Industria y C
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-042252- -00000-0000
Fecha: 2014-02-27 16:40:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

TITULO: CEPA BACTERIANA AISLADA DEL GÉNERO BURKHOLDERIA Y METABOLITOS PLAGUICIDAS DERIVADOS-FORMULACIONES Y USOS

SOLICITANTE: MARRONE BIO INNOVATIONS, INC.

DIRECCIÓN: 2121 Second Street Suite 107B, Davis, CA 95618, Estados Unidos de América.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 27 de febrero de 2014

P2014/000031

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIAI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-042252- -00000-0000

Fecha: 2014-02-27 16:40:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 16

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2014/000031

SOLICITUD DE:

(1)

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) **SOLICITANTE (71)**

Nombre: **MARRONE BIO INNOVATIONS, INC.**
Dirección: 2121 Second Street Suite 107B, Davis, CA 95618, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América.

Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [x] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2012/050807 Fecha Agosto 14, 2012

Publicación Internacional No. WO 2013/032693 Fecha Marzo 7, 2013

(6) **Título (54)** **CEPA BACTERIANA AISLADA DEL GÉNERO BURKHOLDERIA Y METABOLITOS PLAGUICIDAS DERIVADOS-FORMULACIONES Y USOS**

Clasificación Internacional (51) C12N 1/20, C12P 1/04, C12N 1/38, A01N 63/02, A01N 43/06, A01N 43/26, A01P 21/00

Prioridad

SI [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Agosto 27, 2011	61/528,149
US	Agosto 27, 2011	61/528,153

(9) **Comprobante de pago No.** 14- **Fecha** _____

(10) **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple.
- [x] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Declaración Bajo la Regla 4.17
- [x] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos). Secuencias.
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA). (IPRP)
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12 x 12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional. PCT/IB306.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional.

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2012/050807

Ratnakar ASOLKAR
4005 Cowell Blvd.,
Davis, CA 95618
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Hindú

Marja KOIVUNEN
P.O. Box 2277,
Davis CA 95617,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Finlandesa

Pamela MARRONE
3333 Victoria Place,
Davis, CA 95616,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0022851

Bogotá D.C., Febrero 27 de 2014 - 16:32:22

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	601308901	27/02/2014	8.517.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	515.000.00	515.000.00
				$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-042252- -00000-0000
Fecha: 2014-02-27 16:40:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

5

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: ____/ ____/ ____/ AAAA MM DD	Recorrido:
2020	2014 02 27	4

Tipo de Radicación: Entrada: X Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador: | Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-42252	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	*Soporte Documental*
X	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:
EL CD ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 11 ARCHIVOS:

11 EN FORMATO PDF, LOS CUALES FUERON PROCESADOS.

EL CD SE ENCUENTRA UBICADO EN EL FOLIO (5)

6

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-042252- -00000-0000

Fecha: 2014-02-27 16:40:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

6

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE U

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación.

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2014/000031**

SOLICITUD DE:

1

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **MARRONE BIO INNOVATIONS, INC.**
Dirección: 2121 Second Street Suite 107B, Davis, CA 95618, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América.

Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [x] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5 **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2012/050807 Fecha Agosto 14, 2012

Publicación Internacional No. WO 2013/032693 Fecha Marzo 7, 2013

6 **Título (54)** **CEPA BACTERIANA AISLADA DEL GÉNERO BURKHOLDERIA Y METABOLITOS PLAGUICIDAS DERIVADOS-FORMULACIONES Y USOS**

Clasificación Internacional (51) C12N 1/20, C12P 1/04, C12N 1/38, A01N 63/02, A01N 43/06, A01N 43/26, A01P 21/00

Prioridad
SI [X] **NO** [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Agosto 27, 2011	61/528,149
US	Agosto 27, 2011	61/528,153

9 **Comprobante de pago No.** 14- **Fecha** _____

(10) **ANEXOS**

X	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
X	Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
X	Poderes, si fuere el caso.
	Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
X	Declaraciones. Bajo la regla 4.17. (ii) del PCT.
X	Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
X	Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
	Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
	Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
	De ser el caso, copia del contrato de acceso.
	De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
	De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
	Arte final 12 x 12.
	De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
X	De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
X	Otros. Búsqueda Internacional.

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**



(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA: _____

C.C. 79. 782.747Bta T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2012/050807

Ratnakar ASOLKAR
4005 Cowell Blvd.,
Davis, CA 95618
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Hindú

Marja KOIVUNEN
P.O. Box 2277,
Davis CA 95617,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Finlandesa

Pamela MARRONE
3333 Victoria Place,
Davis, CA 95616,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

CECBA - LEY404 GCBA
LEGALIZACION
120202 0560087
02/02/2012 12:22:32

CECBA - LEY404 GCBA
APOSTILLE
120202 1241128
02/02/2012 12:22:32

96.718

COLEGIO DE ESCRIBANOS · CIUDAD DE BUENOS AIRES · CAPITAL FEDERAL · REPUBLICA ARGENTINA

ACTUACION NOTARIAL
LEY 404

ISABEL MARTINEZ DIEGO
MATRICULA 4452
ESCRIBANA

N 014634245

FOLIO 41. PRIMERA COPIA. SUSTITUCION DE MANDATO.- DAGMAR MESSERER POR "MARRONE BIO INNOVATIONS, INC." A CARLOS REINALDO OLARTE Y OTRO.- ESCRITURA NUMERO DIECISIETE. En la Ciudad de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, a dos de febrero del año dos mil doce, ante mi, escribana autorizante, comparece doña Dagmar MESSERER, soltera, mayor de edad, con documento nacional de identidad nº 20.383.892, vecina de esta Ciudad y de mi conocimiento, doy fe, así como que dice: Que SUSTITUYE a favor de los señores CARLOS REINALDO OLARTE y/o JUAN GUILLERMO MOURE PEREZ, para que lo ejerzan conjunta, separada e indistintamente, el mandato otorgado por "MARRONE BIO INNOVATIONS, INC." domiciliada en 2121 Second St. Suite 107B, Davis, CA 95618, Estados Unidos de América, transcripto por escritura nº 15 de fecha 1 de febrero de 2012, ante mi, al folio 35 de este mismo Registro, que en primera copia tengo a la vista, doy fe, y copiada dice: "FOLIO 35. PRIMERA COPIA. TRANSCRIPCION DE MANDATO.- "MARRONE BIO INNOVATIONS, INC." A GERARDO MESSERER Y OTROS. ESCRITURA QUINCE. En la Ciudad de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, a primero de febrero del año dos mil doce, ante mi, escribana autorizante, comparece doña Dagmar MESSERER, soltera, mayor de edad, con documento nacional de identidad nº 20.383.892, vecina de esta Ciudad y de mi conocimiento, doy fe, así como que dice: Que para su TRANSCRIPCION en el protocolo de este Registro, me entrega un poder otorgado por MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. do-

miciliada en 2121 Second St. Suite 107B, Davis, CA 95618, Estados Unidos de América, el que en su original con su correspondiente traducción y legalización, tengo a la vista, doy fe, y copiado dice: "PODER. Los abajo firmante/s Marrone Bio Innovations, Inc. domiciliados en 2121 Second St. Suite 107B, Davis, CA 95618, Estados Unidos de América, declaran por el presente otorgar a Gerardo MESSERER y/o Dagmar MESSERER y/o Karen MESSERER y/o MOELLER & CO. S.A. indistintamente poder general amplio y suficiente para recabar de las autoridades argentinas, sud y centroamericanas así como mexicanas que correspondan, la obtención de patentes de invención, el registro y la renovación de marcas y modelos y/o derechos de propiedad intelectual y/o nombres de dominio, a cuyo efecto los faculta/n para llevar a cabo ante dichas autoridades todas las gestiones necesarias al objeto indicado, presentar solicitudes, formular descripciones, oposiciones, protestos, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos, justificar explotaciones, solicitar testimonios, aceptar transferencias, recibir documentos y valores, percibir y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas de cualquier orden. Por otra parte, les confieren mandato para que en su nombre y representación puedan iniciar y proseguir cualquier juicio que actualmente los que suscriben tengan o en el futuro tuvieran en la República Argentina, en Sudamerica, Centroamérica y México, con motivo de su nombre, marcas de fábrica o de comercio, pa-

ISABEL MARTINEZ DIEGO
MATRICULA 4052
ESCRIBANA

N 014634246

tentes de invención y modelos y/o de sus derechos de propiedad intelectual que actualmente posean o adquieran en lo sucesivo, promover juicios de cualquier jurisdicción, criminales, correccionales, civiles o comerciales contra los falsificadores, usurpadores o imitadores y contra los tenedores de artículos que infrinjan su nombre, marcas o patentes de invención, seguir los juicios por oposición u otros en que fueran parte como actores o demandados, defender el nombre, las marcas, patentes y modelos y/o derechos de propiedad intelectual y/o nombres de dominio, haciendo las protestas del caso o diciendo de nulidad. Al efecto, podrán presentarse con escritos, querellas, pedidos, y lo que fuere necesario ante cualquier autoridad judicial, presentar testigos, documentos y demás justificativos, rendir pruebas de cualquier especie, pedir nombramientos de peritos, pedir y absolver posiciones, asistir a juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, tachar, recusar, apelar, transar, someter a arbitraje o mediación, hacer renuncias, exigir y dar cauciones, pedir embargos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento, pedir la venta de los bienes de los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de sentencias, prestar juramentos, decir de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en general practicar todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este mandato. Podrán asimismo sustituir el presente poder en todo o en parte. En relación a Brasil, este po-

der incluye recibir citaciones, intimaciones, notificaciones en dicho país conforme el articulo 217 de la Ley Brasilera 9279/96 y/o hacer substituciones a otros abogados / agentes brasileros con facultad para recibir dichas citaciones, intimaciones, notificaciones. Dado y firmado en Davis, CA on 16th day of November, 2011. Sigue una firma ilegible, Pamela Marrone, CEO and Founder, Marrone Bio Innovations, Inc." "TRADUCCIÓN PUBLICA. Consta PODER de Marrone Bio Innovations, Inc con dirección en 2121 Second St. Suite 107B, Davis, CA 95618, Estados Unidos de América. Pamela Marrone, Gerente General y fundadora, Marrone Bio Innovations, Inc. Firma ilegible. DOCUMENTO ADJUNTO. ESTADO DE CALIFORNIA. SECRETARIA DE ESTADO. APOSTILLA. (Convención de la Haya del 5 de Octubre 1961). 1. País. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA. Este documento público: 2.- ha sido firmado por Laura Christensen. 3. en su carácter de Notario Público, Estado de California. 4. lleva el sello de Laura Christensen, Notario Publico, Estado de California. Certificado en: 5. Sacramento, California. 6. el 15 de Diciembre 2011. 7. por Secretario de Estado. Estado de California. 8. Nro. 33296. 9.- Sello. Hay un sello que lee El gran sello del Estado de California. 10.- Firma: Hay una firma ilegible. Esta Apostilla solo certifica la autenticidad de la firma y el cargo del funcionario público que ha firmado el documento público y, en caso de que corresponda, la identidad del sello o estampa que lleva el documento público. Esta Apostilla no certifica

N 014634247

la autenticidad del documento subyacente para el cual fue emitido. Esta Apostilla no es válida para uso en cualquier lugar de Estados Unidos de América, sus territorios o posesiones. Para verificar la emisión de esta Apostilla, remitirse a www.sos.ca.gov/business/notary/apostille-search/ DOCUMENTO ADJUNTO. ADMISIÓN. Estado De California. Condado de (en manuscrito) Yolo. El (en manuscrito) 16 de Noviembre 2011, ante mí, (en manuscrito) Laura Christensen, Notario Público. Compareció personalmente PAMELA MARRONE (en manuscrito), quien ha probado satisfactoriamente ante mí ser la persona cuyo nombre se suscribe con la pertinente evidencia y confirmó haber firmado en su capacidad autorizada y que a través de su firma en el instrumento la persona o la entidad en representación de quién ha actuado, ejecuto el documento. Certifico bajo pena de falso testimonio bajo las leyes del Estado de California que lo que antecede es verdadero y correcto. FIRMO Y ESTAMPO SELLO OFICIAL. Sello que lee Laura Christensen. Matricula 1880375, Notario Público, Condado de Yolo, Matricula vence 15 Marzo 2014. Firma ilegible. OCIONAL. Descripción del documento adjunto: PODER. Fecha del documento. 16 de Noviembre 2011. Número de páginas 1. Otros firmantes del mencionado arriba: Capacidad del firmante. Nombre del firmante Pamela Marrone. Gerente General. ES TRADUCCION FIEL DEL DOCUMENTO ADJUNTO QUE HE TENIDO ANTE MI, DEL IDIOMA INGLES AL CASTELLANO, Y AL CUAL ME REMITO A LOS 15 DIAS DEL MES DE DICIEMBRE DE DOS MIL ONCE. Sigue una

N 014634247

firma ilegible. Hay un sello que dice: PAOLA A. CORIGLIANO TRADUCTORA PUBLICA INGLES Mat. T° XV - F° 144 Cap. Fed. Inscrip. C.T.P.C.B.A. N° 5326. Sigue la legalización de la firma de la Traductora Paola Andrea Corigliano realizada por el Colegio de Traductores Públicos de la Ciudad de Buenos Aires. ES COPIA FIEL, doy fe. LEIDA que le es, así la otorga y firma ante mi, doy fe. Dagmar Messerer.- Hay un sello. Ante mí: I.Martinez Diego. Concuerda con su escritura matriz que pasó ante mi al folio 35 del Registro 2011 a mi cargo, doy fe. Para los apoderados expido la presente primera copia en tres sellos de actuación notarial números N 014634242 correlativos al presente, los que firmo y sello en el lugar y fecha de su otorgamiento. Está mi firma y sello." ES COPIA FIEL, doy fe, LEIDA que le es, así la otorga y firma ante mi, doy fe. DAGMAR MESSERER.- Hay un sello. Ante mí: I.MARTINEZ DIEGO. CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mi al folio 41 del Registro 2011 a mi cargo, doy fe. PARA LOS APODERADOS expido la presente PRIMERA COPIA en tres sellos de actuación notarial números N 014634245 correlativos al presente, los que firmo y sello en el lugar y fecha de su otorgamiento. Sobre raspado: dos - Vale -

ISABEL MARTINEZ DIEGO
MATRICULA 4452
ESCRIBANA

COLEGIO DE ESCRIBANOS
CIUDAD DE BUENOS AIRES
CAPITAL FEDERAL - REPUBLICA ARGENTINA

LEGALIZACION
LEY 404

L 010629434

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley orgánica vigente, LEGALIZA la firma y sello del escribano ISABEL MARTINEZ DIEGO

obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el N° 120202056087/1 **La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.**

COLEGIO DE ESCRIBANOS
LEGALIZACION
CIUDAD DE BUENOS AIRES
CAPITAL FEDERAL - REPUBLICA ARGENTINA

Buenos Aires, Jueves 2 de Febrero de 2012

ESC. LUZBELIA BILLORDO
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA

SERIE A 0064617

CFNA

REPÚBLICA ARGENTINA

MINISTERIO *de* RELACIONES EXTERIORES COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: REPÚBLICA ARGENTINA
   El presente documento público DE LEGALIZACIÓN
2. Ha sido firmado por LUZBELIA BILLORDO
3. Quien actúa en calidad de CONSEJERA
4. Lleva el sello/timbre del COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES.
5. En LA CIUDAD DE BUENOS AIRES 6. El día 02/02/2012
7. Por EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO (Convenio 02/09/2003).
8. Bajo el Número: 120202124128
9. Sello/Timbre:

COLEGIO DE ESCRIBANOS - CAPITAL FEDERAL - REPÚBLICA ARGENTINA - APOSTILLA

10. Firma

Esc. NATALIA R. IAPALUCCI
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA

CANCILLERIA ARGENTINA

Sheet No. 5

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51*bis*.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

In relation to this international application, Marrone Bio Innovations, Inc. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

Marrone Bio Innovations, Inc. is entitled as employer of the inventors, Ratnakar Asolkar and Pamela Marrone.

Marrone Bio Innovations, Inc.was entitled as employer of the inventor Marja Koivunen,

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (ii)".

Sheet No. 8

Box No. VIII (iii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO CLAIM PRIORITY

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 213; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51*bis*.1(a)(iii)):

In relation to this international application, Marrone Bio Innovations, Inc. is entitled to claim priority of earlier applications, No. US 61/528,153 and No. US 61/528,149, by virtue of the following:

Marrone Bio Innovations, Inc. is entitled as employer of the inventors, Ratnakar Asolkar and Pamela Marrone.

Marrone Bio Innovations, Inc.was entitled as employer of the inventor Marja Koivunen.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iii)".

Box No. VIII (v) DECLARATION: NON-PREJUDICIAL DISCLOSURES OR EXCEPTIONS TO LACK OF NOVELTY

This declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 215; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (v). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty (Rules 4.17(v) and 51*bis*.1(a)(v))

Cheryl H. Agris, Agent for Applicants, declares that the subject matter claimed in this international application was disclosed as follows:

(i) kind of disclosure

(a) publication

(ii) date of disclosure: 1 September 2011

(iii) title of disclosure: "ISOLATED BACTERIAL STRAIN OF THE GENUS BURKHOLDERIA AND PESTICIDAL METABOLITES THEREFROM"

(iv) place of disclosure: WIPO, published as WO2011/106941

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (v)".

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
7 March 2013 (07.03.2013)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2013/032693 A2

(51) International Patent Classification:
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 43/06* (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01) *A01N 43/26* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01) *A01P 21/00* (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2012/050807

(22) International Filing Date:
14 August 2012 (14.08.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/528,149 27 August 2011 (27.08.2011) US
61/528,153 27 August 2011 (27.08.2011) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **MARRONE BIO INNOVATIONS, INC.** [US/US]; 2121 Second Street, Suite 107B, Davis, CA 95618 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **ASOLKAR, Ratnakar** [IN/US]; 4005 Cowell Blvd, Davis, CA 95618 (US). **KOIVUNEN, Marja** [FI/US]; PO Box 2277, Davis, CA 95617 (US). **MARRONE, Pamela** [US/US]; 3333 Victoria Place, Davis, CA 95616 (US).

(74) Agent: **AGRIS, Cheryl, H.**; Agris & Von Natzmer, LLP, PO Box 8495, Pelham, NY 10803 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

— *as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty (Rule 4.17(v))*

Published:

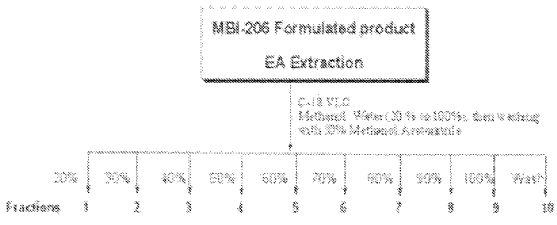
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

— *with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: ISOLATED BACTERIAL STRAIN OF THE GENUS *BURKHOLDERIA* AND PESTICIDAL METABOLITES THEREFROM-FORMULATIONS AND USES

Figure 2-Fractionation



Bioassay data:

MBI-206-FP-F3	50	50	50	50.0	0.0
MBI-206-FP-F4	75	87.5	87.5	83.3	7.2
MBI-206-FP-F5	75	87.5	87.5	83.3	7.2
MBI-206-FP-F6	50	75	50	58.3	14.4

(57) Abstract: A species of *Burkholderia sp* with no known pathogenicity to vertebrates but with pesticidal activity (e.g., plants, algae, arachnids, insects, fungi, weeds and nematodes) as well as methods for controlling algae using said species of *Burkholderia*. Also provided are natural products derived from a culture of said species and methods of controlling algae and/or arachnids using said natural products.

WO 2013/032693 A2

ISOLATED BACTERIAL STRAIN OF THE GENUS *BURKHOLDERIA* AND PESTICIDAL METABOLITES THEREFROM-FORMULATIONS AND USES

TECHNICAL FIELD

Provided herein is a species of *Burkholderia sp* with no known pathogenicity to vertebrates, such as mammals, fish and birds but pesticidal activity against plants, algae, insects, fungi, arachnids, such as mites and nematodes and formulations and compositions comprising said species. Also provided are natural products, formulations and compositions derived from a culture of said species and methods of controlling algae and arachnids, such as mites, using said *Burkholderia* and/or said natural products.

BACKGROUND

Natural products are substances produced by microbes, plants, and other organisms. Microbial natural products offer an abundant source of chemical diversity, and there is a long history of utilizing natural products for pharmaceutical purposes. One such compound is FR901228 isolated from *Chromobacterium* and has been found to be useful as an antibacterial agent and antitumor agent (see, for example, Ueda et al., US Patent No. 7,396,665).

However, secondary metabolites produced by microbes have also been successfully found to have uses for weed and pest control in agricultural applications (see, for example, Nakajima et al. 1991; Duke et al., 2000; Lydon & Duke, 1999; Gerwick et al., US Patent No. 7,393,812). Microbial natural products have been also successfully developed into agricultural insecticides (see, for example, Salama et al. 1981; Thompson et al., 2000; Krieg et al. 1983). Sometimes, such natural products have been combined with chemical pesticides (see, for example, Gottlieb, US Patent No. 4,808,207).

Acaricides

Acaricides are compounds that kill mites (miticides) and ticks (ixodicides). This class of pesticides is large and includes antibiotics, carbamates, formamidine acaricides, pyrethroids, mite growth regulators, and organophosphate acaricides. Besides chemical pesticides, diatomaceous earth and fatty acids can be used to control mites. They typically work through disruption of the cuticle, which dries out the mite. In addition, some essential oils such as peppermint oil, are used to control mites. In spite of the great variety of known acaricide compounds, mites remain a serious problem in agriculture because of the damage they cause to

the crops. They can produce several generations during one season, which facilitates rapid development of resistance to the acaricide products used. Hence, new pesticide products with new target sites and novel modes of action are critically needed.

Algicides

Algae come in many forms. These include: (1) microscopic, one-celled algae, filamentous algae that resemble hair, algae that grow in sheets and macroalgae that look like plants; (2) algae that live inside the outer integument ("skin") or calcium shell of some corals, anemones, and other sessile invertebrates called zooxanthellae; (3) very hard-to-remove little dots of green that sometimes grow on aquarium panels which also are not algae, but diatom or radiolarian colonies (microscopic, one-celled, animals with hard shells) with algae incorporated in their matrix.

Growth of algae in a small amount of water retained in the container over a significant period of time can be considerable, which is highly undesirable. As a result, algae can cause clogging of filters in water filtration devices, undesirable smells and appearance in pools, exhaustion of dissolved oxygen, and suffocation of fishes and shellfishes to death. In addition to being present in water, algae may also be present in industrial materials which are exposed to the weather and light, such as coatings containing organic film formers on mineral substrates, textile finishes, wood paints and also materials made of plastics.

Algae control can be divided into four categories: biological, mechanical, physical and chemical controls. A few pertinent facts hold for all methods of algae control. For example, Turbo and Astrea snails, some blennies, some tangs, among others are good grazers. Snails are the most widely used scavengers, and generally the best choice. Some parts of the country seem to favor the use of sea urchins, dwarf angels. The former die too easily and move the decor about, and the latter can be problematical with eating expensive invertebrates. Other methods include functional protein skimmers, with or without ozone and ultraviolet sterilizers. These physical filters remove and destroy algae on exposure and help oxidize nutrients as the water is circulated. Antibiotics may also be used. However, they treat the symptoms only without dealing with the cause(s) of the algae problem. The factors can contribute to water system being out of balance. Copper, usually in the form of copper sulfate solution has been employed as an algicide, as well as a general epizootic parasite preventative. This metal is useful in treatment and quarantine tanks, dips and fish-only arrangements but it is persistent and toxic to all life, especially non-fish.

Burkholderia

The Burkholderia genus, β-subdivision of the proteobacteria, comprises more than 40 species that inhabit diverse ecological niches (Compant et al., 2008). The bacterial species in the genus *Burkholderia* are ubiquitous organisms in soil and rhizosphere (Coenye and Vandamme, 2003; Parke and Gurian-Sherman, 2001). Traditionally, they have been known as plant pathogens, *B. cepacia* being the first one discovered and identified as the pathogen causing disease in onions (Burkholder, 1950). Several *Burkholderia* species have developed beneficial interactions with their plant hosts (see, for example, Cabballero-Mellado et al., 2004, Chen et al., 2007). Some *Burkholderia* species have also been found to be opportunistic human pathogens (see, for example, Cheng and Currie, 2005 and Nierman et al., 2004). Additionally, some *Burkholderia* species have been found to have potential as biocontrol products (see for example, Burkhead et al., 1994; Knudsen et al., 1987; Jansiewicz et al., 1988; Gouge et al., US Patent Application No. 2003/0082147; Parke et al., US Patent No. 6,077,505; Casida et al., US Patent No. 6,689,357; Jeddeloh et al., WO2001055398; Zhang et al., US Patent No. 7,141,407). Some species of in this genus have been effective in bioremediation to decontaminate polluted soil or groundwater (see, for example, Leahy et al. 1996). Further, some *Burkholderia* species have been found to secrete a variety of extracellular enzymes with proteolytic, lipolytic and hemolytic activities, as well as toxins, antibiotics, and siderophores (see, for example, Ludovic et al., 2007; Nagamatsu, 2001).

PCT/US2011/026016 discloses a *Burkholderia* species, particularly *Burkholderia* A396 and compounds derived from said species with no known pathogenicity to vertebrates with activity against plants, insects, fungi and nematodes.

Oxazoles, Thiazoles and Indoles

Oxazoles, thiazoles and indoles are widely distributed in plants, algae, sponges, and microorganisms. A large number of natural products contain one or more of the five-membered oxazole, thiazole and indole nucleus/moieties. These natural products exhibit a broad spectrum of biological activity of demonstrable therapeutic value. For example, bleomycin A (Tomohisa et al.), a widely prescribed anticancer drug, effects the oxidative degradation of DNA and uses a bithiazole moiety to bind its target DNA sequences (Vanderwall et al., 1997). Bacitracin (Ming et al., 2002), a thiazoline-containing peptide antibiotic, interdicts bacterial cell wall new biosynthesis by complexation with C55-bactoprenolpyrophosphate. Thiangazole (Kunze et al., 1993) contains a tandem array of one oxazole and three thiazolines and exhibits antiviral activity (Jansen et al., 1992). Yet other oxazole/thiazole-containing natural products such as thiostrepton (Anderson et al., 1970) and GE2270A (Selva et al., 1997) inhibit translation steps

in bacterial protein synthesis. More than 1000 alkaloids with the indole skeleton have been reported from microorganisms. One-third of these compounds are peptides with masses beyond 500 Da where the indole is tryptophan derived. The structural variety of the remaining two-thirds is higher, and their biological activity seems to cover a broader range, including antimicrobial, antiviral, cytotoxic, insecticidal, antithrombotic, or enzyme inhibitory activity.

BRIEF SUMMARY

Provided herein is an isolated strain of a non-*Burkholderia cepacia,* non-*Burkholderia plantari*, non-*Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp*. which has the following characteristics:

(a) Has a 16rRNA gene sequence comprising a forward sequences having at least 99.5% identity to the sequences set forth in SEQ ID NO:8, 11 and 12 and a reverse sequence having at least 99.5% identity to SEQ ID NO:9, 10, 13-15;

(b) Has pesticidal, in particular, herbicidal, algicidal, acaricidal, insecticidal, fungicidal and nematicidal activity;

(c) Produces at least one of the compounds selected from the group consisting of:

(i) a compound having the following properties: (a) a molecular weight of about 525-555 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (b) ^{1}H NMR values of 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (c) has ^{13}C NMR values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 and (c) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient;

(ii) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one carboxylic ester group; at least 17 carbons and at least 3 oxygen and 2 nitrogens;

(iii) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one amide group; at least 15 carbons and at least 2 oxygen and 2 nitrogens;

(iv) a compound having at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons and at least eight oxygen and one nitrogen and

(d) is non-pathogenic (non-infectious) to vertebrate animals, such as mammals, birds and fish;

(e) is susceptible to kanamycin, chloramphenicol, ciprofloxacin, piperacillin , imipenem, and a combination of sulphamethoxazole and trimethoprim and

(f) contains the fatty acids 16:0, cyclo 17:0, 16:0 3- OH, 14:0, cyclo 19:0 ω8*c*, 18:0.

In a particular embodiment, the strain has the identifying characteristics of a *Burkholderia* A396 strain (NRRL Accession No. B-50319).

In a particular embodiment, the first substance is a supernatant. In yet even a more particular embodiment, the supernatant is a cell-free supernatant.

Also provided is a combination, particularly a composition or formulation comprising

(a) a first substance selected from the group consisting of a pure culture, cell fraction or supernatant derived from the *Burkholderia* strain set forth above or extract thereof for use optionally as a pesticide; and

(b) optionally at least one of a carrier, diluent, surfactant, adjuvant, or chemical or biological pesticide (e.g., algicide, acaricide, herbicide, fungicide, insecticide, nematocide and particularly, algicide or acaricide (e.g., miticide)). In a related aspect, provided herein is a seed coated with said combination or composition.

In a particular embodiment, the composition or formulation may comprise:

(a) a first substance selected from the group consisting of a pure culture, cell fraction or supernatant derived from the *Burkholderia* strain set forth above or extract thereof for use optionally as a pesticide;

(b) fatty acids 16:0, cyclo 17:0, 16:0 3-OH, 14:0, cyclo 19:0 ω8*c*, 18:0, C1-C7 paraben, C2-C17 alcohol and detergent and

(c) optionally another substance wherein said other substance is a pesticide (e.g., fungicide, insecticide, algicide, acaricide (e.g., miticide), herbicide, nematocide).

In a particular embodiment, the C1-C7 aliphatic paraben is present in the amount of about 0.01 – 5 %, the C2-C17 alcohol is present in the amount of about 0.00–10 % and the detergent is present in the amount of about 0.001–10 %.

Also provided are the pesticidal substances derived from the formulation set forth above, combinations comprising said pesticidal subtances and another chemical or biological pesticide and methods for producing these pesticidal substances. In a particular embodiment, these pesticidal substances comprise at least one of the following characteristics:

(a) has pesticidal properties and in particular, herbicidal, insecticidal, nematicidal, and fungicidal properties;

(b) has a molecular weight of about 210-240 and more particularly, 222 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS);

(e) has ^{1}H NMR values of δ 7.90, 6.85, 4.28, 1.76, 1.46, 1.38, 1.37, 0.94;

(d) has ^{13}C NMR values of δ 166.84, 162.12, 131.34 (2C), 121.04, 114.83 (2C), 64.32, 31.25, 28.43, 25.45, 22.18. 12.93;

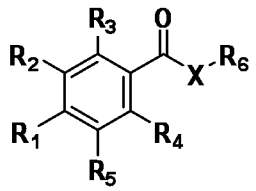
(e) has an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 15-20 minutes, more specifically about 17 minutes and even more specifically about 17.45 min on a reversed phase C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90-0 % aqueous CH_3CN, 20-24 min; 100% CH_3CN, 24-27 min; 0 - 90 % aqueous CH_3CN, 27-30 min; 90% aqueous CH_3CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm;

(f) The ^{13}C NMR spectrum exhibited 13 discrete carbon signals which were attributed to one methyl, five methylene carbons, four methines, and three quaternary carbons;

(g) has a molecular formula of $C_{13}H_{18}O_3$ which was determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis;

(h) has UV absorption bands between about 210-450 nm and most particularly at about 248 nm.

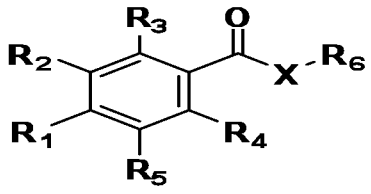
Also provided are compounds having the structure shown below:



Wherein

X, is independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, and R_6 are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

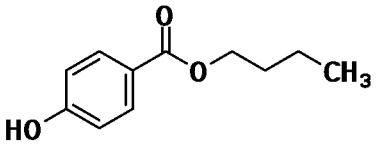
In particular, the substance may have the structure



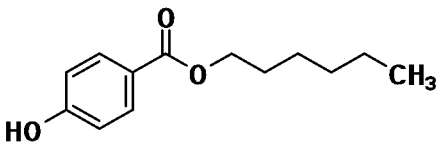
Wherein

X, is independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, and R_6 are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

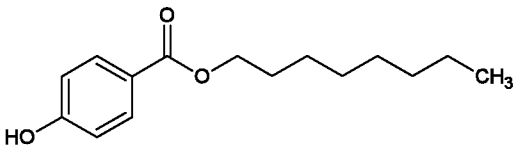
In a more particular embodiment, the compound is butyl parben with the following structure:



In a more particular embodiment, the compound is hexyl parben with the following structure:



In a more particular embodiment, the compound is octyl parben with the following structure:



The pesticidal substance(s) derived from the formulation set forth above may obtained by

(a) providing the formulation set forth above;

(b) incubating or storing the formulation provided for a sufficient time (e.g., between about 1 day to about 6 months) and at a sufficient temperature (e.g., between about 3C to about 50 C) to produce the pesticidal substance(s) and

(c) isolating the pesticidal substance.

In a related aspect, disclosed is a method for modulating proliferation and/or growth of a pest including but not limited to insect, fungi, weeds, nematode, arachnid, algae and particularly, algae, arachnid (e.g., mites. ticks) comprising applying to a location where modulation of proliferation and/or growth of a pest is desired an amount of:

(I)(a) at least one or more substances selected from the group consisting of a substantially pure cell culture, cell fraction, supernatant derived from the *Burkholderia* strain set forth above or extract thereof and (b) optionally another substance, wherein said substance is a pesticide, or

(II) the combination, composition or formulation or pesticidal substances derived from said formulation set forth above, effective to modulate proliferation and/or growth of a pest at said location.

Disclosed herein are isolated compounds which are optionally obtainable or derived from *Burkholderia* species, or alternatively, organisms capable of producing these compounds that can be used to control various pests, particularly plant phytopathogenic pests, examples of which include but are not limited to insects, nematodes, bacteria, fungi. These compounds may also be used as herbicides, acaricides or algicides.

In particular, the isolated pesticidal compounds may include but are not limited to:

(A) a compound having the following properties: (i) a molecular weight of about 525-555 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR values of 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (iii) has ^{13}C NMR values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 and (iv) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient;

(B) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one carboxylic ester group; at least 17 carbons and at least 3 oxygen and 2 nitrogens;

(C) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one amide group; at least 15 carbons and at least 2 oxygen and 2 nitrogens;

(D) a compound having at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons and at least eight oxygen and one nitrogen and

(E) a compound having at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons, at least 8 oxygens and at least 1 nitrogen.

In a particular embodiment, the isolated compounds may include but are not limited to:

(A) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group, at least one carboxylic ester group, at least 17 carbons, at least 3 oxygens and at least 2 nitrogens; and which has at

least one of the following: (i) a molecular weight of about 275-435; (ii) ^{1}H NMR δ values at 8.44, 8.74, 8.19, 7.47, 7.31, 3.98, 2.82, 2.33, 1.08; (iii) ^{13}C NMR values of δ 163.7, 161.2, 154.8, 136.1, 129.4, 125.4, 123.5, 123.3, 121.8, 121.5, 111.8, 104.7, 52.2, 37.3, 28.1, 22.7, 22.7; (iv) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-20 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system and UV detection of 210 nm; (v) UV absorption bands at about 226, 275, 327 nm.;

(B) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one amide group; at least 15 carbons and at least 2 oxygens, at least 2 nitrogens; and at least one of the following characteristics: (i) a molecular weight of about 240-290 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR δ values at about 7.08, 7.06, 6.75, 3.75, 2.56, 2.15, 0.93, 0.93; (iii) ^{13}C NMR values of δ 158.2, 156.3, 155.5, 132.6, 129.5, 129.5, 127.3, 121.8, 115.2, 115.2, 41.2, 35.3, 26.7, 21.5, 21.5; (iv) a High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 6-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient and (v) UV absorption bands at about 230, 285, 323 nm;

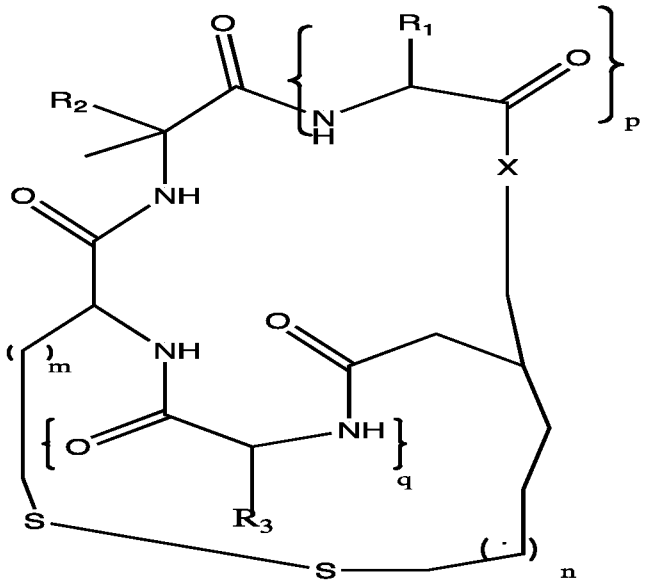
(C) a non-epoxide compound comprising at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons, at least eight oxygens and one nitrogen and at least one of the following characteristics: (i) a molecular weight of about 530-580 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR values of δ 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04; (iii) ^{13}C NMR values of δ 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41; (iv) a High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 7-12 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system and UV detection of 210 nm; (v) a molecular formula of $C_{28}H_{45}NO_{10}$ which was determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis; (vi) UV absorption bands between about 210-450 nm;

(D) a compound comprising (i) at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons, at least 8

oxygens and at least 1 nitrogen, (ii) ^{13}C NMR values of δ174.03, 166.12, 143.63, 137.50, 134.39, 128.70, 126.68, 124.41, 98.09, 80.75, 76.84, 75.23, 69.87, 69.08, 68.69, 68.60, 48.83, 41.07, 35.45, 31.67, 29.19, 27.12, 24.55, 19.20, 18.95, 13.48, 11.39, 8.04, (iii) a molecular formula of $C_{28}H_{43}NO_9$ and at least one of: (a) ^1H NMR δ values at about 6.41, 6.40, 6.01, 5.97, 5.67, 5.55, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.64, 3.59, 3.54, 3.52, 2.44, 2.34, 2.25, 1.96, 1.81, 1.76, 1.42, 1.38, 1.17, 1.12, 1.04; (b) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 6-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient; (c) UV absorption band between about 210-450 nm and most particularly at about 234 nm.

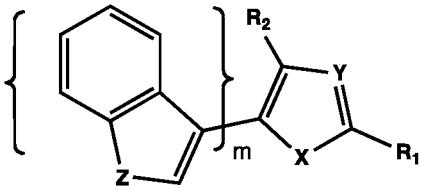
In a more particular embodiment, provided are compounds including but not limited to:

(A) a compound having the structure ##STR001##



or a pesticidally acceptable salt or steriosomers thereof, wherein M is 1, 2, 3 or 4; n is 0, 1, 2, or 3; p and q are independently 1 or 2; X is O, NH or NR; R1, R2 and R3 are the same or different and independently an amino acid side-chain moiety or an amino acid side-chain derivative and R is a lower chain alkyl, aryl or arylalkyl moiety;

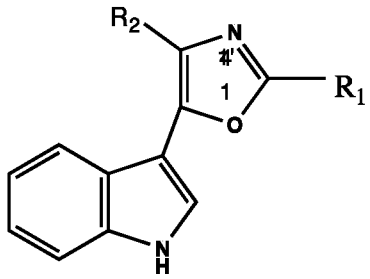
(B) a compound having the structure ##STR002##



##STR002##

wherein X, Y and Z are each independently --O, --NR_1, or --S, wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2 and m are each independently --H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl and "m" may be located anywhere on the oxazole ring;

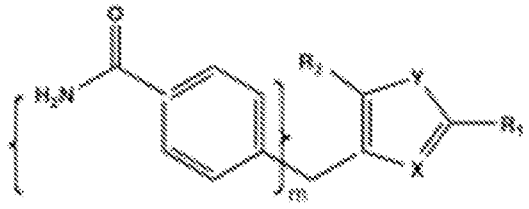
(C) a compound having the structure ##STR002a##.



##STR002a##

wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl; R_2 is an alkyl ester;

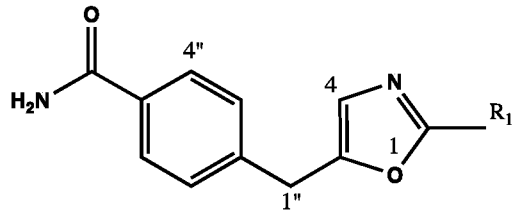
(D) a compound having the structure ##STR003##



##STR003##

wherein: X and Y are each independently --OH, --NR_1, or --S, wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2 and m, a substituent on the oxazole ring, are each independently --H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

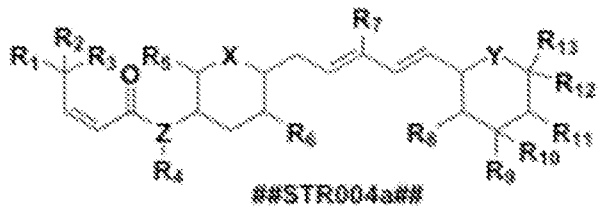
(E) a compound having the structure ##STR003a##



##STR003a##

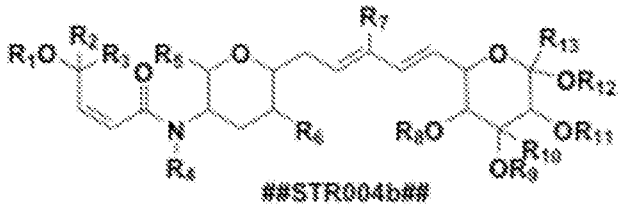
wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl;

(F) a compound having the structure ##STR004a##



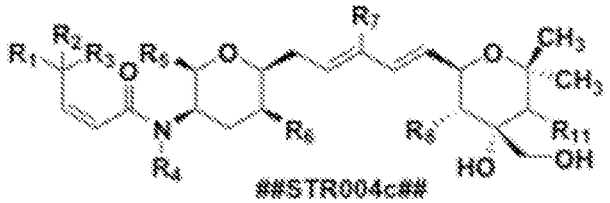
Wherein X, Y and Z are each independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

(G) a compound having the structure ##STR004b##



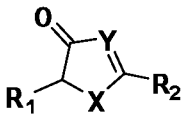
wherein R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl;

(H) a compound having the structure ##STR004c##



wherein R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl;

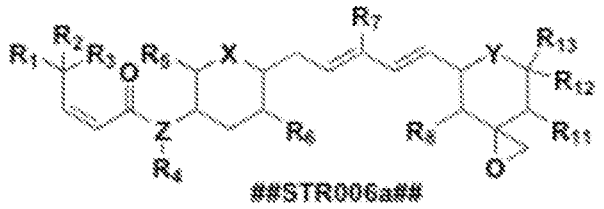
(I) a compound having the structure ##STR005##



##STR005##

wherein X and Y are each independently --OH, --NR_1, or --S, wherein R_1, R_2 are each independently --H, alkyl (e.g., C_1-C_{10} alkyl), substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl;

(J) a compound having the structure ##STR006a##



##STR006a##

Wherein X, Y and Z are each independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

In a most particular embodiment, the compounds may include but are not limited to

(i) templazole A;

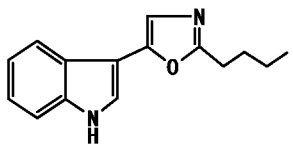
(ii) templazole B;

(iii) templamide A;

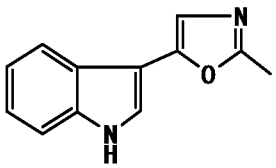
(iv) templamide B;

(v) FR901228;

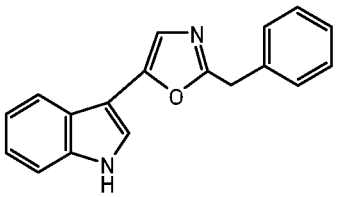
(vi)



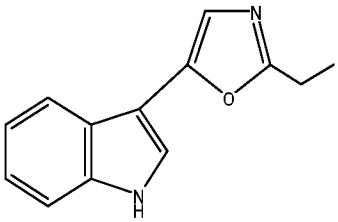
(vii)



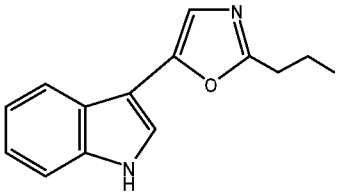
(viii)



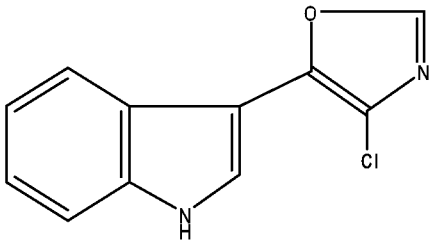
(ix)



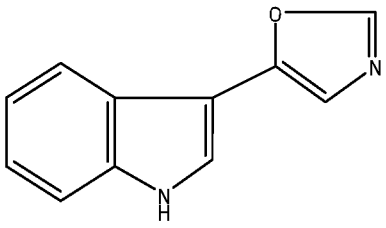
(x)



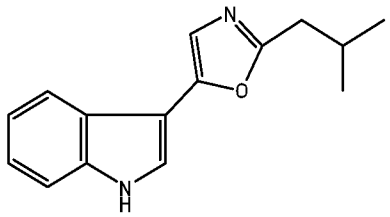
(xi)



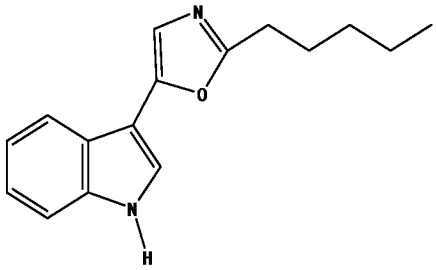
(xii)



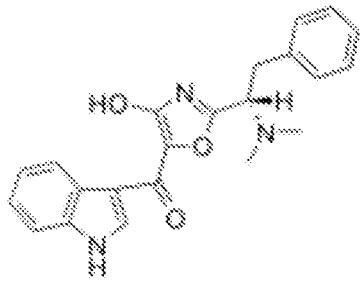
(xiii)



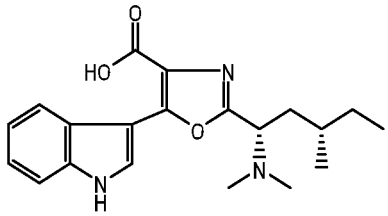
(xiv)



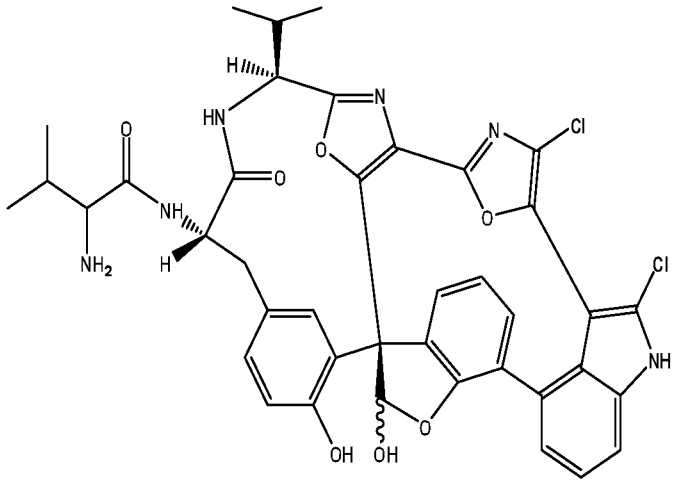
(xv)



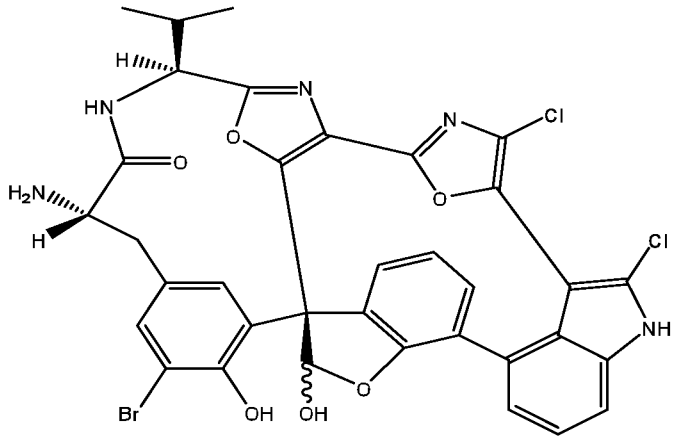
(xvi)



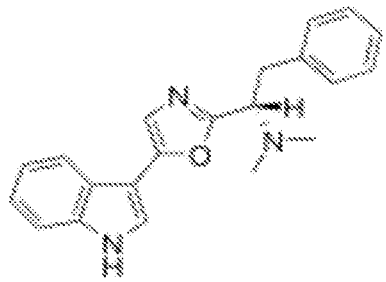
(xvii)



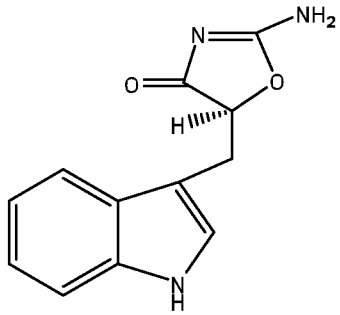
(xviii)



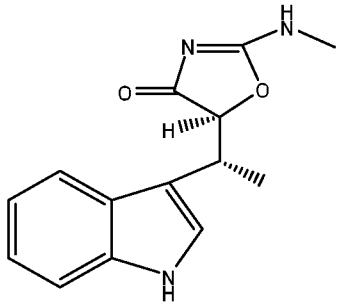
(xix)



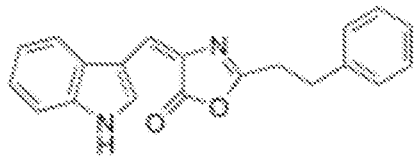
(xx)



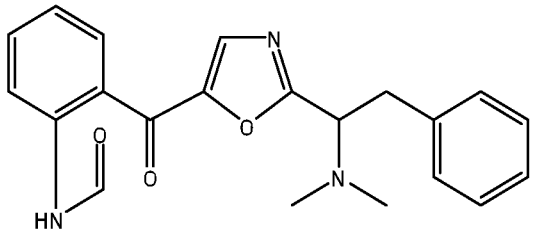
(xxi)

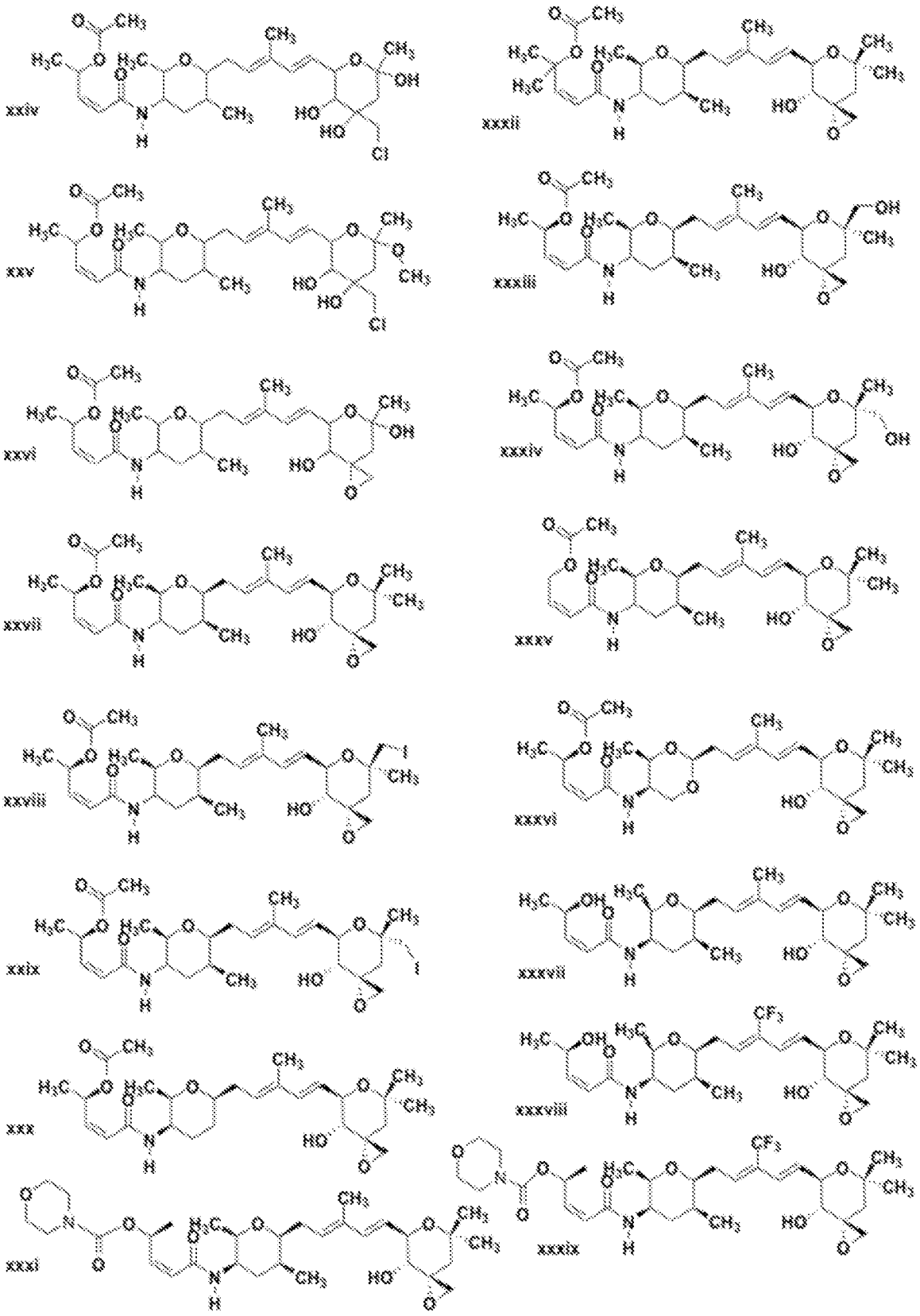


(xxii)



(xxiii)





(xl) FR901465;

(xli) F8H17, an active compound from fraction F8, which has been assigned a molecular weight

of 1080 based on the molecular ion peak at 1081.75 (M + H) in positive ESI mode and further confirmed by the negative ESIMS with base peak at 1079.92. This compound showed UV absorption at 234 nm.

In a related aspect, disclosed is a method for modulating proliferation and/or growth of a pest (e.g., algae, arachnid, nematode, insect, fungus) comprising applying to a location where modulation of proliferation and/or growth of a pest (e.g., algae, arachnid, nematode, insect, fungus) is desired an amount of

(I) (a) the isolated compounds set forth above and (b) optionally another substance, wherein said substance is an algicide or

(II) the composition or combination set forth above

in an amount effective to modulate proliferation and/or growth of pest at said location.

In another related aspect, disclosed is a method for modulating proliferation and/or growth of algae and/or modulating pest infestation in a plant and/or a method for modulating emergence and/or growth of monocotyledonous, sedge or dicotyledonous weeds comprising applying to a location where modulation of proliferation and/or growth of algae and/or modulation of infestation of an arachnid and/or modulation of emergence and/or growth of said weed is desired an amount of

(A) the formulation set forth above or pesticidally effective substance derived therefrom;

(B) the combination set forth above;

(C) templamide A;

(D) templamide B;

(E) FR901465;

(F) FR901228

effective to modulate said proliferation and/or growth of algae and/or pest infestation and/or emergence or growth of monocotyledonous, sedge or dicotyledonous weeds at said location. The nematode and/or insect infestation is modulated with templamide A, templamide B, FR901465 and/or FR901228. In a more particular embodiment, infestation of insects, specifically *Oncopeltus* sp. (e.g., *O. fasciatus*) and/or *Lygus* sp. and/or free living nematodes and/or parasitic nematodes (e.g., *M. incognita*) are modulated.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows the comparison of the growth rate of *Burkholderia* A396 *to Burkholderia multivorans* ATCC 17616.

Figure 2 shows the general scheme used to obtain fractions from formulated MBI-206.

Figure 3 shows the general scheme used to obtain fractions and compounds from an MBI-206 culture.

Figure 4 shows insecticidal (sucking) activities of tested compounds against milkweed bugs (*Oncopeltus fasciatus*).

Figure 5 shows insecticidal (feeding) activities of pure compounds against *Lygus Hesperus*.

DETAILED DESCRIPTION OF EMBODIMENTS

While the compositions and methods heretofore are susceptible to various modifications and alternative forms, exemplary embodiments will herein be described in detail. It should be understood, however, that there is no intent to limit the invention to the particular forms disclosed, but on the contrary, the intention is to cover all modifications, equivalents, and alternatives falling within the spirit and scope of the invention as defined by the appended claims.

Where a range of values is provided, it is understood that each intervening value, to the tenth of the unit of the lower limit unless the context clearly dictates otherwise, between the upper and lower limit of that range and any other stated or intervening value in that stated range, is included therein. Smaller ranges are also included. The upper and lower limits of these smaller ranges are also included therein, subject to any specifically excluded limit in the stated range.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can also be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are now described.

It must be noted that as used herein and in the appended claims, the singular forms "a," "and" and "the" include plural references unless the context clearly dictates otherwise.

As defined herein, “derived from” means directly isolated or obtained from a particular source or alternatively having identifying characteristics of a substance or organism isolated or obtained from a particular source.

As defined herein, an “isolated compound” is essentially free of other compounds or substances, e.g., at least about 20% pure, preferably at least about 40% pure, more preferably about 60% pure, even more preferably about 80% pure, most preferably about 90% pure, and even most preferably about 95% pure, as determined by analytical methods, including but not limited to chromatographic methods, electrophoretic methods.

As used herein, the term "alkyl" refers to a monovalent straight or branched chain hydrocarbon group having from one to about 12 carbon atoms, including methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, tert-butyl, n-hexyl, and the like.

As used herein, "substituted alkyl" refers to alkyl groups further bearing one or more substituents selected from hydroxy, alkoxy, mercapto, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, heterocyclic, substituted heterocyclic, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, aryloxy, substituted aryloxy, halogen, cyano, nitro, amino, amido, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carboxyl, sulfonyl, sulfonamide, sulfuryl, and the like.

As used herein, "alkenyl" refers to straight or branched chain hydrocarbyl groups having one or more carbon-carbon double bonds, and having in the range of about 2 up to 12 carbon atoms, and "substituted alkenyl" refers to alkenyl groups further bearing one or more substituents as set forth above.

As used herein, "alkynyl" refers to straight or branched chain hydrocarbyl groups having at least one carbon-carbon triple bond, and having in the range of about 2 up to 12 carbon atoms, and "substituted alkynyl" refers to alkynyl groups further bearing one or more substituents as set forth above.

As used herein, "aryl" refers to aromatic groups having in the range of 6 up to 14 carbon atoms and "substituted aryl" refers to aryl groups further bearing one or more substituents as set forth above.

As used herein, "heteroaryl" refers to aromatic rings containing one or more heteroatoms (e.g., N, O, S, or the like) as part of the ring structure, and having in the range of 3 up to 14 carbon atoms and "substituted heteroaryl" refers toheteroaryl groups further bearing one or more substituents as set forth above.

As used herein, "alkoxy" refers to the moiety --O-alkyl-, wherein alkyl is as defined above, and "substituted alkoxy" refers to alkoxyl groups further bearing one or more substituents as set forth above.

As used herein, "thioalkyl" refers to the moiety --S-alkyl-, wherein alkyl is as defined above, and "substituted thioalkyl" refers to thioalkyl groups further bearing one or more substituents as set forth above.

As used herein, "cycloalkyl" refers to ring-containing alkyl groups containing in the range of about 3 up to 8 carbon atoms, and "substituted cycloalkyl" refers to cycloalkyl groups further bearing one or more substituents as set forth above.

As used herein, "heterocyclic", refers to cyclic (i.e., ring-containing) groups containing one or more heteroatoms (e.g., N, O, S, or the like) as part of the ring structure, and having in

the range of 3 up to 14 carbon atoms and "substituted heterocyclic" refers to heterocyclic groups further bearing one or more substituent's as set forth above.

As used herein "algae" refers to any of various chiefly aquatic, eukaryotic, photosynthetic organisms, ranging in size from single-celled forms to the giant kelp. The term may further refer to photosynthetic protists responsible for much of the photosynthesis on Earth. As a group, the algae are polyphyletic. Accordingly, the term may refer to any protists considered to be algae from the following groups, alveolates, chloraraachniophytes, cryptomonads, euglenids, glaucophytes, haptophytes, red algae such as Rhodophyta, stramenopiles, and viridaeplantae. The term refers to the green, yellow-green, brown, and red algae in the eukaryotes. The term may also refer to the cyanobacteria in the prokaryotes. The term also refers to green algae, blue algae, and red algae.

As used herein "algicide" refers to one or more agents, compounds and/or compositions having algaestatic and/or algaecidal activity.

As used herein "algicidal" as used herein means the killing of algae.

As used herein "algistatic" as used herein means inhibiting the growth of algae, which can be reversible under certain conditions.

The Burkholderia Strain

The *Burkholderia* strain set forth herein is a non-*Burkholderia cepacia* complex, non-*Burkholderia plantari,* non-*Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp* and non-pathogenic to vertebrates, such as birds, mammals and fish. This strain may be isolated from a soil sample using procedures known in the art and described by Lorch et al., 1995. The *Burkholderia* strain may be isolated from many different types of soil or growth medium. The sample is then plated on potato dextrose agar (PDA). The bacteria are gram negative, and it forms round, opaque cream-colored colonies that change to pink and pinkish-brown in color and mucoid or slimy over time.

Colonies are isolated from the potato dextrose agar plates and screened for those that have biological, genetic, biochemical and/or enzymatic characteristics of the *Burkholderia* strain of the present invention set forth in the Examples below. In particular, the *Burkholderia* strain has a 16S rRNA gene comprising a forward sequence that is at least about 99.5%, more preferably about 99.9% and most preferably about 100% identical to the sequence set forth in SEQ ID NO: 8, 11 and 12 and a forward sequence that is at least about 99.5%, more preferably about 99.9% and most preferably about 100% identical to the sequence set forth in SEQ ID NO: 9, 10, 13, 14 and 15 as determined by clustal analysis. Furthermore, as set forth below, this *Burkholderia* strain may, as set forth below, have pesticidal activity, particularly, virucidal,

herbicidal, germicidal, fungicidal, nematicidal, bactericidal and insecticidal and more particularly, herbicidal, algicidal, acaricidal, insecticidal, fungicidal and nematicidal activity. It is not pathogenic to vertebrate animals, such as mammals, birds, and fish.

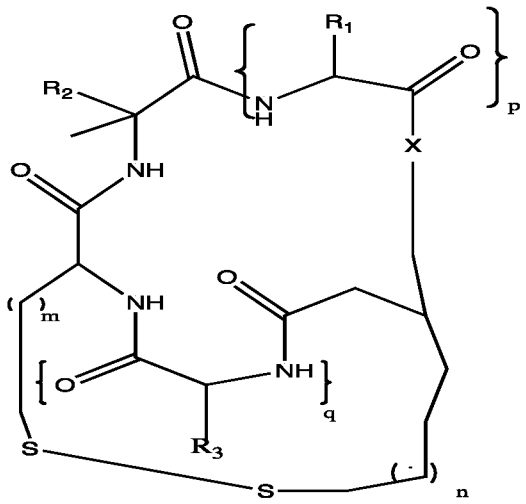
Additionally, the *Burkholderia* strain produces at least the pesticidal compounds set forth in the instant disclosure.

The *Burkholderia* strain is susceptible to kanamycin, chloramphenicol, ciprofloxacin, piperacillin , imipenem, and a combination of sulphamethoxazole and trimethoprim and contains the fatty acids 16:0, cyclo 17:0, 16:0 3- OH, 14:0, cyclo 19:0, 18:0.

This *Burkholderia* strain may be obtained by culturing a microorganism having the identifying characteristics of *Burkholderia* A396 (NRRL Accession No. B-50319) on Potato Dextrose Agar (PDA) or in a fermentation medium containing defined carbon sources such as glucose, maltose, fructose, galactose, and undefined nitrogen sources such as peptone, tryptone, soytone, and NZ amine.

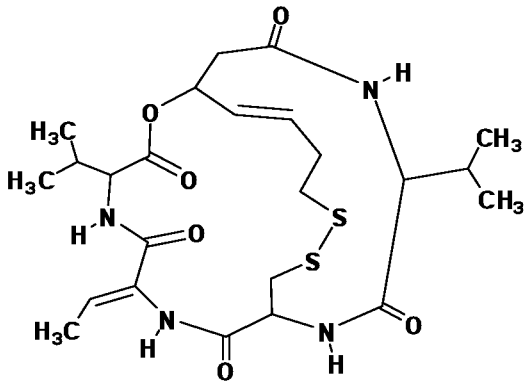
Algicidal and Acaricidal Compounds

The algicidal and acaricidal compounds disclosed herein may have the following properties: (a) is obtainable from a novel *Burkholderia* species, e.g., A396; (b) is, in particular, toxic to most common agricultural insect pests; (c) has a molecular weight of about 525-555 and more particularly, 540 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (d) has ^{1}H NMR values of 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (d) has ^{13}C NMR values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 (e) has an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-15 minutes, more specifically about 12 minutes and even more specifically about 12.14 min on a reversed phase C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5μ C18 (2) 100A, 100 x 4.60 mm) column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system (0-20 min 90-0 % aqueous CH_3CN, 20-24 min 100% CH_3CN, 24-27 min, 0-90 % aqueous CH_3CN, 27-30 min 90% aqueous CH_3CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm (f) has a molecular formula, $C_{24}H_{36}N_4O_6S_2$, which is determined by interpretation of ^{1}H, ^{13}C NMR and LC/MS data (g) a ^{13}C NMR spectrum with signals for all 24 carbons, including 5 methyl, 4 methylene, 9 methine, and 6 quaternary carbons and (g) ^{1}H NMR spectrum displaying characteristics of a typical depsipeptide, illustrating three -amino protons [4.63, 4.31, 3.93], and one ester carbinol proton [5.69]. In a particular embodiment, the compound has the structure ##STR001##:

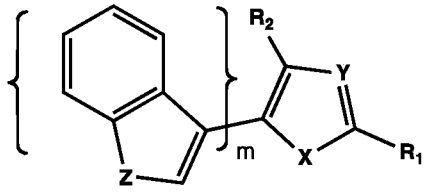


Or a pesticidally acceptable salt or stereoisomers thereof, wherein M is 1, 2, 3 or 4; n is 0, 1, 2, or 3; p and q are independently 1 or 2; X is O, NH or NR; R1, R2 and R3 are the same or different and independently an amino acid side-chain moiety or an amino acid side-chain derivative and R is a lower chain alkyl, aryl or arylalkyl moiety.

In an even more particular embodiment, the compound has the structure of FR901228:



Provided herewith are compounds set forth in ##STR002##:

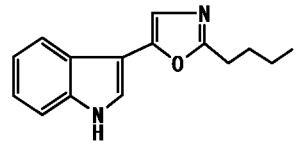


##STR002##

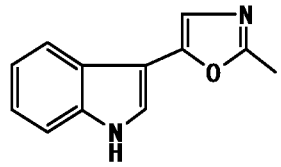
wherein: X, Y and Z are each independently --O, --NR_1, or --S, wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2 and m are each independently --H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted

alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

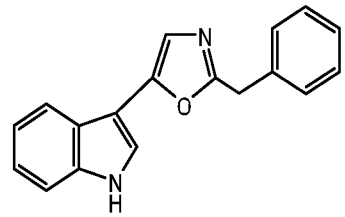
In an even another particular embodiment, Family ##STR002## compounds may be the compounds set forth in **(vi)-(xix)**.



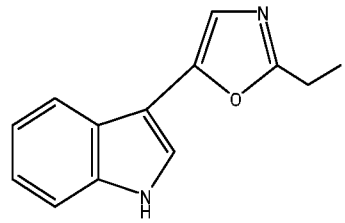
(vii)



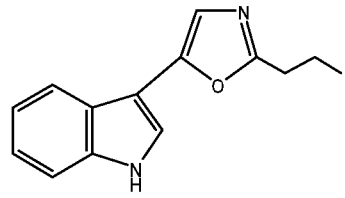
(viii)



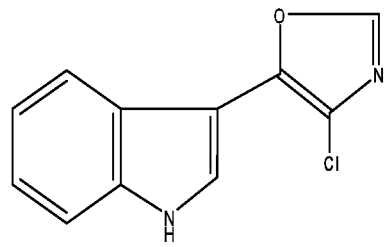
(ix)



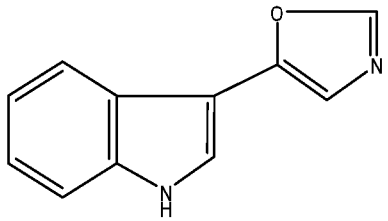
(x)



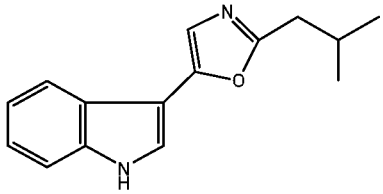
(xi)



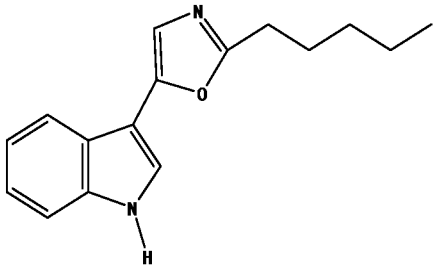
(xii)



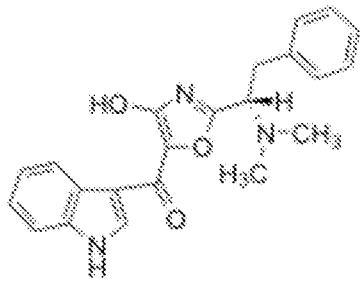
(xiii)



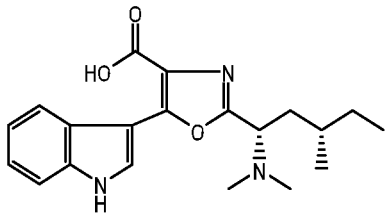
(xiv)



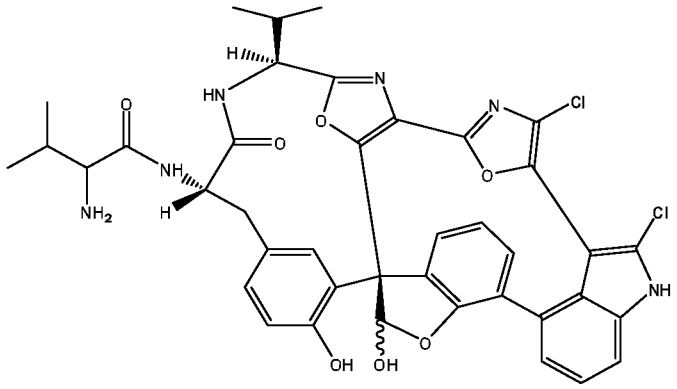
(xv)



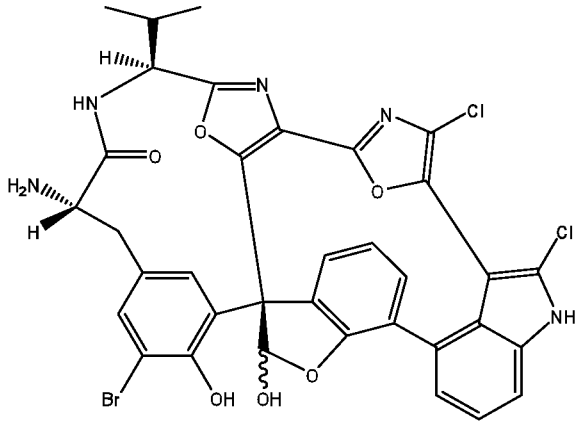
(xvi)



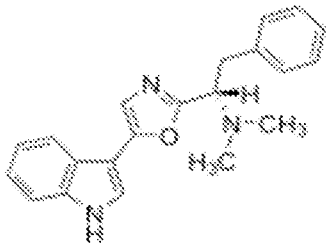
(xvii)



(xviii)



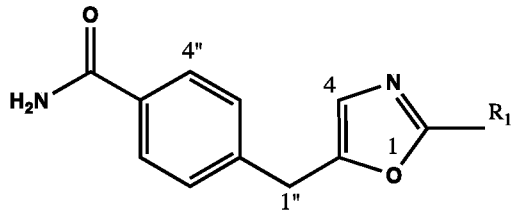
(xix)



These are from either natural materials or compounds obtained from commercial sources or by chemical synthesis. Natural sources of Family ##STR002## compounds include, but are not limited to, microorganisms, alga, and sponges. In a more particular embodiment, microorganisms which include the Family ##STR002## compounds include but are not limited to, or alternatively, Family ##STR002## compounds may be derived from species such as *Streptoverticillium waksmanii* (compound **vi**) (Umehara, et al., 1984), *Streptomyces pimprina* (compound vii) (Naiket al., 2001), *Streptoverticillium olivoreticuli* (compounds **viii, ix, x**) (Koyama Y., et al., 1981), *Streptomyces* sp (compounds **xi, xii**) (Watabe et al., 1988), *Pseudomonas syringae* (compounds **xiii, xiv**) (Pettit et al., 2002). Family ##STR002## compounds may also be derived from algae including but not limited to red alga (compound **xv**) (N'Diaye, et al., 1996), red alga *Martensia fragilis* (compound **xvi**) (Takahashi S. et al., 1998),

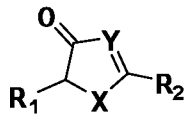
Diazona chinensis (compounds **xvii & xviii**) (Lindquist N. et al., 1991), *Rhodophycota haraldiophyllum* sp (compound **xix**) (Guella et al., 1994).

Also provided is ##STR003##:



wherein: X and Y are each independently --OH, --NR_1, or --S, wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2 and m, a substituent on the oxazole ring, are each independently --H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

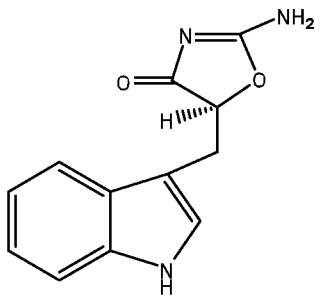
Further provided is ##STR005##:



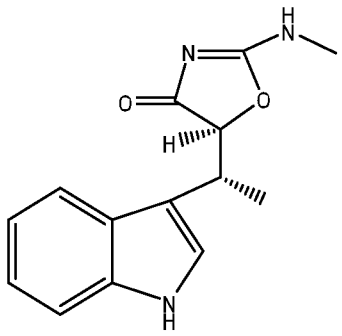
wherein X and Y are each independently --OH, --NR_1, or --S, wherein R_1, R_2 are each independently --H, alkyl (e.g., C_1-C_{10} alkyl), substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

In a particular embodiment, Family ##STR005## compounds such as compounds from **xx-xxiii** set forth below may be derived from natural or commercial sources or by chemical synthesis.

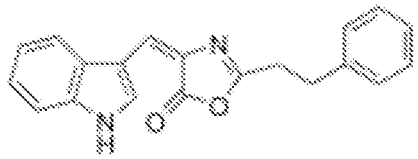
(xx)



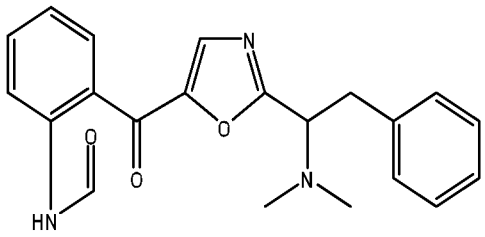
(xxi)



(xxii)



(xxiii)



Natural sources of Family ##STR005## compounds include, but are not limited to plants, corals, microorganisms, and sponges. The microorganisms include, but are not limited to *Streptomyces griseus* (compound **xx**) (Hirota et al., 1978), *Streptomyces albus* (compound **xxi**) (Werner et al., 1980). Family STR004 compounds may also be derived from algae including but not limited to *Haraldiophyllum sp* (compound **xxii** (Guella et al., 2006), and red algae (compound **xxiii**) (N'Diaye et al., 1994).

In one embodiment, the compound may be derived from or is obtainable from a microorganism, and in particular from *Burkholderia* species and characterized as having a structure comprising at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons and at least eight oxygen and one nitrogen. The compound further comprises at least one of the following characteristics:

(a) pesticidal properties and in particular, nematicidal, fungicidal, insecticidal, acaricidal, algicidal and herbicidal properties;

(b) a molecular weight of about 530-580 and more particularly, 555 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS);

(c) ^{1}H NMR values of δ 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04;

(d) ^{13}C NMR values of δ 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41;

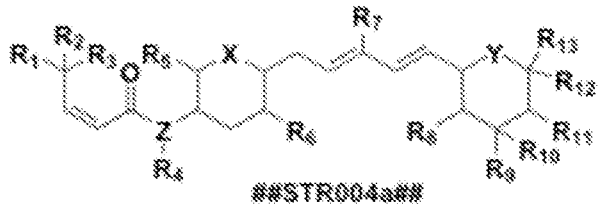
(e) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 7-12 minutes, more specifically about 10 minutes and even more specifically about 10.98 min on a reversed phase C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90-0 % aqueous CH_3CN, 20-24 min; 100% CH_3CN, 24-27 min; 0-90 % aqueous CH_3CN, 27-30 min; 90% aqueous CH_3CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm;

(f) ^{13}C NMR spectrum which exhibits 28 discrete carbon signals which may be attributed to six methyls, four methylene carbons, and thirteen methines including five sp^2, four quaternary carbons;

(g) a molecular formula of $C_{28}H_{45}NO_{10}$ which was determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis;

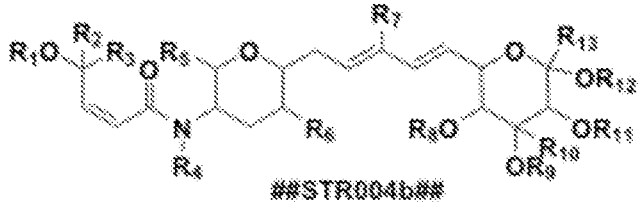
(h) UV absorption bands between about 210-450 nm and most particularly at about 234 nm.

Also provided are compounds having the structure ##STR004a##:



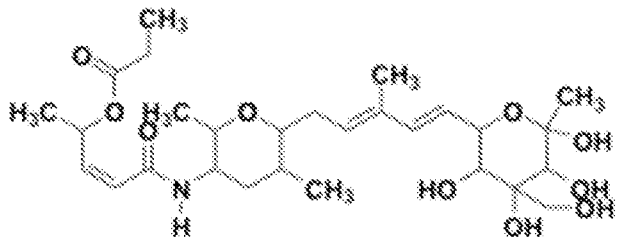
Wherein X, Y and Z are each independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

In a particular embodiment, the compound has the structure set forth in ##STR004b##:



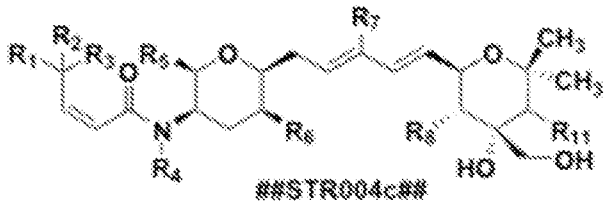
wherein R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are as previously defined for ##STR004a##.

In a more particular embodiment, the compound is Templamide A with the following structure:



Templamide A

In another embodiment, provided is a compound having formula ##STR004c##:



##STR004c##

Wherein R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, and R_{11} are as previously defined for ##STR004a##.

In another embodiment, provided is a compound which may be derived from *Burkholderia* species and characterized as having a structure comprising at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons and at least 8 oxygen and 1 nitrogen, and pesticide activity. The compound further comprises at least one of the following characteristics:

(a) pesticidal properties and in particular, insecticidal, fungicidal, nematocidal, acaricidal, algicidal and herbicidal properties;

(b) a molecular weight of about 520-560 and particularly 537 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS);

(c) ^{1}H NMR δ values at about 6.41, 6.40, 6.01, 5.97, 5.67, 5.55, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.64, 3.59, 3.54, 3.52, 2.44, 2.34, 2.25, 1.96, 1.81, 1.76, 1.42, 1.38, 1.17, 1.12, 1.04;

(d) ^{13}C NMR values of δ 174.03, 166.12, 143.63, 137.50, 134.39, 128.70, 126.68, 124.41, 98.09, 80.75, 76.84, 75.23, 69.87, 69.08, 68.69, 68.60, 48.83, 41.07, 35.45, 31.67, 29.19, 27.12, 24.55, 19.20, 18.95, 13.48, 11.39, 8.04;

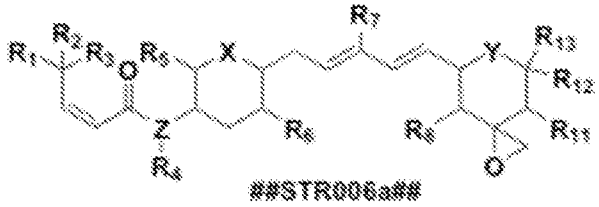
(e) High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 6-15 minutes, more specifically about 8 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient, particularly, an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 8-15 minutes, more specifically about 11 minutes and even more specifically about 11.73 min on a reversed phase C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient

solvent system (0-20 min; 90-0 % aqueous CH_3CN, 20-24 min; 100% CH_3CN, 24-27 min; 0 - 90 % aqueous CH_3CN, 27-30 min; 90% aqueous CH_3CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm;

(f) a molecular formula of $C_{28}H_{43}NO_9$ which was determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis;

(g) UV absorption bands at about 210-450 nm and most particularly at about 234 nm.

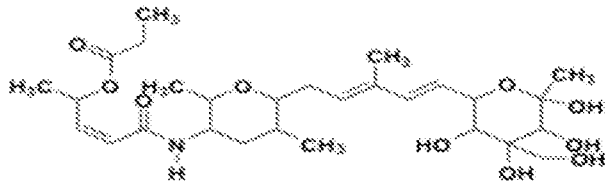
In a particular embodiment, the compound has the structure ##STR006a##:



##STR006a##

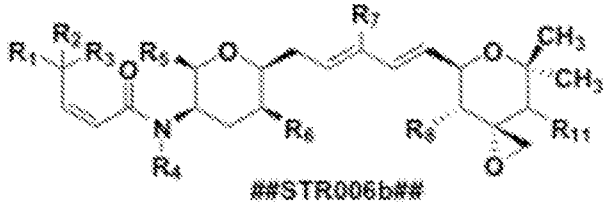
Wherein X, Y and Z are each independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

In a particular embodiment, the compound has the structure:



Templamide A

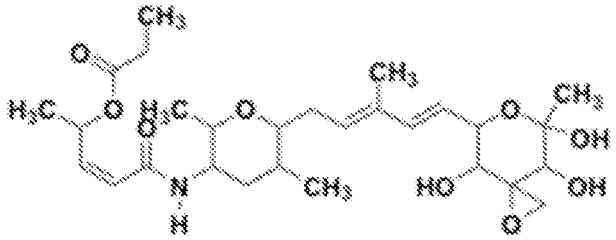
In another embodiment, provided is a compound having formula ##STR006b##:



##STR006b##

Wherein R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, and R_{11} are as previously defined for ##STR006a##.

In a more particular embodiment, the compound is Templamide B with the following structure:



Templamide B

In yet another particular embodiment, the compound may be derived from *Burkholderia* species and characterized as having a structure comprising at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons and at least 8 oxygen and at least 1 nitrogen. The compound further comprises at least one of the following characteristics:

(a) pesticidal properties and in particular, insecticidal, fungicidal, acaricidal, nematicidal, algicidal and herbicidal properties;

(b) a molecular weight of about 510-550 and particularly about 523 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS);

(c) ^{1}H NMR δ values at about 6.41, 6.40, 6.01, 5.98, 5.68, 5.56, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.65, 3.59, 3.55, 3.50, 2.44, 2.26, 2.04, 1.96, 1.81, 1.75, 1.37, 1.17, 1.04;

(d) ^{13}C NMR values of δ 172.22, 167.55, 144.98, 138.94, 135.84, 130.14, 125.85, 123.37, 99.54, 82.19, 78.28, 76.69, 71.31, 70.13, 69.68, 48.83, 42.52, 36.89, 33.11, 30.63, 25.99, 21.20, 20.38, 18.14, 14.93, 12.84;

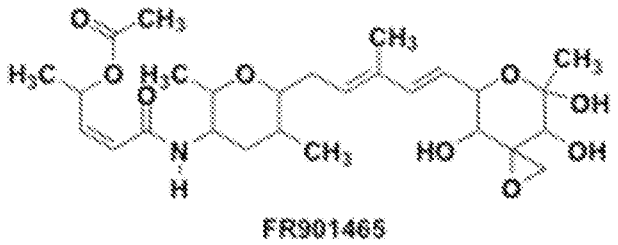
(e) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 6-15 minutes, more specifically about 8 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient, particularly, an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 8-15 minutes, more specifically about 10 minutes and even more specifically about 10.98 min on a reversed phase C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90 - 0 % aqueous CH_3CN, 20-24 min; 100% CH_3CN, 24-27 min; 0 - 90 % aqueous CH_3CN, 27-30 min; 90% aqueous CH_3CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm;

(f) a molecular formula of $C_{27}H_{41}NO_9$ which was determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis;

(g) UV absorption bands at about 210-450 nm and most particularly at about 234 nm.

In a more particular embodiment, the compound is a known compound FR901465 which was isolated earlier from culture broth of a bacterium of *Pseudomonas* sp. No. 2663

(Nakajima et al. 1996) and had been reported to have anticancer activity with the following structure:



FR901465

In an even another particular embodiment, Family ##STR006a## compounds may be the compounds set forth in **xxiv** to **xxxix.** These are from either natural materials or compounds obtained from commercial sources or by chemical synthesis. Natural sources of Family ##STR006a## compounds include, but are not limited to, microorganisms, alga, and sponges. In a more particular embodiment, microorganisms which include the Family ##STR006a## compounds which may be derived from species such as *Pseudomonas* sp. No. 2663 (compounds **xxiv-xxvi**) (Nakajima et al., 1996), The synthetic analogues of the FR901464 (**xxvii-xxxix**) which have been synthesized and patented as anticancer compounds (see Koide et al., US Patent Application No. 2008/0096879 A1).

Also provided are the pesticidal compounds produced by the formulation set forth above which comprises at least one of the following characteristics:

(a) has pesticidal properties and in particular, herbicidal, insecticidal, nematicidal, and fungicidal properties;

(b) has a molecular weight of about 210-240 and more particularly, 222 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS);

(e) has ^{1}H NMR values of δ 7.90, 6.85, 4.28, 1.76, 1.46, 1.38, 1.37, 0.94;

(d) has ^{13}C NMR values of δ 166.84, 162.12, 131.34 (2C), 121.04, 114.83 (2C), 64.32, 31.25, 28.43, 25.45, 22.18. 12.93;

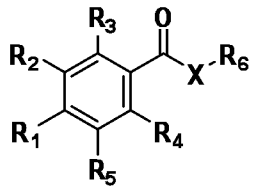
(e) has an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 15-20 minutes, more specifically about 17 minutes and even more specifically about 17.45 min on a reversed phase C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90 - 0 % aqueous CH_3CN, 20-24 min; 100% CH_3CN, 24-27 min; 0-90 % aqueous CH_3CN, 27-30 min; 90% aqueous CH_3CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm;

(f) The ^{13}C NMR spectrum exhibited 13 discrete carbon signals which were attributed to one methyl, five methylene carbons, four methines, and three quaternary carbons;

(g) has a molecular formula of $C_{13}H_{18}O_3$ which was determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis;

(h) has UV absorption bands between about 210-450 nm and most particularly at about 248 nm.

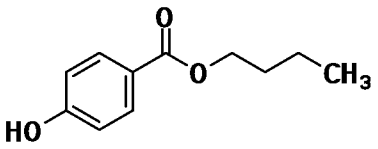
Also provided are compounds having the structure shown below



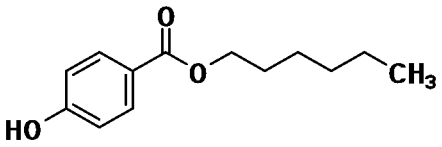
Wherein

X, is independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, and R_6 are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

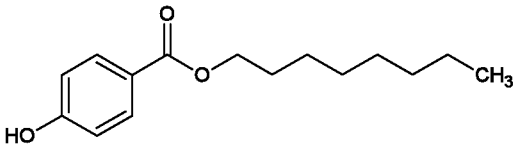
In a more particular embodiment, the compound is butyl parben with the following structure:



In a more particular embodiment, the compound is hexyl parben with the following structure:



In a more particular embodiment, the compound is octyl parben with the following structure:



In yet another embodiment, the compound is F7H18, which has a molecular weight of about 1080.

Compositions

A substantially pure culture, cell fraction or supernatant and compounds produced by the *Burkholderia* strain disclosed herein, all of which are alternatively referred to as "active ingredient(s)", may be formulated into pesticidal compositions. In a particular embodiment, the supernatant may be a cell-free supernatant.

The active ingredient(s) set forth above can be formulated in any manner. Non-limiting formulation examples include but are not limited to emulsifiable concentrates (EC), wettable powders (WP), soluble liquids (SL), aerosols, ultra-low volume concentrate solutions (ULV), soluble powders (SP), microencapsulation, water dispersed granules, flowables (FL), microemulsions (ME), nano-emulsions (NE), dusts, emulsions, liquids, flakes etc. In any formulation described herein, percent of the active ingredient is within a range of 0.01% to 99.99%.

A solid composition can be prepared by suspending a solid carrier in a solution of pesticidal compounds and drying the suspension under mild conditions, such as evaporation at room temperature or vacuum evaporation at 65°C or lower. Alternatively, a solid composition may be derived via spray-drying or freeze-drying.

When referring to solid compositions, it should be understood by the artisan of ordinary skill that physical forms such as dusts, beads, powders, particulates, pellets, tablets, agglomerates, granules, floating solids and other known solid formulations are included. The artisan of ordinary skill will be able to readily optimize a particular solid formulation for a given application using methods well known to those of ordinary skill in the art.

The composition may comprise gel-encapsulated compounds derived from the *Burkholderia* strain set forth above. Such gel-encapsulated materials can be prepared by mixing a gel-forming agent (e.g., gelatin, cellulose, or lignin) with a solution of algicidal compounds and inducing gel formation of the agent.

The composition may additionally comprise a surfactant to be used for the purpose of emulsification, dispersion, wetting, spreading, integration, disintegration control, stabilization of active ingredients, and improvement of fluidity or rust inhibition. In a particular embodiment, the surfactant is a non-phytotoxic non-ionic surfactant which preferably belongs to EPA List 4B. In another particular embodiment, the nonionic surfactant is polyoxyethylene (20) monolaurate. The concentration of surfactants may range between 0.1-35% of the total formulation, preferred range is 5-25%. The choice of dispersing and emulsifying agents, such as non-ionic, anionic, amphoteric and cationic dispersing and emulsifying agents, and the amount employed is determined by the nature of the composition and the ability of the agent to facilitate the dispersion of these compositions.

In order to provide compositions containing the active ingredient(s) set forth above in the form of dusts, granules, water dispersible powders, aqueous dispersions, or emulsions and dispersions in organic liquids, the carrier or diluent agent in such compositions may be a finely divided solid, an organic liquid, water, a wetting agent, a dispersing agent, humidifying agent, or emulsifying agent, or any suitable combination of these. Generally, when liquids and wettable powders are prepared, a conditioning agent comprising one or more surface-active agents or surfactants is present in amounts sufficient to render a given composition containing the active material, the microorganism, dispersible in water or oil.

Since these compositions can be applied as a spray utilizing a liquid carrier, it is contemplated that a wide variety of liquid carriers such as, for example, water, organic solvents, decane, dodecane, oils, vegetable oil, mineral oil, alcohol, glycol, polyethylene glycol, agents that result in a differential distribution of pathogenic bacterium in water being treated. combinations thereof and other known to artisan of ordinary skill can be used.

The present compositions can also include other substances which are not detrimental to the active ingredient(s) such as adjuvants, surfactants, binders, stabilizers and the like, which are commonly used in algicides, either singly or in combination as needed.

It will be understood by the artisan of ordinary skill that various additives or agents that predispose pests susceptible to the active ingredient set forth above are added to enhance its pesticidal action. By the phrase "additive that enhances the pesticidal action of the active ingredient" is meant any compound, solvent, reagent, substance, or agent that increases the effect of the active ingredient toward pests and more particularly, mites as compared to the pesticidal effect of the active ingredient in the absence of said additive. In some embodiments, these additives will increase the susceptibility of a particular pest to the active ingredient. Additional additives include but are not limited to agents which weaken the biological defenses of susceptible pests. Such agents can include salts, such as NaCl and $CaCl_2$.

The composition may further comprise another microorganism and/or pesticide (e.g, nematocide, fungicide, insecticide, herbicide, algicide, aracicide). The microorganism may include but is not limited to an agent derived from *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Brevabacillus sp., Lecanicillium* sp., non-*Ampelomyces* sp., *Pseudozyma* sp., *Streptomyces* sp, *Burkholderia* sp, *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp. Alternatively, the agent may be a natural oil or oil-product having fungicidal, herbicidal, aracidal, algicidal, nematocidal and/or insecticidal activity (e.g., paraffinic oil, tea tree oil, lemongrass oil, clove oil, cinnamon oil, citrus oil, rosemary oil).

The composition, in particular, may further comprise an insecticide. The insecticide may include but is not limited to avermectin, *Bacillus thuringiensis*, neem oil and azadiractin, spinosads, *Chromobacterium subtsugae*, eucalyptus extract, entomopathogenic bacterium or

fungi such a *Beauveria bassiana, and Metarrhizium anisopliae* and chemical insecticides including but not limited to organochlorine compounds, organophosphorous compounds, carbamates, pyrethroids, and neonicotinoids.

The composition my further comprise a nematocide. The nematocide may include, but is not limited to chemical nematocides such as fenamiphos, aldicarb, oxamyl, carbofuran, natural product neamticide, avermectin, the fungi *Paecilomyces lilacinas and Muscodor spp.*, the bacteria *Bacillus firmus* and other *Bacillus spp.* and *Pasteuria penetrans*.

The composition may further comprise a biofungicide such as extract of *R. sachalinensis* (Regalia) or a fungicide. Such fungicides include, but are not limited to, a single site anti-fungal agent which may include but is not limited to benzimidazole, a demethylation inhibitor (DMI) (e.g., imidazole, piperazine, pyrimidine, triazole), morpholine, hydroxypyrimidine, anilinopyrimidine, phosphorothiolate, quinone outside inhibitor, quinoline, dicarboximide, carboximide, phenylamide, anilinopyrimidine, phenylpyrrole, aromatic hydrocarbon, cinnamic acid, hydroxyanilide, antibiotic, polyamine, calamine, phthalimide, benzenoid (xylylalanine). In yet a further embodiment, the antifungal agent is a demethylation inhibitor selected from the group consisting of imidazole (e.g., triflumizole), piperazine, pyrimidine and triazole (e.g., bitertanol, myclobutanil, penconazole, propiconazole, triadimefon, bromuconazole, cyproconazole, diniconazole, fenbuconazole, hexaconazole, tebuconazole, tetraconazole, propiconazole).

The antimicrobial agent may also be a multi-site non-inorganic, chemical fungicide selected from the group consisting of a nitrile (e.g., chloronitrile or fludioxonil), quinoxaline, sulphamide, phosphonate, phosphite, dithiocarbamate, chloralkythios, phenylpyridin-amine, cyano-acetamide oxime.

The compositions may be applied using methods known in the art. Specifically, these compositions may be applied to plants or plant parts. Plants are to be understood as meaning in the present context all plants and plant populations such as desired and undesired wild plants or crop plants (including naturally occurring crop plants). Crop plants can be plants which can be obtained by conventional plant breeding and optimization methods or by biotechnological and genetic engineering methods or by combinations of these methods, including the transgenic plants and including the plant cultivars protectable or not protectable by plant breeders' rights. Plant parts are to be understood as meaning all parts and organs of plants above and below the ground, such as shoot, leaf, flower and root, examples which may be mentioned being leaves, needles, stalks, stems, flowers, fruit bodies, fruits, seeds, roots, tubers and rhizomes. The plant parts also include harvested material, and vegetative and generative propagation material, for example cuttings, tubers, rhizomes, offshoots and seeds.

Treatment of the plants and plant parts with the compositions set forth above may be carried out directly or by allowing the compositions to act on their surroundings, habitat or storage space by, for example, immersion, spraying, evaporation, fogging, scattering, painting on, injecting. In the case that the composition is applied to a seed, the composition may be applied to the seed as one or more coats prior to planting the seed using one or more coats using methods known in the art.

As noted above, the compositions may be herbicidal compositions. The composition may further comprise one or more herbicides. These may include, but are not limited to, a bioherbicide and/or a chemical herbicide. The bioherbicide may be selected from the group consisting of clove oil, cinnamon oil, lemongrass oil, citrus oil, orange peel oil, tentoxin, cornexistin, AAL-toxin, manuka oil, leptospermone, thaxtomin, sarmentine, momilactone B, sorgoleone, ascaulatoxin and ascaulatoxin aglycone. The chemical herbicide may include, but is not limited to, diflufenzopyr and salts thereof, dicamba and salts thereof, topramezone, tembotrione, S-metolachlor, atrazine, mesotrione, primisulfuron-methyl, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, nicosulfuron, thifensulfuron-methyl, asulam, metribuzin, diclofop-methyl, fluazifop, fenoxaprop-p-ethyl, asulam, oxyfluorfen, rimsulfuron, mecoprop, and quinclorac, thiobencarb, clomazone, cyhalofop, propanil, bensulfuron-methyl, penoxsulam, triclopyr, imazethapyr, halosulfuron-methyl, pendimethalin, bispyribac-sodium, carfentrazone ethyl, sodium bentazon/sodium acifluorfen, glyphosate, glufosinate and orthosulfamuron.

Herbicidal compositions may be applied in liquid or solid form as pre-emergence or post-emergence formulations.

For pre-emergence dry formulations, the granule size of the carrier is typically 1-2 mm (diameter) but the granules can be either smaller or larger depending on the required ground coverage. Granules may comprise porous or non-porous particles.

For post-emergence formulations, the formulation components used may contain smectite clays, attapulgite clays and similar swelling clays, thickeners such as xanthan gums, gum Arabic and other polysaccharide thickeners as well as dispersion stabilizers such as nonionic surfactants (for example polyoxyethylene (20) monolaurate).

In a particular embodiment, the composition may comprise in addition to the active ingredient another microorganism and/or algicide and/or acaricide. The microorganism may include but is not limited to an agent derived from *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp., and *Streptomyces* sp.

The compositions may also as set forth above, be algicidal compositions which can further comprise other algicides such as copper sulphate, diquat or thaxtomin A.

The compositions may be acaricidal compositions which can further comprise other acaricides such as antibiotics, carbamates, formamidine acaricides, pyrethroids, mite growth regulators, organophosphate acaricides and diatomaceous earth.

Uses

The compositions and pesticidal compounds derived from the *Burkholderia* strain set forth herein may be used as pesticides, particularly as insecticides, nematocides, fungicides, algicides, acaricides and herbicides.

Specifically, nematodes that may be controlled using the method set forth above include but are not limited to parasitic nematodes such as root-knot, ring, sting, lance, cyst, and lesion nematodes, including but not limited to free living nematodes, *Meloidogyne, Heterodera* and *Globodera* spp; particularly *Meloidogyne incognita* (root knot nematodes), as well as *Globodera rostochiensis* and *globodera pailida* (potato cyst nematodes); *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode); *Heterodera schachtii* (beet cyst nematode); *Oligonychus pratensis* (Banks grass mite); *Eriophyes cynodoniensis* (Bermuda grass mite); *Bryobia praetiosa* (Clover mite) –and *Heterodera avenae* (cereal cyst nematode).

Phytopathogenic insects controlled by the method of the present invention include, but are not limited to, insects from the order

(a) Lepidoptera, for example, *Acleris spp., Adoxophyes spp., Aegeria spp., Agrotis spp., Alabama argillaceae, Amylois spp., Anticarsia gemmatalis, Archips spp., Argyrotaenia spp., Autographa spp., Busseola fusca, Cadra cautella, Carposina nipponensis, Chilo spp., Choristoneura spp., Clysia ambiguella, Cnaphalocrocis spp., Cnephasia spp., Cochylis spp., Coleophora spp., Crocidolomia binotalis, Cryptophlebia leucotreta, Cydia spp., Diatraea spp., Diparopsis castanea, Earias spp., Ephestia spp., Eucosma spp., Eupoecilia ambiguella, Euproctis spp., Euxoa spp., Grapholita spp., Hedya nubiferana, Heliothis spp., Hellula undalis, Hyphantria cunea, Keiferia lycopersicella, Leucoptera scitella, Lithocollethis spp., Lobesia botrana, Lymantria spp., Lyonetia spp., Malacosoma spp., Mamestra brassicae, Manduca sexta, Operophtera spp., Ostrinia nubilalis, Pammene spp., Pandemis spp., Panolis flammea, Pectinophora gossypiella, Phthorimaea operculella, Pieris rapae, Pieris spp., Plutella xylostella, Prays spp., Scirpophaga spp., Sesamia spp., Sparganothis spp., Spodoptera spp., Synanthedon spp., Thaumetopoea spp., Tortrix spp., Trichoplusia ni and Yponomeuta spp.;*

(b) Coleoptera, for example, *Agriotes spp., Anthonomus spp., Atomaria linearis, Chaetocnema tibialis, Cosmopolites spp., Curculio spp., Dermestes spp., Diabrotica spp., Epilachna spp., Eremnus spp., Leptinotarsa decemlineata, Lissorhoptrus spp., Melolontha spp., Orycaephilus spp., Otiorhynchus spp., Phlyctinus spp., Popillia spp., Psylliodes spp.,*

Rhizopertha spp., Scarabeidae, Sitophilus spp., Sitotroga spp., Tenebrio spp., Tribolium spp. and Trogoderma spp.; (c) Orthoptera, for example, Blatta spp., Blattella spp., Gryllotalpa spp., Leucophaea maderae, Locusta spp., Periplaneta spp. and Schistocerca spp.; (d) Isoptera, for example, Reticulitermes spp.; (e) Psocoptera, for example, Liposcelis spp.; (f) Anoplura, for example, Haematopinus spp., Linognathus spp., Pediculus spp., Pemphigus spp. and Phylloxera spp.; (g) Mallophaga, for example, Damalinea spp. and Trichodectes spp.; (h) Thysanoptera, for example, Frankliniella spp., Hercinotnrips spp., Taeniothrips spp., Thrips palmi, Thrips tabaci and Scirtothrips aurantii; (i) Heteroptera, for example, Cimex spp., Distantiella theobroma, Dysdercus spp., Euchistus spp., Eurygaster spp., Leptocorisa spp., Nezara spp., Piesma spp., Rhodnius spp., Sahlbergella singularis, Scotinophara spp., Oncopeltus spp. Lygys spp. and Tniatoma spp.; (j) Homoptera, for example, Aleurothrixus floccosus, Aleyrodes brassicae, Aonidiella spp., Aphididae, Aphis spp., Aspidiotus spp., Bemisia tabaci, Ceroplaster spp., Chrysomphalus aonidium, Chrysomphalus dictyospermi, Coccus hesperidum, Empoasca spp., Eriosoma larigerum, Erythroneura spp., Gascardia spp., Laodelphax spp., Lecanium corni, Lepidosaphes spp., Macrosiphus spp., Myzus spp., Nephotettix spp., Nilaparvata spp., Paratoria spp., Pemphigus spp., Planococcus spp., Pseudaulacaspis spp., Pseudococcus spp., Psylla spp., Pulvinaria aethiopica, Quadraspidiotus spp., Rhopalosiphum spp., Saissetia spp., Scaphoideus spp., Schizaphis spp., Sitobion spp., Trialeurodes vaporariorum, Trioza erytreae and Unaspis citri; (k) Hymenoptera, for example, Acromyrmex, Atta spp., Cephus spp., Diprion spp., Diprionidae, Gilpinia polytoma, Hoplocampa spp., Lasius spp., Monomorium pharaonis, Neodiprion spp., Solenopsis spp. and Vespa spp.; (l) Diptera, for example, Aedes spp., Antherigona soccata, Bibio hortulanus, Calliphora erythrocephala, Ceratitis spp., Chrysomyia spp., Culex spp., Cuterebra spp., Dacus spp., Drosophila melanogaster, Fannia spp., Gastrophilus spp., Glossina spp., Hypoderma spp., Hyppobosca spp., Liriomyza spp., Lucilia spp., Melanagromyza spp., Musca spp., Oestrus spp., Orseolia spp., Oscinella frit, Pegomyia hyoscyami, Phorbia spp., Rhagoletis pomonella, Sciara spp., Stomoxys spp., Tabanus spp., Tannia spp. and Tipula spp.; (m) Siphonaptera, for example, Ceratophyllus spp. und Xenopsylla cheopis and (n) from the order Thysanura, for example, *Lepisma saccharina*. The active ingredients according to the invention may further be used for controlling crucifer flea beetles (*Phyllotreta* spp.), root maggots (*Delia* spp.), cabbage seedpod weevil (*Ceutorhynchus* spp.) and aphids in oil seed crops such as canola (rape), mustard seed, and hybrids thereof, and also rice and maize. In a particular embodiment, the insect may be a member of the *Spodoptera*, more particularly, *Spodoptera exigua, Myzus persicae, Plutella xylostella* or *Euschistus* sp.

The substances and compositions may also be used to modulate emergence in either a pre-emergent or post-emergent formulation of monocotyledonous, including sedges and

grasses, or dicotyledonous weeds. In a particular embodiment, the weeds may include, but not be limited to, *Chenopodium sp.* (e.g. *C. album*), *Abutilon* sp. (e.g. *A. theophrasti*), *Helianthus sp.* (e.g. *H. annuus*), *Ludwigia sp.* (e.g. *L. hexapetala*), *Ambrosia* sp. (e.g. *A. artemesifolia*), *Amaranthus* sp. (e.g., *A. retroflexus, A. palmeri*), *Convolvulus sp.* (e.g. *C. arvensis*), *Ipomoeae sp., Brassica* sp. (e.g. *B. kaber*), *Raphanus sp., Taraxacum sp.* (e.g. *T. officinale*), *Centaurea sp.* (e.g. *C. solstitalis*), *Conyza sp.* (e.g. *C. bonariensis*), *Cirsium* sp. (e.g. *C. arvense*), *Lepidium* sp., *Gallium sp., Solanum sp.* (e.g. *S. nigrum*), *Malva sp.* (e.g. *M. neglecta*), *Cyperus sp.* (e.g. *C. rotundus*), *Oxalis sp., Euphorbia sp., Trifolium sp., Medicago sp., Hydrilla sp., Azolla sp., Digitaria sp.* (e.g. *D. sanguinalis*), *Setaria* sp. (e.g. *S. lutescens*), *Cynodon dactylon, Bromus* sp. (e.g., *B. tectorum*), *Poa* sp. (e.g. *P. annua, P. pratensis*), *Lollium sp.* (e.g. *L. perenne*), *Sorghum* sp. (e.g. *S. halepense*), *Arundo donax, Festuca sp.* (e.g. *F. arundinaceae*), *Echinochloa sp.* (e.g., *E. crus-galli, E. phyllopogon*).

The *Burkholderia* strain, compounds and compositions set forth above may also be used as a fungicide. The targeted fungus may be a *Fusarium* sp., *Botrytis* sp., *Monilinia* sp., *Colletotrichum sp*, *Verticillium sp.*; *Microphomina* sp., *Phytophtora sp*, *Mucor* sp., *Podosphaera* sp., *Rhizoctonia sp., Peronospora sp., Geotrichum sp., Phoma, and Penicillium*. In another most particular embodiment, the bacteria are *Xanthomonas*.

The substance or compositions can be used to control, reduce and or eliminate the growth and proliferation of marine and non-marine micro and macro algae including but not limited to unicellular, multicellular and diatom, red-, green- and bluegreen- algae such as *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Rhizoclonium* sp., *Cladophoera* sp., *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Hydrodictyon* sp., *Chara* sp, *Microcystis* and *Didymo* sp., *Chlamydomonas sp., Scenedesmus sp., Oscillatoria sp., Volvox sp., Navicula sp, Oedogonium sp., Spirogyra sp., Batrichospermum sp., Rhodymenia sp., Callithamnion sp.,Undaria sp.,* through algaecide and algaestatic activity.

The active ingredient(s) and compositions set forth above may be applied to locations containing algae. These include but are not limited to a body of water such as a pond, lake, stream, river, aquarium, water treatment facility, power plant or a solid surface, such as plastic, concrete, wood, fiberglass, pipes made of iron and polyvinyl choride, surfaces covered wih coating materials and/or paints.

As noted above, the active ingredient(s) and compositions set forth above may be applied to locations containing arachnids, such as mites, including but not limited to, *Panonychus sp.* such as *Panonychus citri* (citrus red mite), and *Panonychus ulmi* (red spider mite), *Tetranychus sp.* such as *Tetranychus kanzawi* (Kanzawa spider mite), *Tetranychus urticae* (2 spotted spider mite), *Tetranychus pacificus* (Pacific spider mite), *Tetranychus*

turkestanii (Strawberry mite) and *Tetranychus cinnabarinus* (Carmine spider mite), *Oligonychus sp.* such as *Oligonychus panicae* (avacado brown mite), *Oligonychus perseae* (persea mite), *Oligonychus pratensis* (Banks grass mite) and *Oligonychus coffeae*, *Aculus sp.* such as *Aculus cornatus* (Peach silver mite), *Aculus fockeni* (plum rust mite) and *Aculus lycopersici* (tomato russet mite), *Eotetranychus sp.* such as *Eotetranychus wilametti, Eotetranychus yumensis* (yuma spider mite) and *Eotetranychus sexmaculatis* (6-spotted mite), *Bryobia rubrioculus* (brown mite), *Epitrimerus pyri* (pear rust mite), *Phytoptus pyri* (Pear leaf blister mite), *Acalitis essigi* (red berry mite), *Polyphagotarsonemus latus* (Broad mite), *Eriophyes sheldoni* (citrus bud mite), *Brevipalpus lewisi* (citrus flat mite), *Phylocoptruta oleivora* (citrus rust mite), *Petrobia lateens* (Brown wheat mite), *Oxyenus maxwelli* (olive mite), *Rhizoglyphus spp., Tyrophagus spp., Diptacus gigantorhyncus* (bigheaded plum mite) and *Penthaleaa major* (winter grain mite), Avocado red mite, Flat mite, black and red Mango spider mite, Papaya leaf edgeroller mite, Texas citrus mite, European red mite, Grape erineum mite (blister mite), Pacific spider mite, Willamette spider mitePink citrus rust mite.

Such locations may include but are not limited to crops that are infested with such mites or other arachnids (e.g., aphenids).

The invention will now be described in greater detail by reference to the following non-limiting examples.

EXAMPLES

The compositions and methods set forth above will be further illustrated in the following, non-limiting Examples. The examples are illustrative of various embodiments only and do not limit the claimed invention regarding the materials, conditions, weight ratios, process parameters and the like recited herein.

1. Example 1. Isolation and identification of the microbe

1.1 Isolation of the microorganism

The microbe is isolated using established techniques know to the art from a soil sample collected under an evergreen tree at the Rinnoji Temple, Nikko, Japan. The isolation is done using potato dextrose agar (PDA) using a procedure described in detail by Lorch et al. , 1995. In this procedure, the soil sample is first diluted in sterile water, after which it is plated in a solid agar medium such as potato dextrose agar (PDA). The plates are grown at 25°C for five days, after which individual microbial colonies are isolated into separate PDA plates. The isolated bacterium is gram negative, and it forms round, opaque cream-colored colonies that change to pink and pinkish-brown in color and mucoid or slimy over time.

1.2. Identification on the microorganism

The microbe is identified based on gene sequencing using universal bacterial primers to amplify the 16S rRNA region. The following protocol is used: *Burkholderia sp.* A396 is cultured on potato-dextrose agar plates. Growth from a 24 hour-old plate is scraped with a sterile loop and re-suspended in DNA extraction buffer. DNA is extracted using the MoBio Ultra Clean Microbial DNA extraction kit. DNA extract is checked for quality/quantity by running 5μl on a 1% agarose gel.

PCR reactions are set up as follows: 2 μl DNA extract, 5 μl PCR buffer, 1 μl dNTPs (10 mM each), 1.25 μl forward primer (27F; (SEQ ID NO:1), 1.25 μl reverse primer (907R; (SEQ ID NO:2)) and 0.25 μl Taq enzyme. The reaction volume is made up to 50 μl using sterile nuclease-free water. The PCR reaction includes an initial denaturation step at 95°C for 10 minutes, followed by 30 cycles of 94°C/30 sec, 57°C/20 sec, 72°C/30 sec, and a final extension step at 72°C for 10 minutes.

The product's approximate concentration and size is calculated by running a 5 μl volume on a 1% agarose gel and comparing the product band to a mass ladder.

Excess primers, dNTPs and enzyme are removed from the PCR product with the MoBio PCR clean up kit. The cleaned PCR product as directly sequenced using primers 27F (same as above), 530F (SEQ ID NO:3)), 1114F (SEQ ID NO:4)) and 1525R (SEQ ID NO:5)), 1100R (SEQ ID NO:6)), 519R (SEQ ID NO:7).

The 16S rRNA gene sequence of strain A396 is compared with the available 16S rRNA gene sequences of representatives of the β-proteobacteria using BLAST. Strain A395 A396 is closely related to members of the *Burkholderia cepacia* complex, with 99% or higher similarity to several isolates of *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia vietnamensis*, and *Burkholderia cepacia*. A BLAST search excluding the *B. cepacia* complex, showed 98% similarity to *B. plantarii, B. gladioli* and *Burkholderia sp.* isolates.

A distance tree of results using the neighbor joining method, showed that A396 is related to *Burkholderia multivorans* and other *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Burkholderia plantarii* and *Burkholderia glumae* grouped in a separate branch of the tree.

The isolated *Burkholderia* strain was found to contain the following sequences: Forward sequence, DNA sequence with 27F primer, 815 nucleotides (SEQ ID NO:8); Reverse sequence, 1453 bp, using primers 1525R, 1100R, 519R (SEQ ID NO:9); Reverse sequence 824 bp using primer 907R (SEQ ID NO: 10); Forward sequence 1152 bp using primer 530F (SEQ ID NO:11); Forward sequence 1067 bp using 1114F primer (SEQ ID NO:12); Reverse sequence

1223 bp using 1525R primer (SEQ NO:13); Reverse sequence 1216 bp using 1100R primer (SEQ ID NO:14); Reverse sequence 1194 bp using 519R primer (SEQ ID NO:15)

1.3. Proof that Burkholderia A396 does not belong to Burkholderia cepacia complex

1.3.1 Molecular Biology work using specific PCR primers

In order to confirm the identification of *Burkholderia A396* as *Burkholderia multivorans*, additional sequencing of housekeeping genes is performed. *Burkholderia multivorans* is a known member of the *Burkholderia cepacia* complex. Efforts are focused on PCR of recA genes, as described by Mahenthiralingam et al., 2000. The following primers are used: (a) BCR1 and BCR2 set forth in Mahenthiralingam et al., 2000 to confirm *B. cepacia* complex match and (b) BCRBM1 and BCRBM2 set forth Mahenthiralingam et al, 2000 to confirm *B. multivorans* match. A product-yielding PCR reaction for the first primer set would confirm that the microbe belongs to the *B. cepacia* complex. A product-yielding PCR reaction for the second primer set would confirm that the microbe is indeed *B. multivorans*.

No PCR product is obtained for either pair of primers. The performance of the PCR reaction and primers is tested using *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 (positive control) and *Pseudomonas fluorescens* (negative control). Strong bands are observed both for *B. multivorans* using both sets of primers. No bands are observed for *Pseudomonas fluorescens*. The results indicate that A396 is a Burkholderia, but not a member of the *B. cepacia* complex, and not *Burkholderia multivorans*. This is also demonstrated in a comparative culture experiment in which both A396 and a type culture of *B. multivorans* are grown side-by-side in a shake culture, and the growth is monitored daily using optical density measurements at 600 nm. Under the set conditions, species A396 grew much faster than the *B. multivorans* type strain (Figure 1).

1.3.2 DNA-DNA Hybridization

In order to confirm that isolate A396 is a new species of *Burkholderia*, a DNA-DNA hybridization experiment with *Burkholderia multivorans* (the closest 16SrRNA sequence match) is conducted. Biomass for both A396 and *B. multivorans* is produced in ISP2 broth, grown over 48 hours at 200 rpm/25°C in Fernbach flasks. The biomass is aseptically harvested by centrifugation. The broth is decanted and the cell pellet is resuspended in a 1:1 solution of water: isopropanol. DNA-DNA hybridization experiments are performed by the DSMZ, the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures in Germany. DNA is isolated using a French pressure cell (Thermo Spectronic) and is purified by chromatography on hydroxyapatite as described by Cashion et al., 1977. DNA-DNA hybridization is carried out as described by

De Ley et al., 1970 under consideration of the modifications described by Huss et al., 1983 using a model Cary 100 Bio UV/VIS-spectrophotometer equipped with a Peltier thermostatted 6x6 multicell changer and a temperature controller with *in-situ* temperature probe (Varian). DSMZ reported % DNA-DNA similarly between A396 and *Burkholderia multivorans* of 37.4%. The results indicate that *Burkholderia sp* strain A396 does not belong to the species *Burkholderia multivorans* when the recommendations of a threshold value of 70% DNA-DNA similarity for the definition of bacterial species by the ad hoc committee (Wayne et al., 1987) are considered.

1.4. Biochemical profile using Biolog GN2 plates

For the carbon source utilization profile, A396 is grown overnight on Potato Dextrose Agar (PDA). The culture is transferred to BUG agar to produce an adequate culture for Biolog experiments as recommended by the manufacturer (Biolog, Hayward, CA).

The biochemical profile of the microorganism is determined by inoculating onto a Biolog GN2 plate and reading the plate after a 24-hour incubation using the MicroLog 4-automated microstation system. Identification of the unknown bacteria is attempted by comparing its carbon utilization pattern with the Microlog 4 Gram negative database.

No clear definitive matches are found to the Biolog profile. The closest matches all had less than 35% similarity with A396: *Pseudomonas spinosa (Burkholderia), Burkholderia cepacia, and Burkholderia pseudomallei*. The results are shown in Table 1.

Table 1. Biochemical Profile of A396

Substrate	Result	Substrate	Result
Cyclodextrin	-	L-arabinose	-
Dextrin	-	D-arabitol	-
Glycogen	-	D-cellobiose	-
Tween 40	+	Erythritol	-
Tween 80	+	D-Fructose	-
N-acetyl-D-Galactoseamine	-	L-Fucose	-
N-acetyl-D-glucosamine	-	D-Galactose	+/-
Adonitol	-	Gentibiose	-
Succinic Acid Mon-methyl ester	-	D-Glucose	+
Acetic acid	-	m-Inositol	-
Cis-aconitic acid	-	D-Lactose	-
Citric acid	-	Lactulose	-
Formic acid	+	Maltose	-
D-Galactonic Acid Lactone	-	D-Mannitol	-
D-Galacturonic Acid	-	D-Mannose	-
D-Gluconic acid	-	D-Melibiose	-
D-Glucosaminic acid	-	β-methyl-D-glucoside	-
D-Glucuronic Acid	-	D-Psicose	-
α-hydroxyburytic acid	-	D-Raffinose	-
β-hydroxybutyric acid	+	L-Rhamonose	-
γ-hydroxybutyric acid	-	D-Sorbitol	-
p-hydroxyphenylacetic acid	-	Sucrose	-
Itaconic acid	-	D-Trehalose	+
α-keto butyric acid	-	Turanose	-
α-keto glutaric acid	-	Xylitol	-
α-ket valeric acid	-	Pyruvic Acid Methyl esther	-
D,L-Lactic acid	-	Uridine	-
Malonic acid	-	Thymidine	-
Propionic acid	+	Phenyethyl-amine	-
Quinic acid	-	Putrescine	-
D-Saccharic acid	-	2-aminoethanol	-
Sebacic acid	-	2,3-Butanediol	-
Succinic Acid	+	Glycerol	+/-
Bromosuccinic acid	-	D,L-a-glycerol phosphate	+/-
Succinamic acid	-	α-D-Glucose-1-phosphate	-
Glucuronamide	-	D-glucose-6-phosphate	+
L-alaninamide	+	γ-amino butyric acid	+
D-Alanine	-	Urocanic acid	-
L-alanine	+	Inosine	-
L-alanyl-glycine	-	L-phenylalanine	+
L-asparagine	+	L-proline	-
L-aspartic acid	+/-	L-pyroglutamic acid	-
L-glutamic acid	+	D-serine	-
Glycyl-L-Aspartic acid	-	L-serine	-
Glycyl-L-glutamic acid	-	L-threonine	-
L-histidine	-	D,L-carnitine	-
Hydroxy-L-proline	+	L-ornithine	-
L-leucine	-		

1.5. Fatty acid composition

After incubation for 24 hours at 28°C, a loopful of well-grown cells are harvested and fatty acid methyl esters are prepared, separated and identified using the Sherlock Microbial Identification System (MIDI) as described (see Vandamme et al., 1992). The predominant fatty acids present in the *Burkholderia* A396 are as follows: 16:0 (24.4%), cyclo 17:0 (7.1%), 16:0 3-OH (4.4%), 14:0 (3.6%), 19:0 ω8*c* (2.6%) cyclo, 18:0 (1.0%). Summed feature 8 (comprising 18:1 ω7*c*) and summed feature 3 (comprising of 16:1 ω7c and 16:1 ω6*c*) corresponded to 26.2% and 20.2 % of the total peak area, respectively. Summed feature 2 comprising 12:0 ALDE, 16:1 iso I, and 14:0 3-OH) corresponded to 5.8% of the total peak area while summed feature 5 comprising 18:0 ANTE and 18:2 ω6,9c corresponded to 0.4%. Other fatty acids detected in A396 in minor quantities included: 13:1 at 12-13 (0.2%), 14:1 ω5c (0.2%), 15:0 3-OH (0.13%), 17:1 ω7c (0.14%), 17:0 (0.15%), 16:0 iso 3-OH (0.2%), 16:0 2-OH (0.8%), 18:1 ω7c 11-methyl (0.15%), and 18:1 2-OH (0.4%).

A comparison of the fatty acid composition of A396 with those of known microbial strains in the MIDI database suggested that the fatty acids in the novel strain A396 were most similar with those of *Burkholderia cenocepacia.*

1.6 Resistance to Antibiotics

Antibiotic susceptibility of *Burkholderia A396* is tested using antibiotic disks on Muller-Hinton medium as described in PML Microbiological's technical data sheet #535. Results obtained after 72-hour incubation at 25°C are presented in Table 2 below.

Table 2: Susceptibility of MBI-206 to various antibiotics. +++ very susceptible, ++ susceptible, - resistant

	Concentration (μg)	Susceptible
Tetracycline	30	-
Kanamycin	30	+++
Erythromycin	15	-
Streptomycin	10	-
Penicillin	10	-
Ampicillin	10	-
Oxytetracycline	30	-
Chloramphenicol	30	++
Ciprofloxacin	5	++
Gentamicin	10	-
Piperacillin	100	+++
Cefuroxime	30	-
Imipenem	10	+++
Sulphamethoxazole-Trimethoprim	23.75/ 25	++

The results indicate that the antibiotic susceptibility spectrum of *Burkholderia A396* is quite different from pathogenic *B. cepacia* complex strains. *Burkholderia A396* is susceptible to kanamycin, chloramphenicol, ciprofloxacin, piperacillin, imipenem, and a combination of sulphamethoxazole and trimethoprim. As a comparison, Zhou et al., 2007 tested the susceptibility of 2,621 different strains in *B. cepacia complex* isolated from cystic fibrosis patients, and found that only 7% and 5% of all strains were susceptible to imipenem or ciprofloxacin, respectively. They also found 85% of all strains to be resistant to chloramphenicol (15% susceptible), and 95% to be resistant (5% susceptible) to the combination of sulphamethoxazole and trimethoprim. Results of Zhou et al., 2007 are similar to those of Pitt et al., 1996 who determined antibiotic resistance among 366 *B. cepacia* isolates and reported that most of them are resistant to ciprofloxacin, cefuroxime, imipenem, chloramphenicol, tetracycline, and sulphametoxacole.

2. Example 2: Burkholderia formulation and isolation of Fractions from Formulated Product

The following procedure is used for the purification of compounds extracted from a formulated product of MBI-206 containing a whole cell broth of a culture of *Burkholderia sp.*:

The culture broth derived from the 10-L fermentation *Burkholderia* (A396) in Hy soy growth medium and formulated using methyl 0.1 % and propyl paraben, 0.1 % hexanol 0.67 % and Glycosperse 0-20, 0.67% is extracted with Amberlite XAD-7 resin (Asolkar et al., "Weakly cytotoxic polyketides from a marine-derived Actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085." J. Nat. Prod. 69:1756-1759. 2006) by shaking the cell suspension with resin at 225 rpm for two hours at room temperature. The resin and cell mass are collected by filtration through cheesecloth and washed with DI water to remove salts. The resin, cell mass, and cheesecloth are then soaked for 2 h in acetone after which the acetone is filtered and dried under vacuum using rotary evaporator to give the crude extract (MBI-206-FP-CE). The crude extract is then fractionated by using reversed-phase C18 vacuum liquid chromatography (H_2O/CH_3OH; gradient 80:20 to 0:100%) to give 10 fractions (see Figure 1 for schematic). These fractions are then concentrated to dryness using rotary evaporator and the resulting dry residues are screened for biological activity using a whole plant herbicidal assay. The active fractions, fractions 3, 4, 5 and 6 and indicated as MBI-206-FP-3, MBI-206-FP-4, MBI-206-FP-5, and MBI-206-FP-6 respectively are then subjected to repeatedly to reversed phase HPLC separation (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) to give pure compounds, which are then screened in above-mentioned bioassays to locate/identify the active compounds (see Figure 2).

2.1 Analysis of Formulation fractions

These fractions are analyzed on a Thermo high performance liquid chromatography (HPLC) instrument equipped with Finnigan Surveyor PDA plus detector, autosampler plus, MS pump and a 4.6 mm x 100 mm Luna C18 5 μm column (Phenomenex). The solvent system consisted of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The mobile phase begins at 10% solvent B and is linearly increased to 100% solvent B over 20 min and then kept for 4 min, and finally returned to 10% solvent B over 3 min and kept for 3 min. The flow rate is 0.5 mL/min. The injection volume is 10 μL and the samples are kept at room temperature in an auto sampler.

To discover the identity of the compound, additional spectroscopic data such as LC/MS and UV are recorded. Compound corresponding to fraction 5, with a retention time of 17.45 minutes is not found in any of the starting materials, which indicates that the compound is a product of a chemical reaction between natural products in the microbial fermentation broth and one or more of the compounds found in the formulation agents. Specifically, this fraction was

analyzed using ESI-LCMS on a Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus electrospray (ESI) instrument using both positive and negative ionization modes in a full scan mode (m/z 100-1500 Da) on a LCQ DECA XP^{plus} Mass Spectrometer (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Mass spectroscopy analysis is performed under the following conditions: The flow rate of the nitrogen gas was fixed at 30 and 15 arb for the sheath and aux/sweep gas flow rate, respectively. Electrospray ionization was performed with a spray voltage set at 5000 V and a capillary voltage at 35.0 V. The capillary temperature was set at 400°C. The data was analyzed on Xcalibur software. The additional new compounds found in fraction 5 were found to have a molecular weight (MW) of 194 (RT = 14.74 min) and 222 (RT = 17.43 min).

2.2 Bioassay

Healthy radish plants with two to three true leaves were selected for testing. The radish plants are 13 days old at treatment. The plants are sorted so that all treatments are equivalent in foliage surface area and plant height. The pots are labeled with treatment number and repetition number. Three repetitions per treatment are tested.

Ten fractions of MBI-206 formulated product are tested. The fractions are at a concentration of 10 mg/ml. The crude extracts of the formulated product and broth are also tested. An untreated control (treated with deionized water) and a positive control (RoundUp Super Concentrate at a rate of 2.5 fluid ounces per gallon) are included in the test.

The following treatments were tested as shown in Table 3:

Table 3: Test description

Treatment	Sample ID	Description
1	MBI-206-FP-F1	4% ethanol/water (0.2% Glycosperse)
2	MBI-206-FP-F2	4% ethanol/water (0.2% Glycosperse)
3	MBI-206-FP-F3	4% ethanol/water (0.2% Glycosperse)
4	MBI-206-FP-F4	4% ethanol/water (0.2% Glycosperse)
5	MBI-206-FP-F5	4% ethanol/water (0.2% Glycosperse)
6	MBI-206-FP-F6	4% ethanol/water (0.2% Glycosperse)
7	MBI-206-FP-F7	4% ethanol/water (0.2% Glycosperse)
8	MBI-206-FP-F8	4% ethanol/water (0.2% Glycosperse)
9	MBI-206-FP-F9	4% ethanol/water (0.2% Glycosperse)
10	MBI-206-FP-F10	4% ethanol/water (0.2% Glycosperse)
11	MBI-206-FP-CE	4% ethanol/water (0.2% Glycosperse)
12	MBI-206-CE (broth)	4% ethanol/water (0.2% Glycosperse)
13	UTC	UTC (DI water)
14	Positive Control	Pos. Control (RoundUp @ 2.5 fl oz/gal (AI: glyphosate @ 50.2%))

All products and treatments are well shaken prior to application. Treatments are applied using a nozzle from a 2-ounce spray bottle. Separate spray nozzles were used for each treatment. The plant foliage is sprayed evenly and with a moderate volume (i.e. neither a light misting nor a heavy application that resulted in runoff). Two milliliters of each treatment are sprayed simultaneously over the three repetitions of each treatment so that each plant is treated with approximately 0.67 milliliters of treatment solution.

The plants are allowed to air dry and are then randomized in holding trays. Each tray is labeled with the experiment name and treatment date and placed on the laboratory greenhouse shelves. The laboratory greenhouse maintains a temperature of 70-80°F and a relative humidity of 30-40%. Throughout the bioassay, plants are watered from below by filling the holding trays with an appropriate amount of water so that plant foliage remained dry.

Results are taken at 3, 8, and 14 days after treatment. Symptoms included foliage burning and plant stunting. The following rating scale, shown in Table 4 is used to quantify efficacy. Ratings are determined by observing the following factors relative to the plants of the untreated control: overall plant health, average plant height, and foliage health. Symptoms of affected plants may include discolored/spotted/burnt/bleached foliage, warped/twisted/curled leaves, side branching (due to damaged apical meristem), plant dieback, or death.

Table 4: Rating Scale

0	– 0% control symptoms
0.5	– ≤ 5% control symptoms
1	– 10% control symptoms
2	– 25% control symptoms
3	– 50% control symptoms
4	– 75% control symptoms
5	– 100% control symptoms

The mean of three readings is shown in Figure 2. In a whole plant herbicide test, fractions 4 and 5 show good herbicidal activity (see Figure 2).

2.3 Isolation of Pesticidal Compounds from Formulation

This fraction was further purified using a HPLC C-18 column (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), water:acetonitrile gradient solvent system (0-10 min; 80 % aqueous CH_3CN, 10-25 min; 80 - 65 % aqueous CH_3CN, 25-50 min; 65 - 50 % aqueous CH_3CN, 50-60 min; 50 - 70 % aqueous CH_3CN, 60-80 min; 70 – 0 % aqueous CH_3CN, 80-85 min; 0 – 20 % aqueous CH_3CN) at 8 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm, to give butyl paraben, retention time 59.15 min (MBI206-FP-F5H32) and hexyl paraben, retention time 74.59 min (MBI206-FP-F5H40) respectively.

2.3.1 NMR Spectroscopy Analysis of Compounds

NMR spectra were measured on a Bruker 600 MHz gradient field spectrometer. The reference is set on the internal standard tetramethylsilane (TMS, 0.00 ppm).

2.3.1.1 *Structure elucidation of hexyl paraben (MBI206-FP-F5H40)*

The active compound was isolated as a colorless solid, with UV absorption at 248 nm. The (-) ESIMS showed molecular ion at 221 (M-H) corresponding to the molecular weight of 222. The compound exhibited ^{1}H NMR δ singals at 7.90, 6.85, 4.28, 1.76, 1.46, 1.38, 1.37, 0.94 and has ^{13}C NMR values of 166.84, 162.12, 131.34 (2C), 121.04, 114.83 (2C), 64.32, 31.25, 28.43, 25.45, 22.18. 12.93. The molecular formula of $C_{13}H_{18}O_3$ (5 degrees of unsaturation), was assigned by combination of NMR and ESI mass spectrometry data. The ^{1}H NMR spectrum exhibited signals for an A_2B_2-type aromatic signals at δ 7.90, 2H d, J = 8.5 Hz, and 6.85, 2H d, J = 8.5 Hz. Furthermore, the ^{1}H NMR spectrum revealed the presence of $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$ group, at δ 4,28, 2H, t, J = 7.3 Hz; 1,76, 2H, m; 1.46, 2H, m; 1.38, 2H. m; 1.37, 2H, m, and 0.94, 3H, t, J = 7.3 Hz. From an analysis of the foregoing spectral data, the structure of the aromatic polyketide was established as hexyl paraben, which was confirmed by detail analysis of the COSY, HMQC and HMBC experiments. A literature search revealed that this compound has been reported as synthetic compound.

2.3.1.2 Structure elucidation of butyl paraben (MBI206-FP-F5H32)

This compound was obtained as a colorless solid with UV max at 248 nm. The LCMS analysis in the negative mode showed molecular ion at *m/z* 193 corresponding to the molecular formula 194. By comparison of the UV, MS and NMR data with that of hexyl paraben with MW 222, this compound was found to be the analogue of hexyl paraben. The only difference between them was only in the side chain. Thus, the structure of butyl paraben was assigned to this compound with MW 194. A search in the literature suggested that this compound is also known as a synthetic compound.

2.3.2 Herbicidal Activity

The pure compounds (butyl paraben [MBI206-FP-F5H32] and hexyl paraben [MBI206-FP-F5H40]) obtained from fraction 5 were tested at a concentration of 10 mg/ml. An untreated control (treated with deionized water), the formulation blank (at 3% v/v & 10 % v/v), and a positive control (RoundUp Super Concentrate at a rate of 2.5 fluid ounces per gallon) are included in the test.

The following treatments were tested as shown in Table 5:

Table 5: Treatment Regimen

Test description

Treatment	Sample ID	Description	Vol (mL) of Sample
1	UTC	UTC (DI water)	2
2	Butyl paraben (MBI206-FP-F5H32)	4% ethanol/water (0.2% Glycosperse)	2
3	Hexyl paraben (MBI206-FP-F5H40)	4% ethanol/water (0.2% Glycosperse)	2
4	Blank	Formulation Blank @ 3% v/v	2
5	Blank	Formulation Blank @ 10% v/v	2
6	Positive Control	Positive Control (RoundUp @ 2.5 fl oz/gal (AI: glyphosate @ 50.2%))	2

Results obtained are set forth in Table 6.

Table 6: Bioassay Results

	Day-1 Reading					**Day-7 Reading**				
	Replicates			**Control**		**Replicate**			**Control**	
Treatment	**1**	**2**	**3**	**AVG**	**STD DEV**	**1**	**2**	**3**	**AVG**	**STD DEV**
1	0	0	0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0.0
2	25	5	25	18.3	11.5	25	10	37.5	24.2	13.8
3	75	75	75	75.0	0.0	87.5	87.5	87.5	87.5	0.0
4	0	0	0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0.0
5	0	0	0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0.0
6	0	0	0	0.0	0.0	87.5	87.5	75	83.3	7.2

Based on the data presented in the table above, hexyl paraben was found to be the most potent herbicidal compound.

2.3.3 Insecticidal Acitivity

The insecticidal activity of butyl paraben (MBI206-FP-F5H32) and hexyl paraben (MBI206-FP-F5H40) were tested in a laboratory assay using a 96-well diet overlay assay with 1st instar Beet Armyworm (*Spodoptera exigua*) larvae using microtiter plates with 200 ul of solid, artificial Beet Armyworm diet in each well. One hundred (100) microliters of each test sample (containing 40 ug of sample) is pipetted on the top of the diet (one sample in each well), and the sample is let dry under flowing air until the surface is dry. Each sample was tested in six replicates, and water and a commercial Dipel product are used as negative and positive controls, respectively. One first instar larvae of the test insect (Beet armyworm – *Spodoptera exiqua)* was placed in each well, and the plate was covered with plastic cover with airholes. The plates

with insects were incubated at 26 ºC for 6 days with daily mortality evaluations. Based on the results presented in Table 7, hexyl paraben and butyl paraben resulted in 71% and 9% mortality, respectively.

Table 7. Insecticidal Bioassay data for butyl paraben (MBI206-FP-F5H32) and hexyl paraben (MBI206-FP-F5H40) against 1st instar Beet Army Worm (*Spodoptera exigua*).

Sample information	Day 3	Day 4
Butyl paraben MBI206-FP-F5H32) @ 40 µg/well	8.93	8.9286
Hexyl parben (MBI206-FP-F5H40) @ 40 µg/well	50.00	70.833
2% Dipel	0.00	0
4% Dipel	25.00	25
8% Dipel	0.00	25
16% Dipel	0.00	0
32% Dipel	0.00	0
64% Dipel	25.00	100
40% EtOH	14.29	14.286
Dipel	33.33	100
H_20	0.00	0

2.3.4 Nematicidal Acitivity; In vitro testing of butyl paraben (MBI206-FP-F5H32) and hexyl paraben (MBI206-FP-F5H40):

The pure sample of butyl paraben and hexyl paraben was used in an *in vitro* 96-well plastic cell-culture plate bioassay. 15-20 nematodes in a 50 µl water solution were exposed to 3 µl of a 20 mg/ml peak concentrate for a 24 hour period at 25°C. Once the incubation period was completed, results were recorded based on a visual grading of immobility of the juvenile nematodes (J2's) in each well treated with compounds; each treatment was tested in replicate of 4 wells. Results are shown in Table 8, which shows the results of two different 96-well plate extract bioassays of compounds. Three controls are included in each trial; 1 positive (1% Avid) & 2 negative (DMSO & water). Trials (T1) was carried out using *M. incognita* nematodes and and trail (T2) was carried out using M. hapla nematodes, the samples were dissolved in 100% DMSO. The hexyl paraben (MBI206-FP-F5H40) showed the excellent control with the immobility of 93.75% against M. incognita as compared to butyl paraben with 81.25% immobility.

Table 8: Effect of hexyl paraben and butyl paraben on *M. incognita* and *M. hapla.*

Sample information	% immobility (trial # T1)	% immobility (trial # T2)	Mean % immobility
MBI206-FP-F5H32 (butyl paraben)	75	87.5	81.25
MBI206-FP-F5H40 (hexyl paraben)	87.5	100	93.75
Avid (1%)	75	75	75
DMSO	6.25	0	3.12
Water	0	0	0

2.3.5 Study of formation of Parabens during formulation of the product

In order to understand the formation of these parabens, the effect of change in alcohol in the formulation was taken into consideration. The different carbon chain alcohols were used in the formulation and the formation of the new parabens were monitored using LCMS.

Four separate formulation experiments were performed using butanol, hexanol, octanol and cetyl alcohol and all other ingradients were kept same. The formulation products were extracted over the period of 2 days and 3 weeks. The crude extract obtained from these formulations were analysed by LCMS. The corresponding parabens formed for all alcohols except for cetyl alcohol. The yield of the parabens was found to be the highest for butyl paraben, followed by hexyl paraben and then octyl paraben for the one day old formulation product. The analysis result even after 3 weeks remain the same order ie, butyl paraben > hexyl paraben > octyl paraben. Thus, the rate of formation of these parabens such as butyl paraben, hexyl paraben & octyl paraben was found to depend on the carbon chain (number of carbon) of the solvent (alcohol) of the corresponding alcohol used in the formulation (butanol (C4) > hexanol (C6) > octanol (C8) etc). The formation of cetyl paraben was not detected till 3 weeks. The yields of these parabens were found to increase over the time.

Another set of experiments were carried out to understand the role of whole cell broth (WCB) in the formation of the new paraben analogues. In 4 different expt. with were carried out with following changes in the formulation-

- Expt-1: Propyl paraben (No methyl paraben) + WCB + other ingredients
- Expt-2: Methyl paraben (No Propyl paraben) + WCB + other ingredients
- Expt-3: No parabens (both) + WCB + other ingredients.
- Expt-4: Methyl Paraben + Propyl paraben + other ingredients + No WCB.

The above formulations were extracted separately and the crude extract obtained were then analysed using LCMS. The formation of the hexyl paraben was observed only in the first two experiments. Thus, these experiments suggested that WCB plays a very important role in the formation of these parabens.

3. **Example 3. Isolation of Templazole A and B**

Methods and Materials

The following procedure is used for the purification of Templazole A and B extracted from cell culture of *Burkholderia sp* (see Figure 3):

The culture broth derived from the 10-L fermentation *Burkholderia* (A396) in Hy soy growth medium is extracted with Amberlite XAD-7 resin (Asolkar et al., 2006) by shaking the cell suspension with resin at 225 rpm for two hours at room temperature. The resin and cell

mass are collected by filtration through cheesecloth and washed with DI water to remove salts. The resin, cell mass, and cheesecloth are then soaked for 2 h in acetone after which the acetone is filtered and dried under vacuum using rotary evaporator to give the crude extract. The crude extract is then fractionated by using reversed-phase C18 vacuum liquid chromatography (H_2O/CH_3OH; gradient 90:10 to 0:100%) to give 11 fractions. These fractions are then concentrated to dryness using rotary evaporator and the resulting dry residues are screened for biological activity using 96 well plate lettuce seeding assay. The active fractions are then subjected to reversed phase HPLC (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) to give pure compounds, which are then screened in above mentioned bioassays to locate/identify the active compounds. To confirm the identity of the compound, additional spectroscopic data such as LC/MS and NMR is recorded.

The active fraction **5** is purified further by using HPLC C-18 column (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), water:acetonitrile gradient solvent system (0-10 min; 80% aqueous CH_3CN, 10-25 min; 80 - 65% aqueous CH_3CN, 25-50 min; 65 - 50 % aqueous CH_3CN, 50-60 min; 50-70% CH_3CN, 60-80 min; 70–0% aqueous CH_3CN, 80-85 min; 0 – 20% aqueous CH_3CN) at 8 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm, to give templazole B, retention time 46.65 min. The other active fraction **7** is also purified using HPLC C-18 column (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), water:acetonitrile gradient solvent system (0-10 min; 80 % aqueous CH_3CN, 10-25 min; 80 - 60 % aqueous CH_3CN, 25-50 min; 60 - 40% aqueous CH_3CN, 50-60 min; 40% CH_3CN, 60-80 min; 40–0% aqueous CH_3CN, 80-85 min; 0-20 % aqueous CH_3CN) at 8 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm, to give templazole A, retention time 70.82 min.

Mass spectroscopy analysis of pure compounds is performed on a Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus electrospray (ESI) instrument using both positive and negative ionization modes in a full scan mode (m/z 100-1500 Da) on a LCQ DECA XP^{plus} Mass Spectrometer (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Thermo high performance liquid chromatography (HPLC) instrument equipped with Finnigan Surveyor PDA plus detector, autosampler plus, MS pump and a 4.6 mm x 100 mm Luna C18 5 µm column (Phenomenex). The solvent system consists of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The mobile phase begins at 10% solvent B and is linearly increased to 100% solvent B over 20 min and then kept for 4 min, and finally returned to 10% solvent B over 3 min and kept for 3 min. The flow rate is 0.5 mL/min. The injection volume was 10 µL and the samples are kept at room temperature in an auto sampler. The compounds are analyzed by LC-MS utilizing the LC and reversed phase chromatography. Mass spectroscopy analysis of the present compounds is performed under the following conditions: The flow rate of the nitrogen gas was fixed at 30 and 15 arb for the sheath

and aux/sweep gas flow rate, respectively. Electrospray ionization was performed with a spray voltage set at 5000 V and a capillary voltage at 35.0 V. The capillary temperature was set at 400°C. The data was analyzed on Xcalibur software. The active compound templazole A has a molecular mass of 298 and showed *m/z* ion at 297.34 in negative ionization mode. The LC-MS chromatogram for templazole B suggests a molecular mass of 258 and exhibited *m/z* ion at 257.74 in negative ionization mode.

^{1}H, ^{13}C and 2D NMR spectra were measured on a Bruker 500 MHz & 600 MHz gradient field spectrometer. The reference is set on the internal standard tetramethylsilane (TMS, 0.00 ppm).

For structure elucidation of templazole A, the purified compound with a molecular weight 298 is further analyzed using a 500 MHz NMR instrument, and has ^{1}H NMR δ values at 8.44, 8.74, 8.19, 7.47, 7.31, 3.98, 2.82, 2.33, 1.08 and has ^{13}C NMR values of δ 163.7, 161.2, 154.8, 136.1, 129.4, 125.4, 123.5, 123.3, 121.8, 121.5, 111.8, 104.7, 52.2, 37.3, 28.1, 22.7, 22.7. Templazole A has UV absorption bands at 226, 275, 327 nm, which suggested the presence of indole and oxazole rings. The molecular formula, $C_{17}H_{18}N_2O_3$, was determined by interpretation of ^{1}H, ^{13}C NMR and HRESI MS data *m/z* 299.1396 $(M+H)^+$ (Calcd for $C_{17}H_{19}N_2O_3$, 299.1397), which entails a high degree of unsaturation shown by 10 double bond equivalents. The ^{13}C NMR spectrum revealed signals for all 17 carbons, including two methyls, a methoxy, a methylene carbon, an aliphatic methine, an ester carbonyl, and eleven aromatic carbons. The presence of 3'-substituted indole was revealed from ^{1}H-^{1}H COSY and HMBC spectral data. The ^{1}H-^{1}H COSY and HMBC also indicated the presence of a carboxylic acid methyl ester group and a $-CH_2-CH-(CH_3)_2$ side chain. From the detailed analysis of ^{1}H-^{1}H COSY, ^{13}C, and HMBC data it was derived that the compound contained an oxazole nucleus. From the 2D analysis it was found that the iso-butyl side chain was attached at C-2 position, a carboxylic acid methyl ester at C-4 position and the indole unit at C-5 position to give templazole A.

The second herbicidally active compound, templazole B, with a molecular weight 258 is further analyzed using a 500 MHz NMR instrument, and has ^{1}H NMR δ values at 7.08, 7.06, 6.75, 3.75, 2.56, 2.15, 0.93, 0.93 and ^{13}C NMR values of δ 158.2, 156.3, 155.5, 132.6, 129.5, 129.5, 127.3, 121.8, 115.2, 115.2, 41.2, 35.3, 26.7, 21.5, 21.5. The molecular formula, is assigned as $C_{15}H_{18}N_2O_2$, which is determined by interpretation of ^{1}H, ^{13}C NMR and mass data. The ^{13}C NMR spectrum revealed signals for all 15 carbons, including two methyls, two methylene carbons, one aliphatic methine, one amide carbonyl, and nine aromatic carbons. The general nature of the structure was deduced from ^{1}H and ^{13}C NMR spectra that showed a *para*-substituted aromatic ring [δ 7.08 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.75 (2H, d, J = 8.8 Hz), and 132.7, 129.5,

115.2, 127.3, 115.2, 129.5]. The ^{1}H NMR spectrum of this structure together with the ^{1}H-^{1}H COSY and HSQC spectra, displayed characteristic signals for an isobutyl moiety [δ 0.93 (6H, d, J = 6.9 Hz), 2.15 (1H, sept., J = 6.9 Hz), 2.57 (2H, d, J = 6.9 Hz). In addition, an olefinic/aromatic proton at (δ 7.06, s), and a carbonyl carbon group (δ 158.9) were also found in the ^{1}H and ^{13}C NMR spectra. On inspection of the HMBC spectrum, the H-1' signal in the isobutyl moiety correlated with the olefinic carbon (C-2, δ 156.3), and the olefinic proton H-4 correlated with (C-5, δ 155.5; C-2, 156.3 & C-1'', 41.2). The methylene signal at δ 3.75 correlated with C-5, C-4 as well as the C-2'' of the para-substituted aromatic moiety. All these observed correlations suggested the connectivity among the isobutyl, and the para-substituted benzyl moieties for the skeleton of the structure as shown. In addition, the carboxamide group is assigned at the para position of the benzyl moiety based on the HMBC correlation from the aromatic proton at H-4''& H-6'' position. Thus, based on the above data, the structure was designated as templazole B.

4. Example 4. Isolation of FR901228

The whole cell broth from the fermentation of *Burkholderia sp.* in an undefined growth medium is extracted with Amberlite XAD-7 resin (Asolkar et al., 2006) by shaking the cell suspension with resin at 225 rpm for two hours at room temperature. The resin and cell mass are collected by filtration through cheesecloth and washed with DI water to remove salts. The resin, cell mass, and cheesecloth are then soaked for 2 h in acetone after which the acetone is filtered and dried under vacuum using rotary evaporator to give the crude extract. The crude extract is then fractionated by using reversed-phase C18 vacuum liquid chromatography (H_2O/CH_3OH; gradient 90:10 to 0:100%) to give 11 fractions. These fractions are then concentrated to dryness using rotary evaporator and the resulting dry residues are screened for biological activity using both insect bioassay as well as herbicidal bioassay. The active fractions are then subjected to reversed/normal phase HPLC (Spectra System P4000; Thermo Scientific) to give pure compounds, which are then screened in herbicidal, insecticidal and nematicidal bioassays described below to locate/identify the active compounds. To confirm the identity of the compound, additional spectroscopic data such as LC/MS and NMR is recorded.

Mass spectroscopy analysis of active peaks is performed on a Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus electrospray (ESI) instrument using both positive and negative ionization modes in a full scan mode (m/z 100-1500 Da) on a LCQ DECA XP^{plus} Mass Spectrometer (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Thermo high performance liquid chromatography (HPLC) instrument equipped with Finnigan Surveyor PDA plus detector, autosampler plus, MS pump and a 4.6 mm x 100 mm Luna C18 5 μm column (Phenomenex). The solvent system consists

of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The mobile phase begins at 10% solvent B and is linearly increased to 100% solvent B over 20 min and then kept for 4 min, and finally returned to 10% solvent B over 3 min and kept for 3 min. The flow rate is 0.5 mL/min. The injection volume is 10 μL and the samples are kept at room temperature in an auto sampler. The compounds are analyzed by LC-MS utilizing the LC and reversed phase chromatography. Mass spectroscopy analysis of the present compounds is performed under the following conditions: The flow rate of the nitrogen gas is fixed at 30 and 15 arb for the sheath and aux/sweep gas flow rate, respectively. Electrospray ionization is performed with a spray voltage set at 5000 V and a capillary voltage at 35.0 V. The capillary temperature is set at 400°C. The data is analyzed on Xcalibur software. Based on the LC-MS analysis, the active insecticidal compound from fraction **6** has a molecular mass of 540 in negative ionization mode.

For structure elucidation, the purified insecticidal compound from fraction **6** with molecular weight 540 is further analyzed using a 500 MHz NMR instrument, and has ^{1}H NMR values at 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; and has ^{13}C NMR values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51. The NMR data indicates that the compound contains amino, ester, carboxylic acid, aliphatic methyl, ethyl, methylene, oxymethylene, methine, oxymethine and sulfur groups. The detailed 1D and 2D NMR analysis confirms the structure for the compound as FR901228 as a known compound.

5. **Example 5. Isolation of Templamide A, B, FR901465 and FR901228**

Methods and Materials

The culture broth derived from the 10-L fermentation *Burkholderia* (A396) in Hy soy growth medium is extracted with Amberlite XAD-7 resin (Asolkar et al., 2006) by shaking the cell suspension with resin at 225 rpm for two hours at room temperature. The resin and cell mass are collected by filtration through cheesecloth and washed with DI water to remove salts. The resin, cell mass, and cheesecloth are then soaked for 2 h in acetone after which the acetone is filtered and dried under vacuum using rotary evaporator to give the crude extract. The crude extract is then fractionated by using reversed-phase C18 vacuum liquid chromatography (H_2O/CH_3OH; gradient 90:10 to 0:100%) to give 11 fractions. These fractions are then concentrated to dryness using rotary evaporator and the resulting dry residues are screened for biological activity using 96 well plate lettuce seeding (herbicidal) and early 3rd instar Beet Armyworm (insecticidal) assay. The active fractions are then subjected to repeatedly to reversed phase HPLC separation (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) to give pure

compounds, which are then screened in above-mentioned bioassays to locate/identify the active compounds. To confirm the identity of the compound, additional spectroscopic data such as LC/MS, HRMS and NMR are recorded.

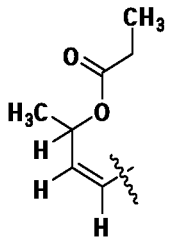
The active fraction **6** is purified further by using HPLC C-18 column (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), water:acetonitrile gradient solvent system (0-10 min; 80 % aqueous CH_3CN, 10-25 min; 80 - 65 % aqueous CH_3CN, 25-50 min; 65 - 50 % aqueous CH_3CN, 50-60 min; 50-70 % aqueous CH_3CN, 60-80 min; 70 – 0 % aqueous CH_3CN, 80-85 min; 0 – 20 % aqueous CH_3CN) at 8 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm, to give templamide A, retention time 55.64 min and FR901465, retention time 63.59 min and FR90128, retention time 66.65 min respectively. The other active fraction **6** is also purified using HPLC C-18 column (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), water:acetonitrile gradient solvent system (0-10 min; 70-60 % aqueous CH_3CN, 10-20 min; 60-40 % aqueous CH_3CN, 20-50 min; 40 - 15 % aqueous CH_3CN, 50-75 min; 15 - 0 % CH_3CN, 75-85 min; 0 – 70 % aqueous CH_3CN) at 8 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm, to give templamide B, retention time 38.55 min.

Mass spectroscopy analysis of pure compounds is performed on a Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus electrospray (ESI) instrument using both positive and negative ionization modes in a full scan mode (*m/z* 100-1500 Da) on a LCQ DECA XP^{plus} Mass Spectrometer (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). Thermo high performance liquid chromatography (HPLC) instrument equipped with Finnigan Surveyor PDA plus detector, autosampler plus, MS pump and a 4.6 mm x 100 mm Luna C18 5 µm column (Phenomenex) is used. The solvent system consists of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The mobile phase begins at 10% solvent B and is linearly increased to 100% solvent B over 20 min and then kept for 4 min, and finally returns to 10% solvent B over 3 min and kept for 3 min. The flow rate is 0.5 mL/min. The injection volume is 10 µL and the samples are kept at room temperature in an auto sampler. The compounds are analyzed by LC-MS utilizing the LC and reversed phase chromatography. Mass spectroscopy analysis of the present compounds is performed under the following conditions: The flow rate of the nitrogen gas is fixed at 30 and 15 arb for the sheath and aux/sweep gas flow rate, respectively. Electrospray ionization is performed with a spray voltage set at 5000 V and a capillary voltage at 45.0 V. The capillary temperature is set at 300°C. The data is analyzed on Xcalibur software. The active compound templamide A has a molecular mass of 555 based on the *m/z* peak at 556.41 $[M + H]^+$ and 578.34 $[M + Na]^+$ in positive ionization mode. The LC-MS analysis in positive mode ionization for templamide B suggests a molecular mass of 537 based *m/z* ions at 538.47 $[M + H]^+$ and 560.65 $[M + Na]^+$. The

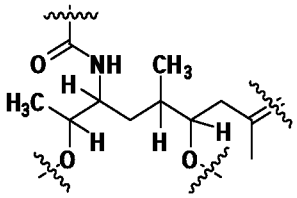
molecular weight for the compounds FR901465 and FR901228 are assigned as 523 and 540 respectively on the basis of LCMS analysis.

^{1}H, ^{13}C and 2D NMR spectra are measured on a Bruker 600 MHz gradient field spectrometer. The reference is set on the internal standard tetramethylsilane (TMS, 0.00 ppm).

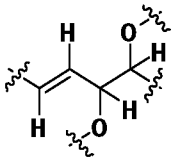
For structure elucidation of templamide A, the purified compound with molecular weight 555 is further analyzed using a 600 MHz NMR instrument, and has ^{1}H NMR δ values at 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04 and has ^{13}C NMR values of δ 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41. The ^{13}C NMR spectrum exhibits 28 discrete carbon signals which are attributed to six methyls, four methylene carbons, and thirteen methines including five sp^2, four quaternary carbons. The molecular formula, $C_{28}H_{45}NO_{10}$, is determined by interpretation of ^{1}H, ^{13}C NMR and HRESI MS data. The detailed analysis of ^{1}H-^{1}H COSY, HMBC and HMQC spectral data reveals the following substructures (I – IV) and two isolated methylene & singlet methyl groups. These substructures are connected later using the key HMBC correlations to give the planer structure for the compound, which has been not yet reported in the literature and designated as templamide A. This polyketide molecule contains two tetrahydropyranose rings, and one conjugated amide.



I



II



III



IV

Substructures I-IV assigned by analysis of 1D & 2D NMR spectroscopic data.

The (+) ESIMS analysis for the second herbicidal compound, shows *m/z* ions at 538.47 $[M + H]^+$ and 560.65 $[M + Na]^+$ corresponding to the molecular weight of 537. The molecular formula of $C_{28}H_{43}NO_9$ is determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis. The ^{1}H and ^{13}C NMR of this compound is similar to that of templamide A except that a new isolated $-CH_2-$ appear instead of the non-coupled methylene group in templamide A. The small germinal coupling constant of 4.3 Hz is characteristic of the presence of an epoxide methylene group. The presence of this epoxide is further confirmed from the ^{13}C NMR shift from 60.98 in templamide A to 41.07 in compound with MW 537. The molecular formulae difference between these two compounds is reasonably explained by elimination of the water molecule

followed by formation of epoxide. Thus, on the basis of based NMR and MS analysis the structure for the new compound was assigned and was designated as templamide B.

For structure elucidation, the purified compound from fraction **6** with molecular weight 523 is further analyzed using a 600 MHz NMR instrument, and has ^{1}H NMR values at 6.41, 6.40, 6.01, 5.98, 5.68, 5.56, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.65, 3.59, 3.55, 3.50, 2.44, 2.26, 2.04, 1.96, 1.81, 1.75, 1.37, 1.17, 1.04; and has ^{13}C NMR values of 172.22, 167.55, 144.98, 138.94, 135.84, 130.14, 125.85, 123.37, 99.54, 82.19, 78.28, 76.69, 71.31, 70.13, 69.68, 48.83, 42.52, 36.89, 33.11, 30.63, 25.99, 21.20, 20.38, 18.14, 14.93, 12.84. The detailed ^{1}H and ^{13}C NMR analysis of compound suggested that this compound was quite similar to compound templamide B; the only difference was in the ester side chain; an acetate moiety was present instead of a propionate moiety in the side chain. The detailed 1D and 2D NMR analysis confirm the structure for the compound as FR901465 as a known compound.

Based on the LC-MS analysis, the other compound from fraction **6** has a molecular mass of 540 in negative ionization mode. For structure elucidation, the purified compound from fraction **5** with molecular weight 540 is further analyzed using a 500 MHz NMR instrument, and has ^{1}H NMR values at 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; and has ^{13}C NMR values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51. The NMR data indicates that the compound contains amino, ester, carboxylic acid, aliphatic methyl, ethyl, methylene, oxymethylene, methine, oxymethine and sulfur groups. The detailed 1D and 2D NMR analysis confirm the structure for the compound as FR901228 as a known compound.

The molecular weight for the other active compound (F8H17) from Fraction F8 was assigned as 1080 based on the molecular ion peak at 1081.75 (M + H) in positive ESI mode and further confirmed by the negative ESIMS with base peak at 1079.92. This compound showed UV absorption at 234 nm.

Example 6. *Burkholderia* sp. as an Algicide

Burkholderia sp. A396 is grown in an undefined mineral medium for 5 days (25°C, 200 rpm). Cells are separated from the supernatant by centrifugation at 8,000 *g*, and the cell-free supernatant is used to test the algaicidal activity against a unicellular algal species (*P. subcapitata*) and a blue-green alga species (*Anabaena* sp.). A specified increasing amount of supernatant is added into wells of a 24-well polystyrene plate that has the specified algae growing in 750 micro liters of Gorham's medium to determine the dose-response curve for the test supernatant on each algae type. Each treatment is done in two replicates, and the blank

growth medium is used as a negative control. The plate is closed with a lid and incubated for 48 hours under constant growth light at room temperature. After 48 hours, the fluorescence (at 700 nm) of the suspension in each well is measured using a SpectraMax Gemini XS plate reader, and the reduction in fluorescence compared with the un-treated control is converted into percent control of algal growth. Results presented in Table 9 below show excellent control of unicellular algae and good control or algistatic effect on blue-green algae.

Table 9. Control of two algal species by *Burkholderia* A396 cell-free broth measured as a reduction of fluorescence at 700 nm.

Amount of broth per well	% control	
	P. subcapitata	***Anabaena sp.***
0 μL	0	0
10 μL	74.2	0.0
20 μL	84.1	0.0
30 μL	85.5	0.0
40 μL	88.3	0.0
50 μL	90.6	0.0
100 μL	94.6	36.4

Example 7: Control of *Chlamydomonas reinhardtii* by crude extract and fractions of *Burkholderia sp.*

Fractions obtained from the fractionation of crude extract of *Burkholderia sp.* were tested for algaecide activity against *Chlamydomonas reinhardtii*. An increasing volume of fraction (with concentration of 20 mg/mL in ethanol) was added to a clear 48 well polystyrene plate with 750 micro liters of the specified algae growing. Each treatment was done in two replicates and the solvent (ethanol) used as a negative control. The plate was closed with a lid and incubated for 72 hours under constant light at room temperature. After 72 hours, the fluorescence (at 680 nm) of the suspension in each well was measured using a SpectraMax M2 plate reader, and the reduction in fluorescence compared with the negative control was converted into percent control of algal growth. Each sample was visually compared to the negative control; a well that was visually clearer than the negative control was scored as active. Results presented in Table 10 below shows control of the specified algae in fractions 5, 6, 7, 8, and 9. Tests were run in two replicates and % Control was calculated as a reduction of fluorescence at 680 nm compared with the negative control. Each sample was visually compared to the negative control; a well that was visually clearer than the negative control was scored as active.

Table 10: Control of *Chlamydomonas reinhardtii* by crude extract & fractions of *Burkholderia* sp. (MBI 206).

Sample	μL of Sample per 750 μL of Algae	% Inhibition	Visual
Solvent Blank	22.5	0.00	Not Active
	11	0.00	Not Active
	5	0.00	Not Active
Crude Extract	22.5	97.10	Active
	11	89.54	Active
	5	90.82	Active
MBI 206F1	22.5	-74.47	Not Active
	11	46.47	Not Active
	5	46.21	Not Active
MBI 206F2	22.5	12.64	Not Active
	11	-214.35	Not Active
	5	-297.56	Not Active
MBI 206F3	22.5	-143.92	Not Active
	11	-740.16	Not Active
	5	32.68	Not Active
MBI 206F4	22.5	-98.80	Not Active
	11	-155.41	Not Active
	5	58.51	Not Active
MBI 206F5	22.5	92.89	Active
	11	79.45	Active
	5	71.60	Weak
MBI 206F6	22.5	94.88	Active
	11	96.33	Active
	5	86.45	Active
MBI 206F7	22.5	97.32	Active
	11	98.96	Active
	5	97.89	Active
MBI 206F8	22.5	94.35	Active
	11	32.17	Weak
	5	-13.51	Not Active
MBI 206F9	22.5	85.35	Active
	11	96.49	Active
	5	97.73	Active
MBI 206F10	22.5	50.30	Not Active
	11	48.54	Not Active
	5	-108.24	Not Active
MBI 206F11	22.5	-121.50	Not Active
	11	-16.21	Not Active
	5	36.46	Not Active

Example 8: Algicidal effect of crude extract and various fractions obtained from *Burkholderia sp.* against *P. subcapitata*.

The crude extract as well as the fractions obtained from *Burkholderia* sp. was tested for algicidal activity against a unicellular algal species (*P. subcapitata*). An increasing volume of pure ethanol solution derived by re-dissolving a known amount of material (10 mg/mL concentration) corresponding to each sample was added into wells of a 24-well polystyrene plate that has the specified algae growing in 750 micro liters of Gorham's medium to determine the algicidal effect of sample (extract/fractions) on unicellular algae. Each treatment was done in three replicates, and pure ethanol was used as a negative control. After mixing, the plate was closed with a lid and incubated for 48 hours under constant growth lights at room temperature. After 48 hours, the fluorescence (at 700 nm) of the suspension in each well was measured using a SpectraMax Gemini XS plate reader, and the reduction in fluorescence compared with the un-treated control was converted into percent control of algal growth. Results presented in Table 11 below show excellent control of unicellular algae with fractions F5, F6 and F7 whereas no substantial algicidal effect was obtained with other samples.

Table 11: Algicidal effect of various samples obtained from *Burkholderia* sp. The bioassay was run in three replicates using *P. subcapitata* as the test organism.

Sample	sample μL	% control	Results
MBI206F1	5	0.0	Not Active
	10	33.9	Not Active
	20	58.2	Not Active
MBI206F2	5	35.7	Not Active
	10	6.0	Not Active
	20	31.8	Not Active
MBI206F3	5	40.9	Not Active
	10	66.4	Not Active
	20	68.5	Not Active
MBI206F4	5	46.8	Not Active
	10	69.8	Weak
	20	84.7	Active
MBI206F5	5	49.9	Not Active
	10	71.5	weak
	20	95.4	Active
MBI206F6	5	62.7	Not Active
	10	74.7	weak
	20	90.7	Active
MBI206F7	5	40.1	Not Active
	10	88.6	Active
	20	93.0	Active
MBI206F8	5	36.8	Not Active
	10	50.0	Not Active
	20	65.9	Not Active
MBI206F9	5	66.3	Not Active
	10	40.7	Not Active
	20	51.8	Not Active
MBI206F10	5	26.8	Not Active
	10	27.5	Not Active
	20	32.9	Not Active
MBI206F11	5	25.9	Not Active
	10	32.8	Not Active
	20	39.2	Not Active
Crude extract	5	45.6	Not Active
	10	69.6	weak
	20	70.0	weak
Solvent Blank	5	0.0	Not Active
	10	0.0	Not Active
	20	0.0	Not Active

Example 9: Control of *Chlamydomonas reinhardtii* by purified compounds from *Burkholderia sp.* fermentation broth

Purified compounds from *Burkholderia sp.* fermentation broth was tested for algaicidal activity against *Chlamydomonas reinhardtii.* An increasing volume of the purified compounds (20 mg/mL in ethanol) was added to a clear 48 well polystyrene plate with 750 micro liters of the specified algae growing. Each treatment was done in two replicates and the solvent used as a negative control. The plate was closed with a lid and incubated for 72 hours under constant light at room temperature. After 72 hours the fluorescence (at 680 nm) of the suspension in each well was measured using a SpectraMax M2 plate reader, and the reduction in fluorescence compared with the negative control was converted into percent control of algal growth. Each sample was visually compared to the negative control; a well that was visually clearer than the negative control was scored as active. Results presented in Table 12 below shows control of the specified algae in samples containing templamide B (MW 537), FR901228 (MW 540), templazole A (MW 298), and F8H18 (MW 1080). Tests were run in two replicates and %. Control was calculated as a reduction of fluorescence at 680 nm compared with the negative control. Each sample was visually compared to the negative control; a well that was visually clearer than the negative control was scored as active.

Table 12: Control of *Chlamydomonas reinhardtii* by purified compounds from Burkholderia sp. fermentation broth (MBI 206).

Sample	µL of Sample per 750 µL of Algae	% Control	Visual
Solvent Blank	22.5	0	Not Active
	11	0	Not Active
	5	0	Not Active
Templamide B (MW 537)	22.5	98.29620264	Active
	11	99.34438783	Active
	5	95.05204335	Active
FR901465 (MW 523)	22.5	-3.887169203	Not Active
	11	-33.58351827	Not Active
	5	-86.58233289	Not Active
Templamide A (MW 555)	22.5	-151.6466844	Not Active
	11	-21.16166036	Not Active
	5	-67.61183948	Not Active
FR901228 (MW 540)	22.5	98.71299647	Active
	11	99.35532773	Active
	5	89.48079462	Active
Templazole B (MW 258)	22.5	-30.78693813	Not Active
	11	52.94712906	Not Active
	5	-102.0883867	Not Active
Templazole A (MW 298)	22.5	98.1523303	Active
	11	98.72823743	Active
	5	99.18429591	Active
Templazole A (MW 298)	22.5	95.71173214	Active
	11	98.31330291	Active
	5	98.69251947	Active
F8H18 (MW 1080)	22.5	94.98474386	Active
	11	82.90378804	Active
	5	-21.38764258	Not Active

Templazole A was tested twice in this bioassay.

Example 10: Control of *Scenedesmus quadricauda* by heat-treated *Burkholderia sp.* fermentation supernatant.

Burkholderia sp. was grown in a fermentation broth as previously described. The broth was heat treated at the end of the fermentation to inactivate all cells. The cell free supernatant was tested for algaecide activity against *Scenedesmus quadricauda*. An increasing volume of supernatant was added to a clear 48 well polystyrene plate with 750 micro liters of the specified algae growing. Each treatment is done in two replicates and the blank growth medium used as a negative control. The plate is closed with a lid and incubated for 72 hours under constant light at room temperature. After 72 hours the fluorescence (at 680 nm) of the suspension in each well

is measured using a SpectraMax M2 plate reader, and the reduction in fluorescence compared with the untreated control is converted into percent control of algal growth. Results presented in Table 13 below shows control of the specified algae. Tests were run in two replicates and % Control was calculated as a reduction of fluorescence at 680 nm compared with the untreated control.

Table 13: Control of *Scenedesmus quadricauda* by supernatant of heat kill *Burkholderia* sp. (MBI 206).

Material	Volume (µL)	% Inhibition
MBI 206 120522ST HK TGAI	0	0
	10	97.21347952
	20	99.36167161
	30	99.42844203
	40	99.50798231
	50	98.90136045
	100	95.9474484

Example 11: Control of *Oscillatoria tenius* by heat kill *Burkholderia sp.* fermentation supernatant

Burkholderia sp. was grown in a fermentation broth as previously described. The broth was heat treated at the end of the fermentation to inactivate all cells. The cell free supernatant was tested for algaecide activity against *Oscillatoria tenius*. An increasing volume of supernatant was added to a clear 48 well polystyrene plate with 750 µL of the specified algae growing. Each treatment is done in two replicates and the blank growth medium used as a negative control. The plate is closed with a lid and incubated for 72 hours under constant light at room temperature. After 72 hours the absorbance at 680 nm is measured in each well using a SpectraMax M2 plate reader, and the reduction in absorbance compared with the untreated control is converted into percent control of algal growth. Results presented in Table 14 below shows control of the specified algae. Tests were run in two replicates and % control was calculated as a reduction of absorbance at 680 nm compared with the untreated control.

Table 14: Control of *Oscillatoria tenius* by supernatant of heat kill *Burkholderia* sp. (MBI 206).

Material	Volume (µL)	% Control
MBI 206 120522ST HK TGAI	0	0
	10	6.177042802
	20	25.12413108
	30	10.56583534
	40	37.70086527
	50	45.47313627
	100	36.96205601

Example 13: Efficacy of *Burkholderia* sp. against two-spotted spidermites infesting marigold plants

Marigold, *Tagetes erecta*, grown in 6" containers were infested with two-spotted spidermite, *Tetranychus urticae*, by placing leaves extracted from host plant (cotton) onto the test plants. Approximately ten (10) leaves with 30-40 spidermites present were placed on various parts of test plants for fourteen (14) days. Test plants were individually caged following infestation to allow spidermite population to build. Host leaves were removed from test plant. No pesticides were applied to test plants prior to study application. Spray application was applied using a Gen3 spray booth calibrated to 100 gpa. Each replicate was individually caged immediately following application. Cage description; a wire tomato cage 30" height x 12" diameter, covered with antivirus insect screening. Test plants received natural lighting for duration of trial. Test plants were soil watered every twenty-four (24) hours as needed. Plants were evaluated prior to application (pre-count), 3, 5 and 7 days after application. Four leaves were randomly selected and harvested from each replicate equaling a 6 cm sq total surface area evaluated. Actual count was recorded on live and dead two-spotted spidermite. *Burkholderia sp.* showed slight activity against both TSSM nymphs and adults. This activity shows potential for biopesticide formulations against TSSM. The treatments also reduced the number of live mites observed on samples. This is compelling evidence that MBI206 shows potential for biopesticide formulations against TSSM.

Example 14: Efficacy of *Burkholderia sp.* fermentation supernatant against two-spotted spidermites infesting Marigold plants

Marigold plants grown in 6" containers were infested with two-spotted spidermite by placing leaves extracted from host plant (cotton) onto the test plants. Eight to ten (8-10) leaves with approximately 30-40 two-spotted spidermite present were placed on various parts of test plants for fourteen (14) days. Test plants were individually caged following infestation to allow mite population to build. Host leaves were removed from test plant. No pesticides were applied to test plants prior to study application. Plants were treated with either 100% supernatant or 10% supernatant (in water) Spray application was applied to full coverage with no run-off using a disposable hand-sprayer. Test plants were placed research greenhouse on a wire-mesh raised bench and arranged in a complete randomized block design. Research greenhouse is monitored by Procom, Micro Grow Greenhouse System temperature control system. Environmental conditions averaged high temperature 85F to

low temperature of 72F during trial dates. Average humidity levels ranged from 40% to 75%. Test plants received natural lighting for duration of trial. Test plants were soil watered every twenty-four (24) hours as needed. Plants were evaluated prior to application (pre-count), 3, 5, 7 and 14 days after application. Evaluations were taken on a 6cm square total area per replicate. Actual count was recorded on live/dead two-spotted spidermite nymph and live/dead two-spotted spidermite adult.

Example 14: Efficacy of *Burkholderia sp.* formulation (MBI 206) for control of two spotted spidermite (TSM) in strawberry – field data.

The efficacies of five traditional chemistry-derived and MBI 206 were evaluated for TSM control under field conditions. 'Strawberry Festival' transplants were set in the field in plastic mulched beds, 13 inches high and 27 inches across the top, and with 4 ft bed spacing. Overhead irrigation was applied for 10 days after setting to aid in establishment of the transplants. Trickle irrigation was used for the remainder of the experiment. Each 12.5-ft. plot consisted of 20 plants in two ten-plant rows per bed. Plots were infested from a laboratory colony in four sessions with 10 to 20 motile TSM, per plant. Each session accomplished the infestation of one block of the experiment. The experiment consisted of treatments of various rates and schedules of application of miticides, some combined with an adjuvant, and a non-treated check. Treatments were replicated four times in a RCB design. Savey and Acramite treatments were applied before TSM densities reached threshold levels (6 Jan); the remainder of the treatment programs began 2 wks later. Treatments were applied using a hand-held sprayer with a spray wand outfitted with a nozzle containing a 45-degree core and a number four disc. The sprayer was pressurized by CO_2, to 40 psi, and calibrated to deliver 100 gal per acre. Pre-treatment samples were taken on Day 1 and sampling continued weekly through 2 wks after the last application of treatments. Samples consisted of ten randomly selected leaflets per plot and were collected from the middle one-third stratum of the plants. Samples were transported to the laboratory where motile and egg TSM were brushed from the leaflets onto rotating sticky discs and counted on 1/10 of the disc surface to estimate average numbers per leaflet. Distinctions could not be made between viable and non-viable eggs, thus total eggs were recorded. MBI 206 at the highest rate (3 gal/acre) shows decrease in the number of eggs at a level comparable to at least two of the chemical controls.

Table 15. Effects of Various Formulations on TSM Egg Production

Treatment/ Formulation	Rate amt/acre	No. egg TSM/leaflet								
		Day1	Day 9	Day 16	Day 22	Day 30	Day 37	Day 44	Day 52	Day 58
Non-treated	--	15.5	10	27.5	12.3	25.3	122	181.5	587	559
Bifenazate+ Blend of alkyl aryl polyoxylkane ethers, free fatty acids and dimethyl polysiloxane	1 lb.	3.8	6	6	0.8	8.3	20.5	3	28	66.5
Nonionic spreader	16.0 fl. oz.	6.8	15.5	11.8	16.8	31.5	148.3	114	321	525.3
5% fenpyroximate EW	32 fl. oz.	11.3	12.8	35	19.3	11	24.5	17.8	49.8	213
5% fenpyroximate EC	32 fl. oz.	9.3	11.8	12.3	12.5	1	34.5	20.8	28.5	97.3
hexythiazox	6 oz.	2	8.5	15	17	22	71.5	128.5	281.5	393.5
MBI 206 + Blend of alkyl aryl polyoxylkane ethers, free fatty acids and dimethyl polysiloxane	1 gal.	12.3	-	20	12	12.5	65.5	83.3	292	478
MBI 206 + Blend of alkyl aryl polyoxylkane ethers, free fatty acids and dimethyl polysiloxane	3 gal.	3.3	-	8.8	13.5	21	54.3	72	158	301.3

Example 15: Control of citrus rust mites (*Phyllocoptruta oleivora*) on citrus under filed conditions

MBI 206 (formulated broth of *Burkhoderia sp.*) was sprayed on Valencia Sweet Orange at 1, 2, and 3 gal/acre in combination with 0.25% v/v/ of LI-700 (surfactant) and delivered in a volume of 100 GPA. A single treatment was delivered and compared to an untreated sample. Mite counts were performed pre-treatment, and then at 1, 7, 10 and 14 days after treatment. Mite counts were an average of 10 fruits per treatment per sampling point. A reduction in the number of mites present in the MBI 206 treatments was observed at 14 days after treatments with 1 and 2 gal/acre MBI 206 (approximately 6-8 mites per count), when compared to the untreated control (approx. 16 mites per count).

Example 16: Insecticidal (sucking contact) activity of Templamide, FR901465 and FR901228 against milkweed bugs.

The insecticidal activity of the pure compounds templamide B (MBI 206; MW 537), FR 901465 (MBI 206; MW 523) and FR901228 (MBI 206; MW 540) were tested in a laboratory assay using a sucking contact bioassay system. The compounds were dissolved in 100% ethanol to concentrations of 1mg/mL. Individual 4th instar milkweed bugs, *penultimate nymph*, larvae were placed in 5C Rubbermaid container with 2 sunflower seeds in each tub and 1 water cup (water in contact cup with cotton wick) into each tub. A Hamilton Micropipette was used to apply 1 µL (1 drop) of compound onto abdomen of milkweed bugs (MWB) of each larvae. Tubs were place into the Rubbermaid container and cap with mesh lid. Eight larvae per sample were treated. The assay was incubated at 25°C, 12h light/12h dark. Larvae were scored at 4 and 7 day after application. All the three compounds exhibited contact activity against MWB, while not all insects died but many were clearly affected and unable to move. Most of the MWB on day 7 had molted which suggests that the compounds may inhibit molting or affect normal MWB development. Thus, FR 901465 provided a better (87.5 %) control of milkweed bugs, than FR 901228 (MW 540) and templamide B (Figure 4).

Example 17: Insecticidal activity of pure compounds against Lygus hesperus late 2nd/early 3rd instar

The insecticidal activity of the four compounds, templamide A, templamide B, FR901465 & FR901228 isolated from *Burkholderia* were tested in a laboratory assay using a 12 well plate with treated green beans bioassay system. The compound was dissolved in

100% ethanol to concentrations of 1 mg/mL and 500 μL of this sample was added to 3.5 mL of water to make a total volume of 4 mL containing 0.25 mg/mL concentration of the compound. Green beans were washed earlier in bleach solution and then sat in water to rinse. Beans were dried before using and then were cut with scissors to fit into wells of 12 – well plate. With the help of forceps the beans were dunked into a 15 mL plastic falcon tube containing each treatment and then submerged in treatment for exactly one min. one bean part was put into each well and then individual late 2nd/early 3rd instar *Lygus hesperus*, were placed in wells with help of brush. Plate sealer was used to cover tray and hole poked into the plate sealer for aeration. The numbers of Lygus/well were counted and plates were placed on brench top. Larvae were scored at 24, 48 and 120 hours after application. Based on the results presented in Figure 5, compound FR 901465, was found to be the most potent with mortality of 91.2%, followed by templamide with B 69.2%, and FR901228 with 51.7%. The templamide A was inactive in the Lygus feeding bioassay. The positive control used in this testing was Avid (Avemectin) at the rate of 13 μL/10 mL.

Example 18: Nematicidal Activity of FR901228

The pure sample of FR 901228 was tested using an *in vitro* 96-well plastic cell-culture plate bioassay. 15-20 nematodes in a 50 μl water solution were exposed to 3 μl of a 20 mg/ml solution of FR 901228 for a 24 hour period at 25C. Once the incubation period was completed, results were recorded based on a visual grading of immobility of the juvenile nematodes (J2's) in each well treated with compounds; each treatment was tested in replicate of 4 wells. Three controls are included in each trial; 1 positive (1% Avid) & 2 negative (DMSO & water). Trials (T1) was carried out using Free living nematodes (FLN) and trail (T2) was carried out using *M. incognita* nematodes, the samples were dissolved in 100% DMSO. FR 901228 (MW 540) showed the excellent control with immobility of 75% against free living nematodes as compared to *M. incognita* with 75% immobility.

MICROORGANISM DEPOSIT

The following biological material has been deposited under the terms of the Budapest Treaty with the Agricultural Research Culture Collection (NRRL), 1815 N. University Street, Peoria, Illinois 61604 USA, and given the following number:

Deposit	Accession Number	Date of Deposit
Burkholderia sp. A396	NRRL B-50319	September 15, 2009

The strain has been deposited under conditions that assure that access to the culture will be available during the pendency of this patent application to one determined by the Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto under 37 C.F.R. §1.14 and 35 U.S.C. §122. The deposit represents a substantially pure culture of the deposited strain. The deposit is available as required by foreign patent laws in countries wherein counterparts of the subject application, or its progeny are filed. However, it should be understood that the availability of a deposit does not constitute a license to practice the subject invention in derogation of patent rights granted by government action.

Although this invention has been described with reference to specific embodiments, the details thereof are not to be construed as limiting, as it is obvious that one can use various equivalents, changes and modifications and still be within the scope of the present invention.

Various references are cited throughout this specification, each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

Literature cited:

Anderson, et al. "The structure of thiostrepton," Nature 225: 233-235. 1970.

Andra, "Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization." Biol. Chem. 387: 301-310. 2006.

Arena, et al. "The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans* - correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding and biological activity." J Parasitol. 81: 286-294. 1995.

Asolkar, et al., "Weakly cytotoxic polyketides from a marine-derived Actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085." J. Nat. Prod. 69:1756-1759. 2006.

Burkhead, et al., "Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes." Appl. Environ. Microbiol. 60: 2031-2039. 1994.

Burkholder, W. H "Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs." Phytopathology 40: 115-117. 1950.

Caballero-Mellado et al., "*Burkholderia unamae* sp. nov., an N2-fixing rhizospheric and endophytic species." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1165-1172. 2004.

Cashion et al. "Rapid method for base ratio determination of bacterial DNA." Anal. Biochem. 81: 461-466. 1977.

Casida, et al., US Patent No. 6,689,357.

Chen et al. , "*Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella* " Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 1055-1059. 2007.

Cheng, A. C. and Currie, B. J. "Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management." Clin. Microbiol. 18: 383-416. 2005.

Coenye, T. and P. Vandamme, P. "Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches." Environ. Microbiol. 5: 719-729. 2003.

Compant, et al. "Diversity and occurence of *Burkholderia* spp. in the natural environment." FEMS Microbiol. Rev. **32**: 607-626. 2008.

De Ley et al. "The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates." Eur. J. Biochem. **12**: 133-142. 1970.

Duke et al. "Natural products as sources for herbicides: current status and future trends." Weed Res 40: 99-111. 2000.

Gerwick et al., US Patent No. 7,393,812.

Gottlieb et al., US Patent No. 4,808,207.

Gouge et al., US Patent Application Pub. No. 2003/0082147.

Guella et al. "Almazole C, a new indole alkaloid bearing an unusually 2,5-disubstituted oxazole moiety and its putative biogenetic precursors, from a Senegalese Delesseriacean sea weed." Helv. Chim. Acta 77: 1999-2006. 1994.

Guella et al. "Isolation, synthesis and photochemical properties of almazolone, a new indole alkaloid from a red alga of Senegal." Tetrahedron. 62: 1165-1170. 2006.

Henderson, P. J. and Lardy H. A. "Bongkrekic acid. An inhibitor of the adenine nucleotide translocase of mitochondria." J. Biol. Chem. 245: 1319-1326. 1970.

Hirota et al. “Isolation of indolmycin and its derivatives as antagonists of L-tryptophan.” Agri. Biol Chem. 42: 147-151. 1978.

Hu, F.-P. and Young, J. M. "Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax, Burkholderia*, *Herbaspirillum, Ralstonia*, and *Xanthomonas* spp." J. Appl. Microbiol. 84: 263-271. 1998.

Huss et al. "Studies of the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates." System. Appl. Microbiol. 4: 184-192. 1983.

Jansiewicz, W. J. and Roitman J. "Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*." Phytopathology 78: 1697-1700. 1988.

Jeddeloh et al., WO2001/055398.

Jansen et al. "Thiangazole: a novel inhibitor of HIV-1 from Polyangium Spec." Liebigs Ann. Chem. 4: 357-3359. 1992.

Jeong et al. "Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops." Plant Disease 87: 890-895. 2003.

Knudsen, G. R. and Spurr, J. "Field persistence and efficacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot." Plant Disease 71: 442-445. 1987.

Koga-Ban et al. "cDNA sequences of three kinds of beta-tubulins from rice." DNA Research 2: 21-26. 1995.

Koide et al. US Patent Application Pub. No. 2008/0096879.

Koyama et al. "Isolation, characterization, and synthesis of pimprinine, pimrinrthine, and pimprinaphine, metabolites of *Streptoverticillium olivoreticuli*." Agri. Biol. Chem. 45: 1285-1287. 1981.

Krieg et al. "*Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis: Ein neuer, gegenuber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp." Z. Angew. Entomol._96:500-508. 1983.

Kunze et al. "Thiangazole, a new thiazoline antibiotic from *Polyangium* sp (Myxobacteria Production, antimicrobial activity and mechanism of action." J. Antibiot., 46: 1752-1755. 1993.

Leahy et al. "Comparison of factors influencing trichloroethylene degradation by toluene-oxidizing bacteria." Appl. Environ. Microbiol. 62: 825-833. 1996.

Lessie et al. "Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*." FEMS Microbiol. Lett. 144: 117-128. 1996.

Lindquist, N. et al. "Isolation and structure determination of diazonamides A and B, unusual cytotoxic metabolites from the marine ascidian *Diazona chinensis*." J. Am Chem. Soc. 113: 2303-2304. 1991.

Lorch, H et al. "Basic methods for counting microoganisms in soil and water. In Methods in applied soil microbiology and biochemistry. K. Alef and P. Nannipieri. Eds. San Diego, CA, Academic Press: pp. 146-161. 1995.

Ludovic et al. "Burkholderia diveristy and versatility: An inventory of the extracellular products." J. Microbiol. Biotechnol. 17: 1407-1429. 2007.

Lydon, J. and Duke, S. "Inhibitors of glutamine biosynthesis." in Plant amino acids: Biochemistry and Biotechnology. B. Singh., Ed. New York, USA, Marcel Decker. pp. 445-464. 1999.

Mahenthiralingam et al. "DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III." J.Clin. Microbiol. 38: 3165-3173. 2000.

Ming, L.-J. and Epperson. "Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin." Biochemistry 91: 46-58. 2002.

Morita et al. "Biological activity of tropolone." Biol. Pharm. Bull. 26: 1487-1490. 2003.

Nagamatsu, T. "Syntheses, transformation, and biological activities of 7-azapteridine antibiotics: toxoflavin, fervenulin, reumycin, and their analogs". Recent Res. Devel. Org. Bioorg. Chem. 4: 97 –121. 2001.

Naik et al., "Pimprine, an extracellular alkaloid produced by *Streptomyces* CDRIL-312: fermentation, isolation and pharmacological activity." J. Biotech. 88: 1-10. 2001.

Nakajima et al., "Antitumor Substances, FR901463, FR901464 and FR901465. I. Taxonomy,

Fermentation, Isolation, Physico-chemical Properties and Biological Activities." J. Antibiot. 49: 1196-1203. 1996.

Nakajima et al. US Patent No. 5,545,542.

Nakajima et al., "Hydantocidin: a new compound with herbicidal activity." J Antibiot. 44: 293-300. 1991.

N'Diaye, I. et al., "Almazole A and amazole B, unusual marine alkaloids of an unidentified red seaweed of the family *Delesseriaceae* from the coasts of Senegal." Tet Lett. 35: 4827-4830. 1994.

N'Diaye, I. et al., "Almazole D, a new type of antibacterial 2,5-disubstituted oxazolic dipeptide from a red alga of the coast of Senegal." Tet Lett. 37: 3049-3050. 1996.

Nierman et al., "Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 14246-14251. 2004.

Okazaki et al., "Rhizobial strategies to enhance symbiotic interaction: Rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase." Microbes Environ. 19: 99-111. 2004.

Parke, J. L. and D. Gurian-Sherman, D. 2001. "Diversity of the Burkholderia cepacia complex and implications for risk assessment of biological control strains." Annual Reviews in Phytopathology 39: 225-258. 2001.

Parke, et al. US Patent No. 6,077,505.

Pettit, G. et al. "Isolation of Labradorins 1 and 2 from *Pseudomonas syringae*." J. Nat. Prod. 65: 1793-1797. 2002.

Pitt, et al., "Type characterization and antibiotic susceptibility of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland." J. Med. Microbiol. 44: 203-210. 1996.

Ramette et al., "Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment." Appl. Environ. Microbiol. 71: 1193-1201. 2005.

Resi et al., "Burkholderia tropica sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium."Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 2155-2162. 2004.

Salama et al. "Potency of spore-gamma-endotoxin complexes of *Bacillus thuringiensis* against some cotton pests." Z. Angew. Entomol. 91: 388-398. 1981.

Selva et al., "Targeted screening for elongation factor Tu binding antibiotics." J. Antibiot. 50: 22-26. 1997.

Takahashi, S. et al. "Martefragin A, a novel indole alkaloid isolated from a red alga, inhibits lipid peroxidation." Chem Pharm. Bull. 46: 1527-1529. 1998.

Thompson et al. "Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme." Pest Management Science **56**: 696-702. 2000.

Takita et al., "Chemistry of Bleomycin. XIX Revised structures of bleomycin and phleomycin." J. Antibiot. 31: 801-804. 1978.

Tran Van et al., "Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield component in low fertility sulphate acid soils of Vietnam." Plant and Soil 218: 273-284. 2000.

Tsuruo et al., "Rhizoxin, a macrocyclic lactone antibiotic, as a new antitumor agent against human and murine tumor cells and their vincristine-resistant sublines." Cancer Res. 46: 381-385. 1986.

Ueda et al., US Patent No. 7,396,665.

Umehara, K. et al. "Studies of new antiplatelet agents WS-30581 A and B." J. Antibiot. 37: 1153-1160. 1984.

Vandamme et al. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens." Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 344-356. 1992.

Vanderwall et al., "A model of the structure of HOO-Co•bleomycin bound to d(CCAGTACTGG): recognition at the d(GpT)site and implications for double-stranded DNA cleavage, Chem. Biol. 4: 373-387. 1997.

Vermis K., et al. "Evaluation of species-specific recA-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex." J. Med. Microbiol 51: 937-940. 2002.

Watanabe, H. et al. "A new antibiotic SF2583A, 4-chloro-5-(3'indoly)oxazole, produced by *Streptomyces*." Meiji Seika Kenkyu Nenpo 27: 55-62. 1988.

Wayne et al., "Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 37: 463-464. 1987.

Werner et al., "Uptake of indolmycin in gram-positive bacteria." Antimicrob Agents Chemotherapy 18: 858-862. 1980.

Wilson et al. "Toxicity of rhizonin A, isolated from *Rhizopus microsporus*, in laboratory animals." Food Chem. Toxicol. 22: 275-281. 1984.

Zeck W.M. "Ein Bonitierungsschema zur Feldauswertung von Wurzelgallenbefall. Pflanzenschutznachrichten." Bayer 24,1: 144-147. 1971.

Zhang et al., US Patent No. 7,141,407.

Zhou et al., "Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51: 1085-1088. 2007.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A formulation comprising:

(A) an isolated strain or fermentation broth comprising cells and culture medium of a non-*Burkholderia cepacia,* non-*Burkholderia plantari*, non-*Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp.* non-*Burkholderia cepacia,* non-*Burkholderia multivorans*, *Burkholderia sp.* which has the following characteristics:

(1) 16S rRNA gene sequence comprising the forward sequence having at least 99% identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:8, 11, 12 and a reverse sequence having at least 99% identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:9, 10, 13, 14 and 15;

(2) pesticidal activity;

(3) produces a pesticidal compound selected from the group consisting of:

(a) a compound having the following properties: (i) a molecular weight of about 525-555 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (ii) ^{1}H NMR d values of 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (iii) has ^{13}C NMR d values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 and (iv) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient;

(b) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one carboxylic ester group, at least 17 carbons, at least 3 oxygens and at least 2 nitrogens;

(c) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one amide group, at least 15 carbons, at least 2 oxygen and at least 2 nitrogens;

(d) a compound having at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons, at least eight oxygen and at least one nitrogen and

(e) a compound having at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons, at least 8 oxygens and at least 1 nitrogen;

(4) is non-pathogenic to vertebrate animals;

(5) is susceptible to kanamycin, chloramphenicol, ciprofloxacin, piperacillin,

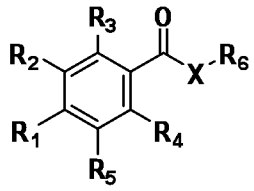
imipenem, and a combination of sulphamethoxazole and trimethoprim and

(6) contains the fatty acids 16:0, cyclo 17:0, 16:0 3-OH, 14:0, cyclo 19:0 ω8*c*, 18:0 and

(B) C1-C7 paraben, C2-C17 alcohol and detergent.

2. The formulation according to claim 1, wherein said C1-7 paraben is present in the amount of about 0.01–5%, the C2-C17 alcohol is present in the amount of about 0.001–10% and the detergent is present in the amount of about 0.001–10%.

3. A method for obtaining a pesticidally effective substance derived from the formulation of claim 1, wherein said pesticidally effective substance is: (a) a substance that has the following properties: (1) has pesticidal properties; (ii) has a molecular weight of about 210-240 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (iii) has ^{1}H NMR values of δ 7.90, 6.85, 4.28, 1.76, 1.46, 1.38, 1.37, 0.94; (iv) has ^{13}C NMR values of δ 166.84, 162.12, 131.34 (2C), 121.04, 114.83 (2C), 64.32, 31.25, 28.43, 25.45, 22.18. 12.93; (v) has an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 15-20 minutes on a reversed phase C-18 HPLC (Phenomenex, Luna 5μ C18(2) 100 A, 100 x 4.60 mm) column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system (0-20 min; 90 - 0 % aqueous CH_3CN, 20-24 min; 100% CH_3CN, 24-27 min; 0 - 90 % aqueous CH_3CN, 27-30 min; 90% aqueous CH_3CN) at 0.5 mL/min flow rate and UV detection of 210 nm; (vi) ^{13}C NMR spectrum which exhibits 13 discrete carbon signals attributed to one methyl, five methylene carbons, four methines, and three quaternary carbons; (vii) has a molecular formula of $C_{13}H_{18}O_3$ which was determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis; (viii) has UV absorption bands between about 210-450 nm and most particularly at about 248 nm or (b) a substance that has the structure



Wherein

X, is independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, and R_6 are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy,

thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl

comprising:

(A) providing the formulation of claim 1;

(B) incubating said formulation for a time and at a temperature sufficient to produce said pesticidally effective substance and

(C) isolating said pesticidally effective substance.

4. A combination comprising

(A) the formulation of claim 1 or pesticidally effective substance derived therefrom and

(B) at least one of

(1) a second substance, wherein said second substance is a chemical or biological algicide or acaricide or

(2) at least one of a pesticidally acceptable carrier, diluent, surfactant, adjuvant.

5. A combination comprising

(I) a first substance selected from the group consisting of

(A) a pure culture, cell fraction, supernatant or extract derived from an isolated strain of a non-*Burkholderia cepacia,* non-*Burkholderia plantari*, non-*Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp*. non-*Burkholderia cepacia,* non-*Burkholderia multivorans*, *Burkholderia sp*. which has the following characteristics:

(1) a 16S rRNA gene sequence comprising the forward sequence having at least 99% identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:8, 11, 12 and a reverse sequence having at least 99% identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:9, 10, 13, 14 and 15;

(2) pesticidal activity;

(3) produces a pesticidal compound selected from the group consisting of:

(a) a compound having the following properties:

(i) a molecular weight of about 525-555 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS);

(ii) ^{1}H NMR values of 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02;

(iii) has ^{13}C NMR values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 and

(iv) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient;

(b) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one carboxylic ester group, at least 17 carbons, at least 3 oxygens and at least 2 nitrogens;

(c) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one amide group, at least 15 carbons, at least 2 oxygen and at least 2 nitrogens;

(d) a compound having at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons, at least eight oxygen and at least one nitrogen and

(e) a compound having at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons, at least 8 oxygens and at least 1 nitrogen;

(B) an isolated pesticidal compound optionally obtainable from a Burkholderia species selected from the group consisting of:

(1) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one carboxylic ester group; at least 17 carbons and at least 3 oxygen and 2 nitrogens; and which has at least one of the following:

(a) a molecular weight of 275-435;

(b) ^{1}H NMR δ values at 8.44, 8.74, 8.19, 7.47, 7.31, 3.98, 2.82, 2.33, 1.08;

(c) ^{13}C NMR values of δ 163.7, 161.2, 154.8, 136.1, 129.4, 125.4, 123.5, 123.3, 121.8, 121.5, 111.8, 104.7, 52.2, 37.3, 28.1, 22.7, 22.7;

(d) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-20 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system and UV detection of 210 nm;

(e) UV absorption bands at 226, 275, 327 nm.;

(2) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group, at least one amide group; at least 15 carbons, at least 2 oxygens and at least 2 nitrogens; and at least one of the following characteristics:

(a) a molecular weight of about 240-290 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS);

(b) ^{1}H NMR δ values at about 7.08, 7.06, 6.75, 3.75, 2.56, 2.15, 0.93, 0.93;

(c) ^{13}C NMR values of δ 158.2, 156.3, 155.5, 132.6, 129.5, 129.5, 127.3, 121.8, 115.2, 115.2, 41.2, 35.3, 26.7, 21.5, 21.5;

(d) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 6-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient and

(e) UV absorption bands at about 230, 285, 323 nm;

(3) a non-epoxide compound comprising at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons, at least eight oxygens and one nitrogen and at least one of the following characteristics:

(a) has a molecular weight of about 530-580 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS);

(b) ^{1}H NMR values of δ 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04;

(c) ^{13}C NMR values of δ 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41;

(d) a High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 7-12 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system and UV detection of 210 nm;

(e) has a molecular formula of $C_{28}H_{45}NO_{10}$ which was determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis;

(f) has UV absorption bands between about 210-450 nm;

(4) a compound comprising

(a) at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons, at least 8 oxygens and at least 1 nitrogen,

(b) ^{13}C NMR values of δ 174.03, 166.12, 143.63, 137.50, 134.39, 128.70, 126.68, 124.41, 98.09, 80.75, 76.84, 75.23, 69.87, 69.08, 68.69, 68.60, 48.83, 41.07, 35.45, 31.67, 29.19, 27.12, 24.55, 19.20, 18.95, 13.48, 11.39, 8.04,

(c) a molecular formula of $C_{28}H_{43}NO_9$ and at least one of:

(i) ^{1}H NMR δ values at about 6.41, 6.40, 6.01, 5.97, 5.67, 5.55, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.64, 3.59, 3.54, 3.52, 2.44, 2.34, 2.25, 1.96, 1.81, 1.76, 1.42, 1.38, 1.17, 1.12,

1.04;

(ii) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 6-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient;

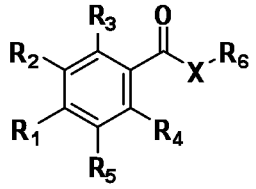
(iii) UV absorption bands between about 210-450 nm;

(II) optionally a second substance, wherein said second substance is a chemical or biological algicide or acaricide and

(III) optionally at least one of a carrier, diluent, surfactant, adjuvant.

6. The combination of claims 4 or 5, wherein said combination is a composition.

7. The combination of claim 4, wherein said pesticidally effective substance has the structure



Wherein

X, is -O; R_1 is hydroxy, R_2, R_3, R_4, R_5 are each H, R_6 $C_{4\text{-}10}$ alkyl, $C_{4\text{-}10}$ substituted alkyl.

8. The combination of claim 4, wherein said pesticidally effective substance is buty, hexyl or octyl paraben.

9. A method of modulating proliferation and/or growth of algae and/or modulating infestation of an arachnid comprising comprising applying to a location where modulation of proliferation and/or growth of algae and/or modulation of infestation of an arachnid is desired:

(A) the combination of claim 5;

(B) a pure culture, cell fraction, supernatant or extract derived from an isolated strain of a non-*Burkholderia cepacia,* non-*Burkholderia plantari*, non-*Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp.* non-*Burkholderia cepacia,* non-*Burkholderia multivorans*, *Burkholderia sp.* which has the following characteristics:

(1) a 16S rRNA gene sequence comprising the forward sequence having at least 99% identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:8, 11, 12 and a reverse sequence having at least 99% identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:9, 10, 13, 14 and 15;

(2) pesticidal activity;

(3) produces a pesticidal compound selected from the group consisting of:

(a) a compound having the following properties:

(i) a molecular weight of about 525-555 as determined by Liquid

Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS);

(ii) ^{1}H NMR values of 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02;

(iii) has ^{13}C NMR values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 and

(iv) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient;

(b) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one carboxylic ester group, at least 17 carbons, at least 3 oxygens and at least 2 nitrogens;

(c) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one amide group, at least 15 carbons, at least 2 oxygen and at least 2 nitrogens;

(d) a compound having at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons, at least eight oxygen and at least one nitrogen and

(e) a compound having at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons, at least 8 oxygens and at least 1 nitrogen;

(C) an isolated pesticidal compound optionally obtainable from a Burkholderia species selected from the group consisting of:

(1) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one carboxylic ester group; at least 17 carbons and at least 3 oxygen and 2 nitrogens; and which has at least one of the following:

(a) a molecular weight of 275-435;

(b) ^{1}H NMR δ values at 8.44, 8.74, 8.19, 7.47, 7.31, 3.98, 2.82, 2.33, 1.08;

(c) ^{13}C NMR values of δ 163.7, 161.2, 154.8, 136.1, 129.4, 125.4, 123.5, 123.3, 121.8, 121.5, 111.8, 104.7, 52.2, 37.3, 28.1, 22.7, 22.7;

(d) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-20 minutes on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system and UV detection of 210 nm;

(e) UV absorption bands at 226, 275, 327 nm.;

(2) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group, at least one amide group; at least 15 carbons, at least 2 oxygens and at least 2 nitrogens; and at least one of the following characteristics:

(a) a molecular weight of about 240-290 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS);

(b) ^1H NMR δ values at about 7.08, 7.06, 6.75, 3.75, 2.56, 2.15, 0.93, 0.93;

(c) ^{13}C NMR values of δ 158.2, 156.3, 155.5, 132.6, 129.5, 129.5, 127.3, 121.8, 115.2, 115.2, 41.2, 35.3, 26.7, 21.5, 21.5;

(d) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 6-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient and

(e) UV absorption bands at about 230, 285, 323 nm;

(3) a non-epoxide compound comprising at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons, at least eight oxygens and one nitrogen and at least one of the following characteristics:

(a) has a molecular weight of about 530-580 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS);

(b) ^1H NMR values of δ 6.40, 6.39, 6.00, 5.97, 5.67, 5.54, 4.33, 3.77, 3.73, 3.70, 3.59, 3.47, 3.41, 2.44, 2.35, 2.26, 1.97, 1.81, 1.76, 1.42, 1.37, 1.16, 1.12, 1.04;

(c) ^{13}C NMR values of δ 173.92, 166.06, 145.06, 138.76, 135.71, 129.99, 126.20, 123.35, 99.75, 82.20, 78.22, 76.69, 71.23, 70.79, 70.48, 69.84, 60.98, 48.84, 36.89, 33.09, 30.63, 28.55, 25.88, 20.37, 18.11, 14.90, 12.81, 9.41;

(d) a High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 7-12 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) with a gradient solvent system and UV detection of 210 nm;

(e) has a molecular formula of $C_{28}H_{45}NO_{10}$ which was determined by interpretation of the ESIMS and NMR data analysis;

(f) has UV absorption bands between about 210-450 nm;

(4) a compound comprising

(a) at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons, at least 8 oxygens and at least 1 nitrogen,

(b) ^{13}C NMR values of δ 174.03, 166.12, 143.63, 137.50, 134.39, 128.70, 126.68, 124.41, 98.09, 80.75, 76.84, 75.23, 69.87, 69.08, 68.69, 68.60, 48.83, 41.07, 35.45, 31.67, 29.19, 27.12, 24.55, 19.20, 18.95, 13.48, 11.39, 8.04,

(c) a molecular formula of $C_{28}H_{43}NO_9$ and at least one of:

(i) ^{1}H NMR δ values at about 6.41, 6.40, 6.01, 5.97, 5.67, 5.55, 4.33, 3.77, 3.75, 3.72, 3.64, 3.59, 3.54, 3.52, 2.44, 2.34, 2.25, 1.96, 1.81, 1.76, 1.42, 1.38, 1.17, 1.12, 1.04;

(ii) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 6-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient;

(5) a compound having the following properties:

(i) a molecular weight of about 525-555 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS);

(ii) ^{1}H NMR values of 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02;

(iii) has ^{13}C NMR values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 and

(iv) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient;

(6) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group, at least one carboxylic ester group, at least 17 carbons and at least 3 oxygen and 2 nitrogens;

(7) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one amide group; at least 15 carbons, at least 2 oxygens and at least 2 nitrogens;

(8) a non-epoxide compound having at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic

double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons and at least eight oxygen and one nitrogen and

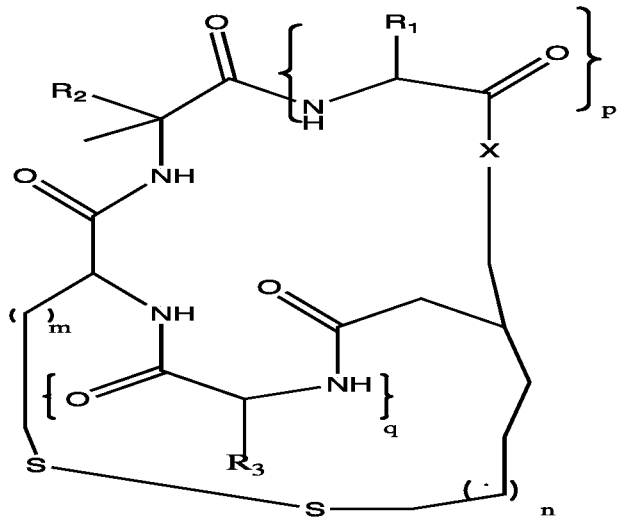
(9) a compound having at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons, at least 8 oxygens, at least 1 nitrogen and

(II) optionally another substance, wherein said substance is an algicidal substance or acaricidal substance in amounts effective to modulate said proliferation and/or growth of algae and/or infestation of an arachnid at said location.

10. A method of modulating proliferation and/or growth of algae and/or modulating infestation of an arachnid comprising comprising applying to a location where modulation of proliferation and/or growth of algae and/or modulation of infestation of an arachnid is desired an amount of

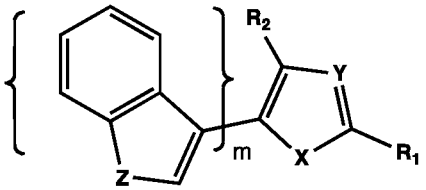
(I) a compound selected from the group consisting of:

(A) a compound having the structure ##STR001##



or a pesticidally acceptable salt or steriosomers thereof, wherein M is 1, 2, 3 or 4; n is 0, 1, 2, or 3; p and q are independently 1 or 2; X is O, NH or NR; R1, R2 and R3 are the same or different and independently an amino acid side-chain moiety or an amino acid side-chain derivative and R is a lower chain alkyl, aryl or arylalkyl moiety;

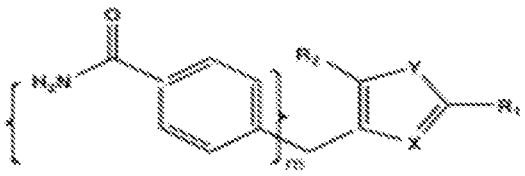
(B) a compound having the structure ##STR002##



##STR002##

wherein X, Y and Z are each independently --O, --NR_1, or --S, wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2 and m are each independently --H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl and "m" may be located anywhere on the oxazole ring;

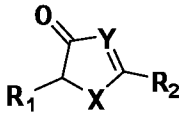
(C) a compound having the structure ##STR003##



##STR003##

wherein: X and Y are each independently --OH, --NR_1, or --S, wherein R_1 is --H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2 and m, a substituent on the oxazole ring, are each independently --H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl.

(D) a compound having the structure ##STR005##

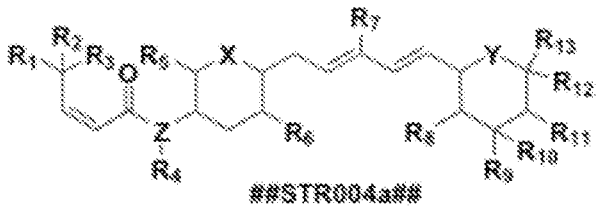


##STR005##

wherein: X and Y are each independently --OH, --NR_1, or --S, wherein R_1, R_2 are each independently --H, alkyl (e.g., C_1-C_{10} alkyl), substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted

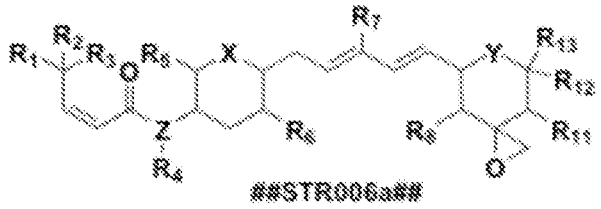
alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, --C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl;

(E) a compound having the structure ##STR004a##



Wherein X, Y and Z are each independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl

(F) a compound having the structure ##STR006a##



Wherein X, Y and Z are each independently -O, -NR, or -S, wherein R is H or C_1-C_{10} alkyl; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, R_{12}, and R_{13} are each independently H, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, substituted alkenyl, alkynyl, substituted alkynyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, heterocyclic, substituted heterocyclic, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, alkoxy, substituted alkoxy, thioalkyl, substituted thioalkyl, hydroxy, halogen, amino, amido, carboxyl, -C(O)H, acyl, oxyacyl, carbamate, sulfonyl, sulfonamide, or sulfuryl and

(II) and optionally another substance, wherein said substance is an algicidal substance or acaracidal substance in amounts effective to modulate said proliferation and/or growth of algae and/or infestation of an arachnid.

11. The method according to claim 10, wherein said compound is selected from the group consisting of:

(i) templazole A;

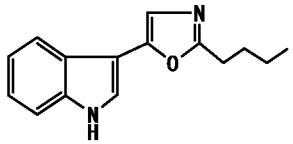
(ii) templazole B;

(iii) templamide A;

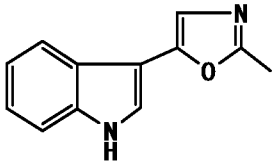
(iv) templamide B;

(v) FR901228;

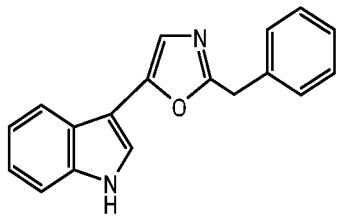
(vi)



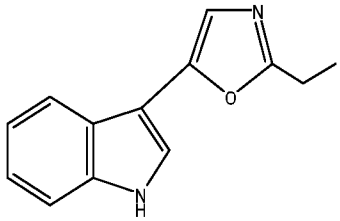
(vii)



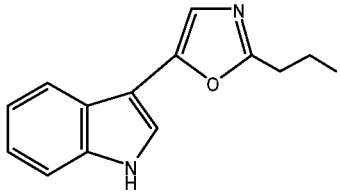
(viii)



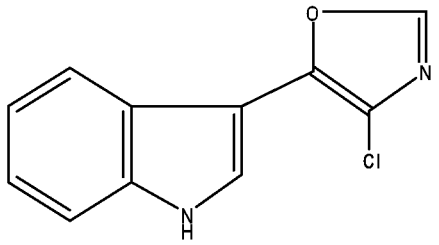
(ix)



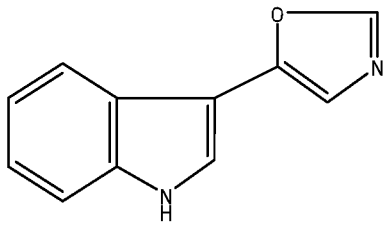
(x)



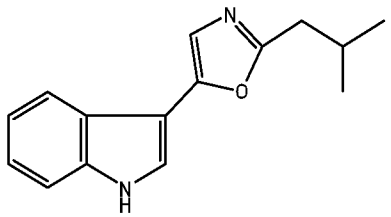
(xi)



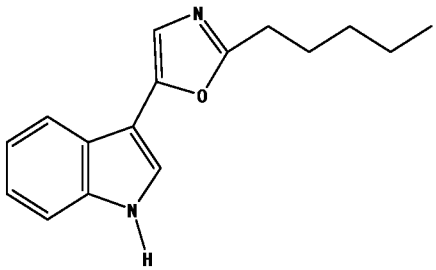
(xii)



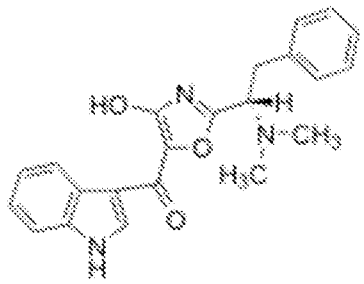
(xiii)



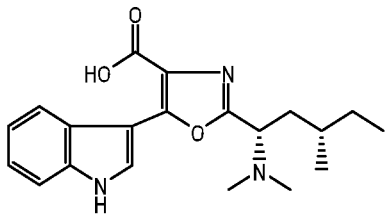
(xiv)



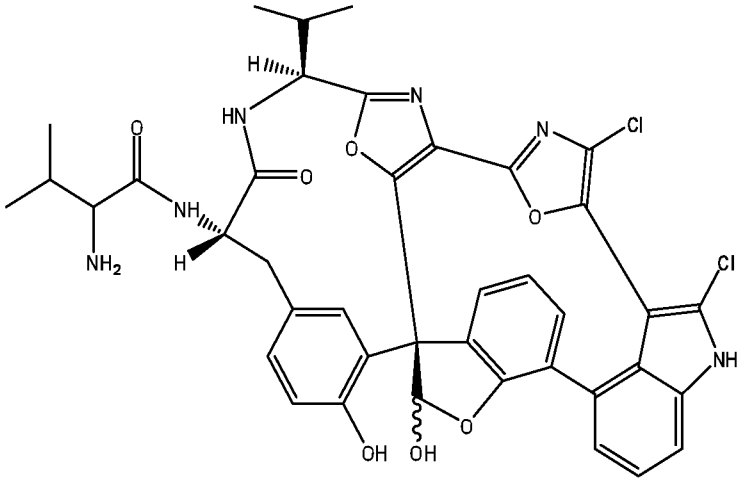
(xv)



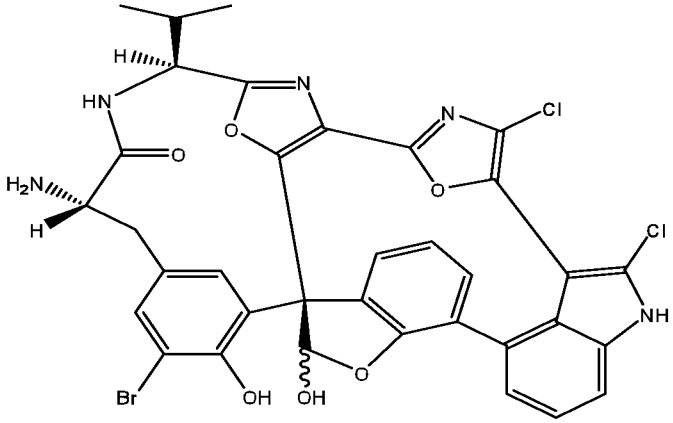
(xvi)



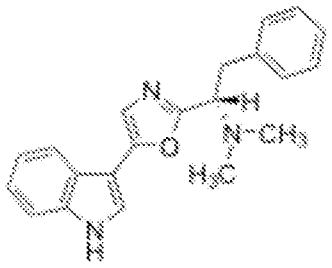
(xvii)



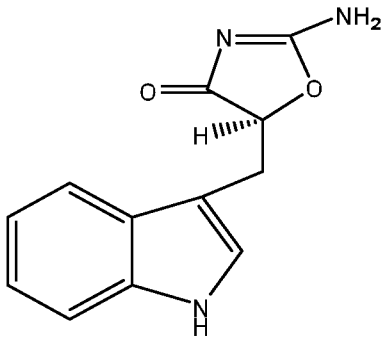
(xviii)



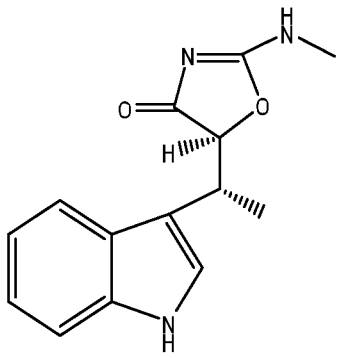
(xix)



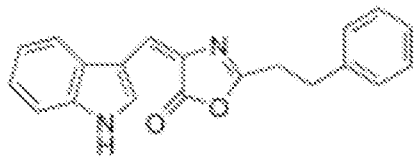
(xx)



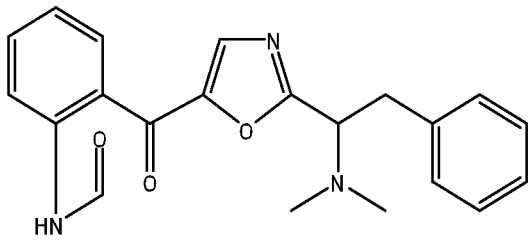
(xxi)

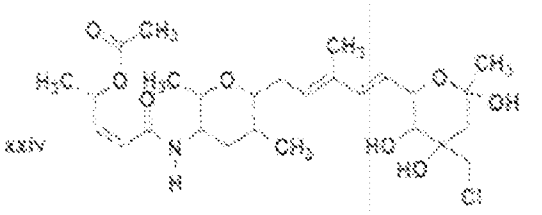


(xxii)

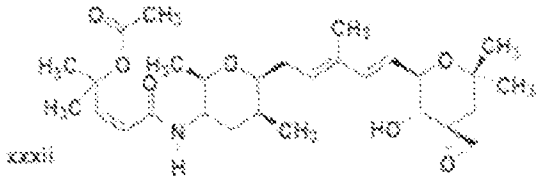


(xxiii)

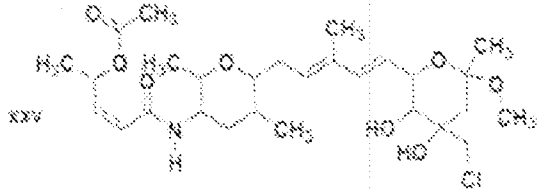




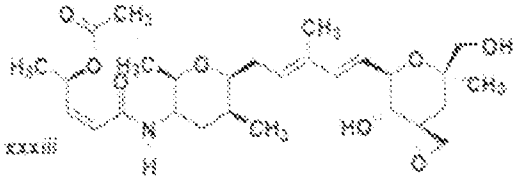
xxiv



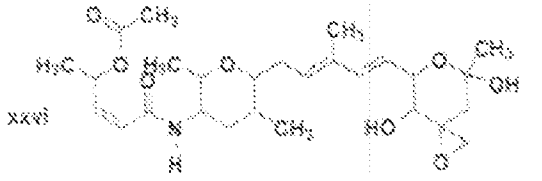
xxxii



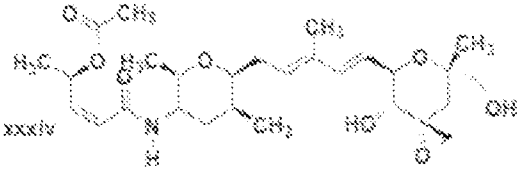
xxv



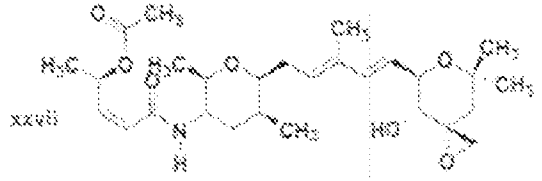
xxxiii



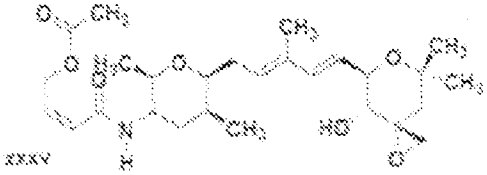
xxvi



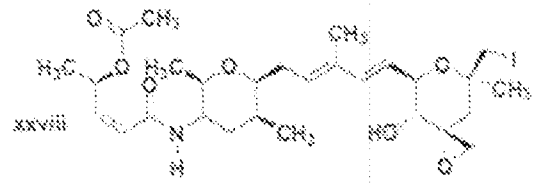
xxxiv



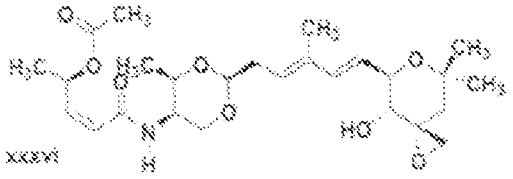
xxvii



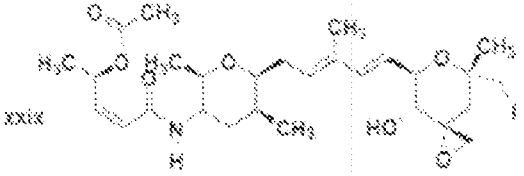
xxxv



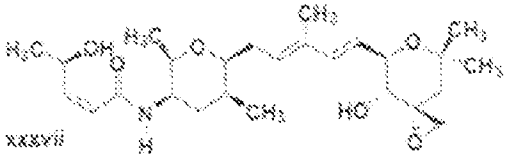
xxviii



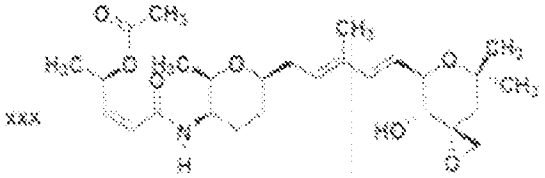
xxxvi



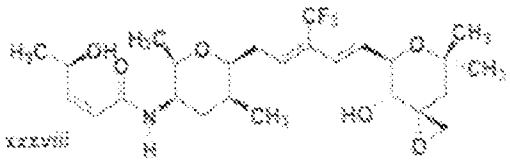
xxix



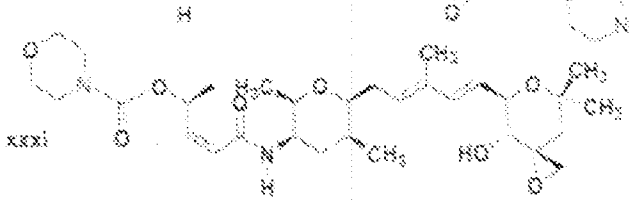
xxxvii



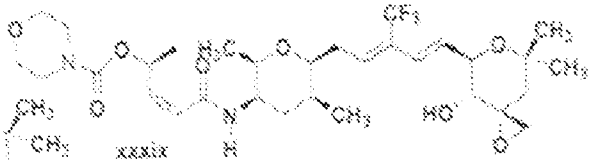
xxx



xxxviii



xxxi



xxxix

(xl) FR901465;

(xli)F8H17.

11. The method according to claim 9 or 10, wherein the *Burkholderia* species is a *Burkholderia* strain having the identifying characteristics of *Burkholderia* A396 (NRRL Accession NO B-50319).

12. The method according to claim 3, wherein said supernatant is a cell-free supernatant.

13. Use of a compound selected from the group consisting of:

(A) a compound having (i) a molecular weight of about 525-555 as determined by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS); (ii) 1H NMR values of 6.22, 5.81, 5.69, 5.66, 5.65, 4.64, 4.31, 3.93, 3.22, 3.21, 3.15, 3.10, 2.69, 2.62, 2.26, 2.23. 1.74, 1.15, 1.12, 1.05, 1.02; (iii) has 13C NMR values of 172.99, 172.93, 169.57, 169.23, 167.59, 130.74, 130.12, 129.93, 128.32, 73.49, 62.95, 59.42, 57.73, 38.39, 38.00, 35.49, 30.90, 30.36, 29.26, 18.59, 18.38, 18.09, 17.93, 12.51 and (iv) an High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) retention time of about 10-15 minutes, on a reversed phase C-18 HPLC column using a water:acetonitrile (CH_3CN) gradient;

(B) a compound having an oxazolyl-indole structure comprising at least one indole moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group, at least one carboxylic ester group, at least 17 carbons, at least 3 oxygen and at least 2 nitrogens;

(C) a compound having an oxazolyl-benzyl structure comprising at least one benzyl moiety, at least one oxazole moiety, at least one substituted alkyl group and at least one amide group; at least 15 carbons, at least 2 oxygens, at least 2 nitrogens;

(D) a compound having at least one ester, at least one amide, at least three methylene groups, at least one tetrahydropyranose moiety, at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least twenty five carbons, at least eight oxygens and at least one nitrogen and

(E) a compound having at least one ester, at least one amide, an epoxide methylene group, at least one tetrahydropyranose moiety and at least three olefinic double bonds, at least six methyl groups, at least three hydroxyl groups, at least 25 carbons, at least 8 oxygens, and at least 1 nitrogen,

and optionally a pesticide

for formulating a composition modulating proliferation and/or growth of algae and/or modulating infestation of an arachnid at a location.

15. A method for modulating proliferation and/or growth of algae and/or modulating pest infestation in a plant and/or a method for modulating emergence and/or growth of monocotyledonous, sedge or dicotyledonous weeds comprising applying to a location where

modulation of proliferation and/or growth of algae and/or modulation of infestation of an arachnid and/or modulation of emergence and/or growth of said weed is desired an amount of

(A) the formulation of claim 1 or pesticidally effective substance derived therefrom;

(B) combination of claim 5;

(C) templamide A;

(D) templamide B;

(E) FR901465;

(F) FR901228

effective to modulate said proliferation and/or growth of algae and/or pest infestation and/or emergence or growth of monocotyledonous, sedge or dicotyledonous weeds at said location.

16. The method according to claim 15, wherein nematode and/or insect infestation is modulated with templamide A; templamide B; FR901465; FR901228.

17. The method according to claim 15, wherein infestation of *Oncopeltus* sp. and/or free living nematodes and/or *M. incognita* nematodes are modulated.

18. A seed comprising the combination of claim 3 or 9 or the formulation of claim 1.

Figure 1

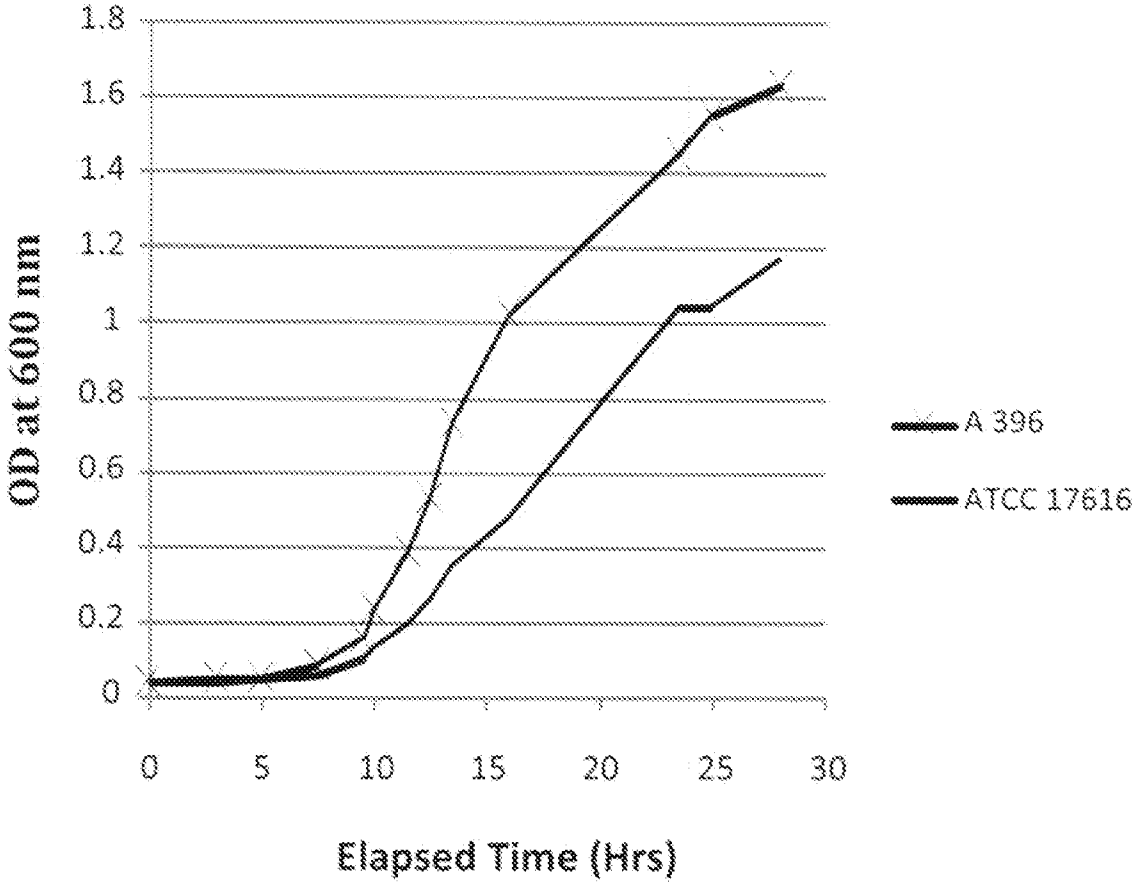
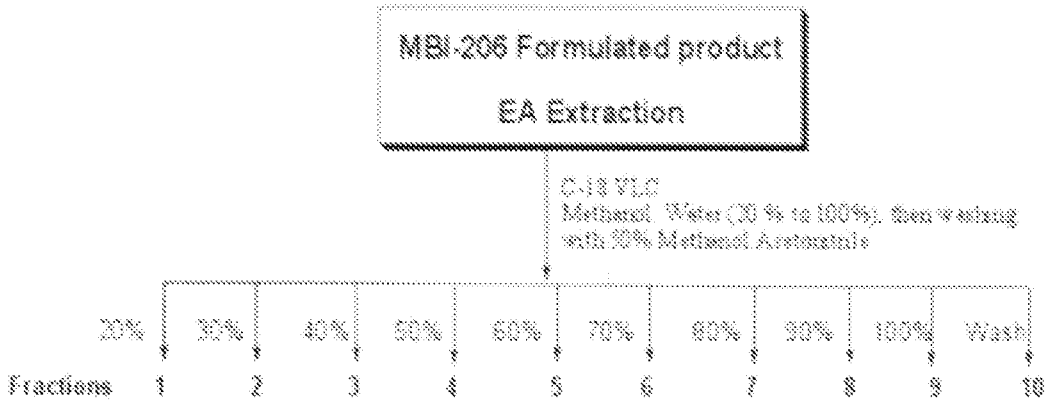

1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD at 600 nm
0
5
10
15
20
25
30
Elapsed Time (Hrs)
A 396
ATCC 17616

Figure 2-Fractionation



Bioassay data:

MBI-206-FP-F3	50	50	50	50.0	0.0
MBI-206-FP-F4	75	87.5	87.5	83.3	7.2
MBI-206-FP-F5	75	87.5	87.5	83.3	7.2
MBI-206-FP-F6	50	75	50	58.3	14.4

Figure 3

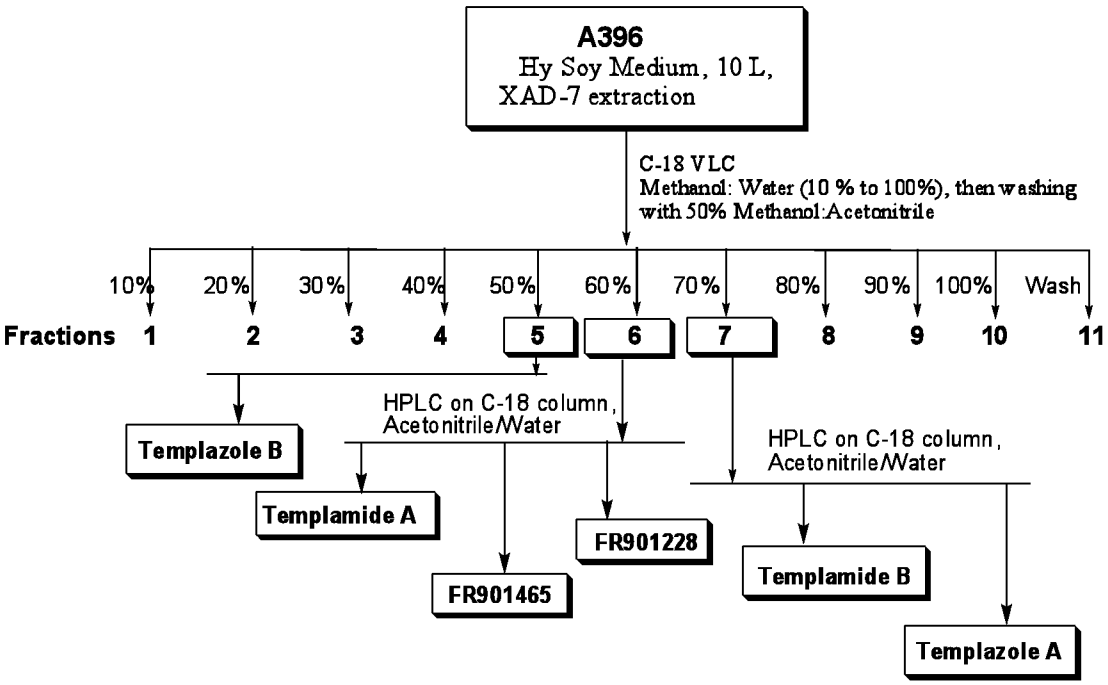

A396
Hy Soy Medium, 10 L,
XAD-7 extraction
C-18 VLC
Methanol: Water (10 % to 100%), then washing with 50% Methanol:Acetonitrile
10%
20%
30%
40%
50%
60%
70%
80%
90%
100%
Wash
Fractions 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
HPLC on C-18 column, Acetonitrile/Water
HPLC on C-18 column, Acetonitrile/Water
Templazole B
Templamide A
FR901465
FR901228
Templamide B
Templazole A

Figure 4

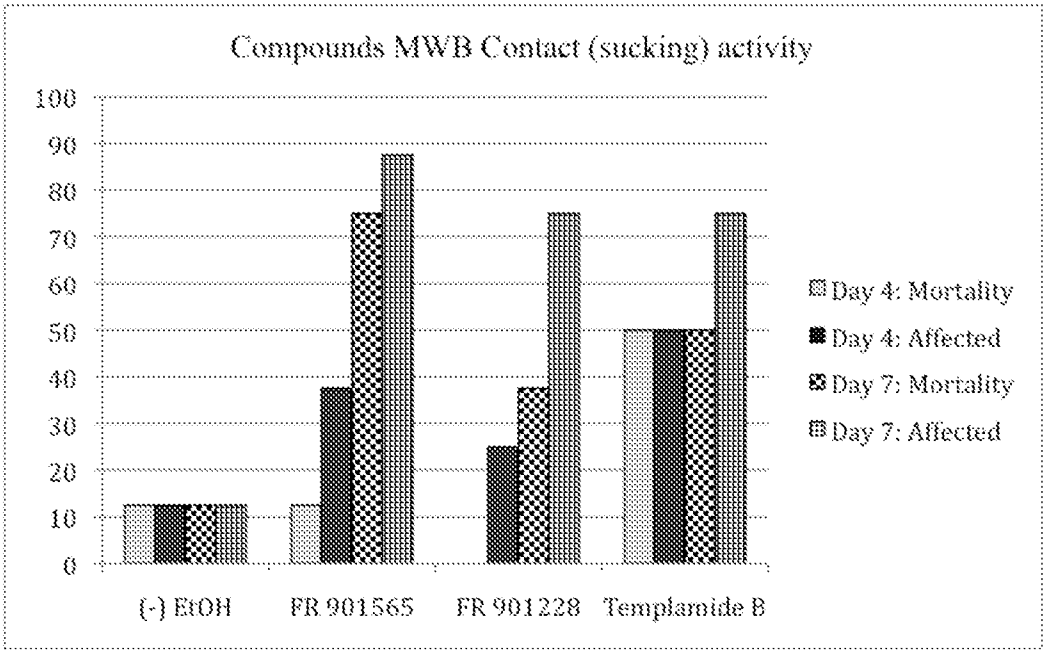
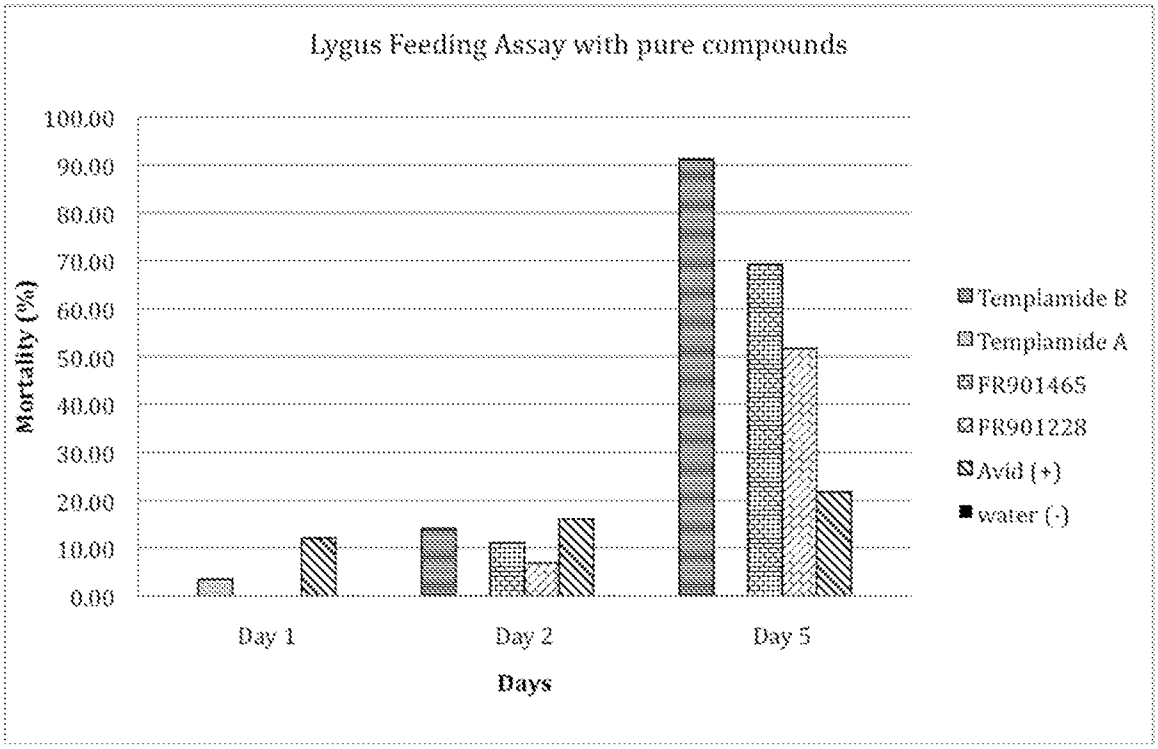

Compounds MWB Contact (sucking) activity
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
(-) EtOH
FR 901565
FR 901228
Templamide B
Day 4: Mortality
Day 4: Affected
Day 7: Mortality
Day 7: Affected

Figure 5


Lygus Feeding Assay with pure compounds
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
Mortality (%)
Day 1
Day 2
Day 5
Days
Templamide B
Templamide A
FR901465
FR901228
Avid (+)
water (-)

CEPA BACTERIANA AISLADA DEL GÉNERO *BURKHOLDERIA* Y METABOLITOS PLAGUICIDAS DERIVADOS–FORMULACIONES Y USOS

CAMPO TÉCNICO

En la presente se proporciona una especie de *Burkholderia sp* sin patogenicidad conocida para los vertebrados, tales como mamíferos, pescado y pájaros pero con actividad plaguicida contra plantas, algas, insectos, hongos, arácnidos, tales como ácaros y nematodos y formulaciones y composiciones que comprenden dichas especies. También se proporcionan productos naturales, formulaciones y composiciones derivadas de un cultivo de dicha especie y métodos de controlar algas y arácnidos, tales como ácaros, usando dicha *Burkholderia* y/o dichos productos naturales.

ANTECEDENTES

Los productos naturales son sustancias producidas por microbios, plantas, y otros organismos. Los productos naturales microbianos ofrecen una fuente abundante de diversidad química y existe una larga historia de utilización de productos naturales con fines farmacéuticos. Uno de tales compuestos es FR901228 aislado de *Chromobacterium* y se ha hallado que es útil como agente antibacteriano y agentes antitumoral (ver, por ejemplo, Ueda et al., Patente US No. 7.396.665).

Sin embargo, también se ha hallado con éxito que los metabolitos secundarios producidos por los microbios tienen usos para controlar malezas y plagas en aplicaciones agrícolas (ver, por ejemplo, Nakajima et al. 1991; Duke et al., 2000; Lydon & Duke, 1999; Gerwick et al., Patente US No. 7.393.812). Los productos microbianos naturales también se han desarrollado con éxito en insecticidas agrícolas (ver, por ejemplo, Salama et al. 1981; Thompson et al.,

2000; Krieg et al. 1983). Algunas veces, tales productos naturales se han combinado con plaguicidas químicos (ver, por ejemplo, Gottlieb, Patente US No. 4.808.207).

Acaricidas

Los acaricidas son compuestos que matan los ácaros (miticidas) y garrapatas (ixodicidas). Esta clase de alguicidas es grande e incluye antibióticos, carbamatos, acaricidas de formamidina, piretroides, reguladores del crecimiento de ácaros, y acaricidas organofosforados. Además de los plaguicidas químicos, las tierras diatomáceas y los ácidos grasos se pueden usar para controlar los ácaros. Ellos actúan normalmente a través de la alteración de la cutícula, que seca el ácaro. Además, algunos aceites esenciales tales como aceite de menta, se usan para controlar los ácaros. A pesar de la gran variedad de compuestos acaricidas conocidos, los ácaros aún son un problema serio en la agricultura debido al daño que causan en los cultivos. Ellos pueden producir varias generaciones durante la estación, lo que facilita el desarrollo rápido de resistencia a los productos acaricidas usados. En consecuencia, se necesitan críticamente nuevos productos plaguicidas con nuevos sitios blanco y nuevos modos de acción.

Alguicidas

Las algas aparecen en muchas formas. Estas incluyen: (1) algas unicelulares microscópicas, algas filamentosas que se asemejan al cabello, algas que crecen en láminas y microalgas que parecen como plantas; (2) algas que viven dentro del integumento exterior ("piel") o caparazón de calcio de algunos corales, anémonas y otros invertebrados sésiles llamados zooxantelas; (3) pequeñas manchas verdes muy difíciles de sacar que algunas veces crecen en los paneles del acuario que tampoco son algas, sino colonias de diatomeas o radiolaria (animales unicelulares microscópicos

con cáscaras duras) con algas incorporadas en su matriz.

El crecimiento de algas en una pequeña cantidad de agua retenida en un recipiente durante un período de tiempo significativo puede ser considerable, lo que es muy indeseable. Como resultado, las algas pueden causar la obstrucción de filros en los dispositivos de filtración de agua, olores y aspecto desagradables en las piletas, agotamiento del oxígeno disuelto, y sofocación de los peces y moluscos hasta la muerte. Además de estar presentes en el agua, las algas también pueden estar presentes en materiales industriales que se exponen a la intemperie y la luz, tales como cubiertas que contienen formadores de película orgánica sobre los sustratos minerales, acabados textiles, pinturas de madera y también materiales hechos de plástico.

El control de las lagas se puede dividir en cuatro categorías: controles biológicos, mecánicos, físicos y químicos. Unos pocos hechos pertinentes se aplican en todos los métodos de control de algas, Por ejemplo, los caracoles Turbo y Astrea, algunos blénidos, algunos peces cirujanos, entre otros son buenos pastoreadores. Los caracoles son los eliminadores más ampliamente usados y en general son la mejor elección. Algunas partes de los países parecen favorecer el uso de erizos de mar, peces ángeles enanos. Los primeros mueren demasiado fácilmente y mueven la decoración y los últimos pueden ser problemáticos con ingestión de invertebrados costosos. Otros métodos incluyen espumadores de proteínas funcionales, con o sin ozono y esterilizadores ultravioleta. Estos filtros físicos eliminan y destruyen las algas en exposición y ayudan a oxidar los nutrientes a medida que el agua circula. También se pueden usar antibióticos. Sin embargo, ellos tratan solo los síntomas sin tratar las causas del problema de las algas. Los factores pueden contribuir a que el sistema del

agua esté fuera del equilibrio. El cobre, usualmente en la forma de solución de sulfato de cobre se ha empleado como un alguicida, así como un agente preventivo de los parásitos epizoóticos generales. Este metal es útil en los tanques de tratamiento y cuarentena, anzuelos y disposiciones solo para peces pero es persistente y tóxico para la vida, en especial no peces.

Burkholderia

El género Burkholderia, subdivisión β de las proteobacterias, comprende más de 40 especies que habitan diversos nichos ecológicos (Compant et al., 2008). Las especies bacterianas del género *Burkholderia* son organismos ubicuos en la tierra y rizosfera (Coenye y Vandamme, 2003; Parke y Gurian-Sherman, 2001). Tradicionalmente, se han conocido como patógenos de plantas, *B. cepacia* es la primera descubierta e identificada como el patógeno que causa enfermedades en las cebollas (Burkholder, 1950). Varias especies de *Burkholderia* han desarrollado interacciones beneficiosas con sus huéspedes de planta (ver, por ejemplo, Cabballero-Mellado et al., 2004, Chen et al., 2007). También se ha hallado que algunas especies de *Burkholderia* son patógenos oportunistas humanos (ver, por ejemplo, Cheng y Currie, 2005 y Nierman et al., 2004). En forma adicional, se ha hallado que algunas especies de *Burkholderia* tienen potencial como productos de biocontrol (ver por ejemplo, Burkhead et al., 1994; Knudsen et al., 1987; Jansiewicz et al., 1988; Gouge et al., Solicitud de Patente US No. 2003/0082147; Parke et al., Patente US No. 6.077.505; Casida et al., Patente US No. 6.689.357; Jeddeloh et al., WO2001055398; Zhang et al., Patente US No. 7.141.407). Algunas especies de este género han sido efectivas en la biorehabilitación para descontaminar suelos contaminados o aguas subterráneas (ver, por ejemplo, Leahy et al. 1996). Además, se ha hallado que algunas especies de

Burkholderia secretan una variedad de enzimas extracelulares con actividades proteolíticas, lipolíticas y hemolíticas, así como toxinas, antibióticos, y sideróforos (ver, por ejemplo, Ludovic et al., 2007; Nagamatsu, 2001).

PCT/US2011/026016 describe una especie de *Burkholderia*, particularmente *Burkholderia* A396 y los compuestos derivados de dichas especies sin patogenicidad conocida para vertebrados pero con actividad contra plantas, insectos, hongos y nematodos.

Oxazoles, Tiazoles e Indoles

Los oxazoles, tiazoles e indoles están ampliamente distribuidos en las plantas, algas, esponjas y microorganismos. Un gran número de productos naturales contienen uno o más los oxazoles de 5 elementos, tiazol y núcleo/residuos de indol. Estos productos naturales exhiben un amplio espectro de actividad biológica de valor terapéutico demostrable. Por ejemplo, la bleomicina A (Tomohisa et al.), un fármaco anticáncer ampliamente descriptos, efectúa loa degradación oxidativa del ADN y usa un residuo de bitiazol para unirse a sus secuencias de ADN blanco (Vanderwall et al., 1997). La bacitracina (Ming et al., 2002), un antibiótico peptídico que contiene tiazolina, interfiere en la biosíntesis de nueva pared celular bacteriana por la complejación con C55-bactoprenolpirofosfato. Tiangazol (Kunze et al., 1993) contiene una matriz en tándem de un oxazol y tres tiazolinas y exhibe actividad antiviral (Jansen et al., 1992). Aún otros productos naturales que contienen oxazol/tiazol tal como tiostrepton (Anderson et al., 1970) y GE2270A (Selva et al., 1997) inhiben las etapas de traducción en la sínteses de proteínas bacterianas. Se han informado más de 1000 alcaloides con el esqueleto de indol provenientes de los microorganismos. Un tercio de estos compuestos son péptidos con masas superiores de 500 Da con

el indol es derivado del triptofano. La variedad estructural de los restantes dos tercios es más alta, y su actividad biológica parece abarcar un rango más amplio, que incluye a actividad antimicrobiana, antiviral, citotóxico, insecticida, antitrombótica o inhibitoria enzimática.

BREVE SÍNTESIS

Se proporcionan en la presente una cepa aislada de una no *Burkholderia cepacia,* no *Burkholderia plantari*, no *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp.* que tiene las siguientes características:

(a) Tiene una secuencia del gen de 16rARN que comprende una secuencia delantera que tiene al menos 99,5% de identidad con las secuencias expuestas en la SEQ ID NO:8, 11 y 12 y una secuencia inversa que tiene al menos 99,5% de identidad con la SEQ ID NO:9, 10, 13-15;

(b) Tiene actividad plaguicida, en particular, herbicida, alguicida, acaricida, insecticida, fungicida y nematicida;

(c) Produce al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en:

(i) un compuesto que tiene las siguientes propiedades: (a) un peso molecular de aproximadamente 525-555 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS); (b) Los valores de ^{1}H RMN 6,22, 5,81, 5,69, 5,66, 5,65, 4,64, 4,31, 3,93, 3,22, 3,21, 3,15, 3,10, 2,69, 2,62, 2,26, 2,23. 1,74, 1,15, 1,12, 1,05, 1,02; (c) tiene valores de ^{13}C RMN de 172,99, 172,93, 169,57, 169,23, 167,59, 130,74, 130,12, 129,93, 128,32, 73,49, 62,95, 59,42, 57,73, 38,39, 38,00, 35,49, 30,90, 30,36, 29,26, 18,59, 18,38, 18,09, 17,93, 12,51 y (c) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 10-15 minutos, en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua :acetonitrilo (CH_3CN) ;

(ii) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que comprende al menos un residuo indol, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo éster carboxílico; al menos 17 carbonos y al menos 3 oxígeno y 2 nitrógenos;

(iii) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos un residuo bencilo, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo amida; al menos 15 carbonos y al menos 2 oxígeno y 2 nitrógenos;

(iv) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos y al menos ocho oxígeno y un nitrógeno y

(d) Es no patogénico (no infeccioso) en animales vertebrados, tales como mamíferos, aves y peces;

(e) Es sensible a kanamicina, cloranfenicol, ciprofloxacin, piperacilina , imipenem, y una combinación de sulfametoxazol y trimetoprima y

(f) Contiene los ácidos grasos 16:0, ciclo 17:0, 16:0 3- OH, 14:0, ciclo 19:0 ω8*c*, 18:0.

En una forma de realización particular, la cepa tiene las características de identificación de una cepa *Burkholderia* A396 (NRRL No. de acceso B-50319).

En una forma de realización particular, la primera sustancia es un sobrenadante. En una forma de realización aún más particular, el sobrenadante es un sobrenadante libre de células.

También se proporciona una combinación, en particular una composición o formulación que comprende

(a) una primera sustancia seleccionada del grupo que consiste en un cultivo puro, fracción celular o

sobrenadante derivado de la cepa de *Burkholderia* que se expuso anteriormente o extracto de esta para usar opcionalmente como un plaguicida; y

(b) opcionalmente al menos uno de un portador, diluyente, tensioactivo, adyuvante, o plaguicida biológico o químico (por ejemplo, alguicida, acaricida, herbicida, fungicida, insecticida, nematicida y particularmente, alguicida o acaricida (por ejemplo, miticide)). En un aspecto relacionado, en la presente se proporciona una semilla recubierta con dicha combinación o composición.

En una forma de realización particular, la composición o formulación puede comprender:

(a) una primera sustancia seleccionada del grupo que consiste en a cultivo puro, fracción celular o sobrenadante derivado de la cepa de *Burkholderia* que se expuso anteriormente o extracto de esta para usar opcionalmente como un plaguicida;

(b) ácidos grasos 16:0, ciclo 17:0, 16:0 3-OH, 14:0, ciclo 19:0 ω8*c*, 18:0, parabeno C1-C7, alcohol C2-C17 y detergente y

(c) opcionalmente otra sustancia donde dicha otra sustancia es un plaguicida (por ejemplo, fungicida, insecticida, alguicida, acaricida (por ejemplo, miticida), herbicida, nematicida).

En una forma de realización particular, el parabeno C1-C7 alifático está presente en la cantidad de aproximadamente 0,01 - 5%, el alcohol C2-C17 está presente en la cantidad de aproximadamente 0,00-10% y el detergente está presente en la cantidad de aproximadamente 0,001-10%.

También se proporcionan las sustancias plaguicidas derivadas de la formulación que se expuso anteriormente, combinaciones que comprenden dichas sustancias plaguicidas y otro plaguicida biológico o químico y métodos para producir estas sustancias plaguicidas. En una forma de

realización particular, estas sustancias plaguicidas comprenden al menos una de las siguientes características:

(a) tiene propiedades plaguicidas y en particular, propiedades herbicidas, insecticidas, nematicidas, y fungicidas;

(b) tiene un peso molecular de aproximadamente 210-240 y más particularmente, 222 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS);

(e) tiene valores de ^{1}H RMN de δ 7,90, 6,85, 4,28, 1,76, 1,46, 1,38, 1,37, 0,94;

(d) tiene valores de ^{13}C RMN de δ 166,84, 162,12, 131,34 (2C), 121,04, 114,83 (2C), 64,32, 31,25, 28,43, 25,45, 22,18. 12,93;

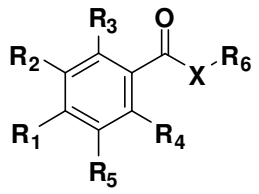
(e) tiene un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 15-20 minutos, más específicamente aproximadamente 17 minutos y aun más específicamente aproximadamente 17,45 min en una columna C-18 de HPLC de fase inversa (Phenomenex, Luna 5µ C18(2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0-20 min; 90-0% de CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100% de CH_3CN, 24-27 min; 0 - 90% de CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH_3CN acuoso) a 0,5 mL/min de caudal de flujo y detección UV de 210 nm;

(f) El espectro ^{13}C RMN exhibió 13 señales de carbono diferenciadas que se atribuyeron a un metilo, cinco carbonos de metileno, cuatro metinos, y tres carbonos cuaternarios;

(g) tiene una fórmula molecular de $C_{13}H_{18}O_3$ que se determinó por interpretación del análisis de los datos de ESIMS y RMN;

(h) tiene bandas de absorción UV entre aproximadamente 210-450 nm y más particularmente a aproximadamente 248 nm.

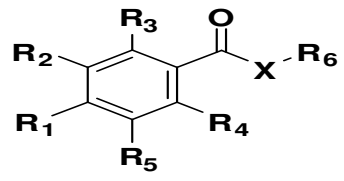
También se proporcionan compuestos que tienen la estructura que se muestra a continuación:



Donde

X, es de modo independiente –O, –NR, o –S, donde R es H o alquilo C_1–C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, y R_6 son cada uno de modo independiente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, –C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

En particular, la sustancia puede tener la estructura

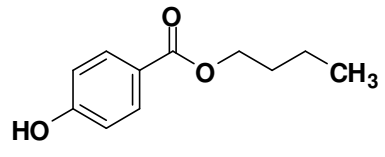


Donde

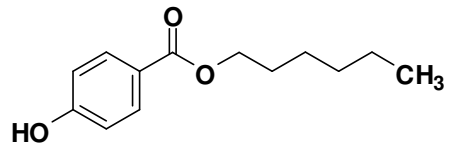
X, es de modo independiente –O, –NR, o –S, donde R es H o alquilo C_1–C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, y R_6 son cada uno de modo independiente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido,

hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, –C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

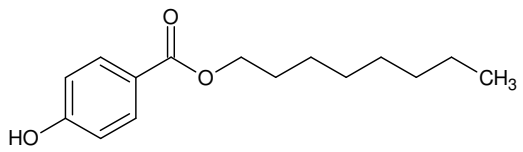
En una forma de realización más particular, el compuesto es butil parabeno con la siguiente estructura:



En una forma de realización más particular, el compuesto es hexil parabeno con la siguiente estructura:



En una forma de realización más particular, el compuesto es octil parabeno con la siguiente estructura:



La sustancia plaguicida derivada de la formulación expuesta anteriormente se puede obtener por

(a) provisión de la formulación expuesta anteriormente;

(b) incubación o conservación de la formulación provista durante un tiempo suficiente (por ejemplo, entre aproximadamente 1 día a aproximadamente 6 meses) y a una temperatura suficiente (por ejemplo, entre aproximadamente 3°C a aproximadamente 50°C) para producir la sustancia plaguicida(s) y

(c) aislar la sustancia plaguicida.

En un aspecto relacionado, se describe un método para modular la proliferación y/o crecimiento de una plaga que incluye pero sin limitación a insectos, hongos, malezas, nematodos, arácnidos, algas y particularmente, algas, arácnidos (por ejemplo, ácaros, garrapatas) que comprende aplicar en una localización donde se desea la modulación de

la proliferación y/o el crecimiento de una plaga una cantidad de:

(I)(a) al menos una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en un cultivo celular, fracción celular, sobrenadante sustancialmente puro derivado de la cepa de *Burkholderia* expuesta anteriormente o extracto de esta y (b) opcionalmente otra sustancia, donde dicha sustancia es un plaguicida, o

(II) la combinación, composición o formulación o sustancias plaguicidas derivadas de dicha formulación expuesta anteriormente, efectiva para modular la proliferación y/o el crecimiento de una plaga en dicha localización.

En la presente se describen compuestos aislados que opcionalmente se pueden obtener o derivar de la especie *Burkholderia* o alternativamente, organismos capaces de producir estos compuestos que se pueden usar para controlar varias plagas, particularmente plagas fitopatogénicas de plantas, cuyos ejemplos incluyen, pero sin limitación insectos, nematodos, bacterias, hongos. Estos compuestos también se pueden usar como herbicidas, acaricidas o alguicidas.

En particular, los compuestos plaguicidas aislados pueden incluir pero sin limitación:

(A) un compuesto que tiene las siguientes propiedades: (i) un peso molecular de aproximadamente 525-555 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS); (ii) Los valores de ^{1}H RMN 6,22, 5,81, 5,69, 5,66, 5,65, 4,64, 4,31, 3,93, 3,22, 3,21, 3,15, 3,10, 2,69, 2,62, 2,26, 2,23. 1,74, 1,15, 1,12, 1,05, 1,02; (iii) tiene valores de ^{13}C RMN de 172,99, 172,93, 169,57, 169,23, 167,59, 130,74, 130,12, 129,93, 128,32, 73,49, 62,95, 59,42, 57,73, 38,39, 38,00, 35,49, 30,90, 30,36, 29,26, 18,59, 18,38, 18,09, 17,93, 12,51 y (iv) un tiempo de

retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 10-15 minutos, en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua :acetonitrilo (CH_3CN) ;

(B) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que comprende al menos un residuo indol, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo éster carboxílico; al menos 17 carbonos y al menos 3 oxígeno y 2 nitrógenos;

(C) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos un residuo bencilo, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo amida; al menos 15 carbonos y al menos 2 oxígeno y 2 nitrógenos;

(D) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos y al menos ocho oxígeno y un nitrógeno y

(E) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, un grupo epóxido de metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos, al menos 8 oxígenos y al menos 1 nitrógeno.

En una forma de realización particular, los compuestos aislados pueden incluir pero sin limitación:

(A) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que comprende al menos un residuo indol, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido, al menos un grupo éster carboxílico, al menos 17 carbonos, al menos 3 oxígenos y al menos 2 nitrógenos; y que tiene al menos de uno de los siguientes: (i) un peso molecular de

aproximadamente 275-435; (ii) ^{1}H RMN δ valores en 8,44, 8,74, 8,19, 7,47, 7,31, 3,98, 2,82, 2,33, 1,08; (iii) ^{13C} RMN valores de δ 163,7, 161,2, 154,8, 136,1, 129,4, 125,4, 123,5, 123,3, 121,8, 121,5, 111,8, 104,7, 52,2, 37,3, 28,1, 22,7, 22,7; (iv) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 10-20 minutos en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) y detección UV de 210 nm; (v) bandas de absorción UV a aproximadamente 226, 275, 327 nm.;

(B) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos un residuo bencilo, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo amida; al menos 15 carbonos y al menos 2 oxígenos, al menos 2 nitrógenos; y al menos una de las siguientes características: (i) un peso molecular de aproximadamente 240-290 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS); (ii) ^{1}H RMN δ valores en aproximadamente 7,08, 7,06, 6,75, 3,75, 2,56, 2,15, 0,93, 0,93; (iii) ^{13C} RMN valores de δ 158,2, 156,3, 155,5, 132,6, 129,5, 129,5, 127,3, 121,8, 115,2, 115,2, 41,2, 35,3, 26,7, 21,5, 21,5; (iv) a cromatografía líquida de alta presión **(**HPLC) tiempo de retención de aproximadamente 6-15 minutos, en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua :acetonitrilo (CH_3CN) y (v) bandas de absorción UV a aproximadamente 230, 285, 323 nm;

(C) un compuesto no epóxido que comprende al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos, al menos ocho oxígenos y un nitrógeno y al menos una de las

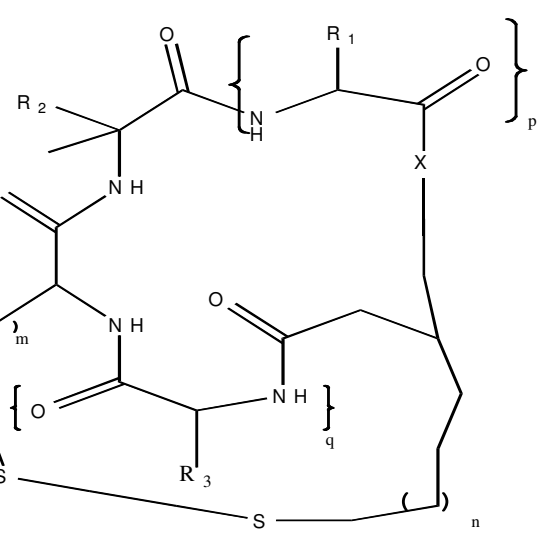
siguientes características: (i) un peso molecular de aproximadamente 530-580 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS); (ii) Los valores de ^{1}H RMN δ 6,40, 6,39, 6,00, 5,97, 5,67, 5,54, 4,33, 3,77, 3,73, 3,70, 3,59, 3,47, 3,41, 2,44, 2,35, 2,26, 1,97, 1,81, 1,76, 1,42, 1,37, 1,16, 1,12, 1,04; (iii) ^{13}C RMN valores de δ 173,92, 166,06, 145,06, 138,76, 135,71, 129,99, 126,20, 123,35, 99,75, 82,20, 78,22, 76,69, 71,23, 70,79, 70,48, 69,84, 60,98, 48,84, 36,89, 33,09, 30,63, 28,55, 25,88, 20,37, 18,11, 14,90, 12,81, 9,41; (iv) a tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 7-12 minutos, en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) y detección UV de 210 nm; (v) una fórmula molecular de $C_{28}H_{45}NO_{10}$ que se determinó por interpretación del análisis de los datos de ESIMS y RMN; (vi) bandas de absorción UV entre aproximadamente 210-450 nm;

(D) un compuesto que comprende (i) al menos un éster, al menos una amida, un grupo epóxido de metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos, al menos 8 oxígenos y al menos 1 nitrógeno, (ii) ^{13}C RMN valores de δ174,03, 166,12, 143,63, 137,50, 134,39, 128,70, 126,68, 124,41, 98,09, 80,75, 76,84, 75,23, 69,87, 69,08, 68,69, 68,60, 48,83, 41,07, 35,45, 31,67, 29,19, 27,12, 24,55, 19,20, 18,95, 13,48, 11,39, 8,04, (iii) una fórmula molecular de $C_{28}H_{43}NO_9$ y al menos uno de: (a) ^{1}H RMN δ valores en aproximadamente 6,41, 6,40, 6,01, 5,97, 5,67, 5,55, 4,33, 3,77, 3,75, 3,72, 3,64, 3,59, 3,54, 3,52, 2,44, 2,34, 2,25, 1,96, 1,81, 1,76, 1,42, 1,38, 1,17, 1,12, 1,04; (b) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de

alta presión (HPLC) de aproximadamente 6-15 minutos, en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua :acetonitrilo (CH_3CN) ; (c) banda de absorción UV entre aproximadamente 210-450 nm y más particularmente a aproximadamente 234 nm.

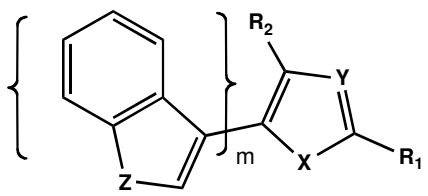
En una forma de realización más particular, se proporciona compuestos que incluyen pero sin limitación:

(A) un compuesto que tiene la estructura ##STR001##



o una de sus sales o estereoisómeros aceptable para uso como plaguicida, donde M es 1, 2, 3 o 4; n es 0, 1, 2, o 3; p y q son de modo independiente 1 o 2; X es O, NH o NR; R1, R2 y R3 son iguales o diferentes y de modo independiente un residuo de la cadena lateral de aminoácido o un derivado de la cadena lateral de aminoácido y R es un residuo alquilo, arilo o arilalquilo de cadena inferior;

(B) un compuesto que tiene la estructura ##STR002##

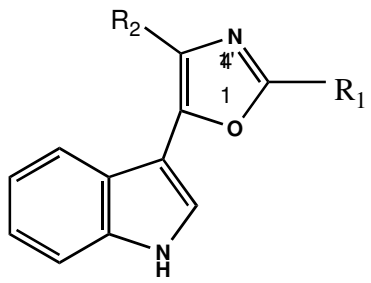


##STR002##

donde X, Y y Z son cada uno de modo independiente --O, --NR_1, o --S, donde R_1 es --H o alquilo C_1-C_{10}; R_1, R_2 y m son

cada uno de modo independiente --H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo y "m" se puede ubicar en cualquier parte sobre el anillo oxazol;

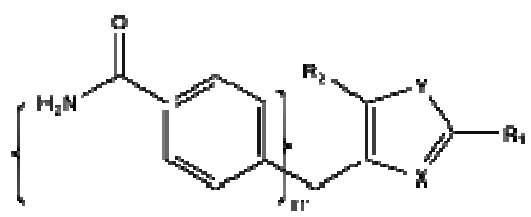
(C) un compuesto que tiene la estructura ##STR002a##.



##STR002a##

donde R_1 es --H o alquilo C_1–C_{10}; R_2 es un éster alquílico;

(D) un compuesto que tiene la estructura ##STR003##

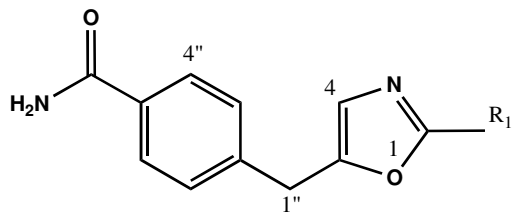


##STR003##

donde: X e Y son cada uno de modo independiente --OH, --NR_1, o --S, donde R_1 es --H o alquilo C_1–C_{10}; R_1, R_2 y m, un sustituyente del anillo oxazol, son cada uno de modo independiente --H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi,

halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

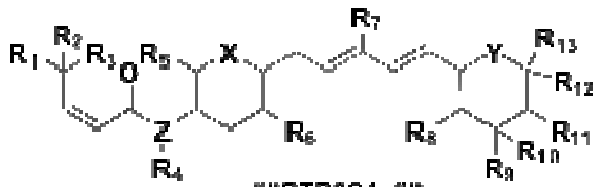
(E) un compuesto que tiene la estructura ##STR003a##



##STR003a##

donde R_1 es --H o alquilo C_1–C_{10};

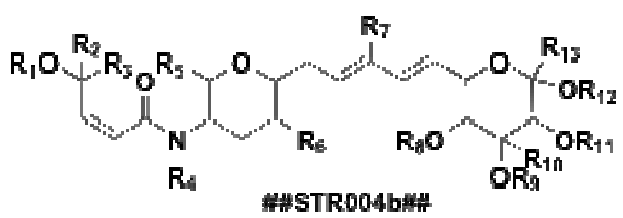
(F) un compuesto que tiene la estructura ##STR004a##



##STR004a##

Donde X, Y y Z son cada uno de modo independiente –O, –NR, o –S, donde R es H o alquilo C_1–C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son cada uno de modo independiente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, –C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

(G) un compuesto que tiene la estructura ##STR004b##

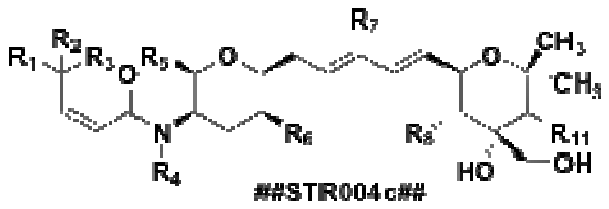


##STR004b##

donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son cada uno de modo independiente H, alquilo, alquilo

sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

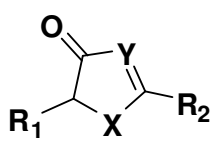
(H) un compuesto que tiene la estructura ##STR004c##



##STR004c##

donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, son cada uno de modo independiente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

(I) un compuesto que tiene la estructura ##STR005##

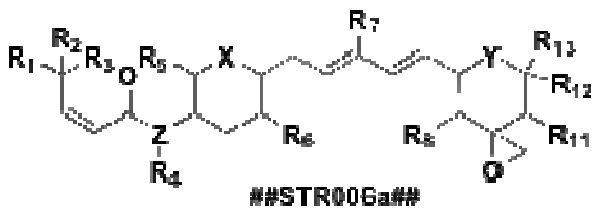


##STR005##

donde X e Y son cada uno de modo independiente --OH, $--NR_1$, o --S, donde R_1, R_2 son cada uno de modo independiente --H, alquilo (por ejemplo, alquilo C_1-C_{10}), alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico

sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

(J) un compuesto que tiene la estructura ##STR006a##



##STR006a##

Donde X, Y y Z son cada uno de modo independiente –O, –NR, o –S, donde R es H o alquilo C_1–C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son cada uno de modo independiente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, –C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

En una forma de realización más particular, los compuestos pueden incluir pero sin limitación

(i) templazol A;

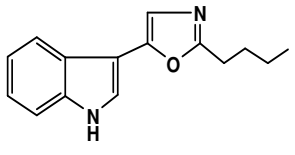
(ii) templazol B;

(iii) templamida A;

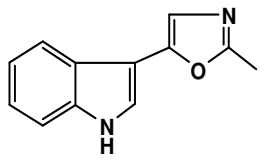
(iv) templamida B;

(v) FR901228;

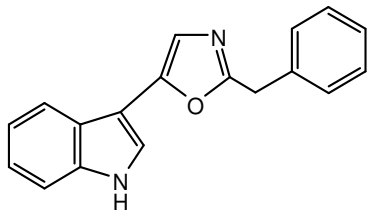
(vi)



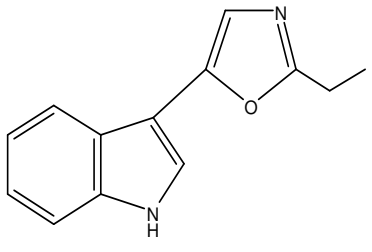
(vii)



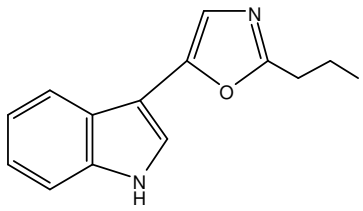
(viii)



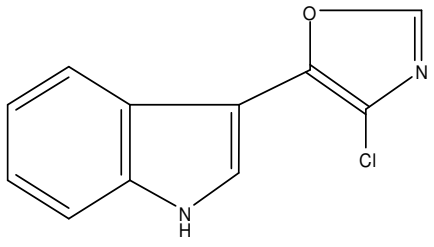
(ix)



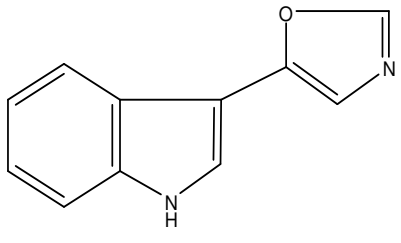
(x)



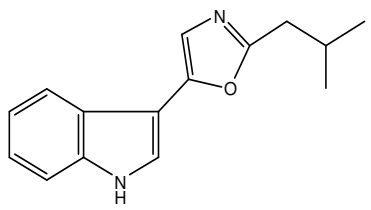
(xi)



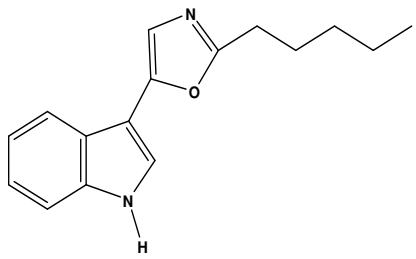
(xii)



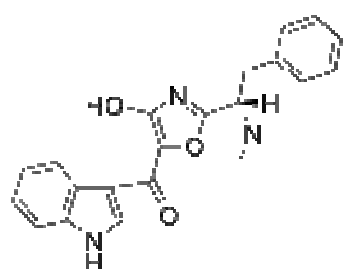
(xiii)



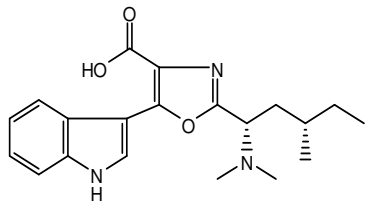
(xiv)



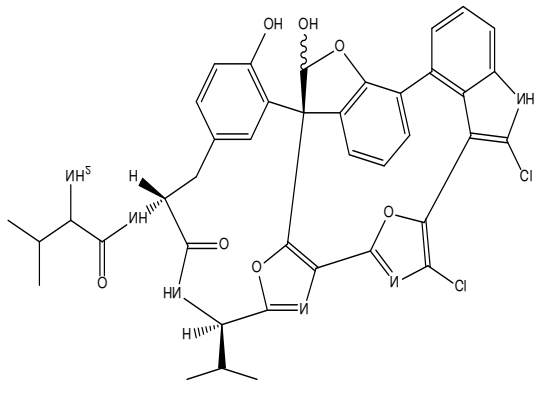
(xv)



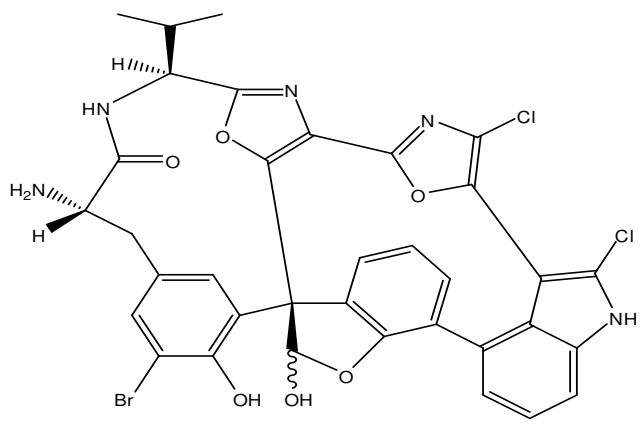
(xvi)



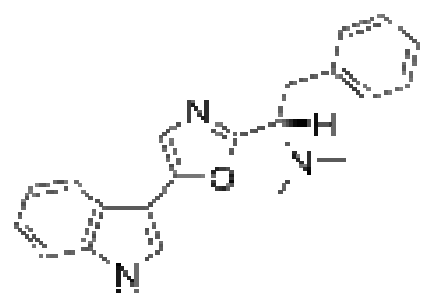
(xvii)



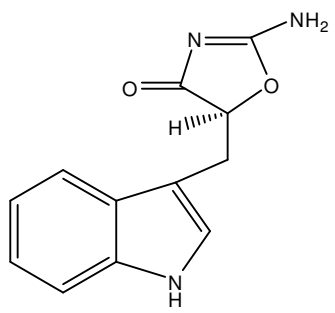
(xviii)



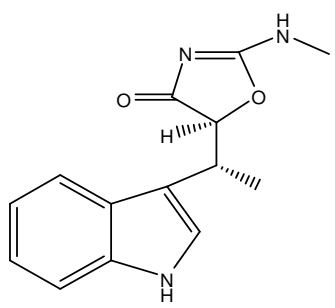
(xix)



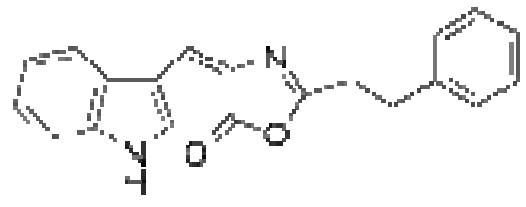
(xx)



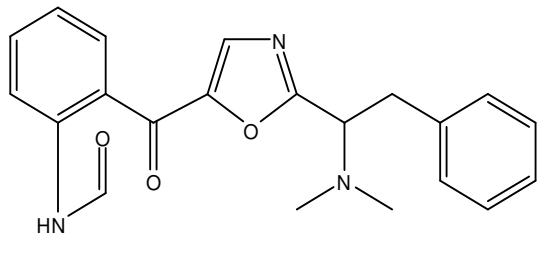
(xxi)

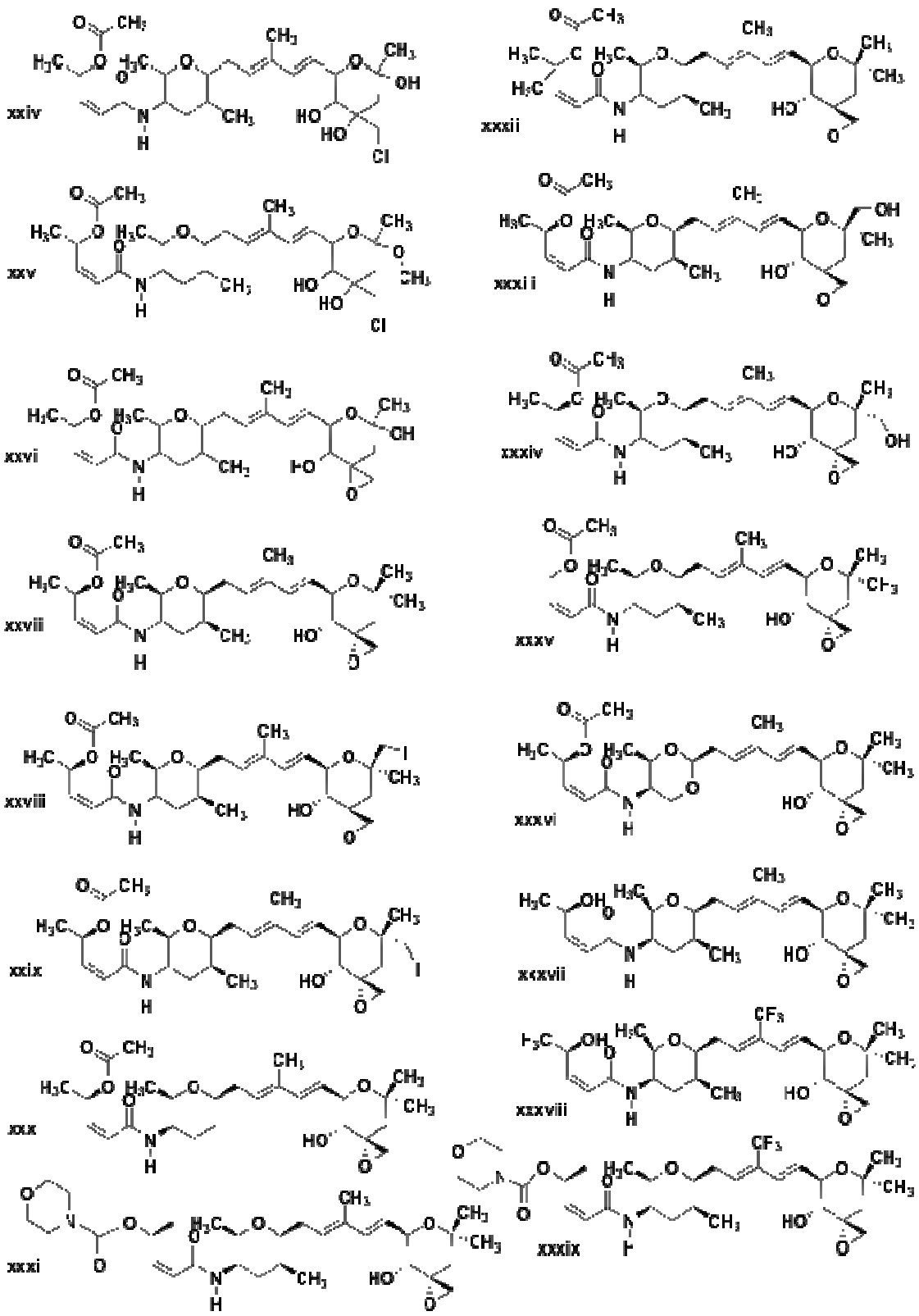


(xxii)



(xxiii)





(xl) FR901465;

(xli) F8H17, un compuesto activo de la fracción F8, al que se ha asignado un peso molecular de 1080 sobre la base del

pico de ion molecular en 1081,75 (M + H) en modo positivo de ESI y también se confirmó por el ESIMS negativo con pico base en 1079,92. Este compuesto mostró absorción UV en 234 nm.

En un aspecto relacionado, se describe un método para modular la proliferación y/o el crecimiento de una plaga (por ejemplo, algas, arácnidos, nematodos, insectos, hongos) que comprende aplicar en una localización donde se desea una modulación de proliferación y/o crecimiento de una plaga (por ejemplo, algas, arácnidos, nematodos, insectos, hongos) una cantidad de

(I) (a) los compuestos aislados expuesto anteriormente y (b) opcionalmente otra sustancia, donde dicha sustancia es un alguicida o

(II) la composición o combinación expuesta anteriormente

en una cantidad efectiva para modular la proliferación y/o el crecimiento de la plaga en dicha localización.

En otro aspecto relacionado, se describe un método para modular la proliferación y/o el crecimiento de algas y/o modular la infestación con plagas en una planta y/o un método para modular la emergencia y/o crecimiento de malezas monocotiledóneas, juncos o dicotiledóneas que comprende aplicar en una localización donde se desea la modulación de la proliferación y/o el crecimiento de algas y/o modulación de la infestación de un arácnido y/o modulación de la emergencia y/o el crecimiento de dicha maleza una cantidad de

(A) la formulación expuesta anteriormente o sustancia efectiva como plaguicida derivada de esta;

(B) la combinación expuesto anteriormente;

(C) templamida A;

(D) templamida B;

(E) FR901465;

(F) FR901228

efectiva para modular dicah proliferación y/o crecimiento de algas y/o infestación con plagas y/o emergencia o crecimiento de malezas monocotiledóneas, juncos o dicotiledóneas en dicha localización. La infestación con nematodos y/o insectos se modula con templamida A, templamida B, FR901465 y/o FR901228. En una forma de realización más particular, se modulan la infestación de insectos, específicamente *Oncopeltus* sp. (por ejemplo, *O. fasciatus*) y/o *Lygus* sp. y/o nematodos de vida libre y/o nematodos parasitarios (por ejemplo, *M. incognita*).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la comparación de la tasa de crecimiento de *Burkholderia* A396 con *Burkholderia multivorans* ATCC 17616.

La Figura 2 muestra el esquema general usado para obtener fracciones de MBI-206 formulada.

La Figura 3 muestra el esquema general usado para obtener fracciones y los compuestos de un cultivo de MBI-206.

La Figura 4 muestra las actividades insecticidas (chupadores) de los compuestos analizados contra chinches (*Oncopeltus fasciatus*).

La Figura 5 muestra las actividades insecticidas (ingestión) de los compuestos puros contra *Lygus Hesperus*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN

Si bien las composiciones y métodos de aquí en adelante son susceptibles para diversas modificaciones y formas alternativas, en la presente se describirán en detalles ejemplos de formas de realización. Se debe entender, sin embargo, que no existe intento de limitar la

invención a las formas particulares descriptas, sino que por el contrario, la intención es cubrir todas modificaciones, equivalentes, y alternativas que se incluyen dentro del espíritu y alcance de la invención definido por las reivindicaciones anexas.

Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor interviniente, a la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto establezca claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de este rango y cualquier otro valor indicado o interviniente en este rango indicado, se incluye en es la presente. Los rangos más pequeños también se incluyen. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños también se incluyen en la presente, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el rango indicado.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que son comúnmente entendidos por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Si bien cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descriptos en la presenten también se pueden usar en la práctica o análisis de la presente invención, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos.

Cabe mencionar que como se usa en la presente y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un” "y" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Como se define en la presente, “derivado de” significa aislado u obtenido directamente de una fuente particular o alternativamente que tiene características de identificación de una sustancia u organismos aislado u obtenido de una fuente particular.

Como se define en la presente, un “compuestos aislado” está esencialmente libre de otros compuestos o sustancias, por ejemplo, al menos aproximadamente 20% puro, con preferencia al menos aproximadamente 40% puro, con más preferencia aproximadamente 60% puro, aun con más preferencia aproximadamente 80% puro, con máxima preferencia aproximadamente 90% puro, y aún con máxima preferencia aproximadamente 95% puro, determinado por métodos analíticos, que incluyen pero sin limitación métodos cromatográficos, métodos electroforéticos.

Como se usa en la presente, el término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada monovalente que tiene de uno a aproximadamente 12 átomos de carbono, que incluye metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, ter-butilo, n-hexilo, y similares.

Como se usa en la presente, "alquilo sustituido" se refiere a grupos alquilo que también portan uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxi, alcoxi, mercapto, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, halógeno, ciano, nitro, amino, amido, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carboxilo, sulfonilo, sulfonamida, sulfurilo, y similares.

Como se usa en la presente, "alquenilo" se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada que tienen uno o más enlaces doble carbono-carbono, y que tiene en el rango de aproximadamente 2 hasta 12 átomos de carbono, y "alquenilo sustituido" se refiere los grupos alquenilo que también portan uno o más sustituyentes expuestos anteriormente.

Como se usa en la presente, "alquinilo" se refiere a a grupos hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada que

tienen uno o más enlaces triple carbono-carbono, y y que tiene en el rango de aproximadamente 2 hasta 12 átomos de carbono, "alquinilo sustituido se refiere a grupo alquinilo que también portan uno o más sustituyentes expuestos anteriormente.

Como se usa en la presente, "arilo" se refiere a grupos aromáticos que tienen en el rango de 6 hasta 14 átomos de carbono y "arilo sustituido" se refiere a grupos arilo que también portan uno o más sustituyentes expuestos anteriormente.

Como se usa en la presente, "heteroarilo" se refiere a anillos aromáticos que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, O, S, o similares) como parte de esta estructura anular, y que tiene en el rango de 3 hasta 14 átomos de carbono y "heteroarilo sustituido" se refiere grupos heteroarilo que también portan uno o más sustituyentes expuestos anteriormente.

Como se usa en la presente, "alcoxi" se refiere al residuo --O-alquilo-, donde alquilo es como se definió anteriormente, y "alcoxi sustituido" se refiere grupos alcoxilo que también portan uno o más sustituyentes expuestos anteriormente.

Como se usa en la presente, "tioalquilo" se refiere al residuo --S-alquilo-, donde alquilo es como se definió anteriormente, y "tioalquilo sustituido" se refiere a grupos tioalquilo que también portan uno o más sustituyentes expuestos anteriormente.

Como se usa en la presente, "cicloalquilo" se refiere grupos alquilo que contiene un anillo en el rango de aproximadamente 3 hasta 8 átomos de carbono, y "cicloalquilo sustituido" se refiere a grupos cicloalquilo que también portan uno o más sustituyentes expuestos anteriormente.

Como se usa en la presente, "heterocíclico", se refiere a grupos cíclicos (es decir, que contienen un anillo) que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo, N, O, S, o similares) como parte de la estructura anular, y que tiene en el rango de 3 hasta 14 átomos de carbono y "heterocíclico sustituido" se refiere a grupos heterocíclicos que además portan uno o más de los sustituyente expuestos anteriormente.

Como se usa en la presente “algas” se refiere a alguno de los diversos organismos principalmente acuáticos, eucarióticos, fotosintéticos, que varían de tamaño desde formas unicelulares a la kelp gigante. El término también se puede referir protistas fotosintéticos responsables de mayor parte de la fotosíntesis en la tierra. Como grupo, las algas son polifiléticas. Por consiguiente, el término se puede referir a cualquier protista considerado como algas de los siguientes grupos, alveoladas, chlorarachniophytes, criptomonadas, euglenoides, glaucofitas, haptofitos, algas rojas tales como Rhodophyta, stramenopiles, y viridaeplantae. El término se refiere las algas verde, amarillo verdoso, marrón, y rojo en los eucariotas. El término también se puede referir a las cianobacterias de los procariotas. El término también se refiere a algas verdes, algas azules, y lagas rojas.

Como se usa en la presente “alguicida” se refiere a uno o más agentes, compuestos y/o composiciones que tienen actividad alguistática y/o alguicida.

Como se usa en la presente “alguicida” como se usa en la presente significa la muerte de las algas.

Como se usa en la presente “alguistático” como se usa en la presente significa que inhibe el crecimiento de algas, lo que puede ser reversible en ciertas condiciones.

La cepa Burkholderia

La cepa *Burkholderia* expuesta en la presente una no complejo de *Burkholderia cepacia* complex, no *Burkholderia plantari*, no *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp* y no patogénica para los vertebrados tales como aves, mamíferos y peces. Esta cepa se puede aislar de una muestra de suelo usando procedimientos conocidos en la en la técnica y descriptos por Lorch et al., 1995. La cepa *Burkholderia* se puede aislar de muchos tipos celulares diferentes de suelo o medio de crecimiento. La muestra luego se siembra en agar de dextrosa de papa (PDA). Las bacterias son gramnegativas, y forma colonias redondas, color crema opacas que cambian a color rosa marrón rosado y mucoide o viscosa con el tiempo.

Las colonias se aíslan de las placas de agar dextrosa de papa y se analizan para determinar las que tienen características biológicas, genéticas, bioquímicas y/o enzimáticas de la cepa *Burkholderia* de la presente invención expuesta en los siguientes Ejemplos. En particular, la cepa *Burkholderia* tiene un gen de ARNr 16S que comprende una secuencia delantera que es al menos aproximadamente 99,5%, con más preferencia aproximadamente 99,9% y con máxima preferencia aproximadamente 100% idéntica con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 8, 11 y 12 y una secuencia delantera que es al menos aproximadamente 99,5%, con más preferencia aproximadamente 99,9% y con máxima preferencia aproximadamente 100% identical con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9, 10, 13, 14 y 15 determinado por análisis clustal. Además, como se expone a continuación, esta cepa *Burkholderia*, como se expone a continuación, puede tener actividad plaguicida, particularmente, viricida, herbicida, germicida, fungicida, nematicida, bactericida e insecticida y más particularmente, actividad herbicida, alguicida, acaricida, insecticida, fungicida y nematicida. No es patogénica para

los animales vertebrados, tales como mamífero, aves y peces.

En forma adicional, la cepa de *Burkholderia* produces al menos los compuestos plaguicidas expuestos en la presente descripción.

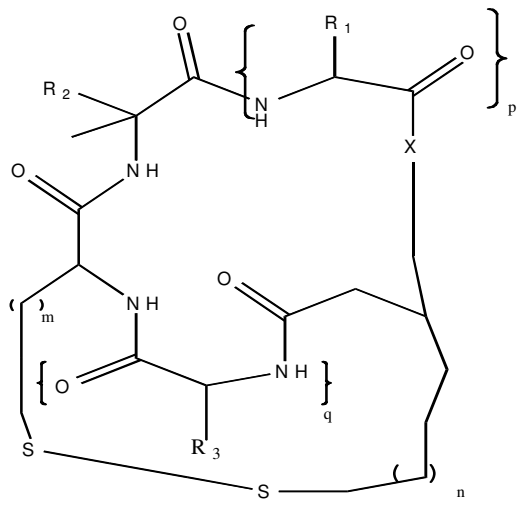
La cepa de *Burkholderia* es sensible a kanamicina, cloranfenicol, ciprofloxacin, piperacilina, imipenem, y una combinación de sulfametoxazol y trimetoprima y contiene los ácidos grasos 16:0, ciclo 17:0, 16:0 3- OH, 14:0, ciclo 19:0, 18:0.

Esta cepa de *Burkholderia* se puede obtener por el cultivo de un microorganismo que tiene las características de identificación de *Burkholderia* A396 (NRRL No, de acceso B-50319) en agar dextrosa y papa (PDA) o en un medio de fermentación que contiene fuentes de carbono definidas tales como glucosa, maltosa, fructosa, galactosa, y fuentes de nitrógeno no definidas tales como peptona, tristona, soytone, y NZ amina.

Compuestos alguicidas y acaricidas

Los compuestos alguicidas y acaricidas descriptos en la presente pueden tener las siguientes propiedades: (a) se pueden obtener de una nueva especie de *Burkholderia*, por ejemplo, A396; (b) es, en particular, tóxica para las plagas de insectos agrícolas más comunes; (c) tiene un peso molecular de aproximadamente 525-555 y más particularmente, 540 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS); (d) tiene valores de ^{1}H RMN de 6,22, 5,81, 5,69, 5,66, 5,65, 4,64, 4,31, 3,93, 3,22, 3,21, 3,15, 3,10, 2,69, 2,62, 2,26, 2,23. 1,74, 1,15, 1,12, 1,05, 1,02; (d) tiene valores de ^{13}C RMN de 172,99, 172,93, 169,57, 169,23, 167,59, 130,74, 130,12, 129,93, 128,32, 73,49, 62,95, 59,42, 57,73, 38,39, 38,00, 35,49, 30,90, 30,36, 29,26, 18,59, 18,38, 18,09, 17,93, 12,51 (e) tiene un tiempo de

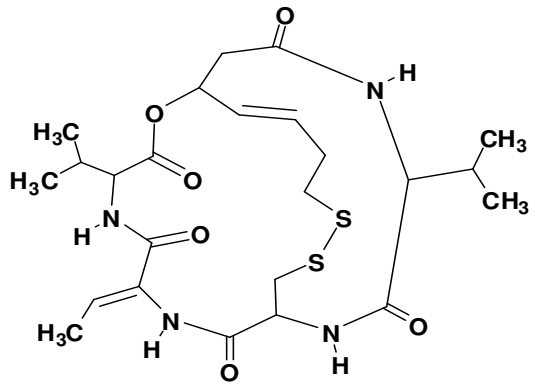
retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 10-15 minutos, más específicamente aproximadamente 12 minutos y aun más específicamente aproximadamente 12,14 min en una columna C-18 de HPLC de fase inversa (Phenomenex, Luna 5µ C18 (2) 100A, 100 x 4,60 mm) usando un gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0-20 min 90-0% de CH_3CN acuoso, 20-24 min 100% de CH_3CN, 24-27 min, 0-90% de CH_3CN acuoso, 27-30 min 90% de CH_3CN acuoso) con un caudal de flujo de 0,5 mL/min y detección UV de 210 nm (f) tiene una fórmula molecular, $C_{24}H_{36}N_4O_6S_2$, que se determina por la interpretación de los datos de ^{1}H,^{13}C RMN y LC/MS (g) un espectro de ^{13}C RMN con señales para los 24 carbonos, que incluyen 5 metilos, 4 metilenos, 9 metinos y 6 carbonos cuaternarios y (g) el espectro de ^{1H} RMN que exhibe características de un depsipéptido típico, que ilustra tres protones -amino [4,63, 4,31, 3,93], y un protón de éster carbinol [5,69]. En una forma de realización particular, el compuesto tiene la estructura ##STR001##:



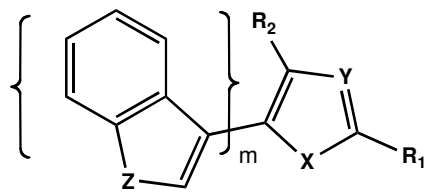
O una de sus sales o estereoisómeros aceptables para uso como plaguicida donde M es 1, 2, 3 o 4; n es 0, 1, 2, o 3; p y q son de modo independiente 1 o 2; X es O, NH o NR; R1, R2 y R3 son iguales o diferentes y de modo independiente un residuo de la cadena lateral de aminoácido o un derivado de

la cadena lateral de aminoácido y R es un residuo alquilo, arilo o arilalquilo de cadena inferior.

En una forma de realización aun más particular, el compuesto tiene la estructura de FR901228:



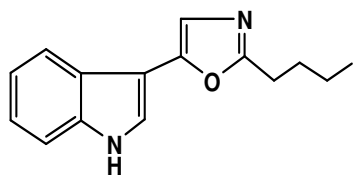
En la presente se proporcionan los compuestos expuestos en ##STR002##:



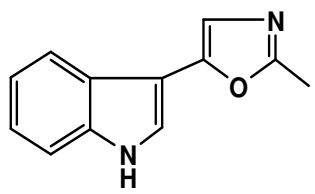
##STR002##

donde: X, Y y Z son cada uno de modo independiente --O, --NR_1, o --S, donde R_1 es --H o alquilo C_1-C_{10}; R_1, R_2 y m son cada uno de modo independiente --H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

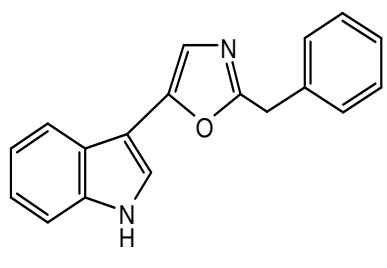
En aun otra forma de realización particular, los compuestos de la Familia ##STR002## puede ser los compuestos expuestos en **(vi)-(xix)**.



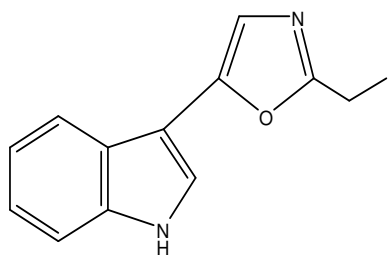
(vii)



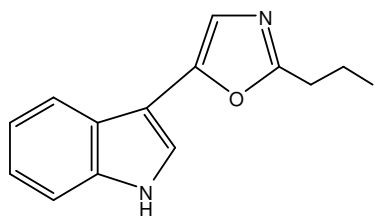
(viii)



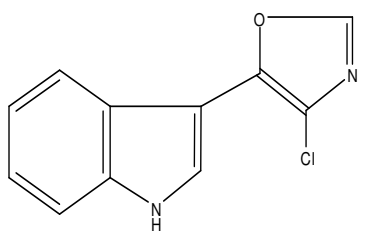
(ix)



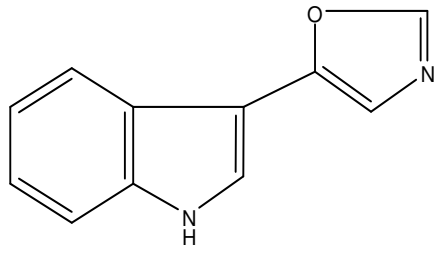
(x)



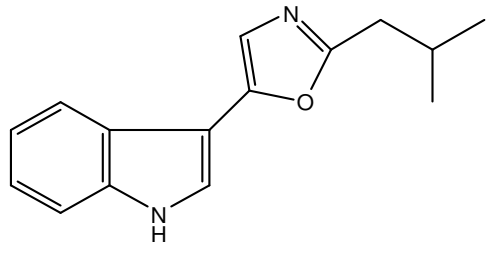
(xi)



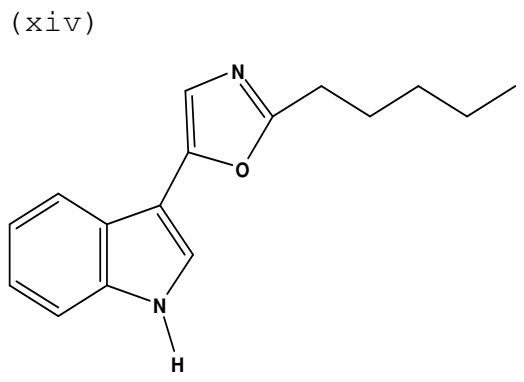
(xii)



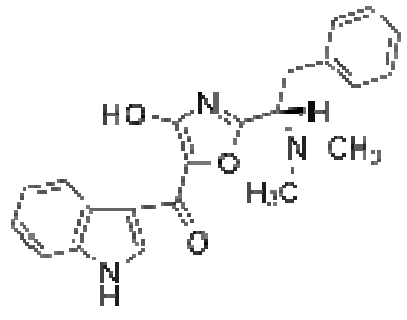
(xiii)



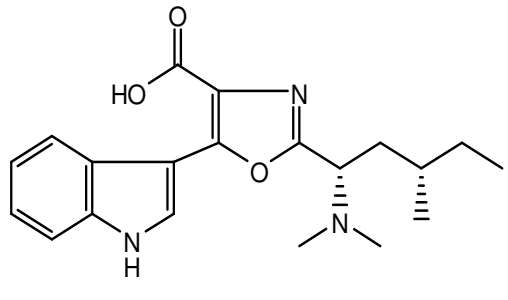
(xiv)



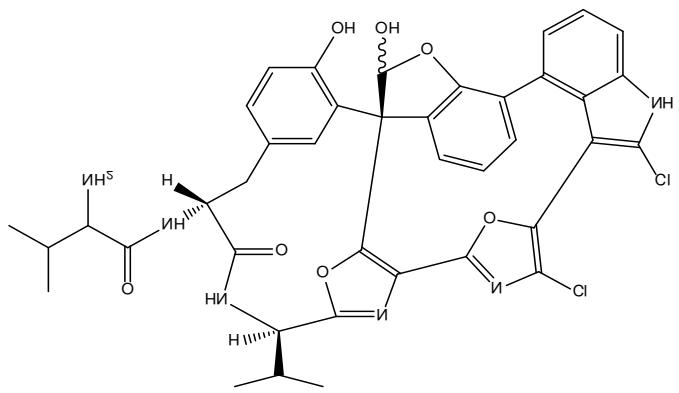
(xv)



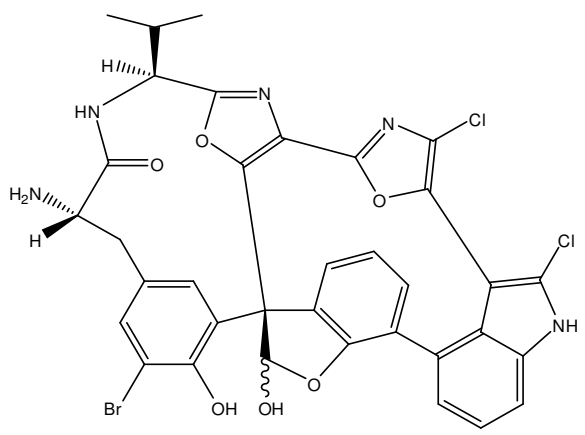
(xvi)



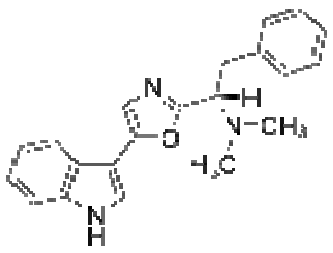
(xvii)



(xviii)



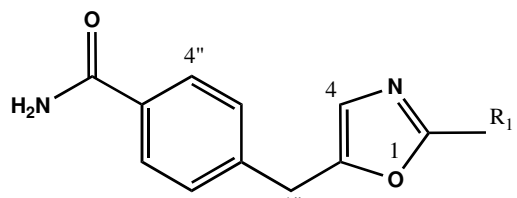
(xix)



Estos provienen de materiales naturales o compuestos obtenidos de fuentes comerciales o por síntesis química. Las fuentes naturales de la Familia de compuestos ##STR002## incluyen, pero sin limitación, microorganismos, algas, y esponjas. En una forma de realización más particular, los microorganismos que incluye la Familia de compuestos ##STR002## incluyen pero sin limitación, o alternativamente, la Familia de compuestos #STR002## se puede derivar de especies tales como *Streptoverticillium waksmanii* (compuesto **vi**) (Umehara, et al., 1984), *Streptomyces pimprina* (compuesto vii) (Naiket al., 2001), *Streptoverticillium olivoreticuli* (compuestos **viii**, **ix**, **x**)

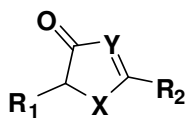
(Koyama Y., et al., 1981), *Streptomyces* sp (compuestos **xi**, **xii**) (Watabe et al., 1988), *Pseudomonas syringae* (compuestos **xiii**, **xiv**) (Pettit et al., 2002). La Familia de compuestos ##STR002## también puede derivar de algas que incluyen pero sin limitación alga roja (compuesto **xv**) (N'Diaye, et al., 1996), alga roja *Martensia fragilis* (compuesto **xvi**) (Takahashi S. et al., 1998), *Diazona chinensis* (compuestos **xvii & xviii**) (Lindquist N. et al., 1991), *Rhodophycota haraldiophillum* sp (compuesto **xix**) (Guella et al., 1994).

También se proporciona ##STR003##:



donde: X e Y son cada uno de modo independiente --OH, --NR_1, o --S, donde R_1 es --H o alquilo C_1-C_{10}; R_1, R_2 y m, un sustituyente del anillo oxazol, son cada uno de modo independiente --H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

También se proporciona ##STR005##:

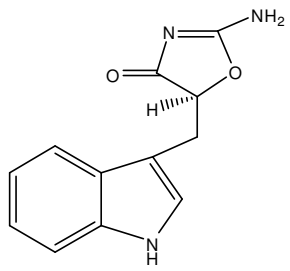


donde X e Y son cada uno de modo independiente --OH, --NR_1, o --S, donde R_1, R_2 son cada uno de modo independiente --H, alquilo (por ejemplo, alquilo C_1-C_{10}), alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo

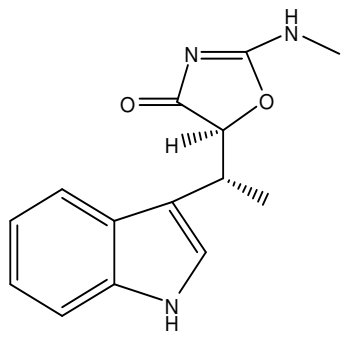
sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

En una forma de realización particular, la Familia de compuestos ##STR005## tales como compuestos de **xx-xxiii** que se exponen a continuación pueden derivar de fuentes naturales o comerciales o por síntesis química.

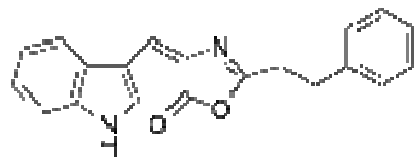
(xx)



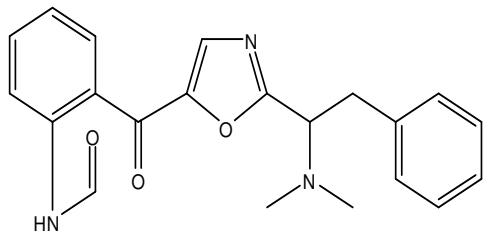
(xxi)



(xxii)



(xxiii)



Las fuentes naturales de la Familia de compuestos ##STR005## incluyen, pero sin limitación plantas, corales, microorganismos, y esponjas. Los microorganismos incluyen, pero sin limitación *Streptomyces griseus* (compuesto **xx**) (Hirota et al., 1978), *Streptomyces albus* (compuesto **xxi**) (Werner et al., 1980). La Familia de compuestos STR004 también se pueden derivar de las algas que incluyen pero sin limitación *Haraldiophillum sp* (compuesto **xxii** (Guella et al., 2006), y algas rojas (compuesto **xxiii**) (N'Diaye et al., 1994).

En una forma de realización, el compuesto se puede derivar o se puede obtener de un microorganismo, y en particular de la especie *Burkholderia* y se caracteriza por tener una estructura que comprende al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos y al menos ocho oxígeno y un nitrógeno. El compuesto también comprende al menos una de las siguientes características:

(a) propiedades plaguicidas y en particular, propiedades nematicidas, fungicidas, insecticidas, acaricidas, alguicidas y herbicidas;

(b) un peso molecular de aproximadamente 530-580 y más particularmente, 555 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS);

(c) valores de ^{1H} RMN δ 6,40, 6,39, 6,00, 5,97, 5,67, 5,54, 4,33, 3,77, 3,73, 3,70, 3,59, 3,47, 3,41, 2,44, 2,35, 2,26, 1,97, 1,81, 1,76, 1,42, 1,37, 1,16, 1,12, 1,04;

(d) valores de ^{13}C RMN de δ 173,92, 166,06, 145,06, 138,76, 135,71, 129,99, 126,20, 123,35, 99,75, 82,20, 78,22, 76,69, 71,23, 70,79, 70,48, 69,84, 60,98, 48,84, 36,89, 33,09, 30,63, 28,55, 25,88, 20,37, 18,11, 14,90, 12,81, 9,41;

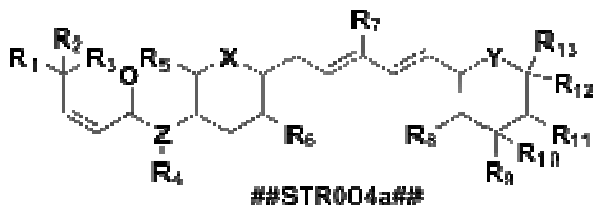
(e) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 7–12 minutos, más específicamente aproximadamente 10 minutos e incluso más específicamente aproximadamente 10,98 min en una columna C-18 de HPLC de fase inversa (Phenomenex, Luna 5µ C18(2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0–20 min; 90–0% de CH_3CN acuoso, 20–24 min; 100% de CH_3CN, 24–27 min; 0–90% de CH_3CN acuoso, 27–30 min; 90% de CH_3CN acuoso) con un caudal de flujo de 0,5 mL/min y detección UV de 210 nm;

(f) el espectro ^{13}C RMN que exhibe 28 señales de carbono diferenciadas que se pueden atribuir a seis metilos, cuatro carbonos de metileno, y trece metinos que incluyen cinco sp^2, cuatro carbonos cuaternarios;

(g) **una** fórmula molecular de $C_{28}H_{45}NO_{10}$ que se determinó por interpretación del análisis de los datos de ESIMS y RMN;

(h) bandas de absorción UV entre aproximadamente 210-450 nm y más particularmente a aproximadamente 234 nm.

También se proporcionan compuestos que tiene la estructura ##STR004a##:

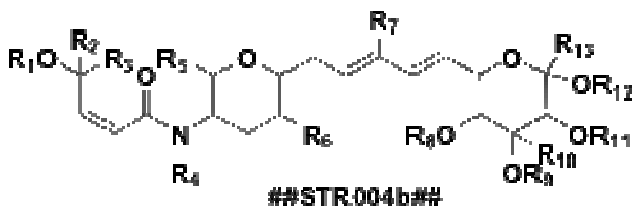


##STR004a##

Donde X, Y y Z son cada uno de modo independiente –O, –NR, o –S, donde R es H o alquilo C_1–C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son cada uno de modo independiente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo

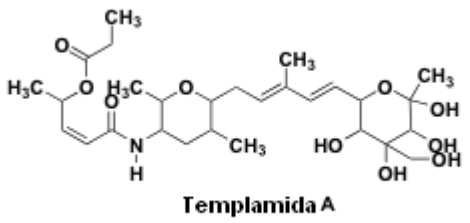
sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

En una forma de realización particular, el compuesto tiene la estructura expuesta en ##STR004b##:

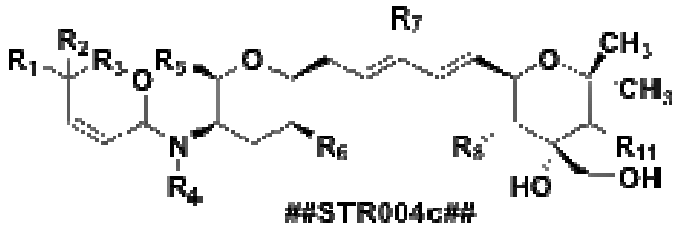


donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son como se definieron previamente para ##STR004a##.

En una forma de realización más particular, el compuesto es Templamida A con la siguiente estructura:



En otra forma de realización, se proporciona un compuesto que tiene la fórmula ##STR004c##:



Donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, y R_{11} son como se definieron previamente para ##STR004a##.

En otra forma de realización, se proporciona un compuesto que se puede derivar de la especie *Burkholderia* species y que se caracteriza por tener una estructura que

comprende al menos un éster, al menos una amida, un grupo epóxido de metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos y al menos 8 oxígeno y 1 nitrógeno, y actividad plaguicida. El compuesto también comprende al menos una de las siguientes características:

(a) propiedades plaguicidas y en particular, propiedades insecticidas, fungicidas, nematicidas, acaricidas, alguicidas y herbicidas;

(b) un peso molecular de aproximadamente 520-560 y particularmente 537 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS);

(c) ^{1}H RMN δ valores en aproximadamente 6,41, 6,40, 6,01, 5,97, 5,67, 5,55, 4,33, 3,77, 3,75, 3,72, 3,64, 3,59, 3,54, 3,52, 2,44, 2,34, 2,25, 1,96, 1,81, 1,76, 1,42, 1,38, 1,17, 1,12, 1,04;

(d) valores ^{13C} RMN de δ 174,03, 166,12, 143,63, 137,50, 134,39, 128,70, 126,68, 124,41, 98,09, 80,75, 76,84, 75,23, 69,87, 69,08, 68,69, 68,60, 48,83, 41,07, 35,45, 31,67, 29,19, 27,12, 24,55, 19,20, 18,95, 13,48, 11,39, 8,04;

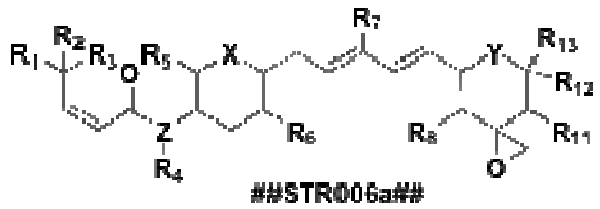
(e) tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 6-15 minutos, más específicamente aproximadamente 8 minutos en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN), particularmente, un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 8-15 minutos, más específicamente aproximadamente 11 minutos y aun más específicamente aproximadamente 11,73 min en una columna C-18 de HPLC de fase inversa (Phenomenex, Luna 5µ C18(2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0-20 min; 90-0% de CH_3CN acuoso,

20-24 min; 100% de CH_3CN, 24-27 min; 0 - 90% de CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH_3CN acuoso) con un caudal de flujo de 0,5 mL/min y detección UV de 210 nm;

(f) una fórmula molecular de $C_{28}H_{43}NO_9$ que se determinó por interpretación del análisis de los datos de ESIMS y RMN;

(g) bandas de absorción UV a aproximadamente 210-450 nm y más particularmente a aproximadamente 234 nm.

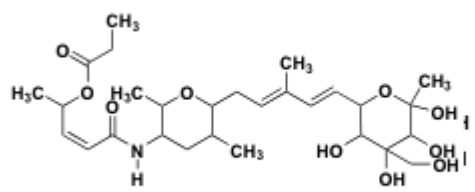
En una forma de realización particular, el compuesto tiene la estructura ##STR006a##:



##STR006a##

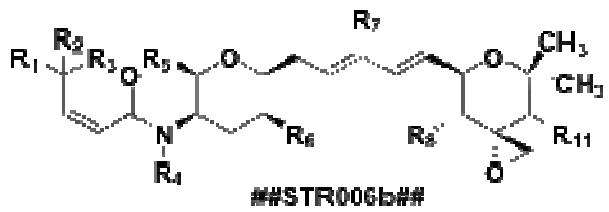
Donde X, Y y Z son cada uno de modo independiente -O, -NR, o -S, donde R es H o alquilo C_1-C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son cada uno de modo independiente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

En una forma de realización particular, el compuesto tiene la estructura:



Templamida A

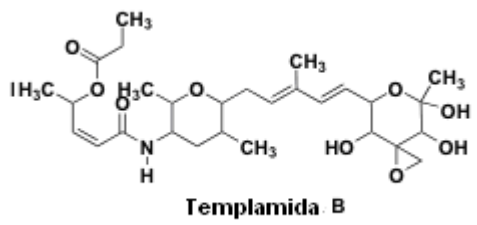
En otra forma de realización, se proporciona un compuesto que tiene la fórmula ##STR006b##:



##STR006b##

Donde R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, y R_{11} son como se definieron previamente para ##STR006a##.

En una forma de realización más particular, el compuesto es Templamida B con la siguiente estructura:



Templamida B

En aun otra forma de realización particular, el compuesto se puede derivar de la especie *Burkholderia* y que se caracteriza por tener una estructura que comprende al menos un éster, al menos una amida, un grupo epóxido de metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos y al menos 8 oxígeno y al menos 1 nitrógeno. El compuesto también comprende al menos una de las siguientes características:

(a) propiedades plaguicidas y en particular, propiedades insecticidas, fungicidas, acaricidas, nematicidas, alguicidas y herbicidas;

(b) un peso molecular de aproximadamente 510-550 y particularmente aproximadamente 523 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS);

(c) ^{1}H RMN δ valores en aproximadamente 6,41, 6,40, 6,01, 5,98, 5,68, 5,56, 4,33, 3,77, 3,75, 3,72, 3,65, 3,59,

3,55, 3,50, 2,44, 2,26, 2,04, 1,96, 1,81, 1,75, 1,37, 1,17, 1,04;

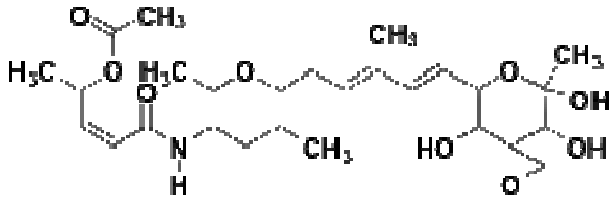
(d) valores de ^{13}C RMN δ 172,22, 167,55, 144,98, 138,94, 135,84, 130,14, 125,85, 123,37, 99,54, 82,19, 78,28, 76,69, 71,31, 70,13, 69,68, 48,83, 42,52, 36,89, 33,11, 30,63, 25,99, 21,20, 20,38, 18,14, 14,93, 12,84;

(e) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 6-15 minutos, más específicamente aproximadamente 8 minutos en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua :acetonitrilo (CH_3CN), particularmente, un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 8-15 minutos, más específicamente aproximadamente 10 minutos y even más específicamente aproximadamente 10,98 min en una columna C-18 de HPLC de fase inversa (Phenomenex, Luna 5µ C18(2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0-20 min; 90 - 0% de CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100% de CH_3CN, 24-27 min; 0 - 90% de CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH_3CN acuoso) con un caudal de flujo de 0,5 mL/min y detección UV de 210 nm;

(f) una fórmula molecular de $C_{27}H_{41}NO_9$ que se determinó por interpretación del análisis de los datos de ESIMS y RMN;

(g) bandas de absorción UV a aproximadamente 210-450 nm y más particularmente a aproximadamente 234 nm.

En una forma de realización más particular, el compuesto es un compuesto conocido FR901465 que se aisló primero del caldo de cultivo de una bacteria de *Pseudomonas* sp. No. 2663 (Nakajima et al. 1996) y se ha informado que tiene actividad anticáncer con la siguiente estructura:



FR901465

En aun otra forma de realización particular, los compuestos de la Familia ##STR006a## pueden ser los compuestos expuestos de **xxiv** a **xxxix**. Estos provienen de materiales naturales o compuestos obtenidos de fuentes comerciales o por síntesis química. Las fuentes naturales de los compuestos de la Familia ##STR006a## incluyen, pero sin limitación, microorganismos, algas, y esponjas. En una forma de realización más particular, los microorganismos incluyen los compuestos de la Familia ##STR006a## que se pueden derivar de especies tales como *Pseudomonas* sp. No. 2663 (compuestos **xxiv–xxvi**) (Nakajima et al., 1996), los análogos sintéticos del FR901464 (**xxvii–xxxix**) se han sintetizado y patentado como compuestos anticáncer (ver Koide et al., solicitud de patente US No. 2008/0096879 A1).

También se proporcionan los compuestos plaguicidas producidos por la formulación expuesta anteriormente que comprende al menos una de las siguientes características:

(a) tiene propiedades plaguicidas y en particular, propiedades herbicidas, insecticidas, nematicidas y fungicidas;

(b) tiene un peso molecular de aproximadamente 210–240 y más particularmente, 222 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS);

(e) tiene valores de ^{1}H RMN de δ 7,90, 6,85, 4,28, 1,76, 1,46, 1,38, 1,37, 0,94;

(d) tiene valores de ^{13}C RMN de δ 166,84, 162,12, 131,34 (2C), 121,04, 114,83 (2C), 64,32, 31,25, 28,43, 25,45, 22,18. 12,93;

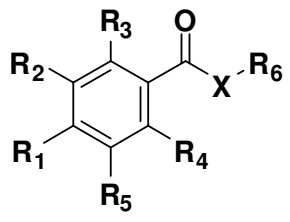
(e) tiene un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 15–20 minutos, más específicamente aproximadamente 17 minutos y aun más específicamente aproximadamente 17,45 min en una columna C–18 de HPLC de fase inversa (Phenomenex, Luna 5µ C18(2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0–20 min; 90 – 0% de CH_3CN acuoso, 20–24 min; 100% de CH_3CN, 24–27 min; 0–90% de CH_3CN acuoso, 27–30 min; 90% de CH_3CN acuoso) con un caudal de flujo de 0,5 mL/min y detección UV de 210 nm;

(f) El espectro ^{13}C RMN exhibió 13 señales de carbono diferenciadas que se atribuyeron a un metilo, cinco carbonos de metileno, cuatro metinos, y tres carbonos cuaternarios;

(g) tiene una fórmula molecular de $C_{13}H_{18}O_3$ que se determinó por interpretación del análisis de los datos de ESIMS y RMN;

(h) tiene bandas de absorción UV entre aproximadamente 210–450 nm y más particularmente a aproximadamente 248 nm.

También se proporcionan compuestos que tienen la estructura que se muestra a continuación

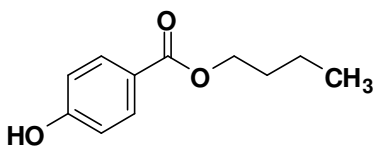


Donde

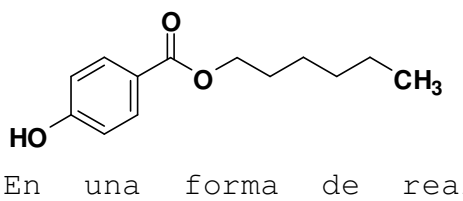
X, es de modo independiente –O, –NR, o –S, donde R es H o alquilo C_1–C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, y R_6 son cada uno de modo independiente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo

sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo.

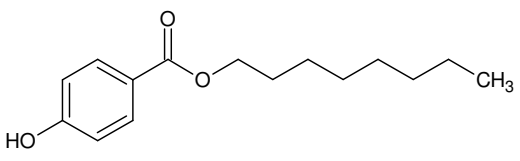
En una forma de realización más particular, el compuesto es butil parabeno con la siguiente estructura:



En una forma de realización más particular, el compuesto es hexil parabeno con la siguiente estructura:



En una forma de realización más particular, el compuesto es octil parabeno con la siguiente estructura:



En aún otra forma de realización, el compuesto es F7H18, queh tiene un peso molecular de aproximadamente 1080.

Composiciones

Un cultivo, fracción celular o sobrenadante y compuestos sustancialmente puros producidos por la cepa *Burkholderia* descripta en la presente, los cuales se denominan en forma alternativa como “ingredientes activos”, se pueden formular en composiciones plaguicidas. En una forma de realización particular, el sobrenadante puede ser un sobrenadante libre de células.

Los ingredientes activos expuestos anteriormente se

pueden formular de cualquier manera. Los ejemplos de formulación limitantes incluyen pero sin limitación concentrados emulsionables (EC), polvos humectables (WP), líquidos solubles (SL), aerosoles, soluciones del concentrado de volumen ultra bajo (ULV), polvos solubles (SP), microencapsulación, gránulos dispersos en agua, fluidos (FL), microemulsiones (ME), nano-emulsiones (NE), polvos, emulsiones, líquidos, escamas, etc. En cualquier formulación descripta en la presente, el porcentaje de ingrediente activo está dentro de un rango de 0,01% a 99,99%.

Se puede preparar una composición sólida por la suspensión de un portador sólido en una solución de compuestos plaguicidas y secado de la suspensión en condiciones moderadas, tales como evaporación a temperatura ambiente o evaporación al vacío a 65°C o menor. En forma alternativa, una composición sólida se puede derivar por medio de secado por aspersión o secado por congelación.

Cuando se hace referencia a las composiciones sólidas, los expertos en la técnica deben entender que las formas físicas tales como espolvoreados, perlas, polvos, particulados, pellets, comprimidos, aglomerados, gránulos, sólidos flotantes y se incluyen otras formulaciones sólidas. Los expertos en la técnica podrán optimizar fácilmente una formulación sólida particular para una aplicación determinada usando métodos bien conocidos en la técnica.

La composición puede comprender compuestos encapsulados en gel derivados de la cepa de *Burkholderia* expuesta anteriormente. Tales materiales encapsulados en gel se pueden preparar por la mezcla de un agente formador de gel (por ejemplo, gelatina, celulosa, o lignina) con una solución de compuestos alguicidas y la inducción de la formación de gel del agente.

La composición adicionalmente puede comprender un tensioactivo para usar con el fin de emulsión, dispersión, humectación, extensión, integración, control de desintegración, estabilización de ingrediente activos, y mejora de la fluidez o inhibición de herrumbre. En una forma de realización particular, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico fitotóxico con preferencia que pertenece a EPA Lista 4B. En otra forma de realización particular, el tensioactivo no iónico es monolaurato de polioxietileno (20). La concentración de tensioactivo puede variar entre 0,1–35% de la formulación total, el rango preferido es 5–25%. La elección de agentes de dispersión y emulsión, tales como agentes de dispersión y emulsión no iónico, aniónico, anfotérico y catiónico, y la cantidad empleada determinada por la naturaleza de la composición y la capacidad del agente para facilitar la dispersión de estas composiciones.

A fin de proporcionar las composiciones que contienen los ingredientes activos expuestos anteriormente en la forma de polvos, gránulos, polvos dispersables en agua, dispersiones acuosas, o emulsiones y dispersiones en líquidos orgánicos, el agente portador o diluyente en tales composiciones pueden ser un sólido finamente dividido, un líquido orgánico, agua, un agente humectante, un agente dispersante, agente humectante, o agente emulsionante, o cualquier combinación de estos. En general, cuando se preparan líquidos y polvos humectables, un agente acondicionador que comprende uno o más agentes activos en superficie o tensioactivos está presente en cantidades suficientes para producir una composición determinada que contiene el material activo, el microorganismo, dispersable en agua o aceite.

Debido a que estas composiciones se pueden aplicar como un spray que utiliza un portador líquido, se contempla

una amplia variedad portadores líquidos tales como, por ejemplo, agua, solventes orgánicos, decano, dodecano, aceites aceites vegetales, aceite mineral, alcohol, glicol, polietilenglicol, agentes que producen una distribución diferencial de bacterias patogénicas en el agua que se está tratando. Se pueden usar combinaciones de estos y otras conocidas por los profesionales expertos.

Las presentes composiciones también pueden incluir otras sustancias que no son perjudiciales para el ingrediente activo tales como adyuvantes, tensioactivos, aglutinantes, estabilizantes y similares, que se usan comúnmente en alguicidas, en forma individual o en combinación, según sea necesario.

Los expertos en la técnica entenderán que varios aditivos o agentes que predisponen a plagas sensibles al ingrediente activo expuesto anteriormente se añaden para aumentar su acción plaguicida. Por la frase "aditivo que aumenta la acción plaguicida del ingrediente activo" se entiende cualquier compuesto, solvente, reactivo, sustancia, o agente que aumenta el efecto del ingrediente activo hacia las plagas y más particularmente, los ácaros en comparación con el efecto plaguicida del ingrediente activo en ausencia de dicho aditivo. En algunas formas de realización, estos aditivos aumentarán la susceptibilidad de una plaga particular al ingrediente activo. Los aditivos adicionales incluyen pero sin limitación agentes que debilitan las defensas biológicas de las plagas susceptibles. Tales agentes pueden incluir sales, tales como NaCl y $CaCl_2$.

La composición también puede comprender otro microorganismo y/o plaguicida (por ejemplo, nematicida, fungicida, insecticida, herbicida, alguicida, acaricida). El microorganismo puede incluir pero sin limitación a un agente derivado de *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.,

Brevabacillus sp., *Lecanicillium* sp., no *Ampelomyces* sp., *Pseudozyma* sp., *Streptomyces* sp, *Burkholderia* sp, *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp. En forma alternativa, el agente puede ser un aceite natural o producto oleoso que tiene actividad fungicida, herbicida, acaricida, alguicida, nematicida y/o insecticida (por ejemplo, aceite parafínico, aceite de árbol de té, aceite de lemongrass, aceite del clavo, aceite de canela, aceite de citrus, aceite de romero).

La composición, en particular, también puede comprender un insecticida. El insecticida puede incluir, pero sin limitación avermectina, *Bacillus thuringiensis*, aceite de neem y azadiractina, espinosad, *Chromobacterium subtsugae*, extracto de eucalyptus, bacterias entomopatogénicas u hogos tales como *Beauveria bassiana, y Metarrhizium anisopliae* e insecticidas químicas que incluyen pero sin limitación compuestos organoclorado, compuestos organofosforados, carbamatos, piretroides, y neonicotinoides.

La composición también puede comprender un nematicida. Los nematicidas pueden incluir, pero sin limitación nematicidas químicos tales como fenamifos, aldicarb, oxamilo, carbofurano, producto nematicida natural, avermectina, los hongos *Paecilomyces lilacinas y Muscodor spp.*, las bacterias *Bacillus firmus* y otros *Bacillus spp.* y *Pasteuria penetrans*.

La composición también puede comprender un biofungicida tal como extracto de *R. sachalinensis* (Regalia) o un fungicida. Tales fungicidas incluyen, pero sin limitación, un agente antifúngico de sitio único que puede incluir pero sin limitación a bencimidazol, un inhibidor de desmetilación (DMI) (por ejemplo, imidazol, piperazina, pirimidina, triazol), morfolina, hidroxipirimidina, anilinopirimidina, fosforotiolato,

inhibidor externo de quinona, quinolina, dicarboximida, carboximida, fenilamida, anilinopirimidina, fenilpirrol, hidrocarburo aromático, ácido cinámico, hidroxianilida, antibiótico, poliamina, calamina, ftalimida, benzenoid (xililalanina). En aún otra forma de realización, el agente antifúngico es un inhibidor de desmetilación seleccionado del grupo que consiste en imidazol (por ejemplo, triflumizol), piperazina, pirimidina y triazol (por ejemplo, bitertanol, miclobutanilo, penconazol, propiconazol, triadimefon, bromuconazol, ciproconazol, diniconazol, fenbuconazol, hexaconazol, tebuconazol, tetraconazol, propiconazol).

El agente antimicrobiano también puede ser un fungicida químico, no inorgánico multisitio seleccionado del grupo que consiste en un nitriloe (por ejemplo, cloronitrilo o fludioxonilo), quinoxalina, sulfemida, fosfonato, fosfito, ditiocarbamato, cloralquiltios, fenilpiridin-amina, ciano-acetamida oxima.

Las composiciones se pueden aplicar usando métodos conocidos en la técnica. En forma específica, estas composiciones se pueden aplicar a las plantas o partes de planta. Se entiende que las plantas significan en el presente contexto todas las plantas y poblaciones de plantas (tales como plantas salvajes deseadas y no deseadas o plantas de cultivo (que incluyen las plantas de cultivo naturales). Las plantas de cultivo pueden ser plantas que se pueden obtener por métodos de reproducción y optimación de plantas convencionales o por métodos biotecnológicos y de ingeniería genética o por combinaciones de estos métodos, que incluyen las plantas transgénicas y que los cultivares de plantas protegibles o no protegibles por los derechos del cultivador. Se entiende que las partes de plantas significan todas las partes y órganos de las plantas por encima y debajo de la tierra, tal como brote,

hoja, flor y raíz, ejemplos de los cuales se pueden mencionar hojas, agujas, tallos, vástagos, flores, cuerpos del frutos, frutos, semillas, raíces, tubérculo y rizomas. Las partes de planta también incluyen material cosechado, y material de propagación vegetativo y generativo, por ejemplo, esquejes, tubérculos, rizomas, retoños y semillas.

El tratamiento de las plantas y partes de planta con las composiciones expuestas anteriormente se puede realizar directamente o dejando que las composiciones actúen en sus alrededores, hábitat o espacio de almacenamiento, por ejemplo, por inmersión, aspersión, evaporación, nebulización, dispersión, pintura, inyección. En el caso de que la composición se aplique a una semilla, la composición se puede aplicar a la semilla como una o más capas antes de plantar la semilla usando una o más capas mediante métodos conocidos en la técnica.

Como se indicó antes, las composiciones pueden ser composiciones herbicidas. La composición también puede comprender uno o más herbicidas. Estos pueden incluir, pero sin limitación, un bioherbicida y/o un herbicida químico. El bioherbicida se puede seleccionar del grupo que consiste en aceite de clavo, aceite de canela, aceite de lemongrass, aceite de citrus, aceite de cáscara de naranja, tentoxina, cornexistina, AAL-toxina, aceite de manuka, leptospermona, taxtomina, sarmentina, momilactona B, sorgoleona, ascaulatoxina y ascaulatoxina aglicona. El herbicida químico puede incluir, pero sin limitación, diflufenzopir y sus sales, dicamba y sus sales, topramezona, tembotriona, S-metolaclor, atrazina, mesotriona, primisulfuron-metilo, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, nicosulfurona, tifensulfuron-metilo, asulam, metribuzina, diclofop-metilo, fluazifop, fenoxaprop-p-etilo, asulam, oxifluorfeno, rimsulfuron, mecoprop, y quinclorac, tiobencarb, clomazona, cihalofop, propanilo, bensulfuron-metilo, penoxsulam,

triclopir, imazetapir, halosulfuron-metilo, pendimetalina, bispiribac-sodio, carfentrazona etilo, bentazon sódico/acifluorfeno sódico, glifosato, glufosinato y ortosulfamurona.

Las composiciones herbicidas se pueden aplicar en forma líquida o sólida como formulaciones de pre-emergencia o pos-emergencia.

Paras las formulaciones secas de pre-emergencia, el tamaño del gránulo del portador es normalmente 1-2 mm (diámetro) pero los gránulos pueden ser más pequeños o más grandes de acuerdo con la cobertura de tierra requerida. Los gránulos pueden comprender partículas porosas o no porosas.

Paras las formulaciones de pos-emergencia, los componentes de la formulación usados pueden contener arcillas de esmectita, arcillas de attapulgita y arcillas hinchables similares, espesantes tales como gomas de xantano, goma arábiga y otros espesantes de polisacáridos así como estabilizantes de la dispersión tales como tensioactivos no iónicos (por ejemplo polioxietileno (20) monolaurato).

En una forma de realización particular, la composición puede comprender además del ingrediente activo otro microortganismo y/o alguicida y/o acaricida. El microorganismo puede incluir pero sin limitación un agente derivado de *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp., y *Streptomyces* sp.

Las composiciones también pueden ser como se expuso anteriormente, composiciones alguicidas que también pueden comprender otros alguicidas tales como sulfato de cobre, diquat o taxtomina A.

Las composiciones pueden ser composiciones acaricidas que también pueden comprender otros acaricidas tales como antibióticos, carbamatos, acaricidas de formamidina,

piretroides, reguladores del crecimiento de ácaros, acaricidas de organofosfato y tieras diatomáceas.

Usos

Las composiciones y compuestos plaguicidas derivados de la cepa de *Burkholderia* expuestos en la presente se pueden usar como plaguicidas, particularmente como insecticidas, nematicidas, fungicidas, algicidas, acaricidas y herbicidas.

En forma específica, los nematodos que se pueden controlar uasando el método expuesto anteriormente incluyen pero sin limitación nemtodos parasitarios tales como nematodos del nódulo de raíz, anillo, aguijón, lanza, quiste y lesión, que incluyen pero sin limitación nematodos de vida libre, *Meloidogyne*, *Heterodera* y *Globodera* spp; particularmente *Meloidogyne incognita* (nematodos del nódulo de raíz), así como *Globodera rostochiensis* y *globodera pailida* (nematodos del quiste de papa); *Heterodera glycines* (nematodos del quiste de soja); *Heterodera schachtii* (nematodos del quiste de remoplacha); *Oligonychus pratensis* (ácaro de los bancos de pasto); *Eriophyes cynodoniensis* (ácaro del pasto Bermuda grass mite); *Bryobia praetiosa* (ácaro del trébol) –y *Heterodera avenae* (nematodo del quiste de cereal).

Los insectos fitopatogénicos controlados por el método de la presente invención incluyen, pero sin limitación, insectos del orden

(a) Lepidóptero, por ejemplo, *Acleris spp.*, *Adoxophyes spp.*, *Aegeria spp.*, *Agrotis spp.*, *Alabama argillaceae*, *Amilois spp.*, *Anticarsia gemmatalis*, *Archips spp.*, *Argyrotaenia spp.*, *Autographa spp.*, *Busseola fusca*, *Cadra cautella*, *Carposina nipponensis*, *Chilo spp.*, *Choristoneura spp.*, *Clysia ambiguella*, *Cnaphalocrocis spp.*, *Cnephasia spp.*, *Cochilis spp.*, *Coleophora spp.*,

Crocidolomia binotalis, Cryptophlebia leucotreta, Cydia spp., Diatraea spp., Diparopsis castanea, Earias spp., Ephestia spp., Eucosma spp., Eupoecilia ambiguella, Euproctis spp., Euxoa spp., Grapholita spp., Hedya nubiferana, Heliothis spp., Hellula undalis, Hyphantria cunea, Keiferia lycopersicella, Leucoptera scitella, Lithocollethis spp., Lobesia botrana, Lymantria spp., Lyonetia spp., Malacosoma spp., Mamestra brassicae, Manduca sexta, Operophtera spp., Ostrinia nubilalis, Pammene spp., Pandemis spp., Panolis flammea, Pectinophora gossypiella, Phthorimaea operculella, Pieris rapae, Pieris spp., Plutella xilostella, Prays spp., Scirpophaga spp., Sesamia spp., Sparganothis spp., Spodoptera spp., Synanthedon spp., Thaumetopoea spp., Tortrix spp., Trichoplusia ni y Yponomeuta spp.;

(b) Coleóptero, por ejemplo, *Agriotes spp., Anthonomus spp., Atomaria linearis, Chaetocnema tibialis, Cosmopolites spp., Curculio spp., Dermestes spp., Diabrotica spp., Epilachna spp., Eremnus spp., Leptinotarsa decemlineata, Lissorhoptrus spp., Melolontha spp., Orycaephilus spp., Otiorhynchus spp., Phlyctinus spp., Popillia spp., Psilliodes spp., Rhizopertha spp., Scarabeidae, Sitophilus spp., Sitotroga spp., Tenebrio spp., Tribolium spp. y Trogoderma spp.; (c) Orthoptera, por ejemplo, Blatta spp., Blattella spp., Grillotalpa spp., Leucophaea maderae, Locusta spp., Periplaneta spp. y Schistocerca spp.; (d) Isoptera, por ejemplo, Reticulitermes spp.; (e) Psocoptera, por ejemplo, Liposcelis spp.; (f) Anoplura, por ejemplo, Haematopinus spp., Linognathus spp., Pediculus spp., Pemphigus spp. y Philloxera spp.; (g) Mallophaga, por ejemplo, Damalinea spp. y Trichodectes spp.; (h) Thysanoptera, por ejemplo, Frankliniella spp., Hercinotnrips spp., Taeniothrips spp., Thrips palmi, Thrips tabaci y Scirtothrips aurantii; (i) Heteroptera, por*

ejemplo, Cimex spp., Distantiella theobroma, Dysdercus spp., Euchistus spp., Eurygaster spp., Leptocorisa spp., Nezara spp., Piesma spp., Rhodnius spp., Sahlbergella singularis, Scotinophara spp., Oncopeltus spp. Lygys spp. y Tniatoma spp.; (j) Homoptera, por ejemplo, Aleurothrixus floccosus, Aleyrodes brassicae, Aonidiella spp., Aphididae, Aphis spp., Aspidiotus spp., Bemisia tabaci, Ceroplaster spp., Chrysomphalus aonidium, Chrysomphalus dictyospermi, Coccus hesperidum, Empoasca spp., Eriosoma larigerum, Erythroneura spp., Gascardia spp., Laodelphax spp., Lecanium corni, Lepidosaphes spp., Macrosiphus spp., Myzus spp., Nephotettix spp., Nilaparvata spp., Paratoria spp., Pemphigus spp., Planococcus spp., Pseudaulacaspis spp., Pseudococcus spp., Psilla spp., Pulvinaria aetiopica, Quadraspidiotus spp., Rhopalosiphum spp., Saissetia spp., Scaphoideus spp., Schizaphis spp., Sitobion spp., Trialeurodes vaporariorum, Trioza erytreae y Unaspis citri; (k) Hymenoptera, por ejemplo, Acromyrmex, Atta spp., Cephus spp., Diprion spp., Diprionidae, Gilpinia polytoma, Hoplocampa spp., Lasius spp., Monomorium pharaonis, Neodiprion spp., Solenopsis spp. y Vespa spp.; (l) Diptera, por ejemplo, Aedes spp., Antherigona soccata, Bibio hortulanus, Calliphora erythrocephala, Ceratitis spp., Chrysomyia spp., Culex spp., Cuterebra spp., Dacus spp., Drosophila melanogaster, Fannia spp., Gastrophilus spp., Glossina spp., Hypoderma spp., Hyppobosca spp., Liriomyza spp., Lucilia spp., Melanagromyza spp., Musca spp., Oestrus spp., Orseolia spp., Oscinella frit, Pegomyia hyoscyami, Phorbia spp., Rhagoletis pomonella, Sciara spp., Stomoxis spp., Tabanus spp., Tannia spp. y Tipula spp.; (m) Siphonaptera, por ejemplo, Ceratophillus spp. und Xenopsilla cheopis y (n) del orden Thysanura, por ejemplo, *Lepisma saccharina*. Los ingredientes activos de acuerdo con la invención también se pueden usar para controlar

pulguillas de las crucíferas (*Phillotreta* spp.), larvas de la raíz (*Delia* spp.), gorogojo de la silicua de repollo (*Ceutorhynchus* spp.) y áfidos en cultivos de oleaginosas tales como canola (colza), semilla de mostaza, y sus híbridos, y también arroz y maíz. En una forma de realización particular, el insecto puede ser un miembro de *Spodoptera*, más particularmente, *Spodoptera exigua, Myzus persicae, Plutella xilostella* o *Euschistus* sp.

Las sustancias y composiciones también se pueden usar para modular la emergencia en una formulación de monocotiledónea pre-emergente o pos-emergent, que incluye juncos y pastos, o malezas dicotiledóneas. En una forma de realización particular, las malezas pueden incluir, pero sin limitación, *Chenopodium sp.* (por ejemplo *C. album*), *Abutilon* sp. (por ejemplo *A. theophrasti*), *Helianthus sp.* (por ejemplo *H. annuus*), *Ludwigia sp.* (por ejemplo *L. hexapetala*), *Ambrosia* sp. (por ejemplo *A. artemesifolia*), *Amaranthus* sp. (por ejemplo, *A. retroflexus, A. palmeri*), *Convolvulus sp.* (por ejemplo *C. arvensis), Ipomoeae sp., Brassica* sp. (por ejemplo *B. kaber*), *Raphanus sp., Taraxacum sp.* (por ejemplo *T. officinale*), *Centaurea sp. (*por ejemplo *C. solstitalis), Conyza sp. (*por ejemplo *C. bonariensis), Cirsium* sp. (por ejemplo *C. arvense*), *Lepidium* sp., *Gallium sp., Solanum sp.* (por ejemplo *S. nigrum), Malva sp.* (por ejemplo *M. neglecta), Cyperus sp. (*por ejemplo *C. rotundus), Oxalis sp., Euphorbia sp., Trifolium sp., Medicago sp., Hydrilla sp., Azolla sp., Digitaria sp. (*por ejemplo *D. sanguinalis), Setaria* sp. (por ejemplo *S. lutescens), Cynodon dactilon, Bromus* sp. *(por ejemplo, B. tectorum*), *Poa* sp. (por ejemplo *P. annua, P. pratensis), Lollium sp. (*por ejemplo, *L. perenne*), *Sorghum* sp. (por ejemplo *S. halepense*), *Arundo donax, Festuca sp. (*por ejemplo *F. arundinaceae*), *Echinochloa sp. (por ejemplo, E. crus-galli, E. phillopogon).*

La cepa *Burkholderia,* los compuestos y composiciones expuestos anteriormente también se pueden usar como fungicidas. El hongo blanco puede ser un *Fusarium* sp., *Botrytis* sp., *Monilinia* sp., *Colletotrichum sp*, *Verticillium sp.*; *Microphomina* sp., *Phytophtora sp*, *Mucor* sp., *Podosphaera* sp., *Rhizoctonia sp., Peronospora sp., Geotrichum sp., Phoma, y Penicillium.* En otra forma de realización más particular, las bacterias son *Xanthomonas*.

La sustancia o composiciones se pueden usar para controlar, reducir y/o eliminar el crecimiento y proliferación de micro y macro algas marinas y no marinas que incluyen pero sin limitación algas unicelulares, multicelulares y diatomeas, rojas, verdes y azules tales como *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Rhizoclonium* sp., *Cladophoera* sp., *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Hydrodictyon* sp., *Chara* sp, *Microcystis* y *Didymo* sp., *Chlamydomonas sp., Scenedesmus sp., Oscillatoria sp., Volvox sp., Navicula sp, Oedogonium sp., Spirogyra sp., Batrichospermum sp., Rhodymenia sp., Callithamnion sp.,Undaria sp.,* a través de la actividad alguicida y alguistática.

Los ingredientes activos y las composiciones que se expusieron anteriormente se pueden aplicar en lugares que contienen algas. Estos incluyen pero sin limitación un cuerpo de agua tal como un estanque, lago, arroyo, río, acuario, planta de tratamiento de agua, central eléctrica o una superficie sólida, tal como plástico, cemento, madera, fibra de vidrio, cañerías de hierro y cloruro de polivinilo, superficies cubiertas con materiales y/o pinturas de recubrimiento.

Como se indicó anteriormente, el ingrediente activo y las composiciones expuestas anteriormente se pueden aplicar a las localizaciones que contienen arácnidos, tales como ácaros, que incluyen pero sin limitación, *Panonychus sp*. tales como *Panonychus citri* (ácaro del citrus), y

Panonychus ulmi (araña roja), *Tetranychus sp.* tales como *Tetranychus kanzawi* (araña de Kanzawa), *Tetranychus urticae* (araña roja de dos manchas), *Tetranychus pacificus* (araña del pacífico), *Tetranychus turkestanii* (araña de la frutilla) y *Tetranychus cinnabarinus* (araña roja carmín), *Oligonychus sp.* tales como *Oligonychus panicae* (avacado brown mite), *Oligonychus perseae* (persea mite), *Oligonychus pratensis* (Banks grass mite) y *Oligonychus coffeae*, *Aculus sp.* tales como *Aculus cornatus* (ácaro plateado del durazno), *Aculus fockeni* (ácaro de la roya de la ciruela) y *Aculus lycopersici* (ácaro del bronceado), *Eotetranychus sp.* tales como *Eotetranychus wilametti, Eotetranychus yumensis* (araña de yuma) y *Eotetranychus sexmaculatis* (araña de 6 manchas), *Bryobia rubrioculus* (arañuela parda), *Epitrimerus piri* (agamuzado del peral), *Phytoptus pyri* (ácaro de la erinosis del peral), *Acalitis essigi* (araña de mora), *Polyphagotarsonemus latus* (ácaro blancoe), *Eriophyes sheldoni* (ácaro de la yema de citrus), *Brevipalpus lewisi* (ácaro plano de los cítricos), *Philocoptruta oleivora* (ácaro del tostado del citrus), *Petrobia lateens* (ácaro del trigo marrón), *Oxienus maxwelli* (ácaro del olivo), *Rhizoglyphus spp., Tyrophagus spp., Diptacus gigantorhyncus* (ácaro del ciruelo) y *Penthaleaa major* (caro invernal de los cereales), arañuela roja del té, ácaro plano, arañuela del mango negra y roja, ácaro de la Papaya, ácaro de citris Texas, arañuela roja europea, erinosis de la vid (ácaro blister), arañuela del Pacífico, araña de Willamette, ácaro del tostado de citrus.

Tales ubicaciones pueden incluir pero sin limitación cultivos que son infestado con tales ácaros u otros arácnidos (por ejemplo, áfidos).

La invención se describirá a continuación con mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Las composiciones y métodos expuestos anteriormente se ilustran adicionalmente en los siguientes Ejemplos no limitativos. Los ejemplos son ilustrativos de diversas formas de realización únicamente y no limitan la invención reivindicada respecto a los materiales, condiciones, proporciones de pesos, parámetros de proceso y similares, citados en esta memoria.

1. Ejemplo 1. Aislamiento e identificación de los microbios

1.1 Aislamiento del microorganismo

El microbio se aísla usando técnicas establecidas conocidas en la técnica a partir de una muestra de suelo recolectada bajo un árbol de hojas perennes en el Templo Rinnoji, Nikko, Japón. El aislamiento se realiza usando agar papa dextrosa (PDA) usando un procedimiento descrito en detalle por Lorch et al., 1995. En este procedimiento, la muestra de suelo se diluye primero en agua estéril, después de lo cual se plaquea en un medio de agar sólido, tal como agar papa dextrosa (PDA). Las placas se cultivan a 25 °C durante cinco días, después de los cuales las colonias microbianas individuales se aíslan en placas de PDA separadas. La bacteria aislada es gram negativa, y forma colonias redondas, opacas, de color crema que cambian a color rosado y marrón-rosáceo y a mucoides o viscosas con el tiempo.

1.2. Identificación del microorganismo

El microbio se identifica basándose en la secuenciación de genes usando cebadores bacterianos universales para amplificar la región de ARNr 16S. Se utiliza el siguiente protocolo: *Burkholderia sp.* A396 se cultiva en placas de agar papa dextrosa. El crecimiento de

24 horas de una placa es raspado con un ansa estéril y resuspendido en tampón de extracción de ADN. El ADN es extraído por medio del kit de extracción MoBio Ultra Clean Microbial DNA. El extracto de ADN es analizado para determinar calidad/cantidad mediante el procesamiento de 5 µl en un de gel de agarosa 1%.

Las reacciones de PCR se configuran de la siguiente manera: 2 µl de extracto de ADN, 5 µl de tampón de PCR, 1 µl de dNTPs (10 mM cada uno), 1,25 µl de cebador directo (27F; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (SEC ID NO: 1), 1,25 µl de cebador inverso (907R; 5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3' (SEC ID NO: 2)). y 0,25 µl de enzima Taq. El volumen de reacción se completa a 50 µl usando agua estéril libre de nucleasa La reacción de PCR incluye un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C/30 seg, 57 °C/20 seg, 72 °C/30 seg, y un paso de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

La concentración aproximada del producto y su tamaño se calculan mediante el procesamiento de un volumen de 5 µl en un gel de agarosa 1% y la comparación de la banda del producto con una escala de masas.

El exceso de cebadores, dNTPs y enzimas se retiran del producto de PCR con el kit de limpieza PCR Mobio. El producto de PCR limpio se secuencia directamente utilizando cebadores 27F (iguales a los anteriores), 530F (5'-GTGCCAGCCGCCGCGG-3' (SEC ID NO: 3)), 1114F (5'-GCAACGAGCGCAACCC (SEC ID NO: 4)) y 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3' (SEC ID NO: 5)), 1100R (5'-GGGTTGCGCTCGTTG-3' (SEC ID NO: 6)), 519R (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3' (SEC ID NO: 7).

La secuencia del gen de ARNr 16S de la cepa A396 se compara con las secuencias de genes de ARNr 16S disponibles de representantes de la β-proteobacteria mediante BLAST. La cepa A395 A396 está estrechamente relacionada con los

miembros del complejo *Burkholderia cepacia*, con una similitud del 99% o mayor a varios aislamientos de *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia vietnamensis* y *Burkholderia cepacia*. Una búsqueda de BLAST excluyendo el complejo *B. cepacia* mostró 98% de similitud con aislamientos de *B. plantarii*, *B. gladioli* y *Burkholderia sp.*

Un árbol de distancia de los resultados utilizando el método de unión al vecino, mostró que A396 se relaciona con *Burkholderia multivorans* y otros aislamientos de complejo de *Burkholderia cepacia*. *Burkholderia plantarii* y *Burkholderia glumae* se agruparon en una rama separada del árbol.

Se encontró que la cepa de *Burkholderia* aislada contenía las siguientes secuencias:

Secuencia directa, secuencia de ADN con cebador 27F, 815 nucleótidos (SEC ID NO: 8)

TGCAGTCGAACGGCAGCACGGGTGCTTGCACCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGT
GAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAAT
ACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGGATCTTCGGACCTCGCGCTATAGGGTTGG
CCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCT
GGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGT
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTTGGGCTAATA
CCCCGGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGC
GGTTTGTTAAGACAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGTGACTG
GCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGA
GATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCA
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGT
CAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCCTTAGTAACGTAGCTACGCGTGAAGTTGACCGCC
TGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAATMGAGGGTKGKKTGKKGGGGGGAAA

Secuencia inversa, 1453 bp, usando cebadores 1525R,

1100R, 519R (SEC ID NO: 9)

GTCATGAATCCTACCGTGGTGACCGTCCTCCTTGCGGTTAGACTAGCCACTTCT
GGTAAAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCA
CCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGCACTCGAGTTGCAGA
GTGCAATCCGGACTACGATCGGTTTTCTGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACC
CTCTGTTCCGACCATTGTATGACGTGTGAAGCCCTACCCATAAGGGCCATGAGGACTTG
ACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCTCTTGCGT
AGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACG
AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTATCGGTTCTCTTTCGAGCACTCCCGAATCT
CTTCAGGATTCCGACCATGTCAAGGGTAGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAAT
CCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGA
CCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTACGTTACTAAGGAAATGAATCCC
CAACAACTAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCT
CCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTATTGGCCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGT
ATTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCTACCCCCCTCTGCCA
TACTCTAGCTTGCCAGTCACAAATGCAGTTCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTCACATCT
GTCTTAACAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACC
CTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCCGGTACCGT
CATCCCCCCGGGGTATTAGCCCAAAGGATTTCTTTCCGGACAAAAGTGCTTTACAACCC
GAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGGTTTCCCCCATTGTCCAAAAT
TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATC
GTCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTTACCCCACCAACTAGCT
AATCAGCCATCGGCCAACCCTATAGCGCGAGGTCCGAAGATCCCCCGCTTTCATCCGTA
GATCGTATGCGGTATTAATCCGGCTTTCGCCGGGCTATCCCCCACTACAGGACATGTTC
CGATGTATTACTCACCCGTTCGCCACTCGCCACCAGGTGCAAGCACCCGTGCTGCCGTT
CGACTTGCATGTGTAAGGCATGCCGCCAGCGTTCAATCTGAG.

Secuencia inversa, 824 bp, usando cebador 907R (SEC NO: 10)

CCAGGCGGTCACTTCACGCGTTAGCTACGTTACTAAGGAAATGAATCCCCAACA
ACTAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCA
CGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTATTGGCCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCC
TCCACATCTCTACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCTACCCCCCTCTGCCATACTC
TAGCTTGCCAGTCACAAATGCAGTTCCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTCACATCTGTCTT

AACAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCTACG
TATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCCGGTACCGTCATCC
CCCCGGGGTATTAGCCCAAAGGATTTCTTTCCGGACAAAAGTGCTTTACAACCCGAAGG
CCTTCTTCACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGGTTTCCCCCATTGTCCAAAATTCCCC
ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCGTCCT
CTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATCA
GCCATCGGCCAACCCTATAGCGCGAGGTCCGAAGATCCCCCGCTTTCATCCGTAGATCG
TATGCGGTATTAATCCGGCTTTCGCCGGGCTATCCCCCACTACAGGACATGTTCCGATG
TATTACTCACCCGTTCGCCACTCGCCACCAGGTGCAAGCACCCGTGCTGCCGTTCGACT
TGCATGTGTAAGGCATGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGTG

Secuencia directa, 1152 bp, usando cebador 530F (SEC ID NO: 11)

TCGGATTACTGGGCGTAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGTTAAGACAGATGTGAAAT
CCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGTGACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGG
GGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGA
AGGGAGCCCCCTGGGCCTATACTGACCCTCATGCTCGAAAGCGTGAGGACCCAACCGGA
TTAGATGCCCTGATAGGCCATGCCCCACACCATGCCATGTGTTAGGGGCCCATTTCCTT
AGGGAGGCAGCTATGGGGAATTTTGGACAATGTGGGAAACCCTGATCCAACAATGCCGC
GTGTGTGAATAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTATCCGGATAGATTCCTTTTGGG
CTAAACCTCCGTAGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAACCACCGGGTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTG
CGCAGGCGGTTTGTTAAGACAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTT
GTGACTGGCAAGCTAGAGTATGGCAGACGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAAT
GCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGGCGAAGCAGCTCCTGGGGCAATACTGACGCT
CATGCACAAGATCGTGCGAAACAAACAGGATAAAACCCCTGTATTCCACGCCCAAAACG
ATGTCCACCAAGTTGTTGGCGATCCTTTCCTTCGTATCGTAGCTACGCGGGAATTTGAC
CCCCTGGGGACTAGGCCGCATATAAAACTCAAGGGAATTCCGGGGACCCCCAGAGCTGT
GTATGATGTGATTATTCCGATGCGCGGAAAACCTTCCTTATCTTTGAATGGCGGTACTC
CTGAAAATTGCGGAGTGCTCGAAAACACCGAACCCGGGTCTTTCTGCGTGTCCTCCCTC
GTGTGGGATATGCTGGATATCCCGCAGACGCATCTTTGACTTAGTGCTCCCAAAACTGA
GAGCTGGGAGGACTCGAGAGGGGATCCCTGCCTCCCCGGCTTGGGTGCTCCCCTTATGG
GGGAAACAGGTACACGGGGGGATCATCCCATACCTA

Secuencia directa, 1067 bp, usando cebador 1114F (SEC ID NO: 12)

TCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCC
TCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCC
AACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATTGCACTCTGCAA
CTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC
GTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTG
GCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCACGGTAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTC
GTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTAAACCCTTTGGCCT
AATAACCCCGGGGGAATAAGTACCGAAAAAAAAAAAAACTGGATAACTTCCGTGCCACA
ACCCGCGGAAAAATCTAGGGGGGGGGAGCTTAAATGGAAATTTACGGGGCCGTAAAGCG
TGCGCAGGCGGTTTGTAAACACAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCAT
TTGTGACTGGCAAGCTAGAGTATGGCACAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCATTGAA
TGCATAGAGATGAGAGGATACCGATGGAGAAGGGCGCCCCCGGGGACAATATGACGCCT
ATGCCACAAAGCTGTGGCACAATAGGTTAAATACCTGTGTTGTCCCCGCCTAAACAGAT
TACACTTGTTGTGGGTATTTTCTCATAAAATACTACACACGGGAGAATACACTGGGGGG
CTTCGTCAATTATCACAACAATGATTGCGGGCACCCACGGGGGTAGATGGGTAATAAAT
CGACGGCAACTATCTACTTACTTGGATGATCGCACAGATTGGGCGGGAGAGAAGAGAAC
AGCGTGTGTGTGCTCCTCCGCGAGTGATAGGTAATCGGACAATACTTTGACAGGACTTA
ACTGGGTAGCGGGATCGAGTGGATTCCCGTCGGATGGCCTCCGCAGGTACGGCAGCTGG
GGATTACATC

Secuencia inversa, 1223 bp, usando cebador 1525R (SEC NO: 13)

TTGCTTACGACTTCACCCCAGTCATGAATCCTACCGTGGTGACCGTCCTCCTTG
CGGTTAGACTAGCCACTTCTGGTAAAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
AAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCT
TCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAATCCGGACTACGATCGGTTTTCTGGGATTAGCTC
CCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTCTGTTCCGACCATTGTATGACGTGTGAAGCCCTACCC
ATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTC
TCCTTAGAGTGCTCTTGCGTAGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA
ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTATCGGTTCTC
TTTCGAGCACTCCCGAATCTCTTCAGGATTCCGACCATGTCAAGGGTAGGTAAGGTTTT
TCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCC

TTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTACG
TTACTAAGGAAATGAATCCCCAACAACTAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAG
GGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTATTGGCCCAGG
GGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACTGCTACACGTGG
AATTCTACCCCCCTCTGCCATACTCTAGCTTGCCAGTCACAAATGCAGTTCCCAGGTTA
AGCCCGGGGATTTCACATC+TGTCTTAACAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCCAGTA
ATTCCGATTAACGCTCGCACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGG
TGCTTATTCTGCGGTACCGTCATCCCCCGGGTATAGCCCAAAGGATTCTTTCGACAAAG
TGCTTTACACCCGATGTCTCTCACACACGCGCATGCTGATCAGGTTTCCCCATGTCAAA
GTCCACTGCTGCTCGTAGGTCTGGACGGGTTCAGTTCAATGTGACTGATCGTCTTTCGA
CAACTACTGAACGTCCCTGTAGCTTACCCACCAACTAGCTATAGCATGC

Secuencia inversa, 1216 bp, usando cebador 1100R (SEC ID NO: 14)

CCGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTATCGGTTCTCTTTCGAGCACTC
CCGAATCTCTTCAGGATTCCGACCATGTCAAGGGTAGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATC
GAATTAATCCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAA
TCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTACGTTACTAAGGAAA
TGAATCCCCAACAACTAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC
TGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTATTGGCCCAGGGGGCTGCCTTCG
CCATCGGTATTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCTACCCCC
CTCTGCCATACTCTAGCTTGCCAGTCACAAATGCAGTTCCCAGGTTAAGCCCGGGGATT
TCACATCTGTCTTAACAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACG
CTCGCACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCC
GGTACCGTCATCCCCCCGGGGTATTAGCCCAAAGGATTTCTTTCCGGACAAAAGTGCTT
TACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGGTTTCCCCCATTG
TCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGT
GGCTGATCGTCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTTACCCCACC
AACTAGCTAATCAGCCATCGGCCAACCCTATAGCGCGAGGTCCGAAGATCCCCCGCTTT
CATCCGTAGATCGTATGCGGTATTAATCCGGCTTTCGCCGGGCTATCCCCCACTACAGG
ACATGTTCCGATGTATTACTCACCCGTTCGCCACTCGCCCCAGGTGCAAGCACCCGTGC
TGCCGTTCGACTTGCATGTGTAGCATGCGCAGCGTCATCTACTAAATAAACAACTCTAA
GAATTTTTGCCCGAGGGCCTCTAAACACTCGGGGCGTCGAGAGAGACTACGGATGAGGA

GCATCCCTCTGTCTCTAGGTATGTGTTGTCGCCTCTCTCACAGAGGAGGGGACGCACGA
CGGAGCCATCGGGGACGACAACATGTACGATATACTATCTA

Secuencia inversa, 1194 bp, usando cebador 519R (SEC ID NO: 15)

TTCTTCGGTACCGTCATCCCCCCGGGGTATTAGCCCAAAGGATTTCTTTCCGGA
CAAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGGT
TTCCCCCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTC
AGTCCCAGTGTGGCTGATCGTCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTAGGCC
TTTACCCCACCAACTAGCTAATCAGCCATCGGCCAACCCTATAGCGCGAGGTCCGAAGA
TCCCCCGCTTTCATCCGTAGATCGTATGCGGTATTAATCCGGCTTTCGCCGGGCTATCC
CCCACTACAGGACATGTTCCGATGTATTACTCACCCGTTCGCCACTCGCCACCAGGTGC
AAGCACCCGTGCTGCCGTTCGACTTGCATGTGTAAGGCATGCCGCCAGCGTTCAATCTG
AGCCATGATCAAACTCTGAGGGGGGGGGCCTTCAACGGAACGACTGGGCAAAAAGCGTG
CCCAGGCGTTTTGTTAAGACAGATGTGAAACCCCGGGGCTTAACCTGGAAACTGCATTT
GTGACTGGAAAGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCATTGAAAT
GCGTAGAAATGGAGAGGAATACCGATGGGAGAGGGCAGCCCCCGTGGGCAAATACTGGC
GCTTATGAACAAAGTTGGGGCGCGCCGCCGGGATATGTTCCCCTGGGATATCCCCCCCC
TAAACTGCTTACAAATATTGTGTGGGAAACTTTTTCTCTAAAAAATAGAACACAACGGG
AGATATCACCCCCGGGGGGCCACCGCCAGATTAAACCCCCAAAAAGTATTTGGCGGGCA
CCCCCCCGGGGGGTGAGATGGGGTAAAATAAATCCGTGCGACGAGCAAACCCTCCCCAC
ACCTGGGATGGTCGCGACCACAGATGAGATGCGGGCGGAGAGAACGATACCCAAGCGTG
GTTGTTTGCCTGCATCCCCTCCGTCGGGAGTGGATATAGTAGAGTAATTACGGCACGAC
TGCATTTTTTTTTCTTCAGTACACCTTATCACACTGTTGGATGCACCGCGAGAAATCCG
GAGGTGTGAGTACTCCCCCCCTCTCCTCGGGATGTGTCGGCGCTCCCTTCTCCCGTTCA
GGGGTGGGTAAGCACCGCG

1.3. Prueba de que Burkholderia A396 no pertenece al complejo Burkholderia cepacia

1.3.1 Pruebas de biología molecular utilizando cebadores de PCR específicos

Con el fin de confirmar la identificación de *Burkholderia A396* como *Burkholderia multivorans*, se realizó la secuenciación adicional de los genes constitutivos.

Burkholderia multivorans es un miembro conocido del complejo *Burkholderia cepacia*. Los esfuerzos se centran en la PCR de los genes recA, como describen Mahenthiralingam et al., 2000. Se utilizan los siguientes cebadores: (a) BCR1 y BCR2 establecidos en Mahenthiralingam et al, 2000 para confirmar la coincidencia con el complejo de *B. cepacia* y (b) BCRBM1 y BCRBM2 establecidos en Mahenthiralingam et al, 2000 para confirmar la coincidencia con *B. multivorans*. Un producto resultante de la reacción de PCR para el primer conjunto de cebadores confirmaría que el microbio pertenece al complejo *B. cepacia*. Un producto resultante de la reacción de PCR para el segundo conjunto de cebadores confirmaría que el microbio es en efecto *B. multivorans*.

No se obtiene ningún producto de PCR para cada par de cebadores. El rendimiento de la reacción de PCR y los cebadores es examinado utilizando *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 (control positivo) y *Pseudomonas fluorescens* (control negativo). Se observaron bandas fuertes para *B. multivorans* utilizando dos conjuntos de cebadores. No se observan bandas para *Pseudomonas fluorescens*. Los resultados indican que A396 es una *Burkholderia*, pero no un miembro del complejo de *B. cepacia*; y no es *Burkholderia multivorans*. Esto también se demuestra en un experimento de cultivo comparativo en el que A396 y un cultivo tipo de *B. multivorans* se cultivan en paralelo en un cultivo con agitación, y el crecimiento se controla diariamente con medidas de densidad óptica a 600 nm. En las condiciones establecidas, la especie A396 creció mucho más rápido que la cepa tipo de ***B. multivorans*** (Figura 1).

1.3.2 Hibridación ADN-ADN

Con el fin de confirmar que el aislamiento A396 es una nueva especie de *Burkholderia*, se lleva a cabo un

experimento de hibridación ADN-ADN con *Burkholderia multivorans* (la secuencia de 16SrARN con coincidencia más cercana). La biomasa para A396 y *B. multivorans* se produce en caldo ISP2, desarrollado durante 48 horas a 200 rpm/25 °C en matraces Fernbach. La biomasa es cosechada asépticamente por centrifugación. El caldo es decantado y el pellet de células se resuspende en una solución 1:1 de agua: isopropanol. Los experimentos de hibridación de ADN-ADN son realizados por DSMZ, la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares en Alemania. Se aísla el ADN usando una célula de presión francesa (Thermo Spectronic) y se purifica por cromatografía en hidroxiapatita como se describe en Cashion et al., 1977. La hibridación ADN-ADN se lleva a cabo como se describe en De Ley et al., 1970 considerando las modificaciones descritas en Huss et al., 1983 utilizando un espectrofotómetro modelo Cary 100 Bio UV/VIS equipado con cambiador multiceldas de 6x6 termostatizado Peltier y un controlador de temperatura con sonda de temperatura in situ (Varian). DSMZ informó un porcentaje de similitud de ADN-ADN entre A396 y *Burkholderia multivorans* del 37,4%. Los resultados indican que la cepa A396 de *Burkholderia* sp. no pertenece a la especie de *Burkholderia multivorans* cuando se consideran las recomendaciones de un valor umbral de similitud de ADN-ADN del 70% para la definición de especies bacterianas del comité ad hoc (Wayne et al., 1987).

1.4. Perfil bioquímico utilizando placas Biolog GN2

Para el perfil de utilización de fuentes de carbono, se cultivó A396 durante una noche en Agar Papa Dextrosa (PDA). El cultivo se transfirió a agar BUG para producir un cultivo adecuado para los experimentos en Biolog según recomendación del fabricante (Biolog, Hayward, CA).

El perfil bioquímico del microorganismo se determina

mediante la inoculación en una placa de Biolog GN2 y la lectura de la placa después de una incubación de 24 horas usando el sistema de micro-estación automatizado MicroLog 4. La identificación de las bacterias desconocidas es intentada mediante la comparación de su patrón de utilización de carbono con la base de datos de Gram negativos de Microlog 4.

No se encuentran coincidencias claras definitivas en el perfil de Biolog. Las coincidencias más cercanas tuvieron menos de 35% de similitud con A396: *Pseudomonas spinosa* (*Burkholderia*), Burkholderia cepacia y *Burkholderia pseudomallei*. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Perfil bioquímico de A396

Sustrato	**Resultado**	**Sustrato**	**Resultado**
Ciclodextrina	–	L-arabinosa	–
Dextrina	–	D-arabitol	–
Glucógeno	–	D-celobiosa	–
Tween 40	+	Eritritol	–
Tween 80	+	D-Fructosa	–
N-acetil-D-Galactosamina	–	L-Fucosa	–
N-acetil-D-glucosamina	–	D-Galactosa	+/-
Adonitol	–	Gentibiosa	–
Ácido succínico mono-metil éster	–	D-Glucosa	+
Ácido acético	–	m-Inositol	–
Ácido cis-aconítico	–	D-Lactosa	–
Ácido cítrico	–	Lactulosa	–
Ácido fórmico	+	Maltosa	–
Lactona del ácido D-galactónico	–	D-Manitol	–
Ácido D-galacturónico	–	D-Manosa	–
Ácido D-glucónico	–	D-Melibiosa	–
Ácido D-glucosamínico	–	β-metil-D-glucósido	–

Sustrato	**Resultado**	**Sustrato**	**Resultado**
Ácido D-glucurónico	-	D-Psicosa	-
Ácido α-hidroxibutírico	-	D-Rafinosa	-
Ácido β-hidroxibutírico	+	L-Ramonosa	-
Ácido γ-hidroxibutírico	-	D-Sorbitol	-
Ácido p-hidroxifenilacético	-	Sacarosa	-
Ácido itacónico	-	D-Trehalosa	+
Ácido α-ceto butírico	-	Turanosa	-
Ácido α-ceto glutárico	-	Xilitol	-
Ácido α-ceto valérico	-	Metil éster del ácido pirúvico	-
Ácido D,L-láctico	-	Uridina	-
Ácido malónico	-	Timidina	-
Ácido propiónico	+	Feniletil-amina	-
Ácido quínico	-	Putrescina	-
Ácido D-sacárico	-	2-Aminoetanol	-
Ácido sebácico	-	2,3-Butanodiol	-
Ácido succínico	+	Glicerol	+/-
Ácido bromosuccínico	-	D,L-a-glicerol fosfato	+/-
Ácido succinámico	-	α-D-Glucosa-1-fosfato	-
Glucuronamida	-	D-glucosa-6-fosfato	+
L-alaninamida	+	Ácido γ-amino butírico	+
D-Alanina	-	Ácido urocánico	-
L-alanina	+	Inosina	-
L-alanil-glicina	-	L-fenilalanina	+
L-asparagina	+	L-prolina	-
Ácido L-aspártico	+/-	Ácido L-piroglutámico	-
Ácido L-glutámico	+	D-serina	-
Ácido glicil-L-aspártico	-	L-serina	-
Ácido glicil-L-glutámico	-	L-treonina	-
L-histidina	-	D,L-carnitina	-
Hidroxi-L-prolina	+	L-ornitina	-

Sustrato	Resultado	Sustrato	Resultado
L-leucina	-		

1.5. Composición de ácidos grasos

Después de la incubación durante 24 horas a 28°C, se cosechó una ansada de células bien desarrolladas y los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron preparados, separados e identificados usando el Sistema de Identificación Microbiana Sherlock (MIDI) (ver Vandamme et al., 1992). Los ácidos grasos predominantes presentes en *Burkholderia* A396 son los siguientes: 16:0 (24,4%), ciclo 17:0 (7,1%), 16:0 3- OH (4,4%), 14:0 (3,6%), 19:0 ω8*c* (2,6%) ciclo, 18:0 (1,0%). La característica 8 sumada (que comprende 18:1 ω7*c*) y la característica 3 sumada (que comprende 16:1 ω7c y 16:1 ω6*c*) correspondieron a 26,2% y 20,2 % del área de pico total, respectivamente. La característica 2 sumada que comprende 12:0 ALDE, 16:1 iso I, y 14:0 3-OH) correspondía a 5,8% del área de pico total mientras que la característica 5 sumada que comprende 18:0 ANTE y 18:2 ω6,9c correspondía a 0,4%. Otros ácidos grasos detectados en A396 en menores cantidades incluyeron: 13:1 a 12-13 (0,2%), 14:1 ω5c (0,2%), 15:0 3-OH (0,13%), 17:1 ω7c (0,14%), 17:0 (0,15%), 16:0 iso 3-OH (0,2%), 16:0 2-OH (0,8%), 18:1 ω7c 11-metil (0,15%), y 18:1 2-OH (0,4%).

Una comparación de la composición de ácidos grasos de A396 con los de las cepas microbianas conocidas en la base de datos MIDI sugirió que los ácidos grasos en la nueva cepa A396 eran más similares a los de *Burkholderia cenocepacia*.

1.6 Resistencia a antibióticos

La susceptibilidad a los antibióticos de *Burkholderia A396* se prueba usando discos de antibióticos en medio

Muller-Hinton como se describe en la ficha técnica # 535 de PML Microbiological. Los resultados obtenidos después de 72 horas de incubación a 25 °C se presentan en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Susceptibilidad de MBI-206 a diversos antibióticos. +++ muy susceptible, ++ susceptible, - resistente

	Concentración (µg)	**Susceptible**
Tetraciclina	30	-
Kanamicina	30	+++
Eritromicina	15	-
Estreptomicina	10	-
Penicilina	10	-
Ampicilina	10	-
Oxitetraciclina	30	-
Cloranfenicol	30	++
Ciprofloxacina	5	++
Gentamicina	10	-
Piperacilina	100	+++
Cefuroxima	30	-
Imipenem	10	+++
Sulfametoxazol-Trimetoprima	23,75/ 25	++

Los resultados indican que el espectro de susceptibilidad a antibióticos de *Burkholderia* A396 es bastante diferente del de las cepas del complejo patógeno de *B. cepacia*. *Burkholderia* A396 es susceptible a kanamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, piperacilina, imipenem, y una combinación de sulfametoxazol y trimetoprima. Como comparación, Zhou et al., 2007 examinaron la susceptibilidad de 2.621 cepas diferentes en

el complejo de *B. cepacia* aisladas de pacientes con fibrosis quística, y encontraron que sólo el 7% y el 5% de todas las cepas fueron sensibles a imipenem o ciprofloxacina, respectivamente. También encontraron que 85% de todas las cepas eran resistentes al cloranfenicol (15% susceptibles), y 95% eran resistentes (5% susceptibles) a la combinación de sulfametoxazol y trimetoprima. Los resultados de Zhou et al., 2007 son similares a los de Pitt et al., 1996 que determinaron resistencia a los antibióticos en 366 aislamientos de *B. cepacia* e informaron que la mayoría de estos son resistentes a ciprofloxacina, cefuroxima, imipenem, cloranfenicol, tetraciclina y sulfametoxazol.

2. Ejemplo 2: Formulación de *Burkholderia* y aislamiento de fracciones del producto formulado

El siguiente procedimiento se utiliza para la purificación de los compuestos extraídos de un producto formulado de MBI-206 que contiene un caldo de células enteras de un cultivo de *Burkholderia* sp.:

El caldo de cultivo derivado de la fermentación de 10 L de *Burkholderia* (A396) en medio de crecimiento Hy soja y formulado usando metil parabeno 0,1% y propil parabeno 0,1%, hexanol 0,67% y Glycosperse 0-20 0,67%, se extrae con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar et al., "Weakly cytotoxic polyketides from a marine-derived Actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085." J. Nat. Prod. 69:1756-1759. 2006) agitando la suspensión celular con resina a 225 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. La resina y la masa de células se recogen por filtración a través de gasa y se lavan con agua DI para eliminar las sales. La resina, la masa de células y la gasa se sumergen a continuación durante 2 h en acetona después de lo cual la acetona se filtra y se seca al vacío empleando un evaporador rotatorio

para dar el extracto en bruto (MBI-206-FP-CE). El extracto en bruto se fracciona a continuación mediante cromatografía líquida al vacío C18 en fase inversa (H_2O/CH_3OH; gradiente de 80:20 a 0:100%) para dar 10 fracciones (ver Figura 1 para el esquema). Estas fracciones se concentran a continuación a sequedad empleando un evaporador rotatorio y los residuos secos resultantes se examinan para determinar la actividad biológica usando un ensayo completo de herbicidas vegetales. Las fracciones activas, fracciones 3, 4, 5 y 6 designadas como MBI-206-FP-3, MBI-206-FP-4, MBI-206-FP-5 y MBI-206-FP-6, respectivamente, son luego sometidas a separaciones repetidas por HPLC de fase inversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) para dar compuestos puros, que se examinan a continuación en los bioensayos mencionados anteriormente para localizar/identificar los compuestos activos (ver Figura 2).

2.1 Análisis de fracciones de la formulación

Estas fracciones se analizaron en un instrumento de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) Thermo equipado con un detector PDA Finnigan Surveyor, un inyector automático, una bomba de MS y una columna de 4,6 mm x 100 mm Luna C18 5 µm (Phenomenex). El sistema de solventes consistía en agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). La fase móvil comienza con 10% de solvente B y se incrementa linealmente hasta 100% de solvente B durante 20 min y luego se mantiene durante 4 min, y finalmente vuelve a 10% de solvente B durante 3 min y se mantiene durante 3 min. El caudal es de 0,5 ml/min. El volumen de inyección es de 10 µl y las muestras se mantienen a temperatura ambiente en un muestreador automático.

A fin de descubrir la identidad del compuesto, se registran datos espectroscópicos adicionales como LC/MS y

UV. El compuesto correspondiente a la fracción 5, con un tiempo de retención de 17,45 minutos no es encontrado en ninguno de los materiales iniciales, lo que indica que el compuesto es un producto de una reacción química entre los productos naturales en el caldo de fermentación microbiana y uno o más de los compuestos encontrado en los agentes de formulación. Específicamente, esta fracción se analizó mediante ESI-LCMS en un instrumento de electroaspersión (ESI) Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus usando los modos de ionización positivo y negativo en un modo de barrido completo (*m/z* 100-1500 Da) en un espectrómetro de masas LCQ Deca XP^{plus} (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). El análisis por espectroscopía de masas se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones: el caudal del gas nitrógeno se fijó en 30 y 15 arb para el caudal de gas impulsor y auxiliar/de barrido, respectivamente. La ionización por electroaspersión se llevó a cabo con un voltaje de pulverización fijado en 5000 V y un voltaje capilar a 35,0 V. La temperatura del capilar se fijó en 400 °C. Los datos se analizaron en un software Xcalibur. Se halló que los nuevos compuestos adicionales encontrados en la fracción 5 tienen un peso molecular (PM) de 194 (RT = 14,74 min) y 222 (RT = 17,43 min).

2.2 Bioensayo

Se seleccionaron para la prueba plantas sanas de rábano con dos o tres hojas verdaderas. Las plantas de rábano tenían 13 días de edad en el tratamiento. Las plantas son ordenadas de modo que todos los tratamientos son equivalentes en superficie foliar y altura de la planta. Las macetas son etiquetadas con el número de tratamiento y el número de repetición. Se examinan tres repeticiones por tratamiento.

Se analizan diez fracciones de producto formulado MBI-206. Las fracciones están a una concentración de 10 mg/ml. Se analizan también los extractos en bruto del producto formulado y el caldo. Se incluyen en el ensayo un control no tratado (tratado con agua desionizada) y un control positivo (RoundUp Super Concentrado a una tasa de 2,5 onzas fluidas por galón).

Los siguientes tratamientos fueron ensayados como se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3: Descripción del ensayo

Tratamiento	**ID de la muestra**	**Descripción**
1	MBI-206-FP-F1	etanol 4%/agua (Glycosperse 0,2%)
2	MBI-206-FP-F2	etanol 4%/agua (Glycosperse 0,2%)
3	MBI-206-FP-F3	etanol 4%/agua (Glycosperse 0,2%)
4	MBI-206-FP-F4	etanol 4%/agua (Glycosperse 0,2%)
5	MBI-206-FP-F5	etanol 4%/agua (Glycosperse 0,2%)
6	MBI-206-FP-F6	etanol 4%/agua (Glycosperse 0,2%)
7	MBI-206-FP-F7	etanol 4%/agua (Glycosperse 0,2%)
8	MBI-206-FP-F8	etanol 4%/agua (Glycosperse 0,2%)
9	MBI-206-FP-F9	etanol 4%/agua (Glycosperse 0,2%)
10	MBI-206-FP-F10	etanol 4%/agua (Glycosperse 0,2%)
11	MBI-206-FP-CE	etanol 4%/agua (Glycosperse 0,2%)
12	MBI-206-FP-CE (caldo)	etanol 4%/agua (Glycosperse 0,2%)
13	UTC	UTC (agua DI)
14	Control positivo	Control Positivo (RoundUp @ 2,5 onzas fluidas/galón (AI: glifosato @ 50,2%))

Todos los productos y tratamientos son bien agitados antes de la aplicación. Los tratamientos se aplican mediante una boquilla a partir de un frasco de pulverización de 2 onzas. Se utilizaron boquillas de pulverización separadas para cada tratamiento. El follaje de la planta se pulverizó uniformemente y con un volumen moderado (es decir, ni un rocío ligero ni una aplicación pesada que diera lugar a escurrimiento). Se pulverizan simultáneamente dos mililitros de cada tratamiento en las tres repeticiones de cada tratamiento, de manera que cada planta se trata con aproximadamente 0,67 ml de solución de tratamiento.

Las plantas se dejan secar al aire y luego son aleatorizadas en bandejas de retención. Cada bandeja es etiquetada con el nombre del experimento y la fecha del tratamiento y colocada en los estantes del invernadero del laboratorio. El invernadero del laboratorio se mantiene a una temperatura de 70-80 °C y una humedad relativa de 30-40%. Durante todo el bioensayo, las plantas son regadas desde abajo llenando las bandejas de retención con una cantidad apropiada de agua de modo que el follaje de la planta se mantenga seco.

Se registran los resultados a los 3, 8, y 14 días después del tratamiento. Los síntomas incluyeron quemadura del follaje y retraso en el crecimiento de las plantas. La siguiente escala de calificación mostrada en la Tabla 4 se utiliza para cuantificar la eficacia. Las calificaciones se determinan mediante la observación de los siguientes factores en relación con las plantas del control no tratado: salud general de la planta, altura media de la planta, y salud del follaje. Los síntomas de las plantas afectadas pueden incluir follaje decolorado/manchado/quemado/blanqueado, hojas deformadas/retorcidas/encrespadas, formación de ramas

laterales (debido a daño en el meristema apical), marchitamiento de la planta, o muerte.

Tabla 4: Escala de calificación

0 – 0% de síntomas en el control
0.5 – ≤ 5% de síntomas en el control
1 – 10% de síntomas en el control
2 – 25% de síntomas en el control
3 – 50% de síntomas en el control
4 – 75% de síntomas en el control
5 – 100% de síntomas en el control

En la Figura 2 se muestra la media de tres lecturas. En la prueba completa de herbicidas vegetales, las fracciones 4 y 5 muestran buena actividad herbicida (ver Figura 2).

2.3 Aislamiento de compuestos plaguicidas a partir de la formulación

Esta fracción se purificó adicionalmente usando una columna de HPLC de C–18 (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), un gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (0–10 min; CH_3CN 80 % en agua, 10–25 min; CH_3CN 80 – 65 % en agua, 25–50 min; CH_3CN 65 – 50 % en agua, 50–60 min; CH_3CN 50 – 70 % en agua, 60–80 min; CH_3CN 70 – 0 % en agua, 80–85 min; CH_3CN 0 – 20 % en agua) a un caudal de 8 ml/min y detección al UV a 210 nm, para dar butil parabeno, tiempo de retención 59,15 min (MBI206–FP–F5H32) y hexil parabeno, tiempo de retención 74,59 min (MBI206–FP–F5H40), respectivamente.

2.3.1 Análisis de compuestos por espectroscopía de RMN

Los espectros de RMN se midieron en un espectrómetro Bruker de 600 MHz de campo de gradiente. La referencia se

establece en el estándar interno tetrametilsilano (TMS, 0,00 ppm).

2.3.1.1 Determinación de la estructura de hexil parabeno (MBI206-FP-F5H40)

El compuesto activo fue aislado en forma de un sólido incoloro, con absorción al UV a 248 nm. El (-) ESIMS mostró un ion molecular a 221 (MH) correspondiente al peso molecular de 222. El compuesto exhibió un $^{1H\ RMN}$ con señales a δ 7,90, 6,85, 4,28, 1,76, 1,46, 1,38, 1,37, 0,94 y tenía valores de ^{13}C RMN de 166,84, 162,12, 131,34 (2C), 121,04, 114,83 (2C), 64,32, 31,25, 28,43, 25,45, 22,18, 12,93. Se asignó la fórmula molecular $C_{13}H_{18}O_3$ (5 grados de insaturación) por combinación de los datos de espectrometría de masa de RMN y ESI. El espectro de $^{1H\ RMN}$ exhibió señales de una estructura aromática tipo A_2B_2 en δ 7,90, 2H d, *J* = 8,5 Hz, y 6,85, 2H d, *J* = 8,5 Hz. Además, el espectro de $^{1H\ RMN}$ reveló la presencia de un grupo $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$, en δ 4,28, 2H, t, *J* = 7,3 Hz; 1,76, 2H, m, 1,46, 2H , m; 1,38, 2H, m; 1,37, 2H, m, y 0,94, 3H, t, *J* = 7,3 Hz. Del análisis de los datos espectrales anteriores, la estructura del policétido aromático se estableció como hexil parabeno, la cual se confirmó por el análisis detallado de los experimentos de COSY, HMQC y HMBC. Una búsqueda bibliográfica reveló que este compuesto ha sido reportado como un compuesto sintético.

2.3.1.2 Determinación de la estructura de butil parabeno (MBI206-FP-F5H32)

Este compuesto se obtuvo como un sólido incoloro con UV máx a 248 nm. El análisis de LCMS en el modo negativo mostró un ion molecular a *m/z* 193 correspondiente a la fórmula molecular 194. Por comparación de los datos de UV, MS y RMN con el hexil parabeno con PM 222, se encontró que

este compuesto era el análogo del hexil parabeno. La única diferencia entre los mismos estaba solamente en la cadena lateral. De este modo, se asignó la estructura de butil parabeno a este compuesto con PM 194. Una búsqueda en la literatura sugirió que este compuesto también es conocido como un compuesto sintético.

2.3.2 Actividad herbicida

Los compuestos puros (butil parabeno [MBI206-FP-F5H32] y hexil parabeno [MBI206-FP-F5H40]) obtenidos a partir de la fracción 5 se ensayaron a una concentración de 10 mg/ml. Se incluyen en la prueba un control no tratado (tratado con agua desionizada), el blanco de formulación (a 3% v/v y 10% v/v), y un control positivo (RoundUp Super Concentrado a una tasa de 2,5 onzas fluidas por galón).

Los siguientes tratamientos se ensayaron como se muestra en la Tabla 5:

Tabla 5: Régimen de tratamiento

Descripción del ensayo

Tratamiento	**ID de la muestra**	**Descripción**	**Volumen (ml) de muestra**
1	UTC	UTC (agua DI)	2
2	Butil parabeno (MBI206-FP-F5H32)	4% etanol/agua (Glycosperse 0,2%)	2
3	Hexil parabeno (MBI206-FP-F5H40)	4% etanol/agua (Glycosperse 0,2%)	2
4	Blanco	Blanco de formulación @ 3% v/v	2
5	Blanco	Blanco de formulación @ 10% v/v	2
6	Control positivo	Control positivo (RoundUp @ 2,5 onzas fluidas por galón (AI: glifosato @ 50,2%))	2

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: Resultados del bioensayo

	Lectura del Día 1					**Lectura del Día 7**				
	Repeticiones			**Control**		**Repeticiones**			**Control**	
Tratamiento	**1**	**2**	**3**	**Promedio**	**DE**	**1**	**2**	**3**	**Promedio**	**DE**
1	0	0	0	0,0	0,0	0	0	0	0,0	0,0
2	25	5	25	18,3	11,5	25	10	37,5	24,2	13,8
3	75	75	75	75,0	0,0	87,5	87,5	87,5	87,5	0,0
4	0	0	0	0,0	0,0	0	0	0	0,0	0,0
5	0	0	0	0,0	0,0	0	0	0	0,0	0,0
6	0	0	0	0,0	0,0	87,5	87,5	75	83,3	7,2

Sobre la base de los datos presentados en la tabla anterior, se encontró que el hexil parabeno era el compuesto herbicida más potente.

2.3.3 Actividad insecticida

Se examinó la actividad insecticida de butil parabeno (MBI206-FP-F5H32) y hexil parabeno (MBI206-FP-F5H40) en un ensayo de laboratorio utilizando una prueba de superposición de dieta de 96 pocillos con larvas de gusano cogollero de la remolacha instar (*Spodoptera exigua*) en primer estadio empleando placas de microtitulación con 200 µl de dieta sólida, artificial para gusano cogollero de la remolacha en cada pocillo. Se pipetean 100 µl de cada muestra de ensayo (que contenían 40 µg de muestra) en la parte superior de la dieta (una muestra en cada pocillo) y la muestra se deja secar bajo corriente de aire hasta que la superficie esté seca. Cada muestra se ensayó en seis repeticiones, y se utilizaron agua y un producto comercial Dipel como controles negativos y positivos, respectivamente. Se colocó una larva de primer estadio del insecto de ensayo (gusano cogollero de la remolacha -

Spodoptera exiqua) en cada pocillo, y la placa se cubrió con una cubierta de plástico con respiraderos. Las placas con los insectos se incubaron a 26 °C durante 6 días con evaluaciones diarias de la mortalidad. Sobre la base de los resultados presentados en la Tabla 7, hexil parabeno y butil parabeno produjeron 71% y 9% de mortalidad, respectivamente.

Tabla 7. Datos del bioensayo insecticida para butil parabeno (MBI206-FP-F5H32) y hexil parabeno (MBI206-FP-F5H40) contra gusano cogollero de la remolacha en primer estadio (*Spodoptera exigua*).

Información de la muestra	Día 3	Día 4
	Promedio	Promedio
Butil parabeno MBI206-FP-F5H32) @ 40 mg/pocillo	8,93	8,9286
Hexil parabeno (MBI206-FP-F5H40) @ 40 mg/pocillo	50,00	70,833
Dipel 2%	0,00	0
Dipel 4%	25,00	25
Dipel 8%	0,00	25
Dipel 16%	0,00	0
Dipel 32%	0,00	0
Dipel 64%	25,00	100
EtOH 40%	14,29	14,286
Dipel	33,33	100
H_20	0,00	0

2.3.4 Actividad nematicida; Prueba in vitro de butil parabeno (MBI206-FP-F5H32) y hexil parabeno (MBI206-FP-F5H40):

La muestra pura de butil parabeno y hexil parabeno fue utilizada en un bioensayo in vitro en una placa de cultivo celular de plástico de 96 pocillos. Se expusieron 15-20 nematodos en una solución de 50 µl de agua a 3 µl de un concentrado máximo de 20 mg/ml durante un período de 24

horas a 25 °C. Una vez completado el período de incubación, se registraron los resultados sobre la base de una clasificación visual de la inmovilidad de los nematodos juveniles (J2) en cada pocillo tratado con compuestos; cada tratamiento se ensayó en repeticiones de 4 pocillos. Los resultados se presentan en la Tabla 8, que muestra resultados de dos bioensayos de extractos de compuestos diferentes en placas de 96 pocillos. Se incluyen tres controles en cada ensayo; uno positivo (Avid 1%) y 2 negativos (DMSO y agua). Un ensayo (T1) se realizó utilizando nematodos *M. incognita* y otro ensayo (T2) se realizó utilizando nematodos *M. hapla*, las muestras se disolvieron en DMSO 100%. El hexil paraben (MBI206-FP-F5H40) mostró un excelente control con inmovilidad del 93,75% frente a *M. incognita* en comparación con butil parabeno con inmovilidad del 81,25%.

Tabla 8: Efecto del hexil parabeno y del butil parabeno en *M. incognita* y *M. hapla*.

Información de la muestra	% de inmovilidad (ensayo # T1)	% de inmovilidad (ensayo # T2)	Media del % de inmovilidad
MBI206-FP-F5H32 (butil parabeno)	75	87,5	81,25
MBI206-FP-F5H40 (hexil parabeno)	87,5	100	93,75
Avid (1%)	75	75	75
DMSO	6,25	0	3,12
Agua	0	0	0

2.3.5 Estudio de la formación de parabenos en la formulación del producto

Con el fin de comprender la formación de estos parabenos, se tomó en consideración el efecto del cambio del alcohol en la formulación. Se utilizaron en la

formulación alcoholes de diferentes cadenas de carbono y se monitoreó la formación de nuevos parabenos mediante LCMS.

Se realizaron cuatro experimentos de formulación separados utilizando butanol, hexanol, octanol y alcohol cetílico y todos los otros componentes se mantuvieron iguales. Los productos de formulación fueron extraídos durante el período de 2 días y 3 semanas. Los extractos en bruto obtenidos a partir de estas formulaciones se analizaron por LCMS. Se formaron los parabenos correspondientes para todos los alcoholes a excepción del alcohol cetílico. Se encontró que el rendimiento de los parabenos era más alto para el butil parabeno, seguido por hexil parabeno y luego octil parabeno para el producto de formulación con antigüedad de un día. El resultado del análisis, incluso después de 3 semanas, seguía el mismo orden, es decir, butil parabeno > hexil parabeno > octil parabeno. De esta manera, se halló que la velocidad de formación de parabenos tales como butil parabeno, hexil parabeno y octil parabeno dependía de la cadena de carbonos (número de carbonos), del solvente (alcohol), del alcohol correspondiente utilizado en la formulación (butanol (C4) > hexanol (C6) > octanol (C8), etc.). La formación de cetil parabeno no se detectó hasta pasadas 3 semanas. Se halló que los rendimientos de estos parabenos aumentaban con el tiempo.

Se llevó a cabo otro grupo de experimentos para entender el papel del caldo de células enteras (WCB) en la formación de los nuevos análogos de parabeno. En 4 experimentos diferentes se realizaron los siguientes cambios en la formulación:

- Experimento 1: Propil parabeno (sin metil parabeno) + WCB + otros componentes

- Experimento 2: Metil parabeno (sin propil parabeno) + WCB + otros componentes

– Experimento 3: Sin parabenos (ambos) + WCB + otros componentes

– Experimento 4: Metilparabeno + propilparabeno + WCB + otros componentes.

Las formulaciones anteriores se extrajeron por separado y los extractos en bruto obtenidos fueron analizados mediante LCMS. La formación de hexil parabeno se observó sólo en los dos primeros experimentos. De este modo, estos experimentos sugieren que el WCB desempeña un papel muy importante en la formación de estos parabenos.

3. Ejemplo 3. Aislamiento de Templazol A y B

Métodos y Materiales

Se utilizó el siguiente procedimiento para la purificación de Templazol A y B extraído a partir del cultivo de células de *Burkholderia sp* (ver Figura 3):

El caldo de cultivo resultante de la fermentación de 10 L de *Burkholderia* (A396) en medio de crecimiento Hy soja se extrae con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar et al., 2006) agitando la suspensión celular con resina a 225 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. La resina y la masa de células se recogen por filtración a través de gasa y se lavan con agua DI para eliminar las sales. La resina, la masa de células y la gasa se sumergen a continuación durante 2 h en acetona después de lo cual la acetona se filtra y se seca al vacío empleando un evaporador rotatorio para dar el extracto en bruto. El extracto en bruto se fracciona a continuación mediante cromatografía líquida al vacío C18 en fase inversa (H_2O/CH_3OH; gradiente de 90:10 a 0:100%) para dar 11 fracciones. Estas fracciones se concentran a continuación a sequedad empleando un evaporador rotatorio y los residuos secos resultantes se examinan para determinar la actividad biológica usando un ensayo de siembra de lechuga en placas de 96 pocillos. Las

fracciones activas son luego sometidas a HPLC de fase inversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) para dar compuestos puros, que se examinan a continuación en los bioensayos mencionados anteriormente para localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registraron datos espectroscópicos adicionales tales como LC/MS y RMN.

La fracción activa **5** se purificó adicionalmente por HPLC utilizando una columna C-18 (Phenomenex, Luna 10u C18 (2) 100 A, 250 x 30), un gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (0-10 min; CH_3CN 80% en agua, 10-25 min; CH_3CN 80 - 65% en agua, 25-50 min; CH_3CN 65 - 50 % en agua, 50-60 min; CH_3CN 50-70%, 60-80 min; CH_3CN 70-0% en agua, 80-85 min; CH_3CN 0 - 20% en agua) a un caudal de 8 ml/min y detección al UV a 210 nm, para dar templazol B, tiempo de retención 46,65 min. La otra fracción activa **7** se purificó también usando una columna de HPLC C-18 (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), un gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (0-10 min; CH_3CN 80 % en agua, 10-25 min; CH_3CN 80 - 60 % en agua, 25-50 min; CH_3CN 60 - 40% en agua, 50-60 min; CH_3CN 40%, 60-80 min; CH_3CN 40-0% en agua, 80-85 min; CH_3CN 0-20 % en agua) a un caudal de 8 ml/min y detección al UV a 210 nm, para dar templazol A, tiempo de retención 70,82 min.

El análisis por espectroscopía de masas de los compuestos puros se llevó a cabo en un instrumento de electroaspersión (ESI) Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus usando los modos de ionización positivo y negativo en un modo de barrido completo (*m/z* 100-1500 Da) en un espectrómetro de masa DECA LCQ XP^{plus} (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) s realizó en un instrumento Thermo equipado con un detector Finnigan Surveyor PDA, un inyector

automático, una bomba MS y una columna Luna C18 de 5 µm de 4,6 mm x 100 mm (Phenomenex). El sistema de solventes consistía en agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). La fase móvil comienza a 10% de solvente B y se incrementa linealmente hasta 100% de solvente B durante 20 min y después se mantiene durante 4 min, y finalmente vuelve a 10% de solvente B durante 3 min y se mantiene durante 3 min. El caudal fue de 0,5 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 µl y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en un muestreador automático. Los compuestos se analizaron por LC-MS utilizando una cromatografía líquida en fase inversa. El análisis por espectroscopía de masas de los presentes compuestos se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: El caudal del gas nitrógeno se fijó en 30 y 15 arb para el caudal de gas impulsor y auxiliar/de barrido, respectivamente. Se realizó una ionización por electroaspersión con un voltaje de pulverización fijado en 5000 V y un voltaje capilar a 35,0 V. La temperatura del capilar se fijó en 400 °C. Los datos se analizaron en un software Xcalibur. El compuesto activo templazol A tiene una masa molecular de 298 y mostró un ion *m/z* a 297,34 en el modo de ionización negativo. El cromatograma por LC-MS para templazol B sugiere una masa molecular de 258 y exhibió un ion *m/z* a 257,74 en el modo de ionización negativo.

Los espectros de ^{1}H, ^{13C} y 2D RMN se midieron en un espectrómetro Bruker de 500 MHz y 600 MHz de campo de gradiente. La referencia se fijó en el estándar interno tetrametilsilano (TMS, 0,00 ppm).

Para la determinación de la estructura de templazol A, el compuesto purificado con un peso molecular de 298 se analizó adicionalmente usando un instrumento de RMN de 500 MHz, y tiene valores de δ en $^{1H\ RMN}$ de 8,44, 8,74, 8,19, 7,47, 7,31, 3,98, 2,82, 2,33, 1,08 y valores de δ en ^{13C} RMN

de 163,7, 161,2, 154,8, 136,1, 129,4, 125,4, 123,5, 123,3, 121,8, 121,5, 111,8, 104,7, 52,2, 37,3, 28,1, 22,7, 22,7. Templazol A tiene bandas de absorción al UV a 226, 275, 327 nm, lo que sugiere la presencia de anillos de indol y oxazol. La fórmula molecular, $C_{17}H_{18}N_2O_3$, fue determinada por interpretación de datos de ^{1}H,^{13}C RMN y HRESI MS *m/z* 299,1396 $(M+H)^+$ (Calculado para $C_{17}H_{19}N_2O_3$, 299,1397), lo que implica un alto grado de insaturación mostrado por 10 equivalentes de dobles enlaces. El espectro de ^{13}C RMN reveló señales para los 17 carbonos, incluyendo dos metilos, un metoxi, un carbono metileno, un metino alifático, un carbonilo de un éster, y once carbonos aromáticos. La presencia de indol 3'-sustituido fue revelada a partir de datos espectrales de ^{1}H-^{1}H COSY y HMBC. ^{1}H-^{1}H COSY y HMBC indicaron también la presencia de un grupo éster metílico de ácido carboxílico y una cadena lateral -CH_2-CH-$(CH_3)_2$. A partir del análisis detallado de datos de ^{1}H-^{1}H COSY, ^{13C} y HMBC se calculó que el compuesto contenía un núcleo oxazol. A partir del análisis 2D se encontró que la cadena lateral de iso-butilo se unía en posición C-2, un éster metílico del ácido carboxílico en posición C-4 y la unidad de indol en posición C-5 para dar templazol A.

El segundo compuesto con actividad herbicida, templazol B, con un peso molecular de 258 se analizó adicionalmente usando un instrumento de RMN de 500 MHz, y tiene valores δ en $^{1H\ RMN}$ de 7,08, 7,06, 6,75, 3,75, 2,56, 2,15, 0,93, 0,93 y valores δ en ^{13C} RMN de 158,2, 156,3, 155,5, 132,6, 129,5, 129,5, 127,3, 121,8, 115,2, 115,2, 41,2, 35,3, 26,7, 21,5, 21,5. La fórmula molecular, se asigna como $C_{15}H_{18}N_2O_2$, la cual se determina por interpretación de datos de ^{1}H,^{13}C RMN y masa. El espectro de RMN ^{13}C reveló señales para los 15 carbonos, incluyendo dos metilos, dos carbonos metilénicos, un metino alifático, un carbonilo amídico, y nueve carbonos aromáticos. La

naturaleza general de la estructura se dedujo a partir de espectros de ^{1}H y ^{13C} RMN que mostraron un anillo aromático *para*-sustituido [δ 7,08 (2H, d, *J* = 8,8 Hz), 6,75 (2H, d, *J* = 8,8 Hz), y 132,7, 129,5, 115,2, 127,3, 115,2, 129,5]. El espectro de ^{1}H RMN de esta estructura junto con los espectros de ^{1}H-^{1}H COSY y HSQC, mostraron las señales características de un resto isobutilo [δ 0,93 (6H, d, *J* = 6,9 Hz), 2,15 (1H, sept, *J* = 6,9 Hz), 2,57 (2H, d, *J* = 6,9 Hz). Además, se encontraron también un protón olefínico/aromático en (δ 7,06, s) y un grupo carbono de carbonilo (δ 158,9) en el espectro de ^{1}H y ^{13C} RMN. En la inspección del espectro de HMBC, la señal H-1' en el resto isobutilo se correlacionó con el carbono olefínico (C-2, δ 156,3), y el protón olefínico H-4 se correlacionó con (C-5, δ 155,5; C-2, 156,3 y C-1", 41,2). La señal de metileno a δ 3,75 se correlacionó con C-5, C-4, así como el C-2" del resto aromático *para*-sustituido. Todas estas correlaciones observadas sugirieron la conectividad entre los restos isobutilo, y bencilo *para*-sustituido para el esqueleto de la estructura mostrada. Además, se asigna el grupo carboxamida en la posición para- del resto bencilo basándose en la correlación de HMBC del protón aromático en la posición H-4'' y H-6''. De este modo, sobre la base de los datos anteriores, la estructura fue designada como templazol B.

4. Ejemplo 4. Aislamiento de FR901228

El caldo de células enteras derivado de la fermentación de *Burkholderia sp.* en un medio de crecimiento indefinido se extrajo con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar et al., 2006) mediante agitación de la suspensión celular con resina a 225 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. La resina y la masa de células se recolectaron por filtración a través de gasa y se lavaron con agua DI

para eliminar las sales. La resina, la masa de células y la gasa se sumergieron a continuación durante 2 h en acetona después de lo cual se filtró la acetona y se secó al vacío empleando un evaporador rotatorio para dar el extracto en bruto. El extracto en bruto se fracciona a continuación mediante cromatografía líquida al vacío C18 en fase inversa (H_2O/CH_3OH; gradiente de 90:10 a 0:100%) para dar 11 fracciones. Estas fracciones después se concentran a sequedad empleando un evaporador rotatorio y los residuos secos resultantes se analizan para determinar la actividad biológica usando bioensayos en insectos y bioensayos herbicidas. Las fracciones activas se somete a continuación a HPLC de fase inversa/normal (Spectra System P4000; Thermo Scientific) para dar los compuestos puros, que se investigan a continuación en bioensayos herbicidas, insecticidas y nematicidas descritos a continuación para localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registran datos espectroscópicos adicionales como LC/MS y RMN.

El análisis por espectroscopia de masas de picos activos se lleva a cabo en un instrumento de electroaspersión (ESI) Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus usando los modos de ionización positivo y negativo en un modo de barrido completo (*m/z* 100-1500 Da) en un espectrómetro de masas DECA LCQ XP^{plus} (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) s realizó en un instrumento Thermo equipado con un detector Finnigan Surveyor PDA, un inyector automático, una bomba MS y una columna Luna C18 de 5 µm de 4,6 mm x 100 mm (Phenomenex). El sistema de solventes consistía en agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). La fase móvil comienza a 10% de solvente B y se incrementa linealmente hasta 100% de solvente B durante 20 min y después se mantiene durante 4 min, y finalmente vuelve a

10% de solvente B durante 3 min y se mantiene durante 3 min. El caudal fue de 0,5 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 µl y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en un muestreador automático. Los compuestos se analizaron por LC-MS utilizando una cromatografía líquida en fase inversa. El análisis por espectroscopía de masas de los presentes compuestos se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: El caudal del gas nitrógeno se fijó en 30 y 15 arb para el caudal de gas impulsor y auxiliar/de barrido, respectivamente. Se realizó una ionización por electroaspersión con un voltaje de pulverización fijado en 5000 V y un voltaje capilar a 35,0 V. La temperatura del capilar se fijó en 400 °C. Los datos se analizaron en un software Xcalibur. Sobre la base del análisis de LC-MS, el compuesto activo insecticida de la fracción **6** tiene una masa molecular de 540 en el modo de ionización negativo.

Para la determinación de la estructura, el compuesto insecticida purificado de la fracción **6** con un peso molecular de 540 se analizó adicionalmente usando un instrumento de RMN de 500 MHz, y tuvo valores de $^{1H\ RMN}$ a 6,22, 5,81, 5,69, 5,66, 5,65, 4,64, 4,31, 3,93, 3,22, 3,21 , 3,15, 3,10, 2,69, 2,62, 2,26, 2,23. 1,74, 1,15, 1,12, 1,05, 1,02, y valores de ^{13}C RMN de 172,99, 172,93, 169,57, 169,23, 167,59, 130,74, 130,12, 129,93, 128,32, 73,49, 62,95, 59,42, 57,73, 38,39, 38,00, 35,49, 30,90, 30,36, 29,26, 18,59, 18,38, 18,09, 17,93, 12,51. Los datos de RMN indican que el compuesto contiene grupos amino, éster, ácido carboxílico, metilo alifático, etilo, metileno, oximetileno, metino, oximetino y azufre. El análisis detallado de de 1D y 2D RMN confirma la estructura del compuesto FR901228 como un compuesto conocido.

5. Ejemplo 5. Aislamiento de Templamida A, B, FR901465 y FR901228

Métodos y Materiales

El caldo de cultivo resultante de la fermentación de 10 L de *Burkholderia* (A396) en medio de crecimiento Hy soja se extrae con resina Amberlite XAD-7 (Asolkar et al., 2006) agitando la suspensión celular con resina a 225 rpm durante dos horas a temperatura ambiente. La resina y la masa de células se recogen por filtración a través de gasa y se lavan con agua DI para eliminar las sales. La resina, la masa de células y la gasa se sumergen a continuación durante 2 h en acetona después de lo cual la acetona se filtra y se seca al vacío empleando un evaporador rotatorio para dar el extracto en bruto. El extracto en bruto se fracciona a continuación mediante cromatografía líquida al vacío C18 en fase inversa (H_2O/CH_3OH; gradiente de 90:10 a 0:100%) para dar 11 fracciones. Estas fracciones se concentran a continuación a sequedad empleando un evaporador rotatorio y los residuos secos resultantes se examinan para determinar la actividad biológica usando un ensayo de siembra de lechuga (herbicida) y con gusano cogollero de la remolacha en tercer estadio (insecticida) en placas de 96 pocillos. Las fracciones activas son luego sometidas a separación repetida por HPLC de fase inversa (Spectra System P4000 (Thermo Scientific) para dar compuestos puros, que se examinan a continuación en los bioensayos mencionados anteriormente para localizar/identificar los compuestos activos. Para confirmar la identidad del compuesto, se registraron datos espectroscópicos adicionales tales como LC/MS, HRMS y RMN.

La fracción activa **6** se purificó adicionalmente por HPLC utilizando una columna C-18 (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), un gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (0-10 min; CH_3CN 80% en agua, 10-25 min; CH_3CN 80 - 65% en agua, 25-50 min; CH_3CN 65 - 50 % en agua, 50-60 min; CH_3CN 50-70%, 60-80 min; CH_3CN 70-0% en

agua, 80–85 min; CH_3CN 0 – 20% en agua) a un caudal de 8 ml/min y detección al UV a 210 nm, para dar templamida A, tiempo de retención 55,64 min y FR901465, tiempo de retención 63,59 min y FR90128, tiempo de retención 66,65 min, respectivamente. La otra fracción activa **6** también se purificó usando una columna de HPLC C–18 (Phenomenex, Luna 10u C18(2) 100 A, 250 x 30), un gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (0–10 min; CH_3CN 70–60% en agua, 10–20 min; CH_3CN 60–40% en agua, 20–50 min; CH_3CN 40 – 15% en agua, 50–75 min; CH_3CN 15 – 0%, 75–85 min; CH_3CN 0 – 70% en agua) a un caudal de 8 ml/min y detección al UV a 210 nm, para dar templamida B, tiempo de retención 38,55 min.

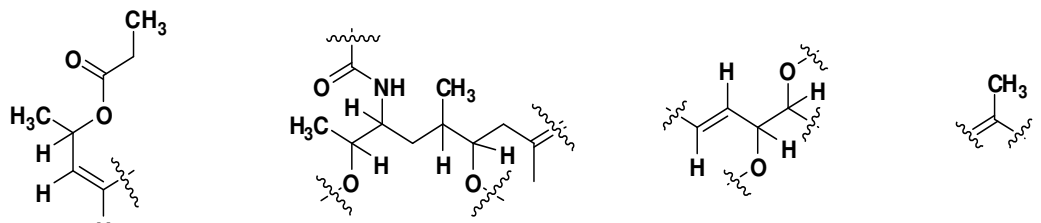
El análisis por espectroscopía de masas de los compuestos puros se llevó a cabo en un instrumento de electroaspersión (ESI) Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus usando los modos de ionización positivo y negativo en un modo de barrido completo (*m/z* 100–1500 Da) en un espectrómetro de masa LCQ DECA XP^{plus} (Thermo Electron Corp., San Jose, CA). La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) s realizó en un instrumento Thermo equipado con un detector Finnigan Surveyor PDA, un inyector automático, una bomba MS y una columna Luna C18 de 5 µm de 4,6 mm x 100 mm (Phenomenex). El sistema de solventes consistía en agua (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). La fase móvil comienza a 10% de solvente B y se incrementa linealmente hasta 100% de solvente B durante 20 min y después se mantiene durante 4 min, y finalmente vuelve a 10% de solvente B durante 3 min y se mantiene durante 3 min. El caudal fue de 0,5 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 µl y las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en un muestreador automático. Los compuestos se analizaron por LC–MS utilizando una cromatografía líquida en fase inversa. El análisis por espectroscopía de masas de

los presentes compuestos se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: El caudal del gas nitrógeno se fijó en 30 y 15 arb para el caudal de gas impulsor y auxiliar/de barrido, respectivamente. Se realizó una ionización por electroaspersión con un voltaje de pulverización fijado en 5000 V y un voltaje capilar a 45,0 V. La temperatura del capilar se fijó en 300 °C. Los datos se analizaron en un software Xcalibur. El compuesto activo templamida A tiene una masa molecular de 555 sobre la base del pico de *m/z* a 556,41 $[M + H]^+$ y 578,34 $[M + Na]^+$ en modo de ionización positivo. El análisis por LC–MS en el modo de ionización positivo para templamida B sugiere una masa molecular de 537 basada en los iones *m/z* a 538,47 $[M + H]^+$ y 560,65 $[M + Na]^+$. Los pesos moleculares de los compuestos FR901465 y FR901228 son asignados como 523 y 540, respectivamente, sobre la base del análisis de LCMS.

Los espectros de ^1H, ^{13C} y 2D de RMN se midieron en un espectrómetro Bruker de 600 MHz de campo de gradiente. La referencia se establece en el estándar interno tetrametilsilano (TMS, 0,00 ppm).

Para la determinación de la estructura de templamida A, el compuesto purificado con peso molecular 555 se analiza adicionalmente usando un instrumento de RMN de 600 MHz, y tiene valores δ de $^{1H\ RMN}$ en 6,40, 6,39, 6,00, 5,97, 5,67, 5,54, 4,33, 3,77, 3,73, 3,70 , 3,59, 3,47, 3,41, 2,44, 2,35, 2,26, 1,97, 1,81, 1,76, 1,42, 1,37, 1,16, 1,12, 1,04 y valores de δ de ^{13}C RMN en 173,92, 166,06, 145,06, 138,76, 135,71, 129,99, 126,20, 123,35 , 99,75, 82,20, 78,22, 76,69, 71,23, 70,79, 70,48, 69,84, 60,98, 48,84, 36,89, 33,09, 30,63, 28,55, 25,88, 20,37, 18,11, 14,90, 12,81, 9,41. El espectro de ^{13}C RMN presenta 28 señales de carbono discretas que se atribuyen a seis metilos, cuatro carbonos metilénicos y trece metinos incluyendo cinco *sp*2, cuatro carbonos cuaternarios. La fórmula molecular,

$C_{28}H_{45}NO_{10}$, se determina por interpretación de los datos de ^{1}H,^{13}C RMN y HRESI MS. El análisis detallado de datos espectrales de ^{1}H-^{1}H COSY, HMBC y HMQC revela las subestructuras siguientes (I - IV) y dos grupos aislados metileno y metilo singlete. Estas subestructuras son conectadas posteriormente mediante las correlaciones de HMBC clave para dar la estructura planar del compuesto, que aún no ha sido informada en la literatura y es designada como templamida A. Esta molécula de policétido contiene dos anillos tetrahidropiranosa, y una amida conjugada.



I II III IV

Subestructuras I-IV asignada por análisis de datos espectroscópicos de 1D y 2D RMN.

El análisis de (+) ESIMS para el segundo compuesto herbicida, muestra iones *m/z* a 538,47 $[M + H]^{+}$ y 560,65 $[M + Na]^{+}$ correspondientes al peso molecular de 537. La fórmula molecular de $C_{28}H_{43}NO_{9}$ se determina por interpretación del análisis de datos de ESIMS y RMN. El ^{1}H y ^{13C} RMN de este compuesto es similar al de templamida A, excepto porque aparece un nuevo $-CH_{2}-$ aislado en lugar del grupo metileno no acoplado de templamida A. La constante de acoplamiento germinal pequeña de 4,3 Hz es característica de la presencia de un grupo metileno epóxido. La presencia de este epóxido se confirma además por el desplazamiento en ^{13C} RMN de 60,98 en la templamida A a 41,07 en el compuesto con PM 537. La diferencia de las fórmulas moleculares entre estos dos compuestos es explicada razonablemente por la eliminación de la molécula de agua seguida por la formación

de un epóxido. De esta manera, sobre la base del análisis de RMN y MS, se asignó la estructura para el nuevo compuesto y se designó como templamida B.

Para la determinación de la estructura, el compuesto purificado a partir de la fracción **6** con peso molecular 523 se analiza adicionalmente usando un instrumento de RMN de 600 MHz, y tiene valores de ^{1}H RMN de 6,41, 6,40, 6,01, 5,98, 5,68, 5,56, 4,33, 3,77, 3,75, 3,72, 3,65, 3,59, 3,55, 3,50, 2,44, 2,26, 2,04, 1,96, 1,81, 1,75, 1,37, 1,17, 1,04, y valores de ^{13}C RMN de 172,22, 167,55, 144,98, 138,94, 135,84, 130,14, 125,85, 123,37, 99,54, 82,19, 78,28, 76,69, 71,31, 70,13, 69,68, 48,83, 42,52, 36,89, 33,11, 30,63, 25,99, 21,20, 20,38, 18,14, 14,93, 12,84. El análisis detallado de ^{1}H y ^{13C} RMN del compuesto sugirió que este compuesto era bastante similar al compuesto templamida B, la única diferencia estaba en la cadena lateral éster; un resto acetato estaba presente en lugar del resto propionato en la cadena lateral. El análisis detallado de 1D y 2D RMN confirma la estructura del compuesto FR901465 como un compuesto conocido.

Sobre la base del análisis de LC-MS, el otro compuesto derivado de la fracción **6** tiene una masa molecular de 540 en el modo de ionización negativo. Para la determinación de la estructura, el compuesto purificado a partir de la fracción **5** con peso molecular 540 se analiza adicionalmente usando un instrumento de RMN de 500 MHz, y tiene valores de ^{1}H RMN de 6,22, 5,81, 5,69, 5,66, 5,65, 4,64, 4,31, 3,93, 3,22, 3,21, 3,15, 3,10, 2,69, 2,62, 2,26, 2,23. 1,74, 1,15, 1,12, 1,05, 1,02, y valores de ^{13}C RMN de 172,99, 172,93, 169,57, 169,23, 167,59, 130,74, 130,12, 129,93, 128,32, 73,49, 62,95, 59,42, 57,73, 38,39, 38,00, 35,49, 30,90, 30,36, 29,26, 18,59, 18,38, 18,09, 17,93, 12,51. Los datos de RMN indican que el compuesto contiene grupos amino, éster, ácido carboxílico, metilo alifático, etilo,

metileno, oximetileno, metino, oximetino y azufre. El análisis detallado de 1D y 2D RMN confirma la estructura del compuesto FR901228 como un compuesto conocido.

El peso molecular para el otro compuesto activo (F8H17) derivado de la Fracción F8 fue asignado como de 1080 basado en el pico del ion molecular a 1081,75 (M + H) en el modo ESI positivo y confirmado además por los ESIMS negativos con pico base a 1079,92. Este compuesto mostró absorción al UV a 234 nm.

Ejemplo 6. *Burkholderia sp.* como alguicida

Se cultiva *Burkholderia sp.* A396 en un medio mineral indefinido durante 5 días (25 °C, 200 rpm). Las células se separan del sobrenadante por centrifugación a 8.000 g, y el sobrenadante libre de células se utiliza para probar la actividad alguicida contra una especie de algas unicelulares (*P. subcapitata*) y una especie de alga azul-verdosa (*Anabaena sp.*). Se añade una cantidad creciente especificada de sobrenadante en los pocillos de una placa de poliestireno de 24 pocillos que presenta las algas especificadas creciendo en 750 microlitros de medio de Gorham a fin de determinar la curva de dosis respuesta para el sobrenadante de prueba en cada tipo de algas. Cada tratamiento se realiza en dos repeticiones, y se utiliza el medio de crecimiento blanco como un control negativo. La placa se cierra con una tapa y se incuba durante 48 horas bajo luz constante a temperatura ambiente. Después de 48 horas, se mide la fluorescencia (a 700 nm) de la suspensión en cada pocillo usando un lector de placas SpectraMax Gemini XS, y la reducción de la fluorescencia comparada con el control sin tratar se convierte en un porcentaje de control del crecimiento de las algas. Los resultados presentados en la Tabla 9 a continuación muestran un excelente control de las algas unicelulares y un buen

control o efecto algistático de las algas azul-verdosas.

Tabla 9. Control de dos especies de algas por caldo libre de células de *Burkholderia* A396 medido como una reducción de la fluorescencia a 700 nm.

Cantidad de caldo por pocillo	**% del control**	
	P. subcapitata	***Anabaena sp.***
0 µl	0	0
10 µl	74,2	0,0
20 µl	84,1	0,0
30 µl	85,5	0,0
40 µl	88,3	0,0
50 µl	90,6	0,0
100 µl	94,6	36,4

Ejemplo 7: Control de *Chlamydomonas reinhardtii* mediante un extracto en bruto y fracciones de *Burkholderia sp.*

Las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento del extracto en bruto de *Burkholderia sp*. fueron analizadas en cuanto a actividad alguicida contra *Chlamydomonas reinhardtii*. Se añadió un volumen creciente de fracción (con concentración de 20 mg/ml en etanol) a una placa de poliestireno transparente de 48 pocillos con 750 microlitros del alga especificada en crecimiento. Cada tratamiento se realizó por duplicado y se utilizó el solvente (etanol) como control negativo. La placa se cerró con una tapa y se incubó durante 72 horas bajo luz constante a temperatura ambiente. Después de 72 horas, se midió la fluorescencia (a 680 nm) de la suspensión en cada pocillo utilizando un lector de placas SpectraMax M2, y la reducción de la fluorescencia en comparación con el control negativo se convirtió en un porcentaje de control del crecimiento de las algas. Cada muestra se comparó visualmente con el control negativo; un pocillo que era

visualmente más claro que el control negativo se calificó como activo. Los resultados presentados en la Tabla 10 a continuación muestran el control del alga especificada en las fracciones 5, 6, 7, 8, y 9. Las pruebas se realizaron por duplicado y el % del control se calculó como una reducción de la fluorescencia a 680 nm en comparación con el control negativo. Cada muestra se comparó visualmente con el control negativo; un pocillo que era visualmente más claro que el control negativo se calificó como activo.

Tabla 10: Control de *Chlamydomonas reinhardtii* mediante un extracto en bruto y fracciones de *Burkholderia* sp. (MBI 206).

Muestra	µl de muestra por 750 µl de algas	% de Inhibición	Visual
Blanco de solvente	22,5	0,00	No activo
	11	0,00	No activo
	5	0,00	No activo
Extracto en bruto	22,5	97,10	Activo
	11	89,54	Activo
	5	90,82	Activo
MBI 206F1	22,5	-74,47	No activo
	11	46,47	No activo
	5	46,21	No activo
MBI 206F2	22,5	12,64	No activo
	11	-214,35	No activo
	5	-297,56	No activo
MBI 206F3	22,5	-143,92	No activo
	11	-740,16	No activo
	5	32,68	No activo
MBI 206F4	22,5	-98,80	No activo
	11	-155,41	No activo
	5	58,51	No activo
MBI 206F5	22,5	92,89	Activo
	11	79,45	Activo
	5	71,60	Débil
MBI 206F6	22,5	94,88	Activo
	11	96,33	Activo
	5	86,45	Activo
MBI 206F7	22,5	97,32	Activo
	11	98,96	Activo

Muestra	µl de muestra por 750 µl de algas	% de Inhibición	Visual
	5	97,89	Activo
MBI 206F8	22,5	94,35	Activo
	11	32,17	Débil
	5	-13,51	No activo
MBI 206F9	22,5	85,35	Activo
	11	96,49	Activo
	5	97,73	Activo
MBI 206F10	22,5	50,30	No activo
	11	48,54	No activo
	5	-108,24	No activo
MBI 206F11	22,5	-121,50	No activo
	11	-16,21	No activo
	5	36,46	No activo

Ejemplo 8: Efecto alguicida de un extracto en bruto y distintas fracciones obtenidas a partir de *Burkholderia sp.* frente a *P. subcapitata*.

El extracto en bruto, así como las fracciones obtenidas de *Burkholderia sp.* se analizaron para determinar la actividad alguicida contra una especie de algas unicelulares (*P. subcapitata*). Se añadió un volumen creciente de solución de etanol puro derivada de la redisolución de una cantidad conocida de material (concentración 10 mg/ml) correspondiente a cada muestra a los pocillos de una placa de poliestireno de 24 pocillos que tenía el alga especificada en crecimiento en 750 microlitros de medio de Gorham a fin de determinar el efecto alguicida de la muestra (extracto/fracciones) sobre un alga unicelular. Cada tratamiento se realizó por triplicado, y se utilizó etanol puro como control negativo. Después de mezclar, la placa se cerró con una tapa y se incubó durante 48 horas bajo luz constante a temperatura ambiente. Después de 48 horas, se midió la fluorescencia (a 700 nm) de la suspensión en cada pocillo usando un lector de placas SpectraMax Gemini XS, y la reducción de la

fluorescencia comparada con el control sin tratar se convirtió en un porcentaje de control del crecimiento de las algas. Los resultados presentados en la Tabla 11 a continuación muestran un excelente control de las algas unicelulares con las fracciones F5, F6 y F7 mientras que no se obtuvo ningún efecto alguicida sustancial con otras muestras.

Tabla 11: Efecto alguicida de diversas muestras obtenidas a partir de *Burkholderia* sp. El bioensayo fue realizado por triplicado usando *P. subcapitata* como organismo de ensayo.

Muestra	µl de Muestra	% del Control	Resultados
MBI206F1	5	0,0	No activo
	10	33,9	No activo
	20	58,2	No activo
MBI206F2	5	35,7	No activo
	10	6,0	No activo
	20	31,8	No activo
MBI206F3	5	40,9	No activo
	10	66,4	No activo
	20	68,5	No activo
MBI206F4	5	46,8	No activo
	10	69,8	Débil
	20	84,7	Activo
MBI206F5	5	49,9	No activo
	10	71,5	Débil
	20	95,4	Activo
MBI206F6	5	62,7	No activo
	10	74,7	Débil
	20	90,7	Activo
MBI206F7	5	40,1	No activo
	10	88,6	Activo
	20	93,0	Activo
MBI206F8	5	36,8	No activo
	10	50,0	No activo
	20	65,9	No activo
MBI206F9	5	66,3	No activo

Muestra	µl de Muestra	% del Control	Resultados
	10	40,7	No activo
	20	51,8	No activo
MBI206F10	5	26,8	No activo
	10	27,5	No activo
	20	32,9	No activo
MBI206F11	5	25,9	No activo
	10	32,8	No activo
	20	39,2	No activo
Extracto en bruto	5	45,6	No activo
	10	69,6	Débil
	20	70,0	Débil
Blanco de solvente	5	0,0	No activo
	10	0,0	No activo
	20	0,0	No activo

Ejemplo 9: Control de *Chlamydomonas reinhardtii* mediante compuestos purificados a partir de un caldo de fermentación de *Burkholderia sp.*

Los compuestos purificados a partir del caldo de fermentación de *Burkholderia sp.* fueron examinados en cuanto a actividad alguicida contra *Chlamydomonas reinhardtii*. Se añadió un volumen creciente de los compuestos purificados (c 20 mg/ml en etanol) a una placa de poliestireno transparente de 48 pocillos con 750 microlitros del alga especificada en crecimiento. Cada tratamiento se realizó por duplicado y se utilizó el solvente como control negativo. La placa se cerró con una tapa y se incubó durante 72 horas bajo luz constante a temperatura ambiente. Después de 72 horas, se midió la fluorescencia (a 680 nm) de la suspensión en cada pocillo utilizando un lector de placas SpectraMax M2, y la reducción de la fluorescencia en comparación con el control negativo se convirtió en un porcentaje de control del crecimiento de las algas. Cada muestra se comparó

visualmente con el control negativo; un pocillo que era visualmente más claro que el control negativo se calificó como activo. Los resultados presentados en la Tabla 12 a continuación muestran el control del alga especificada en muestras que contienen templamida B (PM 537), FR901228 (PM 540), templazol A (PM 298) y F8H18 (PM 1080). Las pruebas se realizaron por duplicado y el % del control se calculó como una reducción de la fluorescencia a 680 nm en comparación con el control negativo. Cada muestra se comparó visualmente con el control negativo; un pocillo que era visualmente más claro que el control negativo se calificó como activo.

Tabla 12: Control de *Chlamydomonas reinhardtii* mediante compuestos purificados a partir de un caldo de fermentación de *Burkholderia sp.* (MBI 206).

Muestra	µl de muestra por 750 µl de algas	% del Control	Visual
Blanco de solvente	22,5	0	No activo
	11	0	No activo
	5	0	No activo
Templamida B (PM 537)	22,5	98,29620264	Activo
	11	99,34438783	Activo
	5	95,05204335	Activo
FR901465 (PM 523)	22,5	-3,887169203	No activo
	11	-33,58351827	No activo
	5	-86,58233289	No activo
Templamida A (PM 555)	22,5	-151,6466844	No activo
	11	-21,16166036	No activo
	5	-67,61183948	No activo
FR901228 (PM 540)	22,5	98,71299647	Activo
	11	99,35532773	Activo

	5	89,48079462	Activo
Templazol B (PM 258)	22,5	-30,78693813	No activo
	11	52,94712906	No activo
	5	-102,0883867	No activo
Templazol A (PM 298)	22,5	98,1523303	Activo
	11	98,72823743	Activo
	5	99,18429591	Activo
Templazol A (PM 298)	22,5	95,71173214	Activo
	11	98,31330291	Activo
	5	98,69251947	Activo
F8H18 (PM 1080)	22,5	94,98474386	Activo
	11	82,90378804	Activo
	5	-21,38764258	No activo

Templazol A fue examinado dos veces en este bioensayo.

Ejemplo 10: Control de *Scenedesmus quadricauda* mediante un sobrenadante de fermentación de *Burkholderia sp.* tratado con calor

Se cultivó *Burkholderia sp.* en un caldo de fermentación como se ha descrito previamente. El caldo fue tratado con calor al final de la fermentación para inactivar todas las células. Se examinó el sobrenadante libre de células para determinar actividad alguicida contra *Scenedesmus quadricauda*. Se añadió un volumen creciente de sobrenadante a una placa de poliestireno transparente de 48 pocillos con 750 microlitros del alga especificada en crecimiento. Cada tratamiento se realizó por duplicado y se utilizó el medio de crecimiento blanco como control negativo. La placa se cerró con una tapa y se incubó durante 72 horas bajo luz constante a temperatura ambiente. Después de 72 horas, se midió la fluorescencia (a 680 nm) de la suspensión en cada pocillo utilizando un lector de placas SpectraMax M2, y la reducción de la fluorescencia en comparación con el control negativo se convirtió en un porcentaje de control del crecimiento de las algas. Los resultados presentados en la Tabla 13 a continuación

muestran el control del alga especificada. Las pruebas se realizaron por duplicado y el % del control se calculó como una reducción de la fluorescencia a 680 nm en comparación con el control no tratado.

Tabla 13: Control of *Scenedesmus quadricauda* mediante un sobrenadante de *Burkholderia* sp. eliminada por calor (MBI 206).

Material	Volumen (µl)	% de Inhibición
MBI 206 120522ST HK TGAI	0	0
	10	97,21347952
	20	99,36167161
	30	99,42844203
	40	99,50798231
	50	98,90136045
	100	95,9474484

Ejemplo 11: Control de *Oscillatoria tenius* mediante un sobrenadante de *Burkholderia* sp. eliminada por calor

Se cultivó *Burkholderia sp*. en un caldo de fermentación como se ha descrito previamente. El caldo fue tratado con calor al final de la fermentación para inactivar todas las células. Se examinó el sobrenadante libre de células para determinar actividad alguicida contra *Oscillatoria tenius*. Se añadió un volumen creciente de sobrenadante a una placa de poliestireno transparente de 48 pocillos con 750 microlitros del alga especificada en crecimiento. Cada tratamiento se realizó por duplicado y se utilizó el medio de crecimiento blanco como control negativo. La placa se cerró con una tapa y se incubó durante 72 horas bajo luz constante a temperatura ambiente. Después de 72 horas, se midió la fluorescencia a 680 nm de la suspensión en cada pocillo utilizando un lector de placas SpectraMax M2, y la reducción de la fluorescencia en comparación con el control no tratado se convirtió en un

porcentaje de control del crecimiento de las algas. Los resultados presentados en la Tabla 14 a continuación muestran el control del alga especificada. Las pruebas se realizaron por duplicado y el % del control se calculó como una reducción de la fluorescencia a 680 nm en comparación con el control no tratado.

Tabla 14: Control de *Oscillatoria tenius* mediante un sobrenadante de *Burkholderia* sp. eliminada por calor (MBI 206).

Material	Volumen (µL)	% Control
MBI 206 120522ST HK TGAI	0	0
	10	6,177042802
	20	25,12413108
	30	10,56583534
	40	37,70086527
	50	45,47313627
	100	36,96205601

Ejemplo 13: Eficacia de *Burkholderia* sp. contra araña roja de dos manchas que infestan plantas de caléndulas

Las caléndulas, *Tagetes erecta*, cultivadas en recipientes de 6" se infestaron con araña roja de dos manchas, *Tetranychus urticae*, mediante la colocación de hojas extraídas la planta huésped (algodón) sobre las plantas de ensayo. Se colocaron aproximadamente diez (10) hojas con 30-40 arañas presentes en varias partes de las plantas de ensayo durante catorce días (14). Las plantas de ensayo se enjaularon en forma individual después de la infestación para permitir que se forme la población de arañas. Las hojas huésped se retiraron de la planta de ensayo. No se aplicaron plaguicidas a las plantas de ensayo antes de la aplicación del estudio. La aplicación de spray

se aplicó usando una cabina de pulverización Gen3 calibrada a 100 gpa. Cada replicado se enjauló en forma individual inmediatamente después de la aplicación. Descripción de la jaula; una jaula de alambre de tomate 30" de altura x 12" de diámetro, cubierta con filtro de insecto antivirus. Las plantas de ensayo recibieron luz natural durante el ensayo. Las plantas de ensayo se regaron en el suelo cada veinticuatro (24) horas según sea necesario. Las plantas se evaluaron antes de la aplicación (pre-recuento), 3, 5 y 7 días después de la aplicación. Cuatro hojas se seleccionaron en forma aleatoria y recolectaron de cada replicado, lo que equivale a 6 cm sq del área de superficie total evaluada. El recuento real se registró respecto de arañas roja de dos manchas vivas y muertas. *Burkholderia sp.* mostró ligera actividad contra las ninfas y adultos de TSSM. Esta actividad muestra potencial para las formulaciones de bioplaguicida contra TSSM. Los tratamientos también redujeron el número de ácaros vivos observados en las muestras. Estas es una evidencia convincente de que MBI206 muestra potencial para las formulaciones de bioplaguicida contra TSSM.

Ejemplo 14: Eficacia del sobrenadante de fermentación de *Burkholderia sp.* contra la araña roja de dos manchas que que infestan plantas de caléndulas

Las caléndulas, *Tagetes erecta*, cultivadas en recipientes de 6" se infestaron con araña roja de dos manchas, *Tetranychus urticae*, mediante la colocación de hojas extraídas la planta huésped (algodón) sobre las plantas de ensayo. Se colocaron aproximadamente ocho a diez (8-10) hojas con aproximadamente 30-40 arañas presentes en varias partes de las plantas de ensayo durante catorce días (14). Las plantas de ensayo se enjaularon en forma individual después de la infestación para permitir que se

forme la población de arañas. Las hojas huésped se retiraron de la planta de ensayo. No se aplicaron plaguicidas a las plantas de ensayo antes de la aplicación del estudio. Las plantas se trataron con 100% de sobrenadante o 10% de sobrenadante (en agua). La aplicación del spray se aplicó para cobertura total sin escurrimiento usando un rociador de mano desechable. Las plantas de ensayo se colocaron en el invernadero de investigación en una mesada elevada con malla de alambre y se dispusieron en un diseño en bloque aleatorizado completo. El invernadero de investigación se controla con el sistema de control de temperatura del Procom, Micro Grow Greenhouse System. Las condiciones ambientales promediaron una temperatura alta de 85F a temperatura baja de 72F durantes las fechas de ensayo. Los niveles de humedad promedio variaron de 40% a 75%. Las plantas de ensayo recibieron luz natural durante todo el ensayo. Las plantas de ensayo se regaron en el suelo cada veinticuatro (24) horas según sea necesario. Las plantas se evaluaron antes de la aplicación (pre-recuento), 3, 5, 7 y 14 días después de la aplicación. Las evaluaciones se tomaron en un átoral de 6cm cuadrados por replicado. El recuento real se registró como araña roja de dos manchas ninfa viva/muerta y araña roja de dos manchas adulta viva/muerta.

Ejemplo 14: Eficacia de la formulación de *Burkholderia sp.* (MBI 206) para controlar las araña roja de dos manchas (TSM) en frutilla – datos del campo.

Se evaluaron las eficacias de cinco formulaciones derivadas de agentes químicos tradicionales y MBI 206 para el control de TSM en condiciones de campo. Los trasplantes de ‘Strawberry Festival’ se establecieron en el campo en macizos con cobertura vegetal plástica, de 13 pulgadas de alto y 27 pulgadas en la parte superior y con 4 ft de

espaciado de macizo. Se aplicó irrigación aérea durante 10 días después de la colocación para ayudar al establecimiento de los trasplantes. Se usó riego por goteo para el resto del experimento. Cada parcela de 12,5-ft. consistió en 20 plantes en hileras de diez plantas por macizo. Las parcelas se infestaron a partir de una colonia de laboratorio en cuatro sesiones con 10 a 20 TSM móviles, por planta. Cada sesión logró la infestación de un bloque del experimento. El experimento consistió en tratamientos de varias tasas y esquemas de aplicación de miticidas, algunos se combinaron con un adyuvante, y una verificación de no tratado. Los tratamientos se replicaron cuatro veces en un diseño RCB. Los tratamientos Savey y Acramite se aplicaron antes de que las densidades de TSM alcancen los niveles umbral (6 de enero); el resto de los programas de tratamiento comenzaron 2 semanas más tarde. Los tratamientos se aplicaron usando un rociador manual con una varilla rociadora equipada con una boquilla que contiene un núcleo de 45 grados y un disco número cuatro. El rociador se presurizó con CO_2, a 40 psi, y se calibró para administrar 100 gal por acre. Las muestras pre-tratamiento se tomaron en el Día 1 y el muestreo continuó una vez por semana hasta 2 semanas después de la aplicación de los tratamientos. Las muestras consistían en diez hojuelas seleccionadas aleatoriamente por parcela y se recolectaron del tercio medio del estrato de las plantas. Las muestras se transportaron al laboratorio donde se quitaron las TSM mótiles y huevo de las hojuelas en discos adherentes giratorios y se contaron en 1/10 de la superficie del disco para estimar las cantidades promedio por hojuela. No se pudieron realizar distinciones entre los huevos viables y no viables, en consecuencia se registró el número total de huevos. MBI 206 en la tasa más alta (3 gal/acre) muestra la

disminución del número de huevos en un nivel comparable con al menos dos de los controles químicos.

Tabla 15 . Efectos de varias formulaciones de la producción del huevo TSM

Tratamiento/ Formulación	Tasa amt/acre	No. huevo de TSM/hojuela									
		Día 1	Día 9	Día 16	Día 22	Día 30	Día 37	Día 44	Día 52	Día 58	Día 65
Non-tratado	--	15,5	10	27,5	12,3	25,3	122	181,5	587	559	423
Bifenazate+ Mezcla de alquil aril polioxialcanos éteres, ácidos grasos y dimetilo polisiloxano	1 lb.	3,8	6	6	0,8	8,3	20,5	3	28	66,5	128,3
Esparcidor no iónico	16 fl. oz.	6,8	15,5	11,8	16,8	31,5	148,3	114	321	525,3	377
5% fenpiroximato EW	32 fl. oz.	11,3	12,8	35	19,3	11	24,5	17,8	49,8	213	234,3
5% enpiroximatoEC	32 fl. oz.	9,3	11,8	12,3	12,5	1	34,5	20,8	28,5	97,3	240,8
hexihazox	6 oz.	2	8,5	15	17	22	71,5	128,5	281,5	393,5	533
MBI 206 + Mezcla de alquil aril polioxialcanos éteres, ácidos grasos y dimetilo polisiloxano	1 gal.	12,3	-	20	12	12,5	65,5	83,3	292	478	320,5
MBI 206 + Mezcla de alquil aril polioxialcanos éteres, ácidos grasos y dimetilo polisiloxano e	3 gal.	3,3	-	8,8	13,5	21	54,3	72	158	301,3	278

Ejemplo 15: Control del ácaro del tostado de los citrus (*Phillocoptruta oleivora*) sobre el citrus en condiciones de campo

Se pulverizó MBI 206 (caldo formulado de *Burkhoderia sp.*) sobre naranja dulce de Valencia a razón de 1, 2, y 3 gal/acre en combinación con 0,25% v/v/ de LI-700 (tensioactivo) y se administró en un volumen de 100 GPA. Se administró un solo tratamiento en comparación con una muestra no tratada. Se realizaron los recuentos de ácaros pre-tratamiento, y luego a 1, 7, 10 y 14 días después del tratamiento. Los recuentos de ácaros fueron un promedio de 10 frutos por tratamiento por punto de muestreo. Se observó una reducción de la cantidad de ácaros presentes en los tratamientos con MBI 206 a los 14 días después de los tratamientos con 1 y 2 gal/acre de MBI 206 (aproximadamente 6-8 ácaros por recuento), cuando se compararon con el control no tratado (aproximadamente 16 ácaros por recuento).

Ejemplo 16: Actividad insecticida (contacto por succión) de Templamida, FR901465 y FR901228 contra chinches.

La actividad insecticida de los compuestos puros templamida B (MBI 206; MW 537), FR 901465 (MBI 206; MW 523) y FR901228 (MBI 206; MW 540) se analizó en un ensayo de laboratorio usando un sistema de bioensayo de contacto por succión. Los compuestos se disolvieron en 100% de etanol a concentraciones de 1 mg/mL. Las larvas de chinche 4to instar individuales, *penúltima ninfa,* se colocaron en un recipiente 5C Rubbermaid con 2 semillas de girasol en cada cuba y 1 copa de agua (agua en la copa de contacto con mecha de algodón) en cada cuba. Se usó una micropipeta Hamilton para aplicar 1 µL (1 gota) de compuesto en el abdomen de las chinches (MWB) de cada larva. Las cubas se

colocaron en el recipiente Rubbermaid y la container y se tapan con tapa de malla. Se trataron ocho larvas por muestra. El ensayo se incubó a 25°C, 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Las larvas se calificaron en los días 4 y 7 después de la aplicación. Los tres compuestos exhibieron actividad de contacto contra las MWB, si bien no todos los insectos murieron pero muchos fueron claramente afectados e incapaces de moverse. La mayor parte de las MWB en el día 7 habían mudado lo que sugiere que los compuestos pueden inhibir la muda o afectar el desarrollo normal de MWB. En consecuencia, FR 901465 proporcionó un mejor (87,5 %) control de las chinches, que FR 901228 (MW 540) y templamida B (La Figura 4).

Ejemplo 17: Actividad insecticida de los compuestos puros contra Lygus hesperus instar 2do tardío/3ero temprano

Se analizó la actividad insecticida de los cuatro compuestos, templamida A, templamida B, FR901465 & FR901228 aislados de *Burkholderia* en un ensayo de laboratorio que usa una placa de 12 pocillos con el sistema de bioensayo de porotos verdes tratados. El compuesto se disolvió en 100% de etanol a concentraciones de 1 mg/mL y se añadieron 500 mL de esta muestra a 3,5 mL de agua para obtener un volumen total de 4 mL que contiene 0,25 mg/mL de concentración del compuesto. Los porotos verdes se lavaron primero en una solución blanqueadora y luego se sentaron en agua para lavar. Los porotos se secaron antes de usar y luego se cortaron con tijeras para caber en los pocillos de la placa de 12 pocillos. Con la ayuda de pinzas se remojaron los porotos en un tubo falcon de plástico de 15 ml que contienen cada tratamiento y luego se sumergieron en el tratamiento durante exactamente 1 minuto. Se colocó una parte del poroto en cada pocillos y luego se colocaron *Lygus hesperus* individuales del instar 2do tardío/3ro

temprano en los pocillos con ayuda del cepillo. Se usó sellador de placa para cubrir la placa y el orificio en el sellador de la placa para aireación. Se contaron las cantidades de Lygus/pocillo y las placas se colocaron en la mesada. Las larvas se calificaron en 24, 48 y 120 horas después de la aplicación. Sobre la base de los resultados presentados en la Figura 5, se halló que el compuesto FR 901465, es el más potente con mortalidad de 91,2%, seguido por la templamida B con 69,2%, y FR901228 con 51,7%. La templamida A fue inactiva en el bioensayo de alimentación de Lygus. El control positivo usado en esta prueba fue Avid (Avemectin)a la tasa de 13 mL/10 mL.

Ejemplo 18: Actividad nematicida de FR901228

La muestra pura de FR 901228 se analizó usando un bioensayo de placa de cultivo celular de 96 pocillos *in vitro*. Se expusieron 15-20 nematodos en una 50 µl de solución de agua a 3 µl de una solución de 20 mg/ml de FR 901228 durante un período de 24 horas a 25C. Una vez que se completó el período de incubación, los resultados se registraron sobre la base de la clasificación visual de la inmovilidad de los nematodos juveniles (J2) en cada pocillo tratado con los compuestos; cada tratamiento se analizó en replicado de 4 pocillos. Se incluyen tres controles en cada ensayo; 1 positivo (1% Avid) & 2 negativo (DMSO & agua). Los ensayos (T1) se llevaron a cabo usando nematodos de vida libre (FLN) y el rastreo (T2) se llevó cabo usando los nematodos *M. incognita*, las muestras se disolvieron en 100% de DMSO. FR 901228 (MW 540) mostró el excelente control con inmovilidad de 75% frente a los nematodos de vida libre en comparación con *M. incognita* con 75% de inmovilidad.

DEPÓSITO DE MICROORGANISMO

El siguiente material biológico se ha depositado bajos

los términos del Tratado de Budapest con la Agricultural Research Culture Collection (NRRL), 1815 N. University Street, Peoria, Illinois 61604 USA, y se asignó el siguiente número:

Depósito	Número de acceso	Fecha de depósito
Burkholderia sp. A396	NRRL B-50319	15 de septiembre de 2009

La cepa se ha depositado en condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la tramitación de esta solicitud de patente a uno determinado por el Commissioner de Patents and Trademarks para tener derecho a la misma bajo 37 C.F.R. §1,14 y 35 U.S.C. §122. El depósito representa un cultivo sustancialmente puro de la cepa depositada. El depósito está disponible según sea requerido por las leyes de patente extranjera en los países donde las contrapartes de la solicitud presente o su progenie sean presentadas. Sin embargo, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la presente invención en derogación de los derechos de la patente concedidos por la acción gubernamental.

Si bien esta invención se ha descripto con referencia a las formas de realización específicas, los detalles de esta no se consideran como limitantes, ya que es obvio que se pueden usar varios equivalentes, cambios y modificaciones y aún están dentro del alcance de la presente invención.

Se citan varias referencias a lo largo de esta memoria descriptiva, cada una de las cuales se incorpora en la presente en su totalidad.

Literature cited:

Anderson, et al. "The structure of thiostrepton," Nature

225: 233-235. 1970.

Andra, "Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization." Biol. Chem. 387: 301-310. 2006.

Arena, et al. "The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans* - correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding and biological activity." J Parasitol. 81: 286-294. 1995.

Asolkar, et al., "Weakly cytotoxic polyketides from a marine-derived Actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085." J. Nat. Prod. 69:1756-1759. 2006.

Burkhead, et al., "Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes." Appl. Environ. Microbiol. 60: 2031-2039. 1994.

Burkholder, W. H "Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs." Phytopathology 40: 115-117. 1950.

Caballero-Mellado et al., "*Burkholderia unamae* sp. nov., an N2-fixing rhizospheric and endophytic species." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1165-1172. 2004.

Cashion et al. "Rapid method for base ratio determination of bacterial DNA." Anal. Biochem. 81: 461-466. 1977.

Casida, et al., Patente US No. 6,689,357.

Chen et al. , "*Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella* " Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 1055-1059. 2007.

Cheng, A. C. and Currie, B. J. "Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management." Clin. Microbiol. 18: 383-416. 2005.

Coenye, T. and P. Vandamme, P. "Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches." Environ. Microbiol. 5: 719-729. 2003.

Compant, et al. "Diversity and occurence of *Burkholderia* spp. in the natural environment." FEMS Microbiol. Rev. **32**: 607-626. 2008.

De Ley et al. "The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates." Eur. J. Biochem. **12**: 133-142. 1970.

Duke et al. "Natural products as sources for herbicides: current status and future trends." Weed Res 40: 99-111. 2000.

Gerwick et al., Patente US No. 7,393,812.

Gottlieb et al., Patente US No. 4,808,207.

Gouge et al., Solicitud de Patente US Publicada. No. 2003/0082147.

Guella et al. "Almazole C, a new indole alkaloid bearing an unusually 2,5-disubstituted oxazole moiety and its putative

biogenetic precursors, from a Senegalese Delesseriacean sea weed." Helv. Chim. Acta 77: 1999-2006. 1994.

Guella et al. "Isolation, synthesis and photochemical properties of almazolone, a new indole alkaloid from a red alga of Senegal." Tetrahedron. 62: 1165-1170. 2006.

Henderson, P. J. and Lardy H. A. "Bongkrekic acid. An inhibitor of the adenine nucleotide translocase of mitochondria." J. Biol. Chem. 245: 1319-1326. 1970.

Hirota et al. “Isolation of indolmycin and its derivatives as antagonists of L-tryptophan.” Agri. Biol Chem. 42: 147-151. 1978.

Hu, F.-P. and Young, J. M. "Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax, Burkholderia*, *Herbaspirillum, Ralstonia*, and *Xanthomonas* spp." J. Appl. Microbiol. 84: 263-271. 1998.

Huss et al. "Studies of the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates." System. Appl. Microbiol. 4: 184-192. 1983.

Jansiewicz, W. J. and Roitman J. "Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*." Phytopathology 78: 1697-1700. 1988.

Jeddeloh et al., WO2001/055398.

Jansen et al. "Thiangazole: a novel inhibitor of HIV-1 from Polyangium Spec." Liebigs Ann. Chem. 4: 357-3359. 1992.

Jeong et al. "Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops." Plant Disease 87: 890-895. 2003.

Knudsen, G. R. and Spurr, J. "Field persistence and efficacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot." Plant Disease 71: 442-445. 1987.

Koga-Ban et al. "cDNA sequences of three kinds of beta-tubulins from rice." DNA Research 2: 21-26. 1995.

Koide et al. Solicitud de Patente US Publicada. No. 2008/0096879.

Koyama et al. “Isolation, characterization, and synthesis of pimprinine, pimrinrthine, and pimprinaphine, metabolites of *Streptoverticillium olivoreticuli*.” Agri. Biol. Chem. 45: 1285-1287. 1981.

Krieg et al. "*Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis: Ein neuer, gegenuber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp." Z. Angew. Entomol. 96:500-508. 1983.

Kunze et al. "Thiangazole, a new thiazoline antibiotic from *Polyangium* sp (Myxobacteria Production, antimicrobial activity and mechanism of action." J. Antibiot., 46: 1752-1755. 1993.

Leahy et al. "Comparison of factors influencing trichloroethylene degradation by toluene-oxidizing bacteria." Appl. Environ. Microbiol. 62: 825-833. 1996.

Lessie et al. "Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*." FEMS Microbiol. Lett. 144: 117-128. 1996.

Lindquist, N. et al. “Isolation and structure determination of diazonamides A and B, unusual cytotoxic metabolites from the marine ascidian *Diazona chinensis*.” J. Am Chem. Soc. 113: 2303-2304. 1991.

Lorch, H et al. "Basic methods for counting microoganisms in soil and water. In Methods in applied soil microbiology and biochemistry. K. Alef and P. Nannipieri. Eds. San Diego, CA, Academic Press: pp. 146-161. 1995.

Ludovic et al. "Burkholderia diveristy and versatility: An inventory of the extracellular products." J. Microbiol. Biotechnol. 17: 1407-1429. 2007.

Lydon, J. and Duke, S. "Inhibitors of glutamine biosynthesis." in Plant amino acids: Biochemistry and Biotechnology. B. Singh., Ed. New York, USA, Marcel Decker. pp. 445-464. 1999.

Mahenthiralingam et al. "DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III." J.Clin. Microbiol. 38: 3165-3173. 2000.

Ming, L.-J. and Epperson. "Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin." Biochemistry 91: 46-58. 2002.

Morita et al. "Biological activity of tropolone." Biol. Pharm. Bull. 26: 1487-1490. 2003.

Nagamatsu, T. “Syntheses, transformation, and biological activities of 7-azapteridine antibiotics: toxoflavin, fervenulin, reumycin, and their analogs”. Recent Res. Devel. Org. Bioorg. Chem. 4: 97 -121. 2001.

Naik et al., “Pimprine, an extracellular alkaloid produced by *Streptomyces* CDRIL-312: fermentation, isolation and pharmacological activity.” J. Biotech. 88: 1-10. 2001.

Nakajima et al., "Antitumor Substances, FR901463, FR901464 and FR901465. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, Physico-chemical Properties and Biological Activities." J. Antibiot. 49: 1196-1203. 1996.

Nakajima et al. Patente US No. 5,545,542.

Nakajima et al., "Hydantocidin: a new compound with herbicidal activity." J Antibiot. 44: 293-300. 1991.

N’Diaye, I. et al., “Almazole A and amazole B, unusual marine alkaloids of an unidentified red seaweed of the family *Delesseriaceae* from the coasts of Senegal.” Tet Lett. 35: 4827-4830. 1994.

N’Diaye, I. et al., “Almazole D, a new type of antibacterial 2,5-disubstituted oxazolic dipeptide from a red alga of the coast of Senegal.” Tet Lett. 37: 3049-3050. 1996.

Nierman et al., "Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 14246-14251. 2004.

Okazaki et al., "Rhizobial strategies to enhance symbiotic interaction: Rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase." Microbes Environ. 19: 99-111. 2004.

Parke, J. L. and D. Gurian-Sherman, D. 2001. "Diversity of the Burkholderia cepacia complex and implications for risk assessment of biological control strains." Annual Reviews in Phytopathology 39: 225-258. 2001.

Parke, et al. Patente US No. 6,077,505.

Pettit, G. et al. “Isolation of Labradorins 1 and 2 from *Pseudomonas syringae*.” J. Nat. Prod. 65: 1793-1797. 2002.

Pitt, et al., "Type characterization and antibiotic susceptibility of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland." J. Med. Microbiol. 44: 203-210. 1996.

Ramette et al., "Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment." Appl. Environ. Microbiol. 71: 1193-1201. 2005.

Resi et al., "Burkholderia tropica sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium."Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 2155-2162. 2004.

Salama et al. "Potency of spore-gamma-endotoxin complexes of *Bacillus thuringiensis* against some cotton pests." Z. Angew. Entomol. 91: 388-398. 1981.

Selva et al., "Targeted screening for elongation factor Tu binding antibiotics." J. Antibiot. 50: 22-26. 1997.

Takahashi, S. et al. “Martefragin A, a novel indole alkaloid isolated from a red alga, inhibits lipid peroxidation.” Chem Pharm. Bull. 46: 1527-1529. 1998.

Thompson et al. "Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme." Pest Management Science **56**: 696-702. 2000.

Takita et al., "Chemistry of Bleomycin. XIX Revised structures of bleomycin and phleomycin." J. Antibiot. 31: 801-804. 1978.

Tran Van et al., "Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield component in low fertility sulphate acid soils of Vietnam." Plant and Soil 218: 273-284. 2000.

Tsuruo et al., "Rhizoxin, a macrocyclic lactone antibiotic, as a new antitumor agent against human and murine tumor cells and their vincristine-resistant sublines." Cancer Res. 46: 381-385. 1986.

Ueda et al., Patente US No. 7,396,665.

Umehara, K. et al. “Studies of new antiplatelet agents WS-30581 A and B.” J. Antibiot. 37: 1153-1160. 1984.

Vandamme et al. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens." Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 344-356. 1992.

Vanderwall et al., "A model of the structure of HOO-Co•bleomycin bound to d(CCAGTACTGG): recognition at the d(GpT)site and implications for double-stranded DNA cleavage, Chem. Biol. 4: 373-387. 1997.

Vermis K., et al. "Evaluation of species-specific recA-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex." J. Med. Microbiol 51: 937-940. 2002.

Watanabe, H. et al. “A new antibiotic SF2583A, 4-chloro-5-(3’indoly)oxazole, produced by *Streptomyces*.” Meiji Seika Kenkyu Nenpo 27: 55-62. 1988.

Wayne et al., "Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 37: 463-464. 1987.

Werner et al., “Uptake of indolmycin in gram-positive bacteria.” Antimicrob Agents Chemotherapy 18: 858-862. 1980.

Wilson et al. "Toxicity of rhizonin A, isolated from *Rhizopus microsporus*, in laboratory animals." Food Chem. Toxicol. 22: 275-281. 1984.

Zeck W.M. "Ein Bonitierungsschema zur Feldauswertung von Wurzelgallenbefall. Pflanzenschutznachrichten." Bayer 24,1: 144-147. 1971.

Zhang et al., Patente US No. 7,141,407.

Zhou et al., "Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Burkholderia cepacia* complex isolated from patients with cystic fibrosis." Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51: 1085-1088. 2007

REIVINDICACIONES:

1. Una formulación que comprende:

(A) una cepa aislada o caldo de fermentación que comprende células y medio de cultivo de una no *Burkholderia cepacia*, no *Burkholderia plantari*, no *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp.* no *Burkholderia cepacia*, no *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia sp.* que tiene las siguientes características:

(1) secuencia del gen de ARNr 16S que comprende la secuencia delantera que tiene al menos 99% de identidad con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:8, 11, 12 y una secuencia inversa que tiene al menos 99% de identidad con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:9, 10, 13, 14 y 15;

(2) actividad plaguicida;

(3) produce un compuesto plaguicida seleccionado del grupo que consiste en:

(a) Un compuesto que tiene las siguientes propiedades: (i) un peso molecular de aproximadamente 525-555 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS); (ii) ^{1}H RMN valores d de 6,22, 5,81, 5,69, 5,66, 5,65, 4,64, 4,31, 3,93, 3,22, 3,21, 3,15, 3,10, 2,69, 2,62, 2,26, 2,23. 1,74, 1,15, 1,12, 1,05, 1,02; (iii) tiene ^{13C} RMN valores d de 172,99, 172,93, 169,57, 169,23, 167,59, 130,74, 130,12, 129,93, 128,32, 73,49, 62,95, 59,42, 57,73, 38,39, 38,00, 35,49, 30,90, 30,36, 29,26, 18,59, 18,38, 18,09, 17,93, 12,51 y (iv) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 10-15 minutos, en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua :acetonitrilo (CH_3CN) ;

(b) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que comprende al menos un residuo indol, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo éster carboxílico, al menos

17 carbonos, al menos 3 oxígenos y al menos 2 nitrógenos;

(c) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos un residuo bencilo, al menos une residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo amida, al menos 15 carbonos, al menos 2 oxígenos y al menos 2 nitrógenos;

(d) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos, al menos ocho oxígeno y al menos un nitrógeno y

(e) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, un grupo epóxido de metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos, al menos 8 oxígenos y al menos 1 nitrógeno;

(4) es no patogénica para los animales vertebrados;

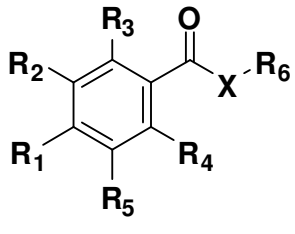
(5) es susceptible a kanamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, piperacilina, imipenem, y una combinación de sulfametoxazol y trimetoprima y

(6) contiene los ácidos grasos 16:0, ciclo 17:0, 16:0 3-OH, 14:0, ciclo 19:0 ω8*c*, 18:0 y

(B) parabeno C1-7, alcohol C2-C17 y detergente.

2. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho parabeno C1-7 está presente en la cantidad de aproximadamente 0,01-5%, el alcohol C2-C17 está presente en la cantidad de aproximadamente 0,001-10% y el detergente está presente en la cantidad de aproximadamente 0,001-10%.

3. Un método para obtener una sustancia efectiva como plaguicida derivada de la formulación de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha sustancia efectiva como plaguicida es: (a) una sustancia que tiene las siguientes propiedades: (1) tiene propiedades plaguicidas; (ii) tiene un peso molecular de aproximadamente 210-240 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS); (iii) tiene valores de ^{1}H RMN de δ 7,90, 6,85, 4,28, 1,76, 1,46, 1,38, 1,37, 0,94; (iv) tiene valores de ^{13}C RMN de δ 166,84, 162,12, 131,34 (2C), 121,04, 114,83 (2C), 64,32, 31,25, 28,43, 25,45, 22,18. 12,93; (v) tiene un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 15-20 minutos en una columna C-18 de HPLC de fase inversa (Phenomenex, Luna 5µ C18(2) 100 A, 100 x 4,60 mm) usando un gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) (0-20 min; 90 - 0% de CH_3CN acuoso, 20-24 min; 100% de CH_3CN, 24-27 min; 0 - 90% de CH_3CN acuoso, 27-30 min; 90% de CH_3CN acuoso) a 0,5 mL/min de caudal de flujo y detección UV de 210 nm; (vi) espectro ^{13}C RMN que exhibe 13 señales de carbono diferenciadas atribuidas a un metilo, cinco carbonos de metileno, cuatro metinos, y tres carbonos cuaternarios; (vii) tiene una fórmula molecular de $C_{13}H_{18}O_3$ que se determinó por la interpretación del análisis de los datos de ESIMS y RMN; (viii) tiene bandas de absorción UV entre aproximadamente 210-450 nm y más particularmente a aproximadamente 248 nm o (b) una sustancia que tiene la estructura



Donde

X, es de modo independiente –O, –NR, o –S, donde R es H o alquilo C_1–C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, y R_6 son cada uno de modo independiente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, –C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo

que comprende:

(A) proporcionar la formulación de acuerdo con la reivindicación 1;

(B) incubar dicha formulación durante un tiempo y a una temperatura suficiente para producir dicha sustancia efectiva como plaguicida y

(C) aislar dicha sustancia efectiva como plaguicida.

4. Una combinación que comprende

(A) la formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o sustancia efectiva como plaguicida derivada de esta y

(B) al menos una de

(1) una segunda sustancia, donde dicha segunda sustancia es un alguicida o acaricida químico o biológico o

(2) al menos uno de un portador, diluyente, tensioactivo, adyuvante aceptable para uso como plaguicida.

5. Una combinación que comprende

(I) una primera sustancia seleccionada del grupo que consiste en

(A) un cultivo puro, fracción celular, sobrenadante o extracto derivado de una cepa aislada de una no

Burkholderia cepacia, no *Burkholderia plantari*, no *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp.* no *Burkholderia cepacia*, no *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia sp.* que tiene las siguientes características:

(1) una secuencia del gen de ARNr 16S que comprende la secuencia delantera que tiene al menos 99% de identidad con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:8, 11, 12 y a secuencia inversa que tiene al menos 99% de identidad con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:9, 10, 13, 14 y 15;

(2) actividad plaguicida;

(3) produces a compuesto plaguicida seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un compuesto que tiene las siguientes propiedades:

(i) un peso molecular de aproximadamente 525-555 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS);

(ii) valores de ^{1}H RMN de 6,22, 5,81, 5,69, 5,66, 5,65, 4,64, 4,31, 3,93, 3,22, 3,21, 3,15, 3,10, 2,69, 2,62, 2,26, 2,23. 1,74, 1,15, 1,12, 1,05, 1,02;

(iii) tiene valores de ^{13}C RMN de 172,99, 172,93, 169,57, 169,23, 167,59, 130,74, 130,12, 129,93, 128,32, 73,49, 62,95, 59,42, 57,73, 38,39, 38,00, 35,49, 30,90, 30,36, 29,26, 18,59, 18,38, 18,09, 17,93, 12,51 y

(iv) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 10-15 minutos, en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) ;

(b) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que comprende al menos un residuo indol, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo éster carboxílico, al menos

17 carbonos, al menos 3 oxígenos y al menos 2 nitrógenos;

(c) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos un residuo bencilo, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo amida, al menos 15 carbonos, al menos 2 oxígeno y al menos 2 nitrógenos;

(d) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos, al menos ocho oxígeno y al menos un nitrógeno y

(e) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, un grupo epóxido de metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos, al menos 8 oxígenos y al menos 1 nitrógeno;

(B) un compuesto plaguicida aislado opcionalmente obtenible de una especie Burkholderia seleccionada del grupo que consiste en:

(1) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que comprende al menos un residuo indol, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo éster carboxílico; al menos 17 carbonos y al menos 3 oxígeno y 2 nitrógenos; y que tiene al menos de uno de los siguientes:

(a) un peso molecular de 275-435;

(b) ^{1}H RMN valores en 8,44, 8,74, 8,19, 7,47, 7,31, 3,98, 2,82, 2,33, 1,08;

(c) valores de ^{13}C RMN de δ 163,7, 161,2, 154,8, 136,1, 129,4, 125,4, 123,5, 123,3, 121,8, 121,5, 111,8, 104,7, 52,2, 37,3, 28,1, 22,7, 22,7;

(d) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 10-20 minutos en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (CH3CN) y detección UV de 210 nm;

(e) bandas de absorción UV at 226, 275, 327 nm.;

(2) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos un residuo bencilo, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido, al menos un grupo amida; al menos 15 carbonos, al menos 2 oxígenos y al menos 2 nitrógenos; y al menos una de las siguientes características:

(a) un peso molecular de aproximadamente 240-290 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS);

(b) ^{1}H RMN δ valores en aproximadamente 7,08, 7,06, 6,75, 3,75, 2,56, 2,15, 0,93, 0,93;

(c) ^{13}C RMN valores de δ 158,2, 156,3, 155,5, 132,6, 129,5, 129,5, 127,3, 121,8, 115,2, 115,2, 41,2, 35,3, 26,7, 21,5, 21,5;

(d) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 6-15 minutos, en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua :acetonitrilo (CH_3CN) y

(e) bandas de absorción UV a aproximadamente 230, 285, 323 nm;

(3) un compuesto no epóxido que comprende al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos, al menos ocho oxígenos y un nitrógeno y al menos una de las siguientes características:

(a) tiene unpeso molecular de aproximadamente 530-580 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS);

(b) Los valores de ^{1}H RMN δ 6,40, 6,39, 6,00, 5,97, 5,67, 5,54, 4,33, 3,77, 3,73, 3,70, 3,59, 3,47, 3,41, 2,44, 2,35, 2,26, 1,97, 1,81, 1,76, 1,42, 1,37, 1,16, 1,12, 1,04;

(c) ^{13}C RMN valores de δ 173,92, 166,06, 145,06, 138,76, 135,71, 129,99, 126,20, 123,35, 99,75, 82,20, 78,22, 76,69, 71,23, 70,79, 70,48, 69,84, 60,98, 48,84, 36,89, 33,09, 30,63, 28,55, 25,88, 20,37, 18,11, 14,90, 12,81, 9,41;

(d) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 7-12 minutos, en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema solvente por gradiente y detección UV de 210 nm;

(e) tiene una fórmula molecular de $C_{28}H_{45}NO_{10}$ que fue determinada por la interpretación del Análisis de los datos de ESIMS y RMN;

(f) tiene bandas de absorción UV entre aproximadamente 210-450 nm;

(4) un compuesto que comprende

(a) al menos un éster, al menos una amida, un grupo epóxido de metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos, al menos 8 oxígenos y al menos 1 nitrógeno,

(b) ^{13}C RMN valores de δ 174,03, 166,12, 143,63, 137,50, 134,39, 128,70, 126,68, 124,41, 98,09, 80,75, 76,84, 75,23, 69,87, 69,08, 68,69, 68,60, 48,83, 41,07, 35,45, 31,67, 29,19, 27,12, 24,55, 19,20, 18,95, 13,48, 11,39, 8,04,

(c) una fórmula molecular de $C_{28}H_{43}NO_9$ y al menos uno de:

(i) ^1H RMN δ valores en aproximadamente 6,41, 6,40, 6,01, 5,97, 5,67, 5,55, 4,33, 3,77, 3,75, 3,72, 3,64, 3,59, 3,54, 3,52, 2,44, 2,34, 2,25, 1,96, 1,81, 1,76, 1,42, 1,38, 1,17, 1,12, 1,04;

(ii) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 6–15 minutos, en una columna C–18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua :acetonitrilo (CH_3CN) ;

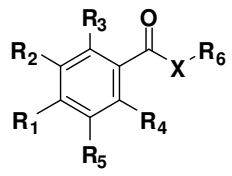
(iii) bandas de absorción UV entre aproximadamente 210–450 nm;

(II) opcionalmente una segunda sustancia, donde dicha segunda sustancia es un alguicida o acaricida químico o biológico y

(III) opcionalmente al menos uno de un portador, diluyente, tensioactivo, adyuvante.

6. La combinación de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, donde dicha combinación es una composición.

7. La combinación de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicha sustancia efectiva como plaguicida tiene la estructura



Donde

X, es –O; R_1 es hidroxi, R_2, R_3, R_4, R_5 son H, R_6 alquilo C4–10, alquilo C4–10 sustituido.

8. La combinación de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicha sustancia efectiva como plaguicida es butil, hexil u octil parabeno.

9. Un método de modular la proliferación y/o crecimiento de algas y/o modular la infestación de un arácnido que comprende que comprende aplicar en un lugar donde se desea la modulación de la proliferación y/o crecimiento de algas y/o modulación de la infestación de un arácnido:

(A) la combinación de acuerdo con la reivindicación 5;

(B) un cultivo puro, fracción celular, sobrenadante o extracto derivado de una cepa aislada de una no *Burkholderia cepacia*, no *Burkholderia plantari*, no *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia sp.* no *Burkholderia cepacia*, no *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia sp.* que tiene las siguientes características:

(1) una secuencia del gen de ARNr 16S que comprende la secuencia delantera que tiene al menos 99% de identidad con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:8, 11, 12 y a secuencia inversa que tiene al menos 99% de identidad con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:9, 10, 13, 14 y 15;

(2) actividad plaguicida;

(3) produces a compuesto plaguicida seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un compuesto que tiene las siguientes propiedades:

(i) un peso molecular de aproximadamente 525-555 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS);

(ii) Los valores de ^{1}H RMN 6,22, 5,81, 5,69, 5,66, 5,65, 4,64, 4,31, 3,93, 3,22, 3,21, 3,15, 3,10, 2,69, 2,62, 2,26, 2,23. 1,74, 1,15, 1,12, 1,05, 1,02;

(iii) tiene ^{13C} RMN valores de 172,99, 172,93, 169,57, 169,23, 167,59, 130,74, 130,12, 129,93, 128,32, 73,49, 62,95, 59,42, 57,73, 38,39, 38,00, 35,49, 30,90, 30,36, 29,26, 18,59, 18,38, 18,09, 17,93, 12,51 y

(iv) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 10-15 minutos, en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua :acetonitrilo (CH_3CN) ;

(b) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que comprende al menos un residuo indol, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo éster carboxílico, al menos 17 carbonos, al menos 3 oxígenos y al menos 2 nitrógenos;

(c) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos un residuo bencilo, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo amida, al menos 15 carbonos, al menos 2 oxígeno y al menos 2 nitrógenos;

(d) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos, al menos ocho oxígeno y al menos un nitrógeno y

(e) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, un grupo epóxido de metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos, al menos 8 oxígenos y al menos 1 nitrógeno;

(C) an compuestom aislado plaguicida opcionalmente obtainable from a Burkholderia species seleccionado del grupo que consiste en:

(1) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que comprende al menos un residuo indol, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo éster carboxílico; al menos 17 carbonos y al menos 3 oxígeno y 2 nitrógenos; y que tiene al menos de uno de los siguientes:

(a) un peso molecular de 275-435;

(b) los valores de ^{1}H RMN de δ 8,44, 8,74, 8,19, 7,47, 7,31, 3,98, 2,82, 2,33, 1,08;

(c) los valores de ^{13}C RMN δ 163,7, 161,2, 154,8, 136,1, 129,4, 125,4, 123,5, 123,3, 121,8, 121,5, 111,8, 104,7, 52,2, 37,3, 28,1, 22,7, 22,7;

(d) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 10-20 minutos en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un agua:acetonitrilo (CH_3CN) con un sistema solvente por gradiente y detección UV de 210 nm;

(e) bandas de absorción UV a 226, 275, 327 nm.;

(2) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos un residuo bencilo, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido, al menos un grupo amida; al menos 15 carbonos, al menos 2 oxígenos y al menos 2 nitrógenos; y al menos una de las siguientes características:

(a) un peso molecular de aproximadamente 240-290 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS);

(b) los valores de ^{1}H RMN de δ en aproximadamente 7,08, 7,06, 6,75, 3,75, 2,56, 2,15, 0,93, 0,93;

(c) los valores de ^{13}C RMNde δ 158,2, 156,3, 155,5, 132,6, 129,5, 129,5, 127,3, 121,8, 115,2, 115,2, 41,2, 35,3, 26,7, 21,5, 21,5;

(d) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 6-15 minutos en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua :acetonitrilo (CH_3CN) y

(e) bandas de absorción UV a aproximadamente 230, 285, 323 nm;

(3) un compuesto no epóxido que comprende al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos, al menos ocho oxígenos y un nitrógeno y al menos una de las siguientes características:

(a) tiene un peso molecular de aproximadamente 530-580 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS);

(b) Los valores de ^1H RMN δ 6,40, 6,39, 6,00, 5,97, 5,67, 5,54, 4,33, 3,77, 3,73, 3,70, 3,59, 3,47, 3,41, 2,44, 2,35, 2,26, 1,97, 1,81, 1,76, 1,42, 1,37, 1,16, 1,12, 1,04;

(c) Los valores de ^{13}C RMN δ 173,92, 166,06, 145,06, 138,76, 135,71, 129,99, 126,20, 123,35, 99,75, 82,20, 78,22, 76,69, 71,23, 70,79, 70,48, 69,84, 60,98, 48,84, 36,89, 33,09, 30,63, 28,55, 25,88, 20,37, 18,11, 14,90, 12,81, 9,41;

(d) a tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 7-12 minutos, en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente con sistema solvente de agua:acetonitrilo (CH_3CN) y detección UV de 210 nm;

(e) tiene una fórmula molecular de $C_{28}H_{45}NO_{10}$ que se determinó por interpretación del análisis de los datos de ESIMS y RMN;

(f) tiene bandas de absorción UV entre aproximadamente 210-450 nm;

(4) un compuesto que comprende

(a) al menos un éster, al menos una amida, un grupo epóxido de metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos, al menos 8 oxígenos y al menos 1 nitrógeno,

(b) ^{13}C RMN valores de δ 174,03, 166,12, 143,63, 137,50, 134,39, 128,70, 126,68, 124,41, 98,09, 80,75, 76,84, 75,23, 69,87, 69,08, 68,69, 68,60, 48,83, 41,07, 35,45, 31,67, 29,19, 27,12, 24,55, 19,20, 18,95, 13,48, 11,39, 8,04,

(c) una fórmula molecular de $C_{28}H_{43}NO_9$ y al menos uno de:

(i) ^{1}H RMN δ valores en aproximadamente 6,41, 6,40, 6,01, 5,97, 5,67, 5,55, 4,33, 3,77, 3,75, 3,72, 3,64, 3,59, 3,54, 3,52, 2,44, 2,34, 2,25, 1,96, 1,81, 1,76, 1,42, 1,38, 1,17, 1,12, 1,04;

(ii) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 6-15 minutos, en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua :acetonitrilo (CH_3CN) ;

(5) un compuesto que tiene las siguientes propiedades:

(i) un peso molecular de aproximadamente 525-555 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS);

(ii) Los valores de ^{1}H RMN 6,22, 5,81, 5,69, 5,66, 5,65, 4,64, 4,31, 3,93, 3,22, 3,21, 3,15, 3,10, 2,69, 2,62, 2,26, 2,23. 1,74, 1,15, 1,12, 1,05, 1,02;

(iii) tiene valores de ^{13}C RMN de 172,99,

172,93, 169,57, 169,23, 167,59, 130,74, 130,12, 129,93, 128,32, 73,49, 62,95, 59,42, 57,73, 38,39, 38,00, 35,49, 30,90, 30,36, 29,26, 18,59, 18,38, 18,09, 17,93, 12,51 y

(iv) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 10-15 minutos, en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua :acetonitrilo (CH_3CN) ;

(6) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que comprende al menos un residuo indol, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido, al menos un grupo éster carboxílico, al menos 17 carbonos y al menos 3 oxígeno y 2 nitrógenos;

(7) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos un residuo bencilo, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo amida; al menos 15 carbonos, al menos 2 oxígenos y al menos 2 nitrógenos;

(8) un compuesto no epóxido que tiene al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos y al menos ocho oxígeno y un nitrógeno y

(9) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, un grupo epóxido de metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos, al menos 8 oxígenos, al menos 1 nitrógeno y

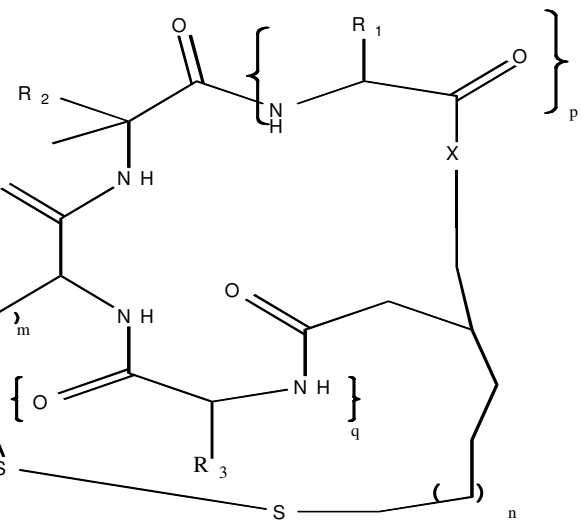
(II) opcionalmente otra sustancia, donde dicha sustancia es una sustancia alguicida o sustancia acaricida en cantidades efectivas para modular dicha proliferación y/o crecimiento

de algas y/o infestación de un arácnido en dicha localización.

10. Un método de modular la proliferación y/o crecimiento de algas y/o modular la infestación de un arácnido que comprende aplicar en un lugar donde se desea la modulación de la proliferación y/o crecimiento de algas y/o modulación de la infestación de un arácnido una cantidad de

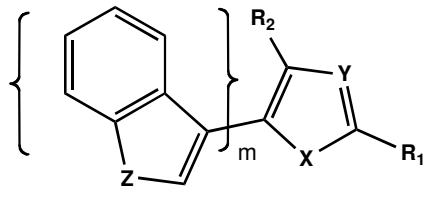
(I) uncompuesto seleccionado del grupo que consiste en:

(A) un compuesto que tiene la estructura ##STR001##



Una de sus sales o estereoisómeros aceptables para uso como plaguicida, donde M es 1, 2, 3 o 4; n es 0, 1, 2, o 3; p y son de modo independiente 1 o 2; X es O, NH o NR; R1, R2 y R3 son iguales o diferentes y de modo independiente un residuo de la cadena lateral de aminoácido o un derivado de la cadena lateral de aminoácido y R es un residuo alquilo, arilo o arilalquilo de cadena inferior;

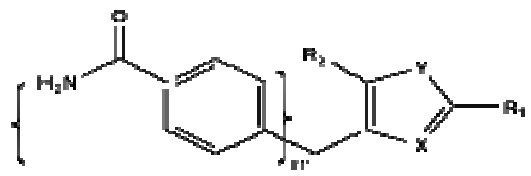
(B) un compuesto que tiene la estructura ##STR002##



##STR002##

donde X, Y y Z son cada uno de modo independiente --O, --NR_1, o --S, donde R_1 es –H o alquilo C_1–C_{10}; R_1, R_2 y m son cada uno de modo independiente --H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo y “m” se puede ubicar en cualquier parte del anillo oxazol;

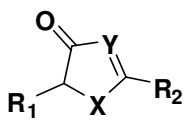
(C) un compuesto que tiene la estructura ##STR003##



##STR003##

donde: X e Y son cada uno de modo independiente --OH, --NR_1, o --S, donde R_1 es --H o alquilo C_1–C_{10}; R_1, R_2 y m, un sustituyente del anillo oxazol, son cada uno de modo independiente --H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida o sulfurilo.

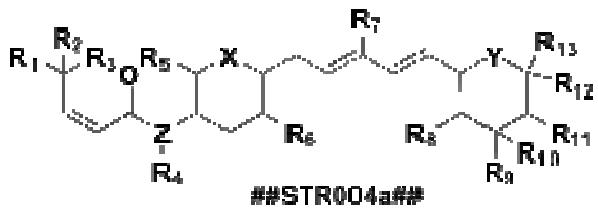
(D) un compuesto que tiene la estructura ##STR005##



##STR005##

donde: X e Y son cada uno de modo independiente --OH, --NR_1, o --S, donde R_1, R_2 son cada uno de modo independiente --H, alquilo (por ejemplo, alquilo C_1-C_{10}), alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, --C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo;

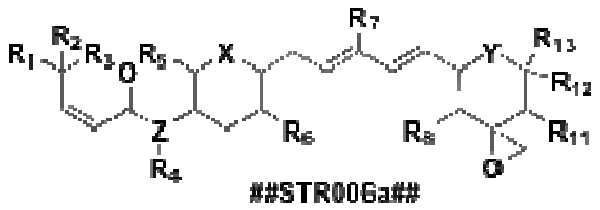
(E) un compuesto que tiene la estructura ##STR004a##



##STR004a##

Donde X, Y y Z son cada uno de modo independiente -O, -NR, o -S, donde R es H o alquilo C_1-C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son cada uno de modo independiente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo

(F) un compuesto que tiene la estructura ##STR006a##



Donde X, Y y Z son cada uno de modo independiente –O, –NR, o –S, donde R es H o alquilo C_1–C_{10}; R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{11}, R_{12}, y R_{13} son cada uno de modo independiente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, tioalquilo, tioalquilo sustituido, hidroxi, halógeno, amino, amido, carboxilo, –C(O)H, acilo, oxiacilo, carbamato, sulfonilo, sulfonamida, o sulfurilo y

(II) y opcionalmente otra sustancia, donde dicha sustancia es una sustancia alguicida o sustancia acaricidas en cantidades efectivas para modular dicha proliferación y/o crecimiento de algas y/o infestación de un arácnido.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicho compuesto se seleccionado del grupo que consiste en:

(i) templazol A;

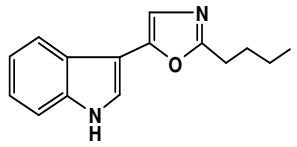
(ii) templazol B;

(iii) templamida A;

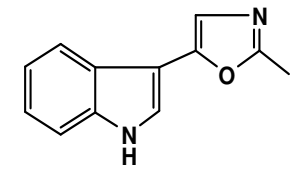
(iv) templamida B;

(v) FR901228;

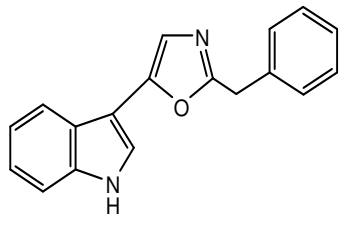
(vi)



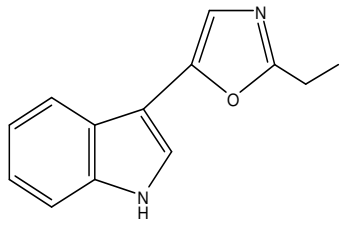
(vii)



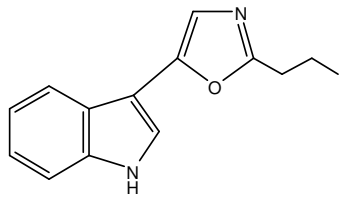
(viii)



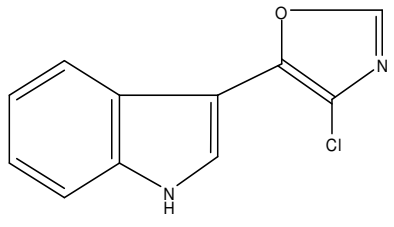
(ix)



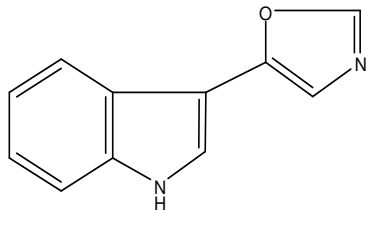
(x)



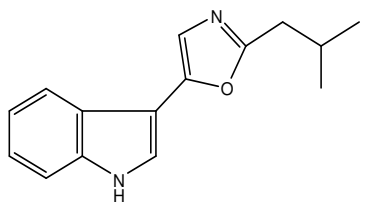
(xi)



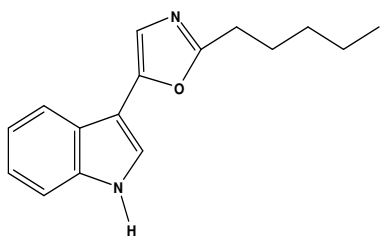
(xii)



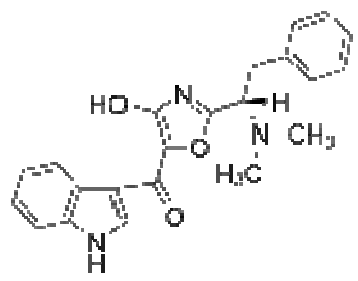
(xiii)



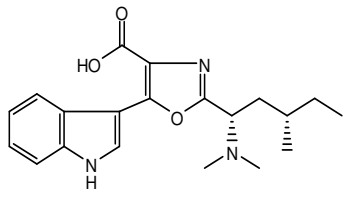
(xiv)



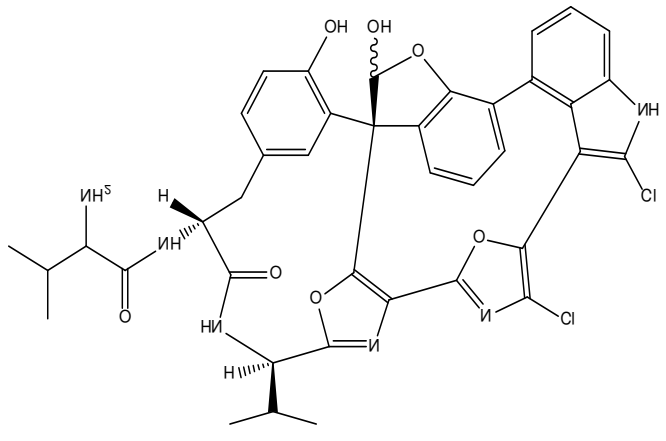
(xv)



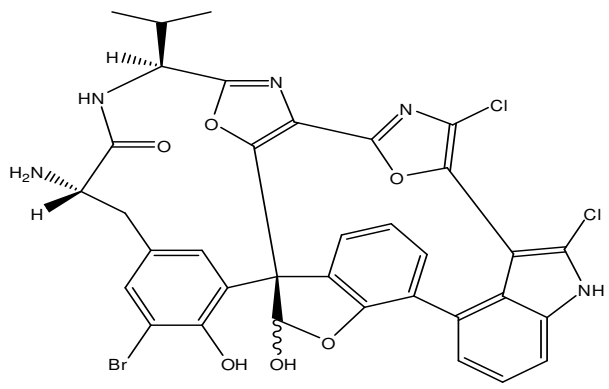
(xvi)



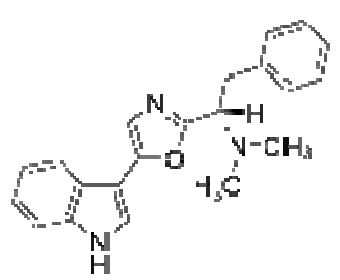
(xvii)



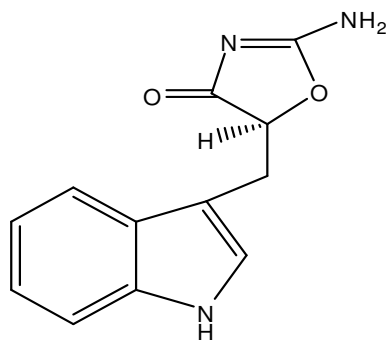
(xviii)



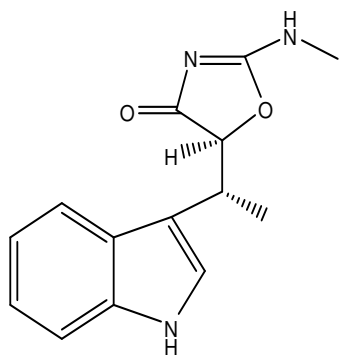
(xix)



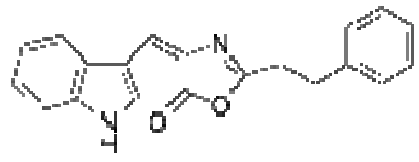
(xx)



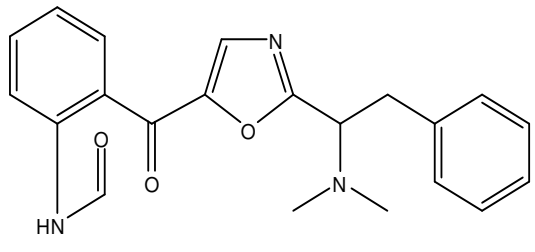
(xxi)

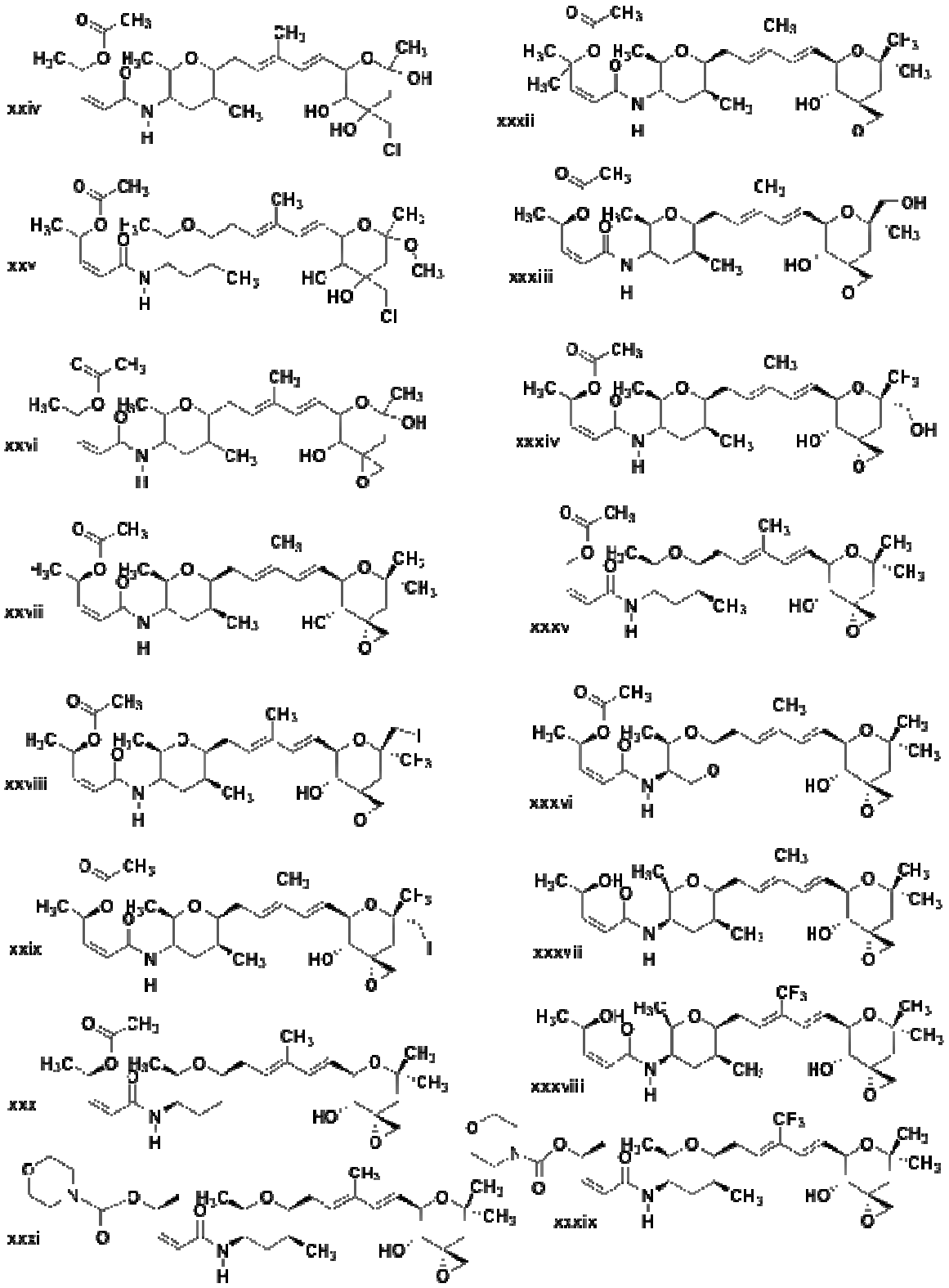


(xxii)



(xxiii)





(xl) FR901465;

(xli)F8H17.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 9 o 10,

donde la especie *Burkholderia* es una cepa de *Burkholderia* que tiene las características de identificación de *Burkholderia* A396 (NRRL No de acceso B-50319).

13. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho sobrenadante es un sobrenadante libre de células.

14. Uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

(A) un compuesto que tiene (i) un peso molecular de aproximadamente 525-555 determinado por cromatografía líquida/Espectroscopia de masa (LC/MS); (ii) Los valores de ^{1}H RMN 6,22, 5,81, 5,69, 5,66, 5,65, 4,64, 4,31, 3,93, 3,22, 3,21, 3,15, 3,10, 2,69, 2,62, 2,26, 2,23. 1,74, 1,15, 1,12, 1,05, 1,02; (iii) tiene valores ^{13}C RMN de 172,99, 172,93, 169,57, 169,23, 167,59, 130,74, 130,12, 129,93, 128,32, 73,49, 62,95, 59,42, 57,73, 38,39, 38,00, 35,49, 30,90, 30,36, 29,26, 18,59, 18,38, 18,09, 17,93, 12,51 y (iv) un tiempo de retención de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de aproximadamente 10-15 minutos, en una columna C-18 de HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua :acetonitrilo (CH_3CN) ;

(B) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-indol que comprende al menos un residuo indol, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido, al menos un grupo éster carboxílico, al menos 17 carbonos, al menos 3 oxígeno y al menos 2 nitrógenos;

(C) un compuesto que tiene una estructura oxazolil-bencilo que comprende al menos un residuo bencilo, al menos un residuo oxazol, al menos un grupo alquilo sustituido y al menos un grupo amida; al menos 15 carbonos, al menos 2 oxígenos, al menos 2 nitrógenos;

(D) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, al menos tres grupos metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa, al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos veinticinco carbonos, al menos ocho oxígenos y al menos un nitrógeno y

(E) un compuesto que tiene al menos un éster, al menos una amida, un grupo epóxido de metileno, al menos un residuo tetrahidropiranosa y al menos tres enlaces dobles olefínicos, al menos seis grupos metilo, al menos tres grupos hidroxilo, al menos 25 carbonos, al menos 8 oxígenos, y al menos 1 nitrógeno,

y opcionalmente un plaguicida

para formular una composición que modula la proliferación y/o crecimiento de algas y/o que modula la infestación de un arácnido en una localización.

15. Un método para modular la proliferación y/o el crecimiento de algas y/o modular la infestación de plagas en una planta y/o un método para modular la emergencia y/o crecimiento de malezas monocotiledóneas, juncos o dicotiledóneas que comprende aplicar en un lugar donde se desea la modulación de la proliferación y/o el crecimiento de algas y/o modulación de la infestación de un arácnido y/o la modulación de la emergencia y/o crecimiento de dicha maleza una cantidad de

(A) la formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o sustancia efectiva como plaguicida derivada de esta;

(B) combinación de acuerdo con la reivindicación 5;

(C) templamida A;

(D) templamida B;

(E) FR901465;

(F) FR901228

Efectiva para modular dicha proliferación y/o crecimiento

de algas y/o infestación con plagas y/o emergencia o crecimiento de malezas monocotiledóneas, juncos o dicotiledóneas en dicho lugar.

16.El método de acuerdo con la reivindicación 15, donde se modula la infestación con nematodos y/o insectos con templamida A; templamida B; FR901465; FR901228.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 15, donde se modulan la infestación de *Oncopeltus* sp. y/o nematodos de vida libres y/o nematodos *M. incognita*.

18. Una semilla que comprende la combinación de acuerdo con la reivindicación 3 o 9 o la formulación de acuerdo con la reivindicación 1.

RESUMEN

Se proporcionan una especie de *Burkholderia sp* sin patogenicidad conocida para vertebrados pero con actividad plaguicida (por ejemplo, plantes, algas, arácnidos, insectos, honogos, malezas y nematodos) así los métodos para controlar las algas usando dichas especies de *Burkholderia.* También se proporcionan productos naturales derivados de un cultivo de dicha especies y los métodos para controlar algas y/o arácnidos usando dichos productos naturales

Figura 1

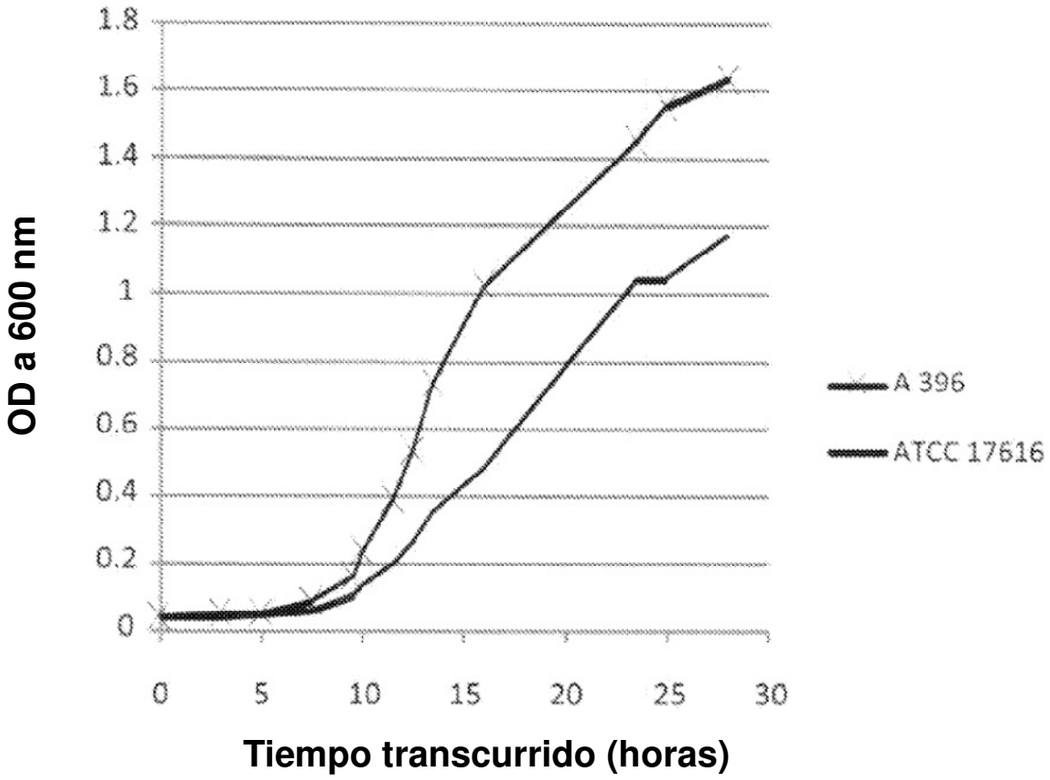
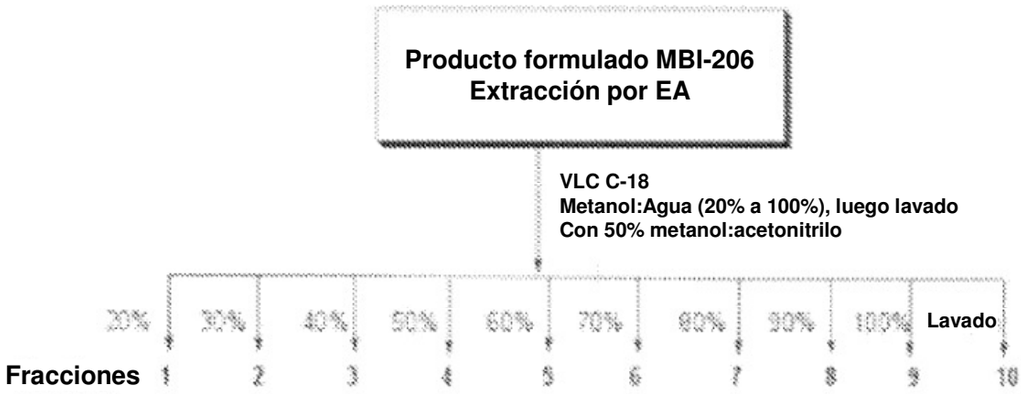

1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
OD a 600 nm
0
5
10
15
20
25
30
Tiempo transcurrido (horas)
A 396
ATCC 17616

Figura 2 - Fraccionamiento



Datos de bioensayo

MBI-206-FP-F3	50	50	50	50.0	0.0
MBI-206-FP-F4	75	87.5	87.5	83.3	7.2
MBI-206-FP-F5	75	87.5	87.5	83.3	7.2
MBI-206-FP-F6	50	75	50	58.3	14.4

Figura 3

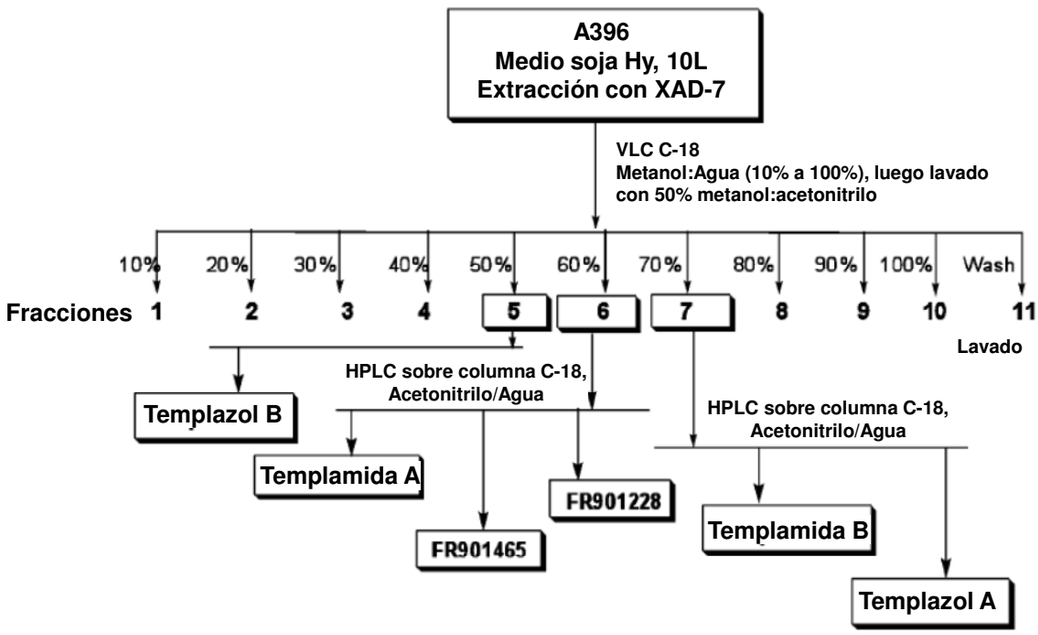

A396
Medio soja Hy, 10L
Extracción con XAD-7
VLC C-18
Metanol:Agua (10% a 100%), luego lavado
con 50% metanol:acetonitrilo
10%
20%
30%
40%
50%
60%
70%
80%
90%
100%
Wash
Fracciones 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Lavado
HPLC sobre columna C-18,
Acetonitrilo/Agua
HPLC sobre columna C-18,
Acetonitrilo/Agua
Templazol B
Templamida A
FR901465
FR901228
Templamida B
Templazol A

Figura 4

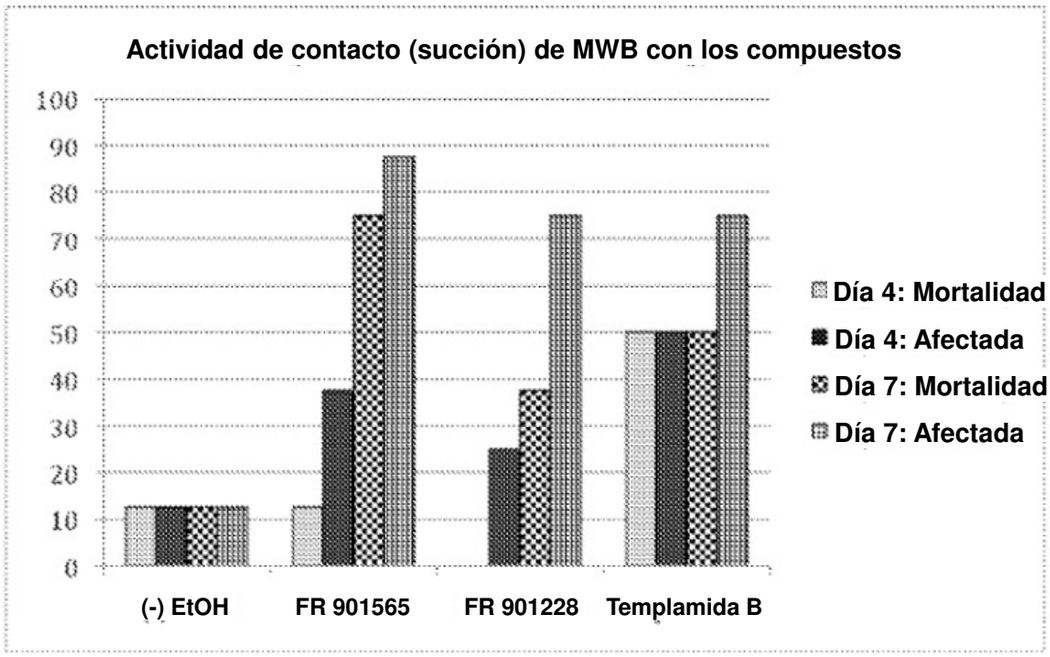
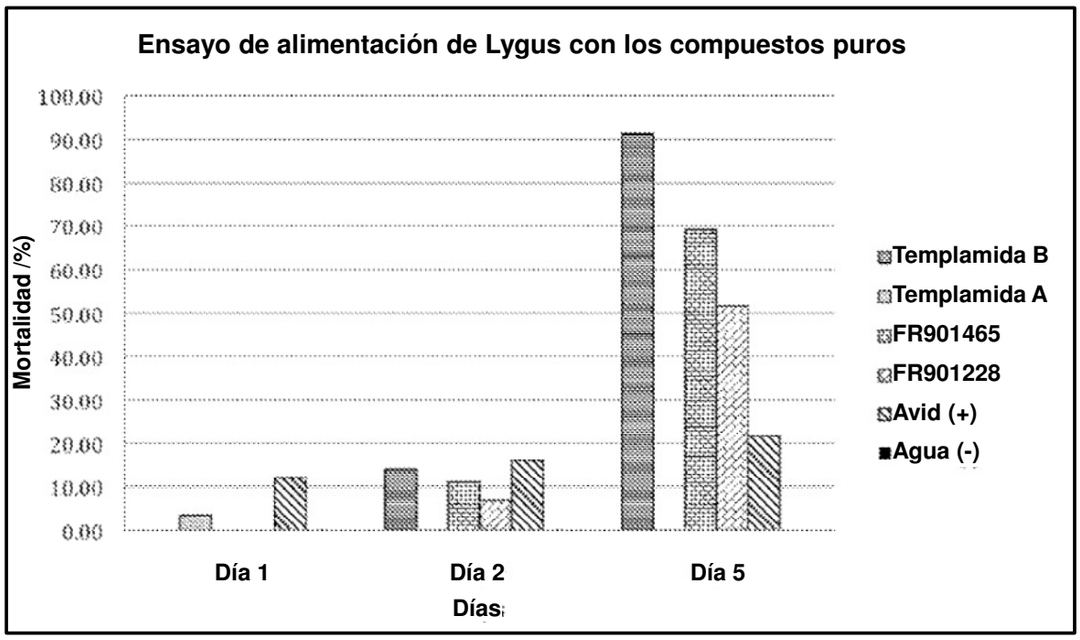

Actividad de contacto (succión) de MWB con los compuestos
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
(-) EtOH
FR 901565
FR 901228
Templamida B
Día 4: Mortalidad
Día 4: Afectada
Día 7: Mortalidad
Día 7: Afectada

Figura 5


Ensayo de alimentación de Lygus con los compuestos puros
Mortalidad /%)
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
Día 1
Día 2
Día 5
Días
Templamida B
Templamida A
FR901465
FR901228
Avid (+)
Agua (-)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Marrone Bio Innovations, Inc.

<120> CEPA BACTERIANA AISLADA DEL GÉNERO BURKHOLDERIA Y METABOLITOS PESTICIDAS DE LA MISMA-FORMULACIONES Y USOS

<130> MOI-42023-25-PCT

<150> 61528153
<151> 2011-08-27

<150> 61528149
<151> 2011-08-27

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 1
agagtttgat cctggctcag 20

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 2
ccgtcaattc ctttgagttt 20

<210> 3
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 3
gtgccagccg ccgcgg 16

<210> 4
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 4
gcaacgagcg caaccc 16

<210> 5
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 5
aaggaggtgw tccarcc 17

<210> 6
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 6
gggttgcgct cgttg 15

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 7
gwattaccgc ggckgctg 18

<210> 8
<211> 871
<212> ADN
<213> Burkholderia

<220>
<223> cepa A396

<400> 8
tgcagtcgaa cggcagcacg ggtgcttgca cctggtggcg agtggcgaac gggtgagtaa 60

tacatcggaa catgtcctgt agtgggggat agcccggcga aagccggatt aataccgcat 120

acgatctacg gatgaaagcg ggggatcttc ggacctcgcg ctatagggtt ggccgatggc 180

tgattagcta gttggtgggg taaaggccta ccaaggcgac gatcagtagc tggtctgaga 240

ggacgatcag ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg 300

ggaattttgg acaatggggg aaaccctgat ccagcaatgc cgcgtgtgtg aagaaggcct 360

tcgggttgta aagcactttt gtccggaaag aaatcctttg ggctaatacc ccgggggat 420

gacggtaccg gaagaataag caccggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag 480

ggtgcgagcg ttaatcggaa ttactgggcg taaagcgtgc gcaggcggtt tgttaagaca 540

gatgtgaaat ccccgggctt aacctgggaa ctgcatttgt gactggcaag ctagagtatg 600

gcagaggggg gtagaattcc acgtgtagca gtgaaatgcg tagagatgtg gaggaatacc 660

gatggcgaag gcagcccccc gggccaatac tgacgctcat gcacgaaagc gtggggagca 720

aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cctaaacgat gtcaactagt tgttggggat 780

tcatttcctt agtaacgtag ctacgcgtga agttgaccgc ctggggagta cggtcgcaag 840

attaaatmga gggtkgkktg kkgggggggaa a 871

<210> 9
<211> 1453
<212> ADN
<213> Burkholderia

<220>
<223> cepa A396

<400> 9
gtcatgaatc ctaccgtggt gaccgtcctc cttgcggtta gactagccac ttctggtaaa 60

acccactccc atggtgtgac gggcggtgtg tacaagaccc gggaacgtat tcaccgcggc 120

atgctgatcc gcgattacta gcgattccag cttcatgcac tcgagttgca gagtgcaatc 180

cggactacga tcggttttct gggattagct ccccctcgcg ggttggcaac cctctgttcc 240

gaccattgta tgacgtgtga agccctaccc ataagggcca tgaggacttg acgtcatccc 300

caccttcctc cggtttgtca ccggcagtct ccttagagtg ctcttgcgta gcaactaagg 360

acaagggttg cgctcgttgc gggacttaac ccaacatctc acgacacgag ctgacgacag 420

ccatgcagca cctgtgtatc ggttctcttt cgagcactcc cgaatctctt caggattccg 480

accatgtcaa gggtaggtaa ggtttttcgc gttgcatcga attaatccac atcatccacc 540

gcttgtgcgg gtccccgtca attcctttga gttttaatct tgcgaccgta ctccccaggc 600

ggtcaacttc acgcgttagc tacgttacta aggaaatgaa tccccaacaa ctagttgaca 660

tcgtttaggg cgtggactac cagggtatct aatcctgttt gctccccacg ctttcgtgca 720

tgagcgtcag tattggccca gggggctgcc ttcgccatcg gtattcctcc acatctctac 780

gcatttcact gctacacgtg gaattctacc cccctctgcc atactctagc ttgccagtca 840

caaatgcagt tcccaggtta agcccgggga tttcacatct gtcttaacaa accgcctgcg 900

cacgctttac gcccagtaat tccgattaac gctcgcaccc tacgtattac cgcggctgct 960

ggcacgtagt tagccggtgc ttattcttcc ggtaccgtca tccccccggg gtattagccc 1020

aaaggatttc tttccggaca aaagtgcttt acaacccgaa ggccttcttc acacacgcgg 1080

cattgctgga tcagggtttc ccccattgtc caaaattccc cactgctgcc tcccgtagga 1140

gtctgggccg tgtctcagtc ccagtgtggc tgatcgtcct ctcagaccag ctactgatcg 1200

tcgccttggt aggcctttac cccaccaact agctaatcag ccatcggcca accctatagc 1260

gcgaggtccg aagatccccc gctttcatcc gtagatcgta tgcggtatta atccggcttt 1320

cgccgggcta tcccccacta caggacatgt tccgatgtat tactcacccg ttcgccactc 1380

gccaccaggt gcaagcaccc gtgctgccgt tcgacttgca tgtgtaaggc atgccgccag 1440

cgttcaatct gag 1453

<210> 10
<211> 860
<212> ADN
<213> Burkholderia

<220>
<223> cepa A396

<400> 10
ccaggcggtc acttcacgcg ttagctacgt tactaaggaa atgaatcccc aacaactagt 60

tgacatcgtt tagggcgtgg actaccaggg tatctaatcc tgtttgctcc ccacgctttc 120

gtgcatgagc gtcagtattg gcccaggggg ctgccttcgc catcggtatt cctccacatc 180

tctacgcatt tcactgctac acgtggaatt ctacccccct ctgccatact ctagcttgcc 240

agtcacaaat gcagttccca ggttaagccc ggggatttca catctgtctt aacaaaccgc 300

ctgcgcacgc tttacgccca gtaattccga ttaacgctcg caccctacgt attaccgcgg 360

ctgctggcac gtagttagcc ggtgcttatt cttccggtac cgtcatcccc ccggggtatt 420

agcccaaagg atttctttcc ggacaaaagt gctttacaac ccgaaggcct tcttcacaca 480

cgcggcattg ctggatcagg gtttccccca ttgtccaaaa ttccccactg ctgcctcccg 540

taggagtctg ggccgtgtct cagtcccagt gtggctgatc gtcctctcag accagctact 600

gatcgtcgcc ttggtaggcc tttaccccac caactagcta atcagccatc ggccaaccct 660

atagcgcgag gtccgaagat cccccgcttt catccgtaga tcgtatgcgg tattaatccg 720

gctttcgccg ggctatcccc cactacagga catgttccga tgtattactc acccgttcgc 780

cactcgccac caggtgcaag cacccgtgct gccgttcgac ttgcatgtgt aaggcatgcc 840

gccagcgttc aatctgagtg 860

<210> 11
<211> 1152
<212> ADN
<213> Burkholderia

<220>
<223> cepa A396

<400> 11

tcggattact gggcgtaagc gtgcgcaggc ggtttgttaa gacagatgtg aaatccccgg 60

gcttaacctg ggaactgcat ttgtgactgg caagctagag tatggcagag gggggtagaa 120

ttccacgtgt agcagtgaaa tgcgtagaga tgtggaggaa taccgatggc gaagggagcc 180

ccctgggcct atactgaccc tcatgctcga aagcgtgagg acccaaccgg attagatgcc 240

ctgataggcc atgccccaca ccatgccatg tgttaggggc ccatttcctt agggaggcag 300

ctatggggaa ttttggacaa tgtgggaaac cctgatccaa caatgccgcg tgtgtgaata 360

aggccttcgg gttgtaaagc acttttatcc ggatagattc cttttgggct aaacctccgt 420

aggggatgac ggtaccggaa gaataaccac cgggtaacta cgtgccagca gccgcggtaa 480

tacgtagggt gcgagcgtta atcggaatta ctgggcgtaa agcgtgcgca ggcggtttgt 540

taagacagat gtgaaatccc cgggcttaac ctgggaactg catttgtgac tggcaagcta 600

gagtatggca gacgggggta gaattccacg tgtagcagtg aaatgcgtag agatgtggag 660

gaataccgat gggcgaagca gctcctgggg caatactgac gctcatgcac aagatcgtgc 720

gaaacaaaca ggataaaacc cctgtattcc acgcccaaaa cgatgtccac caagttgttg 780

gcgatccttt ccttcgtatc gtagctacgc gggaatttga ccccctgggg actaggccgc 840

atataaaact caagggaatt ccggggaccc ccagagctgt gtatgatgtg attattccga 900

tgcgcggaaa accttcctta tctttgaatg gcggtactcc tgaaaattgc ggagtgctcg 960

aaaacaccga acccgggtct ttctgcgtgt cctccctcgt gtgggatatg ctggatatcc 1020

cgcagacgca tctttgactt agtgctccca aaactgagag ctgggaggac tcgagagggg 1080

atccctgcct ccccggcttg ggtgctcccc ttatggggga aacaggtaca cgggggggatc 1140

atcccatacc ta 1152

<210> 12
<211> 1067
<212> ADN
<213> Burkholderia

<220>
<223> cepa A396

<400> 12
tctaaggaga ctgccggtga caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa gtcctcatgg 60

cccttatggg tagggcttca cacgtcatac aatggtcgga acagagggtt gccaacccgc 120

gaggggggagc taatcccaga aaaccgatcg tagtccggat tgcactctgc aactcgagtg 180

catgaagctg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg 240

tcttgtacac accgcccgtc acaccatggg agtgggtttt accagaagtg gctagtctaa 300

ccgcaaggag gacggtcacc acggtaggat tcatgactgg ggtgaagtcg taacaaggta 360

gccgtatcgg aaggtgcggc tggatcacct ccttaaaccc tttggcctaa taaccccggg 420

ggaataagta ccgaaaaaaa aaaaaactgg ataacttccg tgccacaacc cgcggaaaaa 480

tctaggggg gggagcttaa atggaaattt acggggccgt aaagcgtgcg caggcggttt 540

gtaaacacag atgtgaaatc cccgggctta acctgggaac tgcatttgtg actggcaagc 600

tagagtatgg cacaggggg tagaattcca cgtgtagcat tgaatgcata gagatgagag 660

gataccgatg gagaagggcg cccccgggga caatatgacg cctatgccac aaagctgtgg 720

cacaataggt taaatacctg tgttgtcccc gcctaaacag attacacttg ttgtgggtat 780

tttctcataa aatactacac acgggagaat acactggggg gcttcgtcaa ttatcacaac 840

aatgattgcg ggcacccacg ggggtagatg ggtaataaat cgacggcaac tatctactta 900

cttggatgat cgcacagatt gggcgggaga gaagagaaca gcgtgtgtgt gctcctccgc 960

gagtgatagg taatcggaca atactttgac aggacttaac tgggtagcgg gatcgagtgg 1020

attcccgtcg gatggcctcc gcaggtacgg cagctgggga ttacatc 1067

<210> 13
<211> 1223
<212> ADN
<213> Burkholderia

<220>
<223> cepa A396

<400> 13
ttgcttacga cttcacccca gtcatgaatc ctaccgtggt gaccgtcctc cttgcggtta 60

gactagccac ttctggtaaa acccactccc atggtgtgac gggcggtgtg tacaagaccc 120

gggaacgtat tcaccgcggc atgctgatcc gcgattacta gcgattccag cttcatgcac 180

tcgagttgca gagtgcaatc cggactacga tcggttttct gggattagct ccccctcgcg 240

ggttggcaac cctctgttcc gaccattgta tgacgtgtga agccctaccc ataagggcca 300

tgaggacttg acgtcatccc caccttcctc cggtttgtca ccggcagtct ccttagagtg 360

ctcttgcgta gcaactaagg acaagggttg cgctcgttgc gggacttaac ccaacatctc 420

acgacacgag ctgacgacag ccatgcagca cctgtgtatc ggttctcttt cgagcactcc 480

cgaatctctt caggattccg accatgtcaa gggtaggtaa ggtttttcgc gttgcatcga 540

attaatccac atcatccacc gcttgtgcgg gtccccgtca attcctttga gttttaatct 600

tgcgaccgta ctccccaggc ggtcaacttc acgcgttagc tacgttacta aggaaatgaa 660

tccccaacaa ctagttgaca tcgtttaggg cgtggactac cagggtatct aatcctgttt 720

gctccccacg ctttcgtgca tgagcgtcag tattggccca gggggctgcc ttcgccatcg 780

gtattcctcc acatctctac gcatttcact gctacacgtg gaattctacc cccctctgcc 840

atactctagc ttgccagtca caaatgcagt tcccaggtta agcccgggga tttcacatct 900

gtcttaacaa accgcctgcg cacgctttac gcccagtaat tccgattaac gctcgcaccc 960

tacgtattac cgcggctgct ggcacgtagt tagccggtgc ttattctgcg gtaccgtcat 1020

cccccgggta tagcccaaag gattctttcg acaaagtgct ttacacccga tgtctctcac 1080

acacgcgcat gctgatcagg tttccccatg tcaaagtcca ctgctgctcg taggtctgga 1140

cgggttcagt tcaatgtgac tgatcgtctt tcgacaacta ctgaacgtcc ctgtagctta 1200

cccaccaact agctatagca tgc 1223

<210> 14
<211> 1216
<212> ADN
<213> Burkholderia

<220>
<223> cepa A396

<400> 14
ccgagctgac gacagccatg cagcacctgt gtatcggttc tctttcgagc actcccgaat 60

ctcttcagga ttccgaccat gtcaagggta ggtaaggttt ttcgcgttgc atcgaattaa 120

tccacatcat ccaccgcttg tgcgggtccc cgtcaattcc tttgagtttt aatcttgcga 180

ccgtactccc caggcggtca acttcacgcg ttagctacgt tactaaggaa atgaatcccc 240

aacaactagt tgacatcgtt tagggcgtgg actaccaggg tatctaatcc tgtttgctcc 300

ccacgctttc gtgcatgagc gtcagtattg gcccaggggg ctgccttcgc catcggtatt 360

cctccacatc tctacgcatt tcactgctac acgtggaatt ctacccccct ctgccatact 420

ctagcttgcc agtcacaaat gcagttccca ggttaagccc ggggatttca catctgtctt 480

aacaaaccgc ctgcgcacgc tttacgccca gtaattccga ttaacgctcg caccctacgt 540

attaccgcgg ctgctggcac gtagttagcc ggtgcttatt cttccggtac cgtcatcccc 600

ccggggtatt agcccaaagg atttctttcc ggacaaaagt gctttacaac ccgaaggcct 660

tcttcacaca cgcggcattg ctggatcagg gtttccccca ttgtccaaaa ttccccactg 720

ctgcctcccg taggagtctg ggccgtgtct cagtcccagt gtggctgatc gtcctctcag 780

accagctact gatcgtcgcc ttggtaggcc tttaccccac caactagcta atcagccatc 840

ggccaaccct atagcgcgag gtccgaagat cccccgcttt catccgtaga tcgtatgcgg 900

tattaatccg gctttcgccg ggctatcccc cactacagga catgttccga tgtattactc 960

acccgttcgc cactcgcccc aggtgcaagc acccgtgctg ccgttcgact tgcatgtgta 1020

gcatgcgcag cgtcatctac taaataaaca actctaagaa tttttgcccg agggcctcta 1080

aacactcggg gcgtcgagag agactacgga tgaggagcat ccctctgtct ctaggtatgt 1140

gttgtcgcct ctctcacaga ggaggggacg cacgacggag ccatcgggga cgacaacatg 1200

tacgatatac tatcta 1216

<210> 15
<211> 1194
<212> ADN
<213> Burkholderia

<220>
<223> cepa A396

<400> 15
ttcttcggta ccgtcatccc cccggggtat tagcccaaag gatttctttc cggacaaaag 60

tgctttacaa cccgaaggcc ttcttcacac acgcggcatt gctggatcag ggtttccccc 120

attgtccaaa attccccact gctgcctccc gtaggagtct gggccgtgtc tcagtcccag 180

tgtggctgat cgtcctctca gaccagctac tgatcgtcgc cttggtaggc ctttacccca 240

ccaactagct aatcagccat cggccaaccc tatagcgcga ggtccgaaga tcccccgctt 300

tcatccgtag atcgtatgcg gtattaatcc ggctttcgcc gggctatccc ccactacagg 360

acatgttccg atgtattact cacccgttcg ccactcgcca ccaggtgcaa gcacccgtgc 420

tgccgttcga cttgcatgtg taaggcatgc cgccagcgtt caatctgagc catgatcaaa 480

ctctgagggg gggggccttc aacggaacga ctgggcaaaa agcgtgccca ggcgttttgt 540

taagacagat gtgaaacccc ggggcttaac ctggaaactg catttgtgac tggaaagcta 600

gagtatggca gagggggggta gaattccacg tgtagcattg aaatgcgtag aaatggagag 660

gaataccgat gggagagggc agcccccgtg ggcaaatact ggcgcttatg aacaaagttg 720

gggcgcgccg ccgggatatg ttcccctggg atatcccccc cctaaactgc ttacaaatat 780

tgtgtgggaa acttttttctc taaaaaatag aacacaacgg gagatatcac ccccgggggg 840

ccaccgccag attaaacccc caaaaagtat ttggcgggca ccccccgggg gggtgagatg 900

gggtaaaata aatccgtgcg acgagcaaac cctccccaca cctgggatgg tcgcgaccac 960

agatgagatg cgggcggaga gaacgatacc caagcgtggt tgtttgcctg catcccctcc 1020

gtcgggagtg gatatagtag agtaattacg gcacgactgc attttttttt cttcagtaca 1080

ccttatcaca ctgttggatg caccgcgaga aatccggagg tgtgagtact ccccccctct 1140

cctcgggatg tgtcggcgct cccttctccc gttcaggggt gggtaagcac cgcg 1194

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
MOI-42023-25-PCT		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2012/050807	**14 AUGUST 2012 (14.08.2012)**	27 AUGUST 2011 (27.08.2011)

Applicant

MARRONE BIO INNOVATIONS, INC. et al

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of **6** sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of :
      ☒ the international application in the language in which it was filed
      ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.
2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)
3. ☐ **Unity of invention is lacking** (See Box No. III)
4. With regard to the **title,**
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract,**
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.
6. With regard to the drawings,
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. **2**
      ☒ as suggested by the applicant.
      ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
      ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
   b. ☐ none of the figure is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/050807

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of :

a. a sequence listing filed or furnished

- ☐ on paper
- ☒ in electronic form

b. time of filing or furnishing

- ☐ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/050807

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 14
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claim of this application is not numbered consecutively in Arabic numbers according to PCT Rule 6.1(b), since claim 14 is missing.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required addtional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/050807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i, C12P 1/04(2006.01)i, C12N 1/38(2006.01)i, A01N 63/02(2006.01)i, A01N 43/06(2006.01)i, A01N 43/26(2006.01)i, A01P 21/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/20; A01N 63/00; A61K 31/351; A01N 25//02; A61K 31/5377; A01C 1/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: Burkholderia, non-Burkholderia, pesticidal, 16S rRNA, molecular weight, NMR, oxazolyl-indole, oxazolyl-benzyl, ester, paraben, alcohol, detergent.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	US 2011-0207604 A1 (ASOLKAR, RATNAKAR et al.) 25 August 2011 See paragraphs 44, 81-85, 187, and 209-210; claims 1-4, 9, 11, 14, and 18-20; Table 12.	5,6 1,2,18 3,4,7-13,15-17
Y	US 05902595 A (BURKLOW, EDDIE R. et al.) 11 May 1999 See Abstract; column 3, lines 9-24; claim 1.	1,2,18
A	SPILKER, THEODORE et al., `PCR-Based assay for differentiation of Pseudomonas aeruginosa from other Pseudomonas species recovered from cystic fibrosis patients`, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 2004, Vol.42, No.5, pp.2074-2079, ISSN 0095-1137. See Abstract, p.2076, right column; p.2076, left column.	1-13,15-18
A	US 2008-0096879 A1 (KOIDE, KAZUNORI et al.) 24 April 2008 See Abstract; claim 18.	1-13,15-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents,such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 FEBRUARY 2013 (25.02.2013)	**26 FEBRUARY 2013 (26.02.2013)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Facsimile No. 82-42-472-7140	HEO, Joo Hyung Telephone No. 82-42-481-8150

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/050807

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NAKAJIMA, HIDENORI et al. `Antitumor substances, FR901463, FR901464 and FR901465 II. Activities against experimental tumors in mice and mechanism of action`, Journal of antibiotics, December 1996, Vol.49, No.12, pp.1204-1211, ISSN 0021-8820. See Abstract; Figure 1.	1-13,15-18
A	US 2004-0071663 A1 (CAMPOS, JESUS MENA et al.) 15 April 2004 See Abstract; claims 1, 11, and 16-17.	1-13,15-18
A	US 2003-0082147 A1 (GOUGE, DAWN H. et al.) 01 May 2003 See Abstract; claim 3.	1-13,15-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/050807

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011-0207604 A1	25.08.2011	WO 2011-106491 A2	01.09.2011
		WO 2011-106491 A3	15.03.2012
US 05902595 A	11.05.1999	AU 1997-39017 B2	25.01.2001
		EP 0932338 A1	04.08.1999
		EP 0932338 A4	25.10.2000
		EP 0932338 B1	10.09.2003
		US 05902595 A	11.05.1999
		WO 98-04128 A1	05.02.1998
US 2008-0096879 A1	24.04.2008	US 2011-0086909 A1	14.04.2011
		US 7825267 B2	02.11.2010
		US 8309599 B2	13.11.2012
US 2004-0071663 A1	15.04.2004	AT 302552 T	15.09.2005
		AU 2002-216898 B2	07.09.2006
		BR 0116711 A	23.12.2003
		CA 2431669 A1	11.07.2002
		CA 2431669 C	07.02.2012
		CN 1484494 A	24.03.2004
		CN 1484494 C0	15.02.2006
		CU 23176 A1	22.09.2006
		DE 60112973 D1	29.09.2005
		DE 60112973 T2	18.05.2006
		DK 1356733 T3	14.11.2005
		EC SP034675 A	28.10.2003
		EP 1356733 A2	29.10.2003
		EP 1356733 B1	24.08.2005
		ES 2247009 T3	01.03.2006
		IL 156700 A	24.07.2007
		IL 156700 D0	04.01.2004
		JP 2004-522727 A	29.07.2004
		JP 2007-326861 A	20.12.2007
		PA 8536401 A1	30.06.2003
		PE 07782002 A1	16.10.2002
		RU 2003124061 A	27.01.2005
		RU 2249957 C1	20.04.2005
		US 2011-0064718 A1	17.03.2011
		US 8268306 B2	18.09.2012
		UY 27112 A1	22.03.2002
		WO 02-052934 A2	11.07.2002
		ZA 200305121 A	19.07.2004
US 2003-0082147 A1	01.05.2003	None	