

Kommissioneringstest af ballastvandsystemer – metode til test af UV behandling

Teknisk notat udarbejdet under projektet Dansk Maritimt Testcenter med støtte fra Den Danske Maritime Fond og Orient's Fond.

Edina Chua og Anne Sofie Kiil

DHI – Maritime Tech

Udgivet: 30 11 2021

Kontakt: Edina Chua (ecl@dhigroup.com)

Internationale udledningskrav til ballastvand

Med implementeringen af den internationale ballastvandkonvention skal alle større skibe opfylde kravene til udledning af ballastvand i IMOs Regulering D-2 [IMO, BWM.2/Circ.70/Rev.2]. Langt de fleste skibe installerer et typegodkendt ballastvandsystem (BWMS, *Ballast Water Management System*) til behandling af ballastvandet inden udledning. Ved installation af ballastvandsystemet skal der udføres en kommissioneringstest for at validere, at systemets mekaniske, fysiske og kemiske processer virker korrekt. Kommissioneringstesten udføres ved biologiske analyser af behandlet ballastvand for at verificere, at ballastvandsystemet lever op til udledningsstandard i Regulering D-2.

Krav til indholdet af levende organismer i udledt ballastvand i henhold til Regulering D-2.

Organismer		Udledningskrav
≥50 µm	Zooplankton	<10 organismer/m ³
≥10 µm og <50 µm	Phyto- og zooplankton	<10 organismer/mL
Vibrio cholerae (serotype O1 og O139)	Bakterier	<1 CFU ¹⁾ /100 mL
E. coli	Bakterier	<250 CFU ¹⁾ /100 mL
Enterokokker	Bakterier	>100 CFU ¹⁾ /100 mL

1) CFU, colony-forming units (bakterier der vokser i specifikt medium)

Biologiske analyser af ballastvand behandlet med UV lys

De almindeligt anvendte metoder til at kvantificere levende organismer $\geq 10 \mu\text{m}$ and $< 50 \mu\text{m}$ omfatter såkaldt *indikative metoder* (der fx er baseret på måling af fluorescens) og *detaljerede metoder* (der fx er baseret på vitalfarvning og mikroskopi). Måling af fluorescens og mikroskopi efter vitalfarvning viser, om organismene er levende, når analysen udføres. Disse metoder giver en udfordring, når et ballastvandsystem bruger ultraviolet (UV) lys som desinfektion. UV behandling af ballastvand medfører, at organismernes DNA beskadiges. Organismene dør i nogle tilfælde ikke øjeblikkeligt som følge af UV stråling, men skaderne på DNA'et betyder, at de ikke kan formere sig. Dermed er konsekvensen, at organismer med UV beskadiget DNA ikke vil formere sig og blive invasive arter, når de udledes med det behandlede ballastvand. Når kommissioneringstests af UV-ballastvandsystemer udføres med indikative metoder eller vitalfarvning og mikroskopi, er der således en risiko for misvisende resultater, hvor organismer registreres som 'levende', uanset at de ikke kan formere sig i miljøet og ikke udgør en risiko for at blive invasive arter.

For at imødekomme de ovenfor nævnte problemer i tests af UV-ballastvandsystemer, har der været interesse for metoder, der måler evnen til formering for organismene i det behandlede ballastvand. Den såkaldte Most Probable Number (MPN) metode bestemmer det mest sandsynlige antal alger (phytoplankton), der er i stand til at formere sig. Med MPN metoden tages der højde for, at nogle alger vil være i live efter UV behandlingen, men ikke i stand til at reproducere sig og udgøre en trussel for det vandmiljø de ender i.

Hvordan påvirkes ballastvandprøver af transporttid og temperatur

Hvis MPN metoden skal kunne anvendes til kommissioneringstest, er det nødvendigt at transportere vandprøver fra skibet til et laboratorium. Det betyder, at betydningen af transporttiden og temperaturen under transport må valideres, så der er sikkerhed for, at resultatet af MPN analysen af prøver udtaget ombord på skibet er retvisende.

Til validering blev der fremstillet vandprøver med den marine grønalge *Tetraselmis suecica* i to forskellige koncentrationer: Den ene koncentration repræsenterede en prøve, som ville leve op til udledningsstandard (5 - < 10 organismer/mL), og den anden koncentration repræsenterede en prøve, der ikke ville leve op til udledningsstandard (ca. 100 organismer/mL), og disse to blev der lavet undersøgelser på.

Undersøgelsen viste, at det er muligt at transportere vandprøverne i op til 144 timer ved 4-20°C, uden at resultaterne af MPN metoden påvirkes. Det konkluderes, at MPN metoden er anvendelig til at analysere organismer i størrelsesordenen $\geq 10 \mu\text{m}$ and $< 50 \mu\text{m}$ i vandprøver udtaget ombord på et skib, når transporttiden er kortere end 144 timer og temperaturen holdes inden for 4-20°C.

Undersøgelsen er beskrevet i detaljer nedenfor.

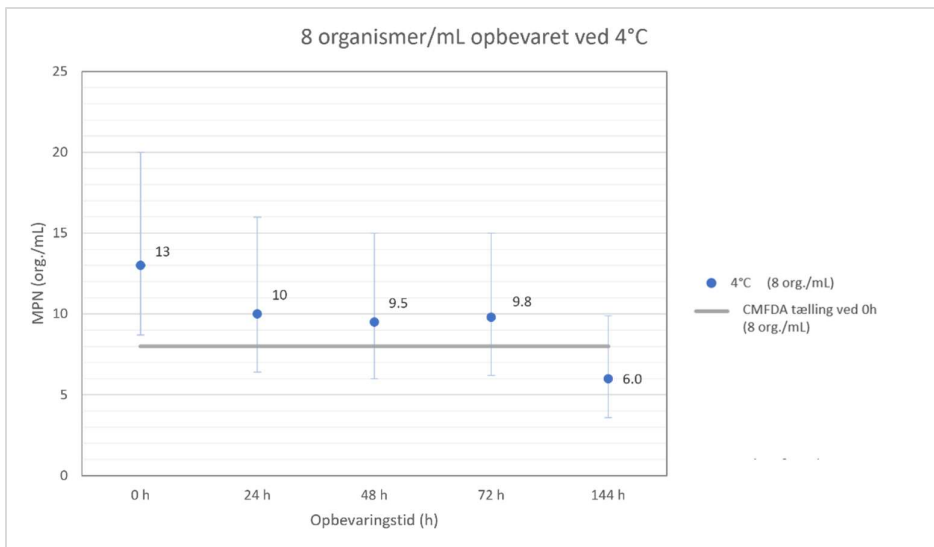
Resultater fra MPN undersøgelsen

To forskellige koncentrationer af *Tetraselmis suecica* (5 - < 10 organismer/mL og ca. 100 organismer/mL) blev fremstillet ved at fortynde en koncentreret *Tetraselmis suecica* kultur med havvand. Koncentrationen af organismer i prøverne blev analyseret ved at tælle seks delprøver farvet med CMFDA/FDA i mikroskop. Denne tælling verificerede, at koncentrationerne af *Tetraselmis* i de to prøver var hhv. 8 og 99 organismer/mL.

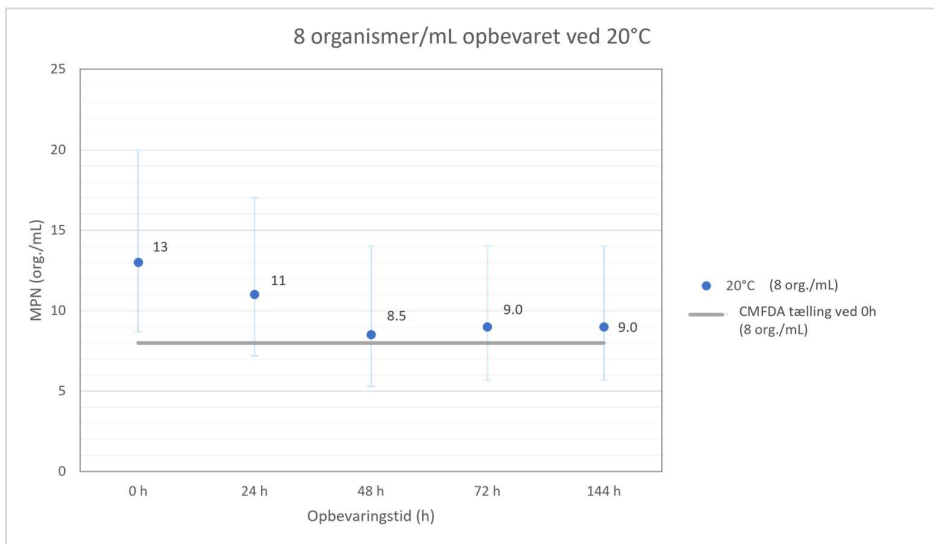
Effekter af transporttiden blev undersøgt ved MPN analyse af prøverne umiddelbart (0-6 timer) efter prøvetagning og efter opbevaring af prøverne i mørke i 24, 48, 72 og 144 timer.

For at undersøge effekter af temperaturen blev prøverne opbevaret ved enten 4°C eller 20°C.

Efter de forskellige opbevaringstider blev prøverne fortyndet, som beskrevet i MPN metoden, og efter 14 dages inkubering blev prøverne analyseret. Resultaterne fra MPN analysen ved den lave koncentration (8 organismer/mL) af *Tetraselmis suecica* er vist i Figur 1 og Figur 2.



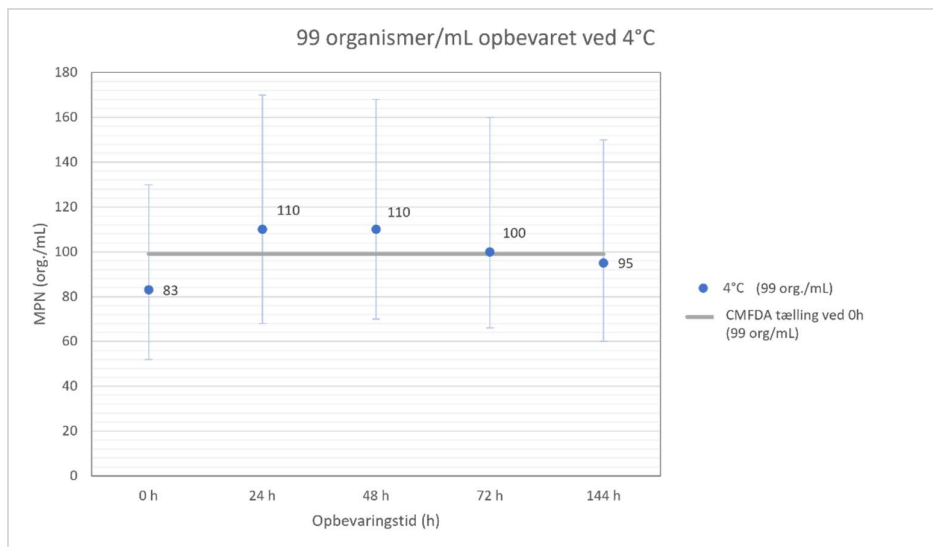
Figur 1 Resultater fra MPN analysen af prøver af *Tetraselmis suecica* i koncentrationen 8 organismer/mL efter 0; 24; 48; 72 og 144 timers opbevaring ved 4°C. 95% øvre og nedre konfidensinterval er angivet ved de lodrette linjer. Den vandrette grå linje viser resultatet af CMFDA/FDA tællingen ved 0 timer.



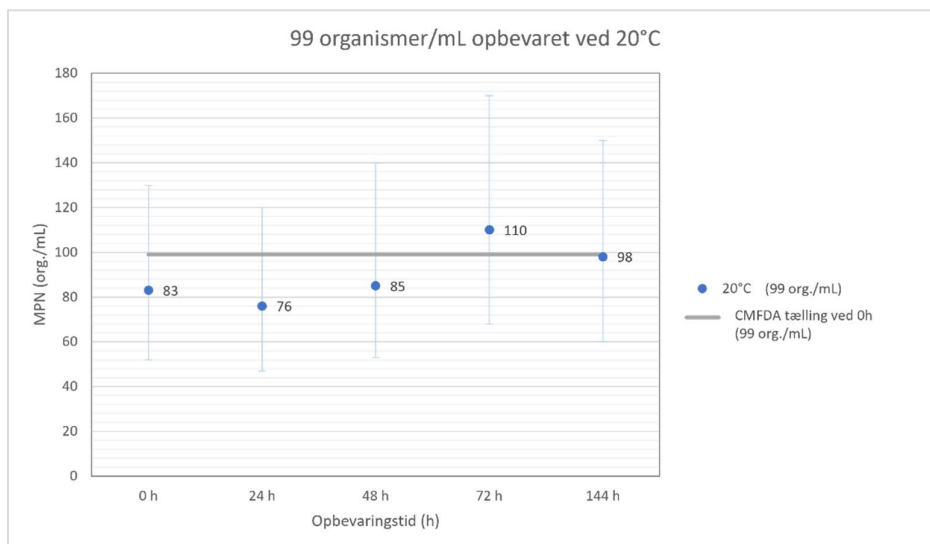
Figur 2 Resultater fra MPN analysen af prøver af *Tetraselmis suecica* i koncentrationen 8 organismer/mL efter 0; 24; 48; 72; og 144 timers opbevaring ved 20°C. 95% øvre og nedre konfidensinterval er angivet ved de lodrette linjer. Den vandrette grå linje viser CMFDA/FDA tællingen ved 0 timer.

Prøven med den lave koncentration af *Tetraselmis* blev målt med MPN til 13 organismer/mL (95% konfidensinterval: 8.7 – 20 organismer/mL), hvilket var højere end CMFDA/FDA tællingen i mikroskop (8 organismer/mL, standard afvigelse ± 1.5). For alle de øvrige MPN målinger var konfidensintervallet i overensstemmelse med CMFDA/FDA resultatet. MPN resultatet ved 0 timer var ikke signifikant forskelligt fra MPN resultaterne for prøverne, der var opbevaret i 24-144 timer, hvilket ses ved de overlappende konfidensintervaller. Der ses de samme tendenser for prøverne opbevaret ved 4°C og 20°C.

Resultaterne fra MPN analysen ved den høje koncentration (99 organismer/mL) af *Tetraselmis suecica* er vist i Figur 3 og Figur 4.



Figur 3 Resultater fra MPN analysen af prøver af *Tetraselmis suecica* i koncentrationen 99 organismer/mL efter 0; 24; 48; 72; og 144 timers opbevaring ved 4°C. 95% øvre og nedre konfidensinterval er angivet med lodrette linjer. Den vandrette grå linje viser CMFDA/FDA tællingen ved 0 timer.



Figur 4 Resultater fra MPN analysen af prøver af *Tetraselmis suecica* i koncentrationen 99 organismer/mL efter 0; 24; 48; 72; og 144 timers opbevaring ved 20°C. 95% øvre og nedre konfidensinterval er angivet med lodrette linjer. Den vandrette grå linje viser CMFDA/FDA tællingen ved 0 timer.

Prøven med den høje koncentration af *Tetraselmis* blev målt med MPN til 83 celler/mL (95% konfidensinterval: 52 – 130 organismer/mL), hvilket var i overensstemmelse med CMFDA/FDA tællingen i mikroskop (99 organismer/mL, standard afvigelse ± 11). Konfidensintervallet for alle de øvrige MPN målinger var ligeledes i overensstemmelse med CMFDA/FDA resultatet. MPN resultatet ved 0 timer var ikke signifikant forskellige fra MPN resultaterne for prøverne, der var opbevaret i 24-144 timer, hvilket ses ved de overlappende konfidensintervaller. Der ses de samme tendenser for prøverne opbevaret ved 4°C og 20°C.