupine organizmov (preglednica 1) zahtevajo različne pristope vzorčenja, saj so koncentracije večjih organizmov, prisotnih v balastni vodi, relativno manjše v primerjavi z manjšimi organizmi. Metode in pristopi se razlikujejo po času vzorčenja, trajanju vzorčenja, volumnu vzorca, različnih dostopnih točkah vzorčenja ter instrumentih za vzorčenje (Gollasch in David, 2010b).

Idealna metoda za nadzor skladnosti je postopek, ki omogoča zaznavo organizmov v balastni vodi, ima ustrezen razpon detekcije organizmov, je natančna, preprosta, točna, hitra, ekonomična, izvedljiva brez predhodnega znanja in izkušenj, splošno uporabna na različnih vrstah ladij v vseh geografskih legah ter uporabna pri izpustu balastne vode iz ladijskih tankov.

Ladje nimajo vzorčevalnih mest za vzorčenje v tanku, v bodoče pa bodo imele vzorčevalno mesto vgrajeno v cevi balastnega sistema blizu mesta izpusta. Ladje imajo različne dostopne točke do balastnih tankov, skozi katere ne moremo vzorčiti z vsemi inštrumenti različnih oblik, ampak morajo biti instrumenti prilagojeni razmeram in potrebam vzorčenja. Pomembno je tudi dejstvo, da je standard D-2 standard izpusta balastne vode, kar gre razumeti, da je treba vzorčiti balastno vodo na izpustu iz tankov po balastnih cevih vodih.

Večina v diplomski nalogi uporabljenih podatkov je bila objavljena v treh poročilih študij (IMO, 2009; Gollasch in David, 2010b; Gollasch in David, 2013), nekatere dodatno doslej neobjavljene podatke pa smo pridobili osebno od izvajalcev teh študij in avtorjev omenjenih poročil (osebni vir Gollasch in David, 2016). Pridobljene podatke smo analizirali za potrebe raziskave diplomske naloge. Z zanesljivimi rezultati podrobne analize smo primerjali rezultate indikativne analize inštrumenta Walz Water PAM in ugotavljali njegovo ustreznost za

---

ocenjevanje skladnosti z zahtevami Konvencije oz. ugotavljali, ali izbrani indikativni inštrument ponuja primerljive rezultate s podrobno analizo.

Inštrument Walz Water PAM je specializiran klorofil fluorometer za preučevanje zelo razredčenih suspenzij enoceličnih alg, cianobakterij, izoliranih kloroplastov in protoplastov. Primeren je za ocenjevanje vsebine ter fotosintetske aktivnosti fitoplanktona v vodi. V povezavi s programsko opremo WinControl omogoča temeljito analizo fotosintetske učinkovitosti fitoplanktona, vključno z določitvijo učinkovitega kvantnega izkoristka, relativne hitrosti transporta elektronov ter krivulje odziva na svetlobo. Programska oprema omogoča povezavo inštrumenta z računalnikom in s tem uporabniku omogoča nadzorovanje operacij, nastavitve funkcij ter zapis podatkov neposredno na računalnik. Detektorska enota inštrumenta je zasnovana za izjemno občutljive meritve fluorescence klorofila pri zelo nizkih koncentracijah, zlasti za preučevanje fitoplanktona v naravnih vodah. Ima valjasto držalo za stekleno kiveto premera 15 mm, obdano s svetlečimi LED diodami, ki inštrumentu zagotavljajo merjenje svetlobe in aktinično (modri del spektra) osvetlitev vzorca (Walz Product).

Vedeti moramo, da inštrument Walz Water PAM lahko meri le živ fitoplankton, da nima možnosti štetja organizmov, ampak le ponuja vrednosti/meritve, ki pomenijo neke posredne meritve biomase in odziva organizmov, s čimer je neprimeren za podrobne analize. Lahko pa bi bil ta instrument (oz. metoda) primeren za indikativne analize, kar tudi ugotavljamo v tej nalogi. Poudariti je treba, da inštrument meri celotno vsebnost živega fitoplanktona v vodi in ne le tistega v območju dimenzije standarda D-2.

Vzorci so bili vzeti na vzorčevalnem mestu iz balastnega cevnege voda. Vsa vzorčevalna mesta so bila enakih dimenzij ter nameščena enakomerno po odseku cevi. Za primerjalno analizo vsakega vzorčenja je bilo uporabljeno eno mesto vzorčenja, pri čemer smo tok razdelili na enake dele, kjer je bilo to potrebno.

Analizirali smo rezultate indikativne analize ter primerjalne podrobne analize 114 vzorcev, pridobljenih na 25 ločenih vzorčenjih (v nadaljevanju poskusov) na treh različnih ladjah, kjer smo na vsakem dogodku vzorčenja pridobili nekaj sekvenčnih vzorcev za indikativno ter podrobno analizo. Na vsakem vzorcu so bile opravljene tri ponovitvene meritve z indikativnim inštrumentom ter ena primerjalna podrobna analiza (štetje organizmov) v laboratoriju na inštitutu NIOZ (Royal Netherlands Institute of Sea Research). Walz Water PAM inštrument je za vsako meritev podal podatke  $F_0$  (osnovna fluorescenca),  $F_m$  (maksimalna fluorescenca) in

---

razmerje  $F_v/F_m$ , ki ga interpretiramo kot vrednost vitalnosti prepoznanih organizmov. Rezultate indikativnega inštrumenta smo primerjali z rezultati podrobne analize.

Glede na to, da inštrument Walz Water PAM ne meri števila organizmov, je bil poudarek naše raziskave na ugotavljanju povezanosti med rezultati PAM-ovega inštrumenta ( $F_0$  in  $F_v/F_m$ ) ter rezultati mikroskopske analize, ki poda vrednost celic fitoplanktona v vzorcu.

Pri analizi rezultatov smo uporabili osnovne statistične operacije (povprečje, standardna deviacija in koeficient variacije). Držali smo se postopka analize, izvedene na raziskavi za priporočila indikativnih analiz pomorskih inšpektorjev (Gollasch et al., 2015a), kjer so za računanje statističnih vrednosti uporabili formule za analizo vzorca majhne statistične populacije, statistične količine pa izračunali po enačbah 1 in 2:

Standardna deviacija (SD) vzorca

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (1)$$

Koeficient variacije (CV)

$$CV = \frac{S_d}{\bar{x}} * \left(1 + \frac{1}{4*N}\right) * 100 \quad (2)$$

kjer je:

- $N$       število meritev v vzorcu,
- $x_i$      ocena i-te meritve vzorca in
- $\bar{x}$       povprečje ocen vzorca.

## 4 ANALIZA PODATKOV

Množica podatkov za analizo vsebuje povprečne ocene indikativnega inštrumenta Walz Water PAM, ki je za vsak vzorec (meritve so bile ponovljene tri krat) podal oceno biomase  $F_0$  (kot kvantitativni element) in oceno vitalnosti alg  $F_m/F_v$  (kot kvalitativni element). Povprečja teh podatkov smo primerjali z rezultati štetja za življenje sposobnih organizmov (celic fitoplanktona), izraženih kot koncentracija teh na mililiter, kot rezultat podrobne analize. Ocenam inštrumenta smo izračunali standardno deviacijo ter koeficient variacije.

Razpon ocen  $F_0$  za vse vzorce je od 97 do 834, razpon ocen  $F_m/F_v$  pa od 0,012 do 0,776 (interpretacija te ocene sledi). Koncentracija celic fitoplanktona je bila v razponu od 0 do 802 celic/ml vzorca balastne vode. Ker je vzorec rezultatov dokaj širok (meja za doseganje standarda D-2 je manj kot 10 celic/ml balastne vode) in številčen (praktično 114 podatkov), lahko na velikem razponu dejanskega števila organizmov v vzorcu vidimo obnašanje indikativnih rezultatov v primerjavi z realno koncentracijo organizmov.

### 4.1 Analiza podatkov v odvisnosti od $F_m/F_v$

Osnovna razlaga oz. interpretacija ocen  $F_m/F_v$  (sposobnost preživetja organizmov) po NIOZ-u (Gollasch in David, 2010b) je:

- $> 0,600$  do  $0,800$ : organizmi v vzorcu so zelo zdravi,
- $> 0,300$  do  $0,800$ : organizmi v vzorcu so zdravi,
- $< 0,300$ : organizmi so zmerno prizadeti in lahko poginejo čez čas,
- $< 0,200$ : organizmi so prizadeti/mrtvi, ni možnosti obnovitve,
- $< 0,100$ : vsi organizmi so mrtvi.

Vse ocene smo grupirali v tri skupine, in sicer

- prva skupina vsebuje ocene manjše od  $0,300$  (organizmi so zmerno prizadeti ali mrtvi),
- druga skupina vsebuje ocene od  $0,300$ – $0,599$  (organizmi so zdravi) ter
- zadnja skupina z ocenami  $0,600$ – $0,800$  (organizmi so zelo zdravi).

#### 4.1.1 Analiza prve skupine ( $F_m/F_v < 0,300$ )

V preglednici 2 so podani rezultati, kjer je  $F_m/F_v < 0,300$ . Povprečja so izračunana na podlagi treh ocen (SD = standardna deviacija, CV = koeficient variacije). Obarvani podatki v preglednici so odstopanja, razložena v razpravi.

Preglednica 2: Rezultati, kjer je  $F_m/F_v < 0,300$  (obarvano polje v prvi vrstici)  
(vir podatkov: IMO, 2009; Gollasch in David, 2010b; Gollasch in David, 2013; osebni vir Gollasch in David, 2016)

št. poskusa	Povprečje $F_0$	SD $F_0$	CV $F_0$	Povprečje $F_v/F_m$	SD $F_v/F_m$	CV $F_v/F_m$	Št. celic fitoplankt. 10–50 $\mu\text{m/ml}$ (podrobna analiza)
19	163	6	4	<b>0,012</b>	0,013	113	0
19	175	5	3	<b>0,015</b>	0,017	124	0
19	177	2	1	<b>0,020</b>	0,003	18	0
21	229	13	6	<b>0,023</b>	0,021	96	0
19	163	5	3	<b>0,029</b>	0,012	43	0
21	226	7	3	<b>0,031</b>	0,030	103	0
21	231	2	1	<b>0,039</b>	0,025	69	0
22	<b>398</b>	39	11	<b>0,039</b>	0,009	26	0
21	214	6	3	<b>0,052</b>	0,006	13	0
22	132	13	11	<b>0,070</b>	0,005	7	0
22	185	20	12	<b>0,072</b>	0,010	15	0
18	182	6	4	<b>0,077</b>	0,003	4	<b>26</b>
18	162	5	4	<b>0,088</b>	0,026	32	<b>16</b>
22	97	15	16	<b>0,093</b>	0,004	5	0
18	163	4	3	<b>0,099</b>	0,015	17	9
18	209	25	13	<b>0,100</b>	0,031	34	<b>23</b>
22	117	14	13	<b>0,100</b>	0,022	23	0
22	112	12	11	<b>0,103</b>	0,012	13	0
22	148	18	13	<b>0,104</b>	0,022	23	0
7	<b>834</b>	23	3	<b>0,154</b>	0,017	12	<b>583</b>
17	220	4	2	<b>0,156</b>	0,042	29	<b>17</b>
17	176	14	8	<b>0,164</b>	0,012	8	7
22	152	14	10	<b>0,173</b>	0,184	115	0
7	<b>519</b>	103	22	<b>0,195</b>	0,037	20	<b>429</b>
17	243	86	38	<b>0,225</b>	0,021	10	9
17	248	2	1	<b>0,289</b>	0,015	6	<b>31</b>

V prvi skupini ocen (vse ocene  $< 0,300$ ) je 26 podatkov (preglednica 2). Razpon koeficienta  $F_m/F_v$  je od 0,012 do 0,289. Razpon  $F_0$  je od 97 (poskus 22) pa do 248 (poskus 17), s tem da so tri vrednosti (od 26) precej višje, in sicer  $F_0=398$  (poskus 22, CV = 11, podrobna analiza = 0 celic),  $F_0=519$  (poskus 7, CV = 22, podrobna analiza 429 celic) in  $F_0=834$  (poskus 7, CV = 3, podrobna analiza 582 celic). Pri prvi višji vrednosti  $F_0=398$  je inštrument podal  $F_m/F_v = 0,039$ , kar je manjše od 0,100, torej lahko rečemo, da so organizmi mrtvi, kar se sklada s podrobno analizo, ki je podala nič celic v vzorcu. Pri drugih dveh višjih vrednostih  $F_0$  pa bi lahko indikacijo vitalnosti ( $F_m/F_v < 0,300$ ) z indikativnim inštrumentom šteli kot napako, saj je podrobna analiza javila visoko število celic v vzorcu (429 in 582 celic). Razpon dejanskih celic v vzorcu, ki jo je podala podrobna analiza pri vzorcih s  $F_m/F_v$ , manjših od 0,300, je od 0 celic do 31 (poskus 17), s tem da imamo dva velika presežka (že zgoraj

omenjeno) s 429 celic (poskus 7) in 583 celic (poskus 7). Najvišja vrednost  $F_0$  (z izvzetjem treh presežkov) 248 se sklada z najvišjo vrednostjo podrobne analize 31 celic (z izvzetjem dveh presežkov), saj gre za isti vzorec. Na osnovi tega podatka torej lahko zaključimo, da vrednost  $F_0$  v tem primeru sledi porastu števila organizmov v vzorcu. Kjer je  $F_m/F_v$  manjši od 0,300, lahko sklepamo, da vzorec vsebuje zmerno prizadete, prizadete ali mrtve organizme. Če ocene primerjamo s standardom D-2, kjer je meja  $< 10$  organizmov/ml za fitoplankton, lahko zaključimo, da je od 26 podatkov inštrument pravilno podal oceno  $F_m/F_v$  za 19 vzorcev, saj je podrobna analiza podala sedem presežkov (podrobna analiza  $\geq 16$  celic).

#### 4.1.2 Analiza druge skupine ( $F_m/F_v$ je 0,300-0,599)

V preglednici 3 so podani rezultati, kjer je  $F_m/F_v$  od 0,300 do 0,599. Povprečja so izračunana na podlagi treh ocen (SD = standardna deviacija, CV = koeficient variacije). Obarvani podatki v preglednici so odstopanja, razložena v razpravi.

Preglednica 3: Rezultati kjer je  $F_m/F_v$  od 0,300 do 0,599 (obarvano polje v prvi vrstici).  
(vir podatkov: IMO, 2009; Gollasch in David, 2010b; Gollasch in David, 2013; osebni vir Gollasch in David, 2016)

št. poskusa	Povprečje $F_0$	SD $F_0$	CV $F_0$	Povprečje $F_v/F_m$	SD $F_v/F_m$	CV $F_v/F_m$	Št. celic fitoplankt. 10–50 $\mu\text{m/ml}$ (podrobna analiza)
2	260	23	10	<b>0,301</b>	0,041	15	96
1	357	11	3	<b>0,302</b>	0,031	11	291
1	548	28	5	<b>0,308</b>	0,031	11	802
6	<b>651</b>	21	4	<b>0,316</b>	0,061	21	451
4	600	22	4	<b>0,316</b>	0,085	29	187
1	478	8	2	<b>0,322</b>	0,001	0	544
6	600	146	26	<b>0,322</b>	0,063	21	347
4	479	20	4	<b>0,324</b>	0,019	6	66
5	566	13	2	<b>0,334</b>	0,064	21	173
5	546	28	5	<b>0,335</b>	0,058	19	369
1	454	13	3	<b>0,339</b>	0,020	6	741
20	205	11	6	<b>0,344</b>	0,034	11	20
12	552	20	4	<b>0,345</b>	0,036	11	107
20	212	28	14	<b>0,346</b>	0,048	15	16
2	249	7	3	<b>0,346</b>	0,020	6	15
6	<b>803</b>	46	6	<b>0,350</b>	0,011	3	70
16	176	6	3	<b>0,356</b>	0,025	7	70
16	229	14	7	<b>0,369</b>	0,021	6	56
12	501	7	1	<b>0,376</b>	0,050	14	224
16	173	5	3	<b>0,385</b>	0,010	3	51
12	482	69	15	<b>0,386</b>	0,043	12	78
3	342	15	5	<b>0,393</b>	0,012	3	235
12	588	51	9	<b>0,395</b>	0,039	11	251
23	218	53	26	<b>0,397</b>	0,079	22	41
4	<b>710</b>	175	27	<b>0,404</b>	0,029	8	104
23	253	8	3	<b>0,409</b>	0,055	15	31

se nadaljuje ...

... nadaljevanje preglednice 2

11	378	32	9	<b>0,417</b>	0,013	3	242
3	481	54	12	<b>0,421</b>	0,025	7	252
11	441	27	7	<b>0,422</b>	0,029	7	350
16	228	19	9	<b>0,426</b>	0,068	17	70
3	334	33	11	<b>0,443</b>	0,027	7	248
15	354	12	4	<b>0,451</b>	0,041	10	75
11	342	16	5	<b>0,462</b>	0,038	9	185
11	508	51	11	<b>0,466</b>	0,015	4	380
25	150	24	18	<b>0,468</b>	0,063	15	26
9	370	26	7	<b>0,469</b>	0,016	4	630
6	804	74	10	<b>0,472</b>	0,006	1	135
23	153	39	28	<b>0,476</b>	0,049	11	32
2	355	27	8	<b>0,483</b>	0,009	2	100
25	146	56	41	<b>0,483</b>	0,086	19	26
2	318	32	11	<b>0,484</b>	0,022	5	88
3	265	22	9	<b>0,484</b>	0,035	8	258
11	415	77	20	<b>0,485</b>	0,007	2	74
15	304	19	7	<b>0,486</b>	0,052	12	63
15	335	17	6	<b>0,488</b>	0,038	8	60
24	210	37	19	<b>0,489</b>	0,039	9	12
25	141	8	6	<b>0,490</b>	0,092	20	31
25	129	5	4	<b>0,493</b>	0,049	11	19
25	150	42	30	<b>0,493</b>	0,070	15	28
11	304	23	8	<b>0,493</b>	0,020	4	166
23	182	24	14	<b>0,498</b>	0,016	4	18
24	240	43	19	<b>0,499</b>	0,051	11	18
25	198	16	9	<b>0,499</b>	0,033	7	13
15	451	59	14	<b>0,506</b>	0,035	7	77
24	225	54	26	<b>0,506</b>	0,017	4	29
25	128	19	16	<b>0,506</b>	0,020	4	18
10	520	49	10	<b>0,507</b>	0,019	4	447
25	202	15	8	<b>0,509</b>	0,034	7	14
24	236	42	19	<b>0,509</b>	0,049	10	20
24	282	25	10	<b>0,511</b>	0,052	11	20
23	184	18	11	<b>0,513</b>	0,080	17	16
20	337	15	5	<b>0,525</b>	0,013	3	47
24	177	18	11	<b>0,526</b>	0,053	11	28
10	393	15	4	<b>0,526</b>	0,004	1	330
23	151	11	8	<b>0,531</b>	0,026	5	22
24	164	24	16	<b>0,531</b>	0,029	6	23
24	148	10	7	<b>0,532</b>	0,034	7	26
23	208	39	20	<b>0,541</b>	0,042	8	10
23	174	7	4	<b>0,542</b>	0,040	8	38
25	184	20	12	<b>0,544</b>	0,048	9	19
10	420	47	12	<b>0,546</b>	0,006	1	600
24	222	28	14	<b>0,555</b>	0,028	5	26
23	161	21	14	<b>0,564</b>	0,045	9	23
10	496	27	6	<b>0,574</b>	0,018	3	603
20	383	32	9	<b>0,579</b>	0,020	4	88
7	387	103	29	<b>0,586</b>	0,109	20	339
14	548	25	5	<b>0,596</b>	0,021	4	214

Druga velika skupina zajema 77 ocen  $F_m/F_v$  od 0,300 do 0,599 (preglednica 3), kjer naj bi bili ocenjeni organizmi zdravi. Razpon podatkov  $F_m/F_v$  je od 0,301 do 0,596, razpon  $F_0$  pa od 128 (poskus 25) do 600 (pri dveh poskusih) s štirimi presežki –  $F_0=651$  (poskus 6, CV = 4, podrobna analiza 451 celic),  $F_0=710$  (poskus 4, CV = 27, podrobna analiza 104 celic),  $F_0=803$  (poskus 6, CV = 6, podrobna analiza 70 celic) in  $F_0=804$  (poskus 6, CV = 10,

podrobna analiza 135 celic). Razpon rezultatov podrobne analize v tej skupini je od 10 celic (poskus 23) do 630 celic (poskus 9), z dvema presežkoma, in sicer 741 celic (poskus 1) in 801 celic (poskus 1). Glede na dejstvo, da je razpon podrobne analize od 10 celic dalje, lahko z visoko zanesljivostjo zaključimo, da je vsakič, ko indikativni inštrument javi  $F_m/F_v > 0,300$  (organizmi v vzorcu so zdravi), v vzorcu prisotnih  $\geq 10$  celic, kar je tudi meja standarda D-2.

#### 4.1.3 Analiza tretje skupine ( $F_m/F_v > 0,600$ )

V preglednici 4 so podani rezultati, kjer je  $F_m/F_v > 0,600$ . Povprečja so izračunana na podlagi treh ocen (SD = standardna deviacija, CV = koeficient variacije)

Preglednica 4: Rezultati kjer je  $F_m/F_v > 0,600$  (obarvano polje v prvi vrstici). (vir podatkov: IMO, 2009; Gollasch in David, 2010b; Gollasch in David, 2013, osebni vir Gollasch in David, 2016)

št. poskusa	Povprečje $F_0$	SD $F_0$	CV $F_0$	Povprečje $F_v/F_m$	SD $F_v/F_m$	CV $F_v/F_m$	Št. celic fitoplankt. 10–50 $\mu\text{m/ml}$ (podrobna analiza)
9	301	16	6	<b>0,617</b>	0,050	9	425
14	682	41	7	<b>0,619</b>	0,002	0	315
14	597	69	12	<b>0,622</b>	0,031	5	309
14	540	75	15	<b>0,630</b>	0,034	6	407
7	394	25	7	<b>0,642</b>	0,024	4	185
9	319	70	24	<b>0,686</b>	0,026	4	28
13	561	38	7	<b>0,731</b>	0,010	2	724
9	184	29	17	<b>0,731</b>	0,019	3	350
13	501	36	8	<b>0,752</b>	0,005	1	528
13	342	95	30	<b>0,774</b>	0,006	1	784
13	309	34	12	<b>0,776</b>	0,008	1	362

V zadnji skupini je 11 podatkov (preglednica 4) z  $F_m/F_v$  med 0,600 in 0,800, kar pomeni, da so prepoznani organizmi v vzorcu zelo zdravi. Razpon podatkov  $F_0$  je od 184 (poskus 9) pa do 682 (poskus 14). Najvišja vrednost  $F_0 = 682$  je manjša od najvišje vrednosti  $F_0$  pri drugi skupini podatkov ( $F_0 = 804$ ), vendar pa je najnižja vrednost  $F_0 = 184$  višja od najnižje v drugi skupini, kjer je razpon  $F_m/F_v$  od 0,300 do 0,599. Razpon rezultatov podrobne analize v tej skupini je od 28 celic (poskus 9) do 784 celic (poskus 13), kar spet kaže na visoko verjetnost presežka organizmov nad določili standarda D-2, kadar indikativni inštrument poda visoko oceno  $F_m/F_v \geq 0,600$ .



## 4.2 Analiza indikativnih ocen v odvisnosti od podrobne analize

Glede na rezultate podrobne analize smo podatke grupirali v štiri skupine. V prvo smo združili vse meritve, pri katerih je podrobna analiza pokazala rezultate < 10 celic, v drugo skupino smo dali rezultate podrobne analize 10–30 celic, v tretji skupini so rezultati podrobne analize od 31–70 celic ter v zadnjo skupino smo vstavili podatke z rezultati > 70 celic. Preverjali smo podajanje ocen  $F_0$  in  $F_m/F_v$  v odvisnosti od dejanskega števila organizmov.

### 4.2.1 Analiza prve skupine (podrobna analiza: 0–9 celic/ml vzorca balastne vode)

V preglednici 5 so podani rezultati podrobne analize vzorcev 0–9 celic (obarvano polje v prvi vrstici). Povprečja so izračunana na podlagi treh ocen (SD = standardna deviacija, CV = koeficient variacije). Obarvani podatki v preglednici so odstopanja, razložena v razpravi.

Preglednica 5: Rezultati analiz, kjer kaže podrobna analiza 0-9 celic  
(vir podatkov: IMO, 2009; Gollasch in David, 2010b; Gollasch in David, 2013; osebni vir Gollasch in David, 2016)

št. poskusa	Povprečje $F_0$	SD $F_0$	CV $F_0$	Povprečje $F_v/F_m$	SD $F_v/F_m$	CV $F_v/F_m$	Št. celic fitoplankt. 10–50 $\mu\text{m}/\text{ml}$ (podrobna analiza)
19	163	6	4	12	13	113	0
19	175	5	3	15	17	124	0
19	163	5	3	29	12	43	0
19	177	2	1	20	3	18	0
21	214	6	3	52	6	13	0
21	229	13	6	23	21	96	0
21	226	7	3	31	30	103	0
21	231	2	1	39	25	69	0
22	117	14	13	100	22	23	0
22	112	12	11	103	12	13	0
22	97	15	16	93	4	5	0
22	152	14	10	173	184	115	0
22	132	13	11	70	5	7	0
22	185	20	12	72	10	15	0
22	398	39	11	39	9	26	0
22	148	18	13	104	22	23	0
17	176	14	8	164	12	8	7
17	243	86	38	225	21	10	9
18	163	4	3	99	15	17	9

V preglednici 5 z 19 vzorci je razpon  $F_0$  od 97 (poskus 22) do 243 (poskus 17), s tem da imamo en presežek  $F_0 = 398$  (poskus 22, CV = 11,  $F_m/F_v = 0,039$ , podrobna analiza = 0 celic), kar kaže na mrtve organizme. Razpon  $F_m/F_v$  je od 0,012 (poskus 19) do 0,104 (poskus 22), pri čemer imamo tri presežke, in sicer  $F_m/F_v = 0,164$  (poskus 17, CV = 8, podrobna analiza 7 celic,  $F_0 = 176$ ), kar gre interpretirati, da so organizmi prizadeti ali mrtvi, kot pri

drugem presežku  $F_m/F_v = 0,173$  (poskus 22, CV = 115, podrobna analiza 0 celic,  $F_0 = 152$ ) ter zadnji presežek  $F_m/F_v = 0,225$  (poskus 17, CV = 10, podrobna analiza 9 celic,  $F_0 = 243$ ), ki ga lahko interpretiramo, da v vzorcu prisotni organizmi lahko poginejo čez čas. Ker je razpon  $F_m/F_v$  pri šestnajstih podatkih do 0,104 in je najvišja vrednost  $F_m/F_v$  manjša od 0,300, pomeni, da je inštrument uspešno ocenil to skupino.

#### 4.2.2 Analiza 2. skupine (podrobna analiza 10–30 celic/ml vzorca balastne vode)

V preglednici 6 so podani rezultati podrobne analize vzorcev 10–30 celic (obarvano polje v prvi vrstici). Povprečja so izračunana na podlagi treh ocen (SD = standardna deviacija, CV = koeficient variacije). Obarvani podatki v preglednici so odstopanja, razložena v razpravi.

Preglednica 6: Rezultati analiz kjer je podrobna 10–30 celic (obarvano polje v prvi vrstici) (vir podatkov: IMO, 2009; Gollasch in David, 2010b; Gollasch in David, 2013, osebni vir Gollasch in David, 2016)

št. poskusa	Povprečje $F_0$	SD $F_0$	CV $F_0$	Povprečje $F_v/F_m$	SD $F_v/F_m$	CV $F_v/F_m$	Št. celic fitoplankt. 10–50 $\mu\text{m/ml}$ (podrobna analiza)
23	208	39	20	541	42	8	10
24	210	37	19	489	39	9	12
25	198	16	9	499	33	7	13
25	202	15	8	509	34	7	14
2	249	7	3	346	20	6	15
18	162	5	4	88	26	32	16
20	212	28	14	346	48	15	16
23	184	18	11	513	80	17	16
17	220	4	2	156	42	29	17
23	182	24	14	498	16	4	18
24	240	43	19	499	51	11	18
25	128	19	16	506	20	4	18
25	129	5	4	493	49	11	19
25	184	20	12	544	48	9	19
20	205	11	6	344	34	11	20
24	236	42	19	509	49	10	20
24	282	25	10	511	52	11	20
23	151	11	8	531	26	5	22
18	209	25	13	100	31	34	23
23	161	21	14	564	45	9	23
24	164	24	16	531	29	6	23
18	182	6	4	77	3	4	26
24	148	10	7	532	34	7	26
24	222	28	14	555	28	5	26
25	146	56	41	483	86	19	26
25	150	24	18	468	63	15	26
9	319	70	24	686	26	4	28
24	177	18	11	526	53	11	28
25	150	42	30	493	70	15	28
24	225	54	26	506	17	4	29

V skupini je 30 podatkov (preglednica 6), razpon  $F_0$  je od 120 (poskus 25) do 249 (poskus 2), s tem da sta dva presežka;  $F_0 = 282$  (poskus 24,  $CV = 10$ ,  $F_m/F_v = 0,511$ , podrobna analiza 20 celic) in  $F_0 = 319$  (poskus 9,  $CV = 24$ ,  $F_m/F_v = 0,686$ , podrobna analiza 28 celic). Razpon  $F_m/F_v$  je od 0,344 (poskus 20) do 0,564 (poskus 23), s tem da imamo 4 minimalne vrednosti;  $F_m/F_v = 0,077$  (poskus 18, podrobna analiza 26 celic),  $F_m/F_v = 0,088$  (poskus 18, podrobna analiza 16 celic), kjer naj bi oba podatka interpretirali kot mrtve organizme, ter  $F_m/F_v = 0,100$  (poskus 18, podrobna analiza 23 celic) in  $F_m/F_v = 0,156$  (poskus 17, podrobna analiza 17 celic), kjer na osnovi vrednosti  $F_m/F_v$  sklepamo, da so organizmi mrtvi ali prizadeti in ni možnosti obnovitve. Med podatki je tudi en presežek, in sicer  $F_m/F_v = 0,686$  (poskus 9, podrobna analiza 28 celic), kar interpretiramo kot zelo zdrave organizme.

V tej skupini imamo 4 minimalne rezultate  $F_m/F_v$ , kjer se kaže napaka inštrumenta, saj so vrednosti manjše od 0,300 (kar nakazuje na prizadete ali mrtve organizme), podrobna analiza pa je pokazala, da so bili v vzorcu prisotni živeči organizmi, in to celo s presežkom standarda D-2. Na tem primeru bi zaključili, da je bil indikativni inštrument uspešen 26-krat od 30 poskusov, kar je za indikativno oceno relativno dobro.

#### **4.2.3 Analiza 3. skupine (podrobna analiza 31–70 celic/ml vzorca balastne vode)**

V preglednici 7 so podani rezultati podrobne analize vzorcev 31–70 celic/ml v vzorcu balastne vode (obarvano polje v prvi vrstici). Povprečja so izračunana na podlagi treh ocen ( $SD$  = standardna deviacija,  $CV$  = koeficient variacije). Obarvani podatki v preglednici so odstopanja, razložena v razpravi.

V skupini je 15 podatkov (preglednica 7), od tega je razpon  $F_0$  od 141 (poskus 25) do 335 (poskus 15), s tem da sta dva presežka –  $F_0 = 479$  (poskus 4,  $CV = 4$ ,  $F_m/F_v = 0,324$ , podrobna analiza 66 celic) in  $F_0 = 803$  (poskus 6,  $CV = 6$ ,  $F_m/F_v = 0,350$ , podrobna analiza 70 celic). Razpon vrednosti  $F_m/F_v$  je od 0,324 (poskus 4) do 0,542 (poskus 23) z enim minimumom  $F_m/F_v = 0,289$  (poskus 17,  $CV = 6$ ,  $F_0 = 248$ , podrobna analiza 31 celic), kar je tudi edina napaka v tej skupini, saj gre interpretirati  $F_m/F_v$ , kot da so organizmi prizadeti in lahko poginejo čez čas. Jasno je vidno, da z naraščanjem števila celic/ml naraščajo tudi vrednosti  $F_0$  in  $F_m/F_v$ , kar kaže na uspešnost inštrumenta v skupini.

Preglednica 7: Rezultati analiz, kjer je podrobna analiza 31–70 celic/ml vzorca balastne vode (obarvano polje v prvi vrstici).  
(vir podatkov: IMO, 2009; Gollasch in David, 2010b; Gollasch in David, 2013, osebni vir Gollasch in David, 2016)

št. poskusa	Povprečje F <sub>0</sub>	SD F <sub>0</sub>	CV F <sub>0</sub>	Povprečje Fv/Fm	SD Fv/Fm	CV Fv/Fm	Št. celic fitoplankt. 10–50 µm/ml (podrobna analiza)
4	479	20	4	324	19	6	66
6	803	46	6	350	11	3	70
15	335	17	6	488	38	8	60
15	304	19	7	486	52	12	63
16	228	19	9	426	68	17	70
16	176	6	3	356	25	7	70
16	173	5	3	385	10	3	51
16	229	14	7	369	21	6	56
17	248	2	1	289	15	6	31
20	337	15	5	525	13	3	47
23	218	53	26	397	79	22	41
23	153	39	28	476	49	11	32
23	253	8	3	409	55	15	31
23	174	7	4	542	40	8	38
25	141	8	6	490	92	20	31

#### 4.2.4 Analiza 4. skupine (podrobna analiza > 70 celic/ml vzorca balastne vode)

V preglednici 8 so podani rezultati podrobne analize vzorcev > 70 celic/ml v vzorcu balastne vode (obarvano polje v prvi vrstici). Povprečja so izračunana na podlagi treh ocen (SD = standardna deviacija, CV = koeficient variacije). Obarvani podatki v preglednici so odstopanja, razložena v razpravi.

Preglednica 8: Rezultati analiz, kjer je podrobna analiza > 70 celic/ml vzorca balastne vode (obarvano polje v prvi vrstici).  
(vir podatkov: IMO, 2009; Gollasch in David, 2010b; Gollasch in David, 2013, osebni vir Gollasch in David, 2016)

št. poskusa	Povprečje F <sub>0</sub>	SD F <sub>0</sub>	CV F <sub>0</sub>	Povprečje Fv/Fm	SD Fv/Fm	CV Fv/Fm	Št. celic fitoplankt. 10–50 µm/ml (podrobna analiza)
11	415	77	20	485	7	2	74
15	354	12	4	451	41	10	75
15	451	59	14	506	35	7	77
12	482	69	15	386	43	12	78
2	318	32	11	484	22	5	88
20	383	32	9	579	20	4	88
2	260	23	10	301	41	15	96
2	355	27	8	483	9	2	100
4	710	175	27	404	29	8	104
12	552	20	4	345	36	11	107
6	804	74	10	472	6	1	135
11	304	23	8	493	20	4	166
5	566	13	2	334	64	21	173
7	394	25	7	642	24	4	185
11	342	16	5	462	38	9	185

se nadaljuje ...

... nadaljevanje preglednice 8

4	600	22	4	316	85	29	187
14	548	25	5	596	21	4	214
12	501	7	1	376	50	14	224
3	342	15	5	393	12	3	235
11	378	32	9	417	13	3	242
3	334	33	11	443	27	7	248
12	588	51	9	395	39	11	251
3	481	54	12	421	25	7	252
3	265	22	9	484	35	8	258
1	357	11	3	302	31	11	291
14	597	69	12	622	31	5	309
14	682	41	7	619	2	0	315
10	393	15	4	526	4	1	330
7	387	103	29	586	109	20	339
6	600	146	26	322	63	21	347
11	441	27	7	422	29	7	350
9	184	29	17	731	19	3	350
13	309	34	12	776	8	1	362
5	546	28	5	335	58	19	369
11	508	51	11	466	15	4	380
14	540	75	15	630	34	6	407
9	301	16	6	617	50	9	425
7	519	103	22	195	37	20	429
10	520	49	10	507	19	4	447
6	651	21	4	316	61	21	451
13	501	36	8	752	5	1	528
1	478	8	2	322	1	0	544
7	834	23	3	154	17	12	583
10	420	47	12	546	6	1	600
10	496	27	6	574	18	3	603
9	370	26	7	469	16	4	630
13	561	38	7	731	10	2	724
1	454	13	3	339	20	6	741
13	342	95	30	774	6	1	784
1	548	28	5	308	31	11	802

Ta skupina je najštevilčnejša, saj vsebuje 50 podatkov (preglednica 8). Razpon  $F_0$  je od 301 (poskus 9) do 710 (poskus 4), s tem da imamo tri minimume, in sicer prvi pri  $F_0 = 154$  (poskus 7,  $CV = 17$ ,  $F_m/F_v = 0,731$ , podrobna analiza 350 celic), drugi minimum je  $F_0 = 260$  (poskus 2,  $Cv = 10$ ,  $F_m/F_v = 0,301$ , podrobna analiza 96 celic) in zadnji  $F_0 = 265$  (poskus 3,  $CV = 9$ ,  $F_m/F_v = 0,484$ , podrobna analiza 258 celic). Pojavila sta se tudi dva presežka:  $F_0 = 804$  (poskus 6,  $CV = 10$ ,  $F_m/F_v = 0,472$ , podrobna analiza 135 celic) in  $F_0 = 834$  (poskus 7,  $CV = 3$ ,  $F_m/F_v = 0,472$ , podrobna analiza 583 celic). Razpon  $F_m/F_v$  v skupini z največ organizmi na mililiter balastne vode je od 0,301 (poskus 2) do 0,776 (poskus 13), s tem da smo opazili dva minimuma prvi je  $F_m/F_v = 0,154$  (poskus 7,  $CV = 12$ ,  $F_0 = 834$ , podrobna analiza 583 celic) in drugi  $F_m/F_v = 0,195$  (poskus 7,  $CV = 20$ ,  $F_0 = 519$ , podrobna analiza 429 celic). Ta dva minimuma sta dve napaki od sedmih, storjenih na vseh vzorcih, saj je podrobna analiza pokazala velik presežek organizmov na volumen vzorca balastne vode, medtem kot je inštrument poleg visokega  $F_0$  podal nizek  $F_m/F_v$ , kar naj bi pomenilo, da so organizmi, ki jih je zaznal, prizadeti brez možnosti obnovitve. Povprečje vseh koeficientov

$F_m/F_v$  v skupini je 0,472, kar je že zanesljiv kazalec, da so prepoznane celice »zdrave«. Inštrument daje zelo zanesljive ocene v skupini.

---

## 5 RAZPRAVA

Bistvo naloge je bilo iskanje zakonitosti, odkriti morebitno povezanost rezultatov indikativnih analiz v primerjavi z dejanskim številom celic fitoplanktona v vzorcu kot rezultatov podrobnih analiz ter preveriti ustreznost inštrumenta za indikativne analize balastne vode. Analize smo se lotili tako, da smo najprej grupirali podatke indikativne analize, in sicer smo po ocenah vitalnosti alg  $F_m/F_v$ , ki jo je podal indikativni inštrument, naredili tri skupine, v katerih so bili rezultati od 0–0,299, kar naj bi pomenilo, da so prepoznani organizmi ali mrtvi in prizadeti, ki niso sposobni obnovitve, ali pa bodo poginili čez čas. V drugo skupino smo skoncentrirali podatke med 0,300–0,600, kar pomeni, da so prepoznani organizmi zdravi, in zadnjo skupino nad 0,600, kar pa pomeni, da so organizmi v vzorcu zelo zdravi. Ugotovili smo, da obstaja povezava med koeficientom vitalnosti  $F_m/F_v$  in razponom  $F_0$  ter številom fitoplanktonskih celic v vzorcu. Višji kot je koeficient  $F_m/F_v$ , višje vrednosti  $F_0$  podaja inštrument. Tudi dejansko število celic fitoplanktona se s podrobno analizo dokazano viša z višjim koeficientom  $F_m/F_v$ . Izpostavili bi dejstvo, da je pri vrednostih koeficienta  $F_m/F_v < 0,300$ , podrobna analiza skoraj vedno (2 presežka od 26 podatkov) v vzorcih dokazala prisotnost od 0 pa do 31 celic fitoplanktona sposobnih preživetja na mililiter vzorca balastne vode (z dvema presežkoma, 583 in 429 celic/ml). Pri višjih vrednostih ( $F_m/F_v > 0,300$ ) pa je podrobna analiza podala vedno 10 celic ali več (do 801 celic). Torej vsakič (88 vzorcev), ko je indikativni inštrument ocenil organizme za 'zdrave' ( $F_m/F_v > 0,300$ ), je bilo dejansko v vzorcu prisotnih več preživetja sposobnih organizmov, kot jih dovoli standard D-2, kar se šteje že za neskladnost z določili Konvencije. Ker je inštrument kot indikacijski namenjen za določanje skladnosti ali neskladnosti, lahko upravičimo nastale napake pri indikaciji ocene vitalnosti organizmov v skupini  $F_m/F_v < 0,300$ , saj je od 26 podatkov (kjer je  $F_m/F_v < 0,300$ , preglednica 2) inštrument 18-krat pravilno ocenil vzorec (glede na standard D-2), saj je tudi podrobna analiza pokazala manjšo število preživetja sposobnih celic fitoplanktona v vzorcu. Glede na dejstvo, da se pri dokazovanju skladnosti balastne vode gleda meja desetih organizmov na mililiter balastne vode, lahko zaključimo, da je od 114 povprečnih meritev inštrument zatajil samo v sedmih primerih, ko je podal nizek  $F_m/F_v (< 0,300)$ , kjer je podrobna analiza dokazala v vzorcu  $\geq 10$  celic/ml balastne vode.

Pri drugi analizi podatkov smo skupine določili glede na rezultate podrobne analize: naredili smo štiri skupine. V prvi so bili vzorci z manj kot 10 celicami, v drugi z 10–30 celicami, v tretji z 31–70 celicami in v zadnji skupini z več kot 70 celicami/ml v vzorcu balastne vode. S temi skupinami smo želeli dokazati povezanost med razponi ocen indikativnega inštrumenta v primerjavi z dejanskimi vrednostmi podrobne analize. Na podlagi te analize lahko potrdimo, da je v vseh primerih (19 vzorcev), kjer je podrobna analiza pokazala  $< 10$  celic/ml vzorca

balastne vode, inštrument podal oceno vitalnosti  $F_m/F_v$  manjšo od 0,300, v 18 primerih pa manjšo od 0,200. To pomeni, da inštrument ni naredil nobene napake tipa I (lažna pozitivna vrednost).

Ko združimo obe analizi, lahko zaključimo, da indikativni inštrument deluje zelo dobro pri nizkih koncentracijah organizmov do 10 celic (vse vrednosti  $F_m/F_v$  so bile nižje od 0,300), pri višjih koncentracijah organizmov pa je razpon ocen indikativnega inštrumenta nekoliko večji. Večina ocen, 88 podatkov od 95 vzorcev z 10 celicami/ml ali več, ima oceno  $F_m/F_v$  višjo od 0,300, kar pomeni, da inštrument pri ocenah dobro sledi porastu organizmov. Inštrument je pravilno ocenil skladnost vseh vzorcev, kjer je podrobna analiza potrdila skladnost z mejami standarda. Pri indikaciji o možni neskladnosti je inštrument tudi opravil dobro delo in večinoma pravilno nakazal stanje v vzorcu, saj je v samo sedmih primerih od stoštrinajstih podal  $F_m/F_v < 0,300$ , kjer je podrobna analiza podala rezultate, ki so bili višji od meje dovoljenega za doseganje skladnosti.

Na podlagi analiz ocen inštrumenta sklepamo, da je zastavljena hipoteza o ustreznosti inštrumenta Walz Water PAM za odločanje o neskladnosti vzorcev balastne vode potrjena. Kljub uspešnosti inštrumenta pa je treba pozornost posvetiti napakam tipa II, ki povzročajo tveganje za okolje zaradi napačne indikacije skladnosti vzorca. Teh napak je imel inštrument kar sedem. Inštrumente je treba še naprej razvijati in ga izpopolniti do te stopnje, da bomo lahko z visoko stopnjo verjetnosti opravljali indikacijske meritve na vzorcih balastne vode in pravilno izvajali ukrepe Konvencije.

Inštrument je prenosljiv, uporaben na ladji v zaprtem prostoru, podaja hitre rezultate in je enostaven za uporabo. Rezultati žal niso izraženi v enostavnih enotah za uporabnika (npr. številu celic na količino vode), zato je vedno potrebna dodatna interpretacija rezultatov. Inštrument meri tudi celotno vsebnost živega fitoplanktona v vodi in ne le tistega v območju dimenzije standarda D-2, zato bi rezultati meritev vzorcev z večjo količino živega planktona izven tega dimenzijskega območja povzročali večje odstopanje. Kljub temu menimo, da smemo ta instrument uporabljati za indikativne analize za ugotavljanje morebitne neskladnosti balastne vode s Konvencijo.



## VIRI

Carlton, JT. 1996. Biological Invasions and Cryptogenic Species. *Ecology* 77(6): 1653–1655.

David, M. 2007. *A decision support system model for ballast water management of vessels. Odločitveni model upravljanja balastnih vod na ladjah*. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za pomorstvo in promet.

David, M. 2013. *Ballast water sampling for compliance monitoring – Ratification of the Ballast Water Management Convention: Final report of research study (for WWF International)*. [http://awsassets.panda.org/downloads/wwf\\_bws\\_guidance\\_study\\_april13.pdf](http://awsassets.panda.org/downloads/wwf_bws_guidance_study_april13.pdf), 66 str. (pregledano 19. 7. 2016).

David, M. 2015. Vessels and ballast water. V: David, M. (ur.), Gollasch, S. (ur.). *Global maritime transport and ballast water management: issues and solutions*. Invading nature – Springer series in invasion ecology, vol. 8: 13–34.

David, M., Gollasch, S., Cabrini, M., Perkovič, M., Bošnjak, D., Virgilio, D. 2007. Results from the first ballast water sampling study in the Mediterranean sea – the Port of Koper study. *Marine Pollution Bulletin* 54 (1): 53–65.

Frazier, M., Miller, A.W., Lee II, H., Reusser, D.A.. 2013. Counting at low concentrations: the statistical challenges of verifying ballast water discharge standards. *Ecological Applications*, 23 (2): 339–351.

Gollasch, S., David, M. 2010a. Recommendations how to take a representative ballast water sample, emerging ballast water management system. Malmö: IMO-WMU Research and Development Forum.

Gollasch, S., David, M. 2010b. Testing sample representativeness of a ballast water discharge and developing methods for indicative analysis. Lisbon: European Maritime Safety Organization (EMSA).

Gollasch, S., David, M. 2012. On board tests of the organism detection tools BallastCAM, FluidImaging USA, Hach-PAM-fluorometer USA, and Walz-Water-PAM-fluorometer. Results and findings. Prepared for Interreg IVB North Sea Ballast Water Opportunity project: 10 str.

Gollasch, S., David, M. 2013. Recommendations for Representative Ballast Water Sampling. Final report for research study of the Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH), Hamburg, Germany.

Gollasch, S., David, M. 2015. Ballast water sampling and sample analysis for compliance control. V: David, M. (ur.), Gollasch, S. (ur.). Global maritime transport and ballast water management: issues and solutions. Invading nature – Springer series in invasion ecology, vol. 8: 171–223.

Gollasch, S., David, M., Francé, J., Mozetič, P. 2015a. Quantifying indicatively living phytoplankton cells in ballast water samples – recommendations for Port State Control. Marine Pollution Bulletin, 101(2): 768–775.

Gollasch, S., David, M., Keast, K., Parker, N., Wiley, C. 2015b. Policy and legal framework and current status of ballast water management requirements. V: David, M. (ur.), Gollasch, S. (ur.). Global maritime transport and ballast water management: issues and solutions. Invading nature – Springer series in invasion ecology, vol. 8: 59–88.

Gollasch, S., Minchin, D., David, M. 2015c. The transfer of harmful aquatic organisms and pathogens with ballast water and their impacts. V: David, M. (ur.), Gollasch, S. (ur.). Global maritime transport and ballast water management: issues and solutions. Invading nature – Springer series in invasion ecology, vol. 8: 35–58.

Gollasch, S., Stehouwer, PP., David, M. 2012. Technical Outline and Requirements for Organism Detection Systems for Establishing Compliance Enforcement with ballast water management requirements: Final report: *prepared for Interreg IVB North Sea Ballast Water Opportunity project*: 67 str.

ICES, 2010. Report of the ICES/IOS/IMO Working Group on Ballast and other Ship Vectors (WGBOSV), Hamburg.

IMO, 2004. International Convention for the Control and Management of Ships' Ballast Water and Sediments 2004. International Maritime Organization, London.

IMO, 2008a. Guidelines for ballast water sampling (G2), IMO Resolution MEPC.173(58). London: International Maritime Organization.

IMO, 2008b. Guidelines for approval of ballast water management systems (G8), IMO Resolution MEPC.174(58). London: International Maritime Organization.

IMO, 2009a. Development of Guidelines and Other Documents for Uniform Implementation of the 2004 BWM Convention, Report of the working Group. BLG 13/WP.5, Sub-Committee on Bulk Liquid and Gases. London: International Maritime Organization: 35 str.

IMO, 2009b. Report to the Marine Safety Committee and the Marine Environment Protection Committee. BLG 13/18, Sub-Committee on Bulk Liquids and Gases. London: International Maritime Organization: 120 str.

IMO, 2010a. Additional guidance for port States and ships during enforcement of the standards and requirements of the Ballast Water Management Convention, BLG 15/5/1. London: International Maritime Organization.

IMO, 2010b. Additional guidance on indicative analysis, BLG 15/5/4. London: International Maritime Organization.

IMO, 2010c. Additional guidance on sampling methodologies and sampling protocols, BLG 15/5/5. London: International Maritime Organization.

IMO, 2010d. Additional guidance for the analysis of a ballast water sample, BLG 15/5/6. London: International Maritime Organization.

IMO, 2013. International Convention for the Control and Management of Ships' Ballast Water and Sediments, 2004, Guidance on ballast water sampling and analysis for trial use in accordance with the BWM Convention and Guidelines (G2), BWM.2/Circ.42. London: International Maritime Organisation.

International Maritime Organization, Status of Conventions.  
<http://www.imo.org/en/About/Conventions/StatusOfConventions/Pages/Default.aspx>  
(Pridobljeno, 7. 7. 2016).

Walz Product. [http://www.walz.com/products/chl\\_p700/water-pam/cuvette\\_version.html](http://www.walz.com/products/chl_p700/water-pam/cuvette_version.html)  
(Pridobljeno, 2. 8. 2016).