

UDK/UDC: 628.312/.313:629.5

Prejeto/Received: 10.02.2020

Izvirni znanstveni članek – *Original scientific paper*

Sprejeto/Accepted: 02.09.2020

**PULZNO AMPLITUDNA MODULACIJA KOT INDIKATIVNA METODA ZA NADZOR
RAVNANJA Z BALASTNIMI VODAMI – TEST INSTRUMENTA WALZ WATER PAM**
**PULSE AMPLITUDE MODULATION AS AN INDICATIVE METHOD FOR MONITORING
COMPLIANCE OF BALLAST WATER MANAGEMENT – WALZ WATER PAM
INSTRUMENT TEST**

Aja Golja^{1,*}, Klaudija Sapač², Dušan Žagar², Matej David^{3,4}

¹ Aja Golja, Winkelbuelhof 7, 6043 Adligenswil, Švica

² Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo, Univerza v Ljubljani, Jamova cesta 2, 1000 Ljubljana

³ Dr. Matej David Consult, Korte 13e, 6310 Izola

⁴ Sveučilište u Rijeci, Pomorski fakultet, Studentska ulica 2, 51000 Reka, Hrvaška

Izvleček

Ladje so eden glavnih prenašalcev škodljivih vodnih organizmov in mikrobnih povzročiteljev bolezni po svetu. Predpis D-2 Mednarodne konvencije za nadzor in ravnanje z ladijsko balastno vodo in usedlinami določa največje število za preživetje sposobnih organizmov na enoto prostornine zaradi preprečevanja prenosa, širjenja ter vnosa škodljivih vodnih organizmov in mikrobnih povzročiteljev bolezni po svetu. Konvencija tudi predpisuje inšpekcijski pregled balastnih vod vsake ladje za ugotavljanje skladnosti z zahtevami. Pomorska inšpekcija vzorči balastno vodo na ladji in izvaja hitre indikativne analize vzorcev balastne vode z indikativnimi instrumenti. Ocenili smo uporabnost instrumenta Walz Water PAM za indikativno analizo balastnih vod. Instrument pri meritvi oceni biomaso fitoplanktona (F_0) v vzorcu in njegovo fotokemično učinkovitost (F_v/F_m). Meritve instrumenta smo primerjali z rezultati laboratorijske podrobne analize vzorcev za velikostno skupino organizmov z najmanjšim premerom 10–50 μm , skladno z zahtevami predpisa D-2. Instrument je pravilno ocenil vseh 19 v podrobni analizi skladnih vzorcev, od 95 v podrobni analizi neskladnih vzorcev pa jih je pravilno ocenil 88 (93 %). Zaključimo lahko, da je instrument primeren za indikativne analize pri nadzoru skladnosti balastne vode s Konvencijo.

Ključne besede: Walz Water PAM, fluorometrija, pulzno amplitudna modulacija, balastna voda, nadzor skladnosti, indikativna analiza.

Abstract

Vessels are considered one of the primary pathways for the transfer of harmful aquatic organisms and pathogens. The D-2 Regulation of the Ballast Water Management Convention specifies the maximum number of organisms per unit volume in order to prevent their spread and transfer, and the introduction of harmful aquatic organisms and pathogens around the globe. The Convention also requires an inspection of every ship's

* Stik / Correspondence: aja.golja7@gmail.com

© Golja A. et al.; Vsebina tega članka se sme uporabljati v skladu s pogoji [licence Creative Commons Priznanje avtorstva – Nekomercialno – Deljenje pod enakimi pogoji 4.0](#).

© Golja A. et al.; This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution – Non Commercial – Share Alike 4.0 Licence](#).

<https://doi.org/10.15292/acta.hydro.2020.03>

ballast water in order to verify compliance with the requirements. Inspectors take samples of ballast water and perform quick analyses on board using indicative instruments. We evaluated the appropriateness of the Walz Water PAM instrument for indicative analysis of ballast water. The instrument estimates the phytoplankton biomass and its photochemical efficiency. The instrument measurements were compared to the results of detailed laboratory analyses of samples for phytoplankton cells in the size range 10–50 μm and with minimum diameter, as addressed by the Regulation D-2. The instrument correctly evaluated all 19 compliant samples from the detailed analyses and 88 of 95 non-compliant samples from detailed analyses (93%). We can thus conclude that Walz Water PAM is a suitable tool for the indicative analysis of vessels' ballast water.

Keywords: Walz Water PAM, fluorometry, Pulse Amplitude Modulation, ballast water, compliance monitoring and enforcement, indicative analysis.

1 Uvod

V okolju najdemo avtohtone vrste organizmov, vrste neznanega izvora (tj. vrste, katerim ni možno zanesljivo določiti izvora) in tujerodne vrste, ki so bile vnesene v neko vodno okolje. Največjo skrb je treba posvetiti invazivnim tujerodnim vrstam, saj 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 škodujejo zdravju ljudi. Balastna voda vsebuje usedline in organizme, ki so lahko povzročitelji bolezni in se s plovbo prenašajo z ene geografske lokacije na drugo, predvsem med pristanišči. Ladje so tako eden glavnih prenašalcev škodljivih vodnih organizmov in mikrobnih povzročiteljev bolezni (angl. harmful aquatic organisms and pathogens – HAOP). Po ocenah za leto 2013 se po svetu prenese približno 3,1 milijona ton balastnih vod letno (David, 2015), z njimi pa se lahko po ocenah prenese več kot 10.000 vrst organizmov tedensko (Carlton, 1999), zato je treba vsako ladjo obravnavati kot potencialno prenašalko vodnih organizmov (Gollasch et al., 2015c).

Mednarodna pomorska organizacija (IMO) je izdala Mednarodno konvencijo za nadzor in ravnanje z ladijsko balastno vodo in usedlinami (v nadaljevanju Konvencija), ki je 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 morskega okolja pred negativnimi posledicami HAOP, ki se prenašajo z balastno vodo, ter s tem prispevati k ohranjanju avtohtone biotske

raznoverstnosti. Konvencija je stopila v veljavo 9. septembra 2017. S tem je začel veljati standard D-2 za nove ladje (postopoma do leta 2024 pa se uvaja za preostale ladje), tj. standard kakovosti izpusta balastne vode, ki narekuje, da smejo ladje izpustiti le dovoljeno število za življenje in razmnoževanje sposobnih organizmov na določen volumen izpuščene balastne vode.

Standard D-2 določa največje število organizmov na enoto prostornine v treh velikostnih razredih. Ladja z balastno vodo sme izpustiti:

- manj kot 10 organizmov, sposobnih preživetja, ki so v najmanjši dimenziji enaki ali večji od 50 μm , na kubični meter balastne vode (v splošnem zooplankton);
- manj kot 10 organizmov, sposobnih preživetja, ki so v najmanjši dimenziji manjši od 50 μm in večji ali enaki 10 μm , na mililiter balastne vode (v splošnem fitoplankton);
- manj kot:
 - 1 cfu (angl. colony-forming unit; enota, ki izraža število mikrobnih celic ali njihovih skupkov, iz katerih se razvije posamezna kolonija) indikatorskih mikroorganizmov *Vibrio Cholerae* na 100 ml balastne vode,
 - 250 cfu *Escherichia coli* na 100 ml balastne vode in
 - 100 cfu črevesnih enterokokov na 100 ml balastne vode.

Kot dokaz, da vzorec balastne vode ni v skladu s standardom D-2, je dovolj preseženo število HAOP v enem samem velikostnem razredu, za

dokazovanje skladnosti pa je treba preveriti vse velikostne razrede, določene v standardu D-2.

V 9. členu Konvencije je za ugotavljanje skladnosti balastne vode s Konvencijo predpisan inšpekcijski nadzor ladij, ki naj bi ga opravljale od države pogodbenice pooblaščen osebe. Pomorski inšpektor (oziroma pooblaščen oseba) lahko po zahtevah Konvencije med drugim vzorči in analizira ladijsko balastno vodo po smernicah G2 (IMO, 2008).

V nekaterih državah se je kot ovira za ratifikacijo Konvencije izkazalo pomanjkanje zanesljivih metod vzorčenja in analiz balastnih vod za izvajanje nadzora Konvencije (Gollasch in David, 2010b; David, 2013; Gollasch in David, 2015; Gollasch et al., 2015a). Študije kažejo, da so rezultati analiz zaradi velikosti balastnih tankov in nehomogene porazdelitve organizmov v njih pogosto netočni oziroma niso reprezentativni (Gollasch in David, 2010a). Nepravilna uporaba instrumentov ter uporaba različnih instrumentov vzorčenja in analiz pa lahko daje neustrezne, celo zavajajoče rezultate (Gollasch in David, 2015).

V splošnem ločimo dve vrsti analiz: podrobne (npr. mikroskopiranje) in indikativne analize (npr. zaznavanje fluorescentne aktivnosti klorofila CFA, meritve količine adenozin trifosfata ATP). Prve omogočajo neposredno in točno določanje števila za preživetje sposobnih organizmov, vendar so drage, zamudne in zahtevajo strokovno znanje in izkušnje. Indikativne analize so enostavnejše, hitrejše in cenejše, vendar instrumenti merijo biološke, fizikalne in kemijske parametre, ki se jih nato posredno interpretira kot količino za preživetje sposobnih organizmov (Bradie et al., 2018).

Namen smernic za vzorčenje G2 (IMO, 2008) je bil zagotoviti ustrezne in zanesljive postopke za vzorčenje in analizo balastne vode. Smernice so pomanjkljive, saj postopki vzorčenja in analiz niso natančno opredeljeni. Ker obstaja širok spekter razpoložljivih metod za analize balastnih vod in posledično rezultatov, se načini primerne vzorčenja in analiz še vedno ugotavljajo z različnimi študijami. V pregledanih študijah in poročilih testiranja primernih metod (ICES, 2010; David, 2013; David et al., 2007; Frazier et al., 2013;

Gollasch in David, 2010a, b; 2012; 2013, Gollasch et al., 2015b) so navedeni rezultati vzorčenja in analiz, ugotovitve ter predlagana priporočila in izboljšave za vzorčenje in analizo balastne vode. Namen teh študij je tudi odpraviti nejasnosti glede izvajanja vzorčenja in nedopustne napake, katerih posledica je oškodovanje ladij, torej gospodarska škoda, ali negativen vpliv na okolje in zdravje ljudi (IMO, 2004). Pri napakah tipa I (lažna pozitivna vrednost) indikativna analiza pokaže neskladnost, vendar je dejanska koncentracija organizmov v balastni vodi v mejah dovoljenega. V tem primeru mora inšpektor ladji prepovedati izpust balastne vode, dokler grožnja ni odstranjena (IMO, 2004), s čimer pa lahko povzroči gospodarske posledice za mednarodno trgovino, če ladja ne more nadaljevati s predvidenimi tovornimi operacijami. Pri napakah tipa II (lažna negativna vrednost) indikativna analiza pokaže skladnost balastne vode s Konvencijo, voda pa vsebuje preveliko število organizmov na volumen balastne vode. Takšna napaka ima lahko negativne posledice za okolje.

Pred podrobnim testiranjem ladje pri nadzoru skladnosti se izvede indikativna analiza vzorcev, s katero takoj ocenimo potencialno skladnost ali neskladnost s Konvencijo. Uporabljati je treba indikativne metode, ki omogočajo hitro oceno stanja in instrumente, ki so dovolj zanesljivi ter enostavni za uporabo in prenos po ladji (Gollasch et al., 2015a). V začetku leta 2019 je MEPC (2019) objavil seznam 12 indikativnih instrumentov, ki so bili s strani strokovnjakov ter s pomočjo objavljenih raziskav prepoznani kot na trgu razpoložljivi instrumenti, namenjeni analizi balastnih vod. Med njimi ni instrumenta Walz Water PAM, s katerim je bilo v zadnjih letih analizirano precejšnje število vzorcev balastne vode ob hkratni podrobni analizi.

Glavni cilj raziskave je torej primerjalna analiza razpoložljivih rezultatov meritev instrumenta Walz Water PAM in podrobnejših laboratorijskih analiz. Na podlagi izvedene analize želimo preveriti ustreznost indikativnega instrumenta za ocenjevanje skladnosti balastne vode z zahtevami Konvencije oz. ugotoviti, ali so rezultati izbranega indikativnega instrumenta primerljivi z rezultati podrobnih analiz.

2 Metode in materiali

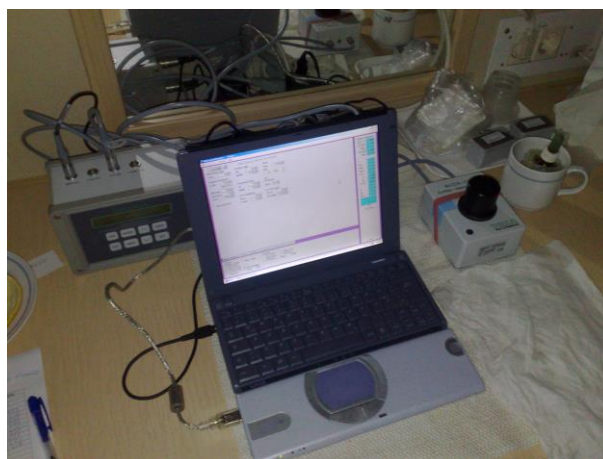
Večina v raziskavi uporabljenih podatkov je bila objavljena v treh poročilih (IMO, 2009; Gollasch in David, 2010b; Gollasch in David, 2013), nekatere dodatne, doslej neobjavljene podatke pa smo pridobili od izvajalcev meritev in avtorjev omenjenih poročil (osebni vir Gollasch in David, 2016).

Vzorci so bili odvzeti na vzorčevalnih mestih na treh ladjah z inštalacijo cevi na balastni cevni vod ob različnih operacijah ladje, kot so črpanje balastne vode v balastne tanke in izpuščanje balastne vode. Vzorci balastne vode za analize so bili zajeti preko pretočnega razdelilnika na inštalirani cevi, ki je tok razdelil na enake dele. Na treh ladjah je bilo skupno opravljenih 24 vzorčenj in pridobljenih 114 vzorcev, saj so pri vsakem vzorčenju zaporedno odvzeli več vzorcev. Na vsakem vzorcu so bile opravljene tri ponovitvene meritve z indikativnim instrumentom Walz Water PAM, v laboratoriju na inštitutu NIOZ (Royal Netherlands Institute for Sea Research) pa je bila izvedena ena primerjalna analiza štetja organizmov z mikroskopijo. Podrobni podatki o načinu vzorčenja in izvajanja analiz so objavljeni v poročilih (IMO, 2009; Gollasch in David, 2010b; Gollasch in David, 2013).

Indikativni instrument Walz Water PAM je naravnan za ugotavljanje prisotnosti živega fitoplanktona v vzorcu glede na klorofilno fluorescenco in je primeren za ocenjevanje fotosintetske aktivnosti fitoplanktona v vodi. Velika večina fitoplanktonskih organizmov je v velikostnem razredu z najmanjšo dimenzijo 10–50 μm , enem od treh velikostnih razredov organizmov po standardu D-2, zato smo se v tej študiji osredotočili samo na ta velikostni razred organizmov. Pri tem velja poudariti, da Walz Water PAM meri vsebnost celotnega živega fitoplanktona v vodi in ne le tistega v območju dimenzije standarda D-2 (Bradie et al., 2017; Gollasch et al., 2012, 2015a).

Programska oprema omogoča uporabniku upravljanje instrumenta, nadzorovanje operacij ter nastavitve funkcij in pregled rezultatov meritev neposredno preko računalnika (Slika 1). Detektorska enota instrumenta je zasnovana za

izjemno občutljive meritve fluorescence klorofila pri zelo majhnih koncentracijah, zlasti za proučevanje fitoplanktona v naravnih vodah. Ima valjasto držalo za stekleno kiveto premera 15 mm, obdano s svetlečimi LED-diodami, ki instrumentu zagotavljajo merjenje svetlobe in aktinično (modri del spektra) osvetlitev vzorca.



Slika 1: Indikativna analiza balastne vode na ladji z instrumentom Walz Water PAM.

Figure 1: On-board indicative analysis of ballast water using the Walz Water PAM instrument.

Instrument Walz Water PAM s serijo oddanih svetlobnih signalov oceni osnovno fluorescenco na temo prilagojenega vzorca F_0 (interpretiramo jo kot oceno biomase) in maksimalno fluorescenco F_m (angl. maximum fluorescence yield) (Gollasch in David, 2010b). Razliko med F_m in F_0 imenujemo variabilna fluorescena F_v (angl. variable fluorescence), ki prikaže različne odzive organizmov na svetlobne impulze različnih jakosti. Razmerje F_v/F_m je indikator potencialne oz. maksimalne fotokemične učinkovitosti in je sorazmeren fotosintezi. Razmerje F_v/F_m interpretiramo kot vitalnost zaznanih organizmov, pri čemer višje razmerje pomeni večjo vitalnost organizmov (Gollasch in David, 2010b, 2012; Gollasch et al., 2015a).

2.1 Analiza podatkov

Množica podatkov, na katerih smo opravili analizo, obsega rezultate treh meritev z indikativnim instrumentom Walz Water PAM, ki je za vsakega izmed 114 vzorcev podal oceno biomase F_0 (kot

kvantitativni element) in oceno vitalnosti alg F_v/F_m (kot kvalitativni element). Te podatke smo primerjali z rezultati podrobne analize, torej s številom za življenje sposobnih organizmov na mililiter vzorca balastne vode (Golja, 2016). Preštete organizme iz podrobne analize smo primerjali s srednjo vrednostjo trikrat izmerjenih vrednosti F_v/F_m in F_0 . Da bi potrdili ustreznost uporabe srednjih vrednosti treh zaporednih meritev pri nadaljnjih analizah za oceno ustreznosti instrumenta Walz Water PAM, smo preverili spremenljivost, homogenost oziroma skladnost meritev istega vzorca. Uporabili smo metodo medrazredne korelacije, katere rezultat je medrazredni korelacijski koeficient (angl. interclass correlation coefficient, ICC), ki nam pove, koliko so si posamezne enote znotraj enega vzorca podobne med seboj. V našem primeru smo preverjali, kako so si med seboj podobni rezultati trikrat izvedenih meritev (F_v/F_m in F_0) na enem vzorcu balastne vode.

Sodobni način izračuna ICC poteka preko analize variance (ANOVA) in se pogosto uporablja predvsem na področju medicine. V splošnem je opredeljen kot razmerje med varianco, ki jo lahko pripišemo razlikam med vzorci, in celotno opaženo varianco meritev (Shrout in Fleiss, 1979):

$$ICC = \frac{var_{med\ vzorci}}{var_{med\ vzorci} + var_{med\ ponovitvami} + var_{napake}} \quad (1)$$

ICC lahko doseže vrednosti med 0 in 1, pri čemer velja naslednja interpretacija skladnosti izmerjenih vrednosti: < 0,50 slaba, 0,50–0,75 zmerna, 0,75–0,90 dobra in > 0,90 odlična (Koo in Li, 2016). Vrednosti ICC smo izračunali s pomočjo rezultatov dvofaktorske analize variance. Ker je bila v našem primeru tako za meritve F_v/F_m kot F_0 prepoznana odlična skladnost izmerjenih vrednosti ($ICC \geq 0,95$), smo za nadaljevanje študije primerjave indikativnih meritev s podrobnimi analizami uporabili srednjo vrednost izmerjenih parametrov.

Osnovna interpretacija vrednosti razmerja F_v/F_m (sposobnost preživetja organizmov) po NIOZ (Gollasch in David, 2010b, str. 96) je:

- > 0,600 in \leq 0,800: organizmi v vzorcu so zelo zdravi,

- > 0,300 in \leq 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.

Podatke smo analizirali na dva načina. Najprej smo jih razdelili v tri skupine v odvisnosti od ocene vitalnosti (F_v/F_m) in jih primerjali z rezultati podrobne analize. Delitev v tri skupine glede na vrednosti F_v/F_m je bila narejena skladno z interpretacijo vrednosti F_v/F_m , ki so jo podali Stehouwer et al. (2010) in Gollasch in David (2010b):

- prva skupina vsebuje ocene $F_v/F_m \leq 0,300$ (organizmi so zmerno prizadeti ali mrtvi),
- druga skupina vsebuje ocene F_v/F_m 0,301–0,600 (organizmi so zdravi) ter
- zadnja skupina z ocenami F_v/F_m 0,601–0,800 (organizmi so zelo zdravi).

V prvo skupino spadajo vzorci, pri katerih bi naj bila balastna voda skladna s Konvencijo, v drugi in tretji skupini pa so vzorci, katerih rezultati indikativne analize kažejo neskladnost (Golja, 2016). Meja med drugo in tretjo skupino je meja med zdravimi in zelo zdravimi organizmi, s podrobno analizo pa smo želeli pokazati, ali ta meja sovpada z velikim porastom organizmov v vzorcu ter ali visoke ocene parametra F_v/F_m pomenijo neskladnost ladje s predpisi.

Drugo primerjavo smo izvedli tako, da smo rezultate podrobne analize oz. dejansko število celic fitoplanktona na mililiter razvrstili v štiri skupine in jih primerjali z ocenami indikativnega instrumenta (Golja, 2016). Pomembna je meja med prvo in drugo skupino, saj je to meja skladnosti s standardom D-2. Velikost skupin smo izbrali tako, da smo lahko sledili obnašanju instrumenta pri majhnih razlikah vsebnosti fitoplanktona v 1 ml vzorca:

- prva skupina vsebuje rezultate z ≤ 9 celic,

- v drugi skupini so rezultati podrobne analize z 10–30 celicami,
- v tretji skupini so rezultati podrobne analize z 31–70 celicami,
- v zadnjo skupino smo uvrstili podatke z ≥ 71 celicami.

Rezultate obeh primerjav smo ovrednotili glede na število napak tipa I in II ter število med seboj skladnih rezultatov obeh analiz vzorcev balastne vode. Glede na možne kombinacije primerjav so možni štirje scenariji (Preglednica 1). Po prvem scenariju, ko indikativna analiza pokaže neskladnost vzorca s standardom, podrobna analiza pa skladnost, gre za napako tipa I, katere posledica je predvsem gospodarska škoda zaradi odloga nadaljnjih operacij ladje za čas izvajanja podrobne analize. Po drugem scenariju indikativna analiza pokaže skladnost vzorca balastne vode s standardom D-2. Če ni izvedena še podrobna analiza, ki pokaže, da je vzorec dejansko neskladen s standardom, lahko pride do velikega okoljskega tveganja. Pri tretjem in četrtem scenariju so rezultati indikativne in podrobne analize skladni (tj. obe

analizi pokažeta skladnost s standardom D-2 ali obe pokažeta neskladnost s standardom D-2). V primeru teh dveh scenarijev ne pričakujemo škode po indikativni analizi.

V nekaterih študijah (Gollasch et al., 2012; 2015a, Bradie et al, 2017; Vanden Byllaardt et al, 2017; Gollasch in David, 2010b) so bile za primerjalne analize uporabljene posamezne ocene F_v/F_m , F_v in F_0 . Parameter F_v/F_m nakazuje količino organizmov z različno stopnjo možnosti preživetja v vzorcu balastne vode, medtem ko parameter F_0 opisuje zgolj celotno količino biomase v vzorcu. Primerjave, opravljene v študiji Gollasch et al. (2015a), kažejo slabše ujemanje parametra F_0 s številom organizmov, sposobnih preživetja, kar potrjujejo tudi rezultati analize, ki smo jo izvedli v nadaljevanju raziskave.

Povezanost spremenljivk F_0 in F_v/F_m ter F_0 s številom organizmov smo preverili z uporabo linearne regresije. Kot rezultat povezav smo podali koeficient determinacije, enačbo linearne zveze in statistično (ne)značilnost povezave med spremenljivkami (p-vrednostjo).

Preglednica 1: Možni scenariji primerjave rezultatov indikativne in podrobne analize vzorcev balastne vode.

Table 1: Possible scenarios of comparison for indicative and detailed ballast water sample analysis results.

Scenarij	Indikativna analiza	Podrobna analiza	Posledica
1	$F_v/F_m \geq 0,301$	0–9 organizmov (10–50 $\mu\text{m/ml}$)	napaka tipa I, gospodarska škoda
2	$F_v/F_m \leq 0,300$	≥ 10 organizmov (10–50 $\mu\text{m/ml}$)	napaka tipa II, okoljska škoda
3	$F_v/F_m \leq 0,300$	0–9 organizmov (10–50 $\mu\text{m/ml}$)	skladnost obeh meritev, ni škode
4	$F_v/F_m \geq 0,301$	≥ 10 organizmov (10–50 $\mu\text{m/ml}$)	skladnost obeh meritev, ni škode

Preglednica 2: Statistični parametri spremenljivk indikativne in podrobne analize.

Table 2: Statistical parameters of variables from indicative and detailed analyses.

Spremenljivka	Najnižja vrednost	Povprečna vrednost	Mediana	Najvišja vrednost	St. odklon	Koef. var. [%]	Medkvartilni razpon
F_v/F_m	0,01	0,39	0,45	0,78	0,19	48,9	0,20
F_0	97	323	257	834	172	53,4	265,83
št. celic	0	155,1	53,5	801,7	201,2	129,8	232,3

3 Rezultati in razprava

Najnižje, povprečne in najvišje vrednosti, mediano, standardne odklone, koeficiente variacije ter medkvartilne razpone parametrov indikativne in podrobne analize prikazujemo v preglednici 2 in na sliki 2, kjer je prikazano tudi število podatkov v posamezni skupini. V naboru vzorcev je bila s podrobno analizo ugotovljena skladnost s standardom D-2 pri 19 vzorcih (16,7 %), medtem ko so večji del podatkov (95 od 114) predstavljali vzorci, kjer je podrobna analiza pokazala neskladnost s standardom D-2.

V primerih parametrov F_v/F_m in F_0 , kjer smo za vsak vzorec razpolagali z rezultati treh ponovljenih meritev, vrednosti v preglednici 2 predstavljajo srednjo vrednost. Iz slike 2 (levo), kjer so grafično prikazani podatki razvrščeni glede na razrede F_v/F_m , je razvidno, da povprečno število celic, prešteti pri podrobni analizi, narašča z razredom razmerja F_v/F_m . Pri tem je v razredih F_v/F_m razvidno veliko odstopanje med izračunanimi srednjimi vrednostmi in mediano števila celic iz podrobne analize. Tako bi zgolj ob upoštevanju povprečne vrednosti v prvi skupini $F_v/F_m \leq 0,300$ lahko sklepali, da instrument ne daje zadovoljivih rezultatov, saj povprečno število organizmov (44) iz podrobne analize krepko presega dovoljeno mejo za skladnost s standardom D-2 (manj kot 10 organizmov). To je posledica občutljivosti povprečne vrednosti na skrajne vrednosti v vzorcu (angl. outliers). Izračunana mediana v prvem razredu pokaže, da pri več kot 50 % vzorcev v tem razredu ni bilo najdenih organizmov, sposobnih za preživetje. Ne glede na to pa smo v našem primeru imeli v prvem razredu F_v/F_m 26 vzorcev balastne vode, od katerih dva zelo izstopata glede na rezultate podrobne analize s 429 in 583 preštetimi organizmi. Opazne razlike med ocenama srednje vrednosti (povprečjem in mediano) je opaziti tudi v skupini $F_v/F_m = 0,301-0,600$ in $F_v/F_m \geq 0,601$, vendar tam to neskladje ne bi vplivalo na napačno interpretacijo skladnosti vzorcev s standardom D-2.

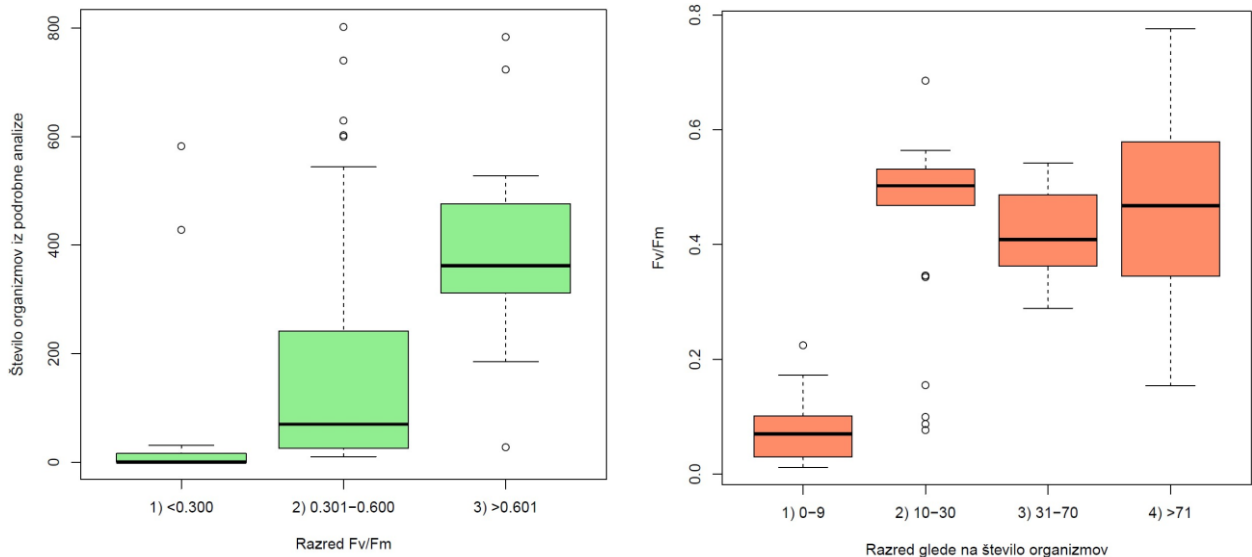
Iz slike 2 (levo), kjer je grafično prikazana porazdelitev podatkov znotraj razredov, je razviden največji razpon med 1. in 3. kvartilom (angl. interquartile range) v srednjem razredu (F_v/F_m med 0,301

in 0,600), kjer znaša 216 organizmov, medtem ko je najmanjša razpršenost in razpon podatkov v prvem razredu ($F_v/F_m \leq 0,300$), kjer je medkvartilni razpon 14,25 organizmov. V tretjem razredu ($F_v/F_m \geq 0,601$) je medkvartilni razpon 164,5 organizma.

Na sliki 2 (desno) prikazujemo iste podatke, razvrščene po razredih glede na število organizmov podrobne analize. V tem primeru povprečna vrednost F_v/F_m ne narašča z razredom, je pa kljub temu lepo razvidno, da je pri vseh vzorcih, kjer je bilo določeno število organizmov iz podrobne analize manjše od 10, indikativna analiza pokazala vrednost $F_v/F_m \leq 0,300$, kar pomeni skladnost s standardom D-2. Iz tega bi lahko sklepali, da indikativni instrument pri nizkih koncentracijah organizmov, ki so blizu mejnim vrednostim po standardu D-2, daje zelo dobre rezultate, kar so ugotovili tudi Bradie et al. (2018). Da bi to lahko potrdili oziroma ovrgli, smo v nadaljevanju podrobneje analizirali pridobljene podatke o meritvah v vzorcih balastne vode, in sicer smo najprej primerjali rezultate meritev parametra F_v/F_m in F_0 s podrobno analizo, nato pa smo poskušali ugotoviti še morebitno povezavo med obema parametroma iz indikativne analize. Rezultate primerjav parov spremenljivk po skupinah za obe izvedeni analizi prikazujemo grafično, podrobna tabelarična primerjava pa je objavljena v Golja (2016).

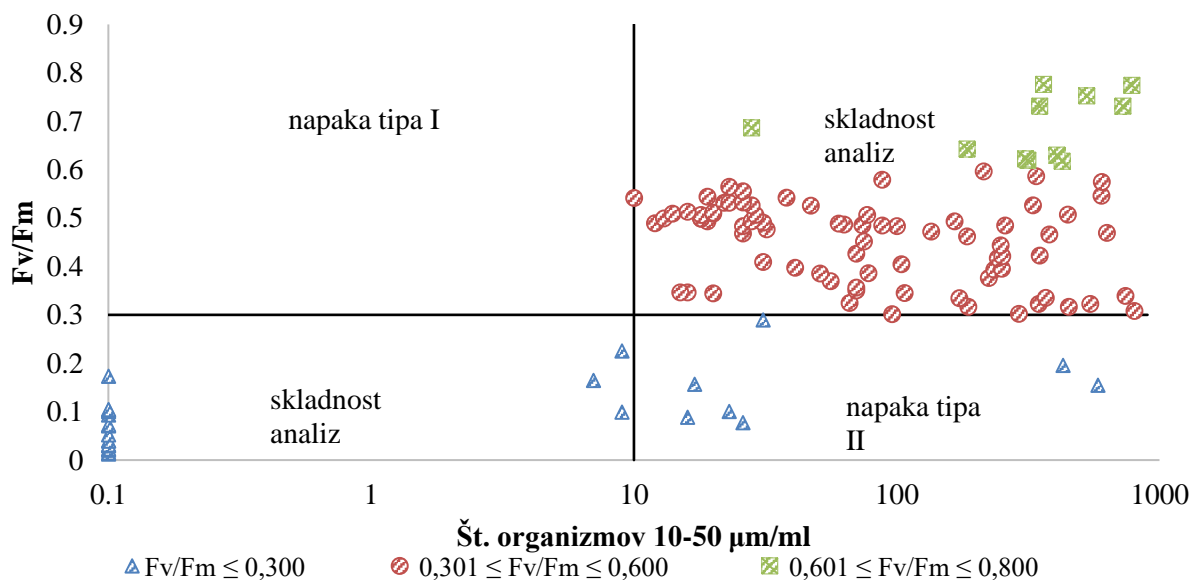
S primerjavo vrednosti izmerjenega parametra F_v/F_m in rezultatov podrobne analize (tj. števila organizmov velikosti 10-50 μm v 1 ml vzorca balastne vode) lahko ocenimo ustreznost uporabe instrumenta Walz Water PAM (Slika 3). Iz grafikona primerjave rezultatov meritev F_v/F_m z rezultati podrobne analize (Slika 3) je razvidno, da izrazite napake tipa I, ko bi instrument pokazal neskladnost s standardom D-2 ($F_v/F_m \geq 0,301$), podrobna analiza pa na skladnost (št. organizmov 0-9), ni bilo zaznati pri nobenem od 114 vzorcev. Je pa en vzorec, pri katerem je štetje pri podrobni analizi pokazalo 10 organizmov, na meji napake. Več je razvidnih napak tipa II, ko je instrument pokazal skladnost vzorca s standardom D-2, dejansko pa je bilo mejno število celic preseženo. Od 26 vzorcev, kjer je bila z instrumentom

izmerjena vitalnost organizmov manjša od 0,300 ali enaka temu, jih je bilo s podrobno analizo skladnih 19 (73 %).



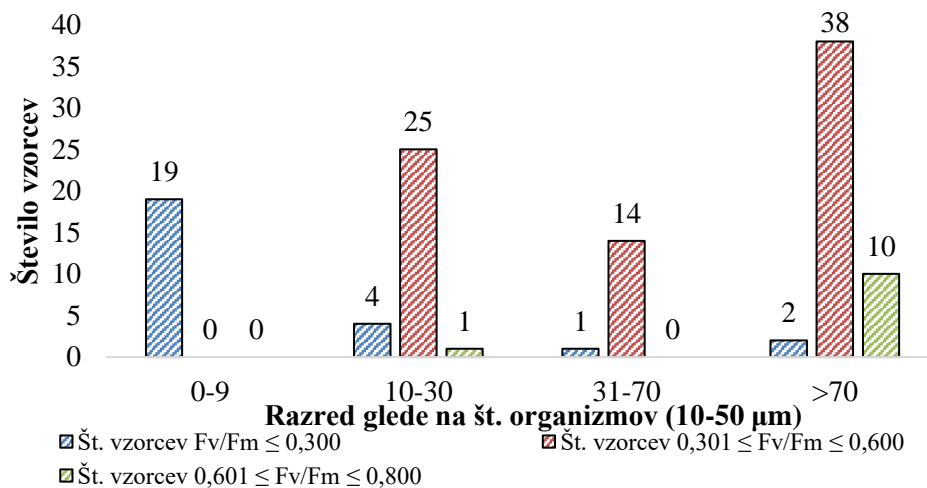
Slika 2: Porazdelitev podatkov iz podrobne analize v razredih glede na vrednosti F_v/F_m (levo) in podatkov o F_v/F_m v razredih glede na število organizmov, prešteti pri podrobni analizi (desno).

Figure 2: Data distribution by class, based on the ratios F_v/F_m (left), and based on the number of organisms obtained in detailed analysis (right).



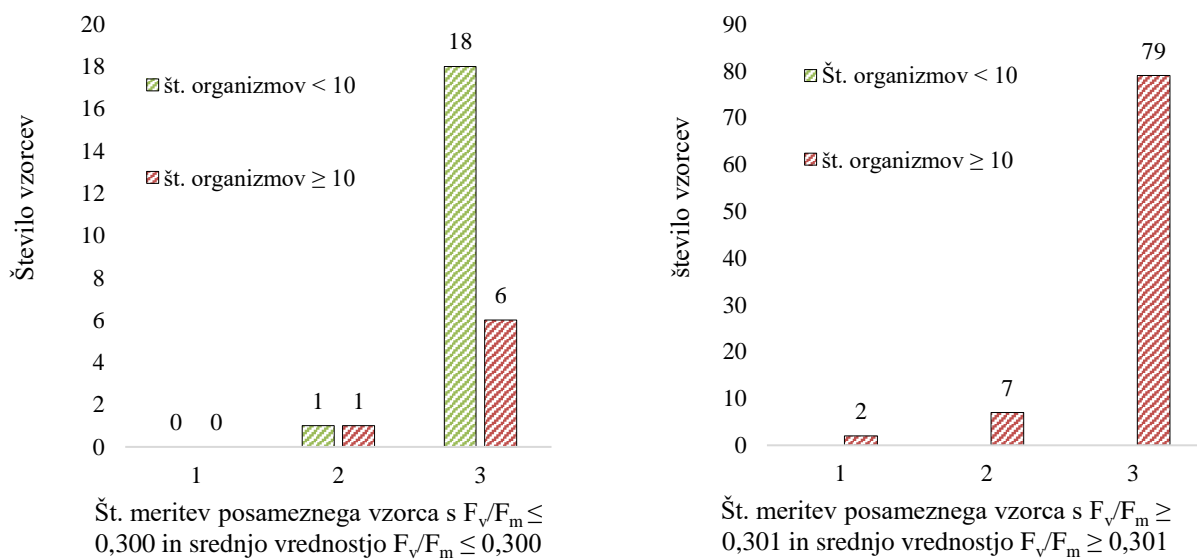
Slika 3: Primerjava rezultatov podrobne analize z rezultati meritev razmerja F_v/F_m . Z vodoravno in navpično črto sta vrisani meji, ki določata območja skladnosti obeh meritev ter območji napak tipa I in II. Vrednosti so obarvane glede na razred F_v/F_m .

Figure 3: Comparison of the results of detailed analysis with the results of F_v/F_m measurements. Vertical and horizontal lines are added as thresholds for determining the compliance of both analyses and determining type I and type II error areas.



Slika 4: Število vzorcev po razredih glede na število organizmov iz podrobne analize: modri stolpci prikazujejo število vzorcev, kjer je bilo izmerjeno razmerje $F_v/F_m \leq 0,300$, rdeči vzorce, kjer je $0,301 \leq F_v/F_m \leq 0,600$, in zeleni vzorce z izmerjenimi $0,601 \leq F_v/F_m \leq 0,800$.

Figure 4: Number of samples in classes based on the number of organisms from the detailed analysis. The blue bars represent samples where the measured ratio $F_v/F_m \leq 0.300$, red samples with $0.301 \leq F_v/F_m \leq 0.600$, and green bars are samples with $0.601 \leq F_v/F_m \leq 0.800$.



Slika 5: Histograma števila vzorcev, pri katerih je indikativna analiza pri 1, 2, 3 meritvah pokazala (ne)skladnost s podrobno analizo. Zeleni stolpci predstavljajo vzorce, kjer je bila s podrobno analizo pokazana skladnost s standardom D-2, rdeči stolpci pa vzorce, kjer je bila s podrobno analizo pokazana neskladnost. V levi diagram so zajeti vzorci, kjer je srednja vrednost treh meritev $F_v/F_m \leq 0,300$, v desnega so zajeti vzorci, kjer je srednja vrednost treh meritev $F_v/F_m \geq 0,301$.

Figure 5: Histogram of the number of samples, where indicative analysis showed (non-)compliance with detailed analysis. The green bars represent samples where detailed analysis showed compliance with D-2, and the red bars represent samples where detailed analysis did not show compliance. The average value of the three measurements is $F_v/F_m \leq 0.300$ (left), and $F_v/F_m \geq 0.301$ (right).

Z razdelitvijo vzorcev v skupine glede na število organizmov iz podrobne analize smo preverili še velikost napake tipa II (Slika 4). Razvidno je, da je instrument vsem 19 vzorcem v prvi skupini (0–9 organizmov) pravilno določil skladnost s standardom, napake pa se pojavljajo v drugi (4 vzorci), tretji (1 vzorec) in četrti (2 vzorca) skupini. Po pričakovanjih je največ napak v drugi skupini (10–30 celic), ki meji na skladnost s standardom D-2, dve napačni meritvi pa se pojavita tudi v četrti skupini, ko je instrument ocenil vzorca s 429 in 583 celicami kot skladna s standardom D-2. Skupni odstotek napačno ovrednotenih vzorcev je razmeroma majhen in znaša 6,1 % (7 od 114), od tega so le 3 (2,6 %) napake tako velike, da preskočijo cel razred, kar pomeni, da je bilo v vzorcih dejansko ugotovljenih 31 ali več organizmov.

Ne glede na to, da smo pokazali, da je uporaba srednje vrednosti treh meritev F_v/F_m ustrezna za analize, izvedene v tej študiji, smo preverili, kako raznoliki ali podobni so rezultati posameznih meritev v smislu potrjevanja skladnosti s standardom D-2. Pri vzorcih, ki smo jih prvotno razdelili v dve skupini, s povprečjem $F_v/F_m \leq 0,300$ in $F_v/F_m \geq 0,301$, smo preverili, pri koliko od treh zaporednih meritev je vzorec pokazal skladnost oziroma neskladnost s standardom D-2. Dodatno smo vzorce ločili še glede na število organizmov iz podrobne analize. Pri vzorcih, kjer je instrument pokazal skladnost (Slika 5, levo), je pri 24 od 26 vzorcev instrument trikrat zaporedoma pokazal vrednost $F_v/F_m \leq 0,300$. Po enkrat v vsaki skupini (0–9 organizmov in ≥ 10 organizmov) pa je bila vrednost $F_v/F_m \leq 0,300$ izmerjena dvakrat od treh zaporednih meritev. Primerov, kjer bi instrument

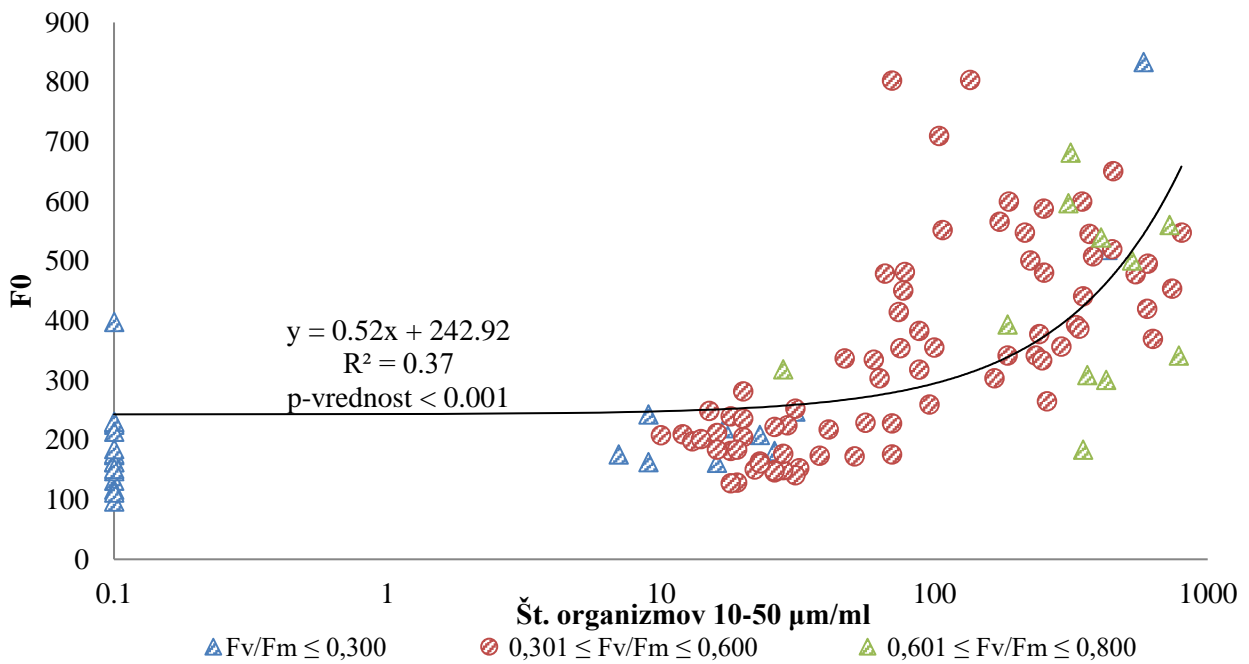
samo enkrat izmeril vrednost $\leq 0,300$ in bi bilo povprečje kljub temu $\leq 0,301$, v tej skupini ni bilo. Na drugi strani smo obravnavali še skupino vzorcev, kjer je povprečje treh zaporednih meritev $F_v/F_m \geq 0,301$. Kot smo že prej ugotovili, v tej skupini ni niti enega vzorca, pri katerem bi podrobna analiza kazala na skladnost s standardom D-2. Tudi v tej skupini je bila pri večini vzorcev (79 od 88) trikratna zaporedna meritev skladna s povprečjem, tj. $\geq 0,301$. Pri sedmih vzorcih je bila vrednost $F_v/F_m \geq 0,301$ izmerjena dvakrat, pri dveh pa enkrat od treh zaporednih meritev.

Iz prikazanih primerjav lahko zaključimo, da instrument zelo zanesljivo pokaže neskladnost balastne vode s standardom D-2, pri določanju skladnosti pa je rezultat meritev napačen v približno 27 % meritev. Če bi kot mejo skladnosti uporabili vrednost $F_v/F_m = 0,150$, bi se odstotek napačnih meritev znižal na 16 % (3 od 19), pri nadaljnjem znižanju na $F_v/F_m = 0,100$ se poveča na 18 % (3 od 17). Šele pri znižanju meje $F_v/F_m = 0,075$ bi bili vsi izmerjeni podatki skladni s standardom D-2. To pa bi seveda bistveno povečalo število napak tipa I, ki bi povzročile gospodarsko škodo ladjam: od 19 vzorcev, skladnih s standardom, bi bilo v tem primeru napačno ovrednotenih osem. Preglednica 3 prikazuje število napak tipa I in tipa II pri različnih mejah skladnosti F_v/F_m . Pri tem velja poudariti še, da bi bila sicer z zniževanjem meje skladnost s podrobno analizo višja le za razred organizmov z najmanjšo dimenzijo v premeru 10–50 μm . Za popolno potrditev skladnosti vzorca pa bi bilo treba potrditi skladnost tudi za ostala dva razreda velikosti organizmov.

Preglednica 3: Število napačnih interpretacij skladnosti vzorcev s standardom D-2 za različne primere mej skladnosti F_v/F_m .

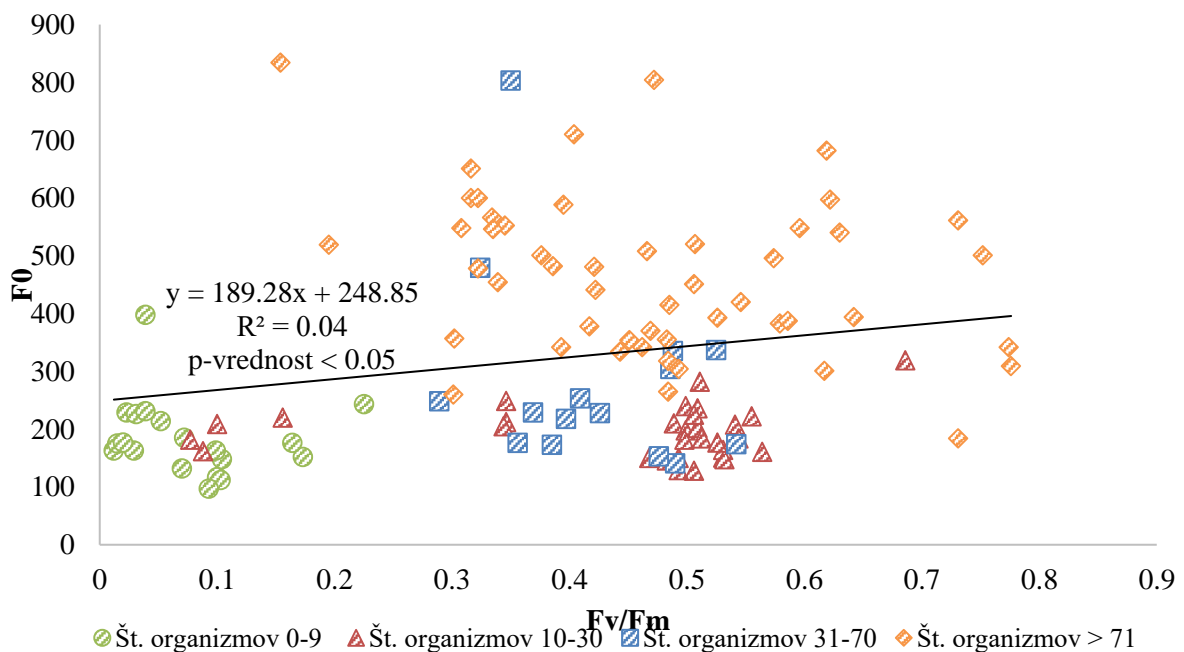
Table 3: Number of incorrect interpretations of compliance with the D-2 Standard for various compliance limits F_v/F_m .

Meja F_v/F_m	Število napak tipa I	Število napak tipa II	Skupaj napak
0,300	0	7	7
0,200	1	6	7
0,150	3	3	6
0,100	3	5	8
0,075	8	0	8



Slika 6: Primerjava rezultatov meritev parametra F_0 z rezultati podrobne analize. Z modro barvo so označeni vzorci, pri katerih je bil $F_v/F_m \leq 0,300$, z rdečo vzorci $0,301 \leq F_v/F_m \leq 0,600$ in zeleno vzorci $0,601 \leq F_v/F_m \leq 0,800$.

Figure 6: Comparison of the measured results F_0 with the results of detailed analysis. Blue represents samples with $F_v/F_m \leq 0.300$, red with $0.301 \leq F_v/F_m \leq 0.600$, and green samples with $0.601 \leq F_v/F_m \leq 0.800$.



Slika 7: Povezava med merjenima parametroma F_v/F_m in F_0 . Z različnimi barvami so ločeni vzorci po razredih glede na število organizmov, določenih v podrobni analizi.

Figure 7: Connection between F_v/F_m and F_0 parameters. Different colors represent classes of samples according to the number of organisms counted in detailed analysis.

Iz grafa odvisnosti med parametrom F_0 in rezultati podrobne analize (Slika 6) je razvidno, da je korelacija med spremenljivkama šibka, ne glede na to pa je med njima zaznati pozitivno zvezo, kar nakazuje, da bi bilo mogoče tudi pri parametru F_0 poiskati mejo skladnosti s standardom D-2. Razpon vrednosti parametra F_0 , kjer je podrobna analiza pokazala skladnost s standardom D-2, je med 97 in 398. Če pri maksimalni vrednosti F_0 v tem razredu (tj. pri $F_0 = 398$) potegnemo navidezno mejo, ugotovimo, da bi bilo poleg 19 vzorcev, kjer je bilo število organizmov 0–9, v tem območju še 63 od 95 preostalih vzorcev, pri katerih je podrobna analiza pokazala neskladnost vzorcev balastne vode s standardom D-2. Tako parameter F_0 ne more biti neposredni pokazatelj skladnosti vzorcev balastne vode s standardom D-2 kot tudi ne pokazatelj neskladnosti, kar se ujema z ugotovitvami v raziskavi Golasch et al. (2015a). To je bilo skladno z opredelitvijo parametra F_0 tudi pričakovati, saj parameter F_0 opisuje celotno količino biomase v vzorcu, medtem ko parameter F_v/F_m kaže na količino organizmov z različno stopnjo možnosti preživetja v vzorcu balastne vode.

V zadnjem delu analize smo preverili še odvisnost med obema spremenljivkama F_v/F_m in F_0 , izmerjenima z instrumentom Walz Water PAM (Slika 7). Koeficient korelacije kaže podobno šibko povezavo kot med spremenljivko F_0 in rezultati podrobne analize. Ocena števila celic fitoplanktona (F_0) in njihova aktivnost (F_v/F_m) torej nista neposredno povezani. Instrument lahko izmeri podobno vrednost F_0 v vzorcu vode, v katerem je razmeroma veliko fitoplanktona, ki ni sposoben preživetja, in v vzorcu vode, kjer je fitoplanktona malo, vendar ima visoko vitalnost (zelo zdravi organizmi). To dodatno podpira prej zapisano ugotovitev, da parameter F_0 , kljub nekoliko boljši korelaciji s podrobno analizo, kot jo je izkazal parameter F_v/F_m , ni primeren za ocenjevanje skladnosti balastne vode s standardom.

Kljub temu pa sta Gollasch in David (2010b) ugotovila, da je mogoče pokazati, da balastna voda ni skladna s standardom D-2 s hkratnim upoštevanjem parametrov F_0 in F_v/F_m . Pokazala sta namreč, da je pri $F_0 > 20$ in $F_v/F_m > 0,301$ rezultat podrobne analize vedno > 20 celic v 1 ml vzorca. To

ugotovitev smo preverili še na naših podatkih in ugotovili, da je med 88 vzorci, kjer je $F_v/F_m > 0,301$ in $F_0 > 120$, 12 takih (13,6 %), kjer je bilo < 20 celic v 1 ml vzorca.

4 Zaključki

Namen raziskave je bil preveriti ustreznost instrumenta Walz Water PAM za indikativne analize balastne vode. V prvi analizi smo grupirali podatke po vrednostih indikativne analize v tri skupine glede na ocene vitalnosti F_v/F_m . Analiza je pokazala, da med koeficientom vitalnosti F_v/F_m in oceno biomase F_0 ter koeficientom F_v/F_m in številom celic fitoplanktona iz podrobne analize obstaja šibka pozitivna zveza. Z višanjem koeficienta F_v/F_m naraščata vrednosti F_0 in dejansko število celic fitoplanktona v vzorcu, prešteti pri podrobni analizi. Instrument je kot skladne ocenil 26 vzorcev, pri čemer je pravilno prepoznal 19 vzorcev z < 10 celic/ml (73 % uspešnost), vseh 88 vzorcev, ki jih je instrument ocenil kot neskladne, pa je dejansko vsebovalo ≥ 10 celic/ml. Od 114 meritev je instrument torej zatajil v sedmih primerih (6,1 %), ko je podal nizek F_v/F_m ($\leq 0,300$), podrobna analiza pa je pokazala ≥ 10 celic/ml balastne vode, a le v dveh primerih več kot 31 celic/ml. V nobenem primeru ni šlo za napako tipa I (oškodovanje ladje in gospodarsko škodo), ampak za napako tipa II, lažno negativno vrednost, kar pomeni preseganje števila organizmov, določenega s standardom D-2. Če na podatke pogledamo z drugega zornega kota in jih razdelimo v štiri razrede glede na rezultate podrobne analize, je vseh 19 vzorcev, ki so bili po številu organizmov skladni s standardom D-2, instrument ocenil pravilno, od 95 neskladnih vzorcev pa jih je pravilno ocenil 88 (93 %).

Na podlagi izvedene raziskave sklepamo, da je instrument Walz Water PAM ustrezno orodje za izvedbo indikativnih analiz skladnosti vzorcev balastne vode s standardom D-2, napak tipa II, ki predstavljajo tveganje za okolje, je bilo malo. Vendar pa, kot ugotavljajo Cabrini et al. (2019), vsebujejo balastne vode preživetja sposobne organizme (tudi invazivne vrste fito- in zooplanktona) v večini balastnih tankov. Mozetič et al. (2019) ugotavljajo tudi, da so nekatere invazivne vrste razvile stabilno populacijo v določenih

obalnih območjih v Jadranskem morju. Zato je kljub razmeroma uspešnemu delovanju instrumenta treba nadaljnjo pozornost posvetiti napakam tipa II, ki lahko povzročajo tveganje za okolje zaradi napačne indikacije skladnosti vzorca. Število aktivnih celic v dveh od sedmih vzorcev, kjer je bila storjena napaka tipa II, je bilo zelo visoko (429 in 583), kar bi lahko nakazovalo na napake pri vzorčenju ali delovanju instrumenta. Indikativne instrumente je treba izpopolniti do stopnje, da bomo lahko z visoko stopnjo zanesljivosti opravljali indikativne meritve na vzorcih balastne vode in omogočili pravilno podlago za izvajanje ukrepov Konvencije. Kljub temu menimo, da smemo instrument Walz Water PAM uporabljati za indikativne analize za ugotavljanje morebitne neskladnosti balastne vode s Konvencijo, kar je tudi eden glavnih namenov indikativnih instrumentov (npr. Bradie et al., 2018), saj je v primeru skladnosti vzorca s standardom D-2 za velikostni razred organizmov 10–50 µm treba skladnost preveriti še za ostala dva velikostna razreda.

Ne glede na zapisane ugotovitve pa so tako hitre indikativne metode kot instrumenti še vedno v fazi razvoja, v fazi testiranja so tudi indikativne analize metode. Le z rednim vzorčenjem, opazovanjem, preizkušanjem in analiziranjem metod in instrumentov bo mogoče izboljšati njihovo učinkovitost in zagotoviti verodostojnost nadzora ter s tem pripomoči k varovanju okolja.

Zahvala

Avtorji se zahvaljujemo dr. Stephanu Gollaschu za možnost uporabe doslej neobjavljenih podatkov analiz vzorcev.

Viri

Bradie, J., Broeg, K., Gianoli, C., He, J., Heitmüller, S., Curto, A., Nakata, A., Rolke, M., Schillak, L., Stehouwer, P., Byllaardt, J., Veldhuis, M., Welschmeyer, N., Younan, L., Zaake, A., Bailey, S. (2018). A shipboard comparison of analytic methods for ballast water compliance monitoring. *Journal of Sea Research* 113, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2017.01.006>.

Cabrini, M., Cerino, F., de Olazabal, A., Di Poi, E., Fabbro, C., Fornasaro, D., Goruppi, A., Flander-Putrie,

V., Francé, J., Gollash, S., Hure, M., Lipej, L., Lučić, D., Magaletti, E., Mozetič, P., Tinta, T., Tornambè, A., Turk, V., Uhan, J., David, M. (2019). Potential transfer of aquatic organisms via ballast water with a particular focus on harmful and non-indigenous species: A survey from Adriatic ports. *Marine Pollution Bulletin*, 147, 16–35. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.0040>.

Carlton, J. T. (1999). The scale and ecological consequences of biological invasions in the world's oceans. Sandlund, O.T., Schei, P.J., Å. Viken (ur.), *Invasive species and biodiversity management*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 195–212.

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, 66 str. (pridobljeno 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, zv. 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. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.08.041>.

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. <https://doi.org/10.1890/11-1639.1>.

Golja, A. (2016). Nadzor ravnanja z balastno vodo – indikativne metode. Diplomsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo, študij vodarstva in komunalnega inženirstva: 43 str.

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*, zv. 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. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.037>

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*, zv. 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*, zv. 8: 35–58.

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

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

IMO (2009). 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 (2004). International Convention for the Control and Management of Ships' Ballast Water and Sediments 2004. International Maritime Organization, London.

Koo, T.K., Li, M.Y. (2016). A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *Journal of Chiropractic Medicine*. 15 (2): 155–63. <https://doi.org/10.1016/j.jcm.2016.02.012>.

MEPC (2019). Harmful aquatic organisms in ballast water, Summary of currently available ballast water indicative analysis instruments. MEPC 74/4/INF.18.

Mozetič, P., Cangini, M., Francé, J., Bastianini, M., Aubry, F. B., Bužančić, M., Cabrini M., Cerino, F., Čalić, M., D'Adamo, R., Drakulović, D., Finotto, S., Fornasaro, D., Grilli, F., Kraus, R., Marić Pfannkuchen, D., Ninčević Gladan, Ž., Pompei, M., Rotter, A., Servadei, I., Skejić, S. (2017). Phytoplankton diversity in Adriatic ports: Lessons from the port baseline survey for the management of harmful algal species. *Marine Pollution Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.029>.

Shrout, P. E., Fleiss, J. L. (1979). Intraclass correlations: Uses in assessing rater reliability. *Psychological Bulletin*, 86(2), 420–428. <http://dx.doi.org/10.1037/0033-2909.86.2.420>

Stehouwer, PP., Fuhr, F., Veldhuis, M. (2010). A Novel Approach to Determine Ballast Water Vitality and Viability after Treatment, in *Emerging Ballast Water Management Systems*, ed. Neil Bellefontaine, Fredrik Haag, Olof Lindén and Jose Matheickal, Proceedings of the IMO-WMU Research and Development Forum, 26–29 January 2010, Malmö, Sweden, 233–240.