

(12) BELGISCH UITVINDINGSOCTROOI

(47) Publicatiedatum : 30/11/2022

(21) Aanvraagnummer : BE2021/5712

(22) Indieningsdatum : 12/09/2021

(62) Afsplitst van basisaanvraag :

(62) Indieningsdatum basisaanvraag :

(51) Internationale classificatie : C05G 3/90, C07D 471/04

(30) Voorrangsgegevens :

14/09/2020 EP 20196021.8

(73) Houder(s) :

EUROCHEM ANTWERPEN
NV
2040, ANTWERPEN
België

(72) Uitvinder(s) :

HABERMÜLLER Heiko
69469 WEINHEIM
Duitsland**HENKE Catarina**
68163 MANNHEIM
Duitsland**MANNHEIM Thomas**
68165 MANNHEIM
Duitsland**PETERS Nils**
68165 MANNHEIM
Duitsland**BEECKMAN Fabian**
68165 MANNHEIM
Duitsland

MOTTE Hans

9052 GENT

België

DROZDZECK Andrzej

9052 GENT

België

AUDENAERT Dominique

9052 GENT

België

BEECKMAN Tom

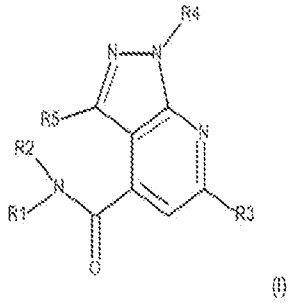
9052 GENT

België

(54) Pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide nitrificatieremmer

(57)

Het gebruik van een pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide van de algemene formule (I)



met de volgende definities: R1-waterstof of C1-4-alkyl, R2C1-12-koolwaterstofresidu dat één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel, waarbij R1 en R2, samen met het stikstofatoom dat hen verbindt, ook een verzadigde of onverzadigde heterocyclische radicaal met vijf of zes leden kunnen vormen, die naar keuze ook één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel, R3C1-12-koolwaterstofresidu dat één heteroatoom kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel, R4C1-8-koolwaterstofresidu, R5-waterstof of C1-4-alkyl, als nitrificatieremmer.

Pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide nitrificatieremmer

Beschrijving

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op het gebruik van een pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide als nitrificatieremmer of als stikstofstabilisator, op meststofmengsels die het bevatten, op een procedé voor de bereiding ervan, en op de methode voor de bemesting van de bodem die de toepassing ervan omvat.

Om planten in de land- of tuinbouw te voorzien van de stikstof die zij nodig hebben, worden vaak meststoffen gebruikt die ammoniumverbindingen bevatten.

Ammoniumverbindingen worden in de bodem binnen betrekkelijk korte tijd microbiëel omgezet in nitraat (nitrificatie). Nitraat kan echter uit de bodem worden geloofd. De uitgespoelde fractie is niet langer beschikbaar voor plantenvoeding, en om die reden is snelle nitrificatie ongewenst. Om de meststof doeltreffender te benutten, worden daarom nitrificatieremmers aan de meststof toegevoegd. Een bekende groep nitrificatieremmers zijn pyrazoolverbindingen.

Een probleem bij het gebruik van pyrazoolverbindingen als nitrificatieremmers is hun hoge vluchtigheid. Bij de opslag van meststofpreparaten die pyrazoolverbindingen bevatten, treedt dan ook een voortdurend verlies van werkzame stof op ten gevolge van verdamping. Daarom moeten de pyrazoolverbindingen door middel van passende maatregelen in een niet-vluchtige vorm worden geformuleerd.

EP-B-1 120 388 beschrijft additiezouten in fosforzuur van 3,4-dimethylpyrazool en 4-chloor-3-methylpyrazool voor gebruik als nitrificatieremmer. Door de zoutvorm is het mogelijk de vluchtigheid aanzienlijk te verminderen.

WO 96/24566 heeft betrekking op het gebruik van laag-volatiele pyrazoolderivaten met hydrofiele groepen als nitrificatieremmers. Als voorbeeld wordt 2-(N-3-methylpyrazool)barnsteenzuur (DMPSA) voorgesteld als nitrificatieremmer. Als geschikte minerale meststoffen worden ammoniumhoudende nitraten, sulfaten of fosfaten genoemd.

WO 2011/032904 en WO 2013/121384 beschrijven pyrazolderivaten als nitrificatieremmers, waarvan DMPSA er een is.

US 2018/0016199 A1 beschrijft pyrazoolverbindingen als nitrificatieremmers. De voorbeelden verwijzen naar verbindingen van een formule I waarin R3 en R4 een carbocyclisch residu kunnen vormen. De definitie in conclusie 1 staat ook toe dat R3 en R4 een heterocyclische ring vormen, maar er worden geen specifieke structuurvoorbeelden gegeven voor deze zeer ruime definitie. De verbindingen bevatten een C3-6 alkynylgroep gekoppeld aan één pyrazoolstikstofatoom.

US 2020/0062755 A1 vermeldt pesticidaal werkzame heterocyclische derivaten met zwavelhoudende substituenten die een N=S structurelement bevatten. Specifieke verbindingen bevatten een pyrazolo-pyridinegroep waarin de pyridinestikstof verwijderd is van de pyrazolonstikstof, zie de paragrafen [0151] en [0165] en tabel Q.

WO 2010/100475 A1 vermeldt hydroxaminezuurderivaten als gramnegatieve antibacteriële stoffen. Voorbeeld 145 B en voorbeeld 293 B laten verbindingen zien die een pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamidegroep bevatten waarin de stikstof van de carboxamide een waterstofatoom en een hydroxylgroep bevat.

De bekende nitrificatieremmers werken in op de nitrificerende ammonia-oxiderende bacteriën (AOB). Maar ook ammoniak-oxiderende archaea (AOA) bevorderen de nitrificatie van ammoniak. Eén daarvan is het ammoniak-oxiderende archaeon *Nitrososphaera viennensis*.

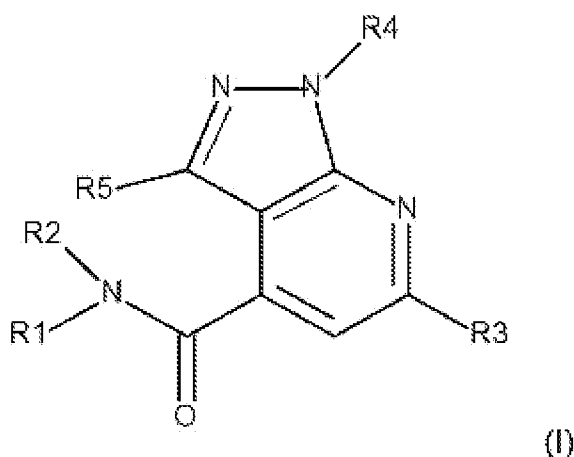
J. Zhao et al. in *Soil Biology and Biochemistry* 141 (2020) 107673 beschrijven het gebruik van simvastatine als een specifieke AOA-remmer in zuivere cultuur en in de bodem. Simvastatine is een gesubstitueerd hexahydronaphtalene-dimethylbutanuaat.

Het zou wenselijk zijn (verdere) nitrificatieremmers toe te passen die inwerken op ammoniak-oxiderende archaea (AOA) en/of comammoxbacteriën en die bij voorkeur de nitrificatieremming kunnen verbeteren wanneer ze gecombineerd worden met een AOB-remmer.

Het doel van de onderhavige uitvinding is nieuwe nitrificatieremmers te verschaffen. Een ander doel van de uitvinding is de ontwikkeling van een nitrificatieremmer die inwerkt op micro-organismen, met name op ammonia-oxiderende archaea (AOA) en/of comammoxbacteriën. Comammoxbacteriën zoals *Candidatus Nitrospira kreffii* zorgen voor volledige ammoniakoxidatie.

Een ander doel van de uitvinding is de ontwikkeling van een meststofmengsel dat een dergelijke nitrificatieremmer bevat, een methode voor de bereiding ervan en een methode voor de bemesting van de bodem met behulp van dit mengsel.

De doelstellingen worden bereikt door het gebruik van een pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide van de algemene formule (I)



met de volgende definities:

R1-waterstof of C1-4-alkyl,

10 R2C1-12-koolwaterstofresidu dat één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel, waarbij R1 en R2, samen met een stikstofatoom dat hen verbindt, ook een verzadigde of onverzadigde heterocyclische radicaal met vijf of zes leden kunnen vormen, die naar keuze ook één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel,

15 R3C1-12-koolwaterstofresidu dat één heteroatoom kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel,

R4C1-8-koolwaterstofresidu,

R5-waterstof of C1-4-alkyl,

als nitrificatieremmer, bij voorkeur inwerkend op een remmende AOA en/of comammox.

20 Daarin fungeren de verbindingen van de algemene formule (I) als nitrificatieremmers. Bovendien fungeren ze ook als stikstofstabilisator in vloeibare meststoffen of mest. Meststoffen kunnen organische en/of anorganische en/of organominerale meststoffen zijn.

Het doel wordt verder bereikt door het gebruik van de pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide als additief of bekledingsmateriaal voor, bij voorkeur anorganische, meststoffen, meer bij voorkeur ammonium- en/of ureumhoudende stikstofhoudende meststoffen.

- 5 Het doel wordt verder bereikt door het gebruik van pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide voor het verminderen van de stikstof- of koolstofverliezen in anorganische en/of organische en/of organominerale meststoffen en ook op oogstafval en weidegrond of tijdens de opslag van vloeibare mest, en voor het verminderen van de ammoniakbelasting in dierenstallen.
- 10 Het kan voorts nuttig zijn de nitrificatieremmer van pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide te gebruiken in combinatie met of vermengd met een aanvullend agrochemisch middel, bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit
- ten minste één andere nitrificatieremmer, bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit 2-(3,4-dimethyl-pyrazol-1-yl)-barnsteenzuur (DMPSA), 3,4-dimethylpyrazool (DMP), 3,4-dimethylpyrazoolfosfaat (DMPP) dicyaandiamide (DCD), 15 1H-1,2,4-triazool, 3-methylpyrazool (3-MP), 2-chloor-6-(trichloormethyl)-pyridine, 5-ethoxy-3-trichloormethyl-1,2,4-thiadiazol, 2-amino-4-chloor-6-methyl-pyrimidine, 2-mercapto-benzothiazool, 2-sulfanilamidothiazool, thiourem, natriumazide, kaliumazide, 1-hydroxypyrazool, 2-methylpyrazool-1-carboxamide, 4-amino-1,2,4-triazool, 3-20 mercapto-1,2,4-triazool, 2,4-diamino-6-trichloormethyl-5-triazine, koolstofbisulfide, ammoniumthiosulfaat, natriumtrithiocarbonaat, 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranolmethylcarbamaat en N-(2,6-dimethylfenyl)-N-(methoxyacetyl)-alanine-methylester, comammoxremmers,
 - ten minste één ureaseremmer, bij voorkeur gekozen uit N-25 butylthiofosforzuurtriamide (NBTP) en/of N-n-propylthiofosforzuurtriamide (NPTPT),
 - ten minste één gebruikelijke agrochemische hulpstof, bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit waterige en/of organische oplosmiddelen, pH-regelaars, oppervlakreactieve stoffen, bevochtigingsmiddelen, spreidingsmiddelen, adhesiebevorderaars, dragers, vulstoffen, viscositeitsregelaars, emulgatoren, 30 dispergeermiddelen, sequestreermiddelen antizinkmiddelen, coalescentiemiddelen, reologiemodificatoren, antischuimmiddelen, fotobeschermingsmiddelen, antivriesmiddelen, biostimulanten, pesticiden, biociden, plantengroeiregulatoren,

beschermstoffen, penetrerende middelen, antiklontermiddelen, minerale en/of plantaardige oliën en/of wassen, kleurstoffen en driftwerende middelen, en mengsels daarvan.

5 Wanneer de extra nitrificatieremmer wordt gebruikt, is de gewichtsverhouding tussen pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide en de extra nitrificatieremmer bij voorkeur 0,1 : 10 : 1, bij voorkeur 0,2 : 5 : 1, en het meest bij voorkeur 0,5 : 2 : 1.

Daarom kan de nitrificatieremmer volgens de onderhavige uitvinding voordelig worden gebruikt samen met of in combinatie met nitrificatieremmers die bij voorkeur ammonia-oxiderende bacteriën (AOB) en/of comammoxbacteriën remmen.

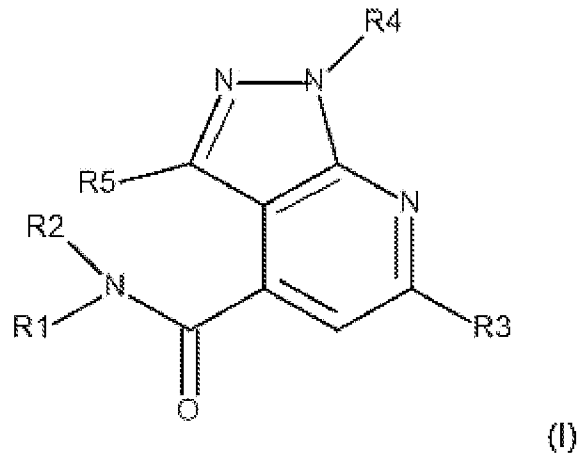
10 Bovendien zijn archaea niet of slechts in geringe mate doelwit van de meeste (AOB) nitrificatieremmers. Wanneer de nieuwe archaea gerichte nitrificatieremmers samen met andere nitrificatieremmers werden gebruikt, werd de nitrificatie in landbouwgrond op synergetische wijze teruggedrongen. Dit wijst er enerzijds op dat archaea een significante bijdrage leveren aan de nitrificatie in landbouwgrond, en anderzijds, wat belangrijker is,
15 dat het nieuwe type nitrificatieremmer kan worden gebruikt om de stikstofverliezen nog verder terug te dringen, inclusief vermindering van de uitstoot van broeikasgassen. Analyse van met DMP behandelde bodem op de abundantie van ammoniak-oxiderende archaea toonde aan dat DMP, zoals verwacht, geen remmend effect had op de aanwezigheid van archaea. Daarentegen had DMP in sommige gevallen een positief
20 effect op de abundantie van ammoniak-oxiderende archaea. Hoewel DMP dus de bacteriële nitrificatie remt, kan het de archaea-nitrificatie versterken, waarschijnlijk omdat DMP bacteriën blokkeert die om hetzelfde substraat concurreren als de archaea. Dit verklaart ook het synergetische effect. Het combineren van de twee soorten remmers kan leiden tot een verdere vermindering van stikstofverliezen, en daarmee van de N-vraag en
25 het nadelige effect van N-meststoffen op het milieu en het klimaat.

Voorts kan, met name wanneer de anorganische meststof ureum bevat, de nitrificatieremmer ook worden gebruikt samen met of in combinatie met een ureaseremmer, die bij voorkeur wordt gekozen uit N-n-butylthiofosfortriamide (NBTPPT of NBPT) en/of N-n-propylthiofosfortriamide (NPTPT of NPPT).

30 Indien de carboxamideverbinding van algemene formule (I) van de onderhavige uitvinding gecombineerd wordt met N-n-butylthiofosfortriamide (NBTPPT) en/of N-n-propylthiofosfortriamide (NPTPT), ligt de gewichtsverhouding tussen nitrificatieremmer(s)

en ureaseremmer bij voorkeur tussen 0,1 en 10 : 1, bij voorkeur tussen 0,5 en 8 : 1, en bij voorkeur tussen 1 en 6 : 1.

Daarom heeft de uitvinding ook betrekking op een mengsel dat ten minste één pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide van de algemene formule (I) bevat



5

met de volgende definities:

R1-waterstof of C1-4-alkyl,

R2C1-12-koolwaterstofresidu dat één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel, waarbij R1 en R2, samen met het stikstofatoom dat hen verbindt, ook een verzadigde of onverzadigde heterocyclische radicaal met vijf of zes leden kunnen vormen, die naar keuze ook één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel,

R3C1-12-koolwaterstofresidu dat één heteroatoom kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel,

15 R4C1-8-koolwaterstofresidu,

R5-waterstof of C1-4-alkyl,

en ten minste één aanvullend agrochemisch agens, bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit

20 - ten minste één andere nitrificatieremmer, bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit 2-(3,4-dimethyl-pyrazol-1-yl)-barnsteenzuur (DMPSA), 3,4-dimethylpyrazool (DMP), 3,4-dimethylpyrazoolfosfaat (DMPP) dicyaandiamide (DCD), 1H-1,2,4-triazool, 3-methylpyrazool (3-MP), 2-chloor-6-(trichloormethyl)-pyridine, 5-ethoxy-3-trichloormethyl-1,2,4-thiadiazol, 2-amino-4-chloor-6-methyl-pyrimidine, 2-

mercapto-benzothiazool, 2-sulfanilamidothiazool, thiouream, natriumazide, kaliumazide, 1-hydroxypyrazool, 2-methylpyrazool-1-carboxamide, 4-amino-1,2,4-triazool, 3-mercapto-1,2,4-triazool, 2,4-diamino-6-trichloormethyl-5-triazine, koolstofbisulfide, ammoniumthiosulfaat, natriumtrithiocarbonaat, 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranolmethylcarbamaat en N-(2,6-dimethylfenyl)-N-(methoxyacetyl)-alanine-methylester, comammoxremmers,

- ten minste één ureaseremmer, bij voorkeur gekozen uit N-butylthiofosforzuurtriamide (NBTP) en/of N-n-propylthiofosforzuurtriamide (NPTPT),

- ten minste één gebruikelijke agrochemische hulpstof, bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit waterige en/of organische oplosmiddelen, pH-regelaars, oppervlakreactieve stoffen, bevochtigingsmiddelen, spreidingsmiddelen, adhesiebevordersaars, dragers, vulstoffen, viscositeitsregelaars, emulgatoren, dispergeermiddelen, sequestreermiddelen antizinkmiddelen, coalescentiemiddelen, reologiemodificatoren, antischuimmiddelen, fotobeschermingsmiddelen, antivriesmiddelen, biostimulanten, pesticiden, biociden, plantengroeiregulators, beschermstoffen, penetrerende middelen, antiklontermiddelen, minerale en/of plantaardige oliën en/of wassen, kleurstoffen en driftwerende middelen, en mengsels daarvan.

Bij voorkeur is het gebruikelijke agrochemische hulpmiddel geen waterig en/of organisch oplosmiddel, minerale en/of plantaardige olie of was.

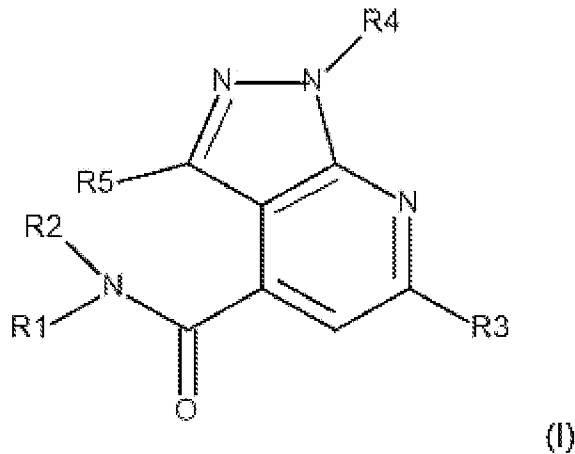
Een combinatie met ten minste één andere nitrificatieremmer en/of ureaseremmer verdient de voorkeur.

Volgens de onderhavige uitvinding is gebleken dat chemische structuren die pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide bevatten, sterke nieuwe nitrificatieremmers zijn en, in tegenstelling tot de gewoonlijk gebruikte nitrificatieremmers, gericht zijn tegen ammonia-oxiderende archaea (AOA) en bij voorkeur ook tegen comammoxbacteriën, maar gewoonlijk niet tegen bacteriën (AOB). Daarom kunnen zij voor een betere nitrificatieremmende werking worden gecombineerd met een andere nitrificatieremmer die gericht is tegen bacteriën (AOB) en/of comammoxbacteriën.

Het nieuwe type nitrificatieremmers is in staat nitrificatie te remmen, vooral in de bodem, en indien gecombineerd met een bacteriële nitrificatieremmer, d.w.z. een nitrificatieremmer die inwerkt op ammoniak-oxiderende bacteriën (AOB) en eventueel

comammoxbacteriënremmers, verhoogt dit de efficiëntie van nitrificatieremming tot boven het niveau dat mogelijk is met de momenteel toegepaste remmers.

Volgens de huidige uitvinding kan een pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide van de algemene formule (I)



5

met de volgende definities:

R1-waterstof of C1-4-alkyl,

R2C1-12-koolwaterstofresidu dat één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel, waarbij R1 en R2, samen met een stikstofatoom dat hen verbindt, ook een verzadigde of onverzadigde heterocyclische radicaal met vijf of zes leden kunnen vormen, die naar keuze ook één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel,

R3C1-12-koolwaterstofresidu dat één heteroatoom kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel,

R4C1-8-koolwaterstofresidu,

R5-waterstof of C1-4-alkyl

wordt gebruikt als nitrificatieremmer op vaste meststoffen, bij voorkeur in combinatie met een meststof, bij voorkeur een (ammonium)stikstofhoudende meststof, bijvoorbeeld een vaste of vloeibare anorganische, organische en/of organominerale meststof, of mest. De heterocyclische verbinding wordt bijvoorbeeld gebruikt als nitrificatieremmer of wordt gebruikt als stikstofremmer of als stikstofstabilisator in vloeibare organische en/of anorganische of organominerale meststoffen of mest.

20

De pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamideverbindingen zijn meestal op zichzelf bekend en kunnen volgens standaardtechnieken worden gesynthetiseerd. Het zijn gedeeltelijk commercieel verkrijgbare verbindingen die kunnen worden betrokken bij Enamine (SIA Enamine, Vestienas iela 2 B, LV-1035 Riga, Letland - <https://enamine.net/>).

- 5 Bij voorkeur zijn de verbindingen van de algemene formule (I) vrij van alkynyl- of allenylgroepen of structurelementen. Bij voorkeur bevatten de verbindingen van de algemene formule (I) geen C3-6 alkynylgroepen of C3-6 allenylgroepen, in het bijzonder niet die groepen die als R1 worden afgebeeld in formule I van claim 1 van US 2018/0016199 A1.
- 10 Verder zijn de verbindingen van de algemene formule (I) bij voorkeur vrij van het structurelement N=S. Meer bij voorkeur zijn de verbindingen van de algemene formule (I) vrij van het structurelement C(=O)-N=S, met name het overeenkomstige structurelement dat wordt weergegeven in formule 1 in conclusie 1 van US 2020/0062755 A1.
- 15 De verbindingen van de algemene formule (I) zijn geannuleerde of gesubstitueerde pyrazoolverbindingen.
- Specifiek is R4 in algemene formule (I) geen alkynyl- of allenylgroep en bevat het geen alkynyl- of allenylgroep, meer specifiek een C3-6 alkynyl- of C3-6 allenylgroep, bv. zoals beschreven in US 2018/0016199 A1 in formule I als groep R1.
- 20 In de verbindingen van de algemene formule (I) zijn sommige van de residuen koolwaterstofresiduen. Koolwaterstofresiduen zijn samengesteld uit waterstof- en koolstofatomen. Zij kunnen verzadigd, onverzadigd of aromatisch zijn. Bovendien kunnen zij de heteroatomen bevatten die hierboven zijn genoemd. De koolwaterstofresiduen kunnen lineair, vertakt of cyclisch zijn, of kunnen een lineair of vertakt residu en een
- 25 cyclisch residu in dezelfde structuur bevatten.
- Als er meer dan één heteroatoom in de structuur aanwezig is, zijn heteroatomen van hetzelfde type niet direct covalent met elkaar verbonden. Bij voorkeur zijn de heteroatomen niet direct covalent verbonden met andere heteroatomen, maar doorsnijden zij het koolwaterstofresidu. Daarom zijn de heteroatomen bij voorkeur niet-
- 30 aangrenzend.
- Bij voorkeur zijn R1 en/of R5, onafhankelijk van elkaar, waterstof, methyl of ethyl, bij voorkeur waterstof of methyl.

Bij voorkeur is R2 een C2-10-koolwaterstofresidu, dat één of twee heteroatomen bevat, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel, en bij voorkeur een C3-8-koolwaterstofresidu, dat één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel.

- 5 Bij voorkeur bevat R2 als heteroatomen een of twee zuurstofatomen, of een stikstofatoom, of een stikstofatoom en een zuurstofatoom, of een stikstofatoom en een zwavelatoom.

Bij voorkeur is R2 een verzadigd lineair of vertakt koolwaterstofresidu, een lineair koolwaterstofresidu met een cyclisch heteroalkylresidu of een aromatisch of
10 heteroaromatisch residu, waarbij het koolwaterstofresidu één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep zuurstof en stikstof, of waarbij R2 een onverzadigd heterocyclisch residu is.

Bij voorkeur is R3 een C3-7-koolwaterstofresidu dat één zuurstofatoom kan bevatten, bij voorkeur een vertakt of cyclisch koolwaterstofresidu dat één zuurstofatoom kan bevatten.

- 15 Bij voorkeur is R4 C1-8-alkyl, bij voorkeur C1-6-alkyl, meer bij voorkeur C1-4-alkyl. Het meest bij voorkeur wordt R4 gekozen uit methyl, ethyl, isopropyl en tert.-butyl.

Alkylresiduen kunnen lineair of vertakt zijn.

Cyclische groepen in de residuen zijn bij voorkeur ringen met 5 of 6 leden die verzadigd, onverzadigd of aromatisch kunnen zijn. De ringen kunnen zuiver koolwaterstofhoudend
20 zijn, b.v. fenyagroepen. Zij kunnen ook stikstof of zuurstof als heteroatoom bevatten, bij voorkeur één stikstof- of zuurstofatoom. Voorbeelden van deze residuen worden in de onderstaande voorbeelden genoemd.

De verbindingen van de algemene formule (I) zijn nitrificatieremmers die remmend werken op de ammoniakoxiderende archaea (AOA), waaronder de ammoniakoxiderende
25 archaeon *Nitrososphaera viennensis*, Ammoniak Bindend Vloeibaar Inculum (ABIL) en bij voorkeur ook op comammoxbacteriën (volledige ammoniakoxidatie) zoals *Candidatus Nitrospira kreffii*.

De nitrificatieremmer van de onderhavige uitvinding valt met name op door het feit dat hij de nitrificatie van ammoniumstikstof in de bodem gedurende een lange periode effectief
30 remt.

Verwacht wordt dat de nitrificatieremmer van de onderhavige uitvinding gunstige toxicologische eigenschappen bezit, een lage dampspanning heeft en goed in de bodem

wordt gesorbeerd. Dientengevolge wordt de nitrificatieremmer niet in significante mate door sublimatie in de atmosfeer uitgestoten, noch wordt hij gemakkelijk door water uitgespoeld. Hieruit vloeien in de eerste plaats economische voordelen voort, zoals een hoge rentabiliteit gezien de langduriger werking van het nitrificatieremmer, en
5 milieuvordelen, zoals een vermindering van de belasting van de lucht (klimaatgasreductie) en van het oppervlakte- en grondwater.

De nitrificatieremmers kunnen worden toegepast op bodems of substraten die worden bemest met een anorganische of organische of organominerale meststof. Gewoonlijk worden zij toegepast in een meststofmengsel dat een (bij voorkeur anorganische)
10 meststof en de pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamideverbinding bevat. Gewoonlijk wordt de pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide gebruikt in een hoeveelheid van 10 tot 10.000 ppm per gewicht, bij voorkeur 100 tot 10.000 ppm per gewicht, op basis van de (bij voorkeur anorganische) meststof zonder water. De gebruikte hoeveelheid is gebaseerd op de droge meststof.

15 De nitrificatieremmer volgens de onderhavige uitvinding kan worden gebruikt in stof, in oplossing, dispersie of emulsie. Daarom heeft de uitvinding ook betrekking op een oplossing, dispersie of emulsie die de pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide van de onderhavige uitvinding bevat, bij voorkeur in een hoeveelheid van 0,1 tot 50 wt%, bij voorkeur 0,5 tot 30 wt%, en bij voorkeur 1 tot 20 wt%.

20 Bij voorkeur wordt volgens de onderhavige uitvinding een meststofmengsel gevormd, dat verbindingen A en B bevat

A. een anorganische en/of organische en/of organominerale meststof en

B. 10 tot 10000 gewichtsprocenten, bij voorkeur 100 tot 10000 gewichtsprocenten, berekend op de bij voorkeur anorganische meststof, van de pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-
25 carboxamideverbinding als hierboven omschreven.

De waterfractie in component A en in het meststoffenmengsel bedraagt vaak niet meer dan 1,5 wt%, bij voorkeur niet meer dan 1,0 wt%, bij voorkeur niet meer dan 0,5 wt%, bij voorkeur niet meer dan 0,3 wt%, en is dus verwaarloosbaar in de balans van de hoeveelheden. De bestanddelen A en B vormen bij voorkeur ten minste 95 gew%, bij
30 voorkeur ten minste 98 gew% van het meststoffenmengsel.

Het stikstofgehalte van verbinding A (zonder water) bedraagt vaak ten minste 12 wt%, bij voorkeur ten minste 20 wt%, bij voorkeur ten minste 22 wt%. Het stikstofgehalte kan

bijvoorbeeld 25 tot 29 wt% bedragen, in het bijzonder 26 tot 28 wt%. Het stikstofgehalte kan worden verdeeld over snel werkende nitraatstikstof en langzaam werkende ammoniumstikstof.

5 De anorganische meststoffen zijn bij voorkeur ammonium- en/of ureumhoudende meststoffen, bij voorkeur ammoniumhoudende meststoffen die bovendien ureum kunnen bevatten.

Ureum bevattende meststoffen worden verder beschreven in WO 2016/207210.

10 De meststoffen die volgens de onderhavige uitvinding worden gebruikt, kunnen van natuurlijke of synthetische oorsprong zijn en worden op de bodem of op plantweefsels aangebracht om een of meer plantenvoedingsstoffen te leveren die essentieel zijn voor de groei van planten. De meststoffen die volgens de onderhavige uitvinding worden gebruikt, moeten ten minste stikstof als nutriënt leveren. Andere nutriënten zijn bijvoorbeeld K en P. Multinutriëntenmeststoffen of complexe meststoffen leveren twee of meer nutriënten. Anorganische meststoffen bevatten geen koolstofhoudende stoffen, 15 behalve ureum. Organische meststoffen zijn meestal van planten of dieren afkomstig materiaal. Organominerale meststoffen (combinaties van anorganische en organische meststoffen) kunnen eveneens worden gebruikt.

20 De belangrijkste enkelvoudige meststof op basis van stikstof is ammoniak of oplossingen daarvan. Ammoniaknitraat wordt ook veel gebruikt. Ureum is een andere populaire bron van stikstof, met het voordeel dat het vast en niet-explosief is. Een andere meststof op basis van stikstof is calciumammoniumnitraat.

De belangrijkste enkelvoudige fosfaatmeststoffen zijn de superfosfaten, waaronder enkelvoudig superfosfaat, fosfogips en drievoudig superfosfaat. De belangrijkste kaliumhoudende enkelvoudige meststof is kaliummuriat (MOP).

25 De binaire meststoffen zijn bij voorkeur NP- of NK-meststoffen, die kunnen bestaan uit monoammoniumfosfaat (MAP) en diammoniumfosfaat (DAP).

30 NPK-meststoffen zijn drie-componenten-meststoffen die stikstof, fosfor en kalium leveren. NPK-meststoffen kunnen worden geproduceerd door het mengen van de bovengenoemde enkelvoudige meststoffen in bulk of in korrels per stuk, zoals in Nitrophoska®. In sommige gevallen kunnen chemische reacties optreden tussen de twee of meer componenten.

Naast de hoofdbestanddelen, zoals N, P en K, kunnen micronutriënten (sporenelementen) in de meststoffen aanwezig zijn. De belangrijkste micronutriënten zijn molybdeen, zink, borium en koper. Deze elementen worden meestal als in water oplosbare zouten geleverd.

- 5 De meststoffen die de voorkeur genieten, bevatten ammonium of ureum. Voorbeelden van ammoniumhoudende meststoffen die de voorkeur genieten zijn NPK-meststoffen, calciumammoniumnitraat, ammoniumsulfaatnitraat, ammoniumsulfaat en ammoniumfosfaat.

10 Andere geprefereerde ingrediënten van de meststofsamenstellingen zijn bijvoorbeeld sporenelementen, andere mineralen, standaardisatoren en bindmiddelen.

Biologische meststoffen zijn meststoffen met een organische of biologische oorsprong, d.w.z. meststoffen die afkomstig zijn van levende of voorheen levende materialen, zoals dieren, planten of algen. Meststoffen van biologische oorsprong zijn onder meer dierlijk afval, plantaardig afval, bijvoorbeeld van de voedselverwerking of de landbouw, compost
15 en behandeld zuiverings-slib (biosolids). Dierlijke bronnen kunnen mest zijn, maar ook producten van het slachten van dieren, zoals bloedmeel, beendermeel, verenmeel, huiden, hoeven en hoorns.

Bodemverbeteraars, zoals turf of kokos, schors en zaagsel, kunnen ook worden toegevoegd.

- 20 Meststoffen kunnen onder meer zijn: ammoniumsulfaat, ammoniumnitraat, ammoniumsulfaatnitraat, ammoniumchloride, ammoniumbisulfaat, ammoniumpolysulfide, ammoniumthiosulfaat, waterige ammoniak, watervrije ammoniak, ammoniumpolyfosfaat, aluminiumsulfaat, calciumnitraat, calciumammoniumnitraat, calciumsulfaat gebrand magnesiet, calcietskalksteen, calciumoxide, hampeen
25 (gechelateerd ijzer), dolomietkalksteen, hydraatkalk, calciumcarbonaat, diammoniumfosfaat, monoammoniumfosfaat, kaliumnitraat, kaliumbicarbonaat, monopotassiumfosfaat, magnesiumnitraat, magnesiumsulfaat, kaliumsulfaat, kaliumchloride, natriumnitraten, magnesiumische kalksteen, magnesia, dinatriumdihydromolybdaat, kobaltchloride-hexahydraat, nikkelchloride-hexahydraat,
30 indoolboterzuur, L-tryptofaan, ureum, ureum-formaldehyden, ureum-ammoniumnitraat, ureum met zwavelcoating, ureum met polymeercoating, isobutylideendiureum, $K_2SO_4 \cdot 2MgSO_4$, kainiet, sylvinit, kieseriet, Epsomzouten, elementaire zwavel, mergel, gemalen oesterschelpen, vismeel, oliekoeken, vismest, bloedmeel, rotsfosfaat,

superfosfaten, slakken, beendermeel, houtas, biochar, algen, algenextracten, struviet, mest, vleermuisguano, turfmolm, compost, groen zand, katoenzaadmeel, verenmeel, krabmeel, visemulsie of een combinatie daarvan. Het micronutriëntenmeststofmateriaal kan boorzuur, een boraat, een boorfrit, kopersulfaat, een kopersfrit, een koperchelaat, 5 een natriumtetraboraatdecahydraat, een ijzersulfaat, een ijzeroxide, ijzerammoniumsulfaat, een ijzersfrit, een ijzerchelaat, een mangaansulfaat, een mangaansulfaat, een ijzeroxide, een ijzeroxide, een ijzerchelaat of een combinatie daarvan bevatten, mangaansulfaat, mangaanoxide, mangaanchelaat, mangaanchloride, mangaanfrit, natriummolybdaat, molybdizuur, zinksulfaat, zinkoxide, zinkcarbonaat, 10 zinkfrit, zinkfosfaat, zinkchelaat of een combinatie daarvan. In een bijzondere belichaming bevat genoemde meststof of meststofsamenstelling geen onoplosbaar selenium, seleniummineraal, oplosbaar selenium of zouten daarvan.

De behandelde (anorganische, organische of organominerale) meststoffen volgens de uitvinding zijn bij voorkeur aanwezig in poedervorm, in prilvorm of in korrelvorm.

15 Naast de heterocyclische carboxamideverbinding van formule (I) kunnen formuleringen die de verbinding en agronomische hulpstoffen bevatten, worden gebruikt om de nitrificatieremmer in de meststof op te nemen. Agronomische hulpstoffen zijn bijvoorbeeld oplosmiddelen, dispergeermiddelen, pH-regelaars, vulstoffen, stabiliteitsverbeteraars, oppervlakte-actieve stoffen.

20 De nitrificatieremmer kan in het meststoffenmengsel worden opgenomen door het mengsel of de formulering die het bevat te mengen met een vaste of vloeibare meststof of meststofformulering. Bij voorkeur is het meststofmengsel in vaste vorm en wordt de nitrificatieremmer op het oppervlak van de (anorganische, organische of organinerale) meststof aangebracht.

25 In een proces voor de productie van het meststofmengsel van de onderhavige uitvinding kan de nitrificatieremmer of de formulering die deze bevat, worden ingebracht in de (anorganische, organische of organominerale) meststof en/of worden aangebracht op het oppervlak van de (anorganische, organische of organominerale) meststof.

Mestkorrels worden geïmpregneerd of bedekt met de nitrificatieremmer, bijvoorbeeld 30 door ze te besproeien met een formulering zoals een oplossing of een dispersie van de nitrificatieremmer en ze vervolgens te drogen. De methode is bijvoorbeeld bekend uit DE-A-41 28 828. Het verzegelen van de geïmpregneerde korrels met bijvoorbeeld

paraffinewas, een aanvullend voorstel in laatstgenoemd document, is mogelijk, maar in het algemeen niet nodig.

Granulerende hulpstoffen die kunnen worden gebruikt voor de bereiding van vaste meststofsamenstellingen kunnen kalk, gips, siliciumdioxide of kaoliniet zijn.

- 5 Een alternatief is de toevoeging van de nitrificatieremmer tijdens de eigenlijke productie van de meststof, bijvoorbeeld in de drijfmest.

In de regel worden nitrificatieremmers in hoeveelheden van 100 g/ha tot 10 kg/ha op de bodem gebracht. Bij voorkeur ligt de hoeveelheid tussen 200 g/ha en 5 kg/ha.

- 10 De toediening van de nitrificatieremmer in vloeibare meststofformuleringen kan bijvoorbeeld geschieden door fertigatie met of zonder overmaat water, zoals beschreven in DE-C-102 30 593.

- Het meststofmengsel kan ten minste één extra nitrificatieremmer bevatten. Deze ten minste één verdere nitrificatieremmer remt bij voorkeur de ammoniakoxiderende bacteriën (AOB) en wordt bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit 2-(3,4-dimethyl-pyrazol-1-yl)-barnsteenzuur, 3,4-dimethylpyrazool (DMP), 3,4-dimethylpyrazoolfosfaat (DMPP), dicyaandiamide (DCD), 1H-1,2,4-triazool, 3-methylpyrazool (3-MP), 2-chloor-6-(trichloormethyl)-pyridine, 5-ethoxy-3-trichloormethyl-1,2,4-thiadiazol, 2-amino-4-chloor-6-methyl-pyrimidine, 2-mercapto-benzothiazool, 2-sulfanilamidothiazool, thiourem, natriumazide, kaliumazide, 1-hydroxypyrazool, 2-methylpyrazool-1-carboxamide, 4-amino-1,2,4-triazool, 3-mercapto-1,2,4-triazool, 2,4-diamino-6-trichloormethyl-5-triazine, koolstofbisulfide, ammoniumthiosulfaat, natriumtricarbonaat, 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranolmethylcarbamaat en N-(2,6-dimethylfenyl)-N-(methoxyacetyl)-alanine-methylester.

- 25 Wanneer de extra nitrificatieremmer wordt gebruikt, is de gewichtsverhouding tussen pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide en de extra nitrificatieremmer bij voorkeur 0,1 : 1, bij voorkeur 0,2 : 1, bij voorkeur 0,2 : 5 : 1, en het meest bij voorkeur 0,5 : 2 : 1.

- Voorts kan het meststofmengsel ten minste één ureaseremmer bevatten, die bij voorkeur wordt gekozen uit N-n-butylthiofosforzuur-triamide (NBTPT of NBPT) en/of N-n-propylthiofosforzuur-triamide (NPTPT of NPPT). Een ureaseremmer wordt gewoonlijk toegevoegd wanneer de meststof ureum bevat. Stikstof uit ureum komt door de werking van urease vrij in de vorm van ammonium, en het ammonium kan nitrificatie ondergaan.

Daarom kan het voordelig zijn om een ureaseremmer te combineren met de nitrificatieremmer.

Indien de pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide van de onderhavige uitvinding gecombineerd wordt met N-n-butylthiofosfortriamide (NBTPT) en/of N-n-propylthiofosfortriamide (NPTPT), ligt de gewichtsverhouding tussen nitrificatieremmer en ureaseremmer bij voorkeur tussen 0,1 en 10 : 1, bij voorkeur tussen 0,5 en 8 : 1, en bij de meeste voorkeur tussen 1 en 6 : 1.

Van thiofosfortriamiden is bekend dat zij betrekkelijk gemakkelijk worden omgezet in de overeenkomstige fosfortriamiden en thiofosfortdiamiden, alsmede in andere metabolieten. Aangezien vocht in het algemeen niet volledig kan worden uitgesloten, zijn thiofosforhoudende triamiden en de overeenkomstige fosforhoudende triamiden vaak in een mengsel met elkaar aanwezig. In deze specificatie worden daarom met de term "(thio)fosforzuurtriamide" niet alleen de zuivere thiofosforzuurtriamiden, respectievelijk fosforzuurtriamiden aangeduid, maar ook mengsels daarvan.

Volgens de onderhavige uitvinding kunnen ook mengsels van N-(n-butyl)thiofosfortriamide en N-(n-)propylthiofosfortriamide worden gebruikt, zoals beschreven in EP-A-1 820 788.

De meststofmengsels kunnen andere ingrediënten bevatten, zoals coatings, bijvoorbeeld van anorganische of organische polyzuren, die worden beschreven in US 6.139.596.

Verder kunnen coatings van poeders, prils en granules worden gevormd van anorganisch materiaal, zoals coatings op zwavel- of mineraalbasis, of met een organisch polymeer. Respectieve coatings worden beschreven in WO 2013/121384 op pagina 23, regel 37 tot pagina 24, regel 16.

Zoals hierboven vermeld, worden de agrochemische formuleringen die de verbindingen van formule (I) bevatten, gebruikt in "effectieve hoeveelheden". Dit betekent dat zij worden gebruikt in een hoeveelheid die het mogelijk maakt het gewenste effect te verkrijgen, namelijk een (synergistische) verbetering van de gezondheid van een plant, maar die geen aanleiding geeft tot fytotoxische symptomen op de behandelde plant.

Voor gebruik volgens de onderhavige uitvinding kunnen de agrochemische formuleringen die de verbindingen van formule (I) bevatten, worden omgezet in de gebruikelijke formuleringen, bijvoorbeeld oplossingen, emulsies, suspensies, stof, poeders, pasta's en korrels. De gebruiksvorm hangt af van het specifieke beoogde doel; in elk geval moet het

zorgen voor een fijne en gelijkmatige verdeling van de agrochemische formuleringen die de verbindingen van formule (I) bevatten volgens de huidige uitvinding. De formuleringen worden op een voor de vakman bekende wijze bereid.

De agrochemische formuleringen kunnen ook hulpstoffen bevatten die gebruikelijk zijn in agrochemische formuleringen. Welke hulpstoffen worden gebruikt, hangt af van respectievelijk de specifieke toepassingsvorm en de werkzame stof. Voorbeelden van geschikte hulpstoffen zijn oplosmiddelen, vaste dragers, disperseermiddelen of emulgatoren (zoals verdere oplosbaarheidsbevorderende stoffen, beschermende colloïden, oppervlakteactieve stoffen en adhesiemiddelen), organische en anorganische verdikkingsmiddelen, bactericiden, antivriesmiddelen, antischuimmiddelen, eventueel kleurstoffen en tackifieermiddelen of bindmiddelen (bijvoorbeeld voor formuleringen voor zaadbehandeling).

Geschikte oplosmiddelen zijn water, organische oplosmiddelen zoals minerale oliefracties met een gemiddeld tot hoog kookpunt, zoals kerosine of dieselolie, voorts koolteerolie en oliën van plantaardige of dierlijke oorsprong, alifatische, cyclische en aromatische koolwaterstoffen, bijv. toluen, xyleen, paraffine, tetrahydronaftaleen, gealkyleerde naftalenen of derivaten daarvan, alcoholen zoals methanol, ethanol, propanol, butanol en cyclohexanol, glycolen, ketonen zoals cyclohexanon en gamma-butyrolacton, dimethylamiden van vetzuren, vetzuren en esters van vetzuren en sterk polaire oplosmiddelen, bijvoorbeeld aminen zoals N-methylpyrrolidon.

Vaste dragers zijn minerale aardmetalen zoals silicaten, silicagels, talk, kaolien, kalksteen, krijt, keileem, löss, klei, dolomiet, diatomeeënaarde, calciumsulfaat, magnesiumsulfaat, magnesiumoxide, gemalen synthetische stoffen, meststoffen zoals bv. ammoniumsulfaat, ammoniumfosfaat, ammoniumnitraat, ureum en producten van plantaardige oorsprong, zoals graanmeel, boomschorsmeel, houtmeel en notenschalenmeel, cellulosepoeders en andere vaste dragers.

Geschikte oppervlakte-actieve stoffen (hulpstoffen, bevochtigers, tackifiers, disperseermiddelen of emulgeermiddelen) zijn alkalimetaal-, aardalkalimetaal- en ammoniumzouten van aromatische sulfonzuren, zoals ligninesulfonzuur, fenolsulfonzuur, naftaleensulfonzuur, dibutylnaftaleensulfonzuur en vetzuren alkylsulfonaten, alkylarylsulfonaten, alkylsulfaten, laurylether-sulfaten, vetalcoholsulfaten en gesulfateerde hexa-, hepta- en octadecanolaten, gesulfateerde vetalcoholglycoethers, voorts

condensaten van naftaleen of van naftaleensulfonzuur met fenol en formaldehyde polyoxy-ethyleen-octylfenylether, geëthoxyleerd isooctylfenol, octylfenol, nonylfenol, alkylfenylpolyglycoethers, tributylfenylpolyglycoether, tristearylfenylpolyglycoether, alkylarylpolyetheralcoholen, alcohol- en vetalcohol/ethyleenoxidecondensaten, 5 geëthoxyleerde ricinusolie, polyoxyethyleenalkylethers, geëthoxyleerd polyoxypropyleen, laurylalcoholpolyglycoetheracetaal, sorbitolesters, lignine-sulfietafvalvloeistof en eiwitten, gedenatureerde eiwitten, polysacchariden (bijv. b.v. methylcellulose), hydrofoob gewijzigd zetmeel, polyvinylalcoholen, polycarboxylaten, polyalkoxylaten, polyvinylamines, polyvinylpyrrolidon en de copolymeren daarvan. Voorbeelden van 10 verdikkingsmiddelen (d.w.z. verbindingen die aan formuleringen een gewijzigde vloeibaarheid verlenen, d.w.z. een hoge viscositeit onder statische omstandigheden en een lage viscositeit bij agitatie) zijn polysacchariden en organische en anorganische klei zoals Xanthaangom.

Een "pesticide" is iets dat een schadelijk organisme ("plaag") of een ziekte voorkomt, 15 vernietigt of bestrijdt, of planten of plantaardige producten beschermt tijdens de productie, de opslag en het vervoer.

De term omvat onder meer: herbiciden, fungiciden, insecticiden, acariciden, nematiciden, molluskiciden, rodenticiden, groeiregulatoren, afweermiddelen, rodenticiden en biociden, alsmede gewasbeschermingsmiddelen.

20 Gewasbeschermingsmiddelen zijn "pesticiden" die gewassen of gewenste of beoogde planten beschermen. Zij worden hoofdzakelijk gebruikt in de landbouwsector, maar ook in de bosbouw, de tuinbouw, in recreatiegebieden en in tuinen voor eigen gebruik. Zij bevatten ten minste één werkzame stof en hebben een van de volgende functies:

25 -planten of plantaardige producten te beschermen tegen plagen/ziekten, voor of na de oogst;

-beïnvloeden de levensprocessen van planten (zoals stoffen die hun groei beïnvloeden, met uitzondering van voedingsstoffen);

-plantaardige producten te bewaren ;

30 -het vernietigen of voorkomen van de groei van ongewenste planten of delen van planten.

Zij kunnen ook andere bestanddelen bevatten, waaronder beschermstoffen en synergistische middelen.

Een werkzame stof is een chemische stof, een plantenextract, een feromoon of een micro-organisme (met inbegrip van virussen), die werkzaam is tegen "schadelijke organismen" of op planten, delen van planten of plantaardige producten.

Het meest gebruikelijke gebruik van pesticiden is in de vorm van gewasbeschermingsmiddelen (GBP's).

De term "pesticide" wordt vaak door elkaar gebruikt met "gewasbeschermingsmiddel", maar pesticide is een bredere term die ook andere toepassingen dan planten/gewassen omvat, bijvoorbeeld biociden.

Biociden, zoals herbiciden, bactericiden, mollusciciden, algiciden, fytotoxische stoffen, fungiciden, en mengsels daarvan kunnen worden toegevoegd.

Ter conservering en stabilisering van de formulering kunnen bactericiden worden toegevoegd. Voorbeelden van geschikte bactericiden zijn die op basis van dichlorofeen en benzylalcohol hemi-formal (Proxel® van ICI of Acticide® RS van Thor Chemie en Kathon® MK van Rohm & Haas) en isothiazolinone-derivaten zoals alkylisothiazolinonen en benzisothiazolinonen (Acticide® M BS van Thor Chemie). Voorbeelden van geschikte antivriesmiddelen zijn ethyleenglycol, propyleenglycol, ureum en glycerine. Voorbeelden voor antischuimmiddelen zijn siliconenemulsies (zoals bijvoorbeeld Silikon® SRE, Wacker, Duitsland of Rhodorsil®, Rhodia, Frankrijk), lange ketenalcoholen, vetzuren, zouten van vetzuren, fluororganische verbindingen en agrochemische formuleringen die de verbindingen van formule (I) daarvan bevatten.

Geschikte kleurstoffen zijn pigmenten met een lage oplosbaarheid in water en in oplosmiddelen oplosbare, b.v. in water oplosbare, kleurstoffen.

Voorbeelden van adhesiepromotoren, zoals tackifiers of binders, zijn polyvinylpyrrolidons, polyvinylacetaten, polyvinylalcoholen en cellulose-ethers (Tylose®, Shin-Etsu, Japan).

Granulaten, bijvoorbeeld gecoate granulaten, geïmpregneerde granulaten en homogene granulaten, kunnen worden bereid door de werkzame stoffen aan vaste dragers te binden. Voorbeelden van vaste dragers zijn minerale aardes zoals silicagels, silicaten, talk, kaolien, attaclay, kalksteen, kalk, krijt, bole, löss, klei, dolomiet, diatomeeënaarde, calciumsulfaat, magnesiumsulfaat, magnesiumoxide, gemalen synthetische stoffen,

meststoffen, zoals bijv, ammoniumsulfaat, ammoniumfosfaat, ammoniumnitraat, ureum, en producten van plantaardige oorsprong, zoals graanmeel, boomschorsmeel, houtmeel en notenschalenmeel, cellulosepoeders en andere vaste dragers.

Antiklontermiddelen zoals oliën en/of wassen kunnen worden toegevoegd.

- 5 De agrochemische formuleringen bevatten over het algemeen tussen 0,01 en 95%, bij voorkeur tussen 0,1 en 90%, en het meest bij voorkeur tussen 0,5 en 90%, in gewicht aan werkzame stoffen. De verbindingen van de agrochemische formuleringen die de verbindingen van formule (I) bevatten, worden gebruikt in een zuiverheid van 90% tot 100%, bij voorkeur van 95% tot 100% (volgens hun NMR-spectrum).
- 10 De verbindingen van de agrochemische formuleringen die de verbindingen van formule (I) bevatten, kunnen als zodanig of in de vorm van hun landbouwkundige samenstellingen worden gebruikt, b.v. in de vorm van rechtstreeks vernevelbare oplossingen, poeders, suspensies, dispersies, emulsies, oliedispersies, pasta's, stuifbare producten, stroommiddelen of granulaten, door middel van verstuiven, verstuiven, verstuiven,
- 15 uitspreiden, borstelen, onderdompelen of gieten. De toepassingsvormen hangen volledig af van de beoogde doeleinden; het is de bedoeling om in elk geval te zorgen voor een zo goed mogelijke verdeling van de verbindingen die aanwezig zijn in de agrochemische formuleringen die de verbindingen van formule (I) bevatten.

Waterige toepassingsvormen kunnen worden bereid uit emulsieconcentraten, pasta's of

20 bevochtigbare poeders (verspuitbare poeders, oliedispersies) door toevoeging van water. Voor de bereiding van emulsies, pasta's of oliedispersies kunnen de stoffen, als zodanig of opgelost in een olie of oplosmiddel, in water worden gehomogeniseerd met behulp van een bevochtiger, tackifieerder, dispergeermiddel of emulgator. Als alternatief kunnen

25 concentraten worden bereid die bestaan uit een werkzame stof, een bevochtigingsmiddel, een tackifieermiddel, een dispergeermiddel of een emulgator en eventueel een oplosmiddel of olie, en dergelijke concentraten zijn geschikt om met water te worden verdund.

De concentraties van de werkzame stoffen in de gebruiksklare preparaten kunnen binnen

30 betrekkelijk ruime marges worden gevarieerd. In het algemeen liggen zij tussen 0,0001 en 10%, bij voorkeur tussen 0,001 en 1%, van het gewicht van de verbindingen van de agrochemische formuleringen die de verbindingen van formule (I) bevatten.

De agrochemische formuleringen die de verbindingen van formule (I) bevatten, kunnen ook met succes worden gebruikt in het ultra-lage-volume-proces (ULV), waarbij het mogelijk is om composities toe te passen die meer dan 95 gewichtspercenten werkzame stof bevatten, of zelfs om de werkzame stof zonder additieven toe te passen.

- 5 Verschillende soorten oliën, bevochtigers, hulpstoffen, herbiciden, fungiciden, andere pesticiden, of bactericiden kunnen aan de actieve verbindingen worden toegevoegd, eventueel pas vlak voor het gebruik (tankmix). Deze middelen kunnen worden vermengd met de verbindingen van de agrochemische formuleringen die de verbindingen van formule (I) bevatten in een gewichtsverhouding van 1:100 tot 100:1, bij voorkeur 1:10 tot 10:1.

De samenstellingen van deze uitvinding kunnen ook meststoffen (zoals ammoniumnitraat, ureum, kalium en superfosfaat), fytotoxische stoffen en plantengroeiregulatoren (plant growth amendments) en beschermstoffen bevatten. Deze kunnen achtereenvolgens of in combinatie met de hierboven beschreven samenstellingen worden gebruikt, eventueel ook pas vlak voor gebruik toegevoegd (tankmix). De plant(en) kan (kunnen) bijvoorbeeld met een samenstelling van deze uitvinding worden besproeid, hetzij vóór, hetzij na de behandeling met de meststoffen.

In de agrochemische formuleringen die de verbindingen van formule (I) bevatten, hangt de gewichtsverhouding van de verbindingen in het algemeen af van de eigenschappen van de verbindingen van de agrochemische formuleringen die de verbindingen van formule (I) bevatten.

De agrochemische formuleringen die de verbindingen van formule (I) bevatten, kunnen afzonderlijk worden gebruikt of reeds geheel of gedeeltelijk met elkaar worden vermengd om de samenstelling volgens de uitvinding te bereiden. Zij kunnen ook worden verpakt en verder worden gebruikt als combinatiecompositie zoals een kit van onderdelen.

De gebruiker brengt de samenstelling volgens de uitvinding gewoonlijk aan vanuit een voordoseertoestel, een rugspuit, een spuittank of een sproeivliegtuig. Hierbij wordt de agrochemische samenstelling aangemaakt met water en/of buffer tot de gewenste toepassingsconcentratie, waarbij eventueel nog andere hulpstoffen kunnen worden toegevoegd, en aldus wordt de gebruiksklare spuitvloeistof of de agrochemische samenstelling volgens de uitvinding verkregen. Gewoonlijk wordt 50 tot 500 liter gebruiksklare spuitvloeistof per hectare nuttig landbouwareaal toegediend, bij voorkeur 50 tot 400 liter.

In een bijzondere belichaming wordt de absolute hoeveelheid van de werkzame stoffen, vertegenwoordigd door formule (I), gebruikt tussen 1 mg/liter en 100 mg/liter, in het bijzonder tussen 1 mg/liter en 20 mg/liter, in het bijzonder tussen 1 mg/liter en 25 mg/liter, in het bijzonder tussen 2 mg/liter en 200 mg/liter vooral tussen 2 mg/l en 100 mg/l, vooral
5 tussen 2 mg/l en 50 mg/l, vooral tussen 2 mg/l en 25 mg/l, vooral tussen 4 mg/l en 40 mg/l, vooral tussen 4 mg/l en 20 mg/l, vooral tussen 4 mg/l en 16 mg/l, en vooral tussen 4 mg/l en 12 mg/l.

Volgens één belichaming kunnen de afzonderlijke verbindingen van de agrochemische formuleringen die de verbindingen van formule (I) bevatten, geformuleerd als
10 samenstelling (of formulering) zoals delen van een kit of delen van het inventieve mengsel, door de gebruiker zelf worden gemengd in een spuittank en kunnen verdere hulpstoffen worden toegevoegd, indien van toepassing (tankmengsel).

Onder "agrochemisch middel" wordt hier verstaan: elke werkzame stof die in de agrochemische industrie kan worden gebruikt (met inbegrip van toepassingen in de
15 landbouw, de tuinbouw, de bloemeteelt en voor gebruik in huis en tuin, maar ook producten die bestemd zijn voor niet-gewasgebonden toepassingen zoals toepassingen ter bestrijding van ongewenste insecten en knaagdieren in het kader van de volksgezondheid/bestrijding van ongedierte, huishoudelijk gebruik, zoals fungiciden en insecticiden voor huishoudelijk gebruik, en middelen ter bescherming van planten of
20 delen van planten, gewassen, bollen, knollen, vruchten (bijv.b.v. tegen schadelijke organismen, ziekten of plagen); voor het onder controle houden, bij voorkeur bevorderen of doen toenemen van de groei van planten; en/of voor het bevorderen van de opbrengst van planten, gewassen of de delen van planten die worden geoogst (b.v. de vruchten, bloemen, zaden enz.).

25 Een "agrochemische samenstelling" zoals hier gebruikt, is een samenstelling voor agrochemisch gebruik, zoals hier gedefinieerd, die ten minste één werkzame stof van een verbinding van formule (I) bevat, eventueel met één of meer additieven die een optimale dispersie, atomisering, depositie, bevochtiging van de bladeren, distributie, retentie en/of opname van agrochemische middelen bevorderen. Dergelijke additieven
30 zijn bijvoorbeeld verdunningsmiddelen, oplosmiddelen, hulpstoffen, oppervlakte-actieve stoffen, bevochtigingsmiddelen, spreidingsmiddelen, oliën, stickers, viscositeitsregelaars (zoals verdikkingsmiddelen, penetranten), pH-regelaars (zoals buffers,

aanzuringsmiddelen), antizinkmiddelen, antivriesmiddelen, fotobeschermingsmiddelen, antischuimmiddelen, biociden en/of driftremmers.

Een "drager", zoals hierin gebruikt, is een vaste, halfvaste of vloeibare drager waarin of waarop een werkzame stof op geschikte wijze kan worden opgenomen, geïmmobiliseerd, geïmmobiliseerd, geadsorbeerd, geabsorbeerd, gebonden, ingekapseld, ingebed, bevestigd of gecompriëerd. Niet-limiterende voorbeelden van dergelijke dragers zijn nanocapsules, microcapsules, nanosferen, microsferen, nanodeeltjes, microdeeltjes, liposomen, blaasjes, parels, een gel, zwakke ionische harsdeeltjes, liposomen, cochleaat-afleveringsvehikels kleine korrels, granulaten, nanobuisjes, bucky-balletjes, waterdruppeltjes die deel uitmaken van een water-in-olie-emulsie, oliedruppeltjes die deel uitmaken van een olie-in-water-emulsie, organische materialen zoals kurk, hout of andere materialen van plantaardige oorsprong (bv. bijvoorbeeld in de vorm van zaaddoppen, houtspaanders, pulp, bolletjes, kralen, vellen of enige andere geschikte vorm), papier of karton, anorganische materialen zoals talk, klei, microkristallijne cellulose, silica, aluminiumoxide, silicaten en zeolieten, of zelfs microbiële cellen (zoals gistcellen) of geschikte fracties of fragmenten daarvan.

De termen "effectieve hoeveelheid", "effectieve dosis" en "effectieve hoeveelheid", zoals hier gebruikt, betekenen de hoeveelheid die nodig is om het gewenste resultaat of de gewenste resultaten te bereiken. Meer exemplarische informatie over hoeveelheden, toepassingswijzen en te gebruiken geschikte verhoudingen wordt hieronder gegeven. De vakman is zich terdege bewust van het feit dat een dergelijke hoeveelheid kan variëren in een breed bereik en afhankelijk is van diverse factoren zoals de behandelde cultuurplant en de klimatologische en bodemomstandigheden.

De hier gebruikte termen "bepalen", "meten", "beoordelen", "controleren" en "analyseren" zijn onderling verwisselbaar en omvatten zowel kwantitatieve als kwalitatieve bepalingen.

Het is duidelijk dat de agrochemische samenstelling stabiel is, zowel tijdens opslag als tijdens gebruik, wat betekent dat de integriteit van de agrochemische samenstelling behouden blijft onder opslag- en/of gebruiksomstandigheden van de agrochemische samenstelling, die verhoogde temperaturen, vries-dooicycli, veranderingen in pH of in ionensterkte, UV-straling, aanwezigheid van schadelijke chemicaliën en dergelijke kunnen omvatten. Meer bij voorkeur blijven de verbindingen van formule (I) zoals hier beschreven stabiel in de agrochemische samenstelling, wat betekent dat de integriteit en de activiteit van de verbindingen behouden blijven onder opslag- en/of

gebruiksomstandigheden van de agrochemische samenstelling, die verhoogde temperaturen, vries-dooicycli, veranderingen in pH of in ionensterkte, UV-straling, aanwezigheid van schadelijke chemicaliën en dergelijke kunnen omvatten. Bij voorkeur blijven de verbindingen van formule (I) stabiel in de agrochemische samenstelling

5 wanneer de agrochemische samenstelling wordt opgeslagen bij omgevingstemperatuur gedurende een periode van twee jaar of wanneer de agrochemische samenstelling wordt opgeslagen bij 54°C gedurende een periode van twee weken. Bij voorkeur behoudt de agrochemische samenstelling van de onderhavige uitvinding ten minste ongeveer 70% activiteit, bij voorkeur ten minste ongeveer 70% tot 80% activiteit, bij voorkeur ongeveer

10 80% tot 90% activiteit of meer. Voorbeelden van geschikte draagstoffen zijn onder meer alginaten, gommen, zetmeel, -cyclodextrinen, cellulosen, polyureum, polyurethaan, polyester of klei.

De agrochemische samenstelling kan in om het even welke formulering voorkomen; de voorkeur gaat uit naar poeders, bevochtigbare poeders, bevochtigbare granulaten, in

15 water dispergeerbare granulaten, emulsies, emulgeerbare concentraten, stof, suspensies, suspensieconcentraten, suspoemulsies, capsulesuspensies, waterige dispersies, oliedispersies, aërosolen, pasta's, schuim, slurries of vloeibaar gemaakte concentraten.

De agrochemische samenstelling volgens de uitvinding kan eenmaal op een gewas

20 worden toegepast, maar kan ook twee of meer keren na elkaar worden toegepast met een interval tussen elke twee toepassingen. De agrochemische samenstelling volgens de uitvinding kan alleen of in combinatie met andere materialen, bij voorkeur andere agrochemische samenstellingen, op het gewas worden aangebracht; als alternatief kan de agrochemische samenstelling volgens de uitvinding afzonderlijk op het gewas worden

25 aangebracht met andere materialen, bij voorkeur andere agrochemische samenstellingen, die op verschillende tijdstippen op hetzelfde gewas worden aangebracht.

In weer een andere belichaming voorziet de uitvinding in een methode voor de vervaardiging van ("of de productie van" hetgeen gelijkwaardig is aan formulering) een

30 agrochemische samenstelling volgens de uitvinding, bestaande uit de formulering van een molecuul van formule (I) als hiervóór gedefinieerd, samen met ten minste één gebruikelijke agrochemische hulpstof. Geschikte fabricagemethoden zijn bekend in de kunst en omvatten, maar zijn niet beperkt tot, mengen met hoge of lage afschuifsnelheid,

nat of droog malen, druipgieten, inkapselen, emulgeren, coaten, encrusteren, pilling, extrusiegranulatie, wervelbedgranulatie, co-extrusie, sproeidrogen, sproeikoelen, verneveling, additie- of condensatiepolymerisatie, interfaciale polymerisatie, polymerisatie in situ, coacervatie, sproei-inkapseling, afkoeling van gesmolten dispersies, 5 verdamping van oplosmiddelen, fasescheiding, solventextractie, sol-gelpolymerisatie, bekleding met een vloeistofbed, bekleding met een pan, smelten, passieve of actieve absorptie of adsorptie.

De gebruikelijke agrochemische hulpstoffen zijn algemeen bekend en omvatten bij voorkeur, maar zijn niet beperkt tot, waterige en/of organische oplosmiddelen, pH- 10 regelaars (zoals buffers, zuurteregelaars), oppervlakteactieve stoffen, bevochtigingsmiddelen, spreidingsmiddelen, adhesiebevorderaars (zoals tackifiers, stickers), draagstoffen, vulstoffen, viscositeitsregelaars (zoals verdikkingsmiddelen), emulgatoren, disperseermiddelen, sequestreermiddelen, antizinkmiddelen, coalescentiemiddelen, reologieversterkers, antischuimmiddelen, fotobeschermers, 15 antivriesmiddelen, biostimulanten (met inbegrip van bacteriële en/of schimmelinoculanten of micro-organismen), biociden (bij voorkeur geselecteerd uit herbiciden, bactericiden, fytoxische stoffen, fungiciden, pesticiden en mengsels daarvan), plantengroeiregulatoren, beschermstoffen, penetrerende stoffen, antiklontermiddelen, minerale en/of plantaardige oliën en/of wassen, kleurstoffen en 20 driftwerende stoffen of een geschikte combinatie daarvan.

Het insecticide kan bestaan uit een organofosfaat, een carbamaat, een pyrethroïde, een acaricide, een alkylftalaat, boorzuur, een boraat, een fluoride, zwavel, een haloaromatisch gesubstitueerd ureum, een koolwaterstofester, een insecticide op biologische basis of een combinatie daarvan. Het herbicide, dat wordt gebruikt om 25 ongewenste planten te verwijderen, kan een chloorfenoxyverbinding, een nitrofenolverbinding, een nitroresolverbinding, een dipyridylverbinding, een acetamide, een alifatische acide, een anilide, een benzamide, een benzoëzuur, een benzoëzuurderivaat, anijszuur, een anijszuurderivaat, een benzonitril, benzothiadiazinon-dioxide, een thiocarbamaat, een carbamaat, een carbanilaat, een 30 chloropyridilaat of een combinatie daarvan bevatten, carbanilaat, chloorpyridinyl, een cyclohexenon derivaat, een dinitroaminobenzeen derivaat, een fluorodinitrotoluidine verbinding, isoxazolidinon, nicotinezuur acide, isopropylamine, een isopropylaminoderivaat, oxadiazolinon, een fosfaat, een ftalaat, een picolinezuurverbinding, een triazine, een triazool, een uracil, een ureumderivaat,

endothall, natriumchloraat, of een combinatie daarvan. Het fungicide kan bestaan uit een gesubstitueerd benzeen, een thiocarbamaat, een ethyleen-bis-dithiocarbamaat, een thiofthalidamide, een koperverbinding, een organische kwikverbinding, een organotinverbinding, een cadmiumverbinding, anilazine, benomyl, cyclohexamide, 5 dodine, etridiazool, iprodion, metlaxyl, thiamimefon, triforine, of een combinatie daarvan. De schimmelinoculant kan bestaan uit een schimmelinoculant van de familie Glomeraceae, een schimmelinoculant van de familie Claroidoglomeraceae, een schimmelinoculant van de familie Acaulosporaceae, een schimmelinoculant van de familie Sacculosporaceae een schimmelinoculant van de familie Entrophosporaceae, een 10 schimmelinoculant van de familie Pacidsporaceae, een schimmelinoculant van de familie Diversisporaceae, een schimmelinoculant van de familie Paraglomeraceae, een schimmelinoculant van de familie Archaeosporaceae een schimmelinoculant van de familie Geosiphonaceae, een schimmelinoculant van de familie Ambisporaceae, een schimmelinoculant van de familie Scutellosporaceae, een schimmelinoculant van de 15 familie Dentiscultataceae, een schimmelinoculant van de familie Racocetraceae een schimmelinoculant van het fylum Basidiomycota, een schimmelinoculant van het fylum Ascomycota, een schimmelinoculant van het fylum Zygomycota, een schimmelinoculant van het genus Glomus of een combinatie daarvan. De bacteriële inoculant kan een bacteriële inoculant van het geslacht Rhizobium omvatten, een bacteriële inoculant van 20 het geslacht Bradyrhizobium, een bacteriële inoculant van het geslacht Mesorhizobium, een bacteriële inoculant van het geslacht Azorhizobium, een bacteriële inoculant van het geslacht Allorhizobium bacteriële inoculant van het genus Burkholderia, bacteriële inoculant van het genus Sinorhizobium, bacteriële inoculant van het genus Kluyvera, bacteriële inoculant van het genus Azotobacter, bacteriële inoculant van het genus 25 Pseudomonas bacteriële inoculant van het genus Azosprillum, bacteriële inoculant van het genus Bacillus, bacteriële inoculant van het genus Streptomyces, bacteriële inoculant van het genus Paenibacillus, bacteriële inoculant van het genus Paracoccus, bacteriële inoculant van het genus Enterobacter bacteriële inoculant van het genus Alcaligenes, bacteriële inoculant van het genus Mycobacterium, bacteriële inoculant van het genus 30 Trichoderma, bacteriële inoculant van het genus Gliocladium, bacteriële inoculant van het genus Klebsiella, of een combinatie daarvan.

Het mengsel kan bovendien ten minste één micro-organisme bevatten, gekozen uit de lijst bestaande uit *Bacillus subtilis* stam 713, *Bacillus amyloliquefaciens* MBI 600, *Bacillus pumillus* QST2808, *Pseudomonas fluorescens*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Trichoderma*

vireus, *Pseudomonas putida*, *Trichoderma harzianum* Rifai-stam T22, *Penicillium bilaii*, *Mesorhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter vinelandii* en *Clostridium pasteurianum*, *Glomus*-soorten.

5 De pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamiden die volgens de huidige uitvinding worden gebruikt, kunnen in combinatie met deze hulpstoffen worden gebruikt. De gebruikte hulpstoffen zijn afhankelijk van de specifieke toepassingsvorm en de werkzame stof en omvatten bij voorkeur oplosmiddelen, vaste dragers, dispergeermiddelen of emulgatoren, zoals oplosbaarheidsbevorderende stoffen, beschermende colloïden, oppervlakreactieve stoffen en hechtmiddelen. Verder kunnen organische en anorganische
10 verdikkingsmiddelen, bactericiden, antivriesmiddelen, antischuimmiddelen, eventueel kleurstoffen en tackifiers of bindmiddelen worden gebruikt in combinatie met de nitrificatieremmers en in het meststofmengsel. Geschikte hulpstoffen worden besproken in WO 2013/121384 op blz. 25 t/m 26.

Andere mogelijke voorkeursingrediënten zijn oliën, bevochtigers, hulpstoffen,
15 biostimulanten, herbiciden, bactericiden, andere fungiciden en/of pesticiden. Deze worden bijvoorbeeld besproken in WO 2013/121384 op blz. 28/29.

De meststofmengsels zijn bij voorkeur in vaste vorm, waaronder poeders, prils en granules. Voorts is het mogelijk de nitrificatieremmer in de vorm van een formulering, oplossing of dispersie afzonderlijk of gelijktijdig met een meststof toe te dienen.

20 Bovendien kan de nitrificatieremmer van de onderhavige uitvinding worden gebruikt voor het verminderen van de stikstofverliezen in organische meststoffen en ook op oogstafval en weiland of tijdens de opslag van vloeibare mest en het volgen van de ammoniumbelasting in dierenstallen.

Voor de respectieve toepassingen kan worden verwezen naar US 6.139.596 en WO
25 2013/121384 alsook naar WO 2015/086823 en WO 2016/207210.

De onderhavige uitvinding heeft ook betrekking op een methode voor de bemesting van land- of tuinbouwgronden, waarbij een meststofmengsel dat verbindingen A en B bevat

A. een anorganische en/of organische en/of organominerale meststof en
B. 10 tot 10000 gewichtsprocenten, berekend op de meststof, van een pyrazolo[3,4-
30 b]pyridine-4-carboxamide als hierboven omschreven,

of de verbindingen A en B afzonderlijk, maar binnen een periode van 0 tot 5 uur, bij voorkeur 0 tot 1 uur, en bij voorkeur ongeveer op hetzelfde tijdstip,

wordt op de bodem aangebracht.

Parallel aan de verbetering van het stikstofgebruik in de ammonium- of ureumhoudende minerale, organische en organominerale meststoffen heeft het gebruik van de nitrificatieremmers, volgens de huidige uitvinding, en van samenstellingen die deze
5 bevatten, tot gevolg dat de opbrengst en de productie van biomassa van gewasgewassen, in sommige gevallen aanzienlijk, toeneemt.

Evenzo kan de nitrificatieremmer volgens de uitvinding worden toegevoegd aan organische meststoffen, zoals vloeibare mest, bijvoorbeeld tijdens de feitelijke opslag van dergelijke meststoffen, om te voorkomen dat stikstofvoedingsstoffen verloren gaan door
10 een vertraagde omzetting van de afzonderlijke stikstofvormen in gasvormige, dus vluchtige, stikstofverbindingen, en tegelijkertijd bij te dragen aan een verlaging van de ammoniakbelasting in dierenstallen. Bovendien kunnen de nitrificatieremmer of samenstellingen die de nitrificatieremmer bevatten, worden gebruikt op landbouwstengels en weidegronden om gasvormig stikstofverlies te verminderen en
15 nitraatuitspoeling te voorkomen.

In het algemeen kan de pyrazool[3,4-b]pyramine-4-carboxamide van de algemene formule (I) worden gebruikt voor het verminderen van de stikstof- of koolstofverliezen in anorganische en/of organische en/of organinerale meststoffen of stikstof- of koolstofhoudende verbindingen of materialen en ook op oogstafval en weiland of tijdens
20 de opslag van vloeibare mest en voor het verminderen van de ammoniakbelasting in dierenstallen.

Stikstofverliezen zijn vaak te wijten aan N₂O- en/of NO-emissies of NO₃-uitspoeling. Stikstofverliezen kunnen optreden in stikstofhoudende verbindingen of materialen, zoals wortels, planten, meststoffen, dieren, enz. Stikstofverliezen treden meestal op bij
25 stikstofhoudende minerale meststoffen of organische stikstofhoudende stoffen. De term "stikstofverliezen" omvat alle vormen van stikstof of stikstofverbindingen die verloren gaan via emissies of uitspoeling, zoals hierboven aangegeven. Een voorbeeld zijn broeikasgasemissies die kunnen worden verminderd door het gebruik van de N-heterocyclische verbinding van de onderhavige uitvinding.

30 Hetzelfde geldt voor koolstofverliezen die kunnen optreden in koolstofhoudende verbindingen of materialen. Koolstofhoudende verbindingen of materialen zijn bijvoorbeeld carbonaathoudende minerale meststoffen en koolstofhoudend organisch materiaal, zoals wortels, planten, dieren, organische meststoffen, enz. Koolstofverliezen

treden vaak op in de vorm van CO₂-emissies, die deel uitmaken van de broeikasgasemissies.

Daarom kunnen de verbindingen van de onderhavige uitvinding worden gebruikt voor het voorkomen of verminderen van broeikasgasemissies van stikstof- of koolstofhoudende verbindingen of materialen. Deze materialen bevatten vaak stikstof en/of koolstof in covalent of ionisch gebonden vorm, b.v. in de vorm van ammonium, eiwit, nitraat, 5 carbonaat, koolhydraten, cellulose, of andere organische koolstofhoudende verbindingen. De termen "koolstof" en "stikstof" kunnen dus verwijzen naar de elementaire vorm of naar verbindingen of materialen die koolstof- en/of stikstofatomen 10 bevatten.

Stikstof- en/of koolstofhoudende verbindingen of materialen kunnen aanwezig zijn in meststoffen, in de bodem, of in het milieu. Het meest in het oog springende effect van de N-heterocyclische verbindingen van de onderhavige uitvinding is de vermindering van de uitstoot van broeikasgassen uit grond die stikstofhoudende verbindingen of materialen 15 bevat.

Het meest efficiënt is de vermindering van broeikasgasemissies uit bemeste grond. Deze broeikasgasemissies worden vaak veroorzaakt door processen na de nitrificatie.

De volgens de uitvinding te behandelen of in de grond te wortelen planten worden bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit landbouw-, bosbouw-, sier- en 20 tuinbouwgewassen, elk in hun natuurlijke of genetisch gemodificeerde vorm. Bij voorkeur worden niet-transgene landbouwplanten behandeld.

Landbouwgewassen die de voorkeur genieten zijn veldgewassen die worden gekozen uit de groep bestaande uit aardappelen, suikerbieten, tarwe, gerst, rogge, haver, sorghum, rijst, maïs, katoen, koolzaad, raapzaad, canola, sojabonen, erwten, veldbonen, 25 zonnebloemen, suikerriet komkommers, tomaten, uien, prei, sla, pompoenen; nog meer bij voorkeur wordt de plant gekozen uit de groep bestaande uit tarwe, gerst, haver, rogge, sojabonen, maïs, koolzaad, katoen, suikerriet, rijst en sorghum.

In een voorkeursbelichaming van de uitvinding wordt het te behandelen gewas gekozen uit de groep bestaande uit tomaat, aardappel, tarwe, gerst, haver, rogge, sojaboon, maïs, 30 koolzaad, canola, zonnebloem, katoen, suikerriet, suikerbiet, rijst, sorghum, weidegras en weideland.

In een andere voorkeursbelichaming van de uitvinding wordt het te behandelen gewas gekozen uit de groep bestaande uit tomaat, aardappel, tarwe, gerst, haver, rogge, sojaboon, maïs, koolzaad, canola, zonnebloem, katoen, suikerriet, suikerbiet, rijst en sorghum.

- 5 In een bijzonder voorkeursgeval van de uitvinding worden de te behandelen planten gekozen uit de groep bestaande uit tomaat, tarwe, gerst, haver, rogge, maïs, koolzaad, canola, suikerriet en rijst.

In één belichaming is de plant die volgens de methode van de uitvinding moet worden behandeld, een landbouwplant. "Landbouwgewassen" zijn planten waarvan een deel
10 (bijv. zaden) of het geheel op commerciële schaal wordt geogst of geteeld of die als belangrijke bron dienen voor veevoer, voedingsmiddelen, vezels (bijv. katoen, linnen), brandstoffen (bijv. hout, bio-ethanol, biodiesel, biomassa) of andere chemische verbindingen. Landbouwgewassen die de voorkeur genieten zijn bijvoorbeeld granen, zoals tarwe, rogge, gerst, triticale, haver, sorghum of rijst, bieten, zoals suikerbieten of
15 voederbieten; vruchten, zoals pruimen, steenvruchten of zacht fruit, zoals appels, peren, pruimen, perziken, amandelen, kersen, aardbeien, frambozen, bramen of kruisbessen; peulvruchten, zoals linzen, erwten, luzerne of sojabonen; oliehoudende gewassen, zoals koolzaad, raapzaad, canola, lijnzaad, mosterd, olijven, zonnebloemen, kokosnoot, cacaobonen, ricinusolie, oliepalmen, grondnoten of sojabonen; cucurbitaceae, zoals
20 pompoenen, komkommers of meloenen; vezelgewassen, zoals katoen, vlas, hennep of jute; citrusvruchten, zoals sinaasappelen, citroenen, grapefruits (pompelmoezen) of mandarijnen; groenten, zoals spinazie, sla, asperges, kool, wortelen, uien, tomaten, aardappelen, komkommers of paprika's; laurahoudende planten, zoals avocado's, kaneel of kamfer; energie- en grondstofplanten, zoals maïs, soja, koolzaad, canola, suikerriet of
25 oliepalm; tabak; noten; koffie; thee; bananen; wijnstokken (tafeldruiven en druivensapdruiven); hop; turf; natuurrubberplanten.

Weidegras en grasland bestaan uit grassen of grasmengsels bestaande uit bijvoorbeeld blauwgras (*Poa* spp.), bentgras (*Agrostis* spp.), raaigras (*Lolium* spp.), zwenkgras (*Festuca* spp, hybriden en cultivars), Zoysiagrass (*Zoysia* spp.), Bermudagrass (*Cynodon* spp.), St. Augustinegras, Bahigras (*Paspalum*), Duizendbladgras (*Eremachloa*), Tapijtgras (*Axonopus*), Buffalogras en Gramagrass. Weiden kunnen ook bestaan uit mengsels van bovengenoemde grassen, bijvoorbeeld raaigras, en *Trifolium*-soorten, bijvoorbeeld *Trifolium pratensis* en *Trifolium repens*, *Medicago*-soorten zoals *Medicago*

sativa, Lotus-soorten zoals Lotus corniculatus, en Melilotus-soorten, bijvoorbeeld Melilotus albus.

In één geval is de plant die volgens de methode van de uitvinding moet worden behandeld, een tuinbouwplant. Onder "tuinbouwgewassen" worden planten verstaan die
5 algemeen worden gebruikt in de tuinbouw - bijvoorbeeld de teelt van sierplanten, kruiden, groenten en/of fruit. Voorbeelden van siergewassen zijn graszoden, geraniums, pelargonias, petunia's, begonia's en fuchsia's. Voorbeelden voor groenten zijn aardappelen, tomaten, paprika's, cucurbitaceae, komkommers, meloenen, watermeloenen, knoflook, uien, wortelen, kool, bonen, erwten en sla en meer bij voorkeur
10 van tomaten, uien, erwten en sla. Voorbeelden voor fruit zijn appels, peren, kersen, aardbeien, citrusvruchten, perziken, abrikozen en bosbessen. In de tuinbouw vervangt een substraat vaak (een deel van) de grond.

In één geval is de plant die volgens de methode van de uitvinding moet worden behandeld, een sierplant. "Sierplanten" zijn planten die gewoonlijk in de tuin worden
15 gebruikt, b.v. in parken, tuinen en op balkons. Voorbeelden zijn graszoden, geraniums, pelargonias, petunia's, begonia's en fuchsia's.

In één geval is de plant die volgens de methode van de uitvinding moet worden behandeld, een bosbouwgewas. Met de term "bosbouwgewas" worden bomen bedoeld, meer in het bijzonder bomen die in herbebossing of industriële aanplantingen worden
20 gebruikt. Industriële aanplantingen dienen in het algemeen voor de commerciële productie van bosproducten, zoals hout, pulp, papier, rubberbomen, kerstbomen, of jonge bomen voor tuindoeleinden. Voorbeelden van bosbouwgewassen zijn naaldbomen, zoals dennen, in het bijzonder Pinus spec, sparren en sparren, eucalyptus, tropische bomen, zoals teak, rubberboom, oliepalm, wilg (Salix), in het bijzonder Salix spec, populier
25 (cottonwood), in het bijzonder Populus spec, beuk, in het bijzonder Fagus spec, berk, oliepalm, en eik.

De volgende definities zijn van toepassing:

De term "planten" moet worden opgevat als planten van economisch belang en/of door de mens gekweekte planten. Zij worden bij voorkeur gekozen uit landbouw-, bosbouw-,
30 sier- en tuinbouwgewassen, elk in hun natuurlijke of genetisch gemodificeerde vorm. De hier gebruikte term "plant" omvat alle delen van een plant, zoals ontkiemende zaden, opkomende zaailingen, kruidachtige vegetatie, alsmede gevestigde houtige gewassen,

met inbegrip van alle onder de grond liggende delen (zoals de wortels) en boven de grond liggende delen.

De term "bodem" moet worden opgevat als een natuurlijk lichaam dat bestaat uit levende (bijvoorbeeld micro-organismen (zoals bacteriën en schimmels), dieren en planten) en niet-levende materie (bijvoorbeeld mineralen en organische materie (bijvoorbeeld organische verbindingen in verschillende ontbindingsgraden), vloeistof en gassen) die zich op het landoppervlak bevindt, en gekenmerkt wordt door bodemhorizonten die van het oorspronkelijke materiaal te onderscheiden zijn als gevolg van diverse fysische, chemische, biologische en antropogene processen.

Onder "nitrificatieremmer" wordt verstaan: een chemische stof die het nitrificatieproces, dat gewoonlijk in (bemeste) grond plaatsvindt, vertraagt of vertraagt. Nitrificatieremmers vertragen de natuurlijke omzetting van ammonium in nitraat en zijn gericht tegen micro-organismen en bij voorkeur ammoniakoxiderende bacteriën (AOB) en/of ammoniakoxiderende archaea (AOA), door de activiteit van bacteriën, bijv. AOB en AOA, zoals *Nitrosomonas* spp., *Nitrosospira* spp. en/of Archaea, te remmen. De nitrificatieremmer wordt meestal gecombineerd met een meststof, bij voorkeur een (ammonium)stikstofhoudende meststof, bijvoorbeeld een vaste of vloeibare anorganische, organische en/of organominerale meststof, of mest.

Onder "nitrificatie" moet worden verstaan de biologische oxidatie van ammoniak (NH_3) of ammonium (NH_4^+) met zuurstof tot nitriet (NO_2^-), gevolgd door de oxidatie van deze nitrieten tot nitraat (NO_3^-) door micro-organismen. Naast nitraat (NO_3^-) wordt door nitrificatie ook distikstofoxide geproduceerd. Nitrificatie is een belangrijke stap in de stikstofcyclus in de bodem.

De term "denitrificatie" moet worden opgevat als de microbiologische omzetting van nitraat (NO_3^-) en nitriet (NO_2^-) in gasvormige vormen van stikstof, in het algemeen N_2 of N_2O . Dit ademhalingsproces vermindert geoxideerde vormen van stikstof in reactie op de oxidatie van een elektronendonor zoals organisch materiaal. De stikstofelektronenacceptoren die de voorkeur genieten, in volgorde van meest naar minst thermodynamisch gunstig, zijn: nitraat (NO_3^-), nitriet (NO_2^-), stikstofmonoxide (NO) en distikstofmonoxide (N_2O). Binnen de algemene stikstofcyclus rondt denitrificatie de cyclus af door N_2 terug te voeren naar de atmosfeer. Dit proces wordt voornamelijk uitgevoerd door heterotrofe bacteriën (zoals *Paracoccus denitrificans* en diverse pseudomonaden), hoewel er ook autotrofe denitrificeerders zijn geïdentificeerd (b.v.

Thiobacillus denitrificans). Denitrificeerders zijn in alle belangrijke fylogenetische groepen vertegenwoordigd. Bij zuurstoftekort kunnen veel bacteriesoorten overschakelen van zuurstof naar nitraten ter ondersteuning van de ademhaling in een proces dat denitrificatie wordt genoemd en waarbij de in water oplosbare nitraten worden omgezet in gasvormige producten, waaronder distikstofoxide, die in de atmosfeer worden uitgestoten.

Lachgas", gewoonlijk "happy gas" of "lachgas" genoemd, is een chemische verbinding met de chemische formule N_2O . Bij kamertemperatuur is het een kleurloos, niet-ontvlambaar gas. Lachgas wordt op natuurlijke wijze in de bodem geproduceerd door de microbiële processen nitrificatie en denitrificatie. Deze natuurlijke emissies van distikstofoxide kunnen worden verhoogd door een verscheidenheid van landbouwpraktijken en -activiteiten, waaronder bijvoorbeeld a) de directe toevoeging van stikstof aan de bodem door het gebruik van minerale en organische meststoffen, b) de teelt van stikstoffixerende gewassen, c) de teelt van bodems met een hoog organisch gehalte.

De term "meststoffen" moet worden opgevat als (chemische) verbindingen die worden toegepast om de groei van planten en vruchten te bevorderen. Meststoffen worden gewoonlijk toegediend via de bodem (voor opname door de wortels van de plant) of via bladvoeding (voor opname door de bladeren). De term "meststoffen" kan in twee grote categorieën worden onderverdeeld: a) organische meststoffen (samengesteld uit rottend plantaardig/dierlijk materiaal) en b) anorganische meststoffen (samengesteld uit chemicaliën en mineralen). Organische meststoffen zijn onder meer drijfmest, wormengiet, turf, zeewier, rioolwater en guano. Gefabriceerde organische meststoffen zijn onder meer compost, bloedmeel, beendermeel en zeewierextracten. Andere voorbeelden zijn enzymatisch verteerde eiwitten, vismeel en verenmeel. De ontbindende gewasresten van voorgaande jaren en mest zijn een andere bron van vruchtbaarheid. Daarnaast worden in de natuur voorkomende mineralen, zoals fosfaat uit mijnsteen, kaliumsulfaat en kalksteen, ook tot de anorganische meststoffen gerekend. Anorganische meststoffen worden gewoonlijk vervaardigd door middel van chemische processen (zoals het Haber-Bosch-proces), waarbij ook gebruik wordt gemaakt van in de natuur voorkomende afzettingen, terwijl deze chemisch worden gewijzigd (b.v. geconcentreerd tripelsuperfosfaat). In de natuur voorkomende anorganische meststoffen zijn onder meer Chileens natriumnitrat, mijnsteenfosfaat en kalksteen. Als derde categorie kunnen organinerale meststoffen worden genoemd, een combinatie van anorganische en organische meststoffen.

Onder "meststof die ureum bevat" (ureummeststof) worden verstaan synthetische meststoffen die ureum bevatten, met uitzondering van in de natuur voorkomende meststoffen die ureum bevatten (bijvoorbeeld mest als voorbeeld van een in de natuur voorkomende meststof die ureum bevat). Voorbeelden van meststoffen die ureum bevatten zijn ureum-ammoniumnitraat (UAN), isobutylideendiureum (IBDU), crotonylideendiureum (CDU) en ureumformaldehyde (UF). Ureum wordt gewoonlijk in de vorm van korrels of prills geproduceerd. Ureummeststof kan worden geproduceerd door het vloeibare ureum uit een prillentoren te laten vallen en het product te drogen. Ureum kan ook worden verkregen in vloeibare vorm, die kan worden gebruikt voor bladbemesting, b.v. op aardappelen, tarwe, groenten en sojabonen, en voor vloeibare toepassing op het veld. Gewoonlijk wordt het gemengd met ammoniumnitraat om UAN te vormen met 28% N.

De term "locus" (habitat van de plant) moet worden opgevat als elk type omgeving, bodem, gebied of materiaal waar de plant groeit of moet groeien. Volgens de uitvinding wordt in het bijzonder de voorkeur gegeven aan grond.

De uitvinding wordt verder geïllustreerd door de volgende voorbeelden.

Voorbeelden

1. Pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamiden

Verschillende pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamiden werden verkregen van Enamine (SIA Enamine, Vestienas iela 2 B, LV-1035 Riga, Letland - <https://enamine.net/>). De respectieve verbindingen zijn opgenomen in tabel 1 hieronder.

2. Materiaal en methoden

2. 1Nitrietmetingen

Nitriet (NO₂⁻) werd gemeten met behulp van het Griess-reagens (Productnummer: G4410, Griess reagens (gemodificeerd), Sigma-Aldrich). Gelijke volumes van het monster of een verdund monster en het Griess-reagens werden gemengd in een transparante multi-well-plaat met vlakke bodem en gedurende 10 minuten in het donker bij kamertemperatuur geïncubeerd. Absorbantiewaarden bij 540 nm werden spectrofotometrisch gemeten (EnVision, Perkin Elmer®) en gebruikt om de [NO₂⁻] te berekenen met behulp van een standaardcurve.

2. 2Ammoniummetingen

Ammonium (NH_4^+) werd gemeten via een gemodificeerd Berthelot's reagens protocol. 8 μl cultuurmonster, 35 μl reagens A (0,5 g NaOH met 8 ml NaClO (2,5 %) in 92 ml MilliQ) en 33 μl reagens B (1 g salicylzuur, 0,5 g NaOH en 1,0237 g natriumnitroprussidedihydraat in 100 ml MilliQ) werden achtereenvolgens toegevoegd aan 160 μl MilliQ in 96-wells-platen met vlakke bodem (cat. nr. 353072, Falcon® 96 Well Clear Microplate, Corning). Absorbantiewaarden bij 635 nm werden spectrofotometrisch gemeten (EnVision, Perkin Elmer®) na een incubatie van 30 minuten en gebruikt om $[\text{NH}_4^+]$ te berekenen met behulp van een standaardcurve.

10 2. 3Cultuurbehoud

2.3.1 Nitrososphaera viennensis

Een vloeistofkweekmonster van *Nitrososphaera viennensis* EN76T werd vriendelijk ter beschikking gesteld door prof. dr. Christa Schleper (Universiteit van Wenen). De cellen werden gekweekt in zoetwatermedium (FWM) zoals eerder beschreven door Tourna et al. (2011). Alle benodigde materialen werden gespoeld met 1 % HCl en ten minste 3 keer gewassen met MilliQ water. FWM (pH 7,5 (KOH)) bevatte 17 mM NaCl, 3 mM $\text{MgCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 680 μM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,47 mM KH_2PO_4 en 6,71 mM KCl. Na autoclaveren werden achtereenvolgens 1 mL niet-geëmailleerd sporenelementenmengsel (101 mM HCl, 488 μM H_3BO_3 , 508 μM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 803 μM $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 101 μM $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 12 μM $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 503 μM $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ en 150 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), 1 mL Fe-NaEDTA (7.5 mM), 1 mL vitamineoplossing (20 mg/l biotine, 20 mg/l foliumzuur, 100 mg/l pyridoxine-HCl, 50 mg/l thiamine-HCl, 50 mg/l riboflavine, 50 mg/l nicotinezuur, 50 mg/l DL-pantotheenzuur, 50 mg/L P-aminobenzoëzuur, 2 g/L cholinechloride en 10 mg/L vitamine B12), 2 mL NaHCO_3 (1 M), 2 mL kanamycine (100 mg/mL), 2 mL carbenicilline (100 mg/mL), 3 mL NH_4Cl (1 M), 10 mL HEPES-buffer (1 M, pH 7.6) en 1 mL Na-pyruvaat (0,1 M) werden aseptisch toegevoegd. Alle stamoplossingen werden gesteriliseerd door een filter, behalve het geautoclaveerde, niet-geëmailleerde sporenelementenmengsel. De culturen werden zonder schudden aerob geïncubeerd bij 42 °C in steriele Erlenmeyers van 250 ml of kweekbuizen van 30 ml (productnummer: 216-1290, Quickstart universal containers STERILIN®, VWR), gevuld met 100 of 20 ml FWM en verzegeld met tape (Micropore™ Surgical Tape 1530-1, 3M™). Laat-log fase culturen ($[\text{NO}_2^-] \geq 1 \text{ mM}$) werden gekweekt door verdunning (1:400) in vers FWM.

2.3.2 ABIL

Ammoniakbindend vloeibaar inoculum (ABIL) is een nitrificerende microbiële verrijking die zowel AOA als AOB bevat en werd verkregen van Avecom nv (België). De suspensie werd gezeefd door een ijzeren gaas met diameter 0,5 mm om grote deeltjes te verwijderen, voorzien van 2,5 mM (NH₄)₂SO₄ en overgegoten in een steriele erlenmeyer. De kweekflessen werden afgesloten met tape (Micropore™ Surgical Tape 1530-1, 3M™) en geïncubeerd in het donker bij 30°C, onder schudden (± 160 rpm). De groei werd beoordeeld door NH₄⁺ metingen.

2. 4 Nitrificatieremmingstests

10 2.4.1 Nitrososphaera viennensis

7-dagen oude 100 ml-culturen, gekweekt in 250 ml Erlenmeyers met een [NO₂-] ≥ 1 mM, werden 5 keer overgeconcentreerd in vers FWM door centrifugeren (4000 rpm, 15 min, 5°C) in 50 ml centrifugebuizen (Cat. nr. 430829, CentriStar™ Conical Centrifuge Tubes, Corning®). Per batch werden alle culturen samengevoegd in één steriele Schott-fles.

15 Vervolgens werd 200 µl per putje bij lage pipetteersnelheid gedoseerd in transparante 96-well-platen met vlakke bodem (cat. nr. 353072, Falcon® 96 Well Clear Microplate, Corning®) met behulp van 150 µl tips met brede opening (twee stappen van 100 µl) op een Tecan-robot (Freedom EVO®, Tecan). 0,5 µl 99,99 % DMSO (negatieve controle - eindconcentratie 0,25 %) en 0,5 µl 0,04 M PTIO (2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide, positieve controle - eindconcentratie 100 µM) werden handmatig

20 toegevoegd aan respectievelijk de eerste en de laatste kolom. Ten slotte werd 0,5 µl kandidaat-nitrificatieremmers (stockoplossingen van 1 mM in 99,99% DMSO - eindconcentratie 2,5 µM) aan de centrale wells toegevoegd met behulp van een pennentang op een Tecan-robot (Freedom EVO®, Tecan). Tussen de toevoegingen door

25 werden de pennen achtereenvolgens gewassen met 99,5% DMSO, MilliQ water en 100% ethanol en aan de lucht gedroogd. Alle platen werden afgedicht met tape (Micropore™ Surgical Tape 1530-1, 3M™), gestapeld per 4 op de top van een 96-well plaat gevuld met 100 pi MilliQ per putje en bedekt met aluminiumfolie. Er werd rekening gehouden met de positie-effecten van de stapels in de incubator. De platen werden geïncubeerd bij

30 42°C zonder te schudden. 24 uur later werd NO₂- spectrofotometrisch gemeten bij 540 nm (EnVision, Perkin Elmer®). Daartoe werden de monsters eerst 25 maal verdund door x µl monsters te pipetteren in x µl vers groeimedium in tussenplaten (cat. nr. 353077, Falcon® 96-well Clear Round Bottom Microplate, Corning®) om vervolgens 15 µl van de

verdunde monsters te mengen met 15 µl Griess-reagens in de putjes van een transparante 384-wellsplaat met vlakke bodem (Cat. nr. X7001, Low Profile Microplate, Molecular Devices), dat spectrofotometrisch werd gemeten bij 540 nm (EnVision, Perkin Elmer®).

5 2.4.2 ABIL

600 ml ABIL-culturen, gekweekt in 1-L Erlenmeyers die volledig 5 mM NH₄⁺ verbruikten (gemeten via het gewijzigde Berthelot-reagensprotocol) binnen 24 uur, werden gebruikt voor een geminiaturiseerde, high-throughput nitrificatieremmingstest. Eerst werd een standaardcassette met buisjes die breed genoeg waren in de dispenser (Multidrop™
10 Combi Reagent Dispenser, Thermo Scientific™) geplaatst om verstopping van het systeem tijdens het dispenseren te voorkomen. Vervolgens werden de buisjes geprimed met 100 ml MilliQ en werd de ABIL-cultuur (met sediment) gelijkmatig verdeeld over
15 transparante 96-well-platen met vlakke bodem (cat. nr. 353072, Falcon® 96 Well Clear Microplate, Corning®). De cultuur werd voortdurend geroerd met behulp van een magneetroerder (snelheid 600 / min) voor een homogene verdeling. De roerder en de
buis (continu bedekt met kweekvloeistof) werden aan tegenovergestelde zijden van de erlenmeyer geplaatst om obstructie te voorkomen. Alle putjes in de kolommen 2 tot en met 12 werden gevuld met 135 µl ABIL.

20 De eerste kolom werd gebruikt voor een ammonium-standaardcurve per plaat: de putjes B1 tot en met D1 en de putjes F1 tot en met H1 kregen elk 135 µl MilliQ, gevolgd door 15 µl van hetzij 5 mM, 12,5 mM of 25 mM (NH₄)₂SO₄. De putjes A1 en E1 kregen 150 µl MilliQ. De putjes in kolom 12 kregen afwisselend 1,5 µl 10 mM PTIO (2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-3-oxide-1-oxyl, positieve controle - eindconcentratie 100 µM) of
25 1,5 µl 99,99% DMSO (oplosmiddel van de verbinding en negatieve controle - eindconcentratie 1%). De verschillende controles werden toegevoegd met een JANUS Mini VariSpan 4-tip, Perkin Elmer®. Na het toevoegen van alle controles, voegde de MDT (Janus Mini MDT, Perkin Elmer®) 1,5 µl verbindingen (eindconcentratie 10 µM) uit de
30 bibliotheek platen om alle centrale putten. Tenslotte werd met de dispenser (Multidrop™ Combi Reagent Dispenser, Thermo Scientific™) 15 µl van een 25 mM (NH₄)₂SO₄-oplossing (N-bron - eindconcentratie 5 mM) aan de kolommen 2 tot en met 12 toegevoegd.

De testplaten werden verzegeld met tape (Micropore™ Surgical Tape 1530-1, 3M™), per 4 gestapeld en in aluminiumfolie verpakt vóór incubatie in het donker bij 28°C, terwijl grondig werd geschud (± 210 omw./min.). 24 uur later werd een kweekmonster van 8 μ l genomen uit elk putje van de testplaatjes en verdund in 160 μ l MilliQ-water in uitleesbare transparante vlakke bodem 96-wells-platen (cat. nr. 353072, Falcon® 96 Well Clear Microplate, Corning). Vervolgens werden achtereenvolgens 35 μ l reagens A en 33 μ l reagens B aan de putjes toegevoegd. Tenslotte werden de afgelezen platen gedurende 30 min bij kamertemperatuur geïncubeerd en spectrofotometrisch gemeten bij 635 nm (EnVision, Perkin Elmer®).

10 2.4.3 Nitrificatieremming bij *Candidatus Nitrospira kreftii*

Candidatus Nitrospira kreftii is een hoge (90%) verrijking van nieuwe comammox soorten. Om de remming van de nitrificatie te kwantificeren in *Ca. Nitrospira kreftii*, a homogenous sample was taken from the bioreactor, washed and resuspended in sterile NOB mineral salts medium supplemented with (per liter) 1 mL of a trace element stock solution composed of NTA (15 g/L), ZnSO₄·7H₂O (0.43 g/L), CoCl₂·6H₂O (0.24 g/L), MnCl₂·4H₂O (0,99 g/L), CuSO₄·5H₂O (0,25 g/L), Na₂MoO₄·2H₂O (0,22 g/L), NiCl₂·6H₂O (0,19 g/L), NaSeO₄·10H₂O (0.021 g/L), H₃BO₄ (0,014 g/L), CeCl₂·6H₂O (0,24 g/L) en 1 mL van een ijzervoorraadoplossing bestaande uit NTA (10 g/L) en FeSO₄ (5 g/L). De uiteindelijke ammoniumconcentratie was 200 μ M.

20 Om de nitrificatiesnelheid te verhogen, werd de celdichtheid 5 maal verhoogd door middel van centrifugatie. Voor een homogene verdeling van de vlokken werd *Ca. Nitrospira kreftii* tijdens de verdeling continu geroerd met een multikanaalspipet in de 96-wellsplaten. Elk putje werd gevuld met 198 μ L cultuur, gevolgd door 2 μ L verbinding (1% eindconcentratie DMSO).

25 Ammoniumconcentraties werden fluorescent gemeten via een gemodificeerde orthofatal-dialdehyde assay. Nitriet- en nitraatconcentraties werden achtereenvolgens bepaald met een spectrofotometer (bij 540 nm): voor nitriet, na toevoeging van 100 μ L Griess-reagens aan 100 μ L monster (10 min incubatie bij kamertemperatuur) en voor nitraat, na
30 secundaire toevoeging van 27 μ L van een verzadigde VCl₃-oplossing in HCl (30 min incubatie bij 60 °C).

2.4.4 Kwantificering van de remming van de nitrificatie

Om de doeltreffendheid van de verbindingen (in termen van remming van de nitrificatie) te beoordelen en om een vergelijking tussen platen en partijen culturen mogelijk te maken, berekenden wij de relatieve nitrificatie. Meer in detail werden alle nitrietresultaten genormaliseerd ten opzichte van zowel een negatieve controle, die geen verbinding bevatte, als een positieve controle, die 100 µM PTIO bevatte, met gebruikmaking van vergelijking 1. Deze normalisatie werd uitgevoerd per multi-well plaat en elke plaat bevatte 8 positieve en 8 negatieve controles.

$$Relative\ nitrification = \frac{Nitrite(compound) - Nitrite(positive\ control)}{Nitrite(negative\ control) - Nitrite(positive\ control)} \quad (Vergelijking\ 1)$$

10)

Dit betekent dat verbindingen die volledige nitrificatie (geen nitrificatieremming) mogelijk maakten, een relatieve nitrificatie van 1 (of 100%) te zien geven. Een verbinding die dezelfde nitrificatieremming vertoont als de positieve controle, vertoont een nitrificatieremming van 0.

15 Voor de nitrificerende gemeenschap ABIL werd een relatieve nitrificatie berekend door vergelijking van het verbruikte ammonium (vergelijking 2), met 100 µM PTIO als positieve controle.

$$Relative\ nitrification = \frac{Ammonium(positive\ control) - Ammonium(compound)}{Ammonium(positive\ control) - Ammonium(negative\ control)} \quad (Vergelijking\ 2)$$

2)

20 2.5 In de bodem verrichte analyses

Toplaagmonsters (0 tot 10 cm) van de bodem werden genomen op verschillende percelen in België (Merelbeke, Sint-Laureins en Moorslede). Vegetatie werd verwijderd en monsters werden genomen van verschillende percelen. Alle bodemmonsters werden gemengd en gezeefd (maaswijdte 2,8 mm) om grote brokstukken te filteren en de bodem te homogeniseren. De grond werd opgeslagen bij 5°C in plastic containers bedekt met Saran-folie om veranderingen in de samenstelling van de microbiële gemeenschap te voorkomen en om het oorspronkelijke bodemvochtgehalte te behouden.

25 Het vochtgehalte van de bodem werd bepaald door 20 g grond gedurende ≥ 48 uur in een oven bij 60 °C te drogen en het gewicht vóór en na het drogen te meten. Op basis van het bodemvochtgehalte (± 20%) werden de samengestelde oplossingen zo bereid

30

dat toevoeging van 200 µl verbinding en 200 µl NH₄Cl-oplossing resulteerde in een eindconcentratie van de verbinding van 50 µM (tenzij anders vermeld) en een eindconcentratie van NH₄⁺ van 10 mM. Per behandeling werden 5 kleine potjes gevuld met 20 g grond. Vervolgens werd de grond eerst behandeld met de respectieve
5 verbindingsooplossing en vervolgens met de NH₄Cl-oplossing. Per bakje werden positieve (50 µM DMP) en negatieve controles (DMSO) opgenomen. De potten werden gedurende 3 of 7 dagen geïncubeerd bij 21°C (6.00 tot 22.00 uur licht). Om de 2 à 3 dagen werd gedemineraliseerd water aan de grond toegevoegd tot een bodemgewicht van 20 g. Uiteindelijk werd elk monster van 20 g grond opgelost in 100 ml 1M KCl en gedurende 1
10 uur geschud, gevolgd door filtratie door Whatmann®-papier. Het filtraat werd gebruikt om de pH-, NH₄⁺- en NO₃⁻ concentraties te meten. Het nitrificatiepercentage werd berekend als de verhouding tussen het verbruikte ammonium in de behandelde bodem en het verbruikte ammonium in de niet-behandelde bodem; het nitrificatieremmingspercentage werd berekend als '100% - het nitrificatiepercentage'.

15 2. 5Metingen van broeikasgassen

Er werden twee landbouwgronden gebruikt die afkomstig waren van velden in Moorslede en Sint-Laureins. Vials met schroefdop werden gevuld met 10 g grond. De flesjes werden verzegeld met parafilm en gedurende 5 dagen in het donker bij 21°C voorgeïncubeerd. Na de preïncubatie werden de flesjes met een ventilator geventileerd. Vervolgens werd
20 100 µL van een 1 mM samengestelde oplossing (10 % DMSO) toegevoegd, onmiddellijk gevolgd door de toevoeging van 100 µL 200 mM NH₄Cl. De flesjes werden gasdicht afgesloten en met een plastic injectiespuit werd 5 mL synthetische lucht aan de headspace toegevoegd, waarna 5 mL headspace werd overgebracht in een geëvacueerde exetainer van 3 mL. De flesjes werden bij 21 °C in het donker geïncubeerd
25 en de NO-achtergrondconcentratie werd genoteerd. Op elk bemonsteringstijdstip werd met een plastic injectiespuit opnieuw 5 ml synthetische lucht aan de headspace toegevoegd, waarna opnieuw 5 ml headspace werd overgebracht in een geëvacueerde exetainer van 3 ml. De flesjes werden geventileerd en weer gesloten, en nieuwe gasmonsters werden overgebracht naar exetainers zoals voorheen. N₂O in de exetainers
30 werd gemeten via gaschromatografie (GC-14 B (Schimadzu) uitgerust met Haysep Q-kolommen (zelfde spec) en een ECD-detector, He bij c.a. 20 mL min, 70 °C). De CO₂- en CH₄-concentratie in de exetainer-flacons van 3 ml werd gemeten met een GC (Trace-GC, Interscience) uitgerust met Haysep Q-kolommen (80-100, 1/8" verdeeld in 2 delen

van 0,25 en 2,0 m verbonden met een klep met 6 poorten om terugspoeling van waterdamp mogelijk te maken) en een FID (CH₄) en TCD (CO₂). Het draaggas was He c.a. 20 mL/min, gehouden op 90 °C. De NO-concentratie werd rechtstreeks gemeten door een chemiluminescentie NO-detector (CLD 77 AM, eco physics) met behulp van een naald rechtstreeks op de headspace aan te sluiten.

3. Resultaten

De in tabel 1 weergegeven resultaten zijn gebaseerd op het gebruik van het nitrificerende archaeon *N. viennensis* en de nitrificerende gemeenschap ABIL (ammoniakbindend vloeibaar inoculum - Avecom nv, België). De geteste pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamiden remmen de nitrificatie in ten minste één van de onderzochte systemen. De remmende activiteit van deze klasse moleculen werd bevestigd voor een aantal structuren met variërende subgroepen. Er werden verschillende doses gebruikt. Uit tabel 1 blijkt dat alle geteste stoffen de nitrificatie in de geteste systemen duidelijk remmen, en dat sommige remmers al bij zeer lage doses, tot 0,5 µM, een sterke remming vertonen. Als referentie vertoont PTIO, een NO-scavenger die voor onderzoeksdoeleinden wordt gebruikt als archaeale nitrificatieremmer en die bij 100 µM als positieve controle in de tests werd gebruikt, geen remming meer en bij 25 µM of 33 µM in respectievelijk de *N. viennensis*- of ABIL-test.

Voorts werd een representatieve subset getest op de groei van *Aliivibrio fischeri* (vroeger bekend als *Vibrio fischeri*), een bacterie die wordt gebruikt in de Microtox-test om toxische stoffen te testen in verschillende substraten zoals (drink)water, lucht, bodem en sedimenten. Geen van deze nieuwe remmers vertoonde een significant effect.

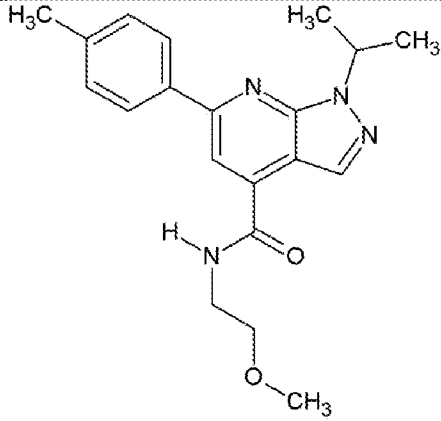
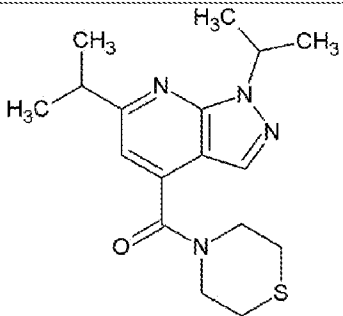
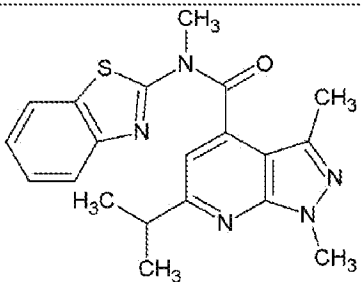
De pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide had geen invloed op de nitrificatie in *Nitrosomonas europaea* of *Nitrospira multiformis*, die beide ammoniak-oxiderende bacteriën (AOB) zijn.

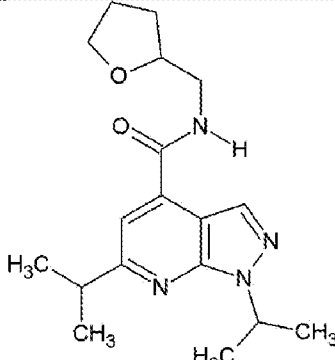
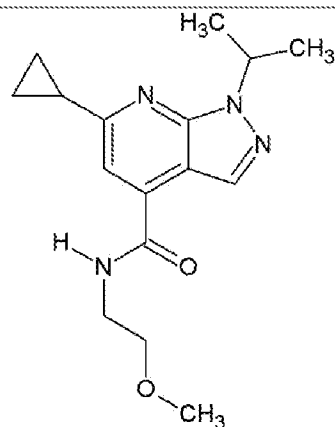
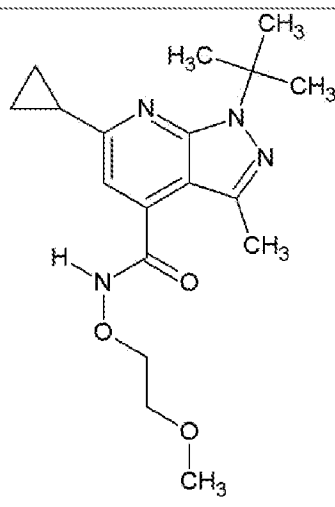
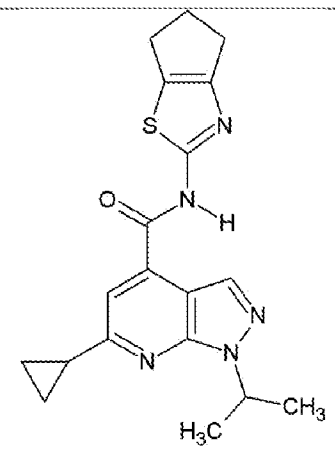
Eén pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide, namelijk voorbeeld 2 (zie tabel 1), werd getest op de comammox (COMplete AMMonia Oxidation) bacterie *Candidatus Nitrospira kreffii*. Bij een concentratie van 6,25 µM vertoonde voorbeeld 2 een nitrificatieremming van 57,3

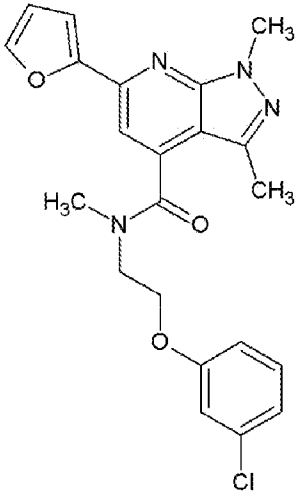
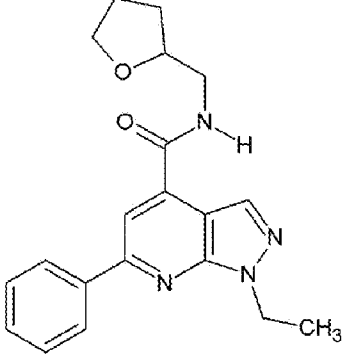
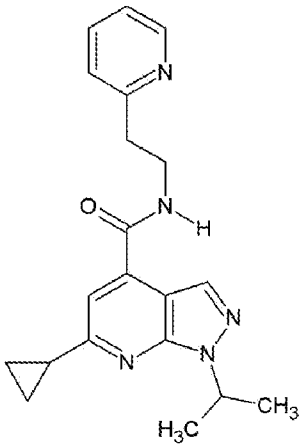
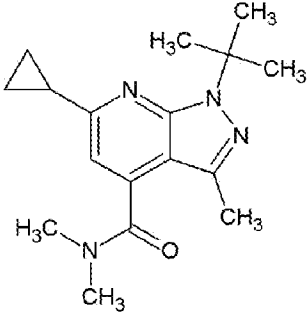
De relatieve nitrificatie van de pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamiden wordt in de *N. viennensis*- of ABIL-test vergeleken met de NO-scavenger PTIO. 0% wijst op een remming die even sterk is als 100 µM PTIO, een negatieve waarde (in het geval van

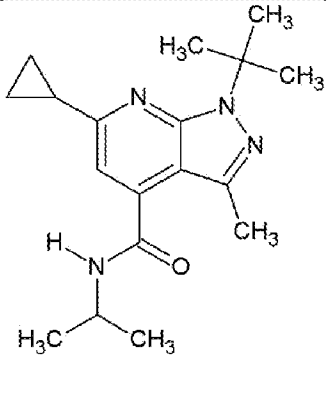
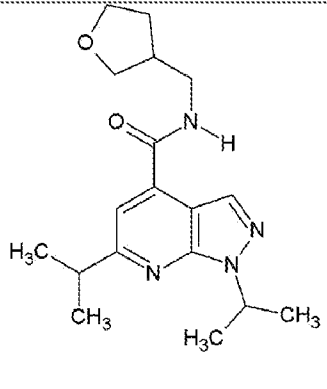
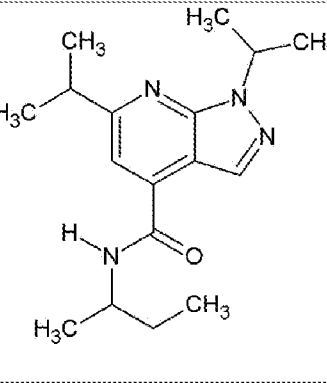
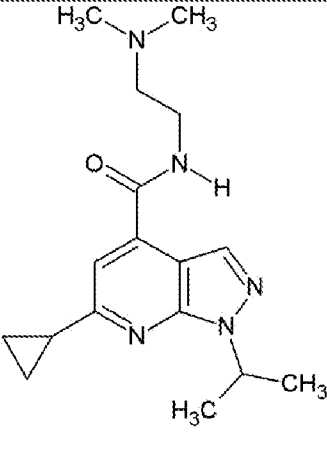
ABIL) wijst op een sterkere remming dan PTIO. 100% relatieve nitrificatie betekent geen remming. NA betekent niet geanalyseerd.

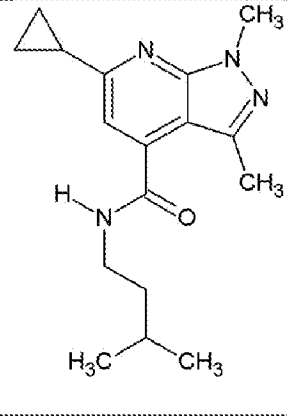
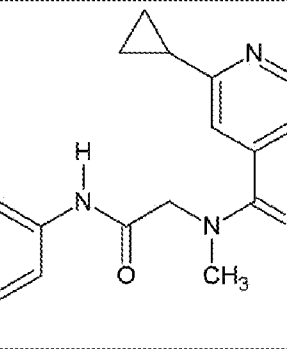
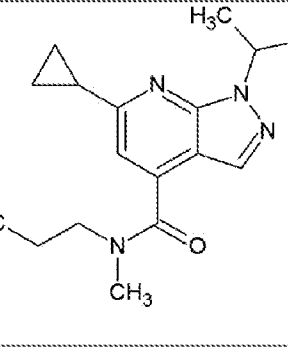
Tabel 1

Voorbeeld	Structuur	ABIL - relatieve nitrificatie (%) bij		N. viennensis - relatieve nitrificatie (%) bij		
		10 μM	2 μM	25 μM	5 μM	0,5 μM
1		-9	NA	0	0	52
2		-31	66	0	75	100
3		-41	-30	0	0	49

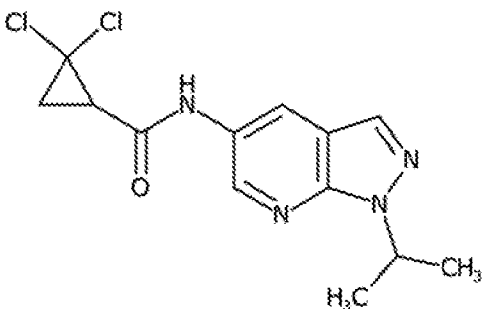
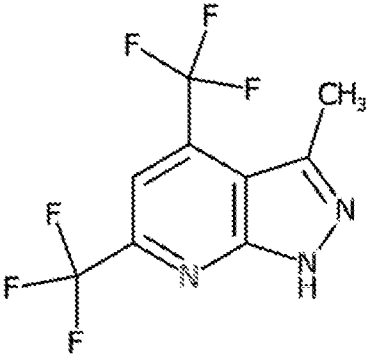
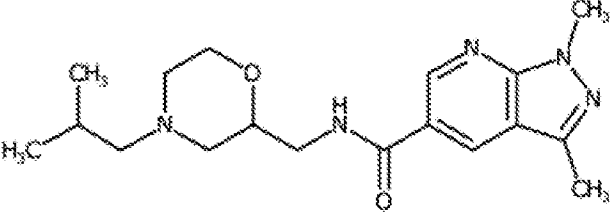
4		10	NA	NA	NA	NA
5		11	NA	NA	NA	NA
6		16	NA	NA	NA	NA
7		NA	NA	2	7	85

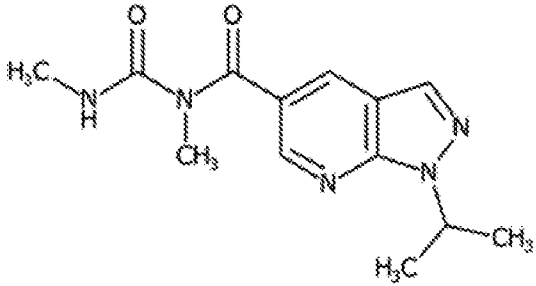
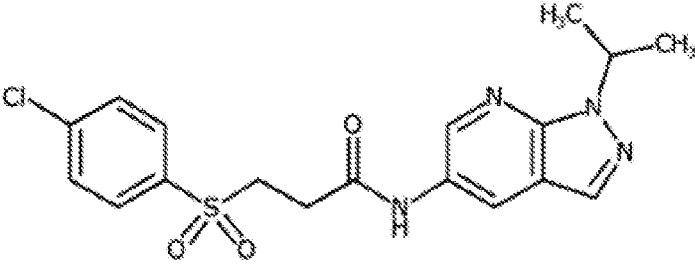
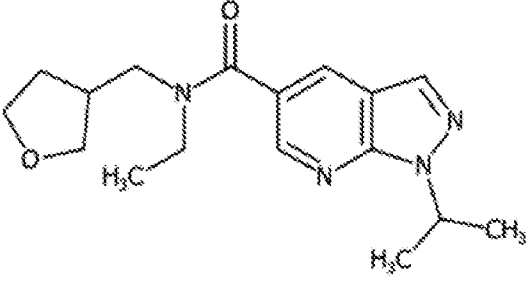
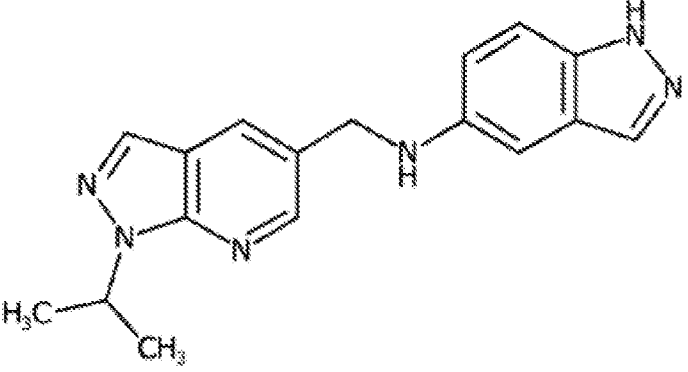
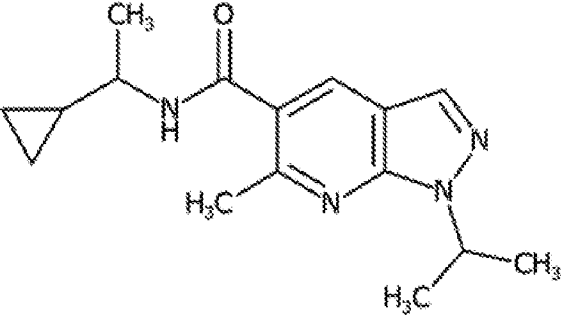
8		NA	NA	5	98	100
9		NA	NA	54	100	100
10		19	NA	NA	NA	NA
11		25	NA	NA	NA	NA

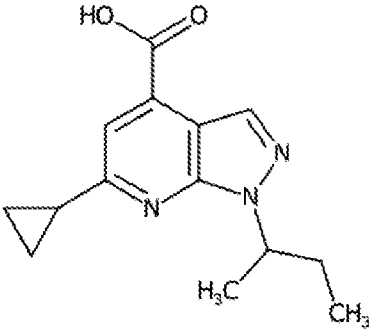
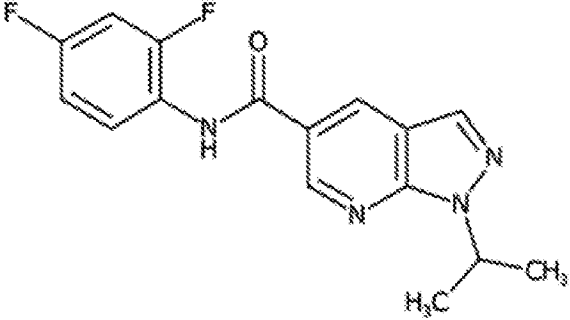
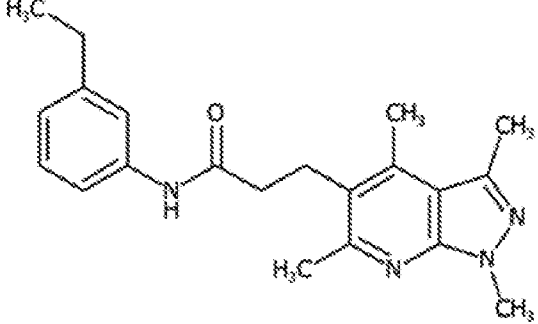
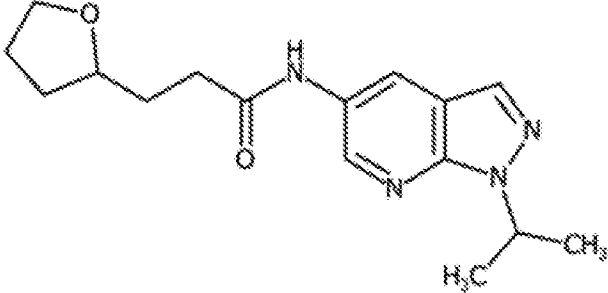
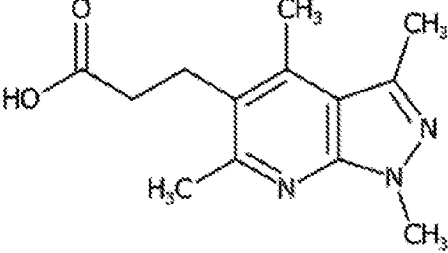
12		30	NA	NA	NA	NA
13		49	NA	NA	NA	NA
14		61	NA	NA	NA	NA
15		65	NA	NA	NA	NA

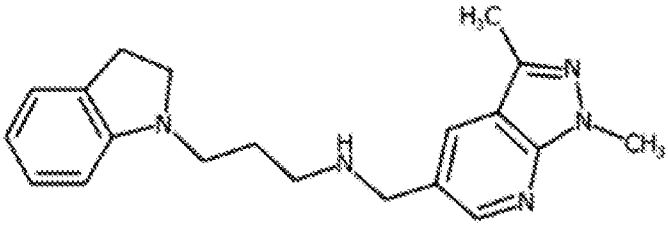
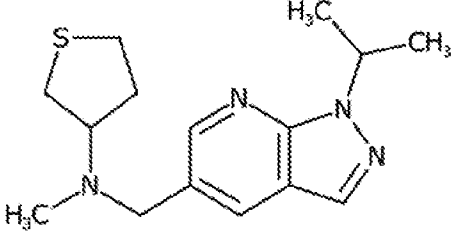
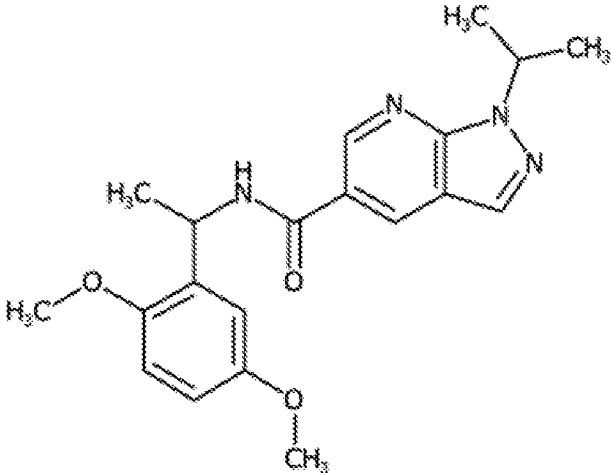
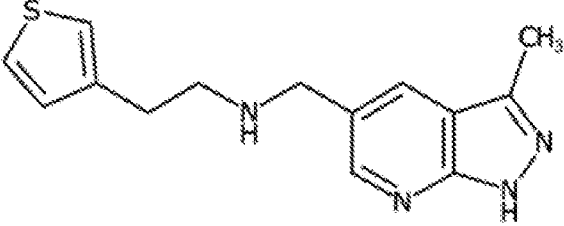
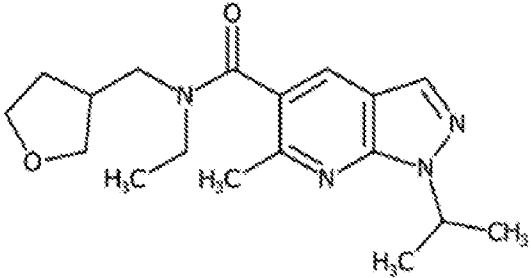
16		65	NA	NA	NA	NA
17		68	NA	NA	NA	NA
18		69	NA	NA	NA	NA

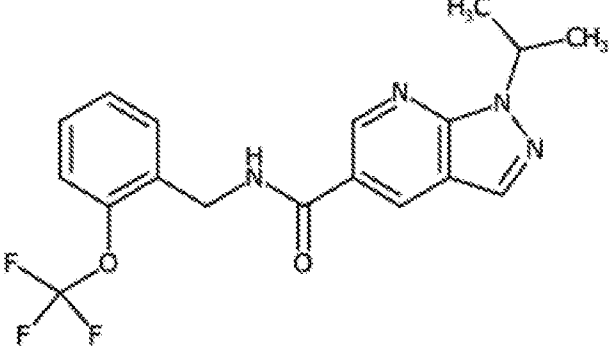
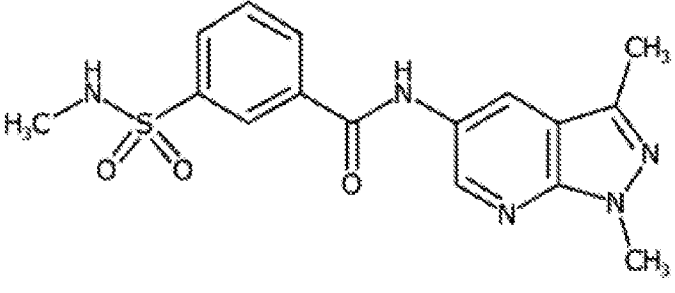
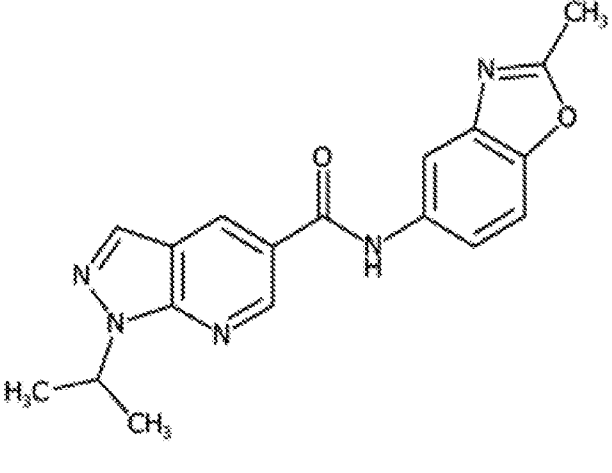
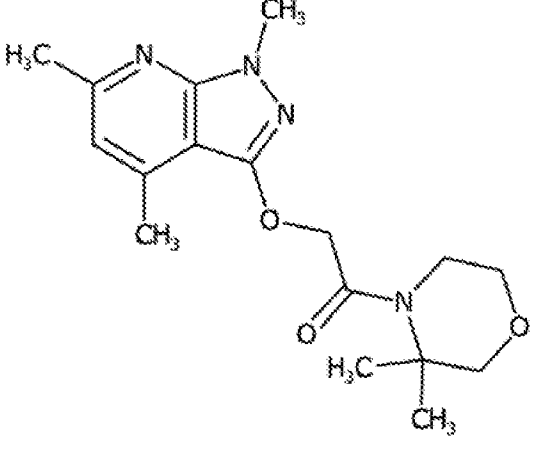
Om te testen of vergelijkbare structuren buiten het bereik van algemene formule (I) ook archaeale nitrificatie zouden kunnen remmen, testten wij een groot en divers panel van structuurvarianten van pyrazolo[3,4,-b]pyridine-4-carboxamide nitrificatie remmers op Nitrososphaere viennensis en op ABIL. De varianten omvatten structuren zonder de carboxamidegroep, met een gewijzigde carboxamidegroep, of met een geherpositioneerde carboxamidegroep - alle buiten de definities van formule (I). De varianten omvatten ook structuren met een indazool in plaats van een pyrazolo[3,4,-b]pyridine, die alleen verschillen in één C/N uitwisselingspositie. Geen van de varianten resulteerde in een significante remming van de nitrificatie op Nitrososphaere viennensis of op ABIL.

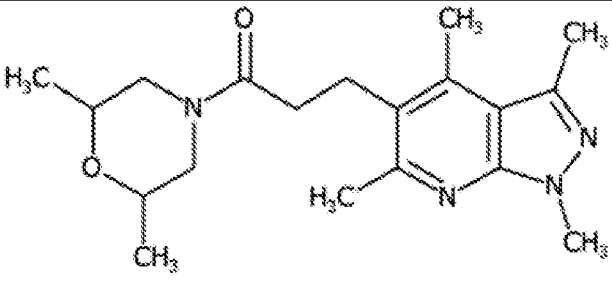
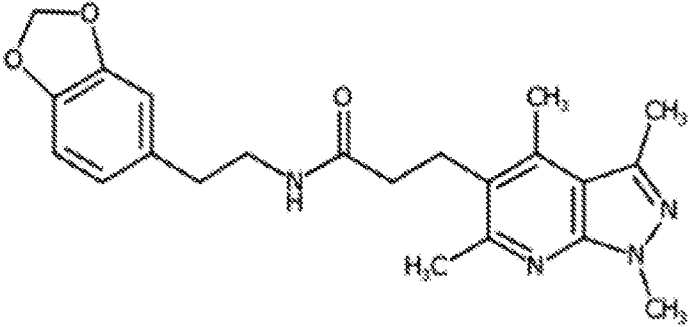
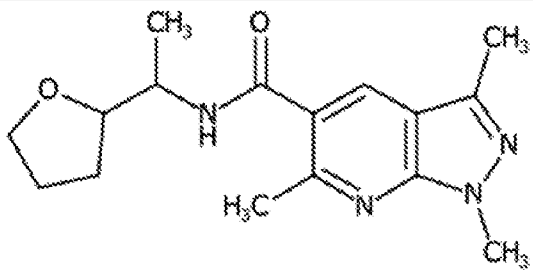
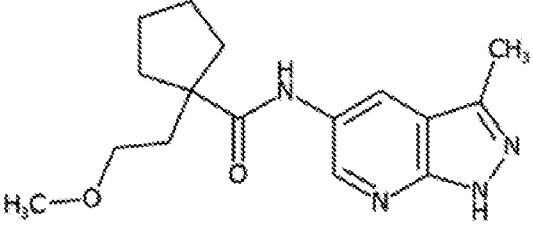
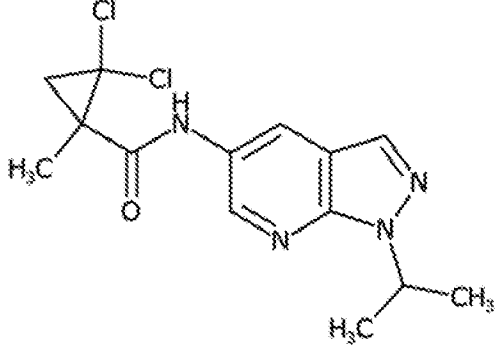
Voorbeeld	Structuur	Relatieve nitrificatie (%) door Nitrososphaera viennensis behandeld met 2,5 μ M verbinding	Relatieve nitrificatie (%) door ABIL behandeld met 10 μ M verbinding
19	 <chem>CC1(C)C(Cl)C(Cl)C1C(=O)Nc2cnc3c2n[nH]3C</chem>	100	90
20	 <chem>CC1=C(C(F)(F)F)N2C(=CN1)C(F)(F)F=C2C</chem>	100	90
21	 <chem>CC1(C)CNC1CCCNC(=O)c2cnc3c2n(C)[nH]3C</chem>	100	90

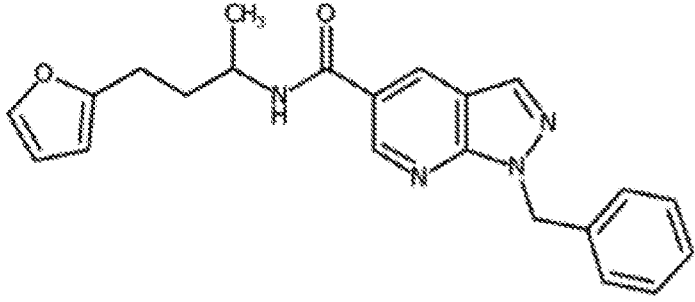
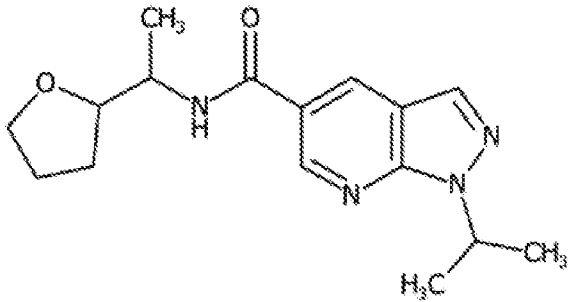
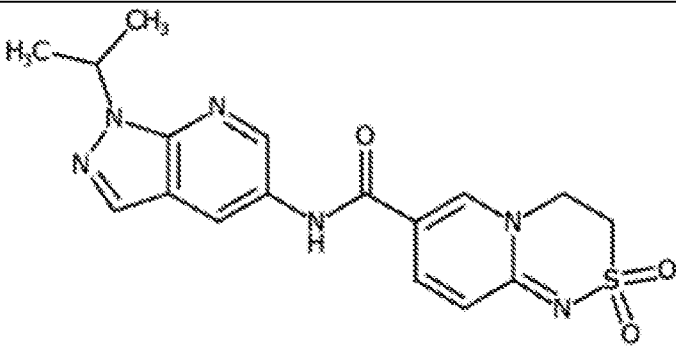
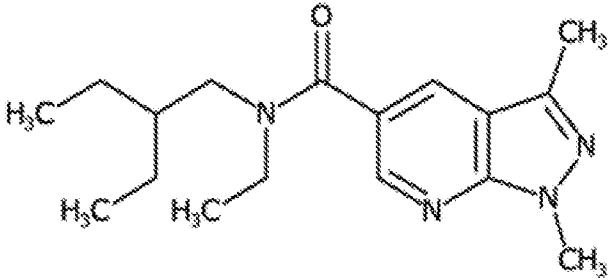
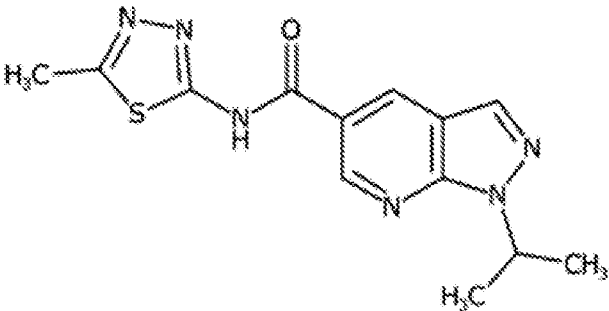
27		100	92
28		100	92
29		100	92
30		100	92
31		99	93

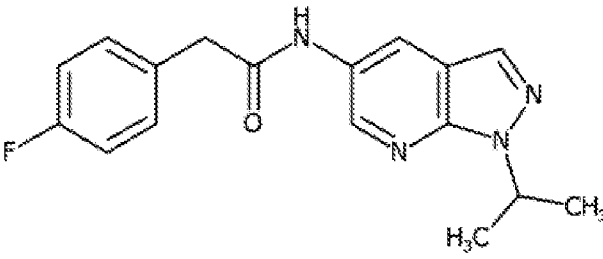
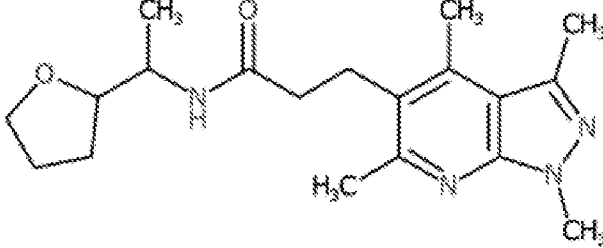
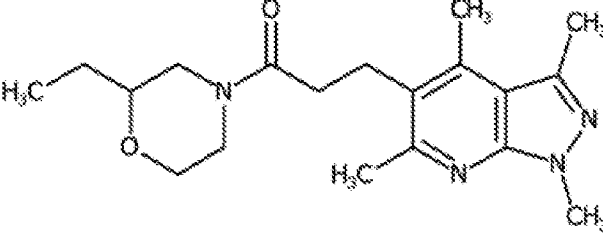
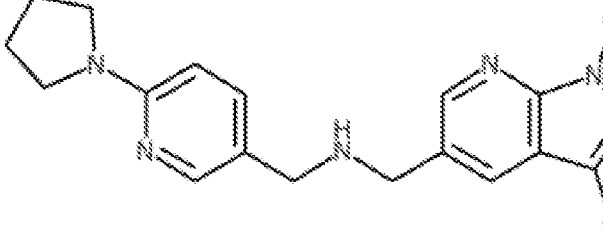
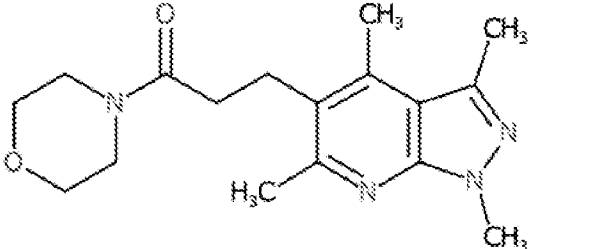
32	 <chem>CCCC(C)N1C=NC2=C1C(=C)C(C3CC3)C(=O)O2</chem>	90	94
33	 <chem>CCCC(C)N1C=NC2=C1C(=C)C(NC(=O)c3cc(F)c(F)cc3)C=C2</chem>	100	94
34	 <chem>CCCC(C)N1C=C(C)N(C)C1=C(C)C2=CC=C(C2)NC(=O)CCC3=CC=C(C3)CC4</chem>	99	96
35	 <chem>CCCC(C)N1C=NC2=C1C(=C)C(NC(=O)CCC3OCC3)C=C2</chem>	98	96
36	 <chem>CCCC(C)N1C=C(C)N(C)C1=C(C)C2=CC=C(C2)C(=O)O</chem>	94	97

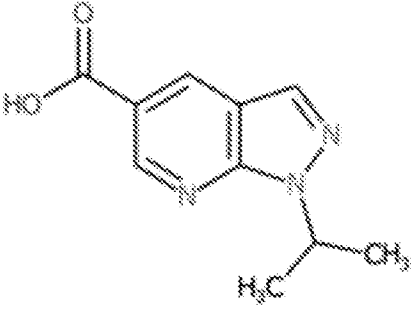
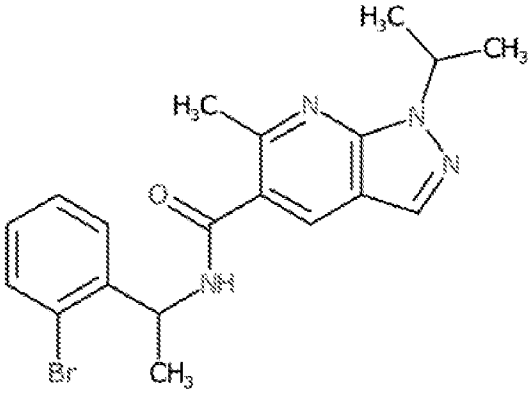
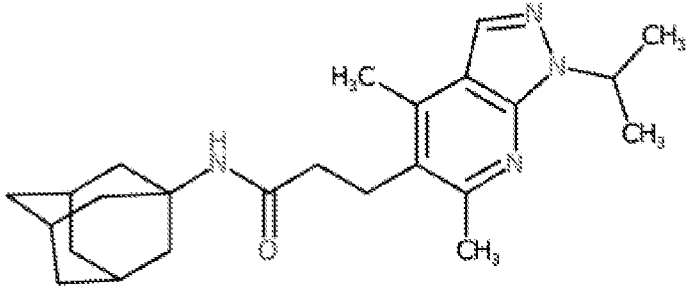
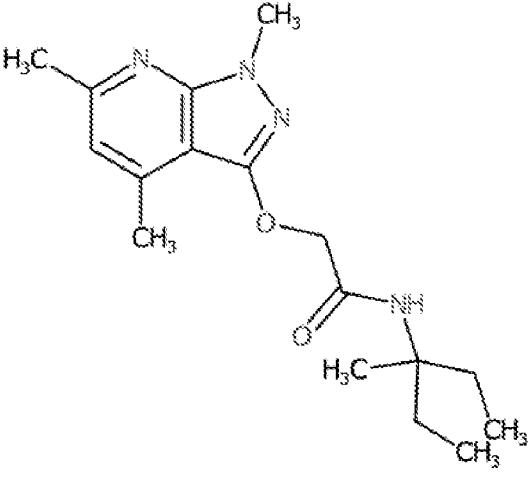
37	 <chem>CN1C=NC=C1CNCCCNC2=CN3C=CC=C3N2</chem>	100	97
38	 <chem>CC(C)N1CCSC1CN2=CC=CC=C2N3C=CC=N3</chem>	99	97
39	 <chem>CC(C)N1C=NC=C1N2C=CC=C2C(=O)N(C)C3=CC(OC)=CC(OC)=3</chem>	100	97
40	 <chem>CC1=CN2C=CC=C2N1CNCCC3=CC=CS3</chem>	93	98
41	 <chem>CC(C)N1C=NC=C1N2C=CC=C2C(=O)N3CCOC3N4CCN(C)CC4</chem>	100	98

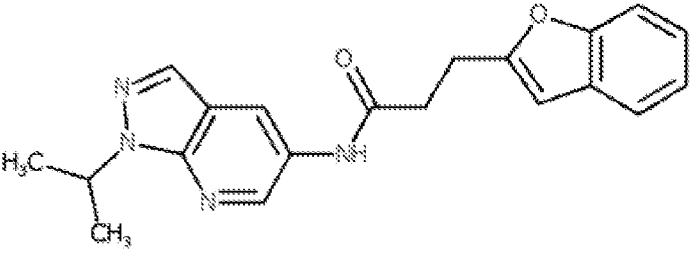
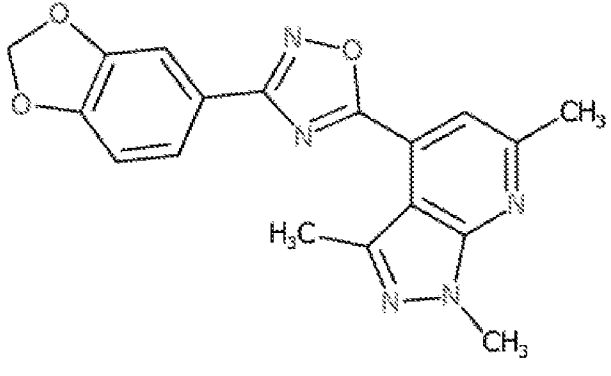
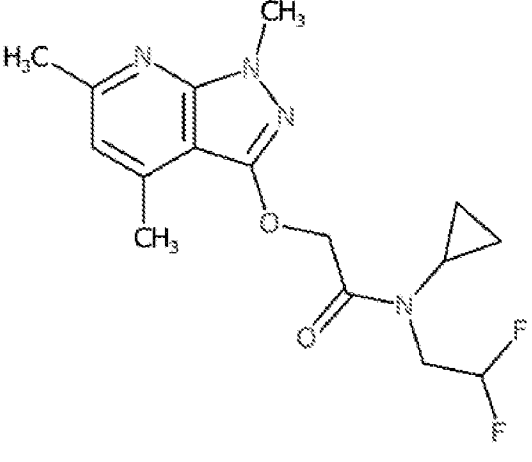
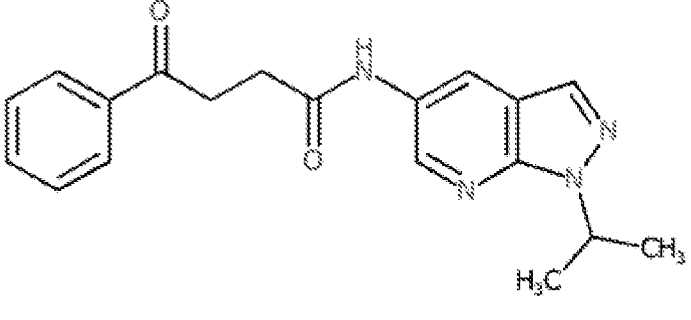
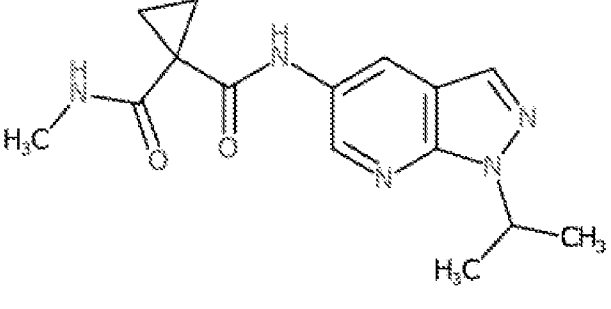
42	 <chem>CC1=NC2=CC=CC=C2N1C(=O)NC3=CC=C(C(F)(F)F)C3</chem>	98	98
43	 <chem>CC1=NC2=CC=CC=C2N1C(=O)NC3=CC=C(S(=O)(=O)C)C3</chem>	100	98
44	 <chem>CC1=NC2=CC=CC=C2N1C(=O)NC3=CC4=CC=CC=C4N3C</chem>	100	99
45	 <chem>CC1=NC2=CC=C(C)C=C2N1C(=O)OCC3=CC=CC=C3N(C)C</chem>	98	99

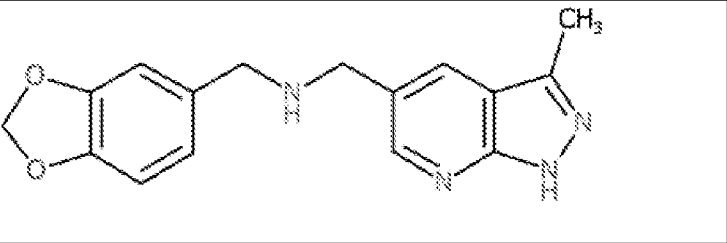
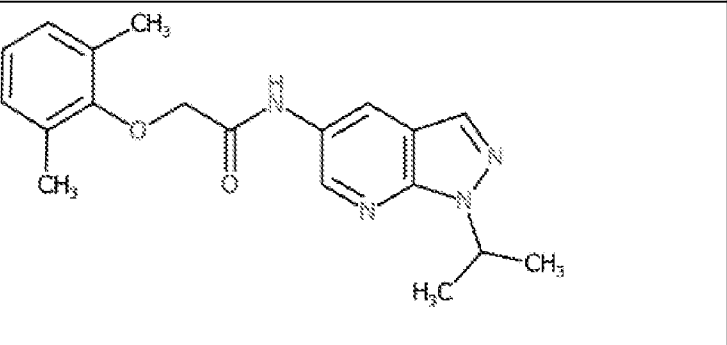
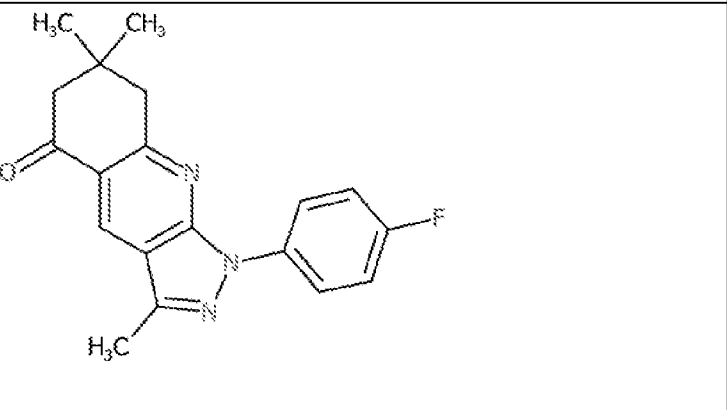
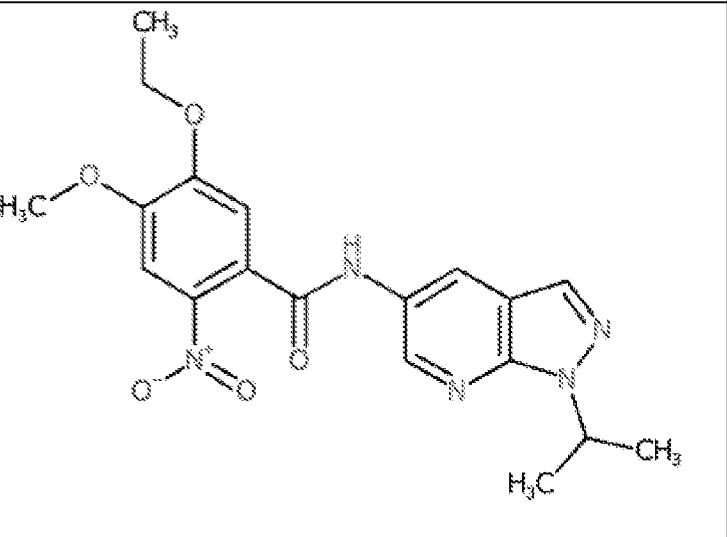
46		90	99
47		100	100
48		99	100
49		100	100
50		92	100

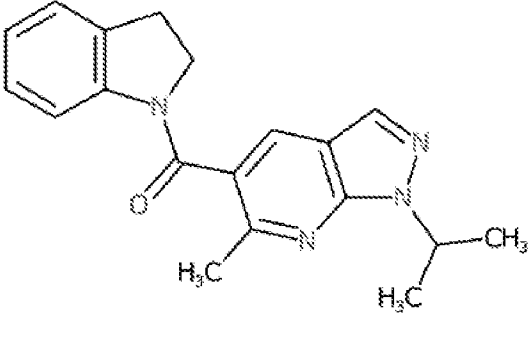
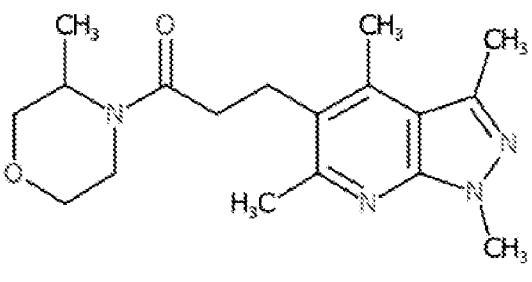
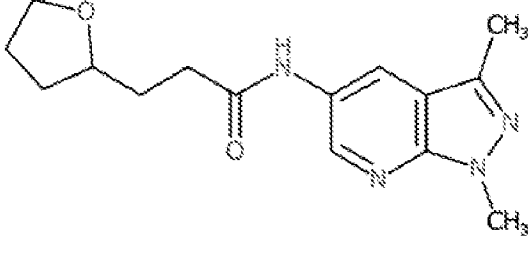
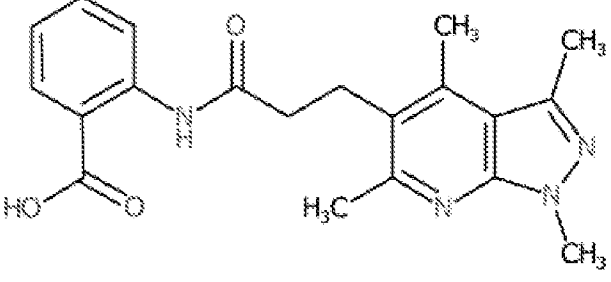
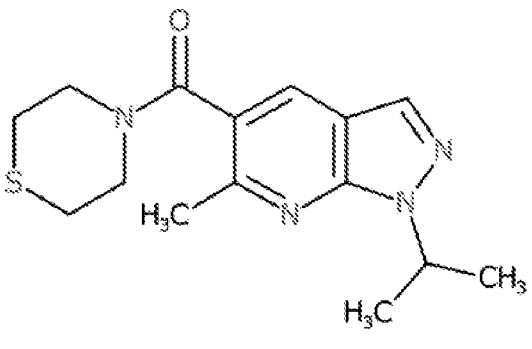
51	 <chem>CC(Cc1ccoc1)NC(=O)c2cc3c(ncn3c2)Cc4ccccc4</chem>	91	100
52	 <chem>CC(C)C(NC(=O)c2cc3c(ncn3c2)C(C)C)C4OCCO4</chem>	100	100
53	 <chem>CC(C)C1=CN2C=CC=C(C2N1)NC(=O)c3cc4c(ncn4c3)S(=O)(=O)N</chem>	95	100
54	 <chem>CC1CCN(CC)CC1C(=O)c2cc3c(ncn3c2)C</chem>	96	100
55	 <chem>CC1=CN=C(S1)NC(=O)c2cc3c(ncn3c2)C(C)C</chem>	100	100

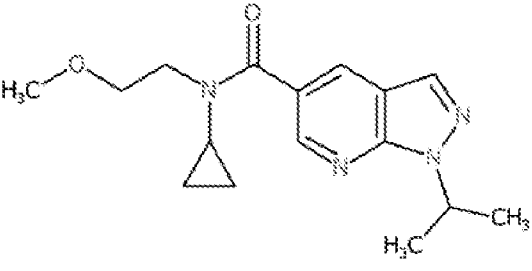
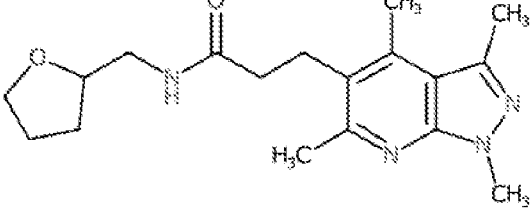
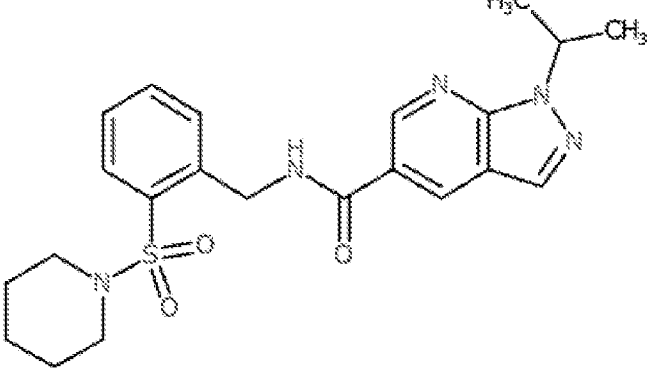
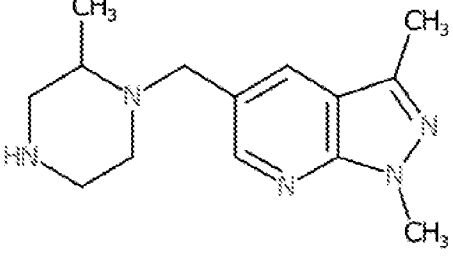
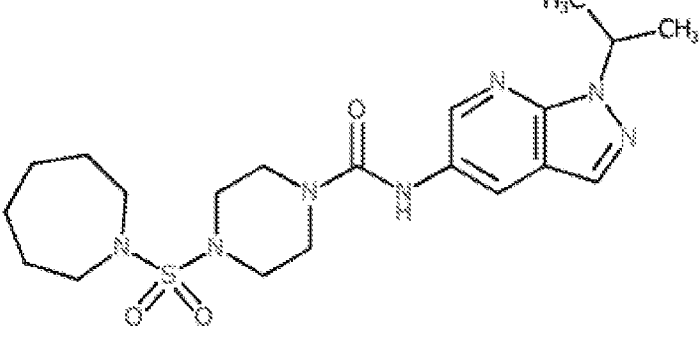
56	 <chem>CC1=CN2C=CC=C2N1CCC(=O)Nc3ccc(F)cc3</chem>	100	100
57	 <chem>CC1=CN2C=CC=C2N1CCC(=O)N(C)C3CCOC3</chem>	97	100
58	 <chem>CC1=CN2C=CC=C2N1CCC(=O)N(C)C3CCOC3</chem>	98	100
59	 <chem>CC1=CN2C=CC=C2N1CCCNC3=CC=C(C=C3)N4CCCC4</chem>	92	100
60	 <chem>CC1=CN2C=CC=C2N1CCC(=O)N3CCOCC3</chem>	100	100

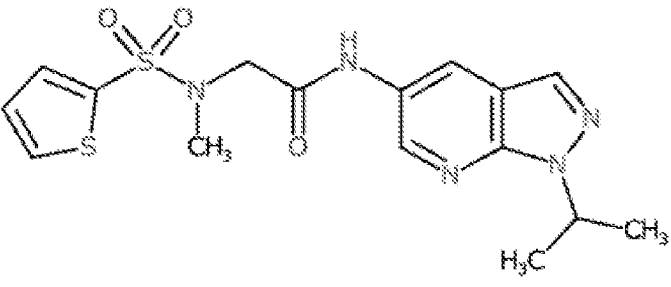
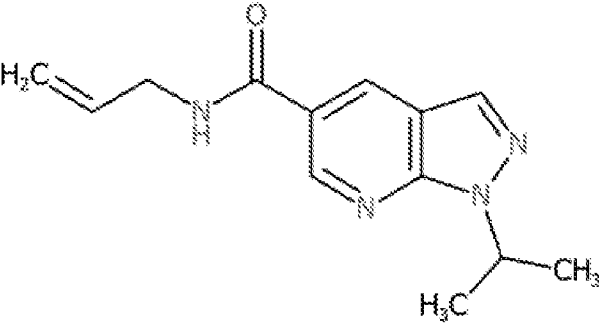
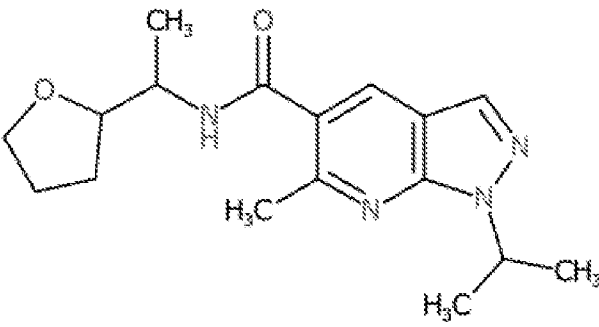
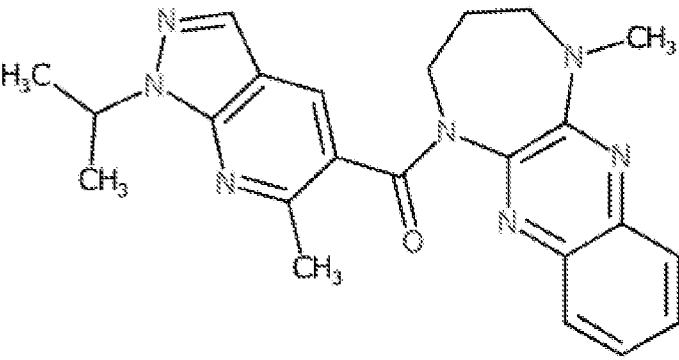
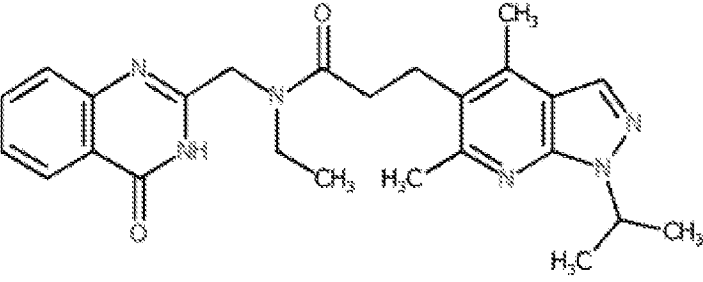
61	 <p>Chemical structure of 2-(1-hydroxypropan-2-yl)imidazo[1,2-a]pyridine-5-carboxylic acid. It features an imidazo[1,2-a]pyridine core with a carboxylic acid group at position 5 and a 1-hydroxypropan-2-yl group at position 2.</p>	100	100
62	 <p>Chemical structure of 2-(2-bromo-1-(propan-2-ylamino)ethyl)benzamide-1,2,4,5-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridine-3-carboxamide. It features a 1,2,4,5-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridine core with a methyl group at position 3, a benzamide group at position 4, and a 2-(2-bromo-1-(propan-2-ylamino)ethyl)benzamide group at position 2.</p>	100	100
63	 <p>Chemical structure of 2-(2-(2-(1,2,3,4,6,7,8-octahydro-1H-cyclohepta[1,2-b]pyridin-5-yl)ethyl)ethyl)imidazo[1,2-a]pyridine-3,4-dimethylpropan-2-ylamine. It features an imidazo[1,2-a]pyridine core with methyl groups at positions 3 and 4, and a 2-(2-(2-(1,2,3,4,6,7,8-octahydro-1H-cyclohepta[1,2-b]pyridin-5-yl)ethyl)ethyl)propan-2-ylamine group at position 2.</p>	100	100
64	 <p>Chemical structure of 2-(2-(2-(2-(1,2,4,5-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)ethyl)ethyl)ethyl)propan-2-ylamine-1,2,4,5-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridine-3,4-dimethyl. It features a 1,2,4,5-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridine core with methyl groups at positions 3 and 4, and a 2-(2-(2-(2-(1,2,4,5-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)ethyl)ethyl)ethyl)propan-2-ylamine group at position 2.</p>	100	100

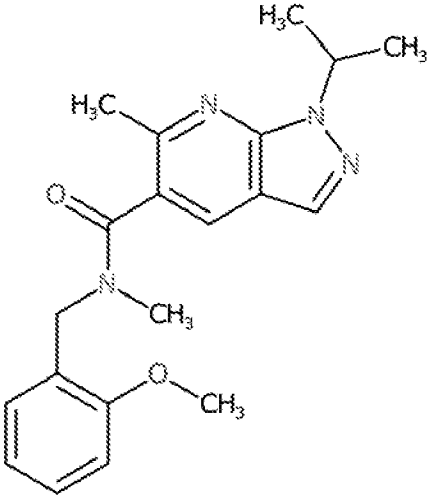
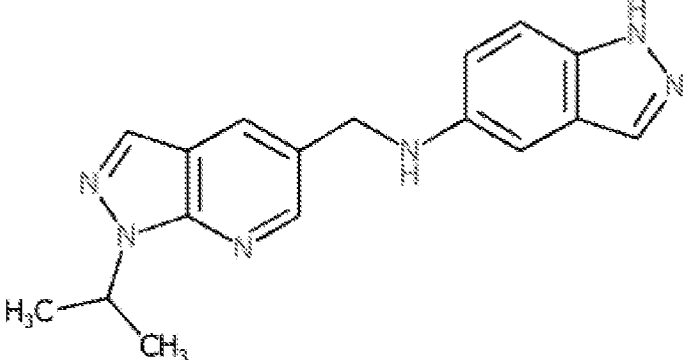
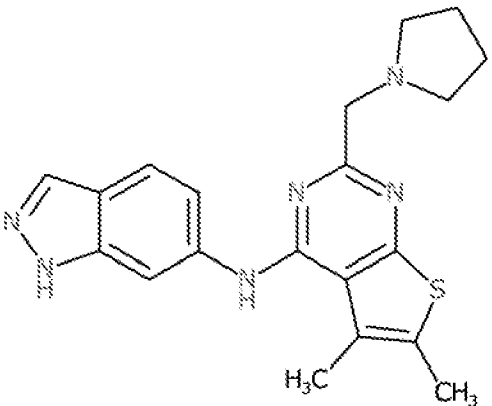
65	 <chem>CC(C)C1=CN2C=CC=C(NC(=O)CCc3c4ccccc4o3)N=C21</chem>	100	100
66	 <chem>CC1=CN2C=CC=C(NC(=O)C3=CN=C(O3)C4=CC=C5C=C(C=C4)O5)N=C21C6=CC=CC=C6C</chem>	99	100
67	 <chem>CC1=CN2C=CC=C(NC(=O)COCC3=CN=C(N3C)C=C21)C=C(C)N2C=CC=C(C2)C</chem>	100	100
68	 <chem>CC(C)C1=CN2C=CC=C(NC(=O)CCC(=O)c3ccccc3)N=C21</chem>	100	100
69	 <chem>CC(C)C1=CN2C=CC=C(NC(=O)CCC(=O)C3CC3)N=C21C(=O)N(C)C</chem>	100	100

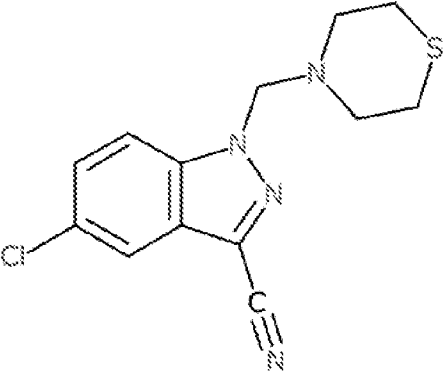
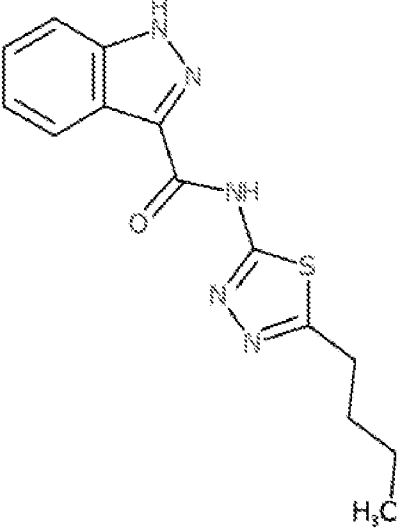
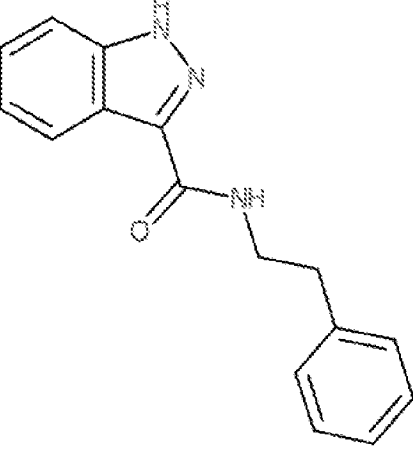
70		100	100
71		94	100
72		99	100
73		93	100

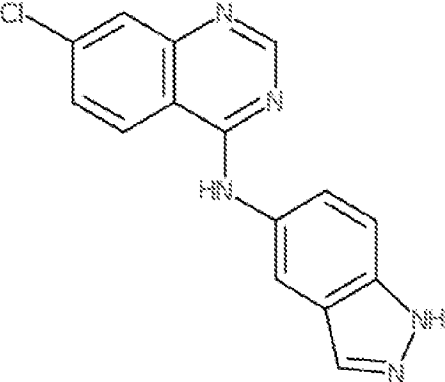
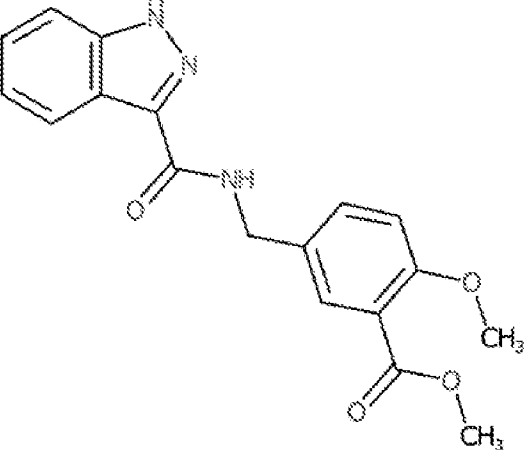
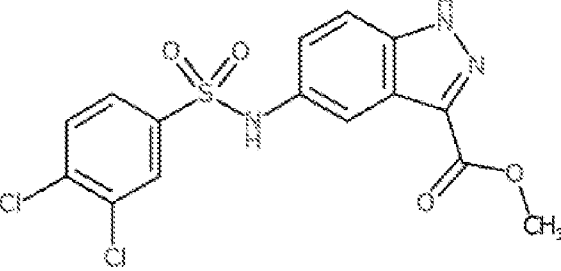
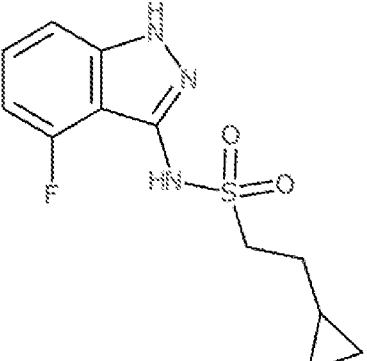
74		100	100
75		100	100
76		100	100
77		100	100
78		100	100

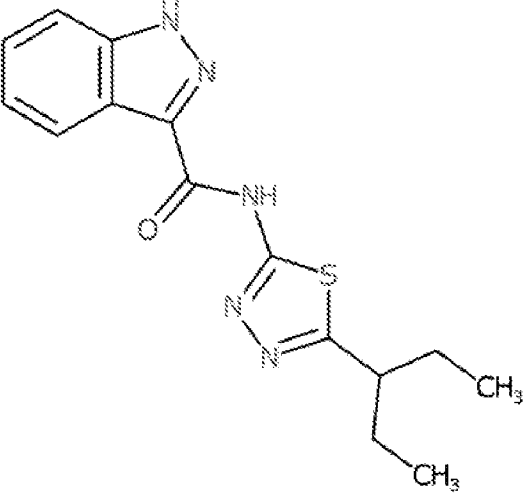
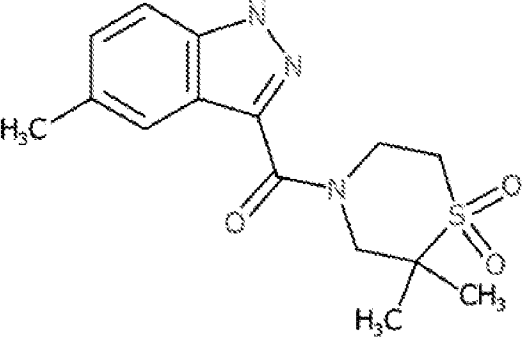
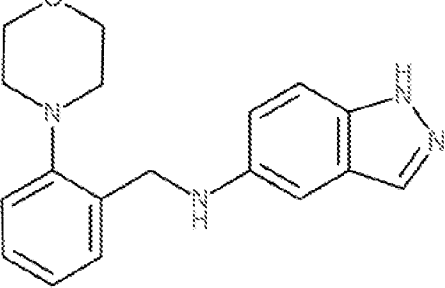
79		97	100
80		100	100
81		100	100
82		96	100
83		100	100

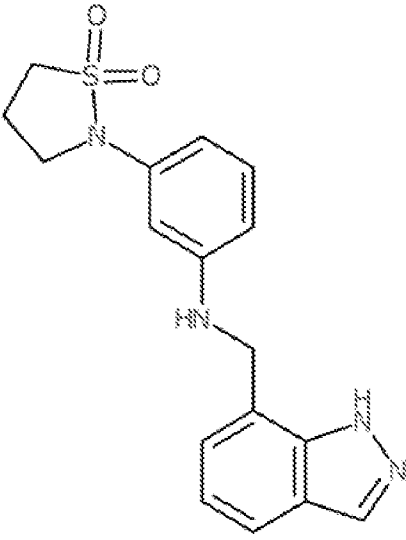
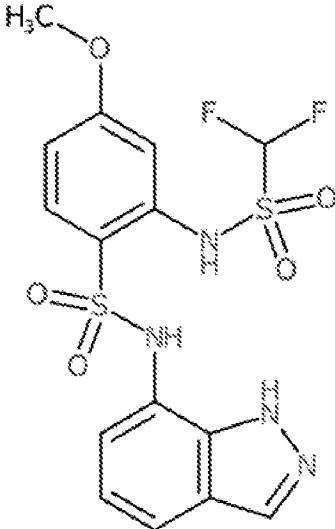
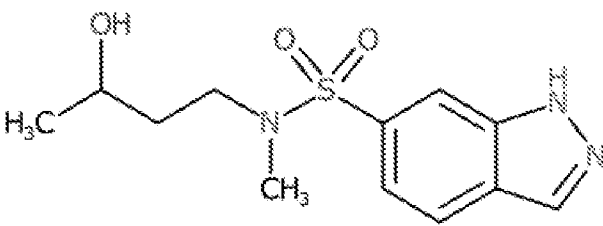
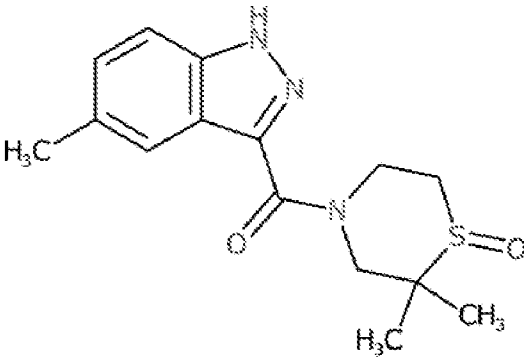
88	 <chem>CN(C)C1=CN=C2C(=N1)C(=CN2)C(=O)N(C)S(=O)(=O)c3ccsc3</chem>	94	100
89	 <chem>CN(C)C1=CN=C2C(=N1)C(=CN2)C(=O)N(C)CC=C</chem>	100	100
90	 <chem>CN(C)C1=CN=C2C(=N1)C(=CN2)C(=O)N(C)C3OCCO3</chem>	93	100
91	 <chem>CN(C)C1=CN=C2C(=N1)C(=CN2)C(=O)N3C4=CC=CC=C4N(C)CC3</chem>	100	100
92	 <chem>CN(C)C1=CN=C2C(=N1)C(=CN2)C(=O)N(C)CC3C(=O)N(C)C4=CC=CC=C4N3</chem>	100	100

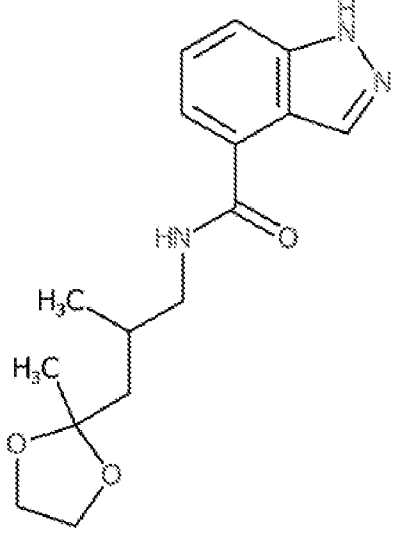
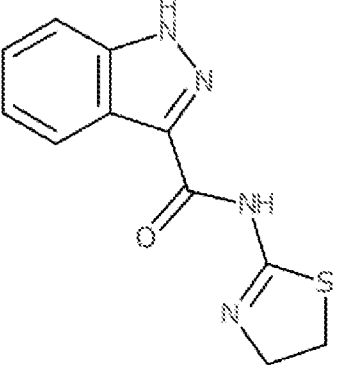
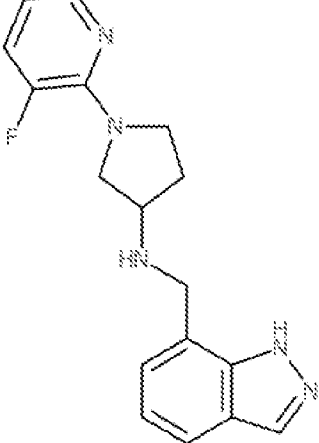
93	 <chem>CC(C)N1C=CN2C=C(C)N=C21NC(C)Cc3cc(OC)ccc3</chem>	100	100
94	 <chem>CC(C)N1C=CN2C=C(C)N=C21NC(C)Cc3ccc4c(c3)ncn4</chem>	100	92
95	 <chem>CC1=C(C)SC2=C1N=CN=C2Nc3ccc4c(c3)ncn4CN5CCCC5</chem>	96	97

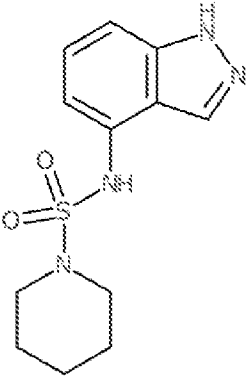
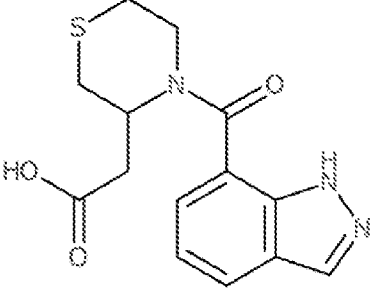
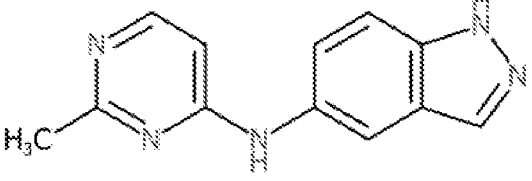
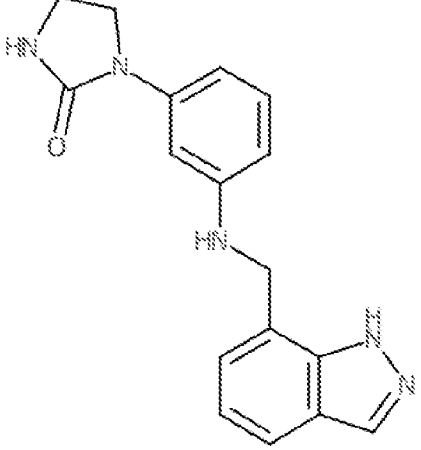
96	 <p>Chemical structure of 1-(4-chlorophenyl)-2-(methylsulfanyl)imidazole-3-carbonitrile. It features a benzimidazole ring system with a chlorine atom at the 4-position of the benzene ring, a methylsulfanyl group (-S-CH₃) at the 2-position of the imidazole ring, and a nitrile group (-C≡N) at the 3-position of the imidazole ring.</p>	96	85
97	 <p>Chemical structure of N-(4-(butylthio)imidazol-2-yl)benzimidazole-3-carboxamide. It consists of a benzimidazole ring system with a carboxamide group (-CONH-) at the 3-position of the imidazole ring. The nitrogen of the amide group is attached to the 2-position of another imidazole ring, which has a butyl group (-CH₂CH₂CH₂CH₃) at the 4-position. The terminal carbon of the butyl chain is labeled H₃C.</p>	100	86
98	 <p>Chemical structure of N-(3-phenylpropyl)benzimidazole-3-carboxamide. It features a benzimidazole ring system with a carboxamide group (-CONH-) at the 3-position of the imidazole ring. The nitrogen of the amide group is attached to a propyl chain, which is further substituted with a phenyl ring at the 3-position.</p>	100	89

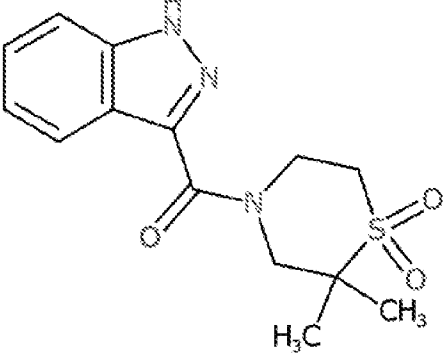
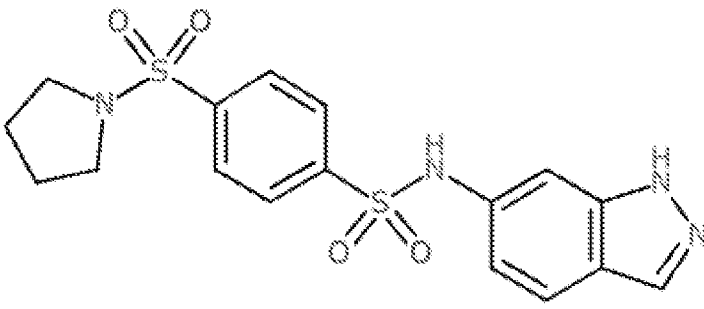
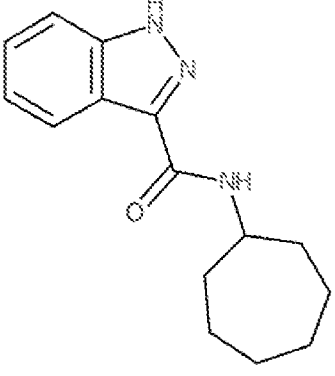
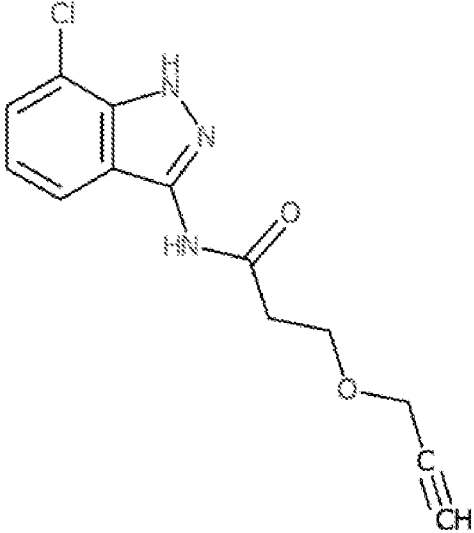
99	 <p>Chemical structure of 2-(4-chlorophenyl)quinazolin-4-ylamine. It consists of a quinazoline ring system with a chlorine atom at the 6-position and an amino group at the 2-position, which is further substituted with a 4-phenyl group.</p>	100	90
100	 <p>Chemical structure of N-(3,4-dimethoxybenzyl)indole-3-carboxamide. It features an indole ring system with a carboxamide group at the 3-position, which is substituted with a benzyl group. The benzene ring of the benzyl group has methoxy groups at the 3 and 4 positions.</p>	96	90
101	 <p>Chemical structure of N-(3,4-dichlorophenyl)-N'-(2-methoxy-1H-indol-3-yl)sulfonamide. It consists of a sulfonamide group where the nitrogen is substituted with a 3,4-dichlorophenyl group and the nitrogen of the sulfonamide is substituted with a 2-methoxy-1H-indol-3-yl group.</p>	94	90
102	 <p>Chemical structure of N-(cyclopropylpropyl)sulfonamide. It features a sulfonamide group where the nitrogen is substituted with a propyl chain, which is further substituted with a cyclopropyl ring at the end.</p>	100	90

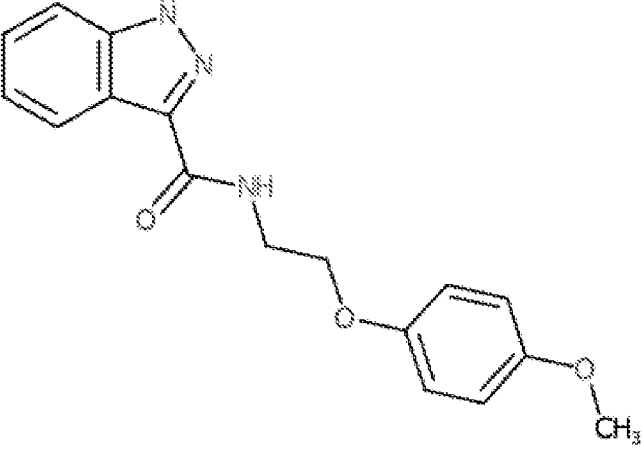
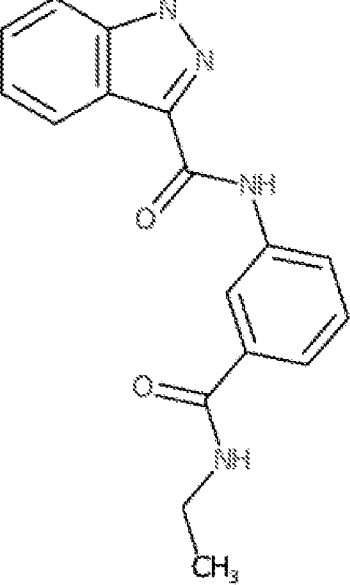
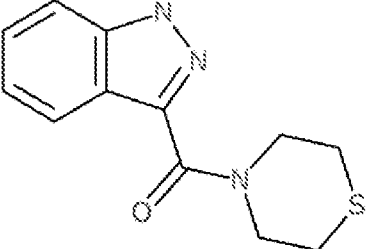
103		100	91
104		100	93
105		100	94

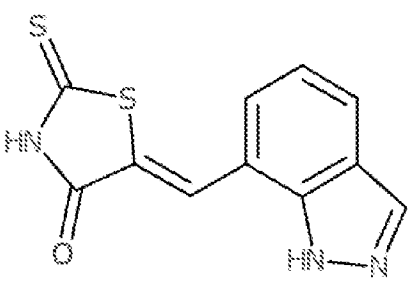
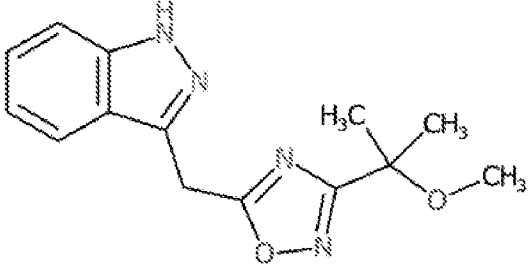
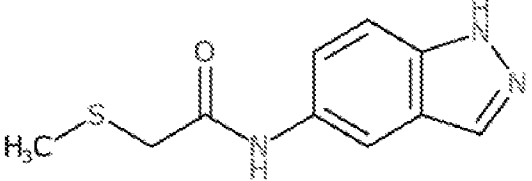
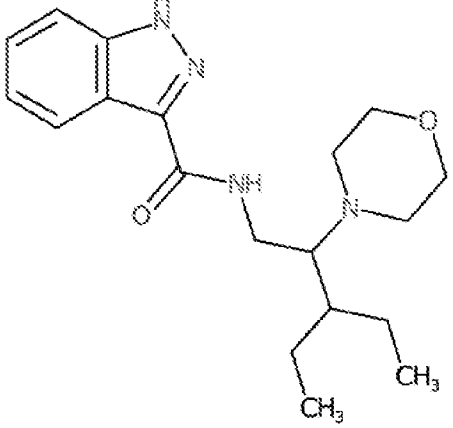
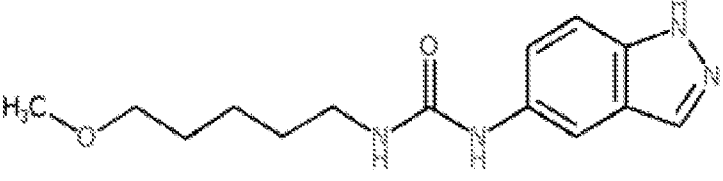
106	 <chem>C1CN(C1)C2=CC=C(C=C2)CNCCNC3=CC=C(C=C3)S(=O)(=O)N4CCCC4</chem>	100	94
107	 <chem>COc1ccc(cc1NC(=O)N2C=CN3C=CC=C32)S(=O)(=O)NCC(F)F</chem>	100	96
108	 <chem>CC(O)CCN(C)S(=O)(=O)c1ccc2c(c1)ncn2</chem>	100	97
109	 <chem>Cc1ccc2c(c1)ncn2C(=O)N3CCN(C3)S(=O)(=O)C4(C)C</chem>	100	97

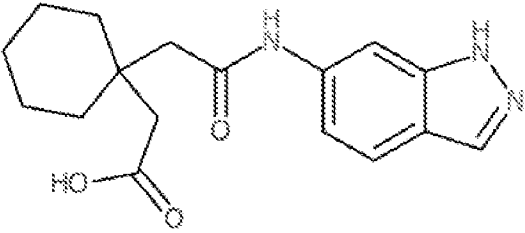
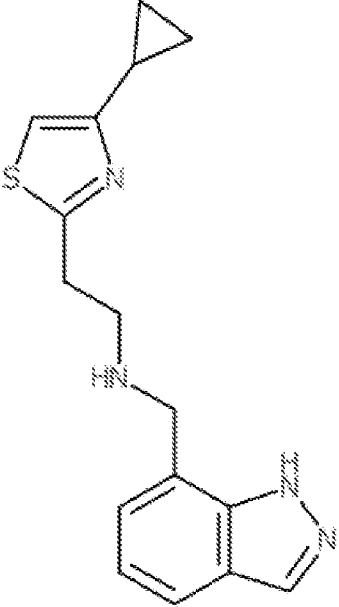
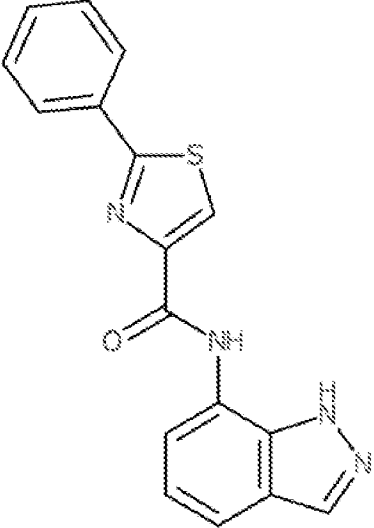
110	 <chem>CN(C)CC1OCCO1C(=O)c2cnc3ccccc23</chem>	100	97
111	 <chem>CN(C)C1=CNCS1C(=O)c2cnc3ccccc23</chem>	95	98
112	 <chem>CN(C)Cc1cnc2ccccc12c3ccncc3F</chem>	100	98

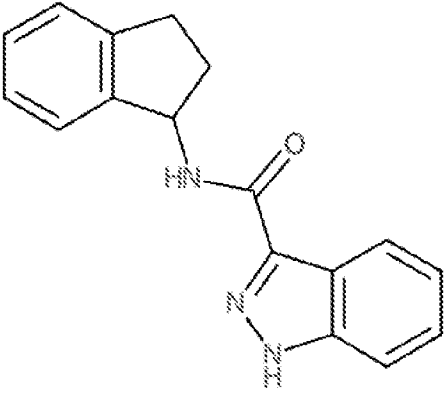
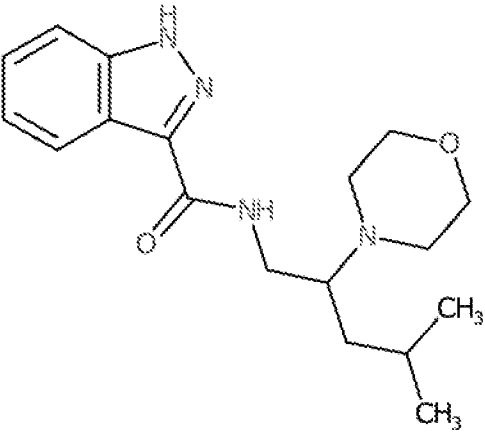
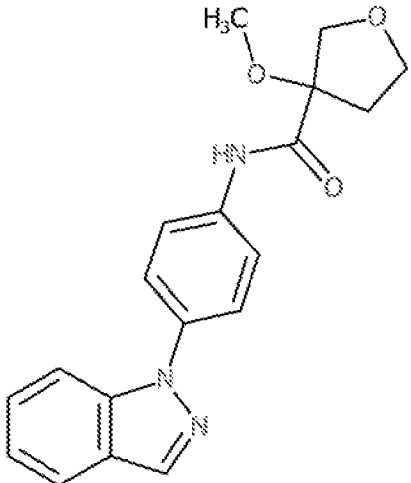
113		100	98
114		100	98
115		96	98
116		96	99

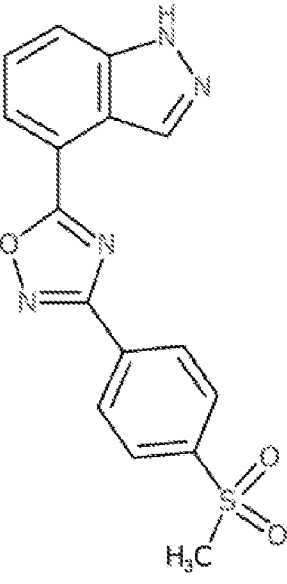
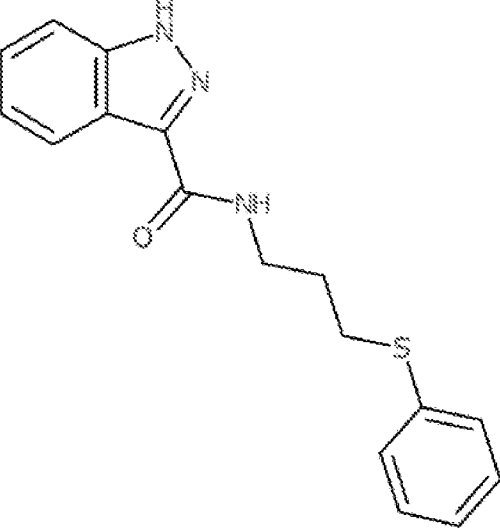
117	 <chem>CN1CC(S(=O)(=O)C2=CC=CC=C2)CC1C(=O)c3cnc4ccccc34</chem>	100	99
118	 <chem>C1CCN1S(=O)(=O)c2ccc(S(=O)(=O)c3cnc4ccccc34)cc2</chem>	100	99
119	 <chem>C1CCN1C(=O)NC2CCCCC2</chem>	100	99
120	 <chem>CC#CCOCC(=O)Nc1cnc2cc(Cl)ccc12</chem>	98	100

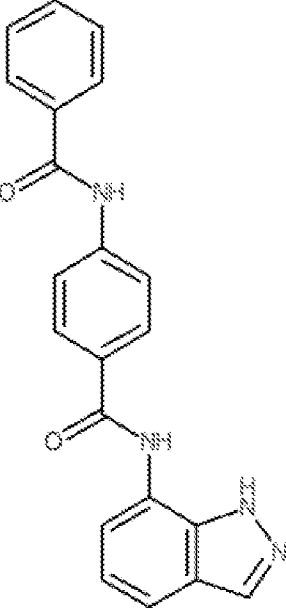
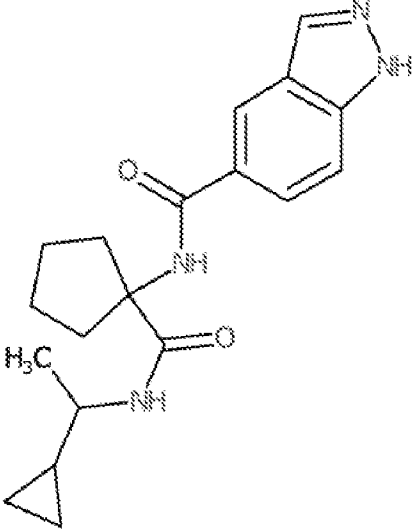
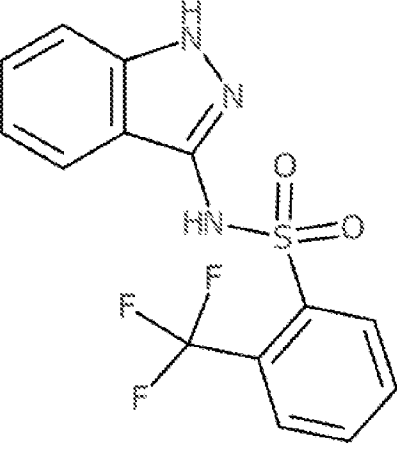
121	 <p>Chemical structure of 1-(4-methoxyphenyl)propan-1-yl 1H-indolizol-3-carboxylate. It features an indolizine ring system connected via a carbonyl group to a propanoate chain, which is further linked to a 4-methoxyphenyl group.</p>	100	100
122	 <p>Chemical structure of 1-(2-(ethylamino)propanoyl)phenyl 1H-indolizol-3-carboxylate. It features an indolizine ring system connected via a carbonyl group to a phenyl ring, which is further linked to a propanoate chain with an ethylamino group.</p>	95	100
123	 <p>Chemical structure of 1-(1,4-dithiane-2-yl) 1H-indolizol-3-carboxylate. It features an indolizine ring system connected via a carbonyl group to a 1,4-dithiane ring system.</p>	92	100

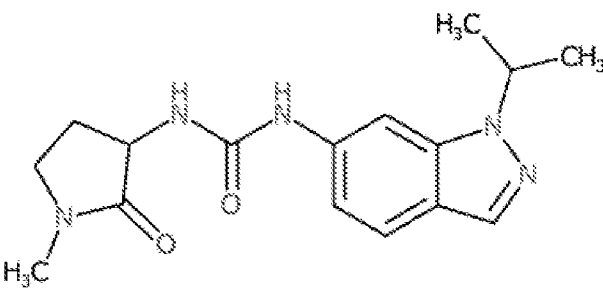
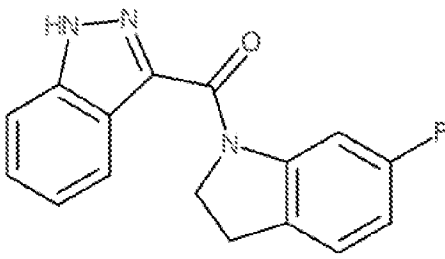
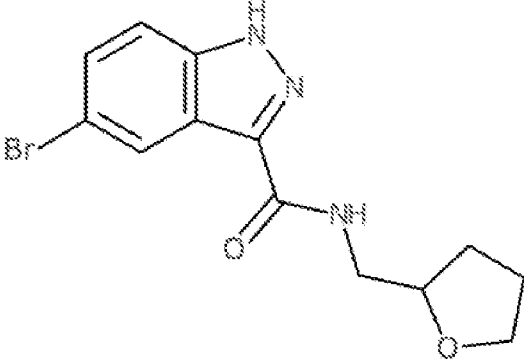
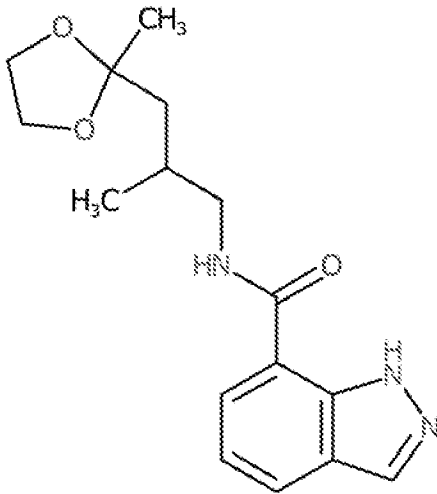
124	 <p>Chemical structure of a thiazolidine-4-one derivative. The thiazolidine ring is substituted at the 2-position with a benzimidazole group via a double bond.</p>	99	100
125	 <p>Chemical structure of a benzimidazole derivative. The benzimidazole ring is substituted at the 2-position with a methylisoxazole ring. The methylisoxazole ring is further substituted with a dimethyl acetal group (C(CH₃)₂OC(CH₃)₃).</p>	97	100
126	 <p>Chemical structure of a benzimidazole derivative. The benzimidazole ring is substituted at the 4-position with a methylsulfanylacetamide group (CH₃S-CH₂-C(=O)-NH-).</p>	100	100
127	 <p>Chemical structure of a benzimidazole derivative. The benzimidazole ring is substituted at the 2-position with a morpholine ring via an amide linkage. The morpholine ring is further substituted with a methylpropyl group (CH₂CH₂CH₃).</p>	100	100
128	 <p>Chemical structure of a benzimidazole derivative. The benzimidazole ring is substituted at the 4-position with a long alkoxy chain (H₃C-O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C(=O)-NH-).</p>	100	100

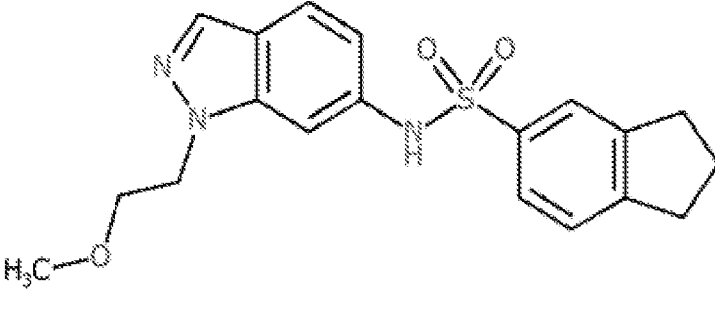
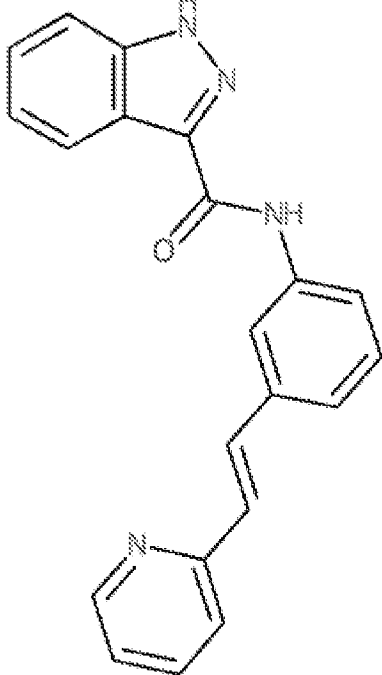
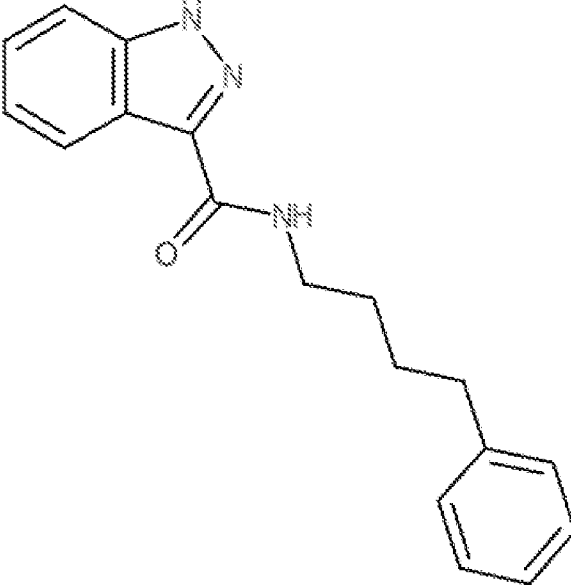
129		100	100
130		94	100
131		100	100

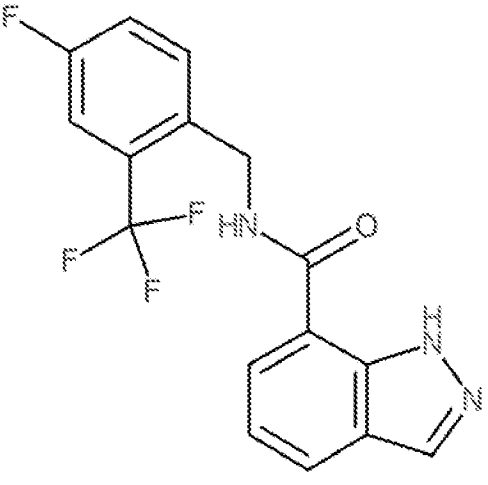
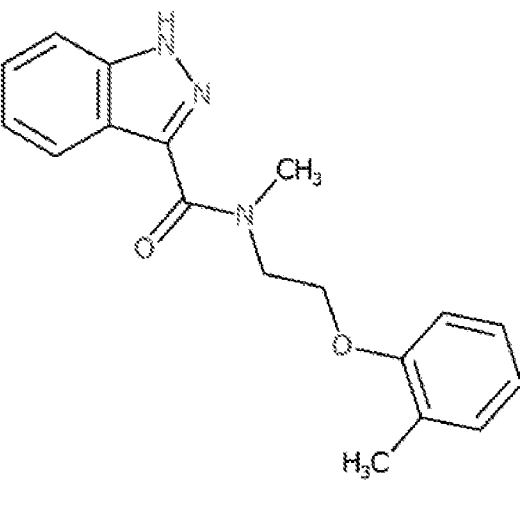
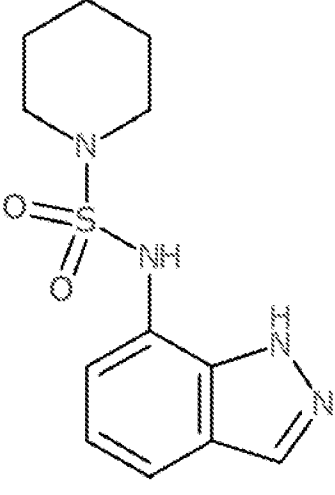
132	 <chem>O=C(Nc1c2ccccc2c1)C3=CNC4=CC=CC=C34</chem>	97	100
133	 <chem>CC(C)CN(C1CCOCC1)CCNC(=O)c2c3ccccc3n2</chem>	100	100
134	 <chem>COC1CCOCC1C(=O)Nc2ccc(N3C4=CC=CC=C4N3)cc2</chem>	100	100

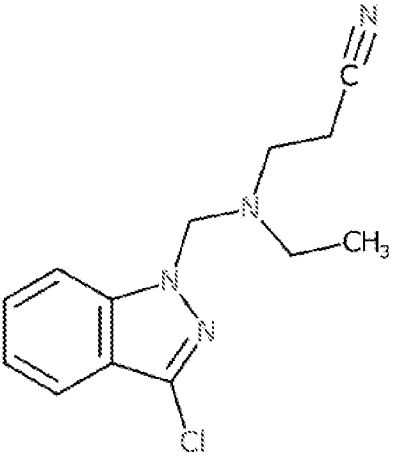
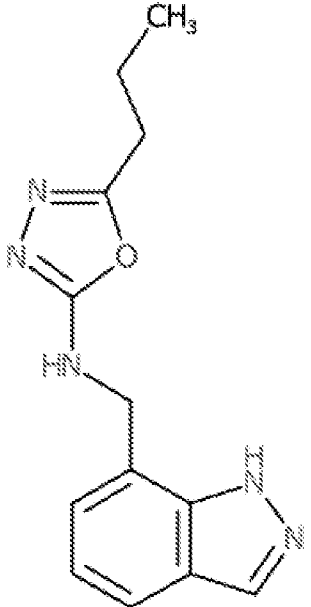
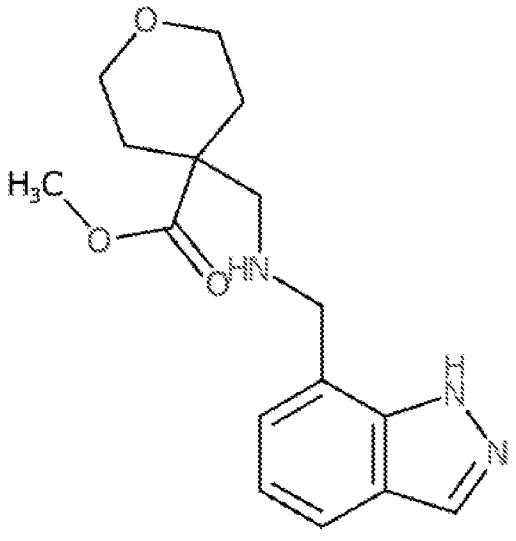
135	 <p>The structure shows a benzotriazole ring system connected at its 5-position to the 4-position of a 1,2,4-fizzoxazole ring. This fizzoxazole ring is further substituted at its 4-position with a para-substituted phenyl ring. The phenyl ring has a methylsulfonyl group (-SO₂CH₃) attached at the para position.</p>	100	100
136	 <p>The structure features a benzotriazole ring system connected at its 2-position to the carbonyl carbon of an acetamide group (-NH₂CO-). The nitrogen of this acetamide group is attached to a four-carbon aliphatic chain. The terminal carbon of this chain is bonded to a sulfur atom, which is in turn bonded to a phenyl ring.</p>	96	100

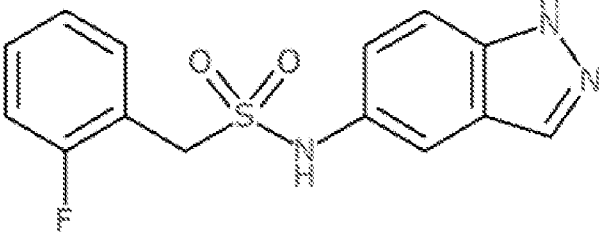
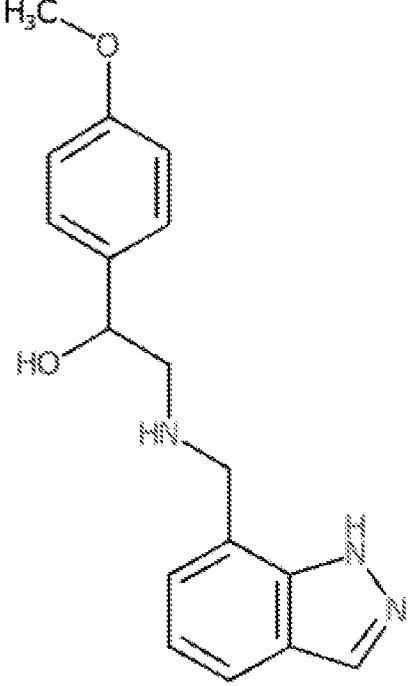
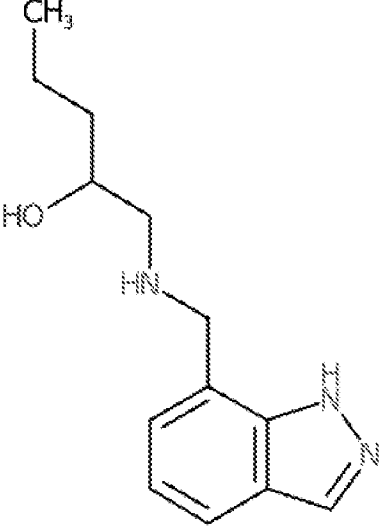
137	 <p>Chemical structure of N-(4-(N-phenylacetamido)phenyl)acetamide. It consists of a central benzene ring with two acetamido groups (-NHCOCH₃) attached at the para positions. One acetamido group is further substituted with a phenyl ring.</p>	98	100
138	 <p>Chemical structure of N-(1-methyl-2-(cyclopropylamino)ethyl)pyrrolidine-2-carboxamide. It features a pyrrolidine ring with a methyl group and a cyclopropylamino group on the nitrogen atom, and a carboxamide group (-CONH-) attached to the 2-position of the pyrrolidine ring. The carboxamide group is further substituted with a 1H-indol-3-yl group.</p>	100	100
139	 <p>Chemical structure of N-(1,1-dimethyl-2-phenylethyl)benzenesulfonamide. It consists of a benzene ring with a sulfonamide group (-SO₂NH-) attached to the 1-position. The sulfonamide group is further substituted with a 1,1-dimethyl-2-phenylethyl group.</p>	97	100

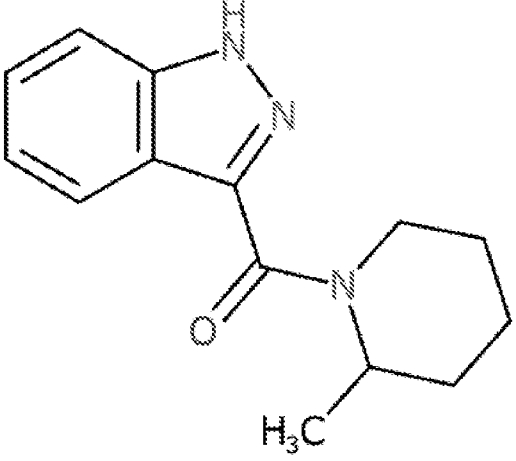
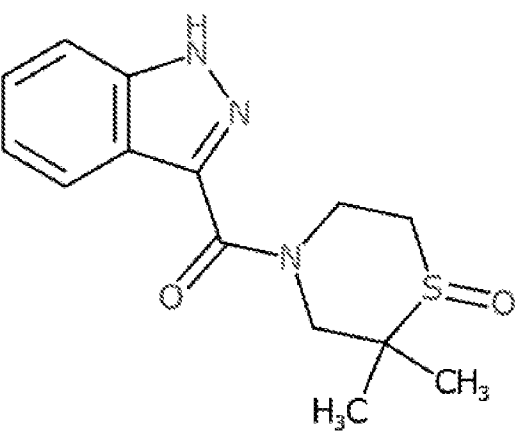
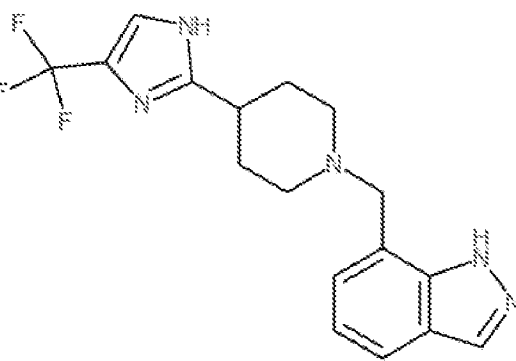
140	 <chem>CC(C)C1CCN1C(=O)Nc2cnc3ccccc23C</chem>	100	100
141	 <chem>Fc1ccc2c(c1)CCN2C(=O)c3c[nH]c4ccccc34</chem>	93	100
142	 <chem>C1CCOC1CNC(=O)c2c[nH]c3cc(Br)ccc23</chem>	100	100
143	 <chem>CC(C1CCOC1)CNC(=O)c2c[nH]c3ccccc23</chem>	100	100

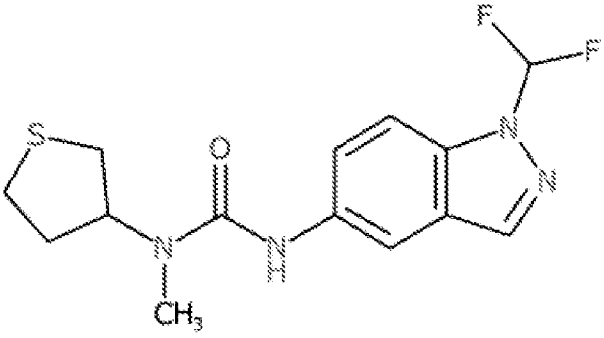
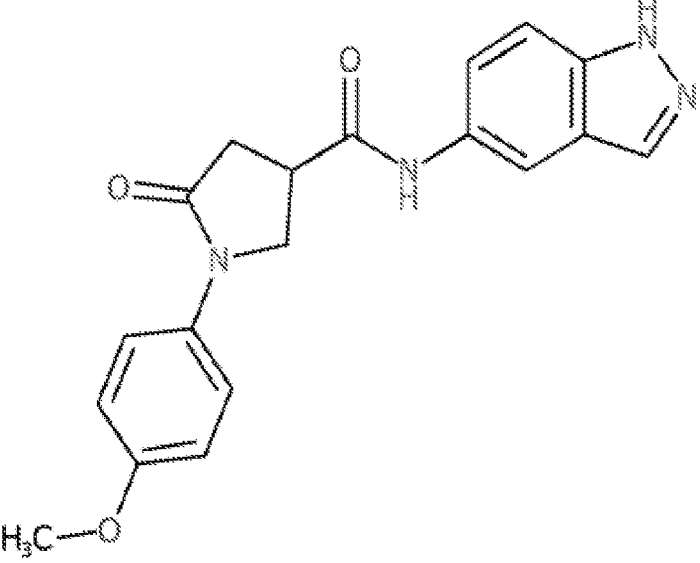
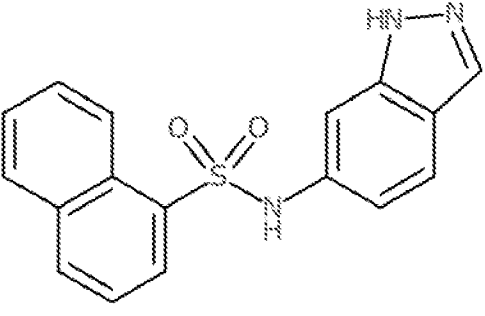
144	 <p>Chemical structure of a benzimidazole derivative. The benzimidazole ring system is substituted at the 2-position with a propyl chain ending in a methoxy group (H₃C-O-). At the 5-position, it is substituted with a sulfonamide group (-NH-SO₂-) attached to a benzofuran moiety.</p>	100	100
145	 <p>Chemical structure of a benzimidazole derivative. The benzimidazole ring system is substituted at the 2-position with a carbonyl group (-C(=O)-) which is further substituted with an amide group (-NH-) attached to a phenyl ring. This phenyl ring is connected via a trans-stilbene-like double bond to another phenyl ring.</p>	96	100
146	 <p>Chemical structure of a benzimidazole derivative. The benzimidazole ring system is substituted at the 2-position with a carbonyl group (-C(=O)-) which is further substituted with an amide group (-NH-) attached to a long alkyl chain (hexyl group) that terminates in a phenyl ring.</p>	96	100

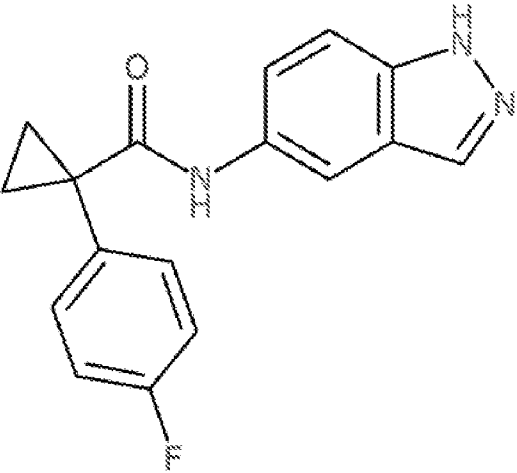
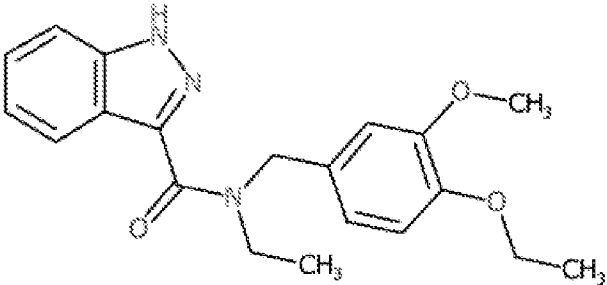
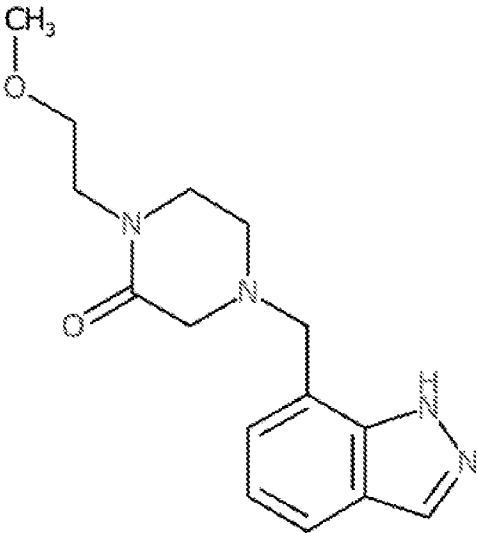
147	 <chem>CC1=NC2=CC=CC=C2N1C(=O)N(C3=CC=C(C=C3)F)C(F)(F)F</chem>	92	100
148	 <chem>CC1=NC2=CC=CC=C2N1C(=O)N(C)CCOC3=CC=C(C=C3)C</chem>	100	100
149	 <chem>C1CCN(C1)S(=O)(=O)NC2=CC=CC=C2N3=CC=CC=C32</chem>	100	100

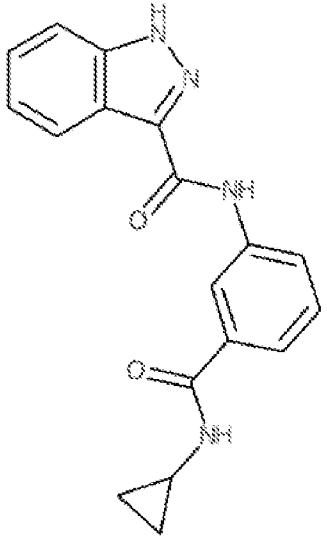
150	 <p>Chemical structure of 2-(2-(2-cyanoethyl)ethylamino)-1H-benzimidazole-3-chloride. It features a benzimidazole ring system with a chlorine atom at the 3-position and a 2-(2-cyanoethyl)ethylamino group at the 2-position.</p>	100	100
151	 <p>Chemical structure of 2-(2-(2-methylpropyl)oxazol-5-ylamino)-1H-benzimidazole. It features a benzimidazole ring system with a 2-(2-(2-methylpropyl)oxazol-5-ylamino) group at the 2-position.</p>	94	100
152	 <p>Chemical structure of 2-(2-(2-methoxy-1,3-dioxolane-5-ylamino)-1H-benzimidazole. It features a benzimidazole ring system with a 2-(2-(2-methoxy-1,3-dioxolane-5-ylamino) group at the 2-position.</p>	98	100

153	 <chem>Cc1ccc(cc1)CCNS(=O)(=O)Nc2cnc3ccccc23</chem>	100	100
154	 <chem>COC1=CC=C(C=C1)C(O)CNc2cnc3ccccc23</chem>	99	100
155	 <chem>CCCN(O)CNc2cnc3ccccc23</chem>	100	100

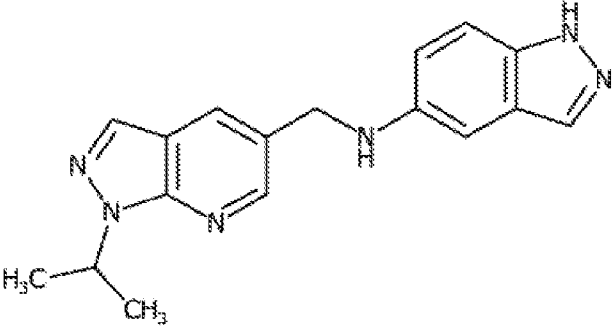
156	 <p>Chemical structure of 1-(1-methylpiperidin-4-yl)carbamoyl-1H-indazole. It features an indazole ring system connected via a carbonyl group to the nitrogen atom of a piperidine ring, which has a methyl group attached to the 1-position.</p>	100	100
157	 <p>Chemical structure of 1-(1,1-dimethyl-2-sulfanylpiperidin-4-yl)carbamoyl-1H-indazole. It features an indazole ring system connected via a carbonyl group to the nitrogen atom of a piperidine ring. The piperidine ring has a sulfone group (-S(=O)₂-) and two methyl groups attached to the 2-position.</p>	94	100
158	 <p>Chemical structure of 1-(2-(2,2,2-trifluoroethyl)-1H-imidazol-5-yl)methylpiperidine. It features a piperidine ring connected via a methylene group to the 5-position of an imidazole ring. The imidazole ring has a 2,2,2-trifluoroethyl group attached to the 2-position.</p>	100	100

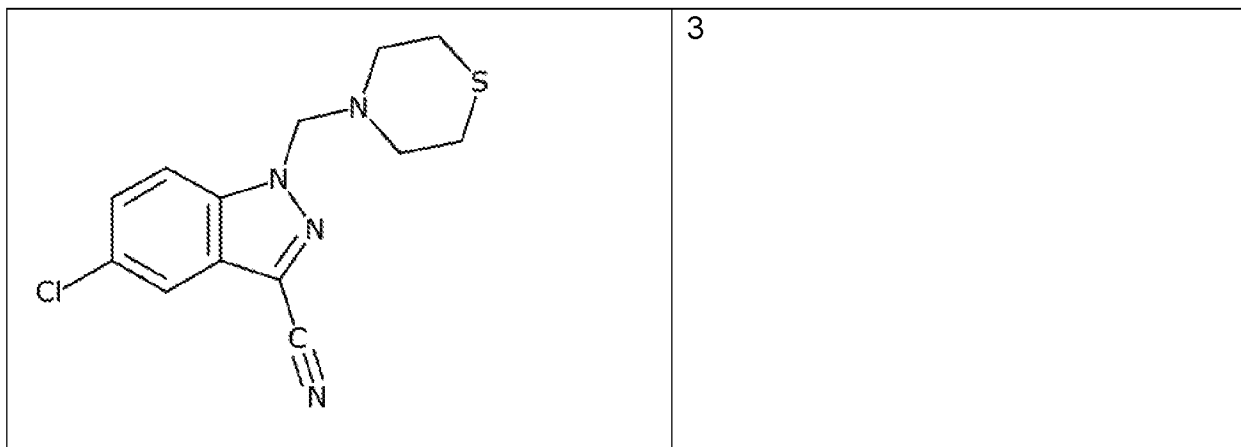
159	 <chem>CN(C1CCSC1)C(=O)Nc2ccc3c(c2)ncn3CC(F)(F)F</chem>	91	100
160	 <chem>COC1=CC=C(C=C1)N2CCCCC2C(=O)Nc3ccc4c(c3)ncn4</chem>	100	100
161	 <chem>O=S(=O)(Nc1ccc2c(c1)ncn2)c3cccc4ccccc34</chem>	100	100

162		100	100
163		99	100
164		100	100

165		100	100
-----	---	-----	-----

5 Twee van deze varianten werden ook getest op *Aliivibrio fischeri* om de mogelijke toxiciteit te testen. In tegenstelling tot de pyrazolo[3,4,-b]pyridine-4-carboxamide nitrificatieremmers, waarvan geen enkele een significante remming van *Aliivibrio fischeri* gaf, remden de twee varianten de groei van *Aliivibrio fischeri*, hetgeen dus wijst op een mogelijke toxiciteit.

Structuur	Groei van <i>Aliivibrio fischeri</i> , ten opzichte van de controle zonder verbinding (%)
	40



Test uitgevoerd in landbouwgrond

Om het vermogen van de pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamiden om nitrificatie te remmen in een relevantere context te bevestigen, werd een representatief lid toegepast in een nitrificatieremmingstest met landbouwgrond. De remmer van voorbeeld 2 die een duidelijke, zij het niet de sterkste, nitrificatieremming in de twee geteste systemen vertoonde, werd geselecteerd.

Drie landbouwgronden werden behandeld met of zonder deze nitrificatieremmer en na het opbrengen van ammonium werd het ammoniumverbruik na 3, 5 of 7 dagen gecontroleerd. Na één week zonder nitrificatieremmer was in alle drie de bodems het grootste deel van het toegediende ammonium verbruikt. In één experiment met een incubatieperiode van 7 dagen en in één bodem, bodem 2, had de nieuwe (archaeale) nitrificatieremmer, in vergelijking met de negatieve (geen remmer) controle, een positief effect op het ammoniumgehalte, wat aantoont dat hij het potentieel heeft om de nitrificatie in de bodem te remmen. De andere twee bodems vertoonden geen respons, mogelijk als gevolg van een nitrificerende gemeenschap die in deze bodems wordt gedomineerd door AOB. De bacteriële nitrificatieremmer DMP kon inderdaad, althans in bodem 1, tot op zekere hoogte de nitrificatie afremmen en het ammoniumverlies verminderen. Het ammoniumverlies kon niet worden gewijzigd door een verhoging van de DMP-dosis. Het bleek dus dat onder deze omstandigheden een maximale vermindering van het ammoniumverbruik ten gevolge van de bacteriële nitrificatie werd bereikt.

Interessant is dat in alle drie de bodems de combinatie van de twee remmers het ammoniumverbruik verminderde tot boven het niveau dat kon worden bereikt met DMP alleen, wat resulteerde in een hoger ammoniumgehalte door de combinatie van DMP en de AOA-remmer van voorbeeld 2.

- In alle gevallen heeft het nieuw geïdentificeerde type nitrificatieremmer van pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide een superieure werking als het wordt gecombineerd met de algemeen gebruikte bacteriële nitrificatieremmer (DMP), waaruit blijkt dat het doeltreffend is als remmer van nitrificatie in de bodem. Hetzelfde geldt indien gecombineerd met andere nitrificatieremmers zoals DMPSA of verbindingen afgeleid van 1,3-thiazolidine-2-thion (2-thiazoline-2-thiol) of structureel gelijksoortige daarvan afgeleide verbindingen.
- Bovendien melden meerdere veldstudies dat (bacteriële) nitrificatieremmers, afhankelijk van de omstandigheden en de plaats van toepassing, geen of slechts een beperkt effect hebben op de nitrificatie of de gewasopbrengst. Evenzo is er, zoals hier wordt aangetoond, soms slechts een zwak effect van de veelgebruikte remmer DMP. De combinatie van DMP en de archaea-inhibitor pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide, samen gericht tegen zowel AOB als AOA, remt de nitrificatie echter sterker onder dezelfde omstandigheden. Het beperkte effect van bacteriële nitrificatieremmers zou dus, althans gedeeltelijk en voor bepaalde landbouwvelden, het gevolg kunnen zijn van de aanwezigheid van AOA's. Met andere woorden, gelijktijdige toepassing van de pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide archaeale nitrificatieremmers, gericht tegen AO's die niet het doelwit zijn van algemeen gebruikte nitrificatieremmers, heeft het potentieel om de efficiëntie van de nitrificatieremming aanzienlijk te verhogen, zoals aangetoond voor ten minste drie verschillende bodems.
- De resultaten zijn weergegeven in de volgende tabel 2. De verbinding van voorbeeld 2 staat in tabel 1, tweede regel.

Tabel 2

Bodem	Incubatie tijd	Behandeling	Nitrificatieremming (%)
1	7 dagen	DMP (50 µM)	88
		DMP (100 µM)	84
		Voorbeeld 2 (50 µM)	0
		DMP (50 µM) + Voorbeeld 2 (50 µM)	97
2	3 dagen	DMP (50 µM)	68

		Voorbeeld 2 (50 μ M)	4
		DMP (50 μ M) + Voorbeeld 2 (50 μ M)	89
		DMPSA (50 μ M)	47
		DMPSA (50 μ M) + Voorbeeld 2 (50 μ M)	57
	5 dagen	1,3-thiazolidine-2-thion (50 μ M)	59
		1,3-thiazolidine-2-thion (50 μ M) + Voorbeeld 2 (50 μ M)	74
	7 dagen	DMP (50 μ M)	14
		DMP (100 μ M)	14
		Voorbeeld 2 (50 μ M)	15
		DMP (50 μ M)+ Voorbeeld 2 (50 μ M)	38
3	3 dagen	DMP (50 μ M)	52
		Voorbeeld 2 (50 μ M)	5
		DMP (50 μ M) + Voorbeeld 2 (50 μ M)	69
	7 dagen	DMP (50 μ M)	0
		DMP (100 μ M)	0
		Voorbeeld 2 (50 μ M)	0
		DMP (50 μ M)+ Voorbeeld 2 (50 μ M)	39

Onderstaande tabel toont het percentage nitrificatieremming door toepassing van 6 verschillende nitrificatieremmers en hun nitrificatieremming in combinatie met Voorbeeld 2. In alle gevallen geeft Voorbeeld 2 een additief effect aan de geteste nitrificatieremmers.

Bodem	Incubatie tijd	Behandeling	Nitrificatieremming (%)
2	7 dagen	Voorbeeld 2 (100 μ M)	0
		DCD (100 μ M)	0
		DCD (100 μ M) + Voorbeeld 2 (100 μ M)	14

	1,2,4-triazool (100 μ M)	32
	1,2,4-triazool (100 μ M) + Voorbeeld 2 (100 μ M)	53
	DMPSA (100 μ M)	44
	DMPSA (100 μ M) + Voorbeeld 2 (100 μ M)	51
	1,3-thiazolidine-2-thion (100 μ M)	46
	1,3-thiazolidine-2-thion (100 μ M) + Voorbeeld 2 (100 μ M)	58
	Nitrapyrine (100 μ M)	48
	Nitrapyrine (100 μ M) + Voorbeeld 2 (100 μ M)	71
	DMP (100 μ M)	54
	DMP (100 μ M) + Voorbeeld 2 (100 μ M)	66

In onderstaande tabel staan de dubbele en drievoudige combinaties van de bacteriële nitrificatieremmers DMP, 1,3-thiazolidine-2-thion en de archeologische remmer uit Voorbeeld 2. Voorbeeld 2 geeft een additief effect in zowel de dubbele als de drievoudige combinatie, maar er is geen verschil binnen de combinaties waarin Voorbeeld 2 is opgenomen. Het additieve effect hangt dus af van Voorbeeld 2 en niet van (de combinatie van) andere nitrificatieremmers.

Bodem	Incubatielijd	Behandeling	Nitrificatieremming (%)
2	7 dagen	Voorbeeld 2 (100 μ M)	0a
		DMP (100 μ M) + 1,3-thiazolidine-2-ion (100 μ M)	38b
		DMP (100 μ M) + Voorbeeld 2 (100 μ M)	49c
		1,3-thiazolidine-2-thion (100 μ M) + Voorbeeld 2 (100 μ M)	44c
		DMP (100 μ M) + 1,3-thiazolidine-2-thion (100 μ M) + Voorbeeld 2 (100 μ M)	45c

* letters in superscript geven statistisch significant verschil aan

Beperking van de uitstoot van broeikasgassen

- Om het remmende effect van de nieuwe klasse nitrificatieremmers op stikstofverliezen verder te bevestigen, werden gasemissies van twee landbouwbodems (Moorslede en Sint-Laureins) opgevangen na bemesting met ammonium en behandeld met voorbeeld 2, DMP of de combinatie van DMP en voorbeeld 2. NO, N₂O, CO₂ en CH₄ werd gemeten. De onderstaande tabel toont de cumulatieve waarden gedurende een incubatie van 99 uur. De volgende tabel toont de cumulatieve waarden gedurende een incubatie van 215 uur
- Er zijn meerdere voorbeelden waarbij NO en N₂O worden gereduceerd na behandeling met Voorbeeld 2. De vermindering van NO is het duidelijkst in Sint-Laureins: zowel het afzonderlijke gebruik van Voorbeeld 2 als de combinatie van Voorbeeld 2 met DMP vermindert de NO-uitstoot ten opzichte van respectievelijk de DMSO- of DMP-controle. De vermindering van N₂O is het duidelijkst in Moorslede, waar het gebruik van Voorbeeld 2 alleen de emissie sterk vermindert ten opzichte van de DMSO-controle, terwijl Voorbeeld 2 in Sint-Laureins een additief effect heeft ten opzichte van DMP bij 215 h. Hieruit blijkt dat de nieuwe klasse nitrificatieremmers het potentieel heeft om de stikstofverliezen te verminderen, terwijl de mogelijke vermindering toeneemt wanneer ze wordt toegepast in combinatie met DMP.

Bodem	Broeikasgas	Behandeling	Cumulatieve emissie op het aangegeven tijdstip [ppb]				
			4h	24h	48h	72h	99h
Moorslede	N ₂ O	DMSO (geen remmer)	226	1895	3733	4466	4466
		Voorbeeld 2	119	834	1616	1875	1875
		DMP	0	0	0	0	0
		DMP + Voorbeeld 2	0	0	0	0	0

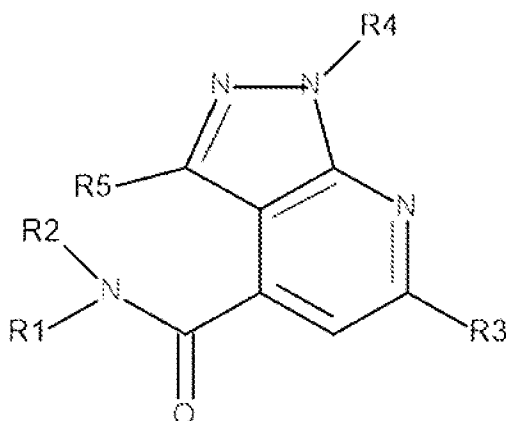
	NO	DMSO (geen remmer)	263	614	1014	1162	1160
		Voorbeeld 2	256	611	1020	1189	1183
		DMP	48	49	47	64	64
		DMP + Voorbeeld 2	40	41	49	68	62
Sint-Laureins	N2O	DMSO (geen remmer)	42	481	1065	1587	1730
		Voorbeeld 2	33	498	1074	1562	1703
		DMP	0	0	0	0	0
		DMP + Voorbeeld 2	0	0	0	0	0
	NO	DMSO (geen remmer)	92	228	423	631	713
		Voorbeeld 2	81	201	371	547	600
		DMP	26	59	98	162	187
		DMP + Voorbeeld 2	22	58	93	151	174

Bodem	Broeikasgas	Behandeling	Cumulatieve emissie bij 215 h[ppb]
Sint-Laureins	N2O	DMP	47
		DMP + Voorbeeld 2	10
	NO	DMP	243

		DMP + Voorbeeld 2	184
--	--	----------------------	-----

Conclusies

1. Het gebruik van een pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide van de algemene formule (I)



(I)

5

met de volgende definities:

R1-waterstof of C1-4-alkyl,

10

R2C1-12-koolwaterstofresidu dat één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel, waarbij R1 en R2, samen met het stikstofatoom dat hen verbindt, ook een verzadigde of onverzadigde heterocyclische radicaal met vijf of zes leden kunnen vormen, die naar keuze ook één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel,

15

R3C1-12-koolwaterstofresidu dat één heteroatoom kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel,

R4C1-8-koolwaterstofresidu,

R5-waterstof of C1-4-alkyl,

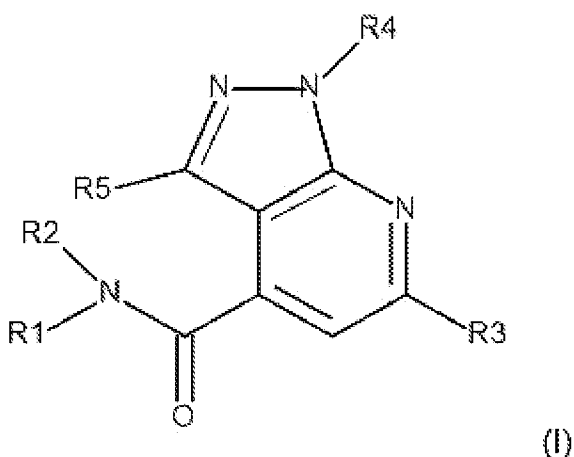
als nitrificatieremmer.

20

2. Het gebruik zoals geclaimd in claim 1, waarin R1 en/of R5 onafhankelijk van elkaar waterstof, methyl of ethyl zijn.
3. Het gebruik zoals geclaimd in claim 1 of 2, waarin R2 een C2-10-koolwaterstofresidu is, dat één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel, en bij voorkeur een C3-8-koolwaterstofresidu is, dat één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit

- de groep stikstof, zuurstof en zwavel, bij voorkeur waarin R2 als heteroatomen één of twee zuurstofatomen bevat, of één stikstofatoom of één stikstofatoom en één zuurstofatoom, of één stikstofatoom en één zwavelatoom, bij voorkeur wanneer R2 een verzadigd lineair of vertakt koolwaterstofresidu is, een lineair koolwaterstofresidu dat een cyclisch heteroalkylresidu draagt of een aromatisch of heteroaromatisch residu, waarbij het koolwaterstofresidu één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep van zuurstof en stikstof, of wanneer R2 een onverzadigd heterocyclisch residu is.
- 5
4. Het gebruik zoals geclaimd in een van de claims 1 tot en met 3, waarin R3 een C3-7-koolwaterstofresidu is dat één zuurstofatoom kan bevatten, bij voorkeur een vertakt of cyclisch koolwaterstofresidu dat één zuurstofatoom kan bevatten.
- 10
5. Het gebruik zoals geclaimd in een van de claims 1 tot en met 4, waarin R4 geen alkynyl- of allenylgroepen bevat en bij voorkeur C1-8-alkyl is, bij voorkeur C1-6-alkyl, meer bij voorkeur C1-4-alkyl.
- 15
6. Het gebruik van een pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide als omschreven in een van de claims 1 tot en met 5 als additief of bekledingsmateriaal voor anorganische en/of organische en/of organominerale meststoffen, bij voorkeur anorganische meststoffen, meer bij voorkeur ammonium- en/of ureumhoudende stikstofhoudende meststoffen.
- 20
7. Het gebruik zoals geclaimd in claim 6, waarin de pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide wordt geleverd in de vorm van een formulering, oplossing of dispersie, afzonderlijk of gelijktijdig met een meststof, of wordt opgenomen in de meststof of wordt toegepast op de meststof.
- 25
8. Het gebruik van een pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide als omschreven in een van de claims 1 tot en met 5 voor het verminderen van de stikstof- of koolstofverliezen in anorganische en/of organische en/of organinerale meststoffen of stikstof- of koolstofhoudende verbindingen of materialen en ook op oogstafval en weiland of tijdens de opslag van vloeibare mest en voor het verminderen van de ammoniakbelasting in dierenstallen.
- 30
9. Het gebruik zoals geclaimd in een van de claims 1 tot en met 8, waarbij de pyrazool [3,4-b]pyridine-4-carboxamide van algemene formule (I) wordt gebruikt samen met ten minste één aanvullend agrochemisch agens, bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit

- 5
- ten minste één andere nitrificatieremmer, bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit 2-(3,4-dimethyl-pyrazol-1-yl)-barnsteenzuur (DMPSA), 3,4-dimethylpyrazool (DMP), 3,4-dimethylpyrazoolfosfaat (DMPP) dicyaandiamide (DCD), 1H-1,2,4-triazool, 3-methylpyrazool (3-MP), 2-chloor-6-(trichloormethyl)-pyridine, 5-ethoxy-3-trichloormethyl-1,2,4-thiadiazol, 2-amino-4-chloor-6-methyl-pyrimidine, 2-mercapto-benzothiazool, 2-sulfanilamidothiazool, thiourem, natriumazide, kaliumazide, 1-hydroxypyrazool, 2-methylpyrazool-1-carboxamide, 4-amino-1,2,4-triazool, 3-mercapto-1,2,4-triazool, 2,4-diamino-6-trichloormethyl-5-triazine, koolstofbisulfide, ammoniumthiosulfaat, natriumtrithiocarbonaat, 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranolmethylcarbamaat en N-(2,6-dimethylfenyl)-N-(methoxyacetyl)-alanine-methylester,
- 10
- ten minste één ureaseremmer, bij voorkeur gekozen uit N-butylthiofosforzuurtriamide (NBTPPT) en/of N-n-propylthiofosforzuurtriamide (NPTPT),
- 15
- ten minste één gebruikelijke agrochemische hulpstof, bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit waterige en/of organische oplosmiddelen, pH-regelaars, oppervlakteactieve stoffen, bevochtigingsmiddelen, spreidingsmiddelen, adhesiebevorderaars, dragers, vulstoffen, viscositeitsregelaars, emulgatoren, disperseermiddelen, sequestreermiddelen antizinkmiddelen, coalescentiemiddelen, reologiemodificatoren, antischuimmiddelen, fotobeschermingsmiddelen, antivriesmiddelen, biostimulanten, pesticiden, biociden,
- 20
- plantengroeiregulatoren, beschermstoffen, penetrerende middelen, antiklontermiddelen, minerale en/of plantaardige oliën en/of wassen, kleurstoffen en driftwerende middelen,
- 25
- en mengsels daarvan.
10. Een mengsel dat ten minste één pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide van de
- 30 algemene formule (I) bevat



met de volgende definities:

R1-waterstof of C1-4-alkyl,

5 R2C1-12-koolwaterstofresidu dat één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel, waarbij R1 en R2, samen met het stikstofatoom dat hen verbindt, ook een verzadigde of onverzadigde heterocyclische radicaal met vijf of zes leden kunnen vormen, die naar keuze ook één of twee heteroatomen kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel,

10 R3C1-12-koolwaterstofresidu dat één heteroatoom kan bevatten, gekozen uit de groep stikstof, zuurstof en zwavel,

R4C1-8-koolwaterstofresidu,

R5-waterstof of C1-4-alkyl,

15 en ten minste één aanvullend agrochemisch agens, bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit

- ten minste één andere nitrificatieremmer, bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit 2-(3,4-dimethyl-pyrazol-1-yl)-barnsteenzuur (DMPSA), 3,4-dimethylpyrazool (DMP), 3,4-dimethylpyrazoolfosfaat (DMPP) dicyaandiamide (DCD), 1H-1,2,4-triazool, 3-methylpyrazool (3-MP), 2-chloor-6-(trichloormethyl)-pyridine, 5-ethoxy-3-trichloormethyl-1,2,4-thiadiazol, 2-amino-4-chloor-6-methyl-pyrimidine, 2-mercapto-benzothiazool, 2-sulfanilamidothiazool, thiourem, natriumazide, kaliumazide, 1-hydroxypyrazool, 2-methylpyrazool-1-carboxamide, 4-amino-1,2,4-triazool, 3-mercapto-1,2,4-triazool, 2,4-diamino-6-trichloormethyl-5-triazine, koolstofbisulfide, ammoniumthiosulfaat, natriumtrithiocarbonaat, 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-
- 20
- 25

benzofuranolmethylcarbamaat en N-(2,6-dimethylfenyl)-N-(methoxyacetyl)-alanine-methylester,

– ten minste één ureaseremmer, bij voorkeur gekozen uit N-butylthiofosforzuurtriamide (NBTPT) en/of N-n-propylthiofosforzuurtriamide (NPTPT),

– ten minste één gebruikelijke agrochemische hulpstof, bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit waterige en/of organische oplosmiddelen, pH-regelaars, oppervlakteactieve stoffen, bevochtigingsmiddelen, spreidingsmiddelen, adhesiebevorderaars, dragers, vulstoffen, viscositeitsregelaars, emulgatoren, dispergeermiddelen, sequestreermiddelen antizinkmiddelen, coalescentiemiddelen, reologiemodificatoren, antischuimmiddelen, fotobeschermingsmiddelen, antivriesmiddelen, biostimulanten, pesticiden, biociden, plantengroeiregulatoren, beschermstoffen, penetrerende middelen, antiklontermiddelen, minerale en/of plantaardige oliën en/of wassen, kleurstoffen en driftwerende middelen,

en mengsels daarvan.

11. Een meststofmengsel, bestaande uit

A. een anorganische en/of organische en/of organominerale meststof en

B. 10 tot 10000 gewichtsproppm, berekend op de meststof, van een pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide als omschreven in een van de claims 1 tot en met 5.

12. Het meststofmengsel zoals beweerd in claim 11, waarbij het meststofmengsel in vaste vorm is en de pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide wordt aangebracht op het oppervlak van de, bij voorkeur anorganische, meststof.

13. Het meststofmengsel zoals bedoeld in een van de vorderingen 11 of 12, waarin het meststofmengsel ten minste één aanvullend agrochemisch agens bevat, bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit

– ten minste één andere nitrificatieremmer, bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit 2-(3,4-dimethyl-pyrazol-1-yl)-barnsteenzuur (DMPSA), 3,4-dimethylpyrazool (DMP), 3,4-dimethylpyrazoolfosfaat (DMPP) dicyaandiamide (DCD), 1H-1,2,4-triazool, 3-methylpyrazool (3-MP), 2-chloor-6-(trichloormethyl)-pyridine, 5-ethoxy-3-trichloormethyl-1,2,4-thiadiazol, 2-amino-4-chloor-6-methyl-pyrimidine, 2-mercapto-

benzothiazool, 2-sulfanilamidothiazool, thiourem, natriumazide, kaliumazide, 1-hydroxypyrazool, 2-methylpyrazool-1-carboxamide, 4-amino-1,2,4-triazool, 3-mercapto-1,2,4-triazool, 2,4-diamino-6-trichloormethyl-5-triazine, koolstofbisulfide, ammoniumthiosulfaat, natriumtrithiocarbonaat, 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranolmethylcarbamaat en N-(2,6-dimethylfenyl)-N-(methoxyacetyl)-alanine-methylester,

– en/of ten minste één ureaseremmer, bij voorkeur gekozen uit N-butylthiofosforzuurtriamide (NBTP) en/of N-n-propylthiofosforzuurtriamide (NPTPT),

– ten minste één gebruikelijke agrochemische hulpstof, bij voorkeur gekozen uit de groep bestaande uit waterige en/of organische oplosmiddelen, pH-regelaars, oppervlakteactieve stoffen, bevochtigingsmiddelen, spreidingsmiddelen, adhesiebevorderaars, dragers, vulstoffen, viscositeitsregelaars, emulgatoren, disperseermiddelen, sequestreermiddelen antizinkmiddelen, coalescentiemiddelen, reologiemodificatoren, antischuimmiddelen, fotobeschermingsmiddelen, antivriesmiddelen, biostimulanten, pesticiden, biociden, plantengroeiregulatoren, beschermstoffen, penetrerende middelen, antiklontermiddelen, minerale en/of plantaardige oliën en/of wassen, kleurstoffen en driftwerende middelen,

en mengsels daarvan.

14. Een werkwijze voor de productie van het meststofmengsel zoals beweerd in een van de vorderingen 11 tot en met 13 door het inbrengen van de pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide in de meststof en/of het aanbrengen van de pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide aan het oppervlak van de meststof.

15. Een methode voor de bemesting van land- of tuinbouwgronden, waarbij een meststofmengsel dat verbindingen A en B bevat

A. een anorganische en/of organische en/of organominerale meststof en

B. 10 tot 10000 gewichtsproppm, berekend op de anorganische meststof, van een pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide als omschreven in een van de claims 1 tot en met 5,

of

verbindingen A en B afzonderlijk, maar binnen een periode van 0 tot 5 uur, bij voorkeur 0 tot 1 uur, meer bij voorkeur ongeveer gelijktijdig, op de bodems worden aangebracht.

SAMENWERKINGSVERDRAG INZAKE OCTROOIEN
VERSLAG BETREFFENDE HET ONDERZOEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE
OPGESTELD KRACHTENS ARTIKEL XI.23., §10 VAN HET BELGISCH WETBOEK
VAN ECONOMISCH RECHT

IDENTIFICATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE	KENMERK VAN DE AANVRAGER OF GEMACHTIGDE EuroChem.vib-3
Belgische nationale aanvraag nr. 202105712	Datum van indiening 12-09-2021
	Ingeroepen voorrangsdatum 14-09-2020
Aanvrager (Naam) EUROCHEM ANTWERPEN	
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type 06-11-2021	Door de Instantie voor Internationaal Onderzoek aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. SN79984
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)	
Volgens de internationale octrooi classificatie (CIB), of tezelfdertijd volgens de nationale classificatie en de CIB Zie onderzoeksrapport	
II. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK	
Onderzochte minimum documentatie	
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen
IPC	Zie onderzoeksrapport
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen	
III. <input type="checkbox"/> MEN IS VAN OORDEEL DAT BEPAALDE CONCLUSIES NIET HET ONDERWERP KONDEN UITMAKEN VAN EEN ONDERZOEK (opmerkingen op aanvullingsblad)	
IV. <input type="checkbox"/> GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING EN/OF VASTSTELLING BETREFFENDE DE OMVANG VAN HET ONDERZOEK (opmerkingen op aanvullingsblad)	

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek

BE 202105712

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
INV. C05G3/90 C07D471/04
ADD.

Volgens de Internationale Classificatie van octrooien (IPC) of zowel volgens de nationale classificatie als volgens de IPC.

B. ONDERZOCHETE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)
C05G C07D

Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor dergelijke documenten, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

Tijdens het onderzoek geraadpleegde elektronische gegevensbestanden (naam van de gegevensbestanden en, waar uitvoerbaar, gebruikte trefwoorden)

EPO-Internal, WPI Data

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	US 2018/016199 A1 (NAVE BARBARA [DE] ET AL) 18 januari 2018 (2018-01-18) * bladzijde 13 - bladzijde 15; tabel A; verbindingen A7, A14, A20, A24-A26, A28, A36 * * conclusies *	1-15
X	US 2020/062755 A1 (MUEHLEBACH MICHEL [CH] ET AL) 27 februari 2020 (2020-02-27) * alinea [0151] * * alinea [0152] * * alinea [0153] * * alinea [0154] * * alinea [0180] * * conclusies *	10

Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.

Leden van dezelfde octroofamilie zijn vermeld in een bijlage

° Speciale categorieën van aangehaalde documenten

"A" niet tot de categorie X of Y behorende literatuur die de stand van de techniek beschrijft

"D" in de octrooiaanvraag vermeld

"E" eerdere octrooi(aanvraag), gepubliceerd op of na de indieningsdatum, waarin dezelfde uitvinding wordt beschreven

"L" om andere redenen vermelde literatuur

"O" niet-schriftelijke stand van de techniek

"P" tussen de voorrangdatum en de indieningsdatum gepubliceerde literatuur

"T" na de indieningsdatum of de voorrangdatum gepubliceerde literatuur die niet bezwarend is voor de octrooiaanvraag, maar wordt vermeld ter verheldering van de theorie of het principe dat ten grondslag ligt aan de uitvinding

"X" de conclusie wordt als niet nieuw of niet inventief beschouwd ten opzichte van deze literatuur

"Y" de conclusie wordt als niet inventief beschouwd ten opzichte van de combinatie van deze literatuur met andere geciteerde literatuur van dezelfde categorie, waarbij de combinatie voor de vakman voor de hand liggend wordt geacht

"&" lid van dezelfde octroofamilie of overeenkomstige octrooipublicatie

Datum waarop het onderzoek naar de stand van de techniek van internationaal type werd voltooid

31 mei 2022

Verzenddatum van het rapport van het onderzoek naar de stand van de techniek van internationaal type

Naam en adres van de instantie

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

De bevoegde ambtenaar

Rodriguez Fontao, M

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
de stand van de techniek

BE 202105712

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN		
Categorie °	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	WO 2010/100475 A1 (ASTRAZENECA AB [SE]; ASTRAZENECA UK LTD [GB] ET AL.) 10 september 2010 (2010-09-10) * bladzijde 590; voorbeeld 293.B * * bladzijde 312; voorbeeld 145B * -----	10

**ONDERZOEKSRAPPORT BETREFFENDE HET
 RESULTAAT VAN HET ONDERZOEK NAAR DE STAND
 VAN DE TECHNIEK VAN HET INTERNATIONALE TYPE**

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een onderzoek naar
 de stand van de techniek

BE 202105712

In het rapport genoemd octrooigeschrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie	
US 2018016199	A1	18-01-2018	AU 2016214305 A1	24-08-2017
			CN 107207443 A	26-09-2017
			EP 3253209 A1	13-12-2017
			JP 6743032 B2	19-08-2020
			JP 2018508452 A	29-03-2018
			US 2018016199 A1	18-01-2018
			WO 2016124769 A1	11-08-2016

US 2020062755	A1	27-02-2020	AR 111672 A1	07-08-2019
			BR 112019022730 A2	12-05-2020
			CN 110730779 A	24-01-2020
			EP 3619203 A1	11-03-2020
			JP 2020520346 A	09-07-2020
			US 2020062755 A1	27-02-2020
			WO 2018202540 A1	08-11-2018

WO 2010100475	A1	10-09-2010	GEEN	



SCHRIFTELIJKE OPINIE

Dossier Nummer SN79984	Indieningsdatum (dag/maand/jaar) 12.09.2021	Voorrangsdatum (dag/maand/jaar) 14.09.2020	Aanvraagnummer BE202105712
Classificatie (IPC) INV. C05G3/90 C07D471/04			
Aanvrager EUROCHEM ANTWERPEN			

Deze schriftelijke opinie bevat een toelichting en de corresponderende pagina's met betrekking tot de volgende onderdelen:

- Onderdeel I Basis van schriftelijke opinie
- Onderdeel II Voorrang
- Onderdeel III Formulering van een opinie inzake nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid niet mogelijk
- Onderdeel IV De aanvraag heeft betrekking op meer dan één uitvinding
- Onderdeel V Gemotiveerde verklaring ten aanzien van nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid; citaten en explicaties ter ondersteuning van deze verklaring
- Onderdeel VI Bepaalde geciteerde documenten
- Onderdeel VII Gebreken in de aanvraag
- Onderdeel VIII Opmerkingen betreffende de aanvraag

Form BE237A (Dekblad) (Januari 2007)	De Examinator Rodriguez Fontao, M
--------------------------------------	--------------------------------------

Onderdeel I Basis van de opinie

1. Deze opinie is opgesteld op basis van de conclusies ingediend voor aanvang van het onderzoek.
2. Met betrekking tot **nucleotide en/of aminozuur sequenties** die, in voorkomend geval, genoemd worden in de aanvraag, is deze opinie opgesteld op basis van de volgende elementen:
 - a. Aard van het element:
 - een lijst van de sequentie(s)
 - tabel(len) met betrekking tot de lijst van de sequentie(s)
 - b. Type drager:
 - op papier
 - in elektronische vorm
 - c. Moment van indiening of levering:
 - opgenomen in de aanvraag zoals ingediend
 - samen met de aanvraag elektronisch ingediend
 - later geleverd
3. Bovendien, wanneer er mer dan één versie of kopie van een sequentielijst of van één of meerdere tabellen die er betrekking op hebben, werd ingediend, zijn de benodigde verklaringen ingediend, dat de informatie, die later of bij wijze van aanvullende kopieën werd geleverd naar gelang het geval, identiek is aan diegene die oorspronkelijk werd geleverd en niet verder gaat dan de openbaarmaking in de internationale aanvraag zoals oorspronkelijk ingediend.
4. Aanvullende opmerkingen:

Onderdeel V Gemotiveerde verklaring ten aanzien van nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid; citaten en explicaties ter ondersteuning van deze verklaring

1. Verklaring

Nieuwheid	Ja: Conclusies Nee: Conclusies 1-15
Inventiviteit	Ja: Conclusies Nee: Conclusies 1-15
Industriële toepasbaarheid	Ja: Conclusies 1-15 Nee: Conclusies

2. Citaten en explicaties:

Zie apart blad

Onderdeel VII Gebreken in de aanvraag

De volgende gebreken in de vorm of inhoud van de aanvraag werden vastgesteld:

Zie apart blad

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Reference is made to the following documents; the numbering will be adhered to in the rest of the procedure.

D1 US 2018/016199 A1 (NAVE BARBARA [DE] ET AL) 18 January 2018 (2018-01-18)

D2 US 2020/062755 A1 (MUEHLEBACH MICHEL [CH] ET AL) 27 February 2020 (2020-02-27)

D3 WO 2010/100475 A1 (ASTRAZENECA AB [SE]; ASTRAZENECA UK LTD [GB] ET AL.) 10 September 2010 (2010-09-10)

2 INDEPENDENT CLAIM 1

The present application does not meet the criteria of patentability because the subject-matter of claim 1 lacks novelty.

2.1 Document D1 discloses (see claims) the use of a pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide of the general formula (I) as a nitrification inhibitor. The subject-matter of claim 1 lacks novelty in view of this document.

3 DEPENDENT CLAIMS 2-9

Dependent claims 2-9 do not contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of patentability in respect of novelty.

3.1 In this respect, the subject-matter of claims 2-9 is known from document D1 (see page 13 - page 15; table A; compounds A7,A14,A20,A24-A26,A28,A36; claims). The subject-matter of these claims lacks therefore novelty in view of document D1.

4 INDEPENDENT CLAIM 10

The present application does not meet the criteria of patentability because the subject-matter of claim 10 lacks novelty.

4.1 Document D1 discloses (see claims) a mixture containing one compound of general formula (I) and a solvent or another additive as mentioned in claim 10. The subject-matter of claim 10 lacks novelty in view of this document.

4.2 The subject-matter of claim 10 is also known from document D2 (see paragraph [0151]; paragraph [0152]; paragraph [0153]; paragraph [0154]; paragraph [0180]; claims) or D3 (page 590; example 293.B; page 312; example 145B).

4.3 Compounds of the class pyrazolopyridine are broadly known for other uses. These compounds would also be novelty destroying for the subject-matter of claim 10 as far as they describe a product suitable to be used in fertilisers.

5 CLAIMS 11-13

The present application does not meet the criteria of patentability because the subject-matter of claims 11-13 lacks novelty.

5.1 D1 discloses (see claims) a fertiliser mixture comprising a fertiliser and a nitrification inhibitor as described in claim 11. The further technical features of claims 12 and 13 are also known from this document.

6 INDEPENDENT CLAIM 14

The present application does not meet the criteria of patentability because the subject-matter of claim 14 lacks novelty.

6.1 Document D1 discloses (see claims) the process for producing a fertiliser mixture by introducing the nitrification inhibitor to the surface of the fertiliser. The subject-matter of claim 14 lacks novelty in view of this document.

7 INDEPENDENT CLAIM 15

The present application does not meet the criteria of patentability because the subject-matter of claim 15 lacks novelty.

7.1 Document D1 discloses (see claims) a method of fertilizing soils exploited agriculturally or horticulturally, by using the fertilisers and nitrification inhibitor of claim 1.
The subject-matter of claim 15 lacks novelty in view of this document.

Re Item VII

Certain defects in the international application

8 The relevant background art disclosed in D1-D3 is not mentioned in the description, nor are these documents identified therein.

Betreffende Item V

Beargumenteerde verklaring met betrekking tot nieuwheid, inventiviteit of industriële toepasbaarheid; citaties en toelichting ter ondersteuning van deze verklaring

- 1 Er wordt verwezen naar de volgende documenten; de nummering wordt in de rest van de procedure aangehouden.
 - D1 US 2018/016199 A1 (NAVE BARBARA [DE] ET AL) 18 januari 2018 (18-01-2018)
 - D2 US 2020/062755 A1 (MUEHLEBACH MICHEL [CH] ET AL) 27 februari 2020 (27-02-2020)
 - D3 WO 2010/100475 A1 (ASTRAZENECA AB [SE]; ASTRAZENECA UK LTD [GB] ET AL.) 10 september 2010 (10-09-2010)
- 2 **ONAFHANKELIJKE CONCLUSIE 1**

De onderhavige aanvraag voldoet niet aan de criteria van octrooieerbaarheid, omdat de materie volgens conclusie 1 een gebrek aan nieuwheid vertoont.
- 2.1 In document D1 wordt geopenbaard (zie de conclusies): het gebruik van een pyrazolo[3,4-b]pyridine-4-carboxamide van de algemene formule (I) als nitrificatiemiddel. De materie volgens conclusie 1 vertoont een gebrek aan nieuwheid gelet op dit document.
- 3 **AFHANKELIJKE CONCLUSIES 2-9**

De afhankelijke conclusies 2-9 bevatten geen maatregelen die in combinatie met de maatregelen volgens een van de conclusies waarnaar zij verwijzen, voldoen aan de eisen met betrekking tot nieuwheid.
- 3.1 Is dit opzicht is de materie volgens de conclusies 2-9 bekend uit document D1 (zie bladzijde 13 - bladzijde 15; tabel A; verbindingen A7, A14, A20, A24-A26, A28, A36; conclusies). De materie volgens deze conclusies vertoont derhalve een gebrek aan nieuwheid gelet op document D1.
- 4 **ONAFHANKELIJKE CONCLUSIE 10**

De onderhavige aanvraag voldoet niet aan de criteria van octrooieerbaarheid, omdat de materie volgens conclusie 10 een gebrek aan nieuwheid vertoont.
- 4.1 In document D1 wordt geopenbaard (zie de conclusies): een mengsel bevattende een verbinding volgens algemene formule (I) en een oplosmiddel of

ander additief zoals genoemd in conclusie 10. De materie volgens onafhankelijke conclusie 10 vertoont derhalve een gebrek aan nieuwheid gelet op dit document.

- 4.2 De materie volgens conclusie 10 is eveneens bekend uit document D2 (zie alinea [0151]; alinea [0152]; alinea [0153]; alinea [0154]; alinea [0180]; conclusies) of D3 (bladzijde 590; voorbeeld 293.B; bladzijde 312; voorbeeld 145B).
- 4.3 Verbindingen van de categorie pyrazolopyridine zijn alom bekend voor andere gebruiken. De materie volgens conclusie 10 zou eveneens geen nieuwheid omvatten vanwege deze verbindingen voor zover deze een product beschrijven dat geschikt is om te worden gebruikt in meststoffen.
- 5 **CONCLUSIES 11-13**
- De onderhavige aanvraag voldoet niet aan de criteria van octrooieerbaarheid, omdat de materie volgens de conclusies 11-13 een gebrek aan nieuwheid vertoont.
- 5.1 In D1 wordt geopenbaard (zie de conclusies): een meststofmengsel omvattende een meststof en een nitrificatieremmer zoals beschreven in conclusie 11. De verdere technische maatregelen volgens de conclusies 12 en 13 zijn eveneens bekend uit dit document.
- 6 **ONAFHANKELIJKE CONCLUSIE 14**
- De onderhavige aanvraag voldoet niet aan de criteria van octrooieerbaarheid, omdat de materie volgens conclusie 14 een gebrek aan nieuwheid vertoont.
- 6.1 In document D1 wordt geopenbaard (zie de conclusies): het proces voor het produceren van een meststofmengsel door het inbrengen van de nitrificatieremmer aan het oppervlak van de meststof. De materie volgens onafhankelijke conclusie 14 vertoont derhalve een gebrek aan nieuwheid gelet op dit document.
- 7 **ONAFHANKELIJKE CONCLUSIE 15**
- De onderhavige aanvraag voldoet niet aan de criteria van octrooieerbaarheid, omdat de materie volgens conclusie 15 een gebrek aan nieuwheid vertoont.
- 7.1 In document D1 wordt geopenbaard (zie de conclusies): een werkwijze van het bemesten van landbouw- of tuinbouwgrond door gebruik te maken van de meststoffen en nitrificatieremmer volgens conclusie 1.
- De materie volgens onafhankelijke conclusie 15 vertoont derhalve een gebrek

aan nieuwheid gelet op dit document.

Betreffende Item VII

Bepaalde gebreken in de internationale aanvraag

- 8 De bekende stand van de techniek als geopenbaard in D1-D3 wordt niet genoemd in de beschrijving, noch worden deze documenten daarin bij naam genoemd.