

University of Groningen

Ballast water treatment system testing

van Slooten, Cees

DOI:
[10.33612/diss.172082815](https://doi.org/10.33612/diss.172082815)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2021

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
van Slooten, C. (2021). *Ballast water treatment system testing: assessing novel treatments and validating compliance methods*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.172082815>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

Samenvatting

De verspreiding van aquatische invasieve soorten wordt beschouwd als een van de belangrijkste bedreigingen voor de mariene biodiversiteit. Via transport van ballastwater worden veel aquatische soorten over de hele wereld vervoerd en geloosd in exotische ecosystemen. Deze nieuw geïntroduceerde soorten kunnen invasief worden en de lokale soorten verdringen door te concurreren op habitat en hun voedsel te eten. Om dit probleem aan te pakken, heeft de Internationale Maritieme Organisatie (IMO) in 2004 het Verdrag inzake ballastwater en sediment (het Verdrag) aangenomen. Het Verdrag heeft tot doel het risico van door ballastwater veroorzaakte invasies te verminderen. Dit doel wordt bereikt door een Ballast Water Lozingsnorm (Lozingsnorm) in te voeren, die limieten stelt aan het aantal levende organismen dat via ballastwater geloosd mag worden. Onafhankelijk van de IMO heeft de Amerikaanse kustwacht (United States Coast Guard, USCG) in 2012 soortgelijke regels ingevoerd genaamd (vrij vertaald): “Standaarden voor Levende Organismen in Ballast Water via Schepen Geloosd in Amerikaanse Wateren (Final Rule)”. Ballastwater speelt een cruciale rol in de stabiliteit, trim, diepgang en structurele integriteit van een zeegaand schip. Voor de meeste schepen is daarom een BallastWater BehandelingsSysteem (BWBS) aan boord nodig om ervoor te zorgen dat de Lozingsnorm niet overschreden wordt. Elk BWBS moet IMO- en/of USCG-typegoedkeuring behalen om het behandelde ballastwater te mogen lozen. Bindende testprotocollen zijn gepubliceerd door de IMO (BWMS Code) en USCG (ETV-protocol) die moeten worden uitgevoerd door onafhankelijke testfaciliteiten. Het BWBS moet (onder andere) in een gestandaardiseerde testopstelling getest worden door respectievelijk vijfmaal zoet, brak of zout water door het systeem te pompen waarna het tijdelijk wordt opgeslagen alvorens het weer wordt geloosd. Tijdens het oppompen en lozen wordt het water bemonsterd en geanalyseerd op (an)organische stoffen en levende organismen zoals zoöplankton, fytoplankton en bacteriën om enerzijds te meten of het water uitdagend genoeg voor betrouwbare test is en anderzijds of na behandeling de Lozingsnorm wordt gehaald door het BWBS. De monstername- en analyseprocedures zijn exact voorgeschreven door de IMO en USCG wat de vergelijkbaarheid van testresultaten ten goede komt. Tenslotte is de havenstaatcontrole (Port State Control, PSC) verantwoordelijk voor het inspecteren van individuele schepen voor toezicht op de naleving en handhaving van het Verdrag en de Lozingsnorm.

Bij de start van dit PhD project waren veel nieuwe BWBS'ën nog in ontwikkeling en moesten verschillende desinfectiemiddelen (hierna actieve stoffen genoemd) worden onderzocht of ze geschikt waren voor ballastwater behandeling. Ook was er kritiek op de verplichte testprotocollen voor typegoedkeuring omdat ze arbeidsintensieve bacteriële agar-

Samenvatting

plaat methoden voorschreven terwijl er veel efficiëntere methoden beschikbaar waren. Tegelijkertijd was het een vraag voor PSC-functionarissen en andere belanghebbenden hoe ze ballastwater op een kosteneffectieve, snelle en gemakkelijke manier konden bemonsteren en analyseren voor de nalevingscontrole. Om deze onderwerpen aan te pakken, werden in dit proefschrift de volgende onderzoeksvragen geformuleerd, corresponderend met verschillende stadia in ontwikkeling, testen en nalevingscontrole van BWBS'ën:

1. Is een quaternaire ammoniumverbinding geschikt als actieve stof om ballastwater te desinfecteren? (Hoofdstuk 2)
2. Hoe verhouden agar-groeimedia zich tot geautomatiseerde cel-tellingen en moleculaire technieken om heterotrofe bacteriën te kwantificeren? (Hoofdstuk 3)
3. Is de FlowCAM een geschikt apparaat om indicatieve ballastwater lozingsanalyses uit te voeren? (Hoofdstuk 4)
4. Hoe presteren verschillende proxy-metingen als methode voor indicatieve nalevingscontrole (Hoofdstuk 5)

In Hoofdstuk 2 werd didecyldimethylammoniumchloride (DDAC) getest op zijn toepasbaarheid als ballastwaterbehandelingsmethode. De behandeling van de eencellige mariene fytoplankton-soorten *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* en *Chaetoceros calcitrans* liet zien dat bij $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ DDAC de cellen desintegreerden na 5 dagen incubatie in het donker. De behandeling van natuurlijk marien plankton met $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ DDAC verminderde de hoeveelheid zoöplankton niet genoeg om te voldoen aan de Lozingsnorm. Schelpdierlarfjes bleken het meest resistent tegen de behandeling. Hoewel de efficiëntie van Fotosysteem II (Photosystem II, PSII) binnen 5 dagen werd geïnactiveerd, wat wijst op het (tijdelijke) verlies van fotosynthetisch vermogen, bleven de fytoplanktoncellen intact. Bovendien vond hergroei plaats binnen 2 dagen nadat het behandelde water was teruggeplaatst in het licht. Deze bevindingen onderstrepen het belang van testen van actieve stoffen in zowel monoculturen op laboratoriumschaal als in natuurlijk water. De snelle hergroei na 2 dagen geeft aan dat de PSII-efficiëntie meting kan resulteren in vals-negatieven, dus dat ten onrechte de conclusie wordt getrokken dat het water voldoet aan de Lozingsnorm. De Meest Waarschijnlijke Aantal (MWA) -methode die wordt gebruikt tijdens veel IMO-typegoedkeuringstests, zou naar verwachting een vergelijkbare hergroei hebben gedetecteerd. Verder is het noemenswaardig op te merken dat PSII-efficiëntie analyses (of afgeleiden daarvan) erg populair zijn als snelle, simpele indicatieve ballastwater

Samenvatting

controlemethode. Door kleinschalige studies uit te voeren gebruikmakend van door IMO en USCG voorgeschreven testwater, worden tekortkomingen van de experimentele behandelingsmethode in een vroeg stadium ontdekt. De resistentie van de schelpdierlarfjes tegen behandeling kan bijvoorbeeld worden omzeild door een filtratiestap aan het BWBS ontwerp toe te voegen en zodoende grotere organismen direct uit te filteren. Inderdaad heeft de overgrote meerderheid van de typegoedgekeurde BWBS'ën filtratie als eerste stap voorafgaand aan de desinfectie-stap. In IMO-richtlijn G9 staat beschreven dat het geloosde water dat behandeld is met een actieve stof moet worden beoordeeld op eventuele giftigheid voor het ontvangende water. Het cruciale belang hiervan werd benadrukt door deze studie. Namelijk, na de incubatie van 5 dagen vertoonde onbehandeld fytoplankton dat was blootgesteld aan de resterende DDAC ($\sim 0,3 \mu\text{L L}^{-1}$) een vertraagde celgroei en verminderde PSII-efficiëntie, wat wijst op giftigheid in het 'geloosde' water. Gezien de vrije verkoop van DDAC als groene aanslagreiniger, is het opmerkelijk om te zien dat algemeen aanvaarde huishoudelijke producten milieurisico's kunnen opleveren als ze een andere toepassing krijgen. Voor veel mensen kan dit wellicht enige context bieden bij de risico-inschatting van lozing van behandeld ballastwater in de lokale omgeving. De risico's voor het milieu worden nauwkeurig in kaart gebracht en beoordeeld alvorens een lozingsvergunning mag worden afgegeven. Zoals de meeste actieve stoffen, vereist behandeling met DDAC een neutralisatieproces en monitoring daarvan voor of tijdens het lozen. Deze studie bracht enkele knelpunten aan het licht om dergelijke processen met succes toe te passen. De colorimetrische meting van DDAC zoals gebruikt in deze studie was tijdrovend en niet-geautomatiseerd. Maar, het bestaan van inline, geautomatiseerde chloor-sensoren toont aan dat het wel degelijk mogelijk is om colorimetrische methoden voor inline gebruik aan boord te automatiseren. Echter, het neutralisatieproces zelf bracht extra uitdagingen met zich mee. Een dubbele dosering van elk 50 mg L^{-1} bentoniet klei was nodig om de resterende DDAC bij lozing te neutraliseren. Het lozen van grote hoeveelheden klei of andere zwevende stoffen is naar verwachting in veel havens verboden. Ook zou het doseer-apparaat om het bentoniet te injecteren aan een streng testregime moeten worden onderworpen om de doeltreffendheid ervan onder scheeps-omstandigheden te waarborgen. Ten slotte zorgt de bentoniet-injectie voor extra kosten voor het behandelingsproces, waardoor het systeem commercieel minder aantrekkelijk wordt.

In Hoofdstuk 3 werd de heterotrofe strijkplaat methode (Heterotrophic Plate-Count, HPC) vergeleken met FlowCytoMetrie (FCM) en kwantitatieve polymerasekettingreactie (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR). De HPC-methode houdt in dat tijdens

Samenvatting

BWBS-typegoedkeuringstests het kiemgetal van de heterotrofe bacteriën worden bepaald. Het kiemgetal is het aantal bacteriekolonies dat na een vijfdaagse incubatie is gegroeid op een kweekplaat. Behoudens een aantal humane pathogenen zijn er geen lozingsnormen voor deze voornoemde heterotrofe bacteriën. Desalniettemin kan hun aanwezigheid in het testwater een belemmering vormen voor het BWBS om het ballastwater goed te desinfecteren. Denk hierbij aan (bijvoorbeeld) versnelde afbraak van actieve stoffen of door verhoogde UV-absorptie te veroorzaken. Hierdoor blijft er minder actieve stof of UV licht over om de andere organismen te doden of inactiveren. Het door de USCG voorgeschreven ETV-protocol vereist HPC-technieken om kweekbare bacteriën te kwantificeren. Echter, het is in wetenschappelijke kringen algemeen bekend dat HPC-technieken het aantal levende niet-kweekbare bacteriën in natuurlijke watermonsters enorm kunnen onderschatten. Voorts ligt het niet in de lijn der verwachting dat kweekbare of niet-kweekbare bacteriën verschillen in hun bijdrage aan de uitdaging die ze vormen voor een BWBS om de Lozingsnorm te bereiken. Daarom was het belangrijk om te bepalen of HPC-resultaten enige correlatie vertoonden met het totale aantal bacteriën zoals gevonden via alternatieve technieken. Monsters werden verzameld op een vast monsterpunt voor natuurlijk zoetwater en zeewater gedurende een aaneengesloten periode van 30 weken. Analyse van bacteriële aantallen met behulp van HPC, FCM en qPCR leverde over het algemeen concentraties op in de ordegrootte van respectievelijk 10^4 , 10^6 en 10^7 cellen mL^{-1} . Aanzienlijke verschillen in concentratie-trends werden in de loop van de tijd tussen de drie technieken waargenomen. Wat FCM betreft gaven glutaraaldehyde-gefixeerde monsters vergelijkbare resultaten als monsters gefixeerd met formaline/hexamine. De afwezigheid van een verband tussen FCM en qPCR in zoetwater monsters werd mede veroorzaakt door variatie in het aantal genkopieën tussen verschillende bacteriesoorten. Daarentegen werden dezelfde aantallen gevonden wanneer een monocultuur van de *Escherichia coli* bacterie werd geteld met behulp van FCM en qPCR. Concluderend lijkt FCM betrouwbaarder dan qPCR om heterotrofe bacterieconcentraties in natuurlijke watermonsters te meten. Meest opmerkelijk was dat er geen correlatie tussen HPC- en FCM-resultaten in bacteriële trends over tijd werd gezien. Daarom ondersteunen deze resultaten de kritiek dat de HPC-technieken weinig zeggen over de daadwerkelijke uitdaging die bacteriën vormen tijdens typegoedkeuringstesten. Daarbij komt dat het onduidelijk is of de uitdaging die bacteriën vormen kan worden onderscheiden van andere bronnen van organisch materiaal in de opgeloste en particuliere organische koolstofbronnen (Dissolved and Particulate Organic Carbon, DOC and POC). Bacteriën vormen slechts een klein deel van de totale organische koolstofbron. Organische koolstof

Samenvatting

vormt een uitdaging voor oxiderende actieve stoffen door ermee te reageren, waardoor (mogelijk) schadelijke bijproducten worden gevormd en de beschikbare oxidanten (Total Residual Oxidants, TRO) worden verlaagd. Hierdoor blijft er minder TRO over om de organismen te doden. Dit chemische proces maakt naar verwachting geen onderscheid tussen organisch koolstof dat afkomstig is van dood materiaal of levende cellen. In UV-systemen is de belangrijkste uitdaging de lage ultraviolette doorzichtigheid (UV-transmissie) die in het water veroorzaakt wordt door licht-absorberende stoffen. De belangrijkste veroorzakers van UV-absorptie zijn humuszuren als onderdeel van de DOC-fractie. Het is onduidelijk hoe levende bacteriën bijdragen aan de uitdaging die wordt gesteld aan UV-gebaseerde BWMS, behalve dat ze deel uitmaken van de POC-fractie, die reeds zijn eigen minimaal vereiste concentratie in het test water heeft. Daarom moet de relevantie van de eisen voor heterotrofe bacteriële besmetting voor het typegoedkeuringsproces worden onderzocht, aangezien er geen lozingslimieten zijn. Tegelijkertijd moet worden opgemerkt dat het ontbreken van lozingslimieten kan leiden tot een onnatuurlijk hoge bacteriegroei in behandeld ballastwater als bijwerking van het desinfecteren van organismen van $\geq 50 \mu\text{m}$ en $10\text{-}50 \mu\text{m}$. Dit risico moet ook nader worden beoordeeld.

Veel belanghebbenden vragen naar eenvoudige, betrouwbare en snelle methoden om de lozing van behandeld ballastwater te inspecteren. Bij installatie bijvoorbeeld, is een indicatieve inbedrijfstellingstest van behandeld ballastwater verplicht om het BWBS-typegoedkeuringscertificaat te krijgen. Ook kan de bemanning routinematig de prestaties van hun BWBS willen controleren door het behandelde water periodiek te testen. Ten derde hebben PSC-functionarissen toegang nodig tot eenvoudige indicatieve instrumenten om naleving van het Verdrag te kunnen handhaven. Om ballastwater goed te beoordelen, moet de grootte, levensvatbaarheid en concentratie van organismen worden bepaald. De Flow Cytometer-en-CAMERA (FlowCAM) is een FCM-techniek gecombineerd met een fotocamera. Deze is ontworpen om de concentratie en morfologische eigenschappen van deeltjes in water te bepalen, via geavanceerde software die iedere foto automatisch analyseert. In Hoofdstuk 4 werden de prestaties van de FlowCAM geëvalueerd met behulp van kunstmatige microbolletjes, UV-behandelde *Prorocentrum minimum* fytoplankton-culturen en natuurlijk zeewater behandeld door een BWBS op basis van UV licht. Analyse van microbolletjes leverde een hoge nauwkeurigheid en precisie op bij het meten van grootte en concentratie. Tijdens metingen van *P. minimum*, was de geautomatiseerde FlowCAM-analyse in staat om UV-effecten in cel-uiteindelijk en celgroei te detecteren. In natuurlijk zeewater maakten de lage concentratie en heterogeniteit van deeltjes echter nog steeds

Samenvatting

handmatige analyse van de afbeeldingen noodzakelijk. Om geschikt te worden als indicatief test-instrument moeten enkele eigenschappen van het apparaat worden verbeterd. Ten eerste is de camera-focus te gevoelig voor omgevings-trillingen. Bovendien kwamen luchtbelletjes enerzijds en verstoppingen anderzijds vaak voor tijdens het verwerken van natuurlijke zeewatermonsters. Wat goed functioneert is de mogelijkheid voor snelle overdracht van bestanden en informatie tussen partijen om de integriteit van de metingen te waarborgen. Echter, een van de fundamentele beperkingen van FlowCAM is dat het onmogelijk is om motiliteit te meten van zoöplankton organismen in de fractie van $\geq 50 \mu\text{m}$. Motiliteit is de belangrijkste levensvatbaarheidsindicator voor organismen $\geq 50 \mu\text{m}$ wat tot nu toe handmatige detectie met behulp van microscopie vereiste. Opvallend genoeg is recentelijk de BallastWISE ontwikkeld, een ander veelbelovend instrument gebaseerd op een videosysteem. Voor organismen van $\geq 50 \mu\text{m}$ gebruikt dit instrument een motiliteitstest en voor organismen van $10\text{-}50 \mu\text{m}$ een motiliteits- plus fluorescentietest. BallastWISE gebruikt een stationaire cel om de beweging en fluorescentie van individuele organismen in stilstaand water te monitoren gedurende een aantal seconden. Bovendien is de detectielimiet voldoende om de Lozingsnorm te bereiken en komen de resultaten goed overeen met traditionele microscopie in natuurlijke watermonsters. Door de gelijktijdige analyse van fluorescentie en motiliteit van $10\text{-}50 \mu\text{m}$ en $\geq 50 \mu\text{m}$ organismen, heeft de BallastWISE mogelijk veel van FlowCAM's beperkingen opgelost.

De ballastwater Lozingsnorm van het IMO Verdrag en de USCG zal in de meeste gevallen worden bereikt door installatie van een BWBS aan boord. Om de prestaties van het systeem te monitoren zijn snelle en eenvoudige test-technieken onmisbaar. Hoofdstuk 5 beschrijft of adenosinetriphosfaat (ATP) geschikt is om levende $10\text{-}50 \mu\text{m}$ organismen te kwantificeren rond $<10 \text{ cellen mL}^{-1}$. ATP is het essentiële energiemolecuul wat alle levende organismen bevatten. Uit de eerste tests bleek dat commercieel beschikbare ATP-testen niet zonder meer geschikt waren voor ATP-metingen in behandeld ballastwater. Dit kwam door zout-verstoring van de analyse-reactie en gebrek aan specificiteit voor de doelorganismen. Om deze problemen op te lossen, werd een snelle en simpele concentratiemethode ontwikkeld om (1) de gevoeligheid te verhogen, (2) zouten te verwijderen, (3) niet-doelgroep organismen te verwijderen en (4) opgelost ATP te verwijderen. Laboratoriumexperimenten toonden aan dat het zoutgehalte 33 keer werd verminderd en de concentratie-efficiëntie 85% bedroeg. De ATP-methode werd vervolgens getest op natuurlijk zoet- en zout water behandeld door een BWBS op basis van UV. Vergeleken met de alternatieve technieken Fluoresceïne Diacetaat (FDA) en PSII -efficiëntie presteerde de ATP-test beter in het

Samenvatting

onderscheiden van behandeld en onbehandeld water. Na verdere verfijningen was de detectielimiet van de ATP-test ruim onder de Lozingsnorm in een fytoplankton cultuur van *Thalassiosira rotula*. In de afgelopen jaren zijn commerciële ATP-instrumenten voor ballastwater controle met succes ontwikkeld en ingezet, zoals de B-QUA Plus (Luminultra). Met name aanvullende monsterverwerking met behulp van microbolletjes om stevige celwanden te breken, draagt bij aan het vrijkomen van intracellulair ATP wat de detectie ten goede komt. Daarom kan de B-QUA Plus-kit ook ATP detecteren in de fractie van $\geq 50 \mu\text{m}$ organismen die wordt gedomineerd door roeipootkreeftjes met harde exoskeletten. De microbolletjes breken de exoskeletten af waardoor de ATP vrijkomt voor detectie. De belangrijkste voordelen ten opzichte van op fluorescentie gebaseerde tools, zoals PSII-efficiëntie, is het vermogen om ATP te detecteren van beide grootteklassen van de Lozingsnorm en van de heterotrofe bacteriën. Op fluorescentie gebaseerde technieken daarentegen richten zich uitsluitend op een beperkt deel van de organismen, namelijk de 10-50 μm fytoplanktoncellen. Als ATP-testen correct worden toegepast, is het de verwachting dat ze betrouwbaardere resultaten rapporteren dan op fluorescentie gebaseerde technieken.

Concluderend, het onderzoek dat in dit proefschrift wordt gepresenteerd, heeft bijgedragen aan verschillende belangrijke onderwerpen op het gebied van ballastwaterbehandeling. (1) DDAC werd beoordeeld op zijn (on)geschiktheid voor ballastwaterbehandeling. (2) De toepasbaarheid van HPC werd vergeleken met alternatieve technieken en de bijdrage van heterotrofe bacteriën aan BWBS-typegoedkeuringstests werd besproken. (3) De geschiktheid van de FlowCAM om behandeld ballastwater te analyseren werd onderzocht en er werden belangrijke tekortkomingen vastgesteld. (4) Er werd een eenvoudige, snelle en betrouwbare oplossing voor monsterverwerking ontwikkeld voor ATP-analyse.

Ten slotte worden de volgende aanbevelingen gedaan om dit onderzoek voort te zetten.

1. Let bij het beoordelen van actieve stoffen voor typegoedkeuring op de noodzaak van betrouwbare geautomatiseerde inline sensoren voor doseercontrole en monitoring tijden lozen.
2. Aangezien de Lozingsnorm de heterotrofe bacteriën niet reguleert, moet de impact van levende heterotrofe bacteriën, in verhouding tot dood organisch materiaal (DOC, POC), op de vorming van giftigheid, desinfectiebijproducten, TRO-afbraak en UV-transmissie worden onderzocht. Tegelijkertijd kan het gebrek aan regulering van heterotrofe bacteriën leiden tot een onnatuurlijk hoge bacteriegroei in behandeld

Samenvatting

ballastwater als bijwerking van het desinfecteren van organismen van $\geq 50 \mu\text{m}$ en 10-50 μm . Deze impact moet ook worden beoordeeld.

3. Aangezien de FlowCAM niet in staat is om gelijktijdig de organismen van $\geq 50 \mu\text{m}$ en 10-50 μm te analyseren, noch de beweeglijkheid van organismen kan beoordelen, wordt aanbevolen om door te gaan met de ontwikkeling van alternatieve apparaten voor ballastwater testen.
4. Het wordt aanbevolen om de ATP-concentraties van een grote verscheidenheid aan 10-50- μm -organismen in verschillende stadia van hun groeicyclus tussen 5 en 50 cellen mL^{-1} te meten om een betrouwbaar geslaagd/gefaald ATP-niveau te krijgen voor ballastwater dat wel of niet voldoet aan de Lozingsnorm.

