



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 74819

(13) C2

(51) МПК (2006)

C02F 1/50

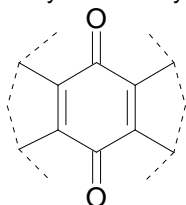
A01N 35/00

A01N 43/90

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) СПОСОБИ БОРОТЬБИ ТА ЗНИЩЕННЯ ПОПУЛЯЦІЇ ПЕВНИХ ВОДНИХ ШКІДЛИВИХ ОРГАНІЗМІВ У  
ВОДНОМУ СЕРЕДОВИЩІ

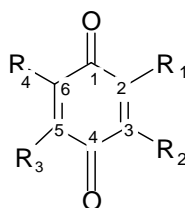
1

(21) 2002097478  
(22) 16.02.2001  
(24) 15.02.2006  
(86) PCT/US01/05117, 16.02.2001  
(31) 09/506,017  
(32) 17.02.2000  
(33) US  
(31) 60/237,401  
(32) 04.10.2000  
(33) US  
(46) 15.02.2006, Бюл. № 2, 2006 р.  
(72) Катлер Горас, US, Катлер Стівен, US, Райт Дейвід, GB, Досон Роджер, GB  
(73) ГАРНЕТТ, ІНК., US  
(56) UA 28201, C2, 16.10.2000  
US 3 947 594, A, 30.03.1975  
WO 9402125, A1, 03.02.1994  
Ann. Pharm. Fr. 1982, Vol. 40, No. 4, pp. 357-363  
ACS Symposium Series 1995  
Chemical & Pharmaceutical Bulletin 1991, Vol. 39, No. 4, pp. 994-998  
(57) 1. Спосіб боротьби з популяцією певних водних шкідливих організмів у водному середовищі, за яким додають у воду заражену певними водними шкідливими організмами ефективну кількість щонайменше однієї аквацидної сполуки, яку вибирають з групи, що складається з: (а) хінонів, (о) нафталіндіонів і (с) антрахінонів, де аквацидна сполука має таку хімічну структуру:



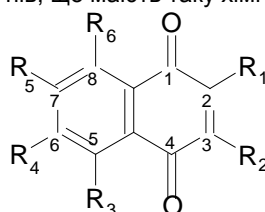
2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що аквацидну сполуку вибирають з групи хінонів, що мають таку хімічну структуру

2



де

R<sub>1</sub> - гідроген, метил, гідроксил, метокси, ізопропіл або (CH<sub>2</sub>CHC(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>H,  
R<sub>2</sub> - гідроген, гідрокси, метил, метокси або -NO<sub>2</sub>,  
R<sub>3</sub> - гідроген, гідрокси, метил або метокси і  
R<sub>4</sub> - гідроген, метил, метокси, гідрокси або -NO<sub>2</sub>.  
3. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що аквацидну сполуку вибирають з групи нафталіндіонів, що мають таку хімічну структуру:



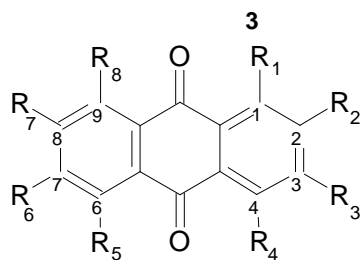
де

R<sub>1</sub> - гідроген або метил,  
R<sub>2</sub> - гідроген, метил, хлор, ацетоніл, 3-метил-2-бутеніл або 2-оксипропіл,  
R<sub>3</sub> - гідроген, метил, хлор, метокси або 3-метил-2-бутеніл,  
R<sub>4</sub> - гідроген або метокси,  
R<sub>5</sub> - гідроген або метил,  
R<sub>6</sub> - гідроген гідрокси і похідних натрію бісульфату.  
4. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що аквацидну сполуку вибирають з групи антрахінонів, що мають таку хімічну структуру:

(13) C2

(11) 74819

(19) UA



де

R<sub>1</sub> - гідроген, гідрокси, хлор,  
R<sub>2</sub> - гідроген, метил, хлор, гідрокси, карбоніл або карбоксил,

R<sub>3</sub> - гідроген або метил,

R<sub>4</sub> - гідроген,

R<sub>5</sub> - гідроген або гідроксил,

R<sub>6</sub> і R<sub>7</sub> - гідроген і

R<sub>8</sub> - гідроген або гідроксил.

5. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що сполуку вибирають з групи хінонів, що містить: 1,4-бензохінон; метил-1,4-бензохінон (толухінон); 2,3-метокси-5-метил-1,4-бензохінон; 2,5-дигідрокси-3,6-динітро-пара-бензохінон; 2,6-диметоксибензохінон; 3-гідрокси-2-метокси-5-метил-пара-бензохінон; 2-метилбензохінон; тетрагідрокси-пара-бензохінон; 2-ізопропіл-5-метил-1,4-бензохінон (тимохінон); убіхінон.

6. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що сполуку вибирають з групи нафталіндіонів, що містить: 1,4-нафталіндіон; 2-метил-5-гідрокси-1,4-нафталіндіон; 2-метил-1,4-нафталіндіон; 2-метил-2-метабісульфіт натрію-1,4-нафталіндіон; 6,8-дигідрокси-бензохінон; 2,7-диметил-1,4-нафталіндіон; 2,3-дихлор-1,4-нафталіндіон; 3-ацетоніл-5,8-дигідрокси-6-метокси-1,4-нафталіндіон; 2-гідрокси-3-(3-метил-2-бутеніл)-1,4-нафталіндіон; 2-гідрокси-3-метил-1,4-нафталіндіон.

7. Спосіб за п. 6, який **відрізняється** тим, що сполукою є 2-метил-1,4-нафталіндіон.

8. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що сполуку вибирають з групи антрахінонів, що містить: 9,10-антрахінон; 1,2-дигідроксіантрахінон; 3-метил-1,8-дигідроантрахінон; 1-хлорантрахінон; 2-метилантрахінон; антрахінон-2-карбонову кислоту; 1,5-дигідроксіантрахінон; 2-хлорантрахінон.

9. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що сполуку вибирають з групи що містить: 1,4-бензохінон; метил-1,4-бензохінон (толухінон); 2,3-метокси-5-метил-1,4-бензохінон; 1,4-нафталіндіон, 2-метил-5-гідрокси-1,4-нафталіндіон, 2-метил-1,4-нафталіндіон, 2-метил-2-метабісульфіт натрію-1,4-нафталіндіон; 9,10-антрахінон; 1,2-дигідроксіантрахінон; 3-метил-1,8-дигідроксіантрахінон; 1-хлорантрахінон; 2-метилантрахінон; антрахінон-2-карбонову кислоту.

10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що масова частка аквацидної сполуки у воді складає менше ніж 1 %.

11. Спосіб за п. 10, який **відрізняється** тим, що аквацидна сполука присутня у воді в кількості від 100 млрд<sup>-1</sup> до 500 млн<sup>-1</sup>.

12. Спосіб за п. 11, який **відрізняється** тим, що аквацидна сполука присутня у воді в кількості від 500 млрд<sup>-1</sup> до 300 млн<sup>-1</sup>.

74819

4

13. Спосіб за п. 12, який **відрізняється** тим, що аквацидна сполука присутня у воді в кількості від 1 млн<sup>-1</sup> до 200 млн<sup>-1</sup>.

14. Спосіб за будь-яким з пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що популяцію певних водних шкідливих організмів обробляють аквацидною сполукою протягом щонайменше однієї години.

15. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що популяцію певних водних шкідливих організмів обробляють аквацидною сполукою протягом 1-96 годин.

16. Спосіб за п. 15, який **відрізняється** тим, що популяцію певних водних шкідливих організмів обробляють аквацидною сполукою протягом 2-48 годин.

17. Спосіб за будь-яким з пп. 1-16, який **відрізняється** тим, що популяцію певних водних шкідливих організмів вибрано з групи, що містить віруси, протисти, грибки, голопланктонні організми, меропланктонні організми, плісняві грибки, рослини, донні організми, придонні організми, відшаровану або плаваючу біоту, бактерії, бактерії, що оточені оболонкою, найпростіші тварини, водорості, пірофіти, криптофіти, хризопфіти, губки, плоскі черв'яки, тварин, які мають псевдоцелом, як аскогельміти, кільчасті черв'яки, смугасті молюски, двостулкові молюски, личинки веслоногих ракоподібних, черепашкові, мізиди, гаммаріди, личинки десятиногих раків та личинки телеостних риб.

18. Спосіб за п. 17, який **відрізняється** тим, що популяцію певних водних шкідливих організмів вибрано з групи, що містить віруси, протисти, голопланктонні організми та меропланктонні організми.

19. Спосіб за п. 17, який **відрізняється** тим, що популяцію певних водних шкідливих організмів вибрано з групи, що містить донні організми, придонні організми, відшаровану або плаваючу біоту, бактерії, бактерії, що оточені оболонкою, та найпростіші тварини.

20. Спосіб за п. 17, який **відрізняється** тим, що популяцію певних водних шкідливих організмів вибрано з групи, що містить водорості, пірофіти, криптофіти, хризопфіти, губки, плоскі черв'яки, тварин, які мають псевдоцелом, як аскогельміти, кільчасті черв'яки, смугасті мідії, двостулкові молюски, личинки веслоногих ракоподібних, черепашкові, мізиди, гаммаріди, личинки десятиногих раків та личинки телеостних риб.

21. Спосіб за п. 17, який **відрізняється** тим, що популяцію певних водних шкідливих організмів вибрано з групи, що містить колючі водні блохи та бактерії.

22. Спосіб за п. 17, який **відрізняється** тим, що популяцію певних водних шкідливих організмів вибрано з групи, що містить бактерії, найпростіші тварини, водорості, джгутіконосці, цист джгутіконосців, смугасті мідії та личинки смугастих мідій.

23. Спосіб за п. 17, який **відрізняється** тим, що популяцію певних водних шкідливих організмів вибрано з групи, що містить бактерії, водорості, джгутіконосці, цист джгутіконосців, смугасті мідії та личинки смугастих мідій.

24. Спосіб за будь-яким з пп. 17-23, який **відрізняється** тим, що популяція певних водних шкідливих організмів з множини видів.

25. Спосіб за п. 24, який **відрізняється** тим, що популяція певних водних шкідливих організмів з множини класів тваринного або рослинного світу.

26. Спосіб за п. 25, який **відрізняється** тим, що популяція певних водних шкідливих організмів включає шкідливі організми з множини філуми або типів тваринного або рослинного світу відповідно.

27. Спосіб за будь-яким з пп. 1-26, який **відрізняється** тим, що водою, зараженою водними шкідливими організмами, є замкнений об'єм води.

28. Спосіб за п. 27, який **відрізняється** тим, що замкненим об'ємом води є баластна вода, розміщена в резервуарі.

29. Об'єм води, очищеної згідно із способом за будь-яким одним з пп. 1-28.

30. Спосіб знищення певної популяції шкідливих молюсків у водній системі, що містить зазначену популяцію, який полягає в тому, що до зазначеної водної системи додають токсичну кількість аквацидної сполуки, яку вибрано з групи, що склада-

ється з 2-метил-5-гідрокси-1,4-нафтохінону, 2-метил-1,4-нафталіндіону, 2-метил-2-метабісульфат натрію-1,4-нафталіндіону, 3-метил-1,8-дигідроксіантрахінону, 2-метилантрахінону, 1,4-нафталіндіону та їх сумішей.

31. Спосіб за п. 30, який **відрізняється** тим, що шкідливі молюски вибрано з групи, яка складається з мідій, двостулкових молюсків та равликів.

32. Спосіб за п. 31, який **відрізняється** тим, що шкідливі молюски вибрано з групи, яка складається із смугастих мідій та Азійських двостулкових молюсків.

33. Спосіб за будь-яким з пп. 30-32, який **відрізняється** тим, що шкідливі молюски обробляють зазначеною аквацидною сполукою протягом часу, достатнього для знищення зазначених шкідників.

34. Спосіб за будь-яким з пп. 30-33, який **відрізняється** тим, що шкідливі молюски обробляють зазначеною аквацидною сполукою протягом 1-96 годин.

Цей винахід стосується способу та речовин для боротьби з водними шкідниками включно з зоологічними організмами та рослинами. Більш конкретно винахід стосується способу та речовини для регуляції, пригнічення та знищення популяцій водних та морських шкідливих рослин, організмів та тварин у зоні цільової обробки. Винахід особливо придатний для стерилізації молюсків, джугитконосців, бактерій та водоростей у обробленому водному середовищі (у замкненому чи незамкненому просторі).

Виявлення влітку 1988р. Євразійського смугастого двостулкового молюска *Dreissina polymorpha* у Великих озерах Північної Америки є одним із найбільш значущих випадків в історії біологічного вторгнення у водному середовищі, і це був не перший випадок появи неавтохтонного виду в водах США. До цього випадку в Сполучених штатах з'явилися колюча дафнія *Daphnia hyalina* та гривистий йорж *Gymnocypris przewalskii*, яких було занесено з баластною водою європейських портів. Згодом виявилось, що смугастий двостулковий молюск також потрапив у США з баластною водою з Європи.

Від літа 1988р. до Сполучених штатів з баластними водами портів інших країн потрапило кілька видів водних організмів. Зараз підраховано, що до США потрапило кілька сотень організмів з баластними водами та/або іншим шляхом, не рахуючи рибного промислу та океанічних або прибережних течій. Висока інтенсивність занесення водних видів організмів з інших країн є суттєвою загрозою для чистоти прибережних вод Сполучених штатів та басейну Великих озер.

Ще до 1880р. вдавались до різних способів контролювання баласту на судах. Зараз багато вулиць у прибережних містах вимощено камінням, яким користувались як баластом на судах. Однак незадовго до кінця століття старі поширені способи стабілізації суден було замінено іншими з використанням води як баласту. Інтенсивність інвазії

неавтохтонних водних видів організмів з початку століття значно зросла, і значною мірою через морські перевезення. Із зростанням трансокеанських перевезень зростає невідоме занесення неавтохтонних видів організмів, які складають загрозу природним водним шляхам. Це пояснюється різноманітністю організмів, здатних витримати трансокеанську подорож у баластній воді, кінгстонних коробках та на корпусах суден. Баластна вода суден - це основний, серед перерахованих, засіб перенесення організмів у води Сполучених штатів.

Баластна вода - це прісна або солоня вода, яку накачують у судно для полегшення керування ним під час маневрування, а також для забезпечення потрібного диференту, остійності та плавучості. Воду для баласту можуть брати у різних пунктах під час плавання, включно з портом відходу або призначення. За час одного навколосвітнього плавання контейнеровози можуть здійснити до 12 заходів до портів/змін баласту. Будь-які види планктону або личинок, що знаходяться поблизу отвору для впуску баластної води, можуть бути втягнутими до судна і перенесеними до наступного порту призначення. Підраховано, що у світі кожного року переміщують 10 мільярдів тон баластної води. Кожне судно може нести від декількох сотень галонів (близько 2 тонн) до понад 100 000 тон баластної води, залежно від розмірності та призначення судна. Кожної години до прибережних вод Сполучених штатів надходить більш ніж 640 тонн баластної води.

За останні 20 років ризик інвазії з баластною водою незрівнянно підвищився через те, що для перевезення до Сполучених штатів та вивезення з їх території більших обсягів вантажів користуються великотоннажними суднами. Підраховано, що у світі щоденно переміщують 3000-10000 видів організмів і тварин. Стосовно вантажів, які прибувають до США, цікаво зауважити, що вантажі, до яких входять тварини, фрукти, овочі і таке інше, Міністерство сільського господарства США повин-

но перевіряти на відповідність вимогам, згідно з якими потенційно шкідливі неавтохтонні види вилучають. Іронія полягає в тому, що судно може скинути баластну воду, яку було забруднено неавтохтонними видами організмів. Саме шляхом до США було занесено кілька сотень видів.

Служба охорони рибацтва та диких тварин США на сьогоднішній день оцінює річні витрати в економіці Північної Америки через занесення неавтохтонних видів організмів як такі, що сягають за 100 мільярдів доларів США. Незважаючи на те, що баластна вода складає меншу частку такого занесення, витрати сягають десятків мільярдів доларів, які стосуються господарської дислокації, очищення, втрат продукції та втрат рибного промислу та інших природних ресурсів.

Як зазначено вище, одним з найбільш горезвісних видів, що потрапили у Великі озера Північної Америки, є Євразійський смугастий молюск *Dreissina polymorpha*, який становить головну загрозу внутрішнім водним ресурсам як з рекреаційної, так і комерційної точки зору. На жаль, зараз ці види окупували територію від Великих озер до штату Луїзіана, а економічні збитки за 1999 календарний рік оцінено у більш, ніж 4 мільярди доларів. Цей вид є особливо плодовитим; репродуктивна самка може відкладати за сезон більш як 40 000 здатних до запліднення яєць, які після виведення можна виявити у вигляді колоній із більш як сто тисяч особин на квадратний метр. Мало того, ці колонії прикріплюються до підводних предметів, серед іншого таких як водозабірні труби, по яким молюски можуть легко розповсюджуватися в інші середовища, корпуси суден, покидьки, наприклад, зношені автомобільні покришки, затонулі судна та непотрібні металеві барабани. Усталені колонії товщиною часто сягають 20 см.

Особливо важливим є закупорювання водозабірних труб смугастими молюсками, які мають руйнівний вплив на господарські показники, особливо таких об'єктів як електростанції, де існує специфічна потреба у водопостачанні. На певних електростанціях після інвазії зареєстровано зменшення водопостачання на 50% і, крім того, виявляється, що смугасті молюски, як живі, так і в мертві, виділяють речовини, що викликають руйнування труб з чорних металів. Проблема, пов'язана з молюсками, також виникає в трубах, по яких постачають питну воду, тому, що навіть після очищення вода має неприємний запах. Це спричинено не тільки тими речовинами, що їх виділяють живі молюски, але головним чином ті, що померли й розкладаються. Під час розкладу останніх, найбільш імовірно утворюються поліаміни, наприклад кадаверин, який має особливо неприємний запах, спричинений розкладом білків і найчастіше характерний для м'яса, що розкладається.

До інших екологічно шкідливих впливів належать як безпосередні, так і опосередковані наслідки інвазії смугастих двостулкових молюсків. Безпосередні наслідки даються взнаки на фітопланктоні. Смугасті двостулкові молюски живляться фітопланктоном і є поживою для риб, особливо в озерах і ставках, через що підвищується фотосинтетична ефективність інших видів водоростей тому, що вода стає більш прозорою. Як ви-

явилось, це має вирішальний вплив на потік енергії та ланцюги живлення у деяких водоймах. Певні види риб виявляються загроженими. Наприклад, окунь добре почувається у каламутній воді, і фахівці з проблем довкілля взагалі вважають, що більш прозора вода, як результат активності смугастих двостулкових молюсків, призведе до зникнення промислу окуня, який зараз оцінюють у 900 мільйонів доларів на рік. Широкомасштабне погіршення стану природного рибного промислу на Великих озерах, що сягає багато мільярдів доларів, відчувається вже зараз як результат міжвидової боротьби з боку непромислових видів, наприклад Євразійського йоржа (*Gymnocephalus cernuus*) та чорноротого бичка (*Proterorhinus marmoratus*), яких було занесено з баластною водою протягом двох минулих десятиріч.

В результаті їх харчових переваг смугасті двостулкові молюски можуть радикально змінити видовий склад водоростевого угруповання, через що потенційно шкідливі види можуть стати широко розповсюдженими. Як приклад, можна згадати *Microcystis* - синьо-зелену водорість, що має невелику харчову цінність і здатна утворювати токсини, які можуть викликати шлунково-кишкові розлади у людини. В Озері Ері та суміжних водних шляхах зафіксовано цвітіння *Microcystis*. Токсичні джугитоконосці, наприклад, *Procerocentrum*, *Gymnodinium*, *Alexandrium* та *Gonyaulax* в багатьох частинах світу часто виявляються як цвітіння, яке іноді називають "червоними потоками". Крім того, що ці організми викликають серйозні (іноді фатальні) захворювання у деяких хребетних споживачів, включно з людьми, деякі з них мали руйнівний вплив на галузі добування та переробки молюсків і ракоподібних в декількох країнах, і зараз вже визнано, що в багатьох з цих випадків причиною була баластна вода.

Повідомлення про занесення бактерії холери *Vibrio cholera*, на узбережжя Мексиканської затоки Сполучених штатів беруть початок з часу завезення цього виду, пов'язаного з планктонними веслоногими ракоподібними переносниками інфекції в баластній воді, що потрапляла до портів Мексиканської затоки з Південної Америки. У свою чергу переносник потрапляв з Європи до портів Південної Америки подібним чином.

В результаті занесення неавтохтонних видів до США та з метою зменшення можливості занесення інших організмів в майбутньому, в 1990р. Конгрес США ухвалив закон, відомий як Публічний Закон 101-646 "Закон про регуляцію та запобігання проникненню неавтохтонних водних шкідників" згідно з "Національною програмою контролю баластної води", який серед іншого приписує проводити дослідження з контролю занесення водних шкідників до США. Такі заходи контролю можуть охоплювати ультрафіолетове опромінення, фільтрацію, зміну солоності води, механічне перемішування, ультразвукову обробку, озонування, теплову обробку, електричну обробку, кисневу депривацію та хімічну обробку, як потенційні способи контролю занесення водних шкідників. Можливо, що інші уряди ухвалюють подібні закони найближчим часом, коли обсяг і вартість забруднення середовища водними шкідниками стануть краще

усвідомленими.

Було запропоновано численні способи і композиції з метою контролювання та пригнічення росту різних морських шкідників та тварин. Зокрема, низку композицій було запропоновано для оброблення води і різних поверхонь, заселених смугастими двостулковими молюсками. Приклади різних композицій розкриті в Патентах США №5851408, 5160047, 5900157 та 5851408. Обробку різних водних шкідників, за винятком токсичних бактерій, з використанням юглону або його аналогів описано в міжнародній публікації WO 00/56140.

Ці композиції й способи, хоча деякою мірою ефективні, не були здатні забезпечити повну регуляцію занесення морських рослин і тварин у водні шляхи. Тому в промисловості існує постійна потреба у більш досконалих способах та композиціях для боротьби з водними шкідниками, такими як рослини та тварини, переважно водні флора та фауна, та іншими організмами, які можуть бути суспендовані у воді й здатні до міграції на великі відстані з водою, що потрапляє у водозабірні пристрої, переноситься течіями та морськими припливами і відпливами.

Даний винахід стосується способу регуляції водних шкідників у вигляді рослин, тварин, бактерій та інших мікроорганізмів. Винахід є особливо придатним для регуляції популяцій та стерилізації молюсків, джугутиконосців, токсичних бактерій та водоростей. Згідно з одним аспектом, винахід стосується способу і композиції для обробки води з метою стерилізації невеликих та мікроскопічних водних шкідників, включно з рослинами, тваринами, токсичними бактеріями та мікроорганізмами, що знаходяться у воді.

Мета винаходу полягає у створенні способу обробки води у визначеній акваторії, у замкненому просторі або акваторії, що не має течії, для стерилізації акваторії з водними шкідливими мікроорганізмами, включно з рослинами, токсичними бактеріями, суспендованими тваринами та іншими біологічними організмами в осадових матеріалах з використанням щонайменше однієї аквацидно-активної сполуки в ефективній кількості, що є токсичною для цільового виду.

Ще одна мета винаходу полягає у створенні способу обробки баластної води в суднах для контролювання перенесення молюсків, джугутиконосців, токсичних бактерій, водоростей та інших мікроорганізмів через оброблення баластної води ефективною кількістю аквацидної сполуки для стерилізації баластної води.

Інша мета винаходу полягає у створенні способу обробки води біля водозабірних труб системи технологічного водопостачання для стерилізації рослин, тварин та мікроорганізмів, що містяться у воді.

Наступною метою винаходу є створення способу обробки баластної води для знищення водних організмів, що знаходяться в ній, та регулювання їх розповсюдження.

Ще одна мета винаходу полягає у створенні способу обробки об'єму води в замкненому просторі або в локалізованій частині відкритої води токсичною кількістю аквацидної сполуки, яка легко перетворюється на нетоксичні побічні продукти.

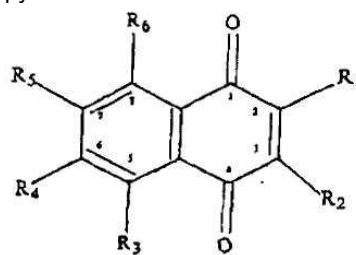
Іншою метою винаходу є створення способу пригнічення розповсюдження водних шкідників, наприклад, дорослих смугастих двостулкових молюсків, личинок смугастих двостулкових молюсків, личинок устриць, фітопланктонів *Isochrysis galbana*, *Neochloris Chlorella*, токсичних джугутиконосців (наприклад, *Prorocentrum*), морських та прісноводних прозоантів та токсичних бактерій (включно з рослинними культурами та їх цистами), дорослих та личинок веслоногих ракоподібних (переносники інфекції *Vibrio Cholera* та *Vibrio fischeri*) та інших планктонних ракоподібних, наприклад, *Artemia salina*, личинок та ікри риб, обробляючи воду щонайменше однією описаною аквацидною сполукою в кількості та протягом достатнього часу для знищення цільових водних шкідників.

Подальшою метою винаходу є створення аквацидних сполук для обробки баластної води та води в інших замкнених просторах, для користування як біоцидними добавками до фарб для нанесення на корпуси морських суден, а також як агрохімічні засоби у рослинництві для боротьби із равликами та слимаками.

Ще одна мета винаходу полягає у створенні способу обробки стічних вод промислових підприємств та комунальних служб для знищення або регуляції розповсюдження водних шкідливих рослин, тварин та мікроорганізмів.

Ці та інші мети винаходу, що стануть очевидними з опису, досягнуто способом пригнічення розвитку та переважно знищення популяції цільового шкідливого мікроорганізму, застосовуючи до зазначеної популяції ефективну кількість щонайменше однієї аквацидної сполуки, яку вибрано з групи, що складається з:

(a) хінонів, (b) антрахінонів, (c) хініну, (d) варфарину, (e) кумаринів, (f) амфоталіду, (g) циклогексаксен-1,4-діону, (h) фенідіону, (i) пірдону, (j) родизонату натрію, (k) апірулозину, (l) тимохінону та (1) нафталендіонів, які мають таку хімічну структуру:



де:

R<sub>1</sub> - гідроген, гідрокси або метильна група;

R<sub>2</sub> - гідроген, метил, бісульфат натрію, хлоро, ацетоніл, 3-метил-2-бутеніл, гідрокси, або 2-оксипропільна група;

R<sub>3</sub> - гідроген, метил, хлоро, метокси або 3-метил-2-бутенильна група;

R<sub>4</sub> - гідроген або метоксигрупа;

R<sub>5</sub> - гідроген, гідрокси або метильна група;

R<sub>6</sub> - гідроген або гідроксигрупа.

Аквацидні сполуки згідно з винаходом надзвичайно ефективні у регуляції популяцій водних шкідливих організмів у дуже низьких концентраціях. Типові цільові невеликі водні шкідники та мікроорганізми, переносяться потоками оточуючих вод,

наприклад, течіями, морськими припливами та відпливами і водозабірними каналами. Якщо аквациди згідно з винаходом, утримувати в контакт з цільовими шкідливими організмами протягом періоду від декількох годин до декількох днів, то цільова популяція шкідників буде знищена. Після цього аквацидні сполуки розкладаються під дією ультрафіолетового світла, в результаті окислення, гідролізу та інших природних механізмів у нешкідливі побічні продукти, що уможливають користування цією водою.

Цей винахід взагалі стосується способу обробки води, що містить цільову популяцію водних шкідників, аквацидним засобом протягом періоду контактування, достатнього для зменшення цільової популяції в обробленій воді до безпечних рівнів або стерилізації обробленої води, що містить цільову популяцію. Вода, яку обробляють, може бути певною відкритою акваторією, може знаходитись у замкненому просторі або може мати обмежену течію. Як приклад, маси води, що можуть бути оброблені згідно з винаходом, охоплюють баластну воду суден, технологічну воду, яку відбирають з нерухомої або рухомої маси води, відрацьовану воду, яку виливають у збірний танк або скидають за борт, воду ставків-охолоджувачів або інших водосховищ, водозабірних каналів або труб, водовипускних каналів або труб, теплообмінників, систем обробки стічних вод, підприємств харчової промисловості та виробництва напоїв, підприємств паперово-целюлозної промисловості, воду в системі водопостачання та скидання води електростанцій, воду охолоджувальних каналів, устаткування для м'якшення води, комунально-побутові стічні води, воду випаровувальних конденсаторів, воду скрубєрів, технологічну воду консервних заводів, воду для пастеризації пива, і таке інше. Передбачається, що аквацидними засобами згідно з винаходом також можна скористатись для обробки узбережжя або акваторії пляжів, якщо популяція водних шкідників погіршила санітарні умови акваторії у визначеному місці загалом відкритої води.

У найкращих прикладах втілення винаходу аквацидний засіб, виготовлений з однієї або більше аквацидних сполук, додають до баластної води суден у концентрації та на період часу, що ефективні для стерилізації шкідливих мікроорганізмів. Такі концентрації мають достатньо низький рівень і розводяться у більшому об'ємі води до нетоксичного рівня, не загрожуючи або зменшуючи загрозу автохтонним видам рослин та тварин. Такий спосіб обробки дозволяє запобігти ненавмисній міграції шкідливих мікроорганізмів між портами без значних капітальних витрат або значних змін у практиці торговельного судноплавства.

Аквацидні сполуки згідно з винаходом вмишують до води відомими пристроями та способами. Аквацидну сполуку можна використати як одиничну дозу або протягом певного часу для застосування бажаної концентрації. Аквацидну сполуку краще вводити в турбулентну зону або в іншу зону, де вода не спокійна і аквацидна сполука буде добре змішуватись з нею. Аквацидну сполуку можна вводити періодично, безперервно або всю дозу одразу.

Цільові популяції шкідників

Водні шкідливі організми та популяції, з якими можна боротися, знищувати або іншим чином знешкодити способом згідно з винаходом, взагалі не можуть вільно переміщуватись між географічними зонами, натомість, вони перш за все зазнають впливу водних течій або осаду, що їх оточує. Такі мікроорганізми головним чином рухаються під дією водних течій, морських припливів і відпливів, з баластною водою, яку беруть в одному порту й скидають в іншому. Водні шкідливі мікроорганізми та популяції, на які спрямовано винахід, охоплюють бактерії, віруси, протисти, грибки, цвіль, водні шкідливі рослини, водні шкідливі тварини, паразити, патогени, та симбіонти будь-якого з цих організмів. Більш конкретний перелік організмів водних шкідників, які можна обробляти згідно з винаходом, охоплює, але не обмежений такими класами (які в деяких випадках можуть частково збігатися):

1) Голопланктонні організми, наприклад фітопланктон (діатомеї, джугтиконосці, синьо-зелені водорості, нанопланктон та пікопланктон) і зоопланктон (медузи, гребеноподібні, гідрозої, багатощетинкові черви, коловертки, планктонні черевоногі, равлики, веслоногі ракоподібні, рівноногі, мізиди, криль, сагіти та пелагічні оболончасті) та риба.

2) Мєропланктонні організми, такі як фітопланктон (паростки бентичних рослин) та зоопланктон (личинки бентичних безхребетних, наприклад, губки, морські анемони, корали, м'якуни, двостулкові молюски, їстівні молюски, устриці та гребінці).

3) Демерсальні організми, такі як маленькі ракоподібні.

4) Організми прибережного планктону, такі як плоскі черви, поліхети, личинки комах, кліщі та нематоди.

5) Бентичні організми, такі як вилуговувачі, личинки та дорослі комахи.

6) Вільноплаваючу біоту, наприклад, морську траву, морські водорості та болотні рослини.

7) Збудників захворювань риб та ракоподібних, патогенів та паразитів.

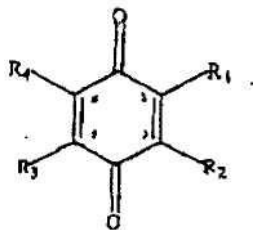
8) *Bythotrephes cederstroemi* (колюча дафнія, колючо-хвоста дафнія).

9) Макробезхребетних, таких як молюски, ракоподібні, губки, анеліди, бризозої та оболончасті. Наприклад до молюсків, з якими можна ефективно боротись, відносяться смугасті двостулкові молюски, їстівні молюски, включно з азійськими їстівними молюсками, устрицями та равликами.

Тварини, проти яких можна застосувати винахід, вибрано з групи, що складається з: бактерій, наприклад, *Vibrio* spp. (*V. Cholera* та *V. Fischel*), цианобактерії (синьо-зелена водорість), найпростіші, наприклад, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Naegleria*, водорості, наприклад, *Pyrrhophyta* (джугтиконосці, наприклад, *Gymnodinium*, *Alexandrium*, *Pfiesteria*, *Gonyaulax*, *Glenodinium* (включно з оболончастими), *Cryptophyta*, *Chrysophyta*, *Porifera* (губки), *Platyhelminthes* (плоскі черви, наприклад, *Trematoda*, *Cestoda*, *Turbellaria*), *Pseudococcolomates* (наприклад, *Rotifers*, *Nematodes*), кільчасті черви (наприклад, поліхети, малощетинкові), молюски (наприклад, черевоногі, такі як легеневі молюски), двостулкові молюски, наприклад, *Crassostrea* (устриці), *Mytilus* (сині мідії), *Dreissena* (смугасті двос-

тулкові моллюски), ракоподібні, личинки та дорослі веслоногі ракоподібні, черепашкові, мізиди, гаммаріди, личинки декаподів та личинки птеригіофор.

В першому прикладі втілення способу згідно з винаходом додають ефективну кількість щонайменше однієї сполуки, що пригнічує розвиток морських рослин та тварин, у воду, яку потрібно обробити. Аквацидну сполуку вибрано з групи, що складається з хінону, нафталіндіону, антрахінону та їх сумішей. Хінони мають таку формулу:



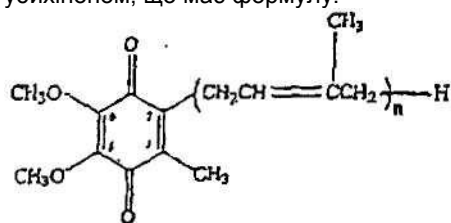
де  $R_1$  - гідроген, метил, гідрокси або метоксигрупа;

$R_2$  - гідроген, гідрокси, метил, метокси або  $\text{NO}_2$  група;

$R_3$  - гідроген, гідрокси, метил або метоксигрупа; та

$R_4$  - гідроген, метил, метокси, гідрокси або  $\text{NO}_2$  група.

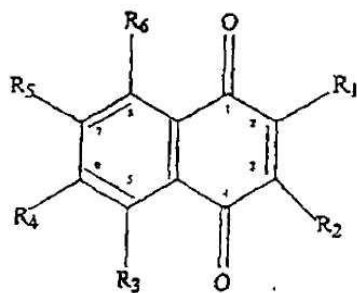
Приклади хінонів, які виявились ефективними у боротьбі або пригніченні розвитку рослин та тварин у воді, охоплюють 1,4-бензохінон (хінон), 2,5-дигідрокси-3,6-динітро-р-бензохінон (нітранілінова кислота), 2,6-диметоксибензохінон, 3-гідрокси-2-метокси-5-метил-р-бензохінон (фумагатин), 2-метилбензохінон (толухінон), тетрагідрокси-р-бензохінон (тетрахінон), 2,3-метокси-5-метил-1,4-бензохінон, 2,3-метокси-5-метил-1,4-бензохінон, та їх суміші. В наступних втіленнях, хінон може бути убихіноном, що має формулу:



де

$n$  - ціле число від 1 до 12. Особливо бажано, щоб убихінон мав формулу де  $n$  більше ніж 10. В наступних втіленнях убихінон має формулу, де  $n = 6-10$  та  $n$  є цілим числом.

В втіленнях винаходу, де композицією, яка пригнічує морських рослин та тварин є нафталіндіон, на відміну від юглона. Такі нафталіндіони мають наступну формулу:



де

$R_1$  - гідроген, гідрокси або метильна група;

$R_2$  - гідроген, метил, бісульфат натрію, хлор, ацетоніл, 3-метил-2-бутеніл або 2-оксипропільна група;

$R_3$  - гідроген, метил, хлор, метокси, або 3-метил-2-бутенільна група;

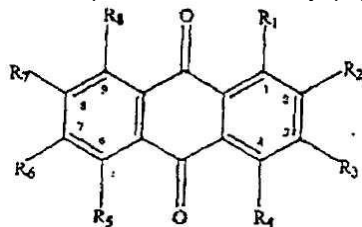
$R_4$  - гідроген або метоксигрупа;

$R_5$  - гідроген, гідрокси або метильна група;

$R_6$  - гідроген або гідроксигрупа.

Нафталіндіони включають 1,4-нафталіндіон, 2-метил-5-гідрокси-1,4-нафталіндіон (графіт), 2-метил-1,4-нафталіндіон (Вітамін  $K_3$ ), метил-2-метабісульфат натрію-1,4-нафталіндіон, 6,8-дигідрокси бензохінон, 2,7-диметил-1,4-нафталіндіон (хімафілія), 2,3-дихлоро-1,4-нафталіндіон (дихлорин), 3-ацетоніл-5,8-дигідрокси-6-метокси-1,4-нафталіндіон (яваніцин), 2-гідрокси-3-(3-метил-2-бутеніл)-1,4 нафталіндіон (лапахол), пірдон та 2-гідрокси-3-метил-1,4-нафталіндіон (фтіолон).

Антрахінони мають таку формулу:



де

$R_1$  - гідроген, гідрокси або хлоро;

$R_2$  - гідроген, метил, хлоро, гідрокси, карбоніл або карбоксигрупа;

$R_3$  - гідроген або метильна група;

$R_4$  - гідроген;

$R_5$  - гідроген або гідроксигрупа;

$R_6$  та  $R_7$  - гідроген; та

$R_8$  - гідроген або гідроксигрупа.

Прикладами антрахінонів, які придатні для обробки води з метою регулювання або пригнічення розвитку морських рослин та тварин, є 9,10-антрахінон, 1,2-дигідроксиантрахінон (алізарин), 3-метил-1,8-дигідроксиантрахінон, антрахінон-2-карбонова кислота, 1-хлороантрахінон, 2-метилантрахінон та 1-5 дигідроксиантрахінон 2-хлороантрахінон.

Інші сполуки, які можуть бути використані у боротьбі з розвитком рослин, тварин та мікроорганізмів окремо, або в комбінації з іншими хінонами, антрахінонами, вказаними вище, включають 9,10-дигідро-9-оксоантрацен (антрон), 6'-метоксицинхонан-9-ол (хінін), 4-гідрокси-3-(3-оксо-1-феніл хутіл)-2Н-1-бензопиран-2-он (варфарин), 2Н-1-бензопиран-2-он (кумарин), 7-гідрокси-4-

метилкумарин, 4-гідрокси-6-метилкумарин, 2[5-(4-амінофенокси)фентил]-1H ізоіндол 1,3-(2H)-діон (амфоталід), ридіксонат натрію, 2-фенил-1,3-індандіон (феніндіон), 2,5-дигідрокси-3-ундецил-2,5-циклогексаксиден, спірулосин та тимохінон.

Сполуки, які є ефективними у боротьбі з макробезхребетними, охоплюють 2,3-метокси-5-метил-1,4-бензохінон, 2-метил-1,4-нафталіндіон, 2-метил-5-гідрокси-1,4-нафталіндіон, 2-метил-2-метабісульфат натрію-1,4-нафталіндіон, 3-метил-1,8-дигідроксиантрахінон, 2-метил-антрахінон, 1,2-дигідроксиантрахінон, 1,4-нафталіндіон та їх суміші. Ці сполуки також ефективні у боротьбі із джгутіконосцями.

В одному з втілень винаходу, для пригнічення розвитку молюсків, джгутіконосців, токсичних бактерій та водоростей їх обробляють, застосовуючи ефективну кількість сполуки, яку вибрано з групи, що складається з 2,3-метокси-5-метил-1,4-бензохінону, 2-метил-1,4-нафталіндіону та їх сумішей.

Один з переважних прикладів втілення винаходу стосується способу знищення або пригнічення розвитку молюсків, джгутіконосців, токсичних бактерій та/або водоростей застосуванням ефективної кількості хінону, антрахінону, нафталіндіону або їх сумішей. Спосіб є ефективним у пригніченні розвитку токсичних бактерій та молюсків - особливо, смугастих двостулкових молюсків та личинок смугастих двостулкових молюсків, а також й інших двостулкових молюсків при застосуванні ефективної кількості аквацидної сполуки у воді. В бажаному втіленні винаходу, молюски, особливо смугасті двостулкові молюски та личинки смугастих двостулкових молюсків, обробляють до знищення або пригнічення їх розвитку, застосовуючи до них токсичну кількість сполуки, вибраної з групи, що складається з 2,3-метокси-5-метил-1,4-бензохінону, 2-метил-5-гідрокси-1,4-нафталіндіону, 2-метил-1,4-нафталіндіону, 2-метил-2-метабісульфату натрію - 1,4-нафталіндіону, 3-метил-1,8-дигідроксиантрахінону, 2-метилантрахінону, та їх сумішей.

Ще в одному втіленні винаходу ці аквацидні сполуки вводять, як активну сполуку, в тверду або рідинну приманку для застосування у сільському господарстві з метою знищення або пригнічення розвитку слимаків та равликів. Приманка може бути стандартною, яка добре відома в даній галузі. В іншому втіленні, аквацидну сполуку застосовують як розчин або дисперсію безпосередньо на рослинах в ефективній кількості з метою боротьби із слимаками та равликами.

Кількість аквацидної речовини

Кількість застосовуваного аквацидного інгредієнту буде почасти залежати від сполуки та видів рослин та тварин. У даному винаході термін "ефективна кількість" або "аквацидний" означають кількість, що здатна знищити цільові види або зробити популяцію цільових видів інертною та іншим чином не життєздатною.

Спосіб обробки води для знищення цільових рослин або тварин полягає в тому, що аквацидні сполуки додають у воду в кількості, масова частка якої складає менш за 1%. Аквацидну сполуку переважно додають в кількості приблизно від

100млрд<sup>-1</sup> до 500млн<sup>-1</sup>, більш бажано в кількості приблизно від 500млрд<sup>-1</sup> до 300млн<sup>-1</sup>, найбільш бажано - приблизно від 500млрд<sup>-1</sup> до 250млн<sup>-1</sup>, та особливо бажано - в кількості приблизно від 1млн<sup>-1</sup> до 250млн<sup>-1</sup>. Взагалі, кількість аквацидної сполуки, яку застосовують під час обробки баластної води в резервуарі, буде складати від приблизно 1млн<sup>-1</sup> до приблизно 200млн<sup>-1</sup>.

До популяції цільових шкідників повинно застосовувати аквацидну сполуку у певній концентрації протягом часу, достатнього для знищення цільової популяції. Час застосування складає від щонайменше однієї години до найменше 96 годин (4 дні) як у прісній, так і в солоній воді. Період застосування переважно складає від приблизно двох годин до приблизно 48 годин. Можна провадити звичайну перевірку та брати зразки для визначення точних концентрацій та часу застосування для конкретної аквацидної сполуки, типу води, цільової популяції, способу введення сполуки та температури.

Нанесення покриття

Аквацидні сполуки згідно з винаходом також можна додавати до фарб та покриття у концентрації, достатній для забезпечення регуляції популяції без погіршення якості покриття. Фарбу або покриття можна наносити на поверхню, наприклад, корпус судна, водозабірної труби, корабельного контейнера, якоря та інших підводних предметів, з метою відвернути розвиток та наростання рослин та тварин на такій поверхні.

Фарба або покриття може бути звичайною морською фарбою, що містить різні полімери або сполуки, що утворюють полімери. Наприклад, придатними компонентами можуть бути аркилові естери, такі як етилакрилат та бутилакрилат, метакрилові естери, такі як метилакрилат та етилметакрилат. Інші придатні сполуки включають 2-гідроксиетил метакрилат та диметиламіноетилметакрилат, який може кополімеризуватись з інший вініловим мономером, наприклад, стиролом. Для пригнічення розвитку рослин або тварин на вкритій поверхні фарба містить ефективну кількість щонайменше однієї аквацидної сполуки. Згідно з винаходом аквацидну сполуку вводять до фарби в кількості, необхідній для забезпечення концентрації аквацидної сполуки на поверхні покриття щонайменше 500млрд<sup>-1</sup>, переважно від приблизно 1млн<sup>-1</sup> до масової частки, що складає 50%, та більш бажано в межах 100-500млн<sup>-1</sup> для забезпечення у покритті кількості аквацидної сполуки, ефективної для регуляції розвитку рослин та тварин.

Приклади

Рівні ефективності та токсичності сполук було визначено на активних видах рослин та тварин. Різні сполуки додавали у воду з контрольованими швидкістю та кількістю. Спостережені результати було занесено в Таблицю 1, яку подано далі.

Сполуки дослідили на ефективність стосовно різних видів рослин та тварин відповідно до наступних протоколів.

а) Смугасті двостулкові молюски (личинки та дорослі особини).

Виводок смугастих двостулкових молюсків утримували в природній артезіанській воді, кальці-



сва та магнезіальна твердість якої становила приблизно 25мг-екв/л.

При температурі 20°C личинки залишалися у стані вільного плавання протягом 30-40 днів перед осіданням. Біологічні дослідження ранніх личинкових стадій розвитку цих видів є варіантами стандартних біологічних досліджень ембріонів устриці. Біологічні дослідження провадили на стадії ембріону, трохофори, та утворення черепашки.

Було досліджено токсичність різних хінонів на ранніх стадіях розвитку життя, особливо на стадії розвитку від ембріону до трохофори (2-17 годин); від трохофори до стадії утворення черепашки (17-48 годин); та від стадії ембріону до стадії утворення черепашки (2-48 годин).

Приблизно 25 дорослих молюсків з виводку (яких утримували при температурі 10-12°C) очистили від бруду та помістили у 1500мл лабораторній склянці із приблизно 800мл культуральної води. Температуру води швидко підвищили до 30-32°C додаванням теплої води. Молюски, оброблені цим способом, клали яйця протягом 30 хвилин. Якщо за цей час кладка яєць не відбувалась, у воду додавали зрілі гонади, гомогенізовані у культуральній воді.

У випадку позитивної кладки кількість яєць досягала >50000 на самку. Щоб проконтролювати, чи було успішним запліднення яєць, зиготи брали до комірки Седжвіка-Рафтера (Sedgewick-Rafter) для підрахунку і дослідження під бінокулярним мікроскопом. Було помічено, що запліднені яйця активно ділились і, через 2-3 години після запліднення, досягали 8-клітинної стадії. Показник запліднення, який перевищує 70%, означає, що експериментальний матеріал є життєздатним.

Біологічні дослідження було проведено на щонайменше 500 ембріонах/личинках в кожній з 4 реплікацій. Було застосовано 5 експериментальних та контрольних концентрацій (в частинах на мільйон). Для біологічних досліджень ембріонів було використано 10 ембріонів на мілілітр середовища, а для дослідження стадії утворення черепашки молюска використовували 2 личинки/мл. Досліди провадили в статичних умовах без відновлення. Під час біологічних дослідів, що тривали 24 години або довше, через 24 години додавали корм (культуральний *Neochloris* @ 5x10<sup>4</sup> клітин мл<sup>-1</sup>).

Після підрахунку та регулювання густини ембріонів біологічні дослідження починали лише через 2 години після запліднення, уводячи відому кількість ембріонів у експериментальне середовище. Пізніші стадії утримували у культуральній воді до уведення. Молюсків, що залишилися в живих, було підраховано у комірках Седжвіка-Рафтера з регулюванням контрольного показника загибелі, користуючись формулою Ебботта (Abbott). Критерієм Пробіта та Даннетта (Probit та Dunnett) користались для визначення дози, що призводить до загибелі 50% організмів (LD<sub>50</sub>), найменшого спостереженого ефекту концентрації (HCEK) та відсутності спостереженого ефекту концентрації (VCEK) (Показник токсичності 5,0).

б) Гострий дослід на товстоголовому пімефалесі (дослідження риб).

Для цих досліджень використовували товсто-

голового пімефалеса (*Pimephales promelas*) з власних лабораторних культур. Тварин вивели у природній артезіанській воді із встановленою твердістю >50млн<sup>-1</sup>-екв (CaCO<sub>3</sub>). Риба відкладала ікру в нерестильний басейн об'ємом 75,7дм<sup>3</sup> (20гал.), обладнаний системою трубок з ПХВ, яка слугує схованкою. Личинки, що тільки вивелися, за щільності 50-100 особин/л перенесли у проміжний басейн і утримували їх там до використання. Як корм, використовували науплії креветок (*Artemia*).

Досліди провадили в статичних умовах з відновленням. Дослідження тривало 48 годин та 96 годин при температурі 20°C ± 1°C, при звичайному лабораторному освітленні. Інтенсивність світла дорівнювала 10-20Е/м<sup>2</sup>/с (50-100фут-с). Фотоперіод тривав 16 годин при освітленні та 8 годин у темряві. Дослідний контейнер мав об'єм 400мл. Відновлення досліджуваного розчину провадили через 48 годин. Вік досліджуваних організмів становив 1-14 днів з 24-годинними варіаціями. У контейнерах було по 10 організмів. Експеримент провадили з трьома реплікаціями концентрації індивідуальних хінонів в межах частин на мільярд. Дослідили 5 концентрацій і контроль (початкові досліди з визначення діапазону концентрацій виконали на логарифмічному рівні). Усі дослідження з розчинення досліджуваної сполуки тривали 5 годин. Тварин годували наупліями (*Artemia*) перед дослідженням та за 2 години до відновлення досліджуваного розчину, яке провадили через 48 годин. Рівні кисню підтримували >4,0мг/л. Для розчинення використовували природну воду з твердістю >50мг-екв/л.

Метою досліджень було визначення LD<sub>50</sub>, HCEK та VCEK. Прийнятний поріг дослідження становив виживання 90% або більше контрольних видів. Дані було проаналізовано на базі Показника токсичності 5,0.

в) Дослідження джугитиконосців (*Prorocentrum minimum*)

Джугитиконосців *Prorocentrum minimum* виростили в Чесапекській Біологічній Лабораторії з власної лабораторної культури об'ємом 1 літр культури в стерилізованій фільтрованій воді, яка мала солоність 16тис<sup>-1</sup> і була збагачена поживними речовинами f/2. Перед провадженням експериментів культуру розбавили до 5 літрів фільтрованою гірловою водою із солоністю 16тис<sup>-1</sup>. Приблизна густина клітин складає 2x10<sup>6</sup> клітин в мл.

Після обробляння культури сполукою згідно з винаходом, кожен лабораторну склянку об'ємом 600мл, в якій знаходилось 400мл культури джугитиконосців, утримували під безперервним флуоресцентним світлом для забезпечення розвитку культури. Кожного дня брали проби для підрахунку клітин та їх дослідження під мікроскопом, для виділення хлорофільних пігментів ацетоном та для безпосереднього визначення in-vivo хлорофільної флуоресценції.

Три реплікати по 100мл кожної культури джугитиконосців пропускали крізь фільтр 25мм GFF під низьким вакуумом. Фільтри складали та вкладали у поліпропіленові трубки центрифуги і додавали точно по 4мл ацетону, яким користуються у високоефективній рідинній хроматографії.

Клітини зразків руйнували ультразвуком за

допомоги зонду (Virsonic 50) протягом приблизно 2 хвилин, після чого їх залишили на ніч у холодильнику для екстрагування при 4°C. Після 5 хвилинного центрифугування надосадову рідину злили у комірku кварцового флуорометра і скануючим детектором флуоресценції Hitachi F4500 визначили флуоресценцію. Збудження було зафіксовано на довжині хвилі 436нм із щільною 10нм, а емісію зареєстровано на довжині 660нм із щільною 10нм. Фотомножник працює на електричному живленні з напругою 700В. Спектрофлуорометр калібрували, розчинивши автентичний хлорофіл а та b (Sigma Chemicals) в ацетоні, яким користуються у високо-ефективній рідинній хроматографії. Кожного дня провадили по три тримірні калібрування, а флуоресцентну реакцію виражали у мкг/л.

Флуорометрія in-vivo за допомогою Hitachi F4500 полягає у суспендуванні клітин водоростей і перенесенні аліквотної проби до одноразової полікарбонатної кюветки, реєстрації спектру випромінювання 600-720нм, де збудження зафіксовано на довжині хвилі 436нм з шириною щілини 10нм.

Безпосередні підрахунки клітин провадили під бінокулярним мікроскопом та за допомогою гемоцитометра, підраховуючи по три тотожні проби у 80 квадратах.

Кінцеві показники для токсичності хінону стосуються рухомості клітин, пригнічення поділу клітин, пригнічення синтезу хлорофілу та відбілювання хлоропласту.

г) Дослідження роду *Chlorella*.

Дослідження інших видів фітопланктону, включно з *Chlorella* sp. та *Isochrysis galbana*, провадили відповідно до вищеописаного порядку.

г) Дослідження веслоногих ракоподібних (*Eurytymora affinis*).

Культури *Eurytymora affinis* постійно утримува-

ли у морській воді з солоністю 15тис<sup>-1</sup> протягом 8/16 годин відповідно при світлі/темряві та корм *Isochrysis galbana* давали кожні 48 годин. Випробування на токсичність провадять на наупліях ранніх стадій (на хронічну смертність/дослідження плодючості) або на дорослих молюсках (гострий дослід на LD<sub>50</sub>).

Личинки збирали наступним чином: культури фільтрували фільтром 200м Nitex, щоб відокремити дорослі личинки від личинок більш ранніх стадій. Дорослих личинок залишали відкладати яйця протягом 48-72 годин для отримання науплій на стадіях 1-3, яких використовували у досліді. Досліди провадили на групах з 10 личинок у кожному випадку застосування сполук згідно з винаходом (в трьох копіях). Досліди тривали 12 днів при температурі 20°C (при вищих температурах були менш тривалими). Кінцеві результати отримали в процентах стосовно генерації F0 (наявна як дорослі особини) та загальної кількості генерації F1 (наявної як яйця або науплії). Біологічні досліді для визначення показника LD<sub>50</sub> у дорослих веслоногих ракоподібних провадили протягом 24 або 48 годин, отримуючи показник смертності у процентах як кінцевий результат. Всі біологічні досліді провадили при солоності води 15тис<sup>-1</sup> в режимі 8 годин/16 годин відповідно при освітленні та у темряві.

д) Цисти джгутіконосців (*Glenodinium* sp.)

Цисти джгутіконосців зібрали з морського осаду, очистили від бруду помірним ультразвуком та піддали дії різних хінонів у концентраціях на рівні частин на мільйон. Світлову мікроскопію та епіфлуоресцентну мікроскопію застосували для дослідження цист на окислювальне пошкодження та розрив хлоропластів після дії хінонів у концентраціях на рівні частин на мільйон.

Таблиця 1

Приклад	Номенклатура IUPAC	Емпірична формула	Організм	Дані про токсичність
(1)	2-метил-5-гідрокси-1,4-нафтохінон	C <sub>11</sub> H <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	T. <i>isochrysis galbana</i> Neochlohs Личинки смугастого двостулкового молюска <i>E. affinis</i> <i>Artemia salina</i> Ікра риби	Токсичність при 50млрд <sup>-1</sup> Токсичність при 500млн <sup>-1</sup> Токсичність при 200млрд <sup>-1</sup> 5млн <sup>-1</sup> < 10хв. Токсичність при 5млн <sup>-1</sup> Знищує та запобігає розвитку при 1млн <sup>-1</sup>
(2)	2-метил-1,4-нафталенедион (Вітамін K <sub>3</sub> )	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Личинки товстоголового пімефалеса Minnow молюск T. <i>isochrysis galbana</i>	Токсичність при 1млн <sup>-1</sup> Токсичність при 500млрд <sup>-1</sup>
(3)	2-метил-2-метабісульфат натрію-1,4-нафталенедион	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> SO <sub>5</sub> Na	Личинки смугастого двостулкового молюска Личинки устриці <i>E. affinis</i> <i>Artemia salina</i> Ікра Риби T. <i>isochrysis galbana</i>	Токсичність при 500млн <sup>-1</sup> 1млн <sup>-1</sup> 5млн <sup>-1</sup> < 15хв. Токсичність при 5млн <sup>-1</sup> Знищує та запобігає розвитку при 1млн <sup>-1</sup> Токсичність при 500млрд <sup>-1</sup>
			Смугастий двостулковий молюск Личинка устриці <i>E. affinis</i> <i>Artemia salina</i>	Токсичність при 1млн <sup>-1</sup> 500 млрд <sup>-1</sup> 5млн <sup>-1</sup> < 15хв. Токсичність при 5 млн <sup>-1</sup>

21		74819	22	
			Ікра риби	Знищує та запобігає розвитку при 1млн <sup>-1</sup>
(4)	Антрони	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O	T. isochrysis galbana	Токсичність при 2млн <sup>-1</sup>
(5)	1,2-дигідроксиантрахінон	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	T. isochrysis galbana E. affinis	Токсичність при 1млн <sup>-1</sup> Токсичність при 1млн <sup>-1</sup>
(6)	3-метил-1,8-дигідроксиантрахінон	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Artemia salina T. isochrysis galbana	Токсичність при 5млн <sup>-1</sup> Токсичність при 1млн <sup>-1</sup>
			Смугастий двостулковий молюск	Токсичність при 1млн <sup>-1</sup>
(7)	антрахінон-2-карбокилинова кислота	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	T. isochrysis galbana	Токсичність при 1млн <sup>-1</sup>
(8)	1-хлороантрахінон	C <sub>14</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	E. affinis T. isochrysis galbana Neochloris	5млн <sup>-1</sup> < 5 годин Токсичність при 500млрд <sup>1</sup> Токсичність при 500млрд <sup>1</sup>
(9)	2-метилантрахінон	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	E. affinis T. isochrysis galbana Neochloris	5млрд <sup>1</sup> < 5 годин Токсичність при 500млрд <sup>1</sup> Токсичність при 1млн <sup>-1</sup>
			Смугастий двостулковий молюск	Токсичність при 200млн <sup>-1</sup>
			E. affinis	5млн <sup>-1</sup> < 45хв.
(10)	1,4-нафталенедион	O <sub>10</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	Artemia salina T. isochrysis galbana Личинка устриці	Токсичність при 5млн <sup>-1</sup> Токсичність при 1млн <sup>-1</sup> Токсичність при 5млн <sup>-1</sup>
(11)	антрахінон	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	E. affinis	5млн <sup>-1</sup> < 10 хвилин
(12)	1,4-бензохінон	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	E. affinis T. isochrysis galbana Ікра Риби	5млн <sup>-1</sup> < 4 годин Токсичність при 500млрд <sup>1</sup> 50% знищення при 5млн <sup>-1</sup> Регулює розвиток мальків при 1млн <sup>-1</sup>
(13)	метил-1,4-бензохінон (тулахінон)	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	T. isochrysis galbana	Токсичність при 500млрд <sup>1</sup>
(14)	2,3-метокси-5-метил-1,4-бензохінон	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	T. isochrysis galbana	Токсичність при 5млн <sup>-1</sup>

#### Приклад 15

Бананових равликів (*Bulimulus alternate*) отримали від промислового постачальника, їх годували листям латуку до початку біологічного дослідження.

Десять равликів помістили в закриті 1 літрові лабораторні склянки, на листя латуку площею приблизно 50см<sup>2</sup>, на яке напилили водний розчин 2,3-метокси-5-метил-1,4-бензохінону у трьох концентраціях: 5, 10 та 20мг/л. Оброблене листя висушили перед тим як помістити на нього равликів. Для контролю 10 равликів помістили на необроблене листя латуку площею приблизно 50см<sup>2</sup>. Застосування сполук згідно з винаходом та спосте-

реження проводили при температурі приблизно 20°C у темряві протягом 24 та 48 годин для визначення ознак загибелі та харчової активності.

За всіх застосувань сполук равлики виявляли значне уникання контакту з токсикантом порівняно з контролем. Деякі равлики експериментальної групи ховалися в свої черепашки та не виявляли будь-якого бажання до корму (листя не торкалися). Інші вилазили вгору по стінкам склянок подалі від листя. Таке уникання знову спостерігали через 48 годин. І навпаки, контрольна група равликів за 24 години спожила більш ніж 10% площі листя та продовжувала харчуватися і спожила приблизно 20% листя за 48 годин.