

FAKULTETA ZA VARSTVO OKOLJA

DIPLOMSKO DELO

**ŠKODLJIVA CVETENJA FITOPLANKTONA – PRIMERJAVA
DVEH ZAŠČITENIH METOD ZAZNAVANJA**

Aljoša Krajnc

VELENJE, 2022

FAKULTETA ZA VARSTVO OKOLJA

DIPLOMSKO DELO

**ŠKODLJIVA CVETENJA FITOPLANKTONA – PRIMERJAVA
DVEH ZAŠČITENIH METOD ZAZNAVANJA**

Aljoša Krajnc

Mentor: prof. dr. Bojan Sedmak

Varstvo okolja in ekotehnologije

Na podlagi Diplomskega reda izdajam naslednji

SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

Študent Visoke šole za varstvo okolja **Aljoša Krajnc** lahko izdela diplomsko delo z naslovom v slovenskem jeziku:

Škodljiva cvetenja fitoplanktona - primerjava dveh zaščitenih metod zaznavanja.

Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku:

Harmful blooms of phytoplankton - comparison of two protected detection method.

Mentor: **prof. dr. Bojan Sedmak.**

Diplomsko delo mora biti izdelano v skladu z Diplomskim redom VŠVO.

Pouk o pravnem sredstvu: zoper ta sklep je dovoljena pritožba na Senat VŠVO v roku 8 delovnih dni od prejema sklepa.



Prof. dr. Boštjan Pokorny
dekan

Visoka šola za varstvo okolja

Trg mladosti 7 | 3320 Velenje

t: 03 898 64 10 | f: 03 89864 13 | e: info@vsvo.si

www.vsvo.si



Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Bojanu Sedmaku za strokovno pomoč pri pisanju diplomskega dela in za vse posredovano znanje, ki je bilo ključnega pomena za nastanek tega dela.

Zahvaljujem se tudi družini in prijateljem, ki so me podpirali, mi stali ob strani in mi pomagali s prevajanjem literature in oblikovanjem diplomskega dela.

Hvala.

IZJAVA O AVTORSTVU

Podpisani Aljoša Krajnc, vpisna številka 34180010, študent visokošolskega strokovnega študijskega programa Varstvo okolja in ekotehnologije, sem avtor diplomskega dela z naslovom **Škodljiva cvetenja fitoplanktona – primerjava dveh zaščitnih metod zaznavanj**, ki sem ga izdelal pod mentorstvom prof. dr. Bojan Sedmaka.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je predloženo delo moje avtorsko delo, torej rezultat mojega lastnega raziskovalnega dela;
- oddano delo ni bilo predloženo za pridobitev drugih strokovnih nazivov v Sloveniji ali tujini;
- so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem delu, navedena oziroma citirana v skladu z navodili FVO;
- so vsa dela in mnenja drugih avtorjev navedena v seznamu virov, ki je sestavni element predloženega dela in je zapisan v skladu z navodili FVO;
- se zavedam, da je plagiatorstvo kaznivo dejanje;
- se zavedam posledic, ki jih dokazano plagiatorstvo lahko predstavlja za predloženo delo in moj status na FVO;
- je diplomsko delo jezikovno korektno in da je delo lektorirala Ana Žagar, mag. prof. slov. jez. in knjiž.,
- dovoljujem objavo diplomskega dela v elektronski obliki na spletni strani FVO;
- sta tiskana in elektronska verzija oddanega dela identični

Datum: _____

Podpis avtorja: _____

IZVLEČEK

V diplomskem delu smo raziskovali problematiko cvetenja škodljivega fitoplanktona in sodobne metode zaznavanja cvetenja fitoplanktona.

V uvodnem delu sta predstavljena problematika škodljivega cvetenja fitoplanktona na globalni in lokalni ravni ter soočanje s toksičnimi metaboličnimi produkti cianobakterij v sedanosti in v zgodovini. Prva opažanja nevarnosti cianobakterij so kemiki opazili že v 17. stoletju v obliki masovnih pomorov živali. Cvetenja pa so bila po sodobnih radio karbonskih raziskavah zaznana že v času obstoja dodo ptic (*Raphus cucullatus*).

V jedrnem delu sta opisani dve sodobni metodi zaznavanja fitoplanktona s fluorometri, ki temeljijo na zaznavanju oddane fluorescence fitoplanktona, ko je silovito osvetljen s svetlobo fotopigmentu najbolj absorbirane valovne dolžine. V delu smo patentirani metodi predstavili in primerjali glede na njuno uporabnost tako v komercialne kot v raziskovalno-analitske namene. Ugotovili smo, da sta metodi po delovanju in osnovi podobni, saj uporabljata podobno metodologijo zaznavanja, z razliko v velikosti in kompleksnosti delovanja metod ter s številom senzorjev, uporabljenih v metodi, in količini ter kakovosti pridobljenih podatkov. S tem smo lahko sklepali o potencialnih prednostih in slabostih posamezne metode ter opredelili, za katere namene se katera metoda lahko uporablja učinkovitejše.

Ugotovili smo, da obstaja potreba po hitrejših zanesljivih metodah zaznavanja cvetenja škodljivega fitoplanktona in trenutno najboljšo možnost predstavlja uporaba fluorosenzorjev, ki zaznavajo oddano svetlobo, ki je posledica vzbujanja fotopigmenta s svetlobo določene valovne dolžine. Izvedeli smo, da sta število in vrsta fluorosenzorjev pomembna, ko se odločamo, katero metodo in napravo bomo uporabljali za analize. Samo s senzorjema za klorofil in fikocianin se zagotovita zadostna količina in kakovost podatkov za preliminarne raziskave in v namene obveščanja javnosti o potencialnih nevarnih fitoplanktonskih cvetenjih. Kompleksnejši sistemi z več senzorji za ostale fotopigmente s svojim večjim naborom podatkov, s katerimi se lahko delajo podrobnejše primerjave in raziskave, so primernejši za statične laboratorije in so boljši v raziskovalno-analizne namene.

Ključne besede: HAB škodljiva cvetenja fitoplanktona, patent, senzorika, zaznavanje v realnem času, fluorescenca

ABSTRACT

In the diploma thesis we researched harmful algal blooms (HABs) and modern methods for the detection of algal blooms.

The first part of the thesis talks about the problem of HABs on a global and local scale, and about the toxic metabolites of cyanobacteria in the past and present. The dangers of cyanobacteria were first noted by chemists in the 17th century in the form of mass animal killings. With the help of the modern technique of radiocarbon dating, toxic algal blooms and mass killings were traced back to the time of the dodo bird (*Raphus cucullatus*).

The core of the thesis contains the introduction and a comparison of two patented modern phytoplankton detection methods using fluorometers, which measure the excess light given off as fluorescence from phytoplankton that reacts to being bombarded with light with the wavelength that is most absorbed by its pigments. In the thesis we have introduced and explained the basics and compared the two patented methods according to their function and usability, both in commercial use and in the research and analytical sector. We found out that the methods, although based upon the same principle of fluorescence detection, differ in complexity and size of design, the number of sensors used, and in the quantity and quality of acquired data. With these conclusions we were able to theorize possible applications for both methods and which method is better suited for what task.

We have learned that there is a need for a fast and reliable method for the detection of HABs. The best option currently available is fluorosensors that detect light emitted from photopigments after they are exposed to light with specific wavelengths. We discovered that the number and type of fluorosensors used is important when deciding on which method and system we should use in our analysis or research. Sensors for chlorophyll and phycocyanin already provide sufficient data to execute preliminary tests and to establish an early warning system for potentially dangerous HABs. More complex systems with multiple sensors for different types of photopigments provide a larger pool of data that are more suited for laboratories, with which we can reach more detailed conclusions and carry out more intense research and analyses.

Keywords: HAB, harmful algal blooms, patent, sensorics, real-time monitoring, cyanobacteria, fluorescence

KAZALO

Zahvala.....	1
IZJAVA O AVTORSTVU	I
IZVLEČEK	II
ABSTRACT	III
KAZALO	IV
KAZALO SLIK.....	V
1. UVOD	1
1.1 Namen in cilj dela	2
1.2 Hipoteze	2
1.3 Metode dela.....	2
2. Fitoplankton	3
2.1 Cianobakterije.....	4
2.1.1 Vrste cianotoksinov.....	5
2.2 Opažanja v zgodovini	6
2.3 Cianobakterije v Sloveniji.....	7
3. Delovanje fluorometrov	7
4. Patenti in patentiranje	8
4.1 Definicija.....	8
4.2 Vrste patentov	8
4.3 Namen patenta	9
4.3.1 Legalni vidik.....	9
4.3.2 Družbeni vidik.....	9
5. Predstavitev patentov.....	10
5.1 Parametri primerjave	10
6. Patent EP3073246B1.....	11
6.1 Opis patenta in princip delovanja.....	11
7. Patent DE102009036562A1.....	14
7.1 Opis patenta in princip delovanja.....	14
8. Klasične metode	16
8.1 Pogosto uporabljene klasične metode	16
8.2 Primerjava s sodobnimi metodami	17
9. Primerjava patentov	18
9.1 Kompleksnost.....	18
9.2 Uporabnost.....	18
9.3 Cena.....	19
9.4 Namen uporabe.....	20

10. Sklepi.....	22
11. Povzetek.....	23
VIRI IN LITERATURA.....	25

KAZALO SLIK

Slika 1: Primeri predstavnikov fitoplanktona, ki lahko tvorijo obsežna cvetenja in s tem ogrožajo ekosistem (Vir: earthobservatory.nasa.gov/features/Phytoplankton)

Slika 2: Hiter razvoj cvetenja fitoplanktona med 11. (zgoraj) in 25. oktobrom (spodaj) 2009, vzhodno od Nove Zelandije (Fotografija: Robert Simmon in Jesse Allen,, NASA, MODIS satelit, vir: earthobservatory.nasa.gov/features/Phytoplankton)

Slika 3: Strukturna formula mikrocistina (levo) in nodularina (desno) nam pokaže podobnost med molekulama

Slika 4: Strukturna formula anatoksina-a (s)(levo) in ene od oblik saksitoksina (desno)

Slika 5: Poenostavljena skica sistema opisanega v patentu EP3073246B1 (Vir: patent EP3073246B1)

Slika 6: Princip detekcije senzorjev kot trdi patent (vir: patent EP3073246B1)

Slika 7: Stabilnost fluorescence fikocianina (PC) monokulture cianobakterije rodu *Microcystis* iz katerega lahko sklepamo velikost populacije v vzorcu. (vir: patent EP3073246B1)

Slika 8: Prve osnovne tipe signalov, ki jih dobimo pri analizi visoke frekvence zajemanja. A: Determinističen tip odgovora krogličaste cianobakterije *Microcystis* (sev PCC7806) in B: stoichiosten tip signala zelen alge *Chlorella*- Kultura cianobakterij ima konstanten premer celic, medtem ko je velikost alg v kulturi zelo različnih premerov. (vir: patent EP3073246B1)

Slika 9:A: AlgaeTorch senzor proizvajalca Astronic, ki ga uporablja patentiran postopek. Na njem so vidne diode različnih valovnih dolžin (vir: <https://www.bbe-moldaenke.de>), B: Naprava AlgaeOnlineAnalyser, ki jo uporablja patentiran postopek (vir: <https://www.bbb-moldaenke.de>)

Slika 10: Graf "Norm-Fluoreszenzspektrum" oziroma spekter fluorescentnih konstant, kot po patentu DE1020090365621A1

Slika 11: A: Secchi disk (levo) in planktonska mrežica (desno), B Poenostavljen prikaz principa uporabe in delovanja Secchi diska (vir: <https://link.springer.com/>)

Slika 12: Graf "Norm-Fluoreszenzspektrum" oziroma spekter fluorescentnih konstant, kot po patentu DE1020090365621A1

Slika 13: Naprava AlgaeOnlineAnalyser, ki uporablja patentiran postopek

Slika 13: A: Avtomatsko vodeno plovilo Stop CyanoBloom v okviru projekta LIFE Stop CyanoBloom (vir: lifestopcyanobloom.arhel.si).B: Mobilna naprava za detekcijo fitoplanktona (Vir: www.nib.si)

Slika 14: Potek analize vzorca z napravo po patentirani metodi EP3073246B

1. Uvod

Cvetenje škodljivega fitoplanktona v širšem pomenu besede (HAB – harmful algal blooms) je globalni pojav, ki s seboj prinaša veliko ekoloških, ekonomskih in zdravstvenih posledic tako za ljudi kot tudi za živali, ki prihajajo v stik s tako ogroženimi vodnimi telesi. Cvetenje fitoplanktona je naravni pojav, ki zaradi človeške dejavnosti vedno pogosteje in v vse večjem obsegu obvladuje površinska telesa. Glavni dejavniki (kar 80 %), ki povzročajo povišanje vnosa hranil v vodna telesa, so kmetijstvo, krčenje gozdov, živinoreja, industrija, promet in odlaganje odpadkov. (*Backer, et al., 2015*)

Ekološke posledice so vidne zelo hitro po pojavu cvetenja. Gre za prevlado neke skupine organizmov, ki lahko povzročijo anoksijo v vodnem telesu (pomanjkanje kisika), kar vodi v pogin številnih organizmov. Pogoste so tudi zastrupitve vodnih in obvodnih organizmov z metaboličnimi produkti toksičnih rodov alg in cianobakterij, ki tako predstavljajo ekološko in zdravstveno tveganje ter lahko terjajo tudi življenja ljudi, ki prihajajo v stik s tako onesnaženo vodo. Kronična izpostavitve nizkim odmerkom cianotoksinov predstavlja resno nevarnost ljudem, saj poviša možnost degenerativnih obolenj in hudih poškodb jeter. (*Milutinović, et al., 2002*).

Ekonomske posledice se občutijo po cvetenju. Te predstavljajo izgube v gojenju rib in ribištvu ter izgubo prihodka rekreativnih dejavnosti na in ob vodi (urejene plaže, tekaške in sprehajalne poti ...). Sanacija posledic je dolgotrajen in drag postopek, med katerim je vodno telo v primeru nadaljnjega onesnaževanja še vedno izpostavljeno ponovnemu cvetenju fitoplanktona.

Cvetenje se pojavi zelo hitro, kar pomeni, da je treba tudi hitro ukrepati, v izogib posledicam. Tukaj se pojavi problem pri klasičnih metodah vzorčenja, ki predstavljajo časovno zahtevno delo usposobljenih strokovnjakov in visoke stroške laboratorijskega dela. Za to obstaja prizadevanje za izdelavo sistemov, ki aktivno, v realnem času merijo prisotnost fitoplanktona in ob zaznanem povišanju števila nevarnih organizmov obvestijo pristojne službe, da pravočasno ukrepajo. Zaradi tega strokovnjaki že vrsto let razvijajo in uveljavljajo sodobne metode zaznavanja fitoplanktona. Ti uporabljajo senzorje, ki merijo fluorescenco klorofila in fikocianina ter različnih pomožnih fotosinteznih pigmentov. Senzorji, ki se uporabljajo v teh metodah, so nastavljeni, da zaznajo specifično valovno dolžino svetlobe, ki jo oddajajo celice, ko se v celici zaradi nenadne čezmerne izpostavitve zaprejo reakcijski centri in celica začne oddajati odvečno svetlobo v obliki fluorescence (Kautsky učinek) (*Kautsky & Hirsch, 1931*).

S pomočjo vedno hitrejših tehnologij prenosa podatkov (5G omrežja) je danes možno prenesti ogromne količine informacij v realnem času in s tem delno avtomatizirati sistem zaznavanja fitoplanktonskih cvetenj.

1.1 Namen in cilj dela

Nameni diplomskega dela so primerjati dve različni patentirani metodi zaznavanja fitoplanktona, prepoznati uporabnost posamičnih metod v realnih scenarijih, identificirati potencialne prednosti in slabosti ene in druge ter poiskati, v katerih primerih je posamezna metoda primernejša.

1.2 Hipoteze

V diplomskem delu smo raziskali naslednje hipoteze:

1. Klasične metode zaznavanja nevarnega fitoplanktona se morajo uporabljati hkrati s sodobnimi instrumentalnimi metodami.
2. Klasične metode so nenadomestljive tudi ob uporabi sodobnih instrumentalnih metod.
3. Sodobne instrumentalne metode podkrepijo in poglobijo naše razumevanje fiziologije fitoplanktona.
4. Sodobne instrumentalne metode omogočajo analizo fitoplanktonske populacije v realnem času.

1.3 Metode dela

V teoretičnem delu diplomskega dela bom z opisno metodo, torej s prebiranjem relevantnih virov, ugotavljal prednosti posamezne patentirane sodobne instrumentalne metode zaznavanja fitoplanktona in preveril tudi zastavljene hipoteze, katere bom potrdil oziroma ovrgel. S to metodo bom tudi pregledal klasične metode zaznavanja fitoplanktona (Secchi disk, planktonsko mrežico, in mikroskopiranje) ,ki jih bom opredelil po njihovi relevantnosti v primerjavi s sodobnimi metodami dela. Na zadnje bom s to metodo določil tudi ali se lahko sodobne instrumentalne metode zaznavanja lahko uporabljajo brez klasičnih metod z identičnimi ali vsaj primerljivimi rezultati.

2. Fitoplankton

Fitoplankton je avtotrofni del združbe, ki živi tako v slanih kot v sladkih vodah. Je zelo široka skupina organizmov, ki vsebuje več podskupin, kot so na primer diatomeje, dinoflagelati in cianobakterije. Ime izvira iz grških besed *phyto* (rastlina) in *plankton* (tavajoče), kar pomeni tavajoča rastlina.

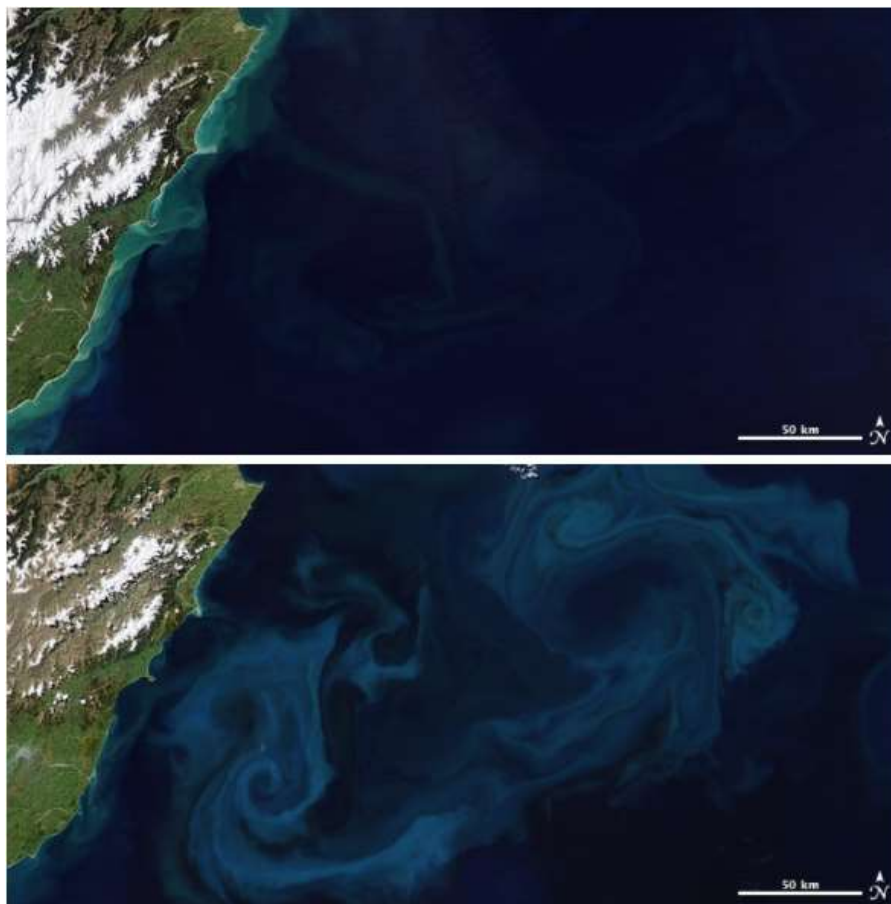
To ime imajo zaradi fiziologije in zgradbe. Kot je prikazano na sliki 1, večina fitoplanktonskih organizmov samostojno ni sposobna gibanja in je zato odvisna od tokov in turbulence, ki jo ustvarjajo vetrovi in drugi, večji organizmi.



Slika 1: Primeri predstavnikov fitoplanktona, ki lahko tvorijo obsežna cvetenja in s tem ogrožajo ekosistem (Vir: earthobservatory.nasa.gov/features/Phytoplankton)

Ker so avtotrofi, in s tem producenti kisika, s svojim delovanjem prispevajo k samočistilni funkciji vodnih teles, s tem, da porabljajo hranila, ki so prisotna v vodi. Strokovnjaki ocenjujejo, da morski fitoplankton proizvede med 50 in 80 % vsega svetovno proizvedenega kisika (*National ocean service U.S. department of commerce, 26/2/21*). Večina fitoplanktonskih organizmov je nezaznavna s prostim očesom v normalnih vodnih razmerah.

Vidni postanejo le ob cvetenju, kadar je v vodi prisotna visoka koncentracija organskih in neorganskih hranil. Fitoplankton ima zmožnost izjemno hitrega razmnoževanja ob ugodnih pogojih, kot je vidno na sliki 2.



Slika 2: Hiter razvoj cvetenja fitoplanktona med 11. (zgoraj) in 25. oktobrom (spodaj) 2009, vzhodno od Nove Zelandije (Fotografija: Robert Simmon in Jesse Allen,, NASA, MODIS satelit, vir: earthobservatory.nasa.gov/features/Phytoplankton)

2.1 Cianobakterije

Cianobakterije so del fitoplanktonske združbe in so najbolj obravnavana skupina, ko pride do fitoplanktonskih cvetov. Problem pri cvetenju cianobakterij sta anoksija vode in kopičenje toksinov, ki so metabolični produkti prehranjevanja cianobakterij.

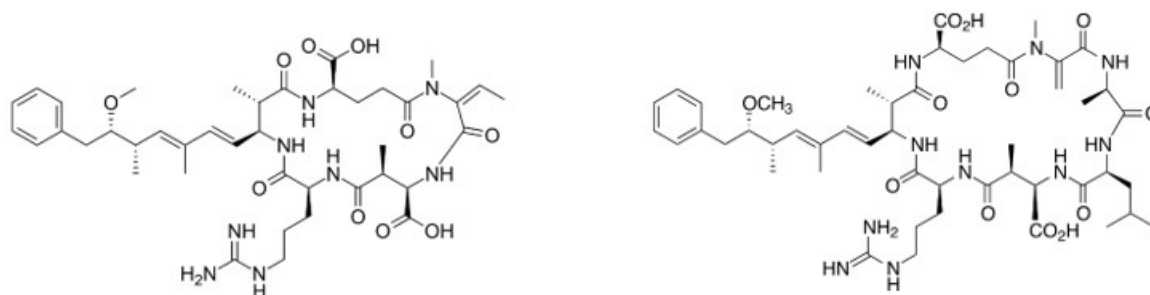
V Sloveniji imamo večje težave predvsem s sladkovodnimi fitoplanktonskimi cvetenji, ki se pojavijo na večjih in tudi manjših vodnih telesih, kjer je večina toksičnih cvetenj fitoplanktona vrste *Microcystis aeruginosa* (Sedmak & Kosi, 1997). Naša obala in morje, kar se tiče cianobakterij, nista ogrožena.

Toksini, ki jih cianobakterije proizvajajo, se po toksičnosti vrstijo od dražljivih snovi do izjemno potentnih toksinov, ki so usodni v zelo majhnih količinah in povzročajo nepopravljivo škodo na genetski ravni in so znani karcinogeni promotorji tumorjev (Žegura, et al 2002; Šuput, 2011).

2.1.1 Vrste cianotoksinov

Med najbolj razširjene in pogoste toksine sodijo hepatotoksini, katerih ciljni organ so jetra. V sladkih vodah je po tej karakteristiki najbolj znan mikrocistin, ki ga proizvajajo cianobakterije rodov *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* in *Oscillatoria*.

Drug zelo prepoznaven hepatotoksin je nodularin, ki je po kemijski zgradbi zelo podoben mikrocistinu. Zanj je do zdaj edina znana vrsta cianobakterije, ki ga proizvaja *Nodularia spumigena*, ta pa je prisotna v brakičnih vodah (Huisman et al., 2018).



Slika 3: Strukturna formula mikrocistina (levo) in nodularina (desno) nam pokaže podobnost med molekulama

Ta dva toksina (slika 3) sta inhibitorja serinskih in treoninskih fosfatov. Njuno delovanje vodi do kopičenja krvi v jetrih, kar je najpogostejši vzrok smrti – hemoragični šok (Azevedo et al., 2002). Manjše doze ob kroničnem izpostavljanju toksinov močno zmanjšajo delovanje jeter (Milutinović et al., 2002; Frangež et al., 2000).

Druga velika skupina toksinov so nevrotoksini, katerih ciljni organ je živčni sistem. Najbolj poznani so anatoksin-a, anatoksin-a(s) (slika 4) ter različne vrste saksitoksinov. Deluje lahko kot inhibitorji acetilholinesteraze ali kot blokada natrijevih kanalov. V obeh primerih pride ob zastrupitvi do konvulzij in nekontroliranega gibanja mišic ter do paralize, ki prepreči dihanje in je posledično najpogostejši vzrok smrti (Funari & Testai, 2008).



Slika 4: Strukturna formula anatoksina-a (s) (levo) in ene od oblik saksitoksina (desno)

Tretja večja skupina cianotoksinov pa so *dermatoksini*, ki v primerjavi s prejšnjima skupinama niso tako smrtonosni, vendar so še vedno zdravju škodljivi. V tej skupini so predvsem lipopolisaharidi, velikih verižnih molekul, ta skupina pa šteje veliko molekul. Med dermatoksine sodita še lingbiatoksin in aplisiatoksin, ki sta povezana z akutnim dermatitisom, medtem ko je lingbiatoksin tudi dokazan tumorski promotor (Smith et al., 2008).

2.2 Opažanja v zgodovini

Cvetenje fitoplanktona je bilo opaženo pred približno 350 leti, takrat o obstoju mikroorganizmov in enoceličnih organizmov še ni bilo veliko znano.

Tako je G. Kirkby leta 1672 za Kraljevo združbo v Londonu poslal pismo, v katerem je opisal pojav zelene gošče, ki povzroča množično umiranje živali. To besedilo je eden najstarejših odkritih virov, ki omenjajo cvetenje fitoplanktona, dolgo pred industrijsko revolucijo.

»...*The water sweet and wholesome; but only in the three Summer months, June, July, and August, it becomes every year, during the dry weather, green in the midle with an hairy efflorescence; which green substance, being some violent wind forced ashore, and with the water drunk by any Cattel, Dog, or Poultry, causeth certain and sudden death; whereas at the same time, that a knowing and ingenious person (who first acquainted me with this,) saw three dogs killed with it, horses that were ridden the water beyond the place, where this green substance floated, drunk without any hurt: and that also, during the same season, the water in the streams, that flow from it, are wholesome. I shall endeavour, if you desire it, to procure some of that stuff, and get it examin'd by a chymical analysis...*«

»... *Voda sladka in neoporečna, vendar le v treh poletnih mesecih, junija, julija in avgusta postane vsako leto v suhem vremenu zelena in v sredini z dlakavim cvetom, katere zelena substanca, ki jo veter porine do obale in jo spijejo živali, psi in kokoši povzroči gotovo smrt. Medtem ko ob tem času, je bistra oseba (ki me je najprej seznanila s tem) videla tri pse, ki so poginili, a konji, ki so šli globje, preko zelene substance, so pili brez škode, pa tudi to da v enaki sezoni, vode potokov, ki tečejo iz jezera so bile čiste. Prizadevam si, če želite, da pridobim nekaj te substance in jo pošljem v analizo h kemiku...*

(Kirkby C., 1672)

Prvo raziskano cvetenje fitoplanktona je opravil George Francis leta 1878, ko je raziskoval pomor živine ob jezeru Aleksandria v Južni Avstraliji. V vodi je našel, kar je bilo kasneje imenovano *Nodularia spumigena*, ki jo je pravilno označil kot povzročitelja množičnega pomora. Uvedel je tudi prvo aktivno preprečevanje nadaljnjih zastrupitev s sistemom obveščanja s strani policije in kmetovalcev. (Francis & Adelaide, 1878)

Najdeni so bili tudi dokazi o množičnem izumrtju živali, in sicer dodo ptic (*Raphus cucullatus*) na otoku Mauritius. Vzorci zemlje in nasipov nekoč večjega jezera na otoku so razkrili prisotnost diatomej in sledi diatoksantina, radio karbonska analiza pa je vzorec ocenila na približno 4200 let pred našim štetjem.

De Boer in sodelavci menijo, da je močna suša (zmanjša količina vode in povečano število živali) povzročila primerne pogoje za cvetenje cianobakterij (toplejše temperature, veliko hranil), kar je bilo usodno za živali v območju, dolgo preden je človek sploh posegel vanj (de Boer et al., 2015).

Zgoraj navedeni primeri dokazujejo aktivnost cianobakterij dolgo pred vplivom človeka in da naša dejanja ter sodoben način življenja močno pripomoreta k nastajanju novih fitoplanktonskih cvetenj. V takšnih primerih, če cvetenja niso pravočasno sanirani, povzročijo ogromne ekonomske in ekološke posledice tako za ljudi kot za naravo.

2.3 Cianobakterije v Sloveniji

Kot globalen ekološki problem so razumljivo škodljiva cvetenja fitoplanktona tudi problem v Sloveniji. Tako je leta 2018 Drolc raziskovala prisotnost cianobakterij v ribnikih in ugotovila prisotnost več rodov in vrst cianobakterij v vseh desetih vzorcih ribnikov in jezer. Med prevladujočimi cianobakterijami sta *Microcystis aeruginosa* ter *Microcystis flos-aquae*. Za lažjo predstavo oblike in velikosti cveta je uporabila tudi brezpilotno letalo, ki je pomagalo pri določevanju mesta fitoplanktonskih cvetov (Drolc, 2018; Sedmak & Kosi, 1997).

3. Delovanje fluorometrov

Odziv pigmentov, kot sta fikocianin in klorofil, na obsevanje je najprej opisal Kautsky, vendar zaradi premajhnega zanimanja na tem področju ni bilo veliko napredka, dokler se ni začel razvoj na področju metodologije in dokler niso izumili prvega fluorometra, naprave za merjenje količine pigmentov in posledično količine fitoplanktona v vodi. Leta 1990 so se strokovnjaki področja dogovorili za poenoteno poimenovanje pojmov za uporabo s fluorometri (van Kooten & Snel, 1990). Van Kooten je bil tudi med prvimi, ki je podrobno opisal Kautsky učinek.

Fluorometri so sestavljeni iz hitro utripajočega vira svetlobe, nastavljene na določeno valovno dolžino, komplementarni senzor pa zazna svetlobo, ki jo oddajajo obsevane celice pri določeni valovni dolžini (Sode et al., 1991). Vir svetlobe obsveti fitoplankton, v katerem se zaradi valovne dolžine 590 nm (valovna dolžina, ki jo fikocianin najbolj absorbira) vzbudi fikocianin, ki ob odvečnem odmerku absorbirane svetlobe zapre reakcijske centre in zaradi tega začne oddajati svetlobo (pojav fluorescence) daljše valovne dolžine pri 650 nm, ki jo zazna senzor.

Pigmentov, ki so podvrženi Kautsky učinku, je več, poleg njih pa fluorescenco ob osvetlitvi proizvajajo tudi nekatere organske spojine. Zaradi tega je treba pri meritvah fitoplanktona meriti pigment fikocianin, ki je prisoten le v cianobakterijah, in vzporedno tudi klorofil, ki je prisoten tako v cianobakterijah kot tudi v ostalem fitoplanktonu. S tem se zmanjša možnost napak in se iz razmerja ugotavlja prisotnost cianobakterij.

Merjenje toksičnih cianobakterij so dokazali med drugimi Gregor in sodelavci v poročilu leta 2006, z merjenjem prisotnosti škodljivih cianobakterij s fluorometri v rezervoarju Vir na Češkem. Z merjenjem odzivov fitoplanktona na valovni dolžini 590 in 485 nanometrov in glede na razmerje med signaloma se lahko določi delež, ki predstavlja cianobakterije. Sklenili so, da je določanje prisotnosti cianobakterij v vodnih vzorcih s fluorometri verodostojno ter pripomnili, da naj bi se vzporedno merila prisotnost evkariontskih alg, ki najbolj absorbirajo modro svetlobo, saj bi te lahko privedle do lažnega pozitivnega odziva senzorja (Gregor et al., 2007).

Potrebo po več kot samo senzorju za klorofil so v dvoletni raziskavi dokazali tudi na Rozina in sodelavci leta 2014 in 2015. Na dveh manjših vodnih telesih so izvajali tedenske meritve s fluorosenzorjema za klorofil in fikocianin ter podatke primerjali s klasično metodo taksonomije in računanja biovolumna. Ugotovili so, da brez fikocianinskega fluorosenzorja klorofilni fluorosenzor lahko poda lažno pozitiven rezultat. (Rozina et al., 2018)

Leta 2014 so Parésys in sodelavci uporabili PhytoSensor, ki zaznava valovne dolžine 680 nm (+/- 10 nm) in vzorec obseva s tremi različnimi valovnimi dolžinami; 430 nm +/- 30 nm, 540 nm +/- 15 nm in 625 nm +/- 20 nm. S poskusi so razdelili modre in rdeče cianobakterije, ki se lahko razločijo z vrsto fluorometričnega odziva, ki je odvisna od fotopigmentov v fitoplanktonu (Parésys et al., 2014).

4. Patenti in patentiranje

4.1 Definicija

Republika Slovenije, oddelek Urada RS za intelektualno lastnino, besedo *patent* definira kot:

»Patent je izključna pravica fizične ali pravne osebe za izum, ki je nov, na inventivni ravni in je industrijsko uporabljiv.

- *Izum oziroma tehnična rešitev je nova, če ni obsežena s stanjem tehnike, se pravi, da ni bila pred datumom vložitve patentne prijave dostopna javnosti z ustnim ali pisnim opisom, z uporabo ali na katerikoli drug način.*
- *Izum je na inventivni ravni, če za strokovnjaka predmet izuma očitno ne izhaja iz stanja tehnike.*
- *Izum je industrijsko uporabljiv, če se predmet izuma lahko proizvede ali uporabi v katerikoli gospodarski dejavnosti, vključno s kmetijstvom.«*

(Urad RS za intelektualno lastnino: gov.si/teme/patenti/)

4.2 Vrste patentov

Patentno varstvo je omejeno na ozemlje, za katero je pristojna ustanova, v kateri je bil vložen patent. V ta namen obstajajo:

- **Nacionalni patent** (Veljaven je samo na ozemlju države, v kateri je bil vložen. Vloži se v patentnem uradu matične države in v matičnem jeziku.)
- **Evropski patent** (Veljaven je v vseh članicah Evropske unije in evropskega poslovnega območja – EPO (European economic area – EEA). Vloži se v uradu članice EU/EPO v matičnem jeziku, nato še v enem od uradnih jezikov Evropskega parlamenta.)
- **Mednarodni patent** (Veljaven je v več kot 150 državah podpisnicah pogodbe o sodelovanju na področju patentov (Patent Cooperation Treaty – PCT). Najprej se patent vloži na EPO ali na slovenskem uradu, sprva lahko v lastnem jeziku, nato se nadaljuje na svetovni organizaciji za intelektualno lastnino (WIPO)).

Po veljavnosti se ti patenti v veliki večini razlikujejo po njihovem obsegu in pokritosti, vsi patenti pa v bistvu naredijo enako; izumitelju dovolijo izključno pravico do uporabe patentiranega izuma pod svojim imenom ter kontroliranega dodeljevanja pravice do uporabe drugim. V Sloveniji se zaradi majhnega trga skoraj ne spleča dobiti le slovenskega patenta, medtem ko evropski patent poskrbi, da se vse članice ravnajo po pravilih in s tem, tudi večje države, z močnejšimi trgi. Patent torej zaščiti manjše države in njihov trg pred ekonomsko močjo večjih članic podpisnic in jih zaveže k upoštevanju pravil.

4.3 Namen patenta

4.3.1 Legalni vidik

Namen patenta je imetniku dodeliti izključno pravico do uporabe patentiranega postopka oziroma do proizvodnje patentiranega proizvoda, kot narekuje 18. člen Zakona o industrijski lastnini (ZIL-1):

18. Člen (pravice iz patenta)

(1) Patent zagotavlja imetniku naslednje izključne pravice:

- a) če je predmet patenta proizvod: preprečitev tretjim osebam, ki nimajo imetnikove privolitve, da izdelujejo, uporabljajo, ponujajo v prodajo, prodajajo ali v te namene uvažajo zadevni proizvod;*
- b) če je predmet patenta postopek: preprečitev tretjim osebam, ki nimajo imetnikove privolitve, da postopek uporabljajo in ponujajo v prodajo, prodajajo ali v te namene uvažajo proizvod, ki je pridobljen neposredno s tem postopkom.*

(2) Obseg patentnega varstva je določen z vsebino patentnih zahtevkov. Za razlago patentnih zahtevkov pa se uporabljajo tudi opis in skice.

(Uradni list: Zakon o industrijski lastnini (ZIL-1))

S tem se zagotovi, da je izumitelj in imetnik patenta plačan, kadar tretja oseba vloži prošnjo za uporabo patenta v svoje proizvodne, izvajalne ali druge namene. Te pravice so pravnomočne le v območju, kjer je patent prijavljen in veljaven.

4.3.2 Družbeni vidik

Evropski in svetovni patent imata velik pomen za izumitelja in za državo, v kateri sta vložena, saj namesto odhodkov denarnih sredstev poskrbita za prihodek, ta pa neposredno pomaga pri razvoju novih tehnologij in pri financiranju raziskav na teh področjih.

S tega stališča ima patent poleg monetarnih koristi tudi korist s socialno-družbenega, razvojnega in ekonomskega vidika. Pripomore k nadaljnjemu razvoju in možnostim razvoja novih tehnologij.

5. Predstavitev patentov

V diplomskem delu bosta obravnavani patentirani metodi zaznavanja fitoplanktona; **EP3073246B1** in **DE102009036562A1**, ki obe za zaznavanje uporabljata senzor za zaznavanje fluorescentnih odzivov fitoplanktona s hitro utripajočo LED diodo, umerjeno na specifične valovne dolžine.

5.1 Parametri primerjave

Patentirani metodi bosta najprej opisani. Opisana bosta princip delovanja naprave in potek metode, nato bosta primerjana glede na naslednje parametre:

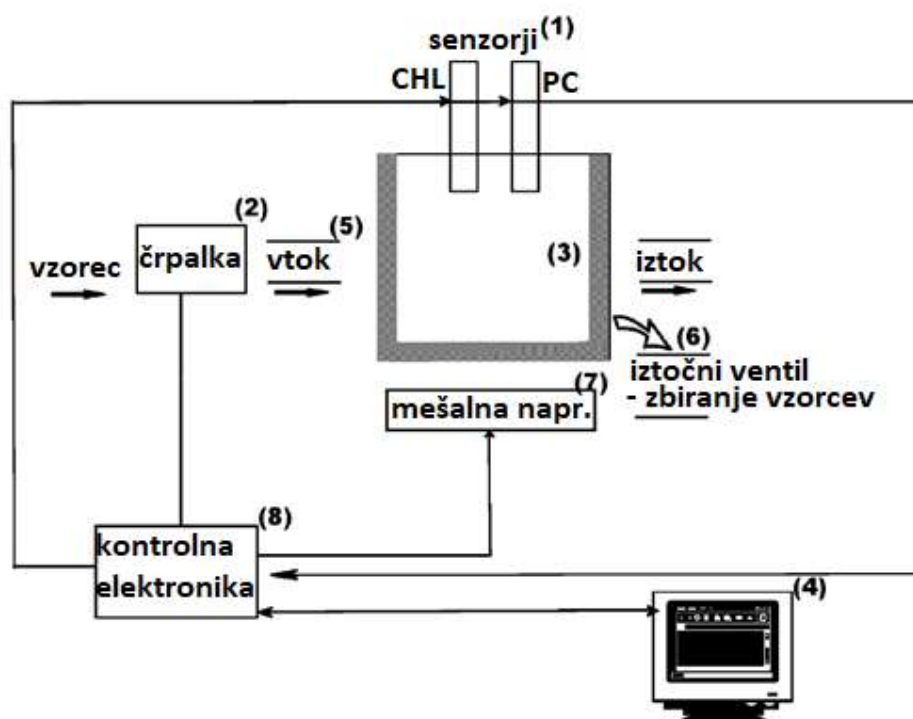
- **Kompleksnost** – Kompleksnost ter zahtevnost patentirane metode in njene uporabe.
- **Uporabnost** – Zahtevnost transporta in prestavljanja naprave, potrebne za delo na terenu.
- **Cena** – Cena nabave in obratovanja patentirane naprave.
- **Namen uporabe** – Najprimernejše okoliščine za uporabo patentirane metode.

S podanimi primerjavami parametrov bodo pridobljene informacije, ki lahko pomagajo ugotoviti, katera od patentiranih metod je primerna za določeno situacijo in poglobi razumevanje delovanja teh in podobnih sodobnih metod zaznavanja s senzorji.

6. Patent EP3073246B1

6.1 Opis patenta in princip delovanja

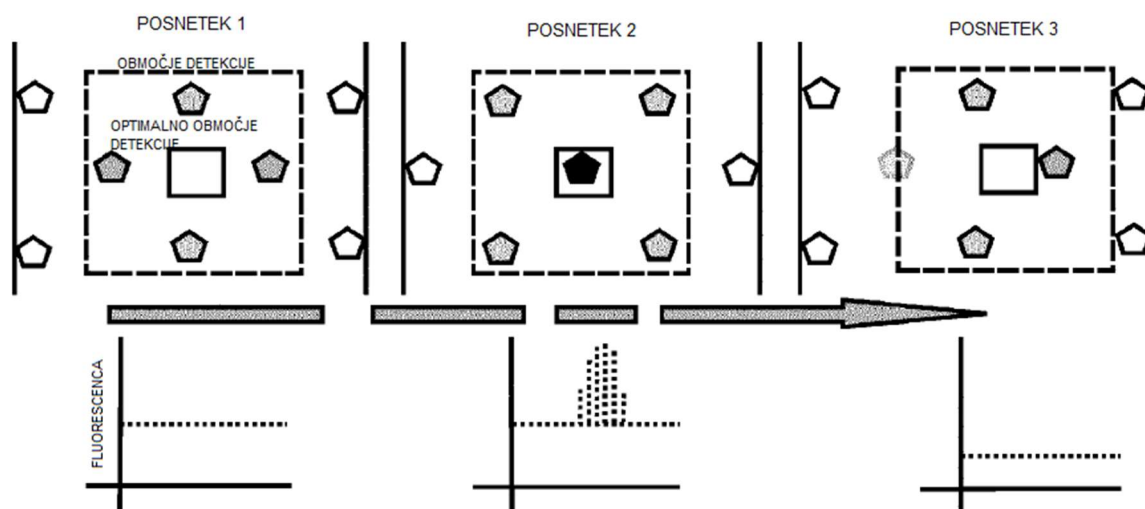
Ime patenta v angleškem jeziku je »Method and system for simultaneous detection of micro-particle concentration in suspension and their morphological and physiological traits«, prevedeno v slovenščino: »Metoda in sistem za sočasno zaznavanje koncentracij mikrodelcev v suspenziji in določanje njihovih morfoloških in fizioloških lastnosti« imetnik tega evropskega patenta je Sedmak s sod. (2015). Slika 5 prikazuje poenostavljeno skico delovanja sistema v obliki sheme.



Slika 5: Poenostavljena skica sistema, opisanega v patentu EP3073246B1 (Vir: patent EP3073246B1)

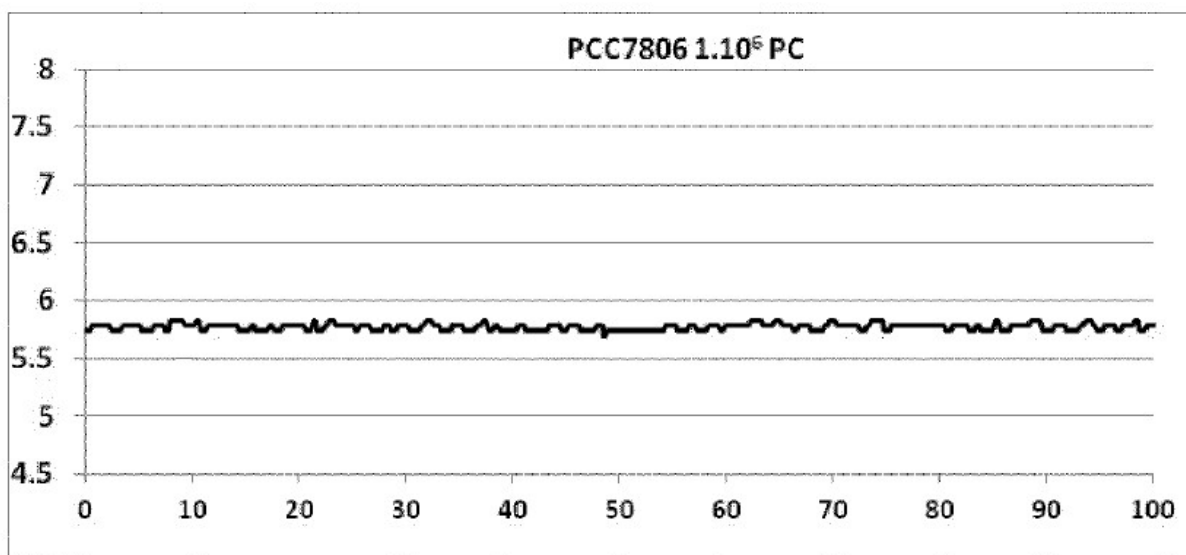
1 sta fluorescenčni senzorja sistema. Eden je senzor za fikocianin (PC), drugi je senzor za klorofil (CHL). Njuni nalogi sta zaznavanje prisotnosti fitoplanktona in sprejemanje informacij glede njihove velikosti in množičnosti. **2** je črpalka, ki skrbi, da voda iz vzorčenega vodnega telesa enakomerno prihaja v senzorsko komoro (**3**) skozi vhodni ventil (**5**). **4** je naprava za shranjevanje podatkov, ki je lahko brezžično povezana do sistema. **8** je kontrolna plošča, ki samodejno uravnava črpalko (**2**), vhodni (**5**) in izhodni (**6**) ventil ter mešalno napravo (**7**), ki nadzoruje umirjen enosmerni tok. Kontrolna plošča vse te naprave upravlja glede na podatke, ki jih prejme od senzorjev (**1**).

Slika 6 prikazuje tri hipotetične položaje v tridimenzionalnem območju zaznavanja senzorjev. Zaradi nehomogenosti območja osvetlitve (vzburljanja fluorescence) in tudi zaznavanja fluorescence ta metoda omogoča sočasno zaznavanje velikosti populacije s pomočjo povprečja signala in tudi specifične lastnosti posamičnih organizmov, kadar zaidejo v območje optimalne osvetlitve.



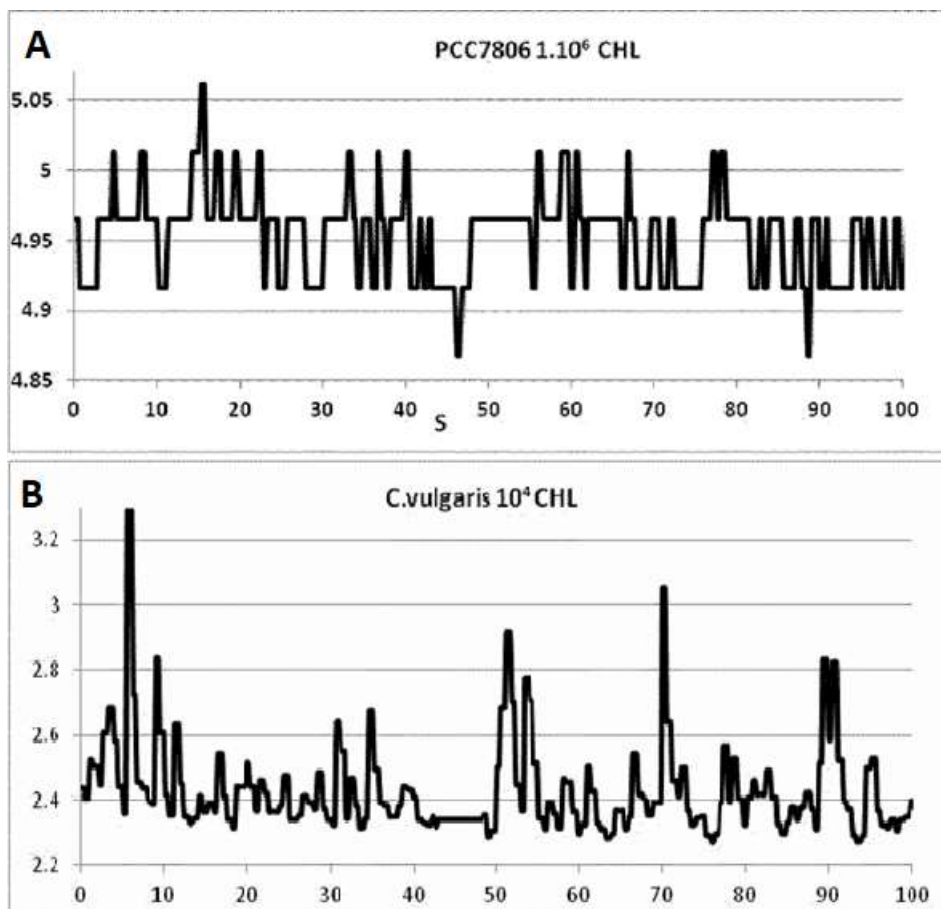
Slika 6: Princip odkrivanja senzorjev kot trdi patent (vir: patent EP3073246B1)

Patentirana metoda uporablja senzor Cyclops 7 (Turner design USA). To je fluorosenzor, ki zaznava valovne dolžine 680 nm (+/- 10 nm) in vzorec obseva s tremi različnimi valovnimi dolžinami; 430 nm +/- 30 nm, 540 nm +/- 15 nm in 625 nm +/- 20 nm. S poskusi so definirane modre in rdeče cianobakterije, ki se lahko razločijo z vrsto fluorometričnega odziva, ki je odvisna od pigmentov v fitoplanktonu. (Parésys et al., 2014).



Slika 7: Stabilnost fluorescence fikocianina (PC) monokulture cianobakterije rodu *Microcystis*, iz katerega lahko sklepamo velikost populacije v vzorcu. (vir: patent EP3073246B1)

Tako so razvidne razlike merjenja klorofila monokulture cianobakterij, katerih celice so uniformne velikosti (slika 8), z rezultati merjenja klorofila monokulture modro-zelene alge *Chlorella Vulgaris*.



Slika 8: Prve osnovne tipe signalov, ki jih dobimo pri analizi visoke frekvence zajemanja. A: Determinističen tip odgovora krogličaste cianobakterije *Microcystis* (sev PCC7806) in B: stohastičnega tip signala zelene alge *Chlorella*. Kultura cianobakterij ima konstanten premer celic, medtem ko je velikost alg v kulturi zelo različnih premerov. (vir: patent EP3073246B1)

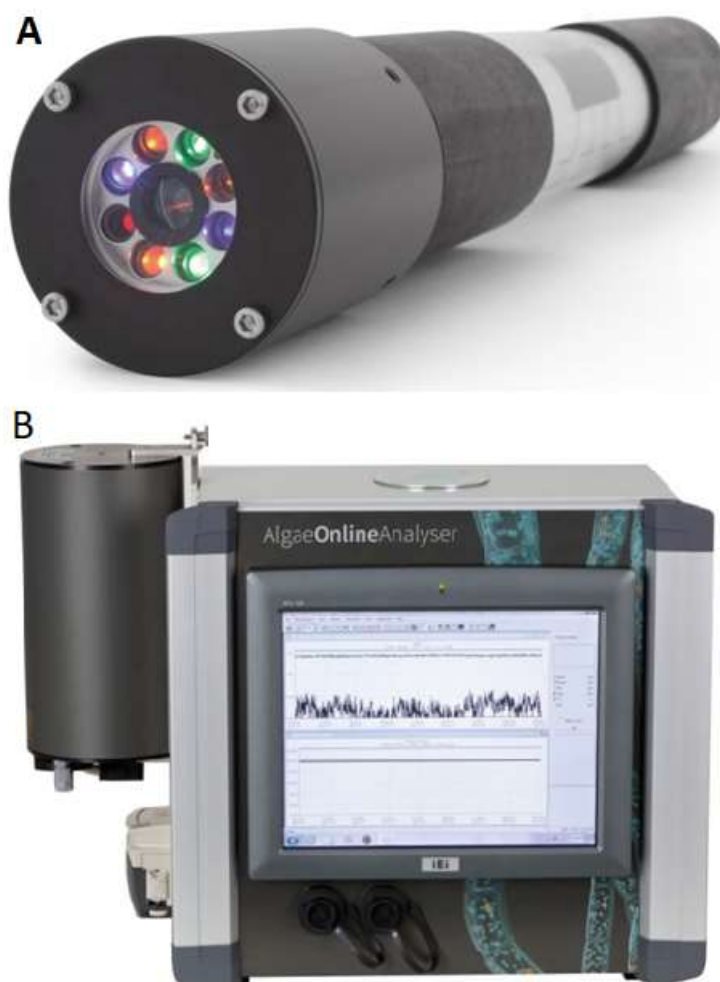
Tako so razvidne razlike merjenja klorofila monokulture cianobakterij, katerih celice so uniformne velikosti (slika 8), z rezultati merjenja klorofila monokulture modro-zelene alge *Chlorella Vulgaris*.

Velikost populacije je približno enaka, razlika signala izhaja iz velikosti posameznih celic. Medtem ko so cianobakterije po veliki večini identične velikosti z majhno variacijo, so modro-zelene alge zelo različne v velikosti. Večje alge imajo več klorofila, kar posledično pomeni večji fluorescentni signal, ki ga odda, ko pride alga v optimalno merilno območje.

7. Patent DE102009036562A1

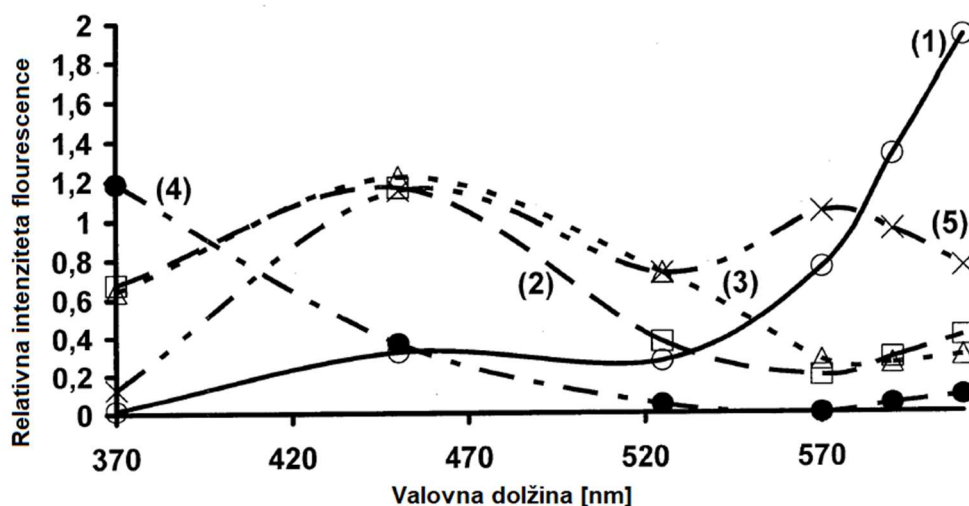
7.1 Opis patenta in princip delovanja

Nemški državni patent, registriran pod oznako *DE102009036562A1* v Nemčiji, poimenovan »Verfahren zur Bestimmung der Wasserqualität eines Gewässers«, preveden v slovenščino kot »postopek za ugotavljanje kakovosti vode vodnega telesa«, katerega imetnik je Moldaenke (2011), je sistem in postopek za odkrivanje in prepoznavanje fitoplanktona v vodnem vzorcu. Patentiran postopek uporablja senzor z naborem osmih hitro utripajočih LED diod in algoritmi, ki zaznava valovne dolžine vzburjenja vzorca in jih primerja z umeritveno krivuljo, ki je predčasno nastavljena (t. i. »Norm-Fluoreszenzspektrum«) in s pomočjo algoritma zazna tip fitoplanktona, ki je prisoten v vzorcu.



Slika 9: A: AlgaeTorch senzor proizvajalca Astronic, ki ga uporablja patentiran postopek. Na njem so vidne diode različnih valovnih dolžin (vir: <https://www.bbe-moldaenke.de>), B: Naprava AlgaeOnlineAnalyser, ki jo uporablja patentiran postopek (vir: <https://www.bbe-moldaenke.de>)

Po patentiranem postopku se vsak izmerjen vzorec računalniško primerja s spektrom konstant, ki z algoritmom določi, ali gre v izmerjenem vzorcu za zelene alge, diatomeje, fitoplankton, cianobakterije ali organska onesnažila in v kakšni meri so prisotni.



Slika 10: Graf "Norm-Fluoreszenzspektrum" oziroma spekter fluorescentnih konstant, kot po patentu DE102009036562A1

Slika 12: Prikazan je graf krivulj intenzivnosti fluorescentnega odziva (1) cianobakterij, (2) zelenih alg, (3) dinoflagelatov, (4) raztopljene barvne organske snovi in (5) kriptofitov pri različnih valovnih dolžinah. Krivulja, pridobljena iz končne analize podanega vzorca, se nato algoritmično primerja z vnaprej podanimi krivuljami, končni rezultat analize pa vsebuje točne informacije o sestavi fitoplanktona v vzorcu, ki se lahko uporabijo za kasnejše analize. Krivulja raztopljene organske snovi v napravi patentiranega postopka se uporablja, da se čim bolj zmanjša napaka, ki bi se pojavila zaradi prisotnosti raztopljenih organskih snovi, ki motijo senzorje in povzročajo nenatančne rezultate. Kalkulacija teh je upoštevana v algoritmu, kar izboljša točnost in natančnost rezultata.

Ena od naprav, ki uporablja patentiran postopek za ugotavljanje kakovosti vode vodnega telesa, je naprava *AlgaeOnlineAnalyser* (slika 13), ki jo je razvilo podjetje *BBE Moldaenke GmbH*. Po opisu proizvajalca je omenjen instrument namenjen za zaznavanje cvetenja fitoplanktona, spremembe v ekosistemu, za uporabo v limnoloških in oceanografskih raziskavah in tudi za iskanje ekološko relevantnih informacij na plovnih poteh ladij. Vročitelj patenta DE102009036562A1, Christian Moldaenke, je tudi generalni direktor podjetja *BBE Moldaenke*.

8. Klasične metode

8.1 Pogosto uporabljene klasične metode

Predstavljena metoda bosta primerjana na osnovi razpoložljivih informacij in tudi s klasičnimi metodami zaznavanja fitoplanktona, ki so v uporabi še danes, ter na osnovi tega, kako patentirana postopka vplivata na relevantnost klasičnih metod zaznavanja.

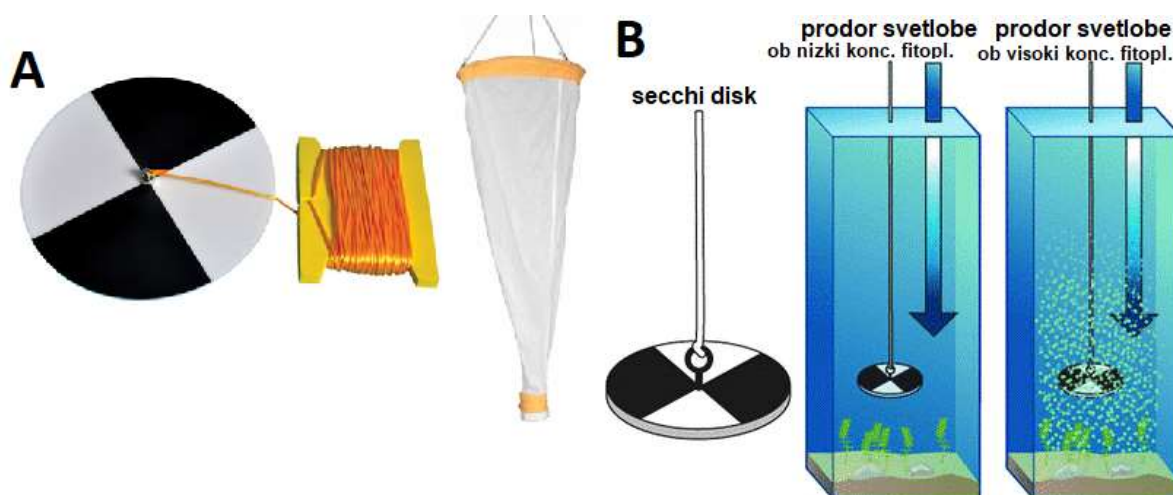
Klasične metode so tiste, ki obstajajo že vrsto desetletij in predstavljajo osnovo vodne mikrobiologije ter postavljajo osnovne parametre za izvajanje različnih analiz na tem področju. Klasične metode, ki se danes še pogosto uporabljajo, so:

- **Secchi disk,**
- **planktonska mrežica,**
- **mikroskopiranje.**

Kot je vidno na sliki 10 A, sta danes najbolj uporabljeni klasični metodi zelo preprosti napravi, ki se še vedno uporabljata zaradi informacij, ki jih pridobimo z izvajanjem teh dveh metod. Mikroskopiranje je temeljna metoda, ki je še danes ključnega pomena in brez katere bi lahko s sodobnimi avtomatiziranimi metodami le ugibali, za točno katere vrste fitoplanktona, oziroma v primeru cianobakterij, za katero nevarnost, gre in kako je treba ukrepati.

Secchi disk se uporablja za merjenje motnosti v vodnem telesu. Disk se potopi v vodo in se na po dolžini označeni vrvici spušča v vodo do globine, dokler disk ni več viden (slika 10 B). S tem se določata prisotnost in število fitoplanktona v vodi, ki zmanjšuje vidljivost in prodor svetlobe v globino. Zaradi uporabe v zgodovini se je ustvarila velika podatkovna baza globin Secchi diskov po celem svetu, ki jo je možno uporabljati za primerjave in raziskave (*Wernand, 2010*).

Planktonska mrežica, vidna na sliki 10 A, je stožčasta mreža z utežjo na dnu. Potopi se v vodno telo in se vleče v vodi naokrog, da se v fino mrežo ujame plankton, ki se lahko kasneje uporablja za nadaljnje raziskave. Velja za eno od najstarejših, najpreprostejših in najcenejših vrst vzorčenja fitoplanktona. Problem pri planktonski mrežici je, da mrežica na koncu, ko jo izvlečemo, vsebuje reprezentativen vzorec celotnega vodnega telesa, kar je v večini dobro, a za namene odkrivanja problematičnih predelov vodnega telesa slabše.



Slika 11: A: Secchi disk (levo) in planktonska mrežica (desno), B: Poenostavljen prikaz principa uporabe in delovanja Secchi diska (vir: <https://link.springer.com/>)

Reprezentativnost vzorca je slabost, saj se lahko cvetenje fitoplanktona pojavi le na nekaterih točkah in ne po celotnem vodnem telesu. To povzroča probleme pri določanju območja cvetenja fitoplanktona in upočasnjuje delo. Primer neenakomernega cvetenja fitoplanktona je razviden na sliki 2.

Mikroskopiranje je najbolj zanesljiva vrsta med klasičnimi metodami zaznavanja fitoplanktona, a tudi ena najbolj dolgotrajnih in težavnih, saj zahteva natančnost in hitrost. Pri mikroskopiranju se fitoplankton iz vzorcev po taksonomskih ključih prepozna in se s tem pride do najbolj konkretnega odgovora na vprašanje, kaj je v vodi in ali je slabo za ekološko in biološko stanje vode.

8.2 Primerjava s sodobnimi metodami

Klasične metode so preverjene in zanesljive. Nekatere se uporabljajo že več kot sto let, kar pomeni, da je baza dostopnih podatkov in raziskav z njimi ogromna in lahko nove podatke primerjamo s starejšimi ter ugotovimo razlike. So zelo natančne in napaka pri teh meritvah je v večini človeška, kar pomeni, da poznavanje analize, postopka in teorije ter pravilno izvajanje analize zmanjšajo napako na minimalne vrednosti in dodatno podkrepijo obstoj klasičnih metod.

Klasične metode so dolgoročne in vse zahtevajo podučeno osebo, ki analizo izvaja vsakič, ko je potrebna. V primerjavi s sodobnimi metodami zaznavanja so počasnejše, vendar po kakovosti rezultatov konkretnije. Patentirana metoda EP3073246B1 se lahko popolno avtomatizira in opravlja računalniško preko GPS signala, kar je bilo že uspešno izvedeno v projektu *LIFE Stop CyanoBloom*. Patentirana metoda DE102009036562A1 pa je polavtomatska, saj zahteva vnos vzorca, preostanek analize pa se opravi sam s pomočjo algoritmov in računalnika. Obe metodi imata prednosti pred klasičnimi metodami v smislu hitrosti analize in obveščanja širše javnosti o kakovosti vode, manjka pa identifikacija zaznanega fitoplanktona in kategorizacija, ali je fitoplanktonski cvet nevaren za ekosistem in zdravje ljudi ali ne. Zato je potrebna sočasna uporaba klasičnih in sodobnih metod zaznavanja za hitrejšo in kakovostnejšo analizo celotnega vodnega telesa.

9. Primerjava patentov

9.1 Kompleksnost

Kompleksnost patenta pomeni zahtevnost uporabe, število komponent ter korakov, ki so vpleteni v postopku. Daljši kot je postopek in več komponent, kot vsebuje postopek, kompleksnejši je postopek. Kompleksnost postopka je pomembna primerjava, saj je od nje odvisno, kako izobražen in vešč mora biti izvajalec postopka, kje se lahko pojavijo težave ter kako dolgo traja, da se analiza opravi.

Patent EP3073246B1 je po opisu preprostejši od obeh obravnavanih patentov. Zaradi uporabe le dveh senzorjev in nezahtevnega vezja ter brez uporabe naprednih algoritmov vsebuje veliko manj točk, na katerih gre lahko kaj narobe. Rezultati, pridobljeni s tem postopkom, se lahko zaradi manjšega števila informacij hitreje pošiljajo na oddaljen strežnik.

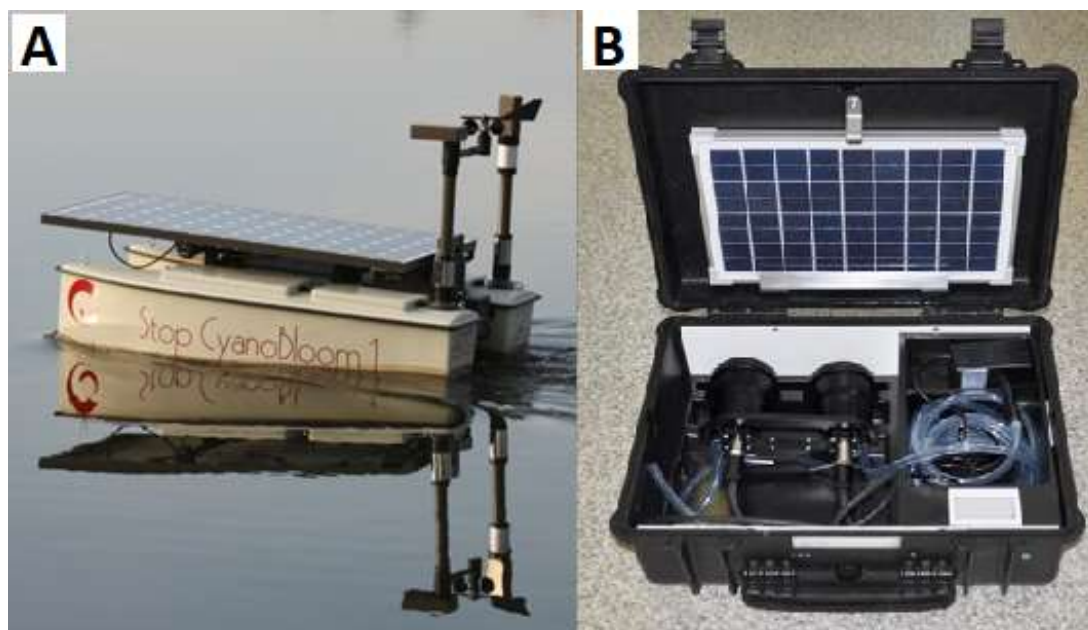
Patent DE102009036562A1 je od obeh opisanih patentov kompleksnejši in tehnično zahteven, saj ima namesto dveh šest senzorjev, ki uporabljajo algoritme za izračune končnih rezultatov, in opravlja večje število meritev.

Primerjava zahtevnosti uporabe je relativna glede na izkušnost izvajalca metode in odvisna od podanih okoliščin. Pomembna je tudi oblika, v kateri je patentirana metoda uporabljena ter kako fleksibilna je na spremembe. DE102009036562A1 pokriva kar velik spekter različnih vrst fitoplanktona, medtem ko je EP3073246B1 namenjen le zaznavi fikocianina in klorofila, a ima edinstveno značilnost, saj z analizo signalov dobimo tudi informacije o značilnih oblikah, velikostih in morfologiji (habitus) fitoplanktona. To je bilo do zdaj možno samo z mikroskopijo. Algoritem za samodejno prepoznavanje žal še ni izdelan. Končni podatki so za to pri metodi dr. Sedmaka in sodelavcev manj kompleksni po naravi, medtem ko so rezultati metode dr. Moldaenke in sodelavcev raznoliki in poglobljeni, kar omogoča več možnosti primerjave, nadaljnjih analiz in dobre osnove za določanje biološkega stanja vodnega telesa.

9.2 Uporabnost

Uporabnost patenta se nanaša na obliko, v kateri se patentirana metoda izvaja, in zmožnost prestavljanja in ponovnega vzpostavljanja v uporabno stanje te. Mobilnost igra veliko vlogo pri terenskem delu, saj omogoča hitro odzivnost in pospeši reakcijski čas v primeru, da je to potrebno.

Patentirana metoda EP3073246B1 ima zaradi majhnega števila komponent in preprostosti prednost v mobilnosti. Uspeh je doživela, kot je bilo prej opisano, z daljinskim opravljanjem v projektu *LIFE CyanoBloom*, kjer je bilo izdelano plovilo, ki je avtomatsko vzorčilo vodo med premikanjem po vodnem telesu (slika 12).



Slika 13: A: Avtomatsko vodeno plovilo Stop CyanoBloom v okviru projekta LIFE Stop CyanoBloom (vir: lifestopcyanobloom.arhel.si). B: Mobilna naprava za odkrivanje fitoplanktona (Vir: www.nib.si)

Poleg avtomatizacije celotnega postopka še vedno obstaja tudi klasična laboratorijska oziroma terenska oblika izvajanja analiz, za katero obstaja mobilna oblika naprave, ki je po principu delovanja podobna brezpilotni obliki in se lahko prenaša in shranjuje v kovčku (slika 18).

V primerjavi s tem patentom, ki je že uspešno uveden v mobilne oblike, ki so doživele uspeh na terenu, je patent DE102009036562A1, ki je tehnično zahtevnejši, manj mobilnen.

9.3 Cena

Cena pravice uporabe patenta je odvisna od ponudbe in povpraševanja, učinkovitosti metode, območju uporabe in oblike, v kateri je naprava uporabljena. Pomembna je tudi cena obratovanja in vzdrževanja, ki je načeloma odvisna od kompleksnosti in zahtevnosti uporabe. Naprave, ki imajo širok spekter uporabe, so zaželeno zaradi zmožnosti zmanjšanja stroškov z opravljanjem več analiz na eni napravi, kar pomeni, da je njihova cena temu primerno višja. Bolj specializirane metode in analize pa potrebujejo za to namenjene naprave z zelo ozkim spektrom uporabe. Te niše se pokrivajo z napravami, ki imajo visoke cene pogosto zaradi patentiranja sistemov in metod, ki eni osebi oziroma podjetju legalno dovoljuje nadziranje konkurence s pridobljenim patentom, ki pokriva nišo.

Patent EP3073246B1 ima prednost v inkorporaciji manjšega števila komponent in kompaktne oblike. Možnost izbire med avtonomno in terensko obliko daje fleksibilnost in s tem pokriva večje območje. Podatki, pridobljeni z uporabo te patentirane metode, so omejeni zaradi pomankanja več senzorjev v primerjavi s patentom g. Moldaenke, kar omeji uporabo patentirane metode na odkrivanje in zgodnje analize.

Patent DE102009036562A1 – v napravi AlgaeOnlineAnalyser, kot je razvidno s slike 12, je uporabljenih več materialov, uporablja se tudi večje število komponent in osemkrat več senzorjev, kar ceno postavi bistveno višje. Naprava je zasnovana za pokrivanje širokega spektra odkrivanja in lahko natančneje določi vrste snovi in organizmov v vzorcu, kar pomeni, da se lahko pridobi več podatkov v krajšem času.

Operativni stroški metode so odvisni od oblike, v kateri je metoda uporabljena. Ker gre za senzorje, je vzdrževanje obeh patentiranih metod približno enako, vendar je pri patentu dr. Moldaenke zaradi večjega števila teh tolikokrat dražje. Avtonomna oblika ima še dodatno vzdrževanje plovila in povezavo z obveščevalnim sistemom oziroma laboratorijem, ki izvaja monitoring v realnem času.

Ob pregledu teh ključnih dejavnikov, ki vplivajo na ceno, je tako za izdelavo kot za vzdrževanje cenejši patent EP3073246B1.

9.4 Namen uporabe

Namen obeh patentov je jasno naveden v naslovu patentov samih, a aplikacije so lahko širše, kar je tudi namen patenta dr. Sedmaka in sodelavcev. Patent EP3073246B1 ima že obstoječe različne različice. Obstajata prenosna terenska različica (slika 13 B) in različica na robotiziranem plovilu (slika 13 A). Princip delovanja je pri obeh implikacijah enak, vendar se rezultati analiz razlikujejo v količini in kakovosti. Vzorci iz brezpilotnega plovila se v testno komoro dovajajo sproti iz vodnega telesa, kadar naprava obratuje in te podatke neposredno pošilja v laboratorij oziroma k pristojni službi. Terenska oblika v kovčku je namenjena analizam na terenu in tudi delu v laboratoriju, kot je vidno na sliki 14.



Slika 14: Potek analize vzorca z napravo po patentirani metodi EP3073246B1

Ker je ta patentirana metoda opremljena le s fluorometrom za klorofil in fikocianin, je prvotni namen t. i. »*Early warning system*« oziroma obveščevalni sistem, ki bi se vzpostavil na vodnih telesih in bi s tem prvim odzivnikom predčasno obvestil o možnosti nevarnega cvetenja fitoplanktona kjer koli na vodnem telesu, da se lahko pravilno in pravočasno vzpostavijo varnostni ukrepi in da se čim prej identificira nevarnost.

V ta namen ima robotizirano plovilo, ko je aktivno, dva načina, ki se menjata v skladu z rezultati sprotne analize. Plovilo je v detekcijskem načinu in konstantno meri fluorometrični odziv in spremlja stanje fikocianina v razmerju s klorofilom. Ko se zazna povišanje fikocianina, se

plovilo samodejno prestavi v analizni način, vtočni in iztočni ventil se zapreta, plovilo pošlje povratne informacije k prejemniku ter sproti spremlja in sporoča stanje v komori.

Tako je vzpostavljen obveščevalni sistem, ki v realnem času posreduje vse potrebne informacije pri relativno nizkih stroških v primerjavi z rednim izvajanjem klasičnih analiz, ki terjajo veliko časa in ročnega ter laboratorijskega dela. Namen uporabe patenta DE102009036562A1 je usmerjen v raziskovalno smer, ki je omogočena zaradi narave metode, s katero je možno pridobiti osemkrat več informacij, ki jih je mogoče interpretirati in kombinirati na različne načine. Patentirana metoda je primerna za raziskovalne in analitske laboratorije večjega obsega. Menimo, da bi se lahko potencialno uporabljala kot mobilni laboratorij na plovilih, kar bi razširilo možnost uporabe.

V nasprotju s patentom dr. Sedmaka s sodelavci je patent dr. Moldaenke neprimeren za obveščevalni sistem, saj bi bila cena za eno merilno postajo ali brezpilotno plovilo previsoka, število informacij, ki so relevantne za opozorilo (prisotnost potencialno nevarnih cianobakterij), pa bi bilo enako, z edino razliko, da bi ti rezultati lahko natančneje določili vrsto prisotnih cianobakterij.

Menimo, da bi se lahko vzpostavil sistem z uporabo obeh patentiranih metod hkrati na vodnem telesu v kombinaciji s klasičnimi metodami odkrivanja za konstanten nadzor vodnih teles.

10. Sklepi

Glede na smer razvijanja tehnologije in željo po čim večji avtomatizaciji vseh ljudem monotoni in dolgo trajajočih del smo prepričani, da bodo sodobne metode zaznavanja fitoplanktona, kot sta metodi, predstavljeni v tem diplomskem delu, našle svoje mesto tako v komercialne kot raziskovalne namene. Obstaja potreba po sistemih zgodnjega zaznavanja cvetenja škodljivega fitoplanktona, saj so fitoplanktonska cvetenja še vedno eden večjih problemov vodnih teles in ljudi, ki so vezani nanje.

Zaradi omejitev sodobnih metod v zvezi s točno identifikacijo vrste prisotnih cianobakterij lahko potrdimo hipotezo, da se morajo klasične metode uporabljati hkrati s sodobnimi metodami zaznavanja, vendar je to potrebno le, kadar gre za identifikacijo prisotnih škodljivih rodov in vrst fitoplanktona. Menimo tudi, da se bodo v prihodnje razvile še bolj sofisticirane sodobne metode, ki bodo morda za vselej izpodrinile dolgotrajne klasične metode zaznavanja fitoplanktona, kar pomeni, da ovržemo drugo hipotezo, ki klasične metode oznani kot nenadomestljive. Ta argument podkrepi predstavljena patentirana metoda, ki lahko z matematičnimi algoritmi in večjim številom senzorjev že zdaj določi, ali gre v vzorcu za alge, cianobakterije, diatomeje, dinoflagelate ali barvna organska onesnažila ter v kakšnem razmerju so.

Zaradi možnosti spremljanja stanja fitoplanktona v realnem času in ogromne količine pridobljenih podatkov lahko potrdimo hipotezo, da sodobne metode zaznavanja poglobijo naše znanje in razumevanje fiziologije fitoplanktona.

Monitoring fitoplanktona v realnem času je bil že dokazan z brezpilotnim plovilom in menimo, da se bo brezpilotna tehnologija lahko v prihodnosti povezala s sateliti, ki bodo sodelovali in natančneje identificirali cvetenje fitoplanktona tudi na večjih vodnih telesih. S tem lahko tudi potrdimo hipotezo, da je merjenje fitoplanktona v realnem času mogoče.

Sklepamo tudi, da je potencial v uporabi brezpilotnih plovil in dronov, ki bi uporabljali umetno inteligenco za prepoznavanje fitoplanktonskih cvetov iz slik in primerjave barve vodnega telesa na sliki. Ta bi posredovala lokacijo zaznanega fitoplanktonskega cveta plovilu, ki bi odvzelo vzorec na lokaciji in poslalo pridobljene podatke v analizo. Zaradi velikih napredkov na področju učenja umetne inteligence mislimo, da bi bilo to izvedljivo in bi takšni sistemi potencialno zanimali raziskovalce na področju limnologije in raziskovanja fitoplanktona.

11. Povzetek

V uvodnem delu smo govorili o problematiki škodljivega cvetenja fitoplanktona in o posledicah, ki jih prinaša. Ugotovili smo nevarnost cianobakterij, ki proizvajajo toksične metabolične snovi, s katerimi v zgodovini, še posebej pa v sedanosti, s pomočjo sodobnega načina življenja ljudi, povzročajo veliko škode za vse ekosisteme v vodnih telesih in okoli njih ter povzročajo ekonomske in zdravstvene posledice, ki jih nosijo okoliški prebivalci. Predstavili smo večje skupine cianotoksinov in njihove ciljne organe ter cianobakterije, ki jih proizvajajo. Te cianobakterije so prisotne v večini fitoplanktonskih cvetenjih, tudi v Sloveniji, kar pomeni, da se v naši državi pojavljajo vprašanja glede varnosti prizadetih vodnih teles.

Predstavili smo klasične metode zaznavanja fitoplanktona v vodi, ki se uporabljajo že več sto let in so za zdaj standardi za določanje vzroka in posledice škodljivega cvetenja fitoplanktona. Največja problem klasičnih metod sta zamudno delo in nezmožnost stalnega nadziranja vseh vodnih teles. Ta dva problema predstavljata zdaj še nepopolno nišo za sistem, ki neprestano in v realnem času nadzira stanje vodnih teles in pravočasno ter natančno zazna cvetenje fitoplanktona.

Ravno v ta namen se razvijajo nove, t. i. sodobne metode zaznavanja fitoplanktona, ki s pomočjo relativno nove metode zaznavanja fluorescenc fotopigmentov lahko določijo prisotnost fitoplanktona in razločijo med neškodljivimi zelenimi algami ter škodljivimi cianobakterijami. V diplomskem delu smo zato predstavili dve patentirani metodi, ki uporabljata fluorosenzorje. Senzorji na osnovi oddane fluorescenc na določeni valovni dolžini lahko razlikujejo med škodljivim in neškodljivim fitoplanktonom glede na razmerje med klorofilom in fikocianinom, zaznanim v vzorcu. Kompleksnejša od obeh metod lahko z osmimi senzorji v vzorcu razlikuje celo med zelenimi algami, dinoflagelati, cianobakterijami in diatomejami ter izključi interferenco barvnih organskih onesnažil.

V primerjavi s klasičnimi metodami sta predstavljeni metodi veliko hitrejši pri pridobivanju informacij, a zaradi nezmožnosti točnega določanja vrste cianobakterij za zdaj še nista zmožni samostojno raziskovati fitoplanktonskih cvetov. Ne glede na to imata velik potencial na področju avtomatizacije nadzora fitoplanktona v vodnih telesih, kar bi lahko v prihodnje potencialno povezala umetna inteligenca in v večini avtomatizirala zaščito ljudi in ekosistemov pred zaenkrat težko obvladljivo težavo.

12. Summary

In the introduction we talked about the problematic of harmful algal blooms and the consequences they bring. We learned about the dangers of cyanobacteria that produce toxic metabolites, which through history and today with the help of humanities modern way of living, cause great damage for all water-based ecosystems and harm the economy and affect public health. We presented the major groups of cyanotoxins, their target organs, and the cyanobacteria that produce them. These cyanobacteria are present in most HAB-s, even in Slovenia, which means, that there is a question of safety for the affected Slovene bodies of water.

We discussed classic methods of phytoplankton detection in water, that are in use for hundreds of years and are until today the standard for the classification of the cause and the consequences of HAB-s. The biggest downsides of classical methods of detection are the lengthy and tedious analysis process and the inability to constantly monitor all water bodies. These two problems present a yet unfulfilled need for a system, that is capable of around the clock real-time monitoring of the status of water bodies that is able to detect HAB-s before they become a problem.

Therefore new, so called “modern detection methods”, are being developed, which use the relatively new method for the detection of fluorescence emitted by photopigments for the quantification of present phytoplankton and can differentiate between toxic cyanobacteria and harmless green algae. Thus, in the thesis we have divulged two patented methods, that use fluorosensors. The sensors measure the response signal of the sample that was rapidly illuminated with light of a specific wavelength to determine the size and quantity of any present phytoplankton. By using a chlorophyll and a phycocyanin sensor it can differentiate the between harmless algae and harmful cyanobacteria. The more complex of the two methods, with its eight sensors can even differentiate between dinoflagellate, cyanobacteria, diatoms and can rule out error due to colored organic pollutants.

In comparison to classical methods, the presented modern methods are much faster at obtaining relevant information, but due to the inability to taxonomies the family of the detected cyanobacteria, they are yet incapable of independent research of HAB-s and still rely on microscopy. Regardless the presented methods have big potential in the field of automatization of water body control, which in the future, artificial intelligence could connect and fully automate the protection of ecosystems from the now hard to control problem that is Harmful algal blooms.

VIRI IN LITERATURA

Azevedo S.M.F.O., Carmichael W.W., Jochimsen E.M., Rinehart K.L., Lau S., Shaw G.R., Egelsham G.K. (2002): **Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil**, *Toxicology*, 181–182, 441–446. doi: 10.1016/S0300-483X(02)00491-2

Backer LC., Manassaram-Baptiste D., LePrell R. and Bolton B. (2015): **Cyanobacteria and algae blooms: Review of health and environmental data from the harmful algal bloom-related illness surveillance system (HABISS) 2007–2011**. *Toxins*, 7, 1048–1064. doi: 10.3390/toxins7041048

De Boer E.J., Vélez M.I., Rijdsdijk K.F., de Louw P.G.B., Vernimmen T.J.J., Visser P.M., Tjallingii R., Hooghiemstra H. (2015): **A deadly cocktail: How a drought around 4200 cal. yr BP caused mass mortality events at the infamous ‘dodo swamp’ in Mauritius**, *Sage journals*, 25, 758–771. doi: 10.1177/0959683614567886

Drovc T. (2018): **Nadzor in analiza površinskega cvetenja fitoplanktona s poudarkom na cianobakterijah**, Magistersko delo, FVO

European Patent Office (EPO): <https://www.epo.org/>

Francis G., Adelaide S. (1878): **Poisonous Australian Lake**, *Nature publishing group*, 18, 11–12. doi: 10.1038/018011d0

Frangež R., Kosec M., Sedmak B., Beravs K., Demsar F., Juntos P., Pogačnik M., Šuput D. (2000): **Subchronic liver injuries caused by microcystins**, *Pflügers Archiv* 440, 103–104. doi: 10.1007/s004240000023

Funari E., Testai E. (2008): **Human health Risk Assessment Related to Cyanotoxins Exposure**, *Critical Reviews in Toxicology, Informa Healthcare USA*, 97–125. doi: 10.1080/10408440701749454

Gregor J., Maršálek B., Šípková H. (2007): **Detection and estimation of potentially toxic cyanobacteria in raw water at the drinking water treatment plant by in vivo fluorescence method**, *Water research*, 41, 228–234 doi: 10.1016/j.watres.2006.08.011

Huisman J., Codd G.A., Paerl H.W., Ibelings B.W., Verspagen J.M.H., Visser P.M. (2018): **Cyanobacterial blooms**, *Nature Reviews Microbiology*, 16, 471–483. doi: 10.1038/s41579-018-0040-1

Kautsky H., Hirsch A. (1931): **Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation**, *Naturwissenschaften*, 19, 964–964.

Kirkby C. (1672): **A relation of an Inland-sea, near Danzick, yeilding at a certain season of the year a green substance, which causeth certain death; together with an observation about white amber**, *The Royal Society, Philosophical Transactions*. doi: 10.1098/rstl.1672.0025

Rozina T., Eleršek T., Zušančič Justin M., Meglič A.: **Kombinirana uporaba klorofilnega in fikocianinskega senzorja fluorescence za kvantifikacijo in kvalifikacijo fitoplanktona: uporaba v majhnih vodnih telesih**, *Acta Biologica Slovenica*, 61, 2, 29–37

Van Kooten O., Snel J.F.H. (1990): **The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology**, *Photosynthesis research*, 25, 147–150.

Milutinović M., Sedmak B., Horvat-Žnidaršič I. Šuput D. (2002): **Renal Injuries induced by chronic intoxication with microcystins**, *Cellular & molecular biology letters*, 7, 139–141.

Moldaenke C. (2011): **Verfahren zur Bestimmung der wasserqualität eines Gewässer (DE102009036562A1)**, *Deutsches Patent- und Markenamt*

National ocean service U.S. department of commerce: **How much oxygen comes from the ocean?** <https://oceanservice.noaa.gov/facts/ocean-oxygen.html> (dostopno 27. 3. 2022).

Parésys G., Rigart C., Rousseau B., Wong A.W.M., Fan F., Barbier J-P., Lavaud J. (2005): **Quantitative and qualitative evaluation of phytoplankton communities by trichromatic chlorophyll fluorescence excitation with special focus on cyanobacteria**, *Water research*, 39, 911–921 doi: 10.1016/j.watres.2004.12.005

Sedmak B., Lakovič G., Lestan D., Meglič A. (2015): **Method and system for simultaneous detection of micro-particle concentration in suspension and their morphological and physiological traits (EP3073246B1)**, *European Patent office*.

Sedmak B., Kosi G. (1997): **Microcystins in Slovene Freshwaters (Central Europe)-First Report**, *Natural Toxins*, 5, 64–73. doi: 10.1002/(SICI)(1997)5:2<64::AID-NT3>3.0.CO;2-O

Smith J.L., Boyer GL., Zimba P.V. (2008): **A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture**, Aquaculture, 280, 5–20. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.05.007

Sode K., Horikoshi K., Takeyama H., Nakamura N., Matsunaga T. (1991): **On-line monitoring of marine cyanobacterial cultivation based on phycocyanin fluorescence**, Journal of biotechnology, 21, 209–218. doi: 10.1016/0168-1656(91)90042-T

Šuput D. (2011): **Effects of microcystins, Cyanobacterial Toxins on mammalian Cells and Organs**, Acta Chimica Slov., 58, 708–716.

Urad RS za intelektualno lastnino: **Patenti**, <https://www.gov.si/teme/patenti/> (dostopno 27. 3. 2022).

Wernand MR (2010): **On the history of the Secchi disc**, Journal of the European Optical Society. doi: 10.2971/jeos.2010.10013s

Žegura B., Sedmak B., Filipič M. (2003): **Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2**, Toxicon, 41, 41–48. doi: 10.1016/S0041-0101(02)00207-6