(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(21) Broj prijave: HR P20010652A A2

HR P20010652A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.[7]: **C 12 N 1/20**
C 12 P 1/04
A 01 N 63/02

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 05.09.2001.
(43) Datum objave prijave patenta u HR: 31.10.2002.
(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US00/07454
Datum podnošenja međunarodne prijave 21.03.2000.
(87) Broj međunarodne objave: WO 00/58442
Datum međunarodne objave 05.10.2000.

(31) Broj prve prijave: 09/281,360
09/461,700
(32) Datum podnošenja prve prijave: 30.03.1999.
14.12.1999.
(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US
US

(71) Podnositelj prijave: **Agraquest, Inc., 1530 Drew Avenue, 95616 Davis, US**
(72) Izumitelji: **Lori, Jo Lehman, 1218 Las Encinas Court, 95687 Vacaville, US**
Randy Jay McCoy, 3212 Breton Avenue, 95616 Davis, US
Belinda, Jane Messenger, 519 10th Street, Davis, 95616 CA, US
Denise Carol Manker, 3037 Prado Lane, 95616 Davis, US
Jimmy Ensio Orjala, 2905 Lillard Drive, 95616 Davis, US
Dorte Lindhard, Apartment 307, 405 Cowell Boulevard, Davis, 95616 CA, US
Pamela Gail Marrone, 3333 Victoria Place, 95616 Davis, US
Desmond Rito Jimenez, 9 Pendegast Street, 95695 Woodland, US
(74) Punomoćnik: Mladen VUKMIR, Zagreb, HR

(54) Naziv izuma: **SOJ BACILLUS PUMILUS ZA SUZBIJANJE BOLESTI BILJAKA**

(57) Sažetak: Ovaj izum opisuje novi Bacillus sp. koji proizvodi antibiotik, pokazuje protugljivično djelovanje samo na neke određene biljne štetočine, a ne pokazuje protubakterijsko djelovanje, kao i biološki čistu kulturu soja koja ima sva obilježja ovog soja. Također se opisuje postupak za liječenje ili zaštitu biljaka, plodova i korijenja od gljivičnih infekcija putem primjene učinkovite količine ovih sojeva, nadtaloga koje proizvode ovi sojevi ili metabolita izoliranih iz ovih sojeva. Izum dalje obuhvaća sinergistički fungicidni učinak zajedničke uporabe sojeva NRRL pristupnih br. B-30087 i B-21661 (AQ 713).

HR P20010652A A2

OPIS IZUMA

Križne reference na srodne prijave

Ova prijava je djelomični nastavak SAD serij. br. 09/281360 od 30. ožujka 1999. i djelomični nastavak SAD serij. br. 09/461700 od 14. prosinca 1999., čiji su sadržaji ovdje uključeni kao reference u ovom otkriću.

Područje tehnike

Ovo je izum iz područja biopesticida. Točnije, izum se odnosi na nalaz prema kojem novi soj *Bacillus pumilus*, NRRL pristupni broj B-30087, može inhibirati širok spektar gljivičnih bolesti biljaka *in vivo*. Izum se također odnosi na fungicidne pripravke koji sadrže ovaj novi soj *Bacillusa*, te na antibiotike i pročišćene i nepročišćene frakcije ovog soja, bilo samostalno, bilo u kombinaciji s drugim kemijskim i biološkim pesticidima. Izum se nadalje odnosi na sinergistički fungicidni učinak korištenja NRRL pristupnog broja B-30087 zajedno s NRRL pristupnim brojem B-21661 (CCRC 910106).

Stanje tehnike

Općenito je poznato kako različiti mikroorganizmi pokazuju biološku aktivnost na taj način da mogu biti korisni za suzbijanje bolesti biljaka. Iako je na polju otkrivanja i razvijanja bioloških pesticida za suzbijanje različitih bolesti biljaka koje su od agronomskog i hortikulturnog značenja postignut napredak, većina pesticida koji su u uporabi su i dalje sintetski spojevi. Mnogi od ovih kemijskih fungicida klasificirani su kao karcinogeni prema Upravi za zaštitu okoliša (Environmental Protection Agency, EPA) otrovni su za životinje i ostale vrste protiv kojih nisu usmjereni. Pored toga, uzročnici mogu razviti otpornost na kemijske pesticide (vidi, npr. *Schwinn i sur., u: Advances In Plant Pathology: Phytophahora Infestans, The Cause Of Late Blight Of Potato, str. 244, Academic Press, San Diego, CA, (1991).*

Biološko suzbijanje nudi privlačnu alternativu sintetskim kemijskim fungicidima. Biopesticidi (živi organizmi i prirodno dobiveni spojevi koje proizvode ti organizmi) mogu biti sigurniji, biorazgradiviji i jeftiniji prilikom razvoja.

Jedan od često korištenih biopesticida je gram pozitivna bakterija *Bacillus thuringiensis*. Zna se kako pesticidni sojevi *B. thuringiensis* tijekom sporulacije proizvode kristalne proteine, koji su specifično otrovni za pojedine skupine i vrste kukaca i glista (vidi, npr., SAD patente br. 4999192 i 5208017). Proteinski endotoksini koje proizvodi *B. thuringiensis* također djeluju kao insekticidna sredstva protiv crva kukuruznog korijena i drugih kukaca (npr., SAD patent br. 518709; *Johnson, T.J. i sur. (1993), J. Econ Entomol 86:330-333*). Endotoksini *B. thuringiensis* pokazali su se učinkovitima u obliku pročišćenih kristala, ispranih staničnih peleta i eksprimiranih proteina. Warren i sur., WO 96/10083, opisuju neendotoksinske proteine koje proizvode *Bacillus cereus* i *B. thuringiensis* u vegetativnom stanju. Ovi vegetativni proteini, nazvani Vip1 i Vip2 imaju snažno djelovanje protiv crva kukuruznog korijena (sjeverni i zapadni). Vidi *Estruch i sur. (1997), Nature Biotechnology 15:137-141.*

Jedan termostabilni metabolit *B. thuringiensis*, nazvan beta-egzotoksin, također je pokazao pesticidna svojstva. *Burgjeron i Biache (1979), Entomophaga 11:279-284*, izvješćuju o beta egzotoksinu koji je učinkovit protiv krumpirove zlatice Kolorada (*Leptinotarsa decemlineata*). Usto, poznati beta-egzotoksini *B. thuringiensis* pokazuju nespecifični pesticidni učinak, uništavajući ne samo gliste, nego i muhe, sovice, grinje i crve kukuruznog korijena. Sigma egzotoksin ima strukturu nalik beta-egzotoksinu, a učinkovit je protiv krumpirove zlatice Kolorada. Vidi *Argauer i sur. (1991), J Entomol Sci 26:206-213).* Alfa-egzotoksin je otrovan za ličinke *Musca domestica* (*Cluthy (1980) FEMS Microbiol Lett 8:1-7*). Gama-egzotoksini su različiti proteolitički enzimi, hitinaze i proteaze. Toksični učinci gama egzotoksina očituju se jedino u kombinaciji s beta-egzotoksinom ili delta-endotoksinom. Vidi *Forsberg C, "Bacillus thuringiensis: Its effects on Environmental Quality", National Research Council of Canada. izdanje br. NRCC 15385, str. 91-109 (1976).* Stonard i sur. *(1994) ACS Symposium Series 551:25* izvješćuju o vodotopljivom sekundarnom metabolitu djelotvornom protiv crva kukuruznog korijena u nadtalogu soja *Bacillus cereus*.

Cvitermicin A je vodotopljiva, linearna aminopoliolna molekula stabilna u kiselini (vidi *He i sur. (1994) Tetrahedron Lett. 35(16): 2499-2502*) sa širokospektralnim djelovanjem protiv brojnih gljivičnih i bakterijskih biljnih štetočinja. Za cvitermicin A je također poznato da pospješuje djelovanje *B. thuringiensis*. Manker i sur. (WO 96/39037) prvi su dokazali mogućnosti i svojstva cvitermicina A kao pospješivača *B. thuringiensis*, a Schnepf i sur. su također izvijestili o poticanju *B. thuringiensis* cvitermicinom A (SAD patent 5702703).

Poznato je kako *Bacilli* proizvode protugljivične i protubakterijske sekundarne metabolite. Vidi *Korzybski i sur. "Antibiotics isolated from the genus Bacillus (Bacillaceae)" u: Antibiotics - Origin, Nature and Properties, American Society for Microbiology, Washington, D.C. vol. III (1978)* i *Berdy (CRC Handbook of Antibiotic Compounds, vol. I-*

XIV, (CRC Press, Inc. Boca Raton, FL 1980-87). Spojevi dobiveni od *B. pumilus* uključuju mikrokokcin P, pumilin i tetain.

Kawaguchi i sur., u SAD patentu br. 4250170, izolirali su novi vodotopljivi antibiotik iz *Bacillusa* koji ima djelovanje protiv širokog spektra gram pozitivnih i gram negativnih bakterija. Stabb i sur. *(1990) Applied Environ. Microbiol. 60:4404-4412* su otkrili neke sojeve *Bacillus* spp. (*Bacillus* spp. uključuje *B. subtilis, B. cereus, B. mycoides, B. thuringiensis*) koji pokazuju aktivnost protiv gljiva. Pokazano je kako ovi sojevi proizvode cvitermicin-A i/ili kanozamin. Vidi *Milner i sur. Appl. Environ. Microb. 62: 3061-3066 (1996).* Riječ je o antibiotičkim sredstvima koja su učinkovita protiv bolesti truljenja koje se prenosi tlom, a uzrokuju ga *Phytopathora medicaginis, P. nicotianae, P. aphanidermatum* ili *Sclerotinia minor* (vidi Stabb i sur., *gore*). Cvitermicin A je vodotopljiva, linearna aminopoliolna molekula stabilna u kiselini. Vidi *He i sur. (1994) Tetrahedron Lett. 35(16): 2499-2502.* Posjeduje širokospektralno djelovanje protiv brojnih gljivičnih i bakterijskih biljnih štetočinja. Kanozamin (*Milner i sur., 1996*) također inhibira širok spektar gljivičnih biljnih štetočinja i nekoliko bakterijskih vrsta.

Handelsman i sur., u SAD patentu br. 5049379, opisuju kako *B. cereus* koji proizvodi cvitermicin-A suzbija truljenje u lucerne i soje. Kada se sjeme obloži s *B. cereus* ATCC 53522, patogeni učinak gljive koja dovodi do truljenja korijena je zapriječen. Slična primjena pripravaka temeljenih na sporama određenih sojeva *B. cereus* na sjeme soje ili na tlo koje okružuje sjeme dokazano je poboljšala prinos soje na mjestima sjetve. Vidi *Osburne i sur. (1995) Am. Phytopathol. Soc. 79(6): 551-556.* Postupci za pripravu biopesticida dobro su poznati u struci i uključuju, na primjer, ovlažive praške, suhe tečne mase, mikroinkapsulate i tekuće pripravke mikroba, puni bujon ili antibiotičke frakcije prikladnih kultura. Vidi, npr., SAD patent br. 5061495 od Rossalla i SAD patent br. 5049379 od Handelsmana i sur.

Tsuno i sur. *(1986) J Antibiotics XXXIX (7):1001-1003* izvješćuju o novim amino šećernim antibioticima iz *B. pumilus* koji djeluju protiv širokog spektra bakterija *in vitro*.

Khmel IA i sur. (1995) u SU 1817875 opisuju novi soj *B. pumilus* VKM CR-333D, koji se koristi za suzbijanje gljivičnih fitopatogena i bakterija.

Leifert i sur., *J. Appl. Bacteriol.* 78:97-108 (1995) izvješćuju o proizvodnji protu-*Botrytis* i protu-*Alternaria* antibiotika od strane dvaju sojeva *Bacillusa*, i to *B. subtilis* CL27 i *B. pumilus* CL 45. Čitav bujon, kao i nestanični filtrati, pokazali su se učinkovitima protiv *Botrytis* i *Alternaria* u testovima *in vitro*, a bili su učinkoviti i protiv *Botrytis* u *in vivo* malim biljnim testovima na *Astilbe*. Leifert i sur. (1997), SAD patent br. 5597565, opisuju *B. subtilis*, *B. pumilus* i *B. polymyxa* koji su osobito učinkoviti za suzbijanje bolesti nakon žetve koje uzrokuju gljive, *Alternaria brassicicola* i *Botrytis cinerea.* Također se opisuje nazočnost antibiotika nastalih u nestaničnom filtratu kulture i njihovo djelovanje pri različitim vrijednostima pH, no ovi spojevi nisu otkriveni. Spojevi iz *B. subtilis* gube učinak pri niskom pH, a učinak ekstrakata iz *B. pumilus* djeluju samo pri pH vrijednostima ispod 5.6. Leifert i sur. (1998), SAD patent br. 5780080, opisuju zeljaste biljke koje se mogu liječiti sojevima *B. subtilis*, *B. pumilus* i *B. polymyxa* za suzbijanje *Alternaria brassicicola* i *Botrytis cinerea.*

Loeffler i sur., *(1986) J Phytopathology 115:204-213,* opisuju sojeve *B. subtilis, B. pumilus, B. licheniformis* i *B. coagulans* koji proizvode različite antibiotike s protugljivičnim i protubakterijskim djelovanjem. *B. pumilus* proizvodi bacilizin i iturin A. Bacilizin je vrlo malen spoj molekulske težine 270 koji inhibira samo kvasce. Iturini, koji su topljivi u polarnim otapalima, imaju široko protugljivično i protubakterijsko djelovanje.

U SAD patentu br. 5344647, Rossall opisuje sojeve *Bacillus subtilis* sa širokom aktivnošću protiv gljiva. Nadalje, SAD patent br. 5061495 istog autora opisuje novi antibiotik iz *B. subtilis* koji ima 63500 daltona, precipitira pri pH ispod 5 i ima djelovanje protiv gram pozitivnih bakterija i gljiva (*Botrytis* i *Erysiphe*). *Sholberg i sur. (1995) Can. J. Microbiol. 41: 247-252, Swinburne i sur. (1975) Trans. Brit. Mycol. Soc. 65:211-217, Singh i Deverall (1984) Trans. Br. Mycol. Soc. 83:487-490, Ferreira i sur. (1991) Phytopathology 81:283-287, Baker i sur. (1983) Phytopathology 73: 1148-1152.* Svi opisuju uporabu *Bacillus* spp. i *Bacillus subtilis* kao sredstava za biološko suzbijanje gljivičnih biljnih štetočinja. Pusey i sur. (1988) *Plant Dis.* 72:622-626, Pusey i sur., SAD patent br. 5047239 i McKeen i sur. *(1986) Phytopathology 76:136-139* opisuju suzbijanje truljenja voća nakon berbe pomoću *B. subtilis*. McKeen i sur., *gore*, okazali su kako antibiotici slični iturinskim cikličkim polipeptidima male molekularne težine doprinose ovom fungicidnom djelovanju *B. subtilis*.

Liu i sur., u SAD patentu br. 5403583, opisuju *Bacillus sp.*, (ATCC 55000) i postupak za suzbijanje gljivičnog biljnog štetočinje, *Rhizoctonia solani.* Islam i Nandi (1985) *J Plant Dis Protect 92(3):241-246* opisuju *Bacillus sp.* s antagonizmom prema *Drechslera oryzae*, uzročnikom smeđe mrlje na riži. Isti autori, Islam i Nandi (1985) *J Plant Dis Protect 92(3) 233-240* također opisuju *in vitro* antagonizam *Bacillus sp.* protiv *Drechslera oryzae, Alternaria alternata* i *Fusarium roseum*. Raspravlja se o tri sastojka filtrata kulture. Najaktivniji antibiotik ima visoku topljivost u vodi i metanolu s UV vrhom na 255 nm i ramenom na 260 nm, a dokazano je kako je riječ o lipopeptidu nalik polioksinu.

Cook i sur. (1987) *Beltwide Cotton Production Research Conferences, Dallas, TX, str. 43-45* opisuju uporabu suspenzije *Bacillus sp.* u smanjivanju broja biljaka pamuka koje je uništio *Phymatotrichum omnivorum*, uzročnik truljenja korijena pamuka.

B'Chir i Namouchi (1988), *Revue Nematologique 11(2):263-266*, izvješćuju o *Bacillus pumilus* koji potiče gljive koje hvataju gliste, povećavajući njihovu sposobnost u hvatanju glista. B'Chir i Belkadhi *(1986), Med Fac Landbouww Rijksuniv Gent 51/3b:1295-1310*, raspravljaju o staničnim međudjelovanjima gljiva (*Fusarium*) i glista koje uzrokuju infekcije agruma. Gljiva je povezana s *B. pumilus* (javljaju se zajedno), a kada je prisutna i glista, gljiva je opsežnija. Izgleda kako *B. pumilus* osigurava hranu glistama. Gokte i Swarup *(1988), Indian J Nematol 18(2):313-318*, izvješćuju o *B. pumilus* koji je nematicidan, ali ne izvješćuju o njegovom protugljivičnom djelovanju. Slabospitskaya i sur. *(1992), Mikrobiol Zh (Kiev) 54(6):16-22*, uspoređuju mnoge različite *Bacillus* sojeve, uključujući *B. pumilus*, prema njihovoj sposobnosti proizvodnje hitinaza, ali ne izvješćuju o djelovanju na biljne štetočinje. *B. pumilus* proizvodi najniže razine hitinaze. McInroy i sur. *(1995), Plant and Soil 173(2):337-342*, izvršili su pregled više tipova bakterija, uključujući mnoge *Bacillus* i *B. pumilus* koji su endofiti u stabljikama i korijenu biljaka. Međutim, nisu dali dokaze da su ovi endofitični sojevi protugljivični. Chernin i sur. *(1995), Molecular Genetics*, otkrili su *Bacillus pumilus* koji ima širok spektar djelovanja protiv bakterija (na pr. *Xanthomonas, Pseudomonas, Erwinia*) i gljiva koje uzrokuju bolesti biljaka. Fey i sur. *(1991) Akad Landwirts Kart*, izvješćuju o sojevima *B. pumilus* koji pružaju izvjesnu zaštitu posađenom krumpiru od *Rhizoctonia solani.*

OPIS IZUMA

Opisuje se novi *Bacillus sp.* koji proizvodi antibiotik, pokazuje protugljivično djelovanje samo na pojedine biljne štetočinje, a ne pokazuje protubakterijsko djelovanje. Također se opisuje postupak za liječenje ili zaštitu bilja, voća i korijena od gljivičnih infekcija, koji obuhvaća korak primjene učinkovite količine *Bacillus sp.* koji proizvodi antibiotik. *Bacillus sp.* koji proizvodi antibiotik može se pripraviti kao suspenzija u punoj bujonskoj kulturi ili kao djelomično pročišćeni nadtalog koji sadrži antibiotik dobiven iz pune bujonske kulture *Bacillus sp* koji proizvodi antibiotik. Također se opisuje novi vodotopljivi antibiotik koji pokazuje specifično protugljivično, ali ne i protubakterijsko djelovanje.

Ovaj izum također opisuje novi spoj koji povećava insekticidno djelovanje *B. thuringiensis*. Spoj se izolira iz pune bujonske kulture ili nadtaloga *B. pumilus*, koji u kombinaciji s *B. thuringiensis* povećavaju njegovo insekticidno djelovanje. Izum također uključuje postupke liječenja biljaka radi suzbijanja infestacija insektima na ili u biljkama s bakterijskom suspenzijom *Bacillus* ili nadtalogom kulture *Bacillus* koji sadrži metabolit ili pročišćenim metabolitima. Ovaj izum nadalje opisuje kombiniranje soja B-30087 sa sojem B-21661 (AQ 713) za uporabu kao fungicida, pri čemu zajednička uporaba sojeva omogućuje veću učinkovitost nego u slučaju pojedinačne primjene nekog od njih.

Kratak opis crteža

Slika 1 je NMR spektar zabilježen na 400 MHz u D_2O, djelomično pročišćene fungicidne frakcije *Bacillus sp.*, pohranjene pod NRRL pristupnim br. B-30087.

Slika 2 prikazuje ^1H NMR spektar cvitermicina A zabilježen na 400 MHz u D_2O.

Slike 3A do 3C su kapilarni elektroferogrami nadtaloga izoliranog iz *Bacillus*-a kako je opisano u Primjeru 9. Uvjeti elektroforeze: korištena je neobložena kapilara od 56 cm pri 40C, 30 kV, pozitivni polaritet, 100 μA, u pH 5.8 natrij fosfatnom puferu, UV detekcija na 200 nm. Slika 3A je kapilarni elektroferogram punog bujona *Bacillus pumilus* B-30087. Slika 3B je kapilarni elektroferogram punog bujona *Bacillus pumilus* B-30087 sa standardom cvitermicina A. Vrh cvitermicina A prikazuje se oko vremena prolaska od 3.25 minuta, bez suispiranja s bilo kojim vrhom u punom bujonu. Slika 3C prikazuje standard cvitermicina A u vrijeme prolaska od oko 3.28 minuta.

Slika 4 uspoređuje tri elektroferograma od analize kapilarne elektroforeze (CE) djelomično pročišćene frakcije NRRL pristupnog broja B-30087 samog (Slika 4A), djelomično pročišćene frakcije NRRL br. B-30087 s cvitermicinom A (Slika 4B), odnosno samog cvitermicina A (Slika 4C).

Slika 5 prikazuje ^1H NMR spektar djelomično pročišćene aktivne frakcije koja djeluje kao B+ pojačivač izoliran iz B-30087, zabilježen na 400 MHz u D_2O.

Načini provođenja izuma

Ovaj izum opisuje biološki čistu kulturu soja koji ima sve odlike novog soja *Bacillus sp.*, i njegove mutante i inačice, s protugljivičnim djelovanjem samo na pojedine biljne štetočinje, kao što su snijeti, praškaste plijesni i pahuljaste plijesni. Ovaj novi soj *B. pumilus* dostavljen je 14. siječnja 1999. u *Agricultural Research Culture Collection* (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Ill. 61604, SAD, pod pristupnim brojem NRRL B-30087, prema odredbama

Budimpeštanskog ugovora o međunarodnom priznavanju pohrane mikroorganizama za svrhe patentnih postupaka. Soj označen kao NRRL B-21661 pohranjen je u istoj ustanovi 7. ožujka 1997. Kasnije je prepoznat kao *Bacillus subtilis*, prema *American Type Culture Collection* (ATCC).

Izum također uključuje postupke za sprječavanje i liječenje gljivičnih bolesti biljaka, uključujući i korijenje biljaka, pomoću tih sojeva bakterija, ili nadtaloga koji sadrže antibiotike, ili čistih antibiotika dobivenih od takvih sojeva bakterija. Izum također uključuje vodotopljivi protugljivični antibiotik molekularne težine manje od 10000 daltona, lagano termolabilan, pozitivno nabijen, i HPLC vrh s UV apsorbancijom s maksimumom pri 280 nm i ramenom pri 230 nm. Antibiotik nije cvitermicin A.

Daljnji aspekti izuma uključuju punu bujonsku kulturu ili nadtalog *B. pumilus* koji, kada se kombinira s *B. thuringiensis*, povećavaju insekticidno djelovanje *B. thuringiensis*. Izum također uključuje postupke za liječenje biljaka, radi suzbijanja infestacija insektima na ili u biljkama, bakterijskom suspenzijom *Bacillus* ili nadtalogom kulture *Bacillus* koji sadrži metabolit ili pročišćenim metabolitima.

Daljni aspekt izuma je neočekivani sinergistički učinak uporabe kombinacije sojeva *B. pumilus* (NRRL B-30087) i *B. subtilis* (NRRL B-21661) kao fungicida. Izum uključuje pripravke i postupke za njihovo korištenje u svojstvu fungicida.

DEFINICIJE

U značenju korištenom u specifikacijama i zahtjevima, jednina (engl. članovi "a", "an", "the"; op. prev.) uključuje i reference u množini, ukoliko iz konteksta nije vidljivo suprotno. Na primjer, izraz "stanica" uključuje i veći broj stanica, uključivo i njihove smjese.

U ovdje korištenom značenju, izraz "sadrži" znači da pripravci i postupci uključuju navedene elemente, ali ne isključujući ostale. "Sastoji se prvenstveno od", kada se koristi za definiranje pripravaka i postupaka, značit će isključivanje drugih elemenata od većeg značaja za kombinaciju. Prema tome, pripravak koji se sastoji uglavnom od elemenata kako su ovdje definirani ne isključuje zagađenje u tragovima porijeklom od postupaka izolacije i pročišćavanja i farmaceutski prihvatljivih nosača, kao što su fiziološka otopina puferirana fosfatom, konzevansi i slični. "Sastoji se od" isključuje sve što je iznad elemenata u tragovima drugih sastojaka i glavnih koraka postupka za primjenu pripravaka ovog izuma. Oblici definirani svakim od ovih prijelaznih izraza su unutar područja ovog izuma.

Izraz "izoliran" se koristi naizmjenično s "biološki čist" i znači odvojen od tvari, staničnih i drugih, s kojima je soj ili metabolit normalno povezan u prirodi.

U ovdje korištenom značenju, "biološko suzbijanje" je definirano kao suzbijanje štetočinje ili kukca uporabom drugog organizma. Poznati mehanizmi biološkog suzbijanja uključuju crijevne bakterije koje suzbijaju truljenje korijena kompeticijom s gljivama za prostor na površini korijena. Bakterijski toksini, kao što su antibiotici, korišteni su u suzbijanju štetočinja. Toksin se može izolirati i izravno primijeniti na biljku, ili se bakterijska vrsta može primijeniti tako da stvara toksin *in situ*.

Izraz "gljiva" ili "gljive" obuhvaća širok spektar organizama s jezgrom, koji nose spore, a nemaju klorofila. Primjeri gljiva uključuju kvasce, plijesni, snijeti, rđe i gljive.

Izraz "bakterija" obuhvaća svaki prokariotski organizam koji nema jasno vidljivu jezgru.

"Fungicidnost" znači sposobnost pojedine tvari da poveća odumiranje ili smanji brzinu rasta gljiva.

"Antibiotik" podrazumijeva svaku tvar koja može ubiti ili suzbiti mikroorganizam. Antibiotike mogu proizvoditi mikroorganizmi, ili se mogu dobiti sintetskim ili polusintetskim postupcima. Prema tome, izraz obuhvaća tvar koja suzbija ili ubija gljive, na primjer cvitermicin-A ili kanozamin.

"Protugljivični" obuhvaća svaku tvar koja može ubiti gljive ili spriječiti njihov rast.

Izraz "kultiviranje" označuje rast organizama na ili u medijima različitih vrsta.

"Puna bujonska kultura" označuje tekuću kulturu koja sadrži i stanice i medij.

"Nadtalog" se odnosi na tekući bujon koji preostaje kada se stanice koje su porasle u bujonu uklone centrifugiranjem, filtriranjem, sedimentiranjem ili na druge načine dobro poznate u struci.

U značenju u kojem se ovdje primjenjuje, izraz "insekti" obuhvaća sve organizme razreda *Insecta*. "Razvojni oblik" insekta se odnosi na bilo koji oblik organizma prije odraslog, zrelog oblika, a uključuje, npr., jajašca, ličinke i nimfe. "Insekticidno" se odnosi na sposobnost tvari da poveća odumiranje ili smanji brzinu rasta kukaca. "Nematicidni" se odnosi na sposobnost tvari da poveća odumiranje ili smanji brzinu rasta glista. "Pesticidni" se odnosi na sposobnost tvari da poveća odumiranje ili smanji brzinu rasta insekata, glista i crva.

"Pozitivna kontrola" označuje spoj za koji je poznato da ima pesticidno djelovanje. "Pozitivne kontrole" uključuju, ali nisu ograničene na tržišno dostupne kemijske pesticide. Izraz "negativna kontrola" označuje spoj za koji je poznato da nema pesticidno djelovanje. Primjeri negativnih kontrola su voda ili etil acetat.

Izraz "otapalo" obuhvaća svaku tekućinu koja sadrži drugu tvar u otopini. Izraz "koji se može ekstrahirati iz otapala" obuhvaća svaki spoj koji se otopi u otapalu i koji se potom može izolirati iz otapala. Primjeri otapala uključuju, bez ograničenja, organska otapala poput etil acetata.

Izraz "metabolit" odnosi se na svaki spoj, tvar ili sporedni proizvod fermentacije mikroorganizma koji ima pesticidno djelovanje. Antibiotik, prema gornjoj definiciji, je metabolit specifično aktivan protiv mikroorganizma.

"Pripravak" označuje kombinaciju aktivnog sredstva i drugog spoja ili pripravka, inertnog (na primjer, sredstvo za otkrivanje ili obilježivač) ili aktivnog, kao što je adjuvans.

"Frakcija" označuje alikvot iz testa frakcioniranja koji se koristi za razdvajanje molekula nadtaloga prema veličini, polarnosti ili naboju.

"Djelomično pročišćena frakcija" je jedan od alikvota prikupljenih u testu frakcioniranja koji ima sposobnost suzbijanja klijanja u biološkom testu ili pospješivanja B+ djelovanja protiv lepioloplausa.

"Učinkovita količina" je količina dostatna da postigne povoljne ili željene rezultate. Učinkovita količina može se primijeniti jednokratno ili višekratno. U kontekstu obrade/liječenja i zaštite, "učinkovita količina" je ona količina koja je dostatna za poboljšanje, stabiliziranje, obrat, usporavanje ili odlaganje napredovanja infestacije insektima.

Opisujemo biološki čistu kulturu soja koji ima svojstva novog soja *Bacillus sp.* koji proizvodi antibiotik, pohranjenog pod NRRL pristupnim brojem B-30087, kao i njegove mutante, koji imaju protugljivično djelovanje samo na pojedine štetočinje, a nemaju protubakterijsko djelovanje. U jednom aspektu, soj je *Bacillus pumilus* pohranjen pod NRRL pristupnim brojem B-30087, kao i njegovi mutanti.

U drugim aspektima, soj je mutant ili inačica NRRL pristupnog broja B-30087, koji ima sva svojstva (opisano u nastavku) soja pohranjenog pod NRRL pristupnim brojem B-30087. Mutant ili inačica naizmjenično se koriste u ovom opisu i dalje, a označuju posjedovanje genoma koji hibridizira, u vrlo strogim uvjetima, u genom NRRL pristupnog broja B-30087. "Hibridizacija" se odnosi na reakciju u kojoj jedna ili više polinukleotida reagira, tvoreći kompleks koji se stabilizira vodikovim vezama između baza nukleotidnih ostataka. Vodikovo vezanje može nastati Watson-Crickovim sparivanjem baza, Hoogsteinovim vezanjem ili bilo kojim drugim načinom koji je specifičan za slijed. Kompleks može predstavljati dvije uzvojnice koje tvore dvostruku strukturu, tri ili više uzvojnica koje tvore kompleks od više uzvojnica, jednu samohibridizirajuću uzvojnicu ili njihovu kombinaciju. Reakcije hibridizacije mogu se provoditi u uvjetima različite "strogoće". Općenito, hibridizacijske reakcije manje strogoće provode se na oko 40°C u 10x SSC ili otopini ekvivalentne ionske snage/temperature. Hibridizacija umjerene strogoće tipično se provodi na oko 50°C u 6 x SSC, hibridizacijska reakcija visoke strogoće se općenito provodi na oko 60°C u 1 x SSC.

Mutant ili inačica NRRL pristupnog broja B-30087 može se također definirati kao soj koji ima genomski slijed više od 85%, preporučljivo više od 90%, preporučljivije više od 95% istovjetan slijedu genoma NRRL pristupnog broja B-30087. Polinukleotid ili polinukleotidna regija (ili polipeptid, odnosno polipeptidna regija) ima određen postotak (na primjer 80%, 85%, 90% ili 95%) "istovjetnosti slijeda" s drugim slijedom znači da je, kada su poravnati, taj postotak baza (ili aminokiselina) jednak kada se uspoređuju ta dva slijeda. Ovo poravnavanje i postotak homologije ili istovjetnosti slijedova može se odrediti korištenjem softvera poznatog u struci, na primjer onog koji je opisan u *Current Protocols in Molecular Biology (FM Ausubel i sur., ur., 1987) suppl. 30, poglavlje 7.7.18, tablica 7.7.1.* Preporučljivo se za poravnavanje koriste zadane postavke. Preporučljivi program za poravnavanje je BLAST, uz zadane postavke. Osobito se preporučuju programi BLASTN i BLASTP, sa slijedećim zadanim postavkama: Genetic code=standard; filter=none; strand=both; cutoff=60; expect=10; matrix=BLOSUM62; descriptions=50 sequences; sort by=high score; databases=non-redundant, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIR. Pojedinosti o ovim programima mogu se naći na slijedećoj internet adresi: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST.

Ovaj izum nadalje opisuje nadtaloge dobivene iz gore spomenutih kultura. Nadtalog se može dobiti postupcima koji su dobro poznati u struci, uključujući centrifugiranje, filtriranje, taloženje i druge.

U slijedećem aspektu, izum obuhvaća izolirani metabolit koji je vodotopljivi protugljivični antibiotik. Metabolit se izolira iz gore opisanih sojeva ovog izuma. Kemijska svojstva su mu slijedeća: manji je od 10000 daltona, UV apsorpcijski vrh mu je na 280 nm, a rame na 230 nm, stabilan je u kiselini i lužini, lagano termolabilan iznad 80°C, pozitivnog naboja i djeluje na određene biljne štetočinje, ali nema učinka na bakterije. Ovaj izum nadalje opisuje postupak za proizvodnju tog metabolita, s time da taj postupak obuhvaća uzgoj soja ovog izuma i izoliranje aktivnog metabolita pomoću dolje opisanih postupaka.

Daljnji aspekt izuma je djelomično pročišćena aktivna frakcija NRRL pristupni br. B-30087 koja ima fungicidno djelovanje. Aktivna frakcija nije istovjetna cvitermicinu A.

Ovaj izum nadalje opisuje pripravke koji sadrže bilo koji od gornjih sojeva (uključujući njihove mutante i inačice), nadtaloge, frakcije i metabolite, same ili u kombinaciji jednih s drugima, te nosač. Ovi pripravci mogu se nadalje opremiti dodavanjem najmanje jednog kemijskog ili biološkog pesticida. Ovi pripravci mogu biti u obliku različitih formulacija, koje uključuju, bez ograničenja, ovlaživi prašak, formulaciju u zrncima, vodenu suspenziju i emulzibilni koncentrat ili mikroinkapsulat.

U svrhu postizanja dobrog raspršivanja i prianjanja pripravaka ovog izuma, može biti zgodno formulirati punu bujonsku kulturu, nadtalog, frakciju i/ili metabolit/antibiotik sa sastojcima koji pomažu raspršivanje i adheziju. Prema tome, prikladne će formulacije biti poznate upućenima u struku (ovlaživi prašci, zrnca i slično, ili mogu biti mikroinkapsulirani u prikladnom mediju i sličnom, tekućinama kao što su vodene tekućine i vodene suspenzije, te emulzibilni koncentrati). Druge prikladne formulacije bit će poznate upućenima u struku.

Bilo koji od gore spomenutih sojeva, metabolita, frakcija, nadtaloga i pripravaka koji sadrže ove aktivne sastojke može se koristiti za stvaranje postupka za liječenje ili zaštitu biljaka, korijena ili plodova od gljivičnih infekcija. Postupak obuhvaća primjenu učinkovite količine soja, metabolita, frakcije, nadtaloga ili pripravaka koji sadrže ove aktivne sastojke, samostalno ili u međusobnoj kombinaciji, i/ili drugi biološki ili kemijski pesticid, na inficirani korijen, biljku ili plod. Učinkovite količine ovih pripravaka također se mogu primjenjivati na biljku, korijen ili plod u svrhu sprječavanja takvih infekcija.

U daljnjem aspektu, izum obuhvaća postupak za liječenje ili zaštitu biljaka, korijena ili plodova od gljivičnih bolesti, koji obuhvaća primjenu učinkovite količine antibiotika kojeg je proizveo soj, ili njegove inačice, a koji svi imaju svojstva novog soja *Bacillus sp.* NRRL pristupni broj B-30087. U jednom obliku, soj je *Bacillus sp.* NRRL pristupni broj B-30087.

Ovaj izum dalje opisuje vodotopljivi spoj koji povećava insekticidno djelovanje *Bacillus thuringiensis*, pri čemu spoj ima molekulsku težinu manju od 10000 daltona i spoj nije cvitermicin A. Spoj nije beta egzotoksin niti drugi egzotoksin koji proizvodi *Bacillus thuringiensis*.

Spoj se izolira anionskom izmjenjivačkom smolom, precipitacijom s acetonitrilom i kromatografijom s isključivanjem po veličini (SEC, size exclusion chromatography). Ovaj izum također opisuje djelomično pročišćenu frakciju nadtaloga *Bacillus* koji sadrži novi spoj. Novi spoj i aktivna frakcija mogu se izolirati od *Bacillus* sojeva odabranih iz skupine *Bacillus spp.*, uključujući bez ograničenja *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. mycoides* i *B. pumilus*.

Djelomično pročišćena aktivna frakcija može se otkriti po svom ^{1}H NMR (ili protonskom NMR) spektru, koji omogućuje stručnjaku da ustanovi je li spoj potpuno pročišćen. Kada je spoj čist, vrh koji predstavlja jedan proton uklopit će se u arbitrarnu vrijednost jedan. Vrhovi koji predstavljaju dva protona, na primjer metilenska skupina, uklopit će se u vrijednost dva. Vrhovi koji predstavljaju tri protona, na primjer metilna skupina, uklopit će se u vrijednost tri. Ovo je slučaj na Slici 3, s čistim cvitermicinom A kao standardom. Međutim, ^{1}H NMR spektar aktivnog djelomično pročišćenog *Bacillus thuringiensis* pospješivača ima skupinu vrhova koja se uklapa u manje od jedan, te stoga pripada spoju različitom od većih vrhova u spektru.

Izolirano, spoj ne pokazuje insekticidno djelovanje. Kombinacija s *Bacillus thuringiensis* pospješuje insekticidni učinak *Bacillus thuringiensis* kada se primijeni na biljke i korijene biljaka. *Bacillus thuringiensis* može biti u obliku mikrobnog soja, tržišnog proizvoda, inženjeringom uzgojene biljke, insekticidno aktivnog metabolita, insekticidno aktivnog nadtaloga ili delta endotoksina.

Bacillus thuringiensis je gram-pozitivna, sporogena bakterija svojstvena po paraspornim kristalnim proteinskim inkluzijama. Proteini mogu imati visoku toksičnost za štetočinje i mogu biti specifični u svojoj toksičnoj aktivnosti. U značenju iz donjih zahtjeva, izraz "*Bacillus thuringiensis*" uključuje mikrobne sojeve, tržišne proizvode koji sadrže te sojeve ili izolate koji sadrže aktivne metabolite ili frakcije izolirane iz sojeva, genetički izmijenjene ili inženjeringom dobivene biljke koje eksprimiraju gen koji kodira *Bacillus thuringiensis* insekticidni protein, genski proizvod ili delta endotoksin. Toksinski geni su izolirani i sekvencionirani, a proizvodi na osnovi rekombinantne DNA *Bacillus thuringiensis* su pripravljeni i odobreni za uporabu. Tehnike genetičkog inženjerstva i novi pristupi za dostavljanje tih *Bacillus thuringiensis* endotoksina u poljoprivredna okruženja su u fazi razvoja i proizvodnje za tržište. Ovo uključuje uporabu biljaka genetičkim inženjeringom izmijenjenih s genima endotoksina za otpornost na štetočinje, kao i uporabu stabiliziranih netaknutih mikrobnih stanica kao nositelja za dostavu *Bacillus thuringiensis* endotoksina (*Gaertner i sur., (1988) TIBTECH 6:S4-S7*). *Bacillus thuringiensis* može se učiniti dostupnim za ciljne štetočinjee izlaganjem ciljnih štetočinja divljem tipu *Bacillus thuringiensis*, koji se prirodno javlja u toksinu. Alternativno, gen koji kodira željeni toksin može se pretvoriti i eksprimirati u prikladnom rekombinantnom domaćinu. Ulomci *Bacillus thuringiensis* toksina koji zadržavaju insekticidno djelovanje također se mogu koristiti.

Slijedeći SAD patenti opisuju pesticidne izolate *Bacillus thuringiensis* ili rekombinantnih mikroba koji eksprimiraju *Bacillus thuringiensis* toksin: SAD patenti br. 5006335, 5106620, 5045469, 5135867, 4990332, 5164180, 5126133, 5093119, 5208017, 5186934, 5185148, 5211946, 4948734, 4849217, 4996155, 4999192, 4966765, 5073632, 5196342, 5063055, 5080897, 5024837, 5147640, 5173409 i 5186934.

Priprava spora i kristala *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki godinama su korištene kao komercijalni insekticidi za lepidopterne štetočinje. Na primjer, *Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD-1* proizvodi kristale nazvane delta endotoksin, koji je toksičan za ličinke brojnih lepidopteranskih kukaca. I druge vrste *Bacillus thuringiensis*, i to *israelensis* i *tenebrionis*, koriste se na tržištu za suzbijanje kukaca.

Kloniranje i ekspresija *Bacillus thuringiensis* kristalnog proteinskog gena u *Escherichia coli* opisano je u *Schnepf H i sur. (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78:2893-2897*. SAD patent 4448885 i SAD patent 4467036 opisuju ekspresiju kristalnog proteina u *E. coli*. Proizveden je hibrid *Bacillus thuringiensis* gena kristalnog proteina koji pokazuje povećanu toksičnost, kao i proširen raspon domaćina na ciljne štetočinje. Vidi SAD patente br. 5128130 i 5055294. SAD patenti br. 4797276 i 4853331 opisuju *Bacillus thuringiensis* soj *San Diego* (a.k.a. B.t. tenebrionis, a.k.a. M-7) koji se može koristiti za suzbijanje koleopternih štetočinja u različitim okruženjima. SAD patent br. 4918006 opisuje *Bacillus thuringiensis* koji djeluje protiv dvokrilaca. SAD patent br. 4849217 opisuje *Bacillus thuringiensis* izolate koji djeluju protiv žiška lucerne. SAD patent br. 5151363 i SAD patent br. 4948734 opisuje pojedine izolate *Bacillus thuringiensis* koji djeluju protiv glista.

Kulture *Bacillus thuringiensis* također su dostupne kod *SAD Zavodu za poljoprivredu (Department of Agriculture,* USDA) u Brownsvilleu, TX. Zahtjeve treba uputiti na USDA, ARS, Cotton Insects Research Unit, P.O. Box 1033, Brownsville, TX 78520 USA; ili na Northern Research Laboratory, US Department of Agriculture, 1815 North University Street, Peoria, IL, USA.

Prema tome, spoj i aktivna frakcija pospješuju insekticidno djelovanje *Bacillus thuringiensis* protiv kukaca, uključujući, bez ograničenja, gliste, muhe, gusjenice sovice, crve, krumpirove zlatice Kolorada i crva kukuruznog korijena.

Kao što je stručnjacima dobro poznato, aktivni sastojak se može primijeniti u obliku pripravka. Prema tome, ovaj izum opisuje i pripravak koji obuhvaća novi spoj i nosač, poput otapala ili poljoprivredno prikladnog nosača. U daljnjem obliku, pripravak dalje uključuje učinkovitu količinu *Bacillus thuringiensis*, kao što je gore opisano. U slijedećem daljnjem obliku, pripravak uključuje najmanje jedan kemijski ili biološki pesticid kakav se rutinski primjenjuje u struci. U svrhu postizanja dobrog raspršivanja i adhezije pripravaka unutar ovog izuma, može biti prikladno pripraviti punu bujonsku kulturu, nadtalog i/ili metabolit sa sastojcima koji pridonose raspršivanju i adheziji. Za lakšu primjenu na biljke i biljne korijene, formulacije se mogu oblikovati kao formulacije odabrane iz skupine koja se sastoji od ovlažívog praška, vodene suspenzije, emulzibilnog koncentrata i mikroinkapsulirane formulacije.

Novi spoj, aktivna frakcija ili pripravci koji ih sadrže mogu se koristiti za pospješivanje insekticidnog djelovanja *Bacillus thuringiensis*. Prema tome, izum opisuje i postupak za pospješivanje insekticidnog djelovanja *Bacillus thuringiensis* kombiniranjem količine novog spoja učinkovite za pospješivanje, aktivne frakcije ili pripravka koji ga sadrži, s *Bacillus thuringiensis*. U daljnjem aspektu, učinkovita količina najmanje jednog biopesticida ili kemijskog pesticida se dodaje formulaciji.

Izum dalje obuhvaća uporabu novog spoja, NRRL pristupnog broja B-30087 u kombinaciji s NRRL pristupnim brojem B-21661, primijenjenom kao puna bujonska kultura, na biljku, korijen ili plod, u ulozi fungicida, s time da spomenuti fungicid ima snažniji učinak kao rezultat neočekivanog sinergističkog učinka kombinacije spojeva. Preporučljivije,

kombinacija se primjenjuje u omjeru 1:2 (B-21661:B-30087) na *Botrytis cinerea* ili *Peronospora parasitica*. Još preporučljivije, kombinacija se primjenjuje na *Botrytis cinerea* ili *Peronospora parasitica* u omjeru 1:4. U slijedećem daljnjem obliku, pripravak uključuje najmanje jedan kemijski ili biološki pesticid kakav se rutinski primjenjuje u struci. U svrhu postizanja dobrog raspršivanja i adhezije pripravaka unutar ovog izuma, može biti prikladno pripraviti punu bujonsku kulturu, nadtalog i/ili metabolit sa sastojcima koji pridonose raspršivanju i adheziji. Za lakšu primjenu na biljke i biljne korijene, formulacije se mogu oblikovati kao formulacije odabrane iz skupine koja se sastoji od ovlažívog praška, vodene suspenzije, emulzibilnog koncentrata i mikroinkapsulirane formulacije.

U ovom se opisu citatima poziva na pojedinosti iz brojnih objava, patenata i objavljenih patenata. Opisi pojedinosti iz tih objava, patenata i objavljenih patenata uključene su u ovaj opis kao reference, radi cjelovitijeg prikaza stanja u struci na koju se izum odnosi.

PRIMJERI

Slijedeći primjeri namijenjeni su ilustriranju, ali ne ograničavaju izum.

Primjer 1
Karakteriziranje soja NRRL pristupni br. B-30087

NRRL pristupni br. B-30087 identificiran je prema staničnim masnim kiselinama cijele stanice, deriviranima do metil estera FAME (*Miller, LT (1982) "Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole cell wall fatty acid methyl esters, including hydroxy acids" J Clin Microbiol 16:584-586*) i analiziranima plinskom kromatografijom pomoću MIDI sustava (Microbial Identification System, Inc., Newark, DE). Postupak i protokoli korišteni za uzgoj bakterijskih kultura i specifikacije instrumenata opisani su u MIDI (identificiranje bakterija plinskom kromatografijom staničnih masnih kiselina. Tehnička uputa #101. MIDI, Inc., 115 Barksdale Professional Center, Newark, DE). Izolati se uzgoje na TSA (BBL) pločama na 28°C tijekom 24 h i stanice se prikupe. Jedan mL metanolske NaOH (15% [mas/vol] NaOH u 50% [vol/vol] metanolu) se doda i stanice se saponificiraju na 100°C 30 minuta. Esterificiranje masnih kiselina se provede s 2 mL 3.25 N HCl u 46%-tnom (vol/vol) metanolu na 80°C tijekom 10 minuta. FAME se ekstrahiraju u 1.25 mL 1:1 (vol/vol) metil-terc-butil eter-heksana i organski ekstrakt se ispire s 3 mL 1.2% (mas/vol) NaOH prije analize plinskom kromatografijom. Plinski kromatograf (Hewlett-Packard 5890A) je opremljen s plamenim ionizirajućim detektorom i kapilarnim stupcem (Hewlett-Packard 19091B-102, križno vezan 5%-tni fenil metil silikon; 25 m x 0.22 mm ID; debljina filma, 0.33 μm; omjer faza 150) s vodikom kao nosećim plinom. Hewlett-Packard 3392 integrator automatski integrira FAME vrhove i bakterijske izolate nazvane pomoću MIDI Microbial Identification Software (Sherlock TSBA Library verzija 3.80). FAME profil *Xanthomonas maltophila* ATCC 13637 korišten je kao referentna provjera za MIDI određivanje.

Rezultati triju odvojenih "tura" MIDI profila identificirali su NRRL pristupni broj B-30087 kao *Bacillus pumilus* sa sličnim indeks zbrojem od 0.875.

Primjer 2
Djelovanje NRRL pristupnog broja B-30087 protiv biljnih štetočinja u kulturi *in vitro* (zonski test)

Za ispitivanje djelovanja NRRL pristupnog broja B-30087 protiv širokog raspona biljnih patogenih gljiva, proveden je slijedeći pokus, sa ovim biljnim štetočinjama: *Botrytis cinerea, Alternaria brassicicola, Colletotrichum acutatum, Cladosporium carophylum, Monilinia fructicola, Venturia inaequalis, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum, Fusarium oxysporum, Taphrina deformans* i *Verticillium dahliae.*

Za ispitivanje djelovanja NRRL pristupnog broja B-30087 u testu difuzije u agaru (zonski test), spore biljne štetočinje (spore se postružu s površine petrijevih ploča i razrijede do približno 1 x 10^5 spora/mL (ovisno o štetočinji)) se rasiju preko površine krumpirovog dekstroznog agara u 10 cm petrijevim posudama. Za *Rhizoctonia solani i Sclerotinia sclerotiorum,* na ploče se umjesto spora rasiju micelijski ulomci. Kružne jamice od približno 7.0 mm se uklone s agara i uzorak od 125 μL nadtaloga NRRL pristupnog broja B-30087, uzgojenog u sojinom mediju s ekstraktom plijesni u 250 mL posudama za protresanje, tijekom 72 h, se stavi u jamicu.

Nadtalog se pripravi centrifugiranjem na 12000 okr/min, tijekom 10 minuta. Tipični rezultati mogu se sastojati od zone bez rasta i/ili sa smanjenim rastom štetočinje oko jamice ili zona uopće ne postoji. Ukoliko je zona postojala, njezina veličina u milimetrima mjerena je i zabilježena. Rezultati su prikazani u Tablici 1 koja slijedi.

Tablica 1

***In vitro* test NRRL pristupnog broja B-30087 protiv gljivičnih biljnih štetočinja**

Alternaria brassicicola	nema zone
Botrytis cinerea	nema zone
Cladosporium carpohilum	nema zone
Colletotrichum acutatum	nema zone
Fusarium oxysporum	nema zone
Monilinia fructicola	nema zone
Rhizoctonia solani	nema zone
Sclerotinia sclerotiorum	nema zone
Taphrina deformans	nema zone
Venturia inaequalis	nema zone
Verticillium dahliae	nema zone
Pythium sp.	nema zone
Phytophthora infestans	slabo djelovanje (mala, zamućena zona)
Phytophthora capsici	nema zone
Didimella bryonia	nema zone

Nadtalog NRRL pristupnog broja B-30087 nije pokazao djelovanje protiv većine gljivičnih biljnih štetočinja u zonskom testu.

Primjer 3
Djelovanje NRRL pristupnog broja B-30087 protiv bakterijskih biljnih štetočinja

Standardni agarski difuzijski test postavi se kao u Primjeru 2. Sloj svakog bakterijskog štetočinje se prošire preko površine dekstroznog agara krumpira. Uzorak od 125 µL i nadtalog NRRL pristupnog broja B-30087 se stavi u svaku jamicu, kako je prethodno opisano. Nazočnost zone ili veličina zone se mjeri u milimetrima.

Tablica 2
***In vitro* inhibiranje bakterijskih biljnih štetočinja (zonski test)**

NRRL br. B-30087, nadtalog	zona inhibicije (mm)
Pseudomonas syringae pv. Tomato	nema zone
Xanthomonacampestris pv. Campestris	nema zone
Erwinia carotovora subsp. Carotovora	nema zone

NRRL pristupni broj B-30087 nije pokazao djelovanje niti protiv jedne vrste bakterijskih biljnih štetočinja u ispitivanju *in vitro*.

Primjer 4
Djelovanje NRRL pristupnog broja B-30087 protiv biljnih štetočinja u biljnom testu

Ispitano je djelovanje NRRL pristupnog broja B-30087 protiv snijeti graha, *Uromyces phaseoli* na snap grahu i sive plijesni, *Botrytis cinerea*, na biljci papra, *Alternaria solani* na biljci rajčice, pahuljaste plijesni zelene salate, *Bremia lactucae*; pahuljaste plijesni *Brassica*, *Peronospora parasitica*, kasne snijeti rajčice, *Phytophthora infestans*, i praškaste plijesni vinove loze, *Uncinula necator*.

Alternaria solani
Štetočinja, *Alternaria solani*, uzgojen je na standardnoj petrijevoj posudi (10 cm) s PDA. Kolonije gljiva su odrezane s ploče i stavljene na medij za sporulaciju (20 g saharoze, 30 g kalcij karbonata i 20 g agara po litri sterilne vode). Sterilna voda se doda na ploču da djelomično prekrije micelijske blokove i ploče se inkubiraju na 22-26°C s četrnaestosatnim razdobljima svjetlosti tijekom dva dana. Spore se prikupe struganjem micelijskih blokova u posudu sterilne vode. Suspenzija spora se podesi na 2 x 10^4 spora/mL).

Sadnice rajčice (UC82-B), u stadiju s 3-4 lista se zasade u lonce od dva palca i smještene na podlogu, se prskaju umjetničkim zračnim kistom, do pojave slijevanja tekućine, s NRRL pristupnim brojem B-30087 punim bujonom uzgojenim u sojinom brašnu, medijem ekstrakta plijesni, tijekom 72 h u posudama za protresanje volumena 250 mL. Nakon prskanja, sadnice se ostave sušiti najmanje dva sata. Inokulirane sadnice se smjeste u Percivalovu vlažnu komoru na 22°C bez osvjetljenja prvih 40 sati. Biljke na svakoj podlozi pokriju se s plastičnim pokrovom i drže na 20-22°C 48 sati u Percivalovom inkubatoru s četrnaestosatnim razdobljima svjetlosti. Voda bez NRRL pristupnog broja B-30087 sa i bez spora štetočinje je korištena kao negativna kontrola i pozitivna kontrola štetočinje. Također, kemijski fungicid (na pr. azoksistrobin, Abound®) se koristi za usporedbu pri brzinama od 100 do 250 ppm. Biljke se boduju

prema ljestvici od 0 do 5, pri čemu 5 označuje 100%-tnu inficiranost, a 0 označuje na nema vidljivih znakova. Na vodenoj kontroli *A. solani*, javila su se jednolika oštećenja po svim listovima, a kotiledoni su bili odvojeni i jako inficirani (ocjena 5 = potpuna infekcija, nema kontrole). Biljke liječene s NRRL pristupnim brojem B-30087 nisu se razlikovale od vodene kontrole. Nije bilo kontrole štetočinje prema NRRL pristupnom broju B-30087 (također ocjena 5). Negativna kontrola nije bila inficirana. Kemijski liječene biljke imale su zbroj između 0 i 1.

Botrytis cinerea

Štetočinja, *Botrytis cinerea*, uzgoji se na standardnoj petrijevoj ploči (10 cm) s PDA i spore se prikupe pomoću krumpirovog dekstroznog bujona (PDB) obogaćenog sa sladom (0.5 g/L) i ekstraktom plijesni (0.5 g/L) i podese na 1x106 spora/mL. Korištena je biljka papra (Yolo Wonder) uzgojena u loncima od 2 palca, do stadija s 3-5 pravih listova. Prijava NRRL pristupnog broja B-30087 i patogen su bili isti kao gore. Pladnjevi s loncima inkubirani su na stalnoj temperaturi od 20°C bez osvjetljenja. Prekriveni su plastičnim poklopcima i ostavljeni 2.5 dana (60 do 65 sati) do bodovanja.

Kemijski fungicid (na pr. Iprodion, Rovral®) se koristi za poredbu, u koncentracijama od 20 do 100 ppm. Biljke su bodovane na ljestvici od 0 do 5, pri čemu je 5 100%-tna infekcija, a 0 je odsutnost znakova infekcije. Na vodenoj kontroli *B. cinerea*, bila su prisutna jednaka oštećenja po svim listovima (ocjena 5 = potpuna infekcija, nema kontrole). Biljke tretirane s NRRL pristupnim brojem B-30087 nisu izgledale različito od vodene kontrole. Nije bilo kontrole štetočinje s NRRL pristupnim brojem B-30087 (također ocjena 5). Negativna kontrola nije bila zaražena. Kemijski tretirane biljke imale su zbroj između 0 i 1.

Bremia lactucae

Za test s bremijom, sjemenke zelene salate su posađene u sloj sterilizirane smjese za uzgoj koja sadrži treset, perlit i vermikulit, u malim prozirnim plastičnim kutijama za biljke, pravokutnog oblika, visine i širine 8 cm. Tjedan dana nakon usađivanja, sadnice zelene salate su prašene s uzorkom bujona ili nadtaloga NRRL pristupnog broja B-30087. Biljke se ostave da se osuše, a zatim se po njima prska suspenzija spora pahuljaste plijesni dobivena s inficiranih sadnica salate (2 x 10^4 spora/mL). Primijene se i kemijski standardi koji se sastoje od Aliette-a (fosetil-al) i Ridomil-a (metalaksil). Međutim, ranije je pokazano kako je izolat *Bremia lactucae* koji je korišten u ovim testovima neosjetljiv na ova dva kemijska standarda koja se koriste na tržištu. Plastične kutije se pokriju poklopcima koji čvrsto prianjaju, te se inkubiraju na 15-16°C u Percival inkubatoru tijekom 16 sati bez osvjetljenja. Plastične kutije se zatim stave na sobnu temperaturu (20-26°C) u svjetlu, tijekom šest dana. Sadnice se otkriju, poprskaju s vodom, osuše i vrate u inkubator na 15-16°C da bi preko noći došlo do sporulacije. Učinak NRRL pristupnog broja B-30087 protiv kemijski otpornog soja pahuljaste plijesni zelene salate prikazan je na Tablici 3, dolje.

Tablica 3

		zbroj	
	Set 1	Set 2	Set 3
NRRL br. B-30087 uzorak 1	0.0	1.0	1.0
NRRL br. B-30087 uzorak 2	1.0	1.0	0.0
Aliette 240 ppm	5.0	3.0	--
Ridomil 125 ppm	3.0	3.0	--
vodena kontrola	5.0	5.0	5.0

NRRL pristupni broj B-30087 pokazao je izvrsno djelovanje protiv pahuljaste plijesni zelene salate, uz malo ili ništa sporulacije patogena na sadnicama, pri čemu su kontrolne biljke (vodena kontrola) bile potpuno sporulirane pahuljastom plijesni. Kemijski standardi nisu učinkovito suzbili štetočinju.

Peronospora parasitica

Soj *Bacillus* NRRL pristupni broj B-30087 uzgojen je kao gore, u posudama za protresanje od 250 mL. Puna bujonska kultura jačine 1x se prska na cvjetaču ili prokulicu starosti jedan tjedan, u punom stadiju kotiledona, s umjetničkim zračnim kistom koji se pokreće stlačenim zrakom. Tri kompleta (seta) od 15-25 sadnica po loncu se prska po jednoj obradi. Suspenzija spora pahuljaste plijesni, *Peronospora parasitica*, i to 1-5 x 10^4 spora/mL se prska na *Brassica* biljke nakon prve primjene NRRL pristupnog broja B-30087. Primijene se i kemijski standardi koji se sastoje od Aliette-a (fosetil-al) i Ridomil-a (metalaksil). Međutim, ranije je pokazano kako je izolat *Peronospora parasitica* koji je korišten u ovim testovima neosjetljiv na ova dva kemijska standarda koja se koriste na tržištu.

Biljke se drže na 15-17°C tijekom 16 sati radi infekcije, potom se sadnice inkubiraju na 20-24°C tijekom šest dana. Lonci se vrate na 15-17°C preko noći, kako bi došlo do sporulacije štetočinja. Svaka se biljka boduje određivanjem postotka suzbijenosti bolesti na ljestvici od 0 do 5. Ocjena 0 je biljka bez oštećenja od sporulacije. Rezultati uprosječeni po kompletima lonaca prikazani su na Tablici 4 koja slijedi.

Tablica 4

	zbroj		
	Set 1	Set 2	Set 3
NRRL br. B-30087 uzorak 1	0.5	1.0	0.5
NRRL br. B-30087 uzorak 2	0.5	0.5	1.0
Aliette 240 ppm	5.0	3.0	--
Ridomil 125 ppm	4.0	4.0	4.0
vodena kontrola	5.0	3.0	5.0

NRRL pristupni broj B-30087 suzbio je *Brassica* pahuljastu plijesan s više učinka u usporedbi s netretiranom kontrolom i kemijskim standardima.

Uncinula necator

Sadnice vinove loze (Chardonnay) uzgojene su u loncima od dva palca, do stadija od 6-9 pravih listova. Kultura praškaste plijesni održana je na sadnicama vinove loze na 22-26°C u razdoblju svjetlosti od 14 sati. Uklonjeni su svi listovi osim 2-4 najmlađa. NRRL pristupni broj B-30087, kemijski fungicid (Rally®, miklobutanil, 25 ppm) i vodena kontrola primijenjeni su do slijevanja na gore opisani način za druge testirane štetočinje. Za svaku je obradu korišteno četiri do pet kompleta. Za inokuliranje praškaste plijesni, listovi s plijesni na sadnici za održavanje su uklonjeni škarama i svaka je biljka inokulirana pojedinačno. Površina sadnice za održavanje je nježno očetkana kistom, tako da se spore odlože na gornju površinu ispitivanih biljaka. Postupak je proveden pomoću osvijetljenog povećala s lećom jačine 3x, kako bi se osiguralo da sve biljke dobiju jednaki inokulum. Pladnjevi s loncima stavljeni su u mrak tijekom 16-24 sata, na 20-24°C. Pladnjevi su držani na 22-26°C s razdobljima svjetlosti od 14 sati, dodatnih 9-11 dana, do očitavanja testa. Kao i gore, biljkama su dane ocjene od 0 do 5. Rezultat dobiven korištenjem NRRL pristupnog broja B-30087 je prikazan dolje, na Tablici 5.

Tablica 5

	zbroj			
	Set 1	Set 2	Set 3	Set 4
NRRL br. B-30087	0.5	0.0	1.0	1.0
Rally 25 ppm	0.0	0.0	0.0	0.0
vodena kontrola	5.0	5.0	3.0	4.0

NRRL pristupni broj B-30087 učinkovito je suzbio *Uncinula* pahuljastu plijesan u usporedbi s netretiranom kontrolom i gotovo tako uspješno kao kemijski standard, Rally.

Phytophthora infestans

Ispitivanje kasne snijeti rajčice, *P. infestans*, provede se uporabom sadnica rajčice (UC82-B) u stadiju rasta s 4-6 pravih listova, u plastičnim dvopalačnim pravokutnim loncima. Primjene NRRL pristupnog broja B-30087, uzgojene na prethodno opisani način,vršene su na sadnice rajčice. Inokulum *P. infestans* dobiven je struganjem sporulacijske kolonije izrasle na agaru s ražinim sjemenkama, uz podešavanje koncentracije inokuluma na između 0.7 i 1.0 x 10^4 sporangija/mL. Inokulirane sadnice smještene su u posude i inkubirane točno kako je opisano u testu *A. solani*. Sadnice su ocijenjene na ljestvici od 0-5. Quadris® (azoksistrobin) je korišten za usporedbu, u koncentracijama od 62.5 do 125 ppm. Rezultat dobiven uporabom NRRL pristupnog broja B-30087 prikazan je u nastavku, na Tablici 6.

Tablica 6

			zbroj		
	Set 1	Set 2	Set 3	Set 4	Set 5
NRRL br. B-30087	2.0	1.5	1.5	0.5	2.0
Quadris 125 ppm	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Quadris 62.5 ppm	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0
vodena kontrola	5.0	5.0	4.0	4.0	5.0

NRRL pristupni broj B-30087 suzbio je kasnu snijet gotovo jednako uspješno kao kemijski standard, Quadris, nakon četiri dana inkubacije.

Uromyces phaseoli

Test sa snijeti graha, *U. phaseoli*, proveden je pomoću snap sadnica graha (sorta dobavljača) dok su prvi primarni listovi bili rašireni za 3/4. Primjena NRRL pristupnog broja B-30087 provedena je na način prethodno opisan za druge kombinacije domaćin/štetočinja. Inokulum snijeti-štetočinje pohranjen je u obliku suhih spora snijeti, u ampulama na -20°C. Inokulum je pripravljen dodavanjem suhih spora snijeti u vodu s 0.01% Tween 20 i energičnim miješanjem na magnetskom miješalu tijekom najmanje sat vremena. Inokulum se podesi na 2-4 x 10^5 spora/mL. Primarni listovi se inokuliraju i sadnice se smjeste na pladnjeve i inkubiraju preko noći na 20°C u Percivalovoj vlažnoj komori. Sadnice se zatim inkubiraju na sobnoj temperaturi (20-26°C) dodatnih 8-10 dana. Sadnice se ocijene na ljestvici od 0 do 5, temeljem pojavnosti i težine nazočnih sporulirajućih pustula snijeti.

Kemijski fungicid, Break® (propikonazol) se koristio za poredbu, pri koncentraciji od 40 ppm. Rezultat, uz uporabu punog bujona NRRL pristupnog broja B-30087 je prikazan na Tablici 7 u nastavku.

Tablica 7

	zbroj		
	Set 1	Set 2	Set 3
NRRL br. B-30087	0.5	0.5	0.0
Break® 40 ppm	0.0	0.0	0.5
vodena kontrola	5.0	5.0	5.0

NRRL pristupni broj B-30087 suzbio je snijet graha gotovo jednako uspješno kao kemijski standard, Break®.

Primjer 5

Protugljivični metabolit koji proizvodi NRRL pristupni broj B-30087

Puni bujon NRRL pristupnog broja B-30087 se razdijeli između etil acetatne, butanolske i vodene frakcije. Svaka frakcija se ispita protiv snijeti zijevalice u testu klijanja spora. Spore snijeti zijevalice kliju u nazočnosti svakog uzorka u mikroskopskim stakalcima s udubinom, koja sadrži 40 μL uzorka i 20 μL patogenih spora. Približno 16 h kasnije, spore se promatraju mikroskopom i gleda se jesu li proklijale. Izostanak klijanja (bodovi 0) u usporedbi s vodenom kontrolom (100%-tno klijanje i rast = zbroj 5) upućuje na aktivnost ispitivanog uzorka. Rezultati testa klijanja snijeti s

različitim frakcijama NRRL pristupnog broja B-30087 prikazani su dolje (zbroj bodovanjem od 0 do 5, kao gore), na Tablici 8.

Tablica 8

	zbroj		
	Set 1	Set 2	Set 3
etil acetat	5.0	2.0	3.0
n-butanol	3.0	5.0	3.0
voda	0.0	0.0	0.0
puni bujon	0.0	0.0	0.0
vodena kontrola	4.0	5.0	5.0

Metabolit je u cijelosti u vodotopljivoj frakciji i nije ga lako ekstrahirati u butanol ili etil acetat.

Određena su druga svojstva metabolita. Pokazalo se kako molekula prolazi kroz filter čija je granična vrijednost molekulska težina 10000, što upućuje da je metabolit manji od 10000 daltona. Aktivnost se ne gubi nakon obrade s proteazama, niti nakon obrade s kiselinom ili bazom. Djelovanje je lagano smanjeno nakon sat vremena grijanja na 80°C (zbroj bodova protiv snijeti zijevalice porastao je s 0 na 1.5). Djelovanje se apsorbira na kationsku smolu, ali ne i na anionsku smolu (metabolit je pozitivno nabijen).

Primjer 6

Djelomično pročišćavanje fungicidne frakcije NRRL pristupnog broja B-30087

Puna bujonska kultura NRRL pristupnog broja B-30087 (850 mL) se centrifugira na 4200 okr/min., 15 minuta, i prikupi se nadtalog. Nadtalogu se doda aktivirani ugljik (30 g) i dobro se protresa prije centrifugiranja na 11500 okr/min., 20 minuta. Nadtalog se suši na kružnom isparivaču, potom se ponovno otopi u 15 mL vode. Uzorak se zatim dalje pročisti kromatografijom s isključivanjem prema veličini (SEC), kako bi se komponente odvojile prema molekulskoj težini.

P-2 smola (130 g, BioRad) se nabubri s milliQ deioniziranom vodom i oblažu se stupci veličine 2.5 cm x 80 cm. Petnaest mL koncentrata se nanese na P-2 stupac, stupac se ispire vodom pomoću sile teže i prikupe se frakcije od 10 mL. Parametri za P-2 stupac: raspon − 2, nm − 226nm, 16 mv.

Isprane frakcije se testiraju pomoću testa na klijanje snijeti zijevalice, opisanom u Primjeru 5. Za frakcije 18-24 je nađeno da potpuno inhibiraju klijanje. Ove frakcije se pomiješaju i suše na kružnom isparivaču, zatim se ponovno otope u 8 mL vode i filtriraju kroz filter od 0.2 μm. Ovo se puni na drugi P-2 stupac i provede se gore opisani postupak, s iznimkom što se prikupljaju frakcije od 7 mL.

Za frakcije 29-38 je nađeno da sprječavaju klijanje u biološkom testu. Ove se frakcije osuše i potom ponovno otope u vodi. Mali alikvot (5 mg) se dalje izdvoji pomoću HPLC, uporabom amino stupca (4.6 mm x 15 cm, 5 μm, 100 angstrema). Stupac se uravnoteži u 0.01 M KH_2PO_4 i gradijent se mijenja od 4% do 44% acetonitril/0.01 M KH_2PO_4 tijekom 30 minuta, 1 mL/min., uz UV detekciju na 200 nm.

Prikupe se tri vrha, prvi vrh se odsoli na HPLC stupcu s isključivanjem prema veličini (Toso Haas, G1000 PW, 7.5mm x 30 cm, 10 μm), ispire s vodom pri 1 mL/min. i detektira pomoću UV na 200 nm. Jedan vrh se prikupi iz stupca za isključivanje prema veličini i za njega je nađeno da je aktivan u testu klijanja. ^1H NMR spektar se bilježi na 400 MHz u D_2O ove polučiste aktivne tvari, kao što je prikazano na Slici 1.

Primjer 7

Kemijska svojstva fungicidnog sastojka su različita od cvitermicina A

Pokazalo se kako je fungicidna aktivna frakcija ovog izuma različita od cvitermicina A na kapilarnoj elektroforezi. Puni bujon NRRL pristupnog broja B-30087 se uzgoji u mediju s *Bacillus* kulturom koji sadrži sojino brašno, dekstrozu, ekstrakt plijesni, KH_2PO_4, K_2HPO_4, NaCl i $MgSO_4$ x $7H_2O$. Prugaste kulture su korištene za inokuliranje posuda za protresanje od 250 mL. Posude su protresane na 210 okr/min., na 30°C tijekom 4 dana.

U puni bujon NRRL pristupnog broja B-30087 se doda pročišćeni cvitermicin A i provede se kapilarna elektroforeza (CE). U 30 μL punog bujona NRRL pristupnog broja B-30087 se doda 10 μL cvitermicina A. Po jedan uzorak punog bujona NRRL pristupnog broja B-30087, punog bujona NRRL pristupnog broja B-30087 s cvitermicinom A i samog cvitermicina A se provede kroz CE pomoću natrij fosfatnog pufera s pH 5.8. Dobiveni elektroferogrami za svaki uzorak prikazani su na Slici 3.

Djelomično pročišćene frakcije potom se usporede s cvitermicinom A pomoću kapilarne elektroforeze (CE). Slika 4 prikazuje elektroferograme djelomično pročišćenog fungicidnog sastojka B-30087, djelomično pročišćenog fungicidnog sastojka B-30087 s 25 μL cvitermicina A, te samog cvitermicina A.

^{1}H NMR spektri cvitermicina A prikazani na Slici 2, te djelomično pročišćenog fungicidnog metabolita B-30087, prikazani na Slici 1, zabilježeni su u D_2O na 400 MHz. Spektri, kao što je prikazano na Slikama 1 i 2, pokazuju da je fungicidni metabolit od NRRL pristupnog broja B-30087, različit od cvitermicina A.

Fungicidni metabolit NRRL pristupnog broja B-30087 također se može razlikovati od egzotoksina pomoću ^{1}H NMR. ^{1}H NMR spektar egzotoksina ima sedam rezonancija iznad 5 ppm, kao što je prikazano u *Analytical Chemistry of Bacillus thuringiensis, LA Hickle i WL Fitch, ur., ACS Symposium Series 432, str. 131 (1990)*. Nasuprot tome, Slika 1 pokazuje da se za uzorak NRRL pristupnog broja B-30087 ne javlja protonska rezonancija iznad 5 ppm.

Primjer 8
Pročišćavanje pojačivača

Pojačivač je polupročišćen iz punog bujona B-30087 na slijedeći način. Polupročišćen je obradom 435 mL punog bujona s anionskom izmjenjivačkom smolom, precipitacijom s acetonitrilom i kromatografijom s isključivanjem prema veličini. Puni bujon se centrifugira kako bi se uklonile stanice i 14.5 g anionske smole (AG 1-X8, 100-200 mesh, acetatni oblik) se doda nadtalogu i smjesa se protresa jednu minutu. Zatim se centrifugira na 5000 okr/min., 20 minuta, i nadtalog se odlije i koristi u slijedećem koraku. Acetonitril se doda nadtalogu, čime se dobije 50%-tna otopina koja se protresa jednu minutu i centrifugira na 5000 okr/min. 20 minuta. Niži tamnosmeđi sloj sadrži pojačivač *Bacillus thuringiensis*.

Gore spomenuti smeđi sloj se dalje pročisti kromatografijom s isključivanjem prema veličini, u dva koraka. Prvo, 130 g P-2 smole (BioRad) se nabubri s milliQ deioniziranom vodom i oblažu se stupci veličine 2.5 cm x 80 cm. Smeđi sloj se koncentrira na kružnom isparivaču približno 4x i 15 mL koncentrata se nanese na P-2 stupac. Stupac se ispire MQ vodom pomoću sile teže i prikupljaju se desetminutne frakcije tijekom 12 h (UV detekcija na 280 nm, raspon apsorbancije 2.0, 10 mV). Daljnje pročišćavanje frakcija 26-28 se provede koncentriranjem frakcija 3x na kružnom isparivaču i nanošenjem na izvorni P2 stupac. Stupac se ispire s MQ vodom. Desetminutne frakcije se prikupljaju prvih 80 minuta, zatim se slijedeća dva sata prikupljaju dvominutne frakcije. Aktivnost pojačivača *Bacillus thuringiensis* se ispire u frakcijama 16-20. (UV detekcija na 220 nm, apsorbancijski raspon 2.0, 10 mV).

Primjer 9
Kemijska svojstva pojačivača su različita od cvitermicina A

Pokazalo se kako je pojačivač iz ovog izuma različit od cvitermicina A na kapilarnoj elektroforezi. Puni bujon B-30087 se uzgoji u mediju s *Bacillus* kulturom koji sadrži sojino brašno, dekstrozu, ekstrakt plijesni, KH_2PO_4, K_2HPO_4, NaCl i $MgSO_4$ x $7H_2O$. Prugaste kulture su korištene za inokuliranje posuda za protresanje od 250 mL. Posude su protresane na 210 okr/min., na 30°C tijekom 4 dana. U puni bujon *Bacillus thuringiensis* B-30087 se doda pročišćeni cvitermicin A i provede se kapilarna elektroforeza (CE). U 30 μL punog bujona B-30087 se doda 10 μL cvitermicina A. Puni bujon B-30087 (Slika 3A), puni bujon B-30087 s cvitermicinom A (Slika 3B) i sam cvitermicin A (Slika 3C) se provede kroz CE pomoću natrij fosfatnog pufera s pH 5.8. Elektroferogrami CE prikazani su na Slici 4.

^{1}H NMR spektri cvitermicina A i polupročišćenog pojačivača B-30087 zabilježeni su u D_2O na 400 MHz. Spektri pokazuju da je pojačivač različit od cvitermicina A.

Primjer 10
Određivanje insekticidnog pojačanja s *Bacillus thuringiensis*

Pojačanje *B. thuringiensis* pokazano je pomoću punog bujona *B. pumilus*, NRRL pristupni broj B-30087, ispitivanjem u testu sinergije gusjenice sovice (*Spodoptera exigua*). Testovi se izvode na mikroločama s 96 jamica. Svaka jamica sadrži kruti agarski supstrat. 20 μL punog bujona B-30087 se ispita s komercijalnim pripravkom *B. thuringiensis*, Javelin (0.25-1.50 μg/jamici) u biološkom testu. Serijska razrjeđenja samih Javelin koncentracija su također provedena.

Za ispitivanje insekticidnog djelovanja, agarski supstrat se pripravi za jamice mikroploče prema Marrone-u i sur. *(1985), J Econ Entomol 78:290-293*. Deionizirana voda se koristi kao negativna kontrola. Dva replikata ispitivanog uzorka ili kontrole su korištena za svaki test. Ploče su potom smještene u pokrov za isparavanje približno 2-3 sata, radi sušenja.

Jedna do tri ličinke *Spodoptera exigua* prvog stadija se dodaju u svaku jamicu. Mikroploča se zatali s tvari nepropusnom za zrak, kao što je Mylar®, i svaka se jamica ozrači pritiskom pribadače. Ploče se inkubiraju na 27°C do 7 dana.

Nakon inkubiranja, jamice se boduju bilježenjem smrtnosti novorođenih ili stupnja razvoja ličinki. Zabilježi se broj mrtvih ličinki. Nerazvijene ličinke se boduju ocjenama od 1 do 4. Bodovanje nerazvijenosti je kako slijedi: 4=kontrolna veličina; 3=75% kontrolne veličine; 2=50% kontrolne veličine; 1=25% kontrolne veličine. Rezultati su sažeti u Tablici 9 u nastavku.

Tablica 9

uzorak	**br. mrtvih/ukupni broj**	**zbroj inhibicije**
0.25 μg Javelin	1/8	4
0.50 μg Javelin	0/8	4
0.75 μg Javelin	1/8	2
1.0 μg Javelin	1/8	2
1.50 μg Javelin	1/8	2
B-30087 + 0.25 μg Javelin	3/8	2
B-30087 + 0.50 μg Javelin	0/8	3
B-30087 + 1.0 μg Javelin	7/8	2
B-30087 + 1.50 μg Javelin	8/8	1
samo B-30087	0/8	4
vodena kontrola	0/8	4

Drugi je test proveden pomoću gornjih postupaka. Rezultati su sažeti na Tablici 10 u nastavku.

Tablica 10

uzorak	**br. mrtvih/ukupni broj**	**zbroj inhibicije**
0.0625 μg Javelin	0/8	4
0.125 μg Javelin	0/8	4
0.187 μg Javelin	0/8	4
0.250 μg Javelin	0/8	3
0.375 μg Javelin	1/8	2
B-30087 + 0.0625 μg Javelin	1/8	3
B-30087 + 0.125 μg Javelin	2/8	3
B-30087 + 0.187 μg Javelin	5/8	2
B-30087 + 0.250 μg Javelin	8/8	1
B-30087 + 0.375 μg Javelin	8/8	1
samo B-30087	0/8	4
vodena kontrola	0/8	4

Za određivanje svojstava polupročišćene frakcije kao pojačivača insekticida uzorak je ispitan kao gore, pomoću 0.1 μg/jamici Javelina i 40 μL/jamici ispitivane frakcije. Rezultati su prikazani na Tablici 11 u nastavku.

Tablica 11

uzorak	**br. mrtvih/ukupni broj**	**zbroj inhibicije**
frakcija 10	0/9	2
frakcija 16	16/16	1
frakcija 18	17/17	1
frakcija 20	14/14	1
frakcija 25	1/10	2
frakcija 30	3/11	2
frakcija 35	1/12	3
Javelin, 0.1 μg/jamici	0/8	3
vodena kontrola	0/14	4

Primjer 11

Zajednička primjena *B. pumilus* (B-30087) i *B. subtilis* (B-21661) kao fungicida

Soj *B. pumilus* NRRL B-30087 se ispita s *B. subtilis*, NRRL B-21661 kako bi se utvrdilo je li fungicidni učinak veći kod zajedničke primjene nego u slučaju pojedinačne primjene svakog soja. Svaki soj se uzgoji u fermentatoru od 10 ili 5000 litara, u mediju temeljenom na sojinom brašnu, približno 50 sati. Svaki soj se ispita kao puna bujonska kultura protiv *Botrytis cinerea*, sive plijesni na papru, i *Peronospora parasitica*, pahuljaste plijesni na *Brassica*. Puni bujoni se ispitaju na 1x, 1/2x i 1/8x. Dva soja se zatim ispitaju u različitim međusobnim kombinacijama na 1/2x, 1/4x i 1/8x. Vodena provjera (kontrola) i kemijski fungicid (BREAK® pri 20 ppm) se također ispitaju radi usporedbe. Biljke se boduju na ljestvici od 0 do 5 (5 = 100%-tna bolest, nema suzbijanja; a 0 = 100%-tno suzbijanje, nema bolesti). Rezultati su prikazani u Tablici 12 u nastavku.

Tablica 12

		Botrytis cinerea **prosječno bodovanje bolesti (4 biljke)**	***Peronospora parasitica*** **prosječno bodovanje bolesti (4 biljke)**
B-21661	1x	0.3	nije testirano
	1/2x	0.3	0.5
	1/4x	1.2	1.0
	1/8x	1.7	2.0
B-30087	1x	1.7	nije testirano
	1/2x	2.3	1.3
	1/4x	nije testirano	3.7
	1/8x	nije testirano	4.3
B-21661 1/4x i B-30087 1/2x		0.7	1.0
B-21661 1/8x i B-30087 1/2x		1.4	0.3
B-21661 1/4x i B-30087 1/4x		N/A	0.5
B-21661 1/2x i B-30087 1/2x		N/A	0.3
B-21661 1/2x i B-30087 1/4x		N/A	0.3
B-21661 1/2x i B-30087 1/8x		N/A	0.5
BREAK® pri 20 ppm		0.2	nije testirano
vodena kontrola		4.6	5.0

Rezultati testa s *Botrytis cinerea* pokazuju statističke razlike kada se sojevi koriste u kombinaciji u usporedbi sa slučajevima pojedinačne primjene. Na primjer, zbroj 0.7 za B-21661 1/4x i B-30087 1/2x je statistički različit od zbroja 1.2 za B-21661 1/4x kada se primjenjuje samostalno. Također, zbroj 1.4 za B-21661 1/8x i B-30087 1/2x je statistički različit od zbroja 1.7 za B-21661 1/8x kada se primjenjuje samostalno ili 2.3 za B-30087 1/2x kada se primjenjuje samostalno, a zajednički zbroj je niži od očekivanog prosjeka svakog soja korištenog samostalno. Ovo pokazuje sinergistički učinak pri zajedničkom korištenju sojeva radi povećane učinkovitosti kao fungicida.

Rezultati testa s *Peronospora parasitica* pokazuju kako je zbroj kombinacije B-21661 1/8x i B-30087 1/2x daleko bolji nego što bi se očekivalo od adicijskog učinka. Zbroj 2.05 očekivao bi se da je postojao samo adicijski učinak

kombinacije sojeva. Međutim, aktualni zbroj je bio 0.3, što je pokazalo siguran sinergistički učinak uporabe sojeva u kombinaciji. Drugi sojevi također pokazuju rezultate bolje od očekivanih, na primjer B-21661 1/4x i B-30087 1/4x imaju zbroj 0.5, što je mnogo bolje nego što bi se očekivalo samo od adicijskog učinka (procijenjeni zbroj 2.35) pojedinačnih sojeva. Ova ista sinergija prikazana je i u kombinacijama B-21661 1/2x i B-30087 1/2x (zbroj 0.3), B-21661 1/2x i B-30087 1/4x (zbroj 0.3), te B-21661 1/2x i B-30087 1/8x (zbroj 0.5). Ovi testovi dokazuju postojanje sinergističkog učinka kada se sojevi koriste u kombinaciji, i predstavlja neočekivan rezultat.

S obzirom da je izum opisan u svezi s gornjim oblicima, treba uvidjeti da gornji opis i primjeri imaju svrhu ilustrirati, ali ne i ograničiti područje izuma. Drugi aspekti, prednosti i preinake unutar područja izuma bit će jasni poznavatelju struke ovog izuma.

PATENTNI ZAHTJEVI

1. Biološki čista kultura, **naznačena time**, što soj koji ima sva obilježja soja *Bacillus pumilus* označenog kao NRRL br. B-30087, ili njegovi mutanti, koji imaju fungicidno djelovanje.
2. Biološki čista kultura soja *Bacillus pumilus*, **naznačena time**, što je označen kao NRRL br. B-30087.
3. Pripravak, **naznačen time**, što sadrži biološki čistu kulturu iz zahtjeva 1 i nosač.
4. Pripravak iz zahtjeva 1, **naznačen time**, što je formuliran iz skupine koja se sastoji od ovlaživog praška, zrnca, vodene suspenzije i emulzibilnog koncentrata, te mikroinkapsulirane formulacije.
5. Izolirani metabolit, **naznačen time**, što je izdvojen iz biološki čiste kulture soja koji ima sva obilježja soja *Bacillus pumilus* označenog kao NRRL pristuoni broj B-30087, ili njegovi mutanti, koji imaju fungicidno djelovanje.
6. Nadtalog, **naznačen time**, što je izdvojen iz biološki čiste kulture soja koji ima sva obilježja soja *Bacillus pumilus* označnog kao NRRL pristupni br. B-30087, ili njegovi mutanti, koji imaju fungicidno djelovanje.
7. Djelomično pročišćena frakcija, **naznačena time**, što je izdvojena iz nadtaloga iz zahtjeva 6.
8. Pripravak, **naznačen time**, što sadrži metabolit iz zahtjeva 5 i nosač.
9. Pripravak, **naznačen time**, što sadrži nadtalog iz zahtjeva 6 i nosač.
10. Pripravak, **naznačen time**, što sadrži djelomično pročišćenu frakciju iz zahtjeva 7 i nosač.
11. Pripravak iz zahtjeva 8, **naznačen time**, što je formuliran iz skupine koja se sastoji od ovlaživog praška, zrnca, vodene suspenzije i emulzibilnog koncentrata, te mikroinkapsulirane formulacije.
12. Pripravak iz zahtjeva 9, **naznačen time**, što je formuliran iz skupine koja se sastoji od ovlaživog praška, zrnca, vodene suspenzije i emulzibilnog koncentrata, te mikroinkapsulirane formulacije.
13. Pripravak iz zahtjeva 10, **naznačen time**, što je formuliran iz skupine koja se sastoji od ovlaživog praška, zrnca, vodene suspenzije i emulzibilnog koncentrata, te mikroinkapsulirane formulacije.
14. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine metabolita iz zahtjeva 1.
15. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine nadtaloga iz zahtjeva 6.
16. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine djelomično pročišćene frakcije iz zahtjeva 7.
17. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine pripravka iz zahtjeva 8.
18. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine pripravka iz zahtjeva 9.
19. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine pripravka iz zahtjeva 10.
20. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine pripravka iz zahtjeva 11.
21. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine pripravka iz zahtjeva 12.
22. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine pripravka iz zahtjeva 13.
23. Postupak iz zahtjeva 17, **naznačen time**, što je gljivična infekcija uzrokovana najmanje jednim od mikroorganizama odabranih iz skupine koja se sastoji od: *Bremia lactucae; Peronospora parasitica; Phytophthora infestans; Uncinula necator;* i *Uromyces phaseoli*.
24. Postupak iz zahtjeva 18, **naznačen time**, što je gljivična infekcija uzrokovana najmanje jednim od mikroorganizama odabranih iz skupine koja se sastoji od: *Bremia lactucae; Peronospora parasitica; Phytophthora infestans; Uncinula necator;* i *Uromyces phaseoli*.

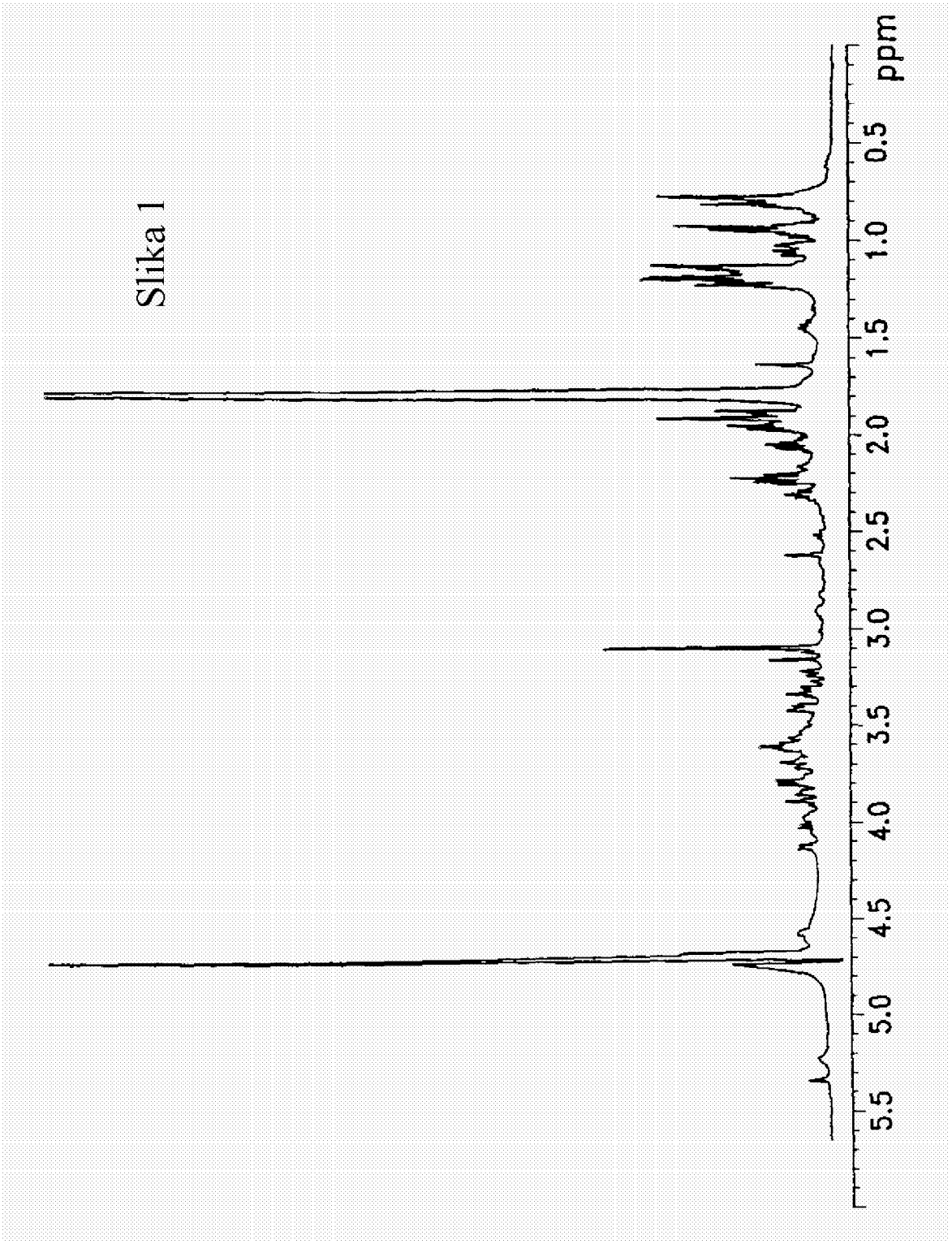
25. Postupak iz zahtjeva 19, **naznačen time**, što je gljivična infekcija uzrokovana najmanje jednim od mikroorganizama odabranih iz skupine koja se sastoji od: *Bremia lactucae; Peronospora parasitica; Phytophthora infestans; Uncinula necator;* i *Uromyces phaseoli*.
26. Postupak iz zahtjeva 20, **naznačen time**, što je gljivična infekcija uzrokovana najmanje jednim od mikroorganizama odabranih iz skupine koja se sastoji od: *Bremia lactucae; Peronospora parasitica; Phytophthora infestans; Uncinula necator;* i *Uromyces phaseoli*.
27. Postupak iz zahtjeva 21 ili 22, **naznačen time**, što je gljivična infekcija uzrokovana najmanje jednim od mikroorganizama odabranih iz skupine koja se sastoji od: *Bremia lactucae; Peronospora parasitica; Phytophthora infestans; Uncinula necator;* i *Uromyces phaseoli*.
28. Pripravak iz zahtjeva 1, **naznačen time**, što dalje sadrži najmanje jedan kemijski ili biološki pesticid.
29. Pripravak iz zahtjeva 7, **naznačen time**, što dalje sadrži najmanje jedan kemijski ili biološki pesticid.
30. Pripravak iz zahtjeva 8, **naznačen time**, što dalje sadrži najmanje jedan kemijski ili biološki pesticid.
31. Postupak iz zahtjeva 14, **naznačen time**, što dalje sadrži primjenu učinkovite količine najmanje jednog kemijskog ili biološkog pesticida.
32. Postupak iz zahtjeva 15, **naznačen time**, što dalje sadrži primjenu učinkovite količine najmanje jednog kemijskog ili biološkog pesticida.
33. Postupak iz zahtjeva 17, **naznačen time**, što dalje sadrži primjenu učinkovite količine najmanje jednog kemijskog ili biološkog pesticida.
34. Postupak za dobivanje protugljivičnog nadtaloga, **naznačen time**, što sadrži uzgoj biološki čiste kulture NRRL pristupnog broja B-30087, i izoliranje protugljivičnog metabolita iz nadtaloga.
35. Postupak za djelomično pročišćavanje nadtaloga iz zahtjeva 34, **naznačen time**, što sadrži frakcioniranje nadtaloga i provođenje biološkog pokusa na frakcijama u svrhu otkrivanja protugljivičnih frakcija.
36. Nadtalog, **naznačen time**, što je dobiven postupkom iz zahtjeva 34.
37. Djelomično pročišćena frakcija iz zahtjeva 7, **naznačena time**, što pokazuje djelovanje protiv gljiva biljnih štetočinja, nađe se u vodenoj frakciji, lagano je termolabilna, otporna je na kiseline/baze i proteaze, ima pozitivni naboj i molekulsku težinu manju od 10000 daltona.
38. Izolirani metabolit iz zahtjeva 5, **naznačen time**, što pokazuje djelovanje protiv gljiva biljnih štetočinja, nađe se u vodenoj frakciji, lagano je termolabilan, otporan je na kiseline/baze i proteaze, ima pozitivni naboj i molekulsku težinu manju od 10000 daltona.
39. Vodotopljivi spoj koji pospješuje insekticidno djelovanje *Bacillus thuringiensis*, **naznačen time**, što ima molekulsku težinu manju od 10000 daltona i nije cvitermicin A.
40. Spoj iz zahtjeva 39, **naznačen time**, što dalje sadrži *Bacillus thuringiensis*.
41. Pripravak, **naznačen time**, što sadrži spoj iz zahtjeva 39 i nosač.
42. Pripravak, **naznačen time**, što sadrži pripravak iz zahtjeva 40 i nosač.
43. Pripravak iz zahtjeva 40, **naznačen time**, što je *Bacillus thuringiensis* u obliku mikrobnog soja, proizvoda za tržište, inženjeringom dobivene biljke ili delta endotoksina.
44. Pripravak iz bilo kojeg od zahtjeva 40 do 43, **naznačen time**, što dalje sadrži najmanje jedan kemijski ili biološki pesticid.
45. Pripravak iz zahtjeva 44, **naznačen time**, što je pripravak formulacija odabrana iz skupine koja se sastoji od ovlaživog praška, vodene suspenzije i emulzibilnog koncentrata, te mikroinkapsulirane formulacije.
46. Djelomično pročišćena frakcija pune bujonske kulture *Bacillus*, **naznačena time**, što pospješuje insekticidno djelovanje *Bacillus thuringiensis*, a nije cvitermicin A niti ß-egzotoksin.
47. Djelomično pročišćena frakcija iz zahtjeva 46, **naznačena time**, što je Bacillus *Bacillus pumilus*.
48. Djelomično pročišćena frakcija iz zahtjeva 47, **naznačena time**, što je *Bacillus pumilus Bacillus pumilus* pohranjen pod NRRL pristupnim brojem B-30087.
49. Pripravak, **naznačen time**, što sadrži frakciju iz bilo kojeg od zahtjeva 46 do 48 i nosač.
50. Frakcija prema bilo kojem od zahtjeva 46 do 49, **naznačena time**, što dalje sadrži *Bacillus thuringiensis*.
51. Frakcija iz zahtjeva 50, **naznačena time**, što je *Bacillus thuringiensis* u obliku mikrobnog soja, proizvoda za tržište, inženjeringom dobivene biljke ili delta endotoksina.
52. Pripravak, **naznačen time**, što sadrži pripravak iz zahtjeva 49 i *Bacillus thuringiensis*.
53. Frakcija iz bilo kojeg od zahtjeva 46 do 48, **naznačena time**, što dalje sadrži najmanje jedan kemijski ili biološki pesticid.
54. Pripravak iz zahtjeva 49, **naznačen time**, što je pripravak formulacija odabrana iz skupine koja se sastoji od ovlaživog praška, vodene suspenzije i emulzibilnog koncentrata, te mikroinkapsulirane formulacije.
55. Pripravak iz zahtjeva 52, **naznačen time**, što je pripravak formulacija odabrana iz skupine koja se sastoji od ovlaživog praška, vodene suspenzije i emulzibilnog koncentrata, te mikroinkapsulirane formulacije.
56. Pripravak iz zahtjeva 53, **naznačen time**, što je pripravak formulacija odabrana iz skupine koja se sastoji od ovlaživog praška, vodene suspenzije i emulzibilnog koncentrata, te mikroinkapsulirane formulacije.

57. Postupak za pospješivanje insekticidnog djelovanja *Bacillus thuringiensis*, **naznačen time**, što sadrži primjenu na biljku ili korijen učinkovite količine spoja iz zahtjeva 39 i učinkovite količine *Bacillus thuringiensis* na biljku ili korijen.
58. Postupak za pospješivanje insekticidnog djelovanja *Bacillus thuringiensis*, **naznačen time**, što sadrži primjenu na biljku ili korijen učinkovite količine frakcije iz zahtjeva 46 i učinkovite količine *Bacillus thuringiensis* na biljku ili korijen.
59. Postupak za zaštitu ili liječenje biljke ili korijena od infestacije insektima, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine spoja iz zahtjeva 40 na biljku ili korijen.
60. Postupak za zaštitu ili liječenje biljke ili korijena od infestacije insektima, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine pripravka iz zahtjeva 44 na biljku ili korijen.
61. Postupak za zaštitu ili liječenje biljke ili korijena od infestacije insektima, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine frakcije iz zahtjeva 50 na biljku ili korijen.
62. Postupak za zaštitu ili liječenje biljke ili korijena od infestacije insektima, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine pripravka iz zahtjeva 52 na biljku ili korijen.
63. Postupak za zaštitu ili liječenje biljke ili korijena od infestacije insektima, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine frakcije iz zahtjeva 53 na biljku ili korijen.
64. Postupak iz zahtjeva 51, **naznačen time**, što dalje sadrži najmanje jedan kemijski ili biološki pesticid.
65. Postupak iz zahtjeva 49 ili 50, **naznačen time**, što dalje sadrži najmanje jedan kemijski ili biološki pesticid.
66. Pripravak, naznačen time, što sadrži
    a) punu bujonsku kulturu soja koji ima sva obilježja soja *Bacillus pumilus* označenog kao NRRL pristuoni br. B-30087, ili njegovih mutanata; i
    b) punu bujonsku kulturu soja koji ima sva obilježja soja *Bacillus subtilis* označenog kao NRRL pristuoni br. B-21661, ili njegovih mutanata,

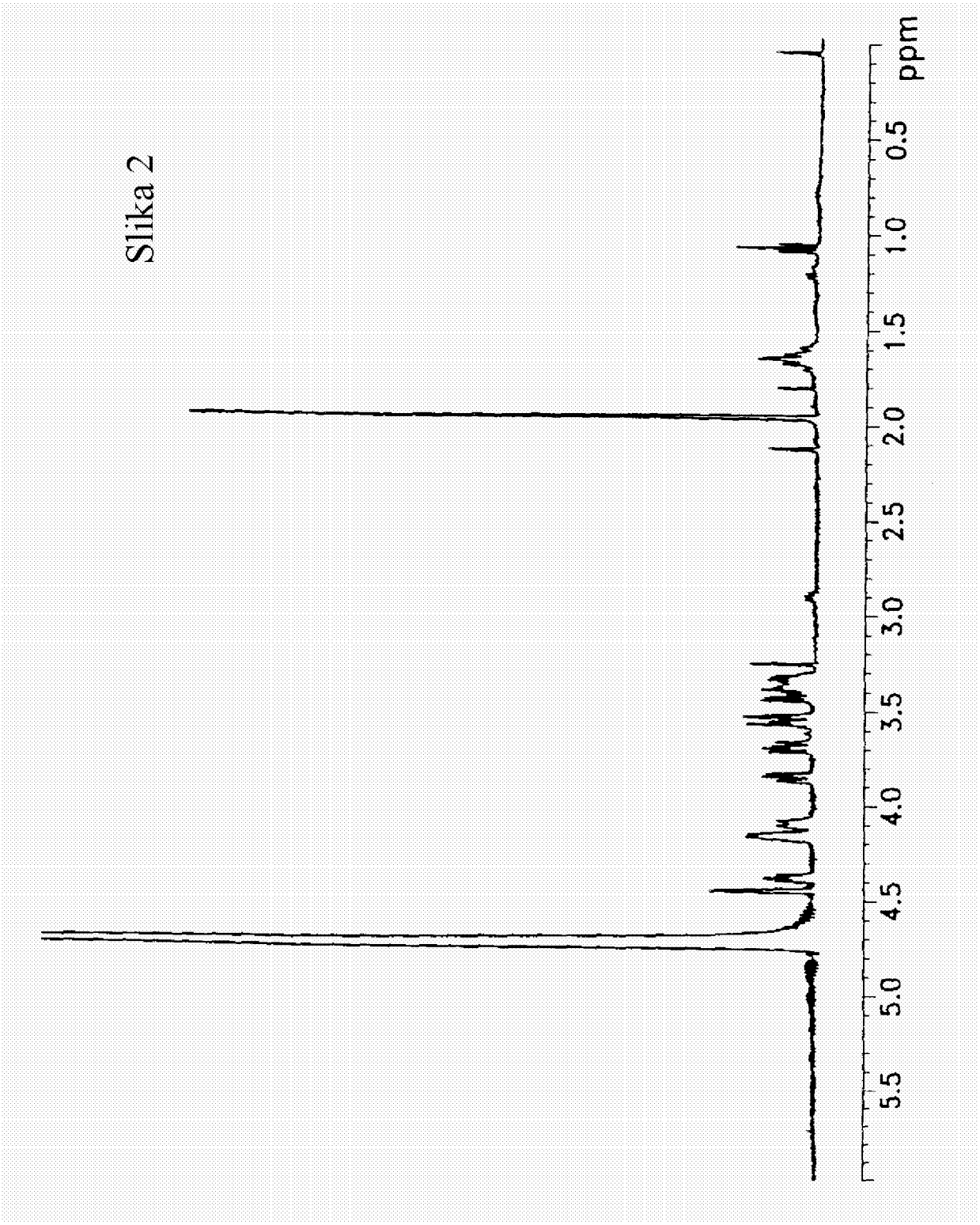
    pri čemu spomenuti sojevi imaju sinergističko fungicidno djelovanje.
67. Pripravak iz zahtjeva 66, **naznačen time**, što je fungicidno djelovanje protiv *Botrytis cinerea* i *Peronospora parasitica*.
68. Pripravak iz zahtjeva 66, **naznačen time**, što su sojevi NRRL pristupni br. B-21661 i B-30087 kombinirani u omjeru 1:2.
69. Pripravak iz zahtjeva 66, **naznačen time**, što su sojevi NRRL pristupni br. B-21661 i B-30087 kombinirani u omjeru 1:4.
70. Pripravak iz zahtjeva 66, **naznačen time**, što su sojevi NRRL pristupni br. B-21661 i B-30087 kombinirani u omjeru 1:2, protiv *Botrytis cinerea* ili *Peronospora parasitica*.
71. Pripravak iz zahtjeva 66, **naznačen time**, što su sojevi NRRL pristupni br. B-21661 i B-30087 kombinirani u omjeru 1:4, protiv *Botrytis cinerea* ili *Peronospora parasitica*.
72. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine pripravka iz zahtjeva 66.
73. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine pripravka iz zahtjeva 67.
74. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine pripravka iz zahtjeva 68.
75. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine pripravka iz zahtjeva 69.
76. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine pripravka iz zahtjeva 70.
77. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine pripravka iz zahtjeva 71.
78. Nadtalog, **naznačen time**, što je izdvojen iz kulture iz zahtjeva 66.
79. Pripravak, **naznačen time**, što sadrži nadtalog iz zahtjeva 78 i nosač.
80. Pripravak iz zahtjeva 79, **naznačen time**, što je formuliran iz skupine koja se sastoji od ovlaživog praška, zrnca, vodene suspenzije i emulzibilnog koncentrata, te mikroinkapsulirane formulacije.
81. Pripravak iz zahtjeva 66, **naznačen time**, što dalje sadrži najmanje jedan biološki ili kemijski pesticid.
82. Pripravak iz zahtjeva 79, **naznačen time**, što dalje sadrži najmanje jedan biološki ili kemijski pesticid.
83. Pripravak iz zahtjeva 81, **naznačen time**, što je formuliran iz skupine koja se sastoji od ovlaživog praška, zrnca, vodene suspenzije i emulzibilnog koncentrata, te mikroinkapsulirane formulacije.
84. Pripravak iz zahtjeva 82, **naznačen time**, što je formuliran iz skupine koja se sastoji od ovlaživog praška, zrnca, vodene suspenzije i emulzibilnog koncentrata, te mikroinkapsulirane formulacije.
85. Postupak za sprječavanje ili liječenje biljke, korijena ili ploda od gljivične infekcije, **naznačen time**, što sadrži primjenu učinkovite količine pripravka iz zahtjeva 69.

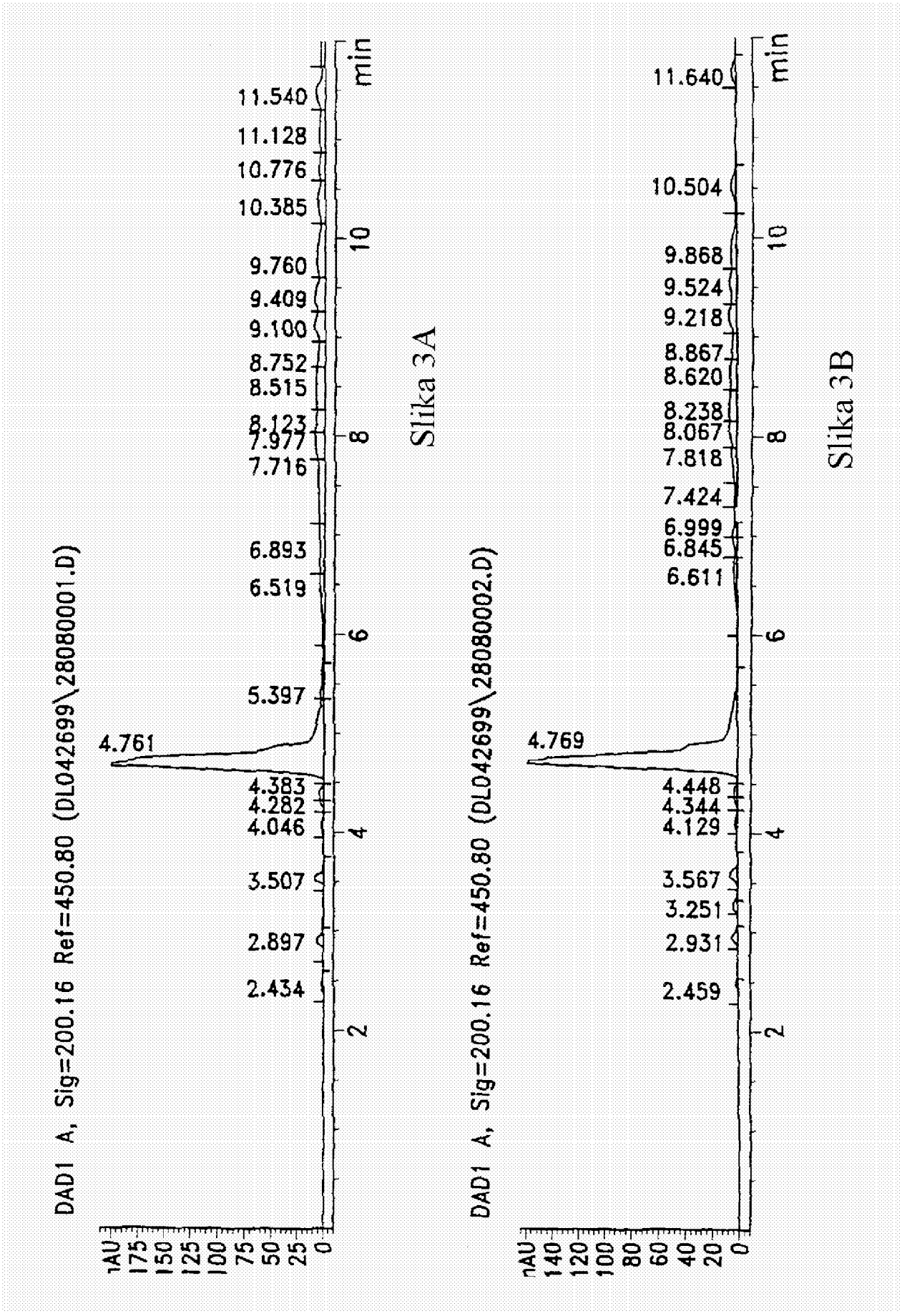
SAŽETAK

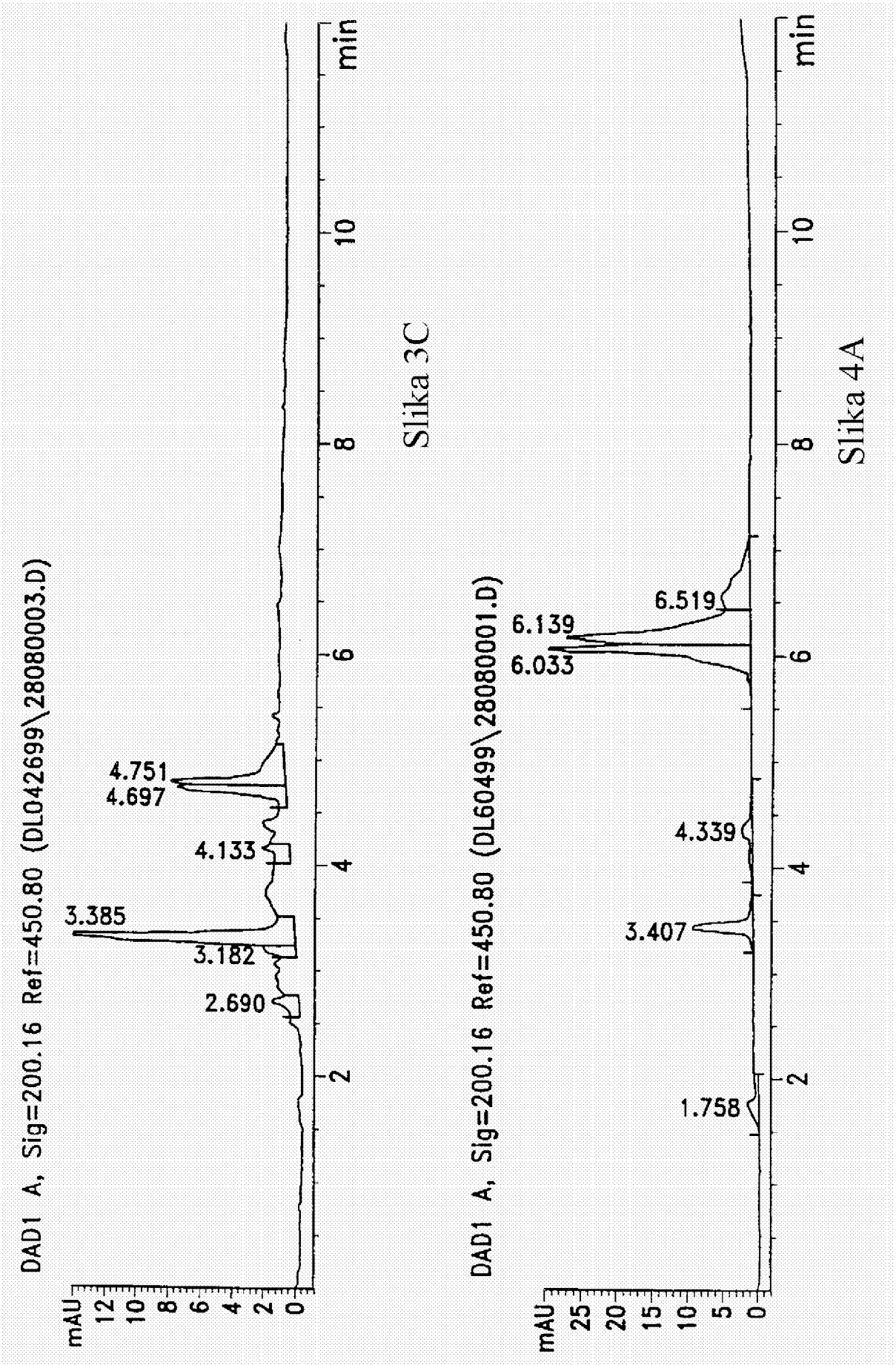
Ovaj izum opisuje novi *Bacillus sp.* koji proizvodi antibiotik, pokazuje protugljivično djelovanje samo na neke određene biljne štetočine, a ne pokazuje protubakterijsko djelovanje, kao i biološki čistu kulturu soja koja ima sva obilježja ovog soja. Također se opisuje postupak za liječenje ili zaštitu biljaka, plodova i korijenja od gljivičnih infekcija putem primjene učinkovite količine ovih sojeva, nadtaloga koje proizvode ovi sojevi ili metabolita izoliranih iz ovih sojeva. Izum dalje obuhvaća sinergistički fungicidni učinak zajedničke uporabe sojeva NRRL pristupnih br. B-30087 i B-21661 (AQ 713).

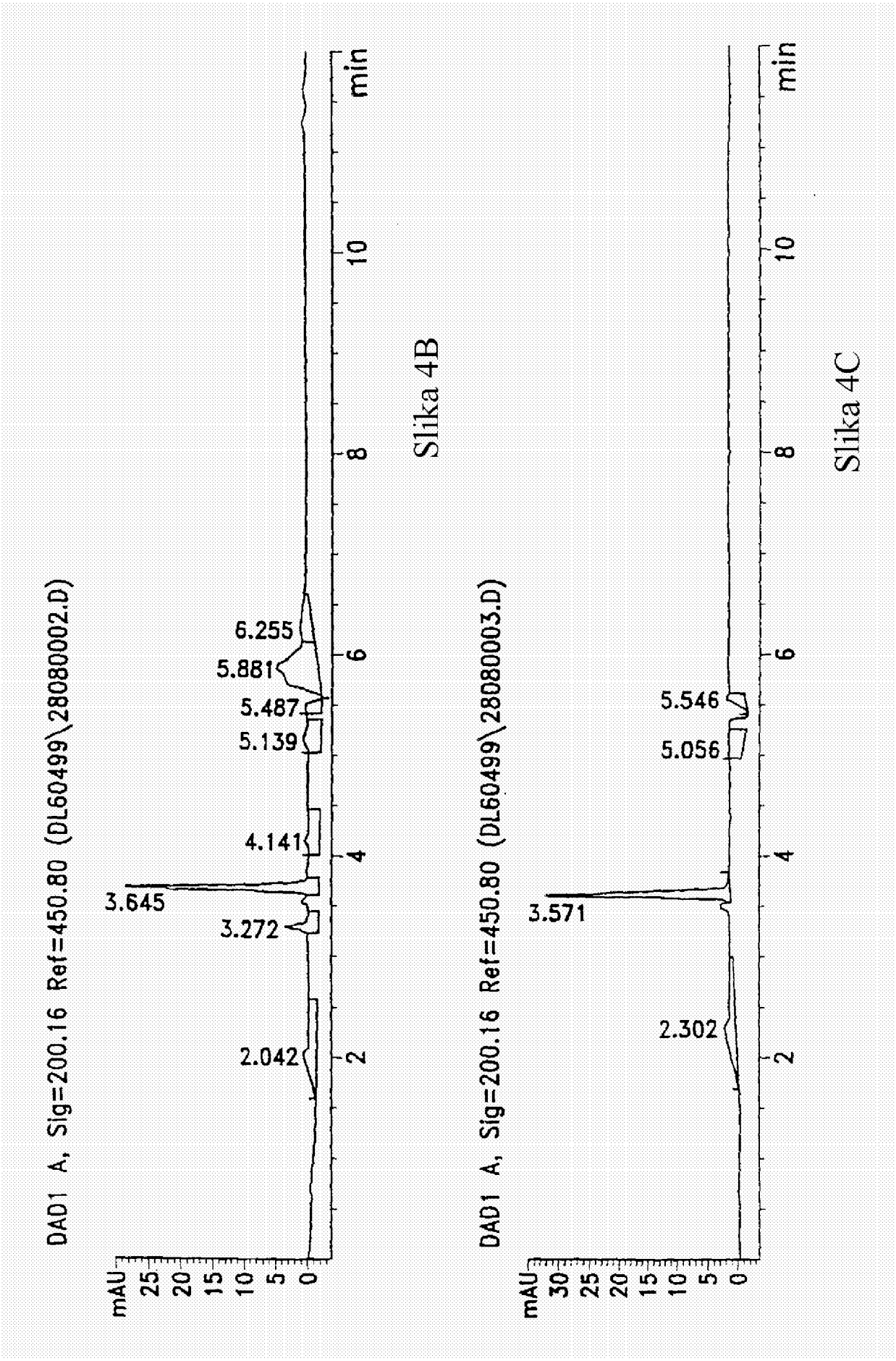
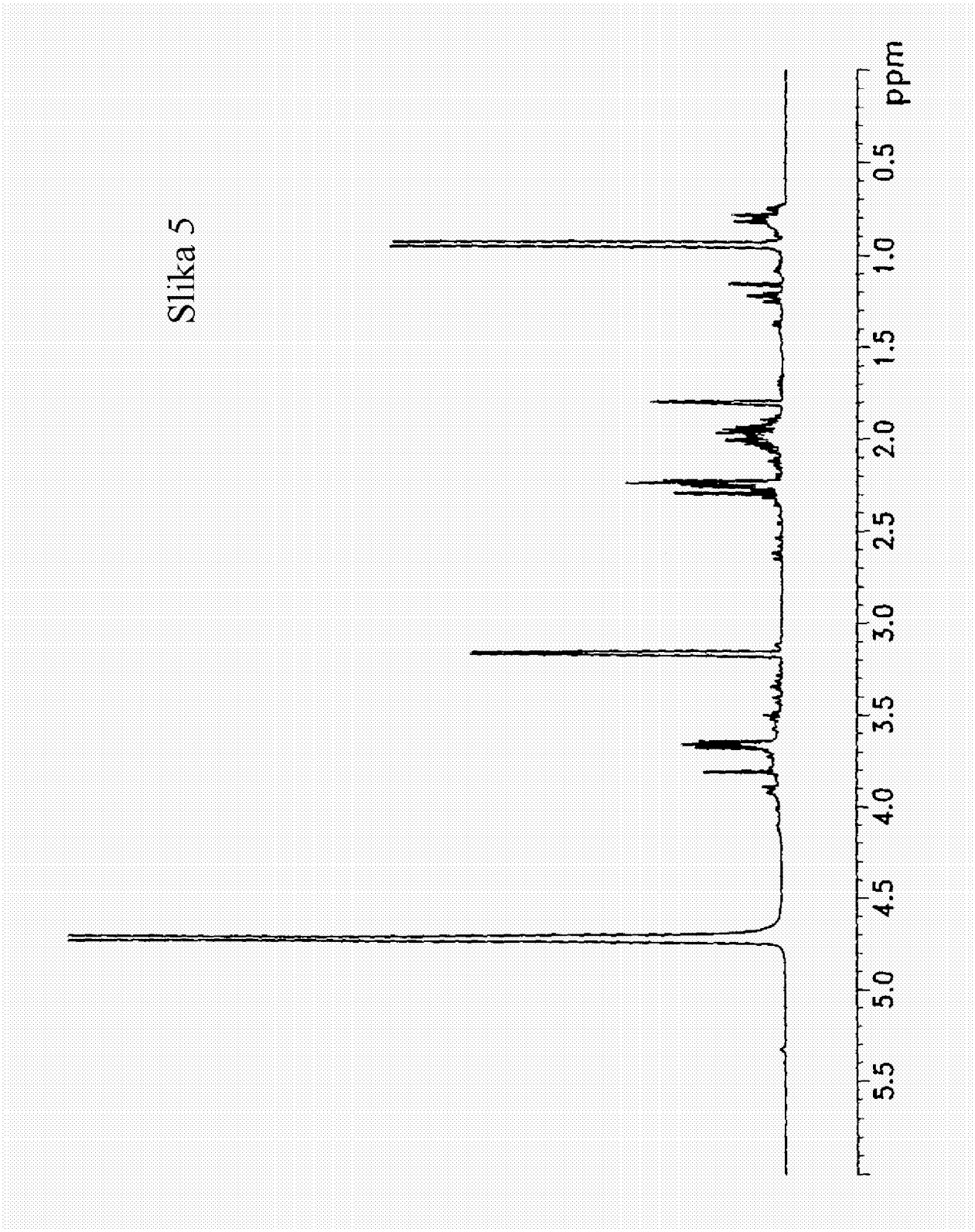

Slika 1
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
ppm

Slika 2




DAD1 A, Sig=200.16 Ref=450.80 (DL042699\28080001.D)
mAU
min
11.540
11.128
10.776
10.385
9.760
9.409
9.100
8.752
8.515
8.123
7.977
7.716
6.893
6.519
5.397
4.761
4.383
4.282
4.046
3.507
2.897
2.434
Slika 3A
DAD1 A, Sig=200.16 Ref=450.80 (DL042699\28080002.D)
mAU
min
11.640
10.504
9.868
9.524
9.218
8.867
8.620
8.238
8.067
7.818
7.424
6.999
6.845
6.611
4.769
4.448
4.344
4.129
3.567
3.251
2.931
2.459
Slika 3B


DAD1 A, Sig=200.16 Ref=450.80 (DL042699\28080003.D)
mAU
min
4.751
4.697
4.133
3.385
3.182
2.690
Slika 3C
DAD1 A, Sig=200.16 Ref=450.80 (DL60499\28080001.D)
mAU
min
6.519
6.139
6.033
4.339
3.407
1.758
Slika 4A


DAD1 A, Sig=200.16 Ref=450.80 (DL60499\28080002.D)
mAU
min
6.255
5.881
5.487
5.139
4.141
3.645
3.272
2.042
Slika 4B
DAD1 A, Sig=200.16 Ref=450.80 (DL60499\28080003.D)
mAU
min
5.546
5.056
3.571
2.302
Slika 4C

Slika 5