

Anna PIEKARSKA<sup>1\*</sup>, Agnieszka BARTOSZEK<sup>2</sup> i Jacek NAMIEŚNIK<sup>1</sup>

## BIOFUMIGACJA JAKO ALTERNATYWNA METODA OCHRONY ROŚLIN

### BIOFUMIGATION AS AN ALTERNATIVE METHOD OF CROP PROTECTION

**Abstrakt:** Zagrożenia zdrowotne związane z powszechnym stosowaniem pestycydów i nawozów sztucznych przyczyniły się do wzrostu zainteresowania alternatywnymi środkami ochrony roślin. Wśród nich coraz większe znaczenie zyskuje biofumigacja. Polega ona na wykorzystaniu naturalnych związków występujących głównie w roślinach z rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*) w zwalczaniu szkodników i drobnoustrojów atakujących uprawy rolne. Ponadto korzystnie wpływają one na jakość gleby oraz wielkość plonu. Przedstawiono informacje o substancjach wykorzystywanych w biofumigacji, ich działaniu antybiologicznym oraz opisano próby praktycznego zastosowania tej metody.

**Słowa kluczowe:** biofumigacja, alternatywne metody ochrony roślin, glukozytolany, izotiocyjaniiny, mirozynaza

### Wprowadzenie

Rolnictwo stanowi główne źródło żywności oraz zapewnia miejsca pracy dla znacznej części społeczeństwa. Ze względu na rosnące zapotrzebowanie na żywność, ograniczoną powierzchnię gleby dostępnej pod uprawę oraz jej pogarszającą się jakość niezbędne stało się chemiczne wspomaganie rolnictwa. Przejawem postępującej chemizacji jest stosowanie przemysłowo otrzymanywanych środków chemicznych, takich jak pestycydy i nawozy sztuczne, w celu zwiększenia wydajności upraw oraz ochrony roślin przed szkodnikami i chorobami.

Nawozy sztuczne zawierają przede wszystkim ważne dla wzrostu roślin pierwiastki, takie jak azot (azotany, mocznik, sole amonu), fosfor (superfosfaty, polifosforany) oraz potas (azotan, siarczan lub chlorek potasu). Dla zdrowia ludzkiego, szczególnie małych dzieci, niebezpieczne są azotany(V), które gromadzą się w warzywach pochodzących z nawożonych upraw. Azotany(V) są przekształcane w przewodzie pokarmowym do azotanów(III), które po związaniu się z hemoglobina, transportującą tlen we krwi, powodują

<sup>1</sup> Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk, tel. +48 58 347 21 10, fax +48 58 347 26 94, email: jacek.namiesnik@pg.gda.pl

<sup>2</sup> Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk, tel. +48 58 347 17 23, email: agnieszka.bartoszek@pg.gda.pl

\* Autor do korespondencji: anna.m.piekarska@o2.pl

jej przejście w słabo wiążącą tlen methemoglobinę, co prowadzi do niedotlenienia organizmu, a nawet zagraża życiu.

Większe obawy są jednak związane ze stosowaniem pestycydów. Stanowią one dużą i różnorodną grupę środków chemicznych wykorzystywanych w rolnictwie. Na podstawie danych zawartych w roczniku statystycznym (2008) można stwierdzić, że udział poszczególnych grup pestycydów w ogólnym ich zużyciu w Polsce jest następujący: herbicydy (62,3%), fungicydy (23,3%) oraz insektycydy (4,6%), a ich łączna produkcja wynosiła blisko 41 tys. ton [1]. Związki te umożliwiają ochronę i wzrost wydajności upraw. Należy zauważyć, że niekorzystnym efektem stosowania pestycydów jest ich toksyczne działanie, które nie ogranicza się tylko do szkodników, ale ma wpływ również na pożyteczne organizmy bytujące na danym terenie oraz ludzi - w szczególności osób pracujących przy opryskach. Ponadto pestycydy mogą być przemieszczane przez wiatr z miejsc stosowania na sąsiednie uprawy i tereny. Jest to zjawisko niekorzystne, ponieważ przenikanie tych związków do gleby, wody, powietrza narusza naturalną równowagę i może przyczynić się do wyginięcia niektórych dziko rosnących gatunków roślin oraz zwierząt. Ze środowiska pestycydy mogą wnikać do pasz i żywności oraz kumulować się w organizmach zwierzęcych. Ich ilość może zostać zwielokrotniona na kolejnych piętrach łańcucha pokarmowego. Przykładowo węglowodory chlorowcoorganiczne (DDT, PCB), obecne w produktach spożywczych, łatwo kumulują się w organizmie ludzkim w tkance tłuszczowej, wątrobie, nerkach, mózgu i sercu, co może być przyczyną zaburzenia funkcjonowania tych organów i prowadzić do związanych z tym chorób. Z tego względu największe obawy dotyczą przenikania pestycydów do żywności. Artykuły spożywcze mogą zostać zanieczyszczone pestycydami na skutek:

- bezpośredniego spryskania warzyw i owoców (związki te przenikają do wszystkich części roślin, niezależnie od sposobu ich stosowania),
- zatrzymania w tkance tłuszczowej zwierząt rzeźnych pestycydów, użytych do zwalczania szkodników bezpośrednio zagrażających zwierzętom lub w wyniku spożycia pestycydów z zanieczyszczoną paszą lub wodą,
- stosowania pestycydów do zapobiegania stratom żywności podczas magazynowania i transportu [2].

Obawy dotyczące bezpieczeństwa stosowania DDT (dichlorodifenylotrichloroetan) spowodowały wycofanie tego środka powszechnie używanego w ochronie roślin w latach 80. XX w. Obecnie związek ten podejrzewany jest o zaburzenie gospodarki hormonalnej, a być może także o wywoływanie chorób nowotworowych. Od 2005 roku obowiązuje również zakaz produkcji i stosowania bromku metylu z wyjątkiem szczególnych sytuacji typu kwarantanna, zgodnie z zaleceniami tzw. Protokołu Montrealskiego, w których są zawarte zalecenia ograniczenia produkcji i wykorzystania związków mających wpływ na niszczenie stratosferycznej warstwy ozonowej [3]. Pestycyd ten był wykorzystywany w rolnictwie do niszczenia obecnych w ziemi nicieni i grzybów, ochrony upraw zbóż, kawy, kakao, tytoniu, a także do zwalczania owadów w spichlerzach, podczas przechowywania oraz transportu. Jednak okazało się, że bromek metylu ma szkodliwe działanie na organizm ludzki. Przy zwiększonym poziomie narażenia powoduje wymioty, drgawki, utratę przytomności, zaburzenia widzenia i mowy, uszkodzenie nerek, a nawet śmierć w wyniku porażenia układu oddechowego [4]. Stwierdzono także jego niekorzystne działanie na uprawy, bowiem obniża siłę kiełkowania nasion, ma wpływ na powstawanie uszkodzeń owoców, warzyw i roślin ozdobnych. W przypadku żywności ujemnie wpływa na jakość

przechowywanych produktów, m.in. prowadzi do zmniejszenia zawartości witamin, obniża wartość wypiekową mąki, zmienia jej smak i zapach. Inny powszechnie stosowany związek - izotiocyanian metylu - jest półproduktem w otrzymywaniu pestycydów z grupy karbaminianów, ale może też być stosowany samodzielnie. Skutecznie zwalcza wiele szkodników, grzybów, insektów powodujących straty i choroby upraw roślinnych. Jest to związek silnie toksyczny, powodujący u ludzi zaburzenia oddychania, krwotoki i śmierć, dlatego jego stosowanie ze względu na możliwość przedostania się do żywności uznano za wyjątkowo groźny i wycofano go z użytku, niedawno także w Polsce [5].

Pestycydy są na ogół związkami trwałymi, a produkty ich rozpadu czasem mogą być bardziej szkodliwe i trwalsze niż wyjściowy związek, dlatego odchodzi się od stosowania pestycydów trwałych na rzecz związków o krótkim czasie rozpadu, bez tendencji do biokumulacji [2]. Poszukuje się też naturalnych metod ochrony roślin, które byłyby skuteczne, ale i bezpieczne w stosowaniu. Ich rozpowszechnienie powinno przyczynić się do zmniejszenia zużycia syntetycznych pestycydów, a tym samym przyniosłoby korzyści zdrowotne i ekologiczne. Jednym z alternatywnych sposobów ochrony roślin jest biofumigacja.

## Biofumigacja

Fumigacja to sposób zwalczania szkodników i patogenów za pomocą trujących substancji stosowanych w postaci gazów i dymów (fumigantów). Ze względu na ochronę środowiska odchodzi się od używania syntetycznych fumigantów na rzecz ich naturalnych odpowiedników. To bardziej ekologiczne podejście nazywane jest biofumigacją. Polega ona na wykorzystaniu związków o działaniu antybiologicznym, naturalnie występujących w roślinach. Substancje te nie tylko niszczą niepożądane grzyby, bakterie i inne szkodniki, ale również korzystnie wpływają na biologiczną jakość gleby, a przede wszystkim są bezpieczne w stosowaniu. W biofumigacji głównie wykorzystywane są zarówno rośliny z rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*), do których należą liczne rośliny uprawne: warzywa (kapusta, rzodkiew, rzepa, brukiew, kalafior), rośliny oleiste (rzepak, rzepik, lnianka, gorczyca), jak również rośliny ozdobne (np. lewkonía) i zielarskie (rukiew, tasznik).

Rośliny z rodziny kapustowatych zawdzięczają swoje biobójcze działanie obecności glukozyzolanów i enzymu mirozynazy. W nienaruszonej komórce tkanki roślinnej glukozyzolan są oddzielone od enzymu, który znajduje się w tzw. komórkach mirozynowych. Gdy komórka roślinna zostanie uszkodzona, mechanicznie lub w wyniku ataku roślinożerców, dochodzi do kontaktu mirozynazy z glukozyzolanami. Wówczas uwalniane zostają produkty ich hydrolizy o właściwościach biobójczych, takie jak izotiocyanianiny, nityle, tiocyjaniany i epitionityle (rys. 3). W ten naturalny sposób zaatakowane rośliny bronią się przed szkodnikami [6-8].

Termin biofumigacja jest także stosowany w przypadku wykorzystania przeciwko patogenom lotnych związków syntetyzowanych przez pewne mikroorganizmy. Wyniki badań informują o skuteczności niektórych metabolitów wytwarzanych przez grzyba *Muscodor albus* w hamowaniu wzrostu grzybów *Phytophthora erythroseptica*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *P. digitatum*, *Geotrichum citri-aurantii* oraz bakterii *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, mikroorganizmów przyczyniających się do rozkładu

warzyw i owoców podczas przechowywania. Grzyb *M. albus* syntetyzuje alkohole, estry, ketony, kwasy (m.in. kwas izomasłowy i izobutanol), które są toksyczne dla patogenów i dzięki temu może być wykorzystany w ochronie płodów rolnych [9-11]. Wyniki badań prowadzonych w innym ośrodku dowodzą skuteczności *M. albus* w walce z larwami szkodników *Phthorimaea operculella* niszczących uprawy ziemniaków [12].

Wyniki badań dowodzą, że nie tylko rodzina kapustowatych, ale także inne rośliny, np. papryka (*Capsicum annum*), jako przedstawiciel rodziny psiankowatych (*Solanaceae*), wykazuje właściwości biofumiganta. Stosując eksperymentalną mieszankę papryki i odchodów zwierzęcych podczas uprawy pomidorów, zaobserwowano znaczny spadek populacji nicieni *M. incognita* (nawet 98% śmiertelności) [13].

Jednak to właśnie rośliny z rodziny kapustowatych stanowią główny obiekt zainteresowania naukowców poszukujących naturalnych pestycydów na potrzeby biofumigacji. Wykorzystanie glukozynolanów w ochronie roślin ma bowiem wiele wymiernych zalet:

- bezpieczeństwo stosowania,
- dostępność i mały koszt stosowania biofumigantów,
- przypadkowe przedostanie się produktów hydrolizy glukozynolanów do żywności, w przeciwieństwie do syntetycznych pestycydów, nie tylko nie stanowi zagrożenia, ale dzięki prozdrowotnym właściwościom mogą one pozytywnie oddziaływać na zdrowie człowieka,
- możliwość biodegradacji przy jednoczesnym wykorzystaniu jako źródła łatwo przyswajalnego węgla i azotu dla upraw,
- do korzyści środowiskowych można też zaliczyć zmniejszenie emisji CO<sub>2</sub> do atmosfery w wyniku ograniczenia produkcji syntetycznych pestycydów.

Biofumiganty nie są jedynym typem naturalnych pestycydów. Obecnie podejmuje się próby wykorzystania innych związków roślinnych i mikrobiologicznych w zwalczaniu szkodników o znaczeniu rolniczym. Antyfidanty to substancje częściowo lub całkowicie hamujące żerowanie owadów. Jako związki naturalne pochodzenia roślinnego są biodegradowalne, a ponadto są aktywne tylko wobec wąskiej grupy owadów. Oddziałują na ich narządy smaku, powodując zaprzestanie żerowania na chronionych roślinach i w efekcie śmierć głodową [14]. Jako przykłady antyfidantów można wymienić: demisyne, solanine oraz tomatynę, glikozydy wyizolowane z roślin z rodziny psiankowatych. Stosunkowo uniwersalnym antyfidantem jest acetoanilid dimetylotriazenu, chroniący między innymi kapustę przed gąsienicami bielinka rzepnika (*Pieris rapae*).

Związki pochodzenia naturalnego, zwalczające insekty, są określane mianem bioinsektycydów. Owadobójcze działanie mogą wywoływać pojedyncze związki zawarte w roślinach, jednak najczęściej są to kompozycje związków, takich jak: alkaloidy, niebiałkowe aminokwasy, steroidy, fenole, flawonoidy, glikozydy, chinony, terpenoidy i garbniki. Zazwyczaj działanie bioinsektycydów jest wolniejsze niż syntetycznych pestycydów, a cena znacznie wyższa. Ponadto niektóre z nich mogą wywoływać reakcje alergiczne lub toksyczne u zwierząt i ludzi [15].

Odmiennym sposobem biologicznej ochrony roślin jest zastosowanie insektycydów pochodzenia drobnoustrojowego. W Hiszpanii używa się preparatu sporządzonego z grzyba *Paecilomyces fumosoroseus* do zwalczania jaj, larw i dorosłych mączników, występujących np. na pomidorach w szklarniach. W ochronie roślin wykorzystuje się także Gram-dodatnią bakterię *Bacillus thuringiensis*, powszechnie występującą w glebie. Jest ona uważana za

bezpieczną dla ludzi, zwierząt i mikroorganizmów niespecyficznych. Dzięki wąskiemu spektrum działania *Bacillus thuringiensis* nie zagraża pożytecznym drobnoustrojom, a czasem nawet wspomaga ich działanie. Wykorzystywana jest do zwalczania głównie szkodników żywiących się liśćmi, m.in. nicieni, bakterii *Helicoverpa zea*. Niektóre szczepy (*Bt. israelensis*) działają też przeciwko komarom i meszkom [16, 17]. Bakteria *Bacillus thuringiensis* syntetyzuje białko, tzw. toksynę krystaliczną Bt, która w środowisku zasadowym przewodu pokarmowego owada łączy się ze specyficznymi receptorami i powoduje powstawanie porów w błonie, co prowadzi do śmierci szkodnika [18]. Bardzo skuteczny insektycyd uzyskano z toksyn bakterii *Photobacterium luminescens*, o działaniu podobnym jak preparaty na bazie Bt. Mogą być one stosowane wymiennie w celu uniknięcia tworzenia się odpornych odmian szkodników.

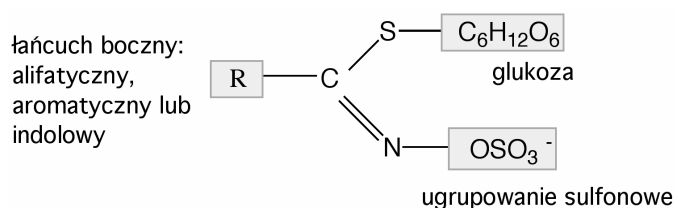
Preparaty zawierające komórki *Bacillus thuringiensis* mogą być stosowane w formie płynnej lub jako granulaty. Niestety ich działanie jest krótkotrwałe, po aplikacji bakterie utrzymują się tylko około tygodnia na powierzchni roślin. Ponadto, aby bakterie *Bacillus thuringiensis* mogły działać efektywnie, ich komórki muszą zostać zjedzone przez szkodniki, a to ogranicza zakres działania tylko do tych szkodników, które żywią się liśćmi [19]. Problemy te udało się rozwiązać, wprowadzając do roślin bakteryjne geny odpowiedzialne za syntezę toksyny Bt. Zastosowanie genetycznej modyfikacji roślin umożliwia powstawanie białek szkodliwych dla pasożytów wewnątrz rośliny. Dotychczas odkryto ponad 100 genów kodujących toksyczne białka, co pozwala na specyficzne wykorzystywanie ich w zwalczaniu tylko konkretnych gatunków szkodników. Jednak genetycznie modyfikowane rośliny wywołują wiele kontrowersji dotyczących bezpieczeństwa ich stosowania.

Takich zastrzeżeń nie budzi wykorzystanie roślin z rodziny *Brassicaceae* jako naturalnych biofumigantów. Nie ma tu ryzyka wprowadzenia obcych genów do środowiska i powstawania niekontrolowanych mutacji, a to właśnie jest źródłem obaw związanych ze stosowaniem organizmów modyfikowanych genetycznie. Uprawianie kapusty naprzemiennie z innymi warzywami było już dawniej stosowane w celu poprawy jakości gleby i zwiększenia wydajności zbiorów. Aspekty ekologiczne i bezpieczeństwo stosowania powodują, że biofumigacja ma szansę stać się technologią preferowaną w zrównoważonym rolnictwie.

Aby w pełni zrozumieć zjawisko biofumigacji, należy dokładnie poznać wszystkie czynniki biorące udział w tym procesie, m.in. glukozytolany jako związki wyjściowe, mirozynazę, dzięki której możliwa jest hydroliza i powstające substancje o właściwościach antybiologicznych.

## Glukozytolany

Glukozytolany (rys. 1) to związki organiczne zawierające grupę  $\beta$ -D-tioglukozową, sulfonowe ugrupowanie oksymowe oraz łańcuch boczny (alifatyczny, aromatyczny lub indolowy). Zaliczane są do drugorzędowych metabolitów roślin. Ich biosynteza obejmuje elongację łańcucha aminokwasowego, konwersję do tiohydrooksymu i ewentualne dalsze modyfikacje. Glukozytolany alifatyczne powstają z pochodnych metioniny, aromatyczne z pochodnych fenyloalaniny lub tyrozyny, indolowe z pochodnych tryptofanu.



Rys. 1. Ogólny wzór glukozynolanów

Fig. 1. General structure of glucosinolates

Dotychczas zidentyfikowano ok. 200 różnych glukozynolanów w wielu gatunkach roślin, głównie z rodziny *Brassicaceae*, *Capparaceae* i *Caricaceae* [20]. Związki te występują w różnych ilościach zarówno w korzeniach, liściach, pędach, jak i nasionach tych roślin. Przykładowo korzenie kapusty polnej (*B. rapa*) i rzepaku (*B. napus*) zawierają więcej i bardziej różnorodną gamę glukozynolanów niż pędy [8]. Wyniki podobnych badań potwierdzają taką zależność, wskazując na 4-5 razy większą ilość tych związków w korzeniach m.in. gorczyca (*Sinapsis alba*), kapusty czarnej (*B. nigra*) i białej (*B. rapa*) [21, 22]. Występowanie poszczególnych glukozynolanów i ich stężenie zależy także od stadium rozwoju rośliny. W nieskiełkowanych ziarnach poziom glukozynolanów waha się od 93  $\mu\text{mol/g}$  s.m. (w brokułach) do 120  $\mu\text{mol/g}$  s.m. (w czerwonej kapuście), podczas gdy 3-4-dniowe kiełki zawierają od 46  $\mu\text{mol/g}$  s.m. (biała kapusta) do 142  $\mu\text{mol/g}$  s.m. (czerwona kapusta) [23]. Dowiedziono także, że w młodych liściach rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) przeważają alifatyczne glukozynolany, które stanowią ok. 80% całkowitej ilości tych związków, jednak z upływem czasu ich liczba maleje na rzecz indolowych pochodnych. Ponadto w wewnętrznych liściach znajduje się więcej glukozynolanów niż w zewnętrznych [24]. Ilość i rodzaj tych związków zależy jednak przede wszystkim od gatunku rośliny. Najczęściej występującymi glukozynolanami w roślinach z rodziny *Brassicaceae* są synigryna, glukoiberyna, glukobrassycyna (odpowiednio w 63, 30 i 23 odmianach na 153 badanych odmian). Na podstawie wyników badań przeprowadzonych w Hiszpanii można stwierdzić, że jarmuż zawiera glukozynolany w ilości 11÷52,8  $\mu\text{mol/g}$  s.m. Są to głównie glukozynolany alifatyczne i stanowią one ponad 60% całkowitej zawartości tej grupy związków. Natomiast w kapuście białej zawartość tych związków waha się na poziomie 10,9÷27  $\mu\text{mol/g}$  s.m., a w największej ilości występuje glukobrassycyna i glukoiberyna [25, 26]. Na ilość glukozynolanów ma wpływ także pora zbioru i klimat regionu, w którym zlokalizowane są uprawy. W kapuście ogrodowej (*Brassica oleracea*) zbieranej wiosną znajduje się więcej tych związków (22  $\mu\text{mol/g}$  s.m.) niż w tej ze zbiorów jesiennych (13  $\mu\text{mol/g}$  s.m.) [25]. W czasie innych badań zawartość glukozynolanów w kapuście białej oznaczono na poziomie 3,3÷7,7  $\mu\text{mol/g}$  s.m. w większych ilościach ze zbiorów jesiennych niż wiosennych. Różnice w ilości tych substancji mogą wynikać z różnic klimatycznych regionów, na których uprawiana jest kapusta, i czasem ekspozycji słonecznej, która sprzyja syntezie większych ilości aktywnych związków w roślinie [27]. W tabeli 1 zestawiono informacje o najczęściej występujących glukozynolanach i produktach ich hydrolizy.

Oprócz warunków uprawy roślin, ważne są także sposób i warunki ich dalszej obróbki. Transport i przechowywanie roślin z rodziny kapustowatych, nawet w niskiej temperaturze, mogą prowadzić do straty znacznych ilości glukozynolanów. Stwierdzono, że w trakcie

przechowywania kapusty *Brassica oleracea* przez 7 dni w temp. 1°C (co odpowiada warunkom magazynowym), a następnie kolejne 3 dni w temp. 15°C (warunki sklepowe) ubytek glukozynolanów był rzędu 70–80% w stosunku do zawartości początkowej, zmniejszyła się również zawartość innych cennych składników odżywczych, m.in. flawonoidów [28]. Natomiast wyniki innych badań wykazały, że dwudniowe przechowywanie warzyw w temperaturze –22°C nie ma wyraźnego wpływu na ilość glukozynolanów [29]. Ich zawartość może się zmieniać także w zależności od składu atmosfery, w której przechowywane są warzywa. W przypadku brokułów zaobserwowano spadek ilości glukozynolanów o 15% w stosunku do ilości początkowej podczas przechowywania (7 dni, 10°C) w atmosferze zawierającej 20% CO<sub>2</sub>. Natomiast w powietrzu lub atmosferze zawierającej 0,5% tlenu i 20% CO<sub>2</sub> zanotowano wzrost odpowiednio o 42 i 21% w porównaniu do zawartości glukozynolanów w świeżych warzywach [30]. Informacje te mogą być ważne przy przygotowaniu roślin do zastosowania ich jako biofumigantów.

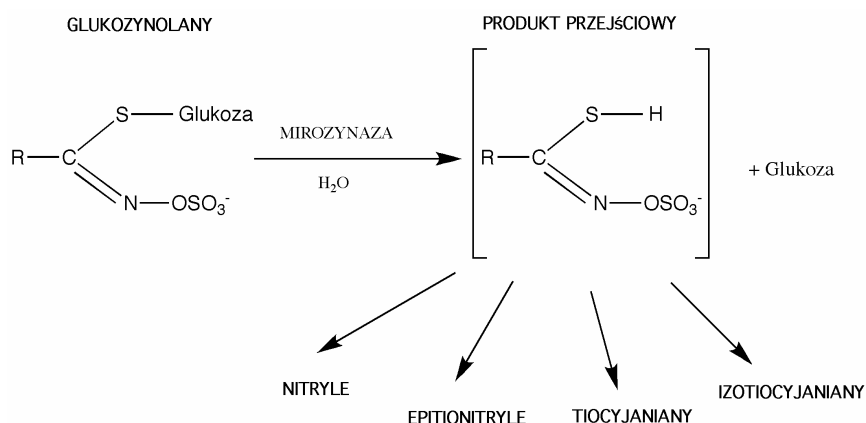
Tabela 1  
Glukozynolany i produkty ich hydrolizy najczęściej występujące w roślinach z rodziny kapustowatych

Table 1  
Glucosinolates and products of their hydrolysis frequently occurring in plants of *Brassica* family

Budowa łańcucha bocznego	Nazwa systematyczna glukozynolanu	Nazwa zwyczajowa glukozynolanu	Główne produkty degradacji
alifatyczne	3-metylosulfinylopropylo GLS	glukoiberyna	izotiocyjanian 3-metylo-sulfinylopropyłu
	2-propenylo GLS	synigryna	izotiocyjanian allilu
	4-metylosulfinylobutylo GLS	glukorafanina	izotiocyjanian 4-metylo-sulfinylobutyłu
	3-butenylo GLS	glukonapina	izotiocyjanian 3-butenyłu
	4-pentenylo GLS	glukobrassikonapina	izotiocyjanian 4-pentenyłu
	4-metylotiobutylo GLS	glukoerucyna	izotiocyjanian 4-metylotiobutyłu
indolowe	3-indolometylo GLS	glukobrassycyna	indolo-3-karbinol, askorbigen, indolo-3-acetonitryl
	1-metoksy-3-indolometylo GLS	neoglukobrasycyna	1-metoksy-3- indoilometyl
aromatyczne	2-fenyloetylo GLS	glukonasturcyna	izotiocyjanian 2-fenyloetyłu
	benzylo GLS	glukotropaeolina	izotiocyjanian benzyłu
	4-hydroksybenzylo GLS	sinalbina	izotiocyjanian p-hydroksybenzyłu

Glukozynolany nie wykazują właściwości biobójczych, dopiero w wyniku enzymatycznej hydrolizy powstają związki o takiej aktywności: tiocyjaniany, nitryle, epitionitryle i najważniejsze z nich izotiocyjaniany (rys. 2) [31, 32].

Na skuteczność działania izotiocyjanianów ma wpływ ich budowa; im większa lotność związku, tym większa aktywność antybiologiczna. Ważny jest także rodzaj zwalczanych mikroorganizmów, a nawet faza ich wzrostu [32, 33].



Rys. 2. Produkty enzymatycznej hydrolizy glukozynolanów

Fig. 2. Products of enzymatic hydrolysis of glucosinolates

Aktywność biobójcza izotiocyanianów jest porównywalna ze skutecznością syntetycznych pestycydów, takich jak bromek metylu, oraz niektórych antybiotyków (gentamycyna) [8, 34]. O antybiologicznym działaniu produktów hydrolizy glukozynolanów decyduje to, z jakiej części stosowanej rośliny pochodzą te związki. Produkty hydrolizy glukozynolanów obecnych w korzeniach mają znacznie skuteczniejsze działanie biobójcze niż związki pochodzące z pędów. Stosowanie preparatu uzyskanego z korzeni kapusty i rzepaku wywołało zahamowanie wzrostu prawie całej populacji grzybów *R. fragariae* (96% kolonii), podczas gdy preparat z pędów tych roślin spowodował śmierć tylko 16% kolonii [8]. Wykazano także, że im starsze korzenie, tym skuteczniejsze jest działanie biobójcze uwalnianych z nich izotiocyanianów. Z kolei młode liście *B. rapa* zawierają więcej glukozynolanów (75,9  $\mu\text{mol/g}$  s.m.) niż stare liście i dlatego są rzadziej atakowane przez szkodniki [35, 36]. W gorczyczniku (*Barbarea vulgaris*) najwięcej glukozynolanów znajduje się w nasionach (40–90  $\mu\text{mol/g}$  s.m., w zależności od odmiany), a najmniej w kwiatach (10  $\mu\text{mol/g}$  s.m). Wyniki badań pokazują, że w Europie dominują odmiany tej rośliny bogate w glukobarbarynę (glukozynolan 2-hydroksy-2-feniloetylu), która stanowi aż 94% całkowitej zawartości glukozynolanów. Możliwe produkty jej hydrolizy to izotiocyaniany lub mało szkodliwe tiony. Rzadziej występują odmiany zawierające dużo glukonasturcyny (82% całkowitej zawartości glukozynolanów), której produkty hydrolizy (izotiocyanian 2-feniloetylowy) są bardziej toksyczne dla szkodników [37].

Proces enzymatycznej degradacji glukozynolanów do izotiocyanianów zachodzi szybciej w obecności wody, przy podwyższonej temperaturze gleby i przy silnym uszkodzeniu komórek [33]. Z całych komórek roślinnych przechodzi do ziemi tylko 1% izotiocyanianów, które powstały z glukozynolanów zawartych w roślinie, natomiast po uszkodzeniu (zamrażanie i rozmrażanie) aż 26% izotiocyanianów [38]. Największa ich ilość jest uwalniana po 30 min od wprowadzenia utartych roślin do gleby, a obecność izotiocyanianów można wykryć nawet 12 dni później. Do izotiocyanianów zostało przekształconych odpowiednio 14 i 53% glukozynolanów z rzepaku i gorczycy w czasie 30 min. Ponadto indolowe glukozynolany, które nie są hydrolizowane do izotiocyanianów, pozostają w ziemi przez dłuższy czas [39].



Spośród produktów enzymatycznej degradacji glukozynolanów największe znaczenie w biofumigacji mają izotiocyaniany. To one wykazują najskuteczniejsze działanie biobójcze, dlatego tak ważna jest wiedza na temat warunków hydrolizy i czynników wpływających na ich powstawanie.

## Mirozynaza

Hydroliza glukozynolanów jest możliwa dzięki enzymowi o zwyczajowej nazwie mirozynaza, należącemu do  $\beta$ -tioglukozydaz (EC 3.2.3.1). Mirozynaza katalizuje hydrolizę wiązań tioglukozydowych, w wyniku czego powstaje niestabilny produkt przejściowy - tiohydroksym *o*-sulfonowy, który w zależności od środowiska reakcji może zostać przekształcony do izotiocyanianów, tiocyanianów, nitryli lub epinitryli [40].

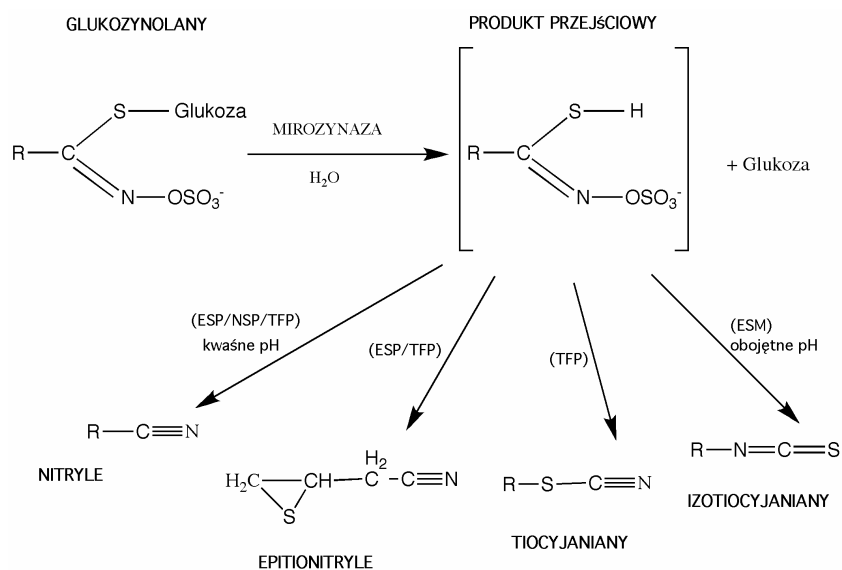
Warunki hydrolizy enzymatycznej mają wpływ na rodzaj i właściwości produktu reakcji. Przykładowo glukozynolany zawierające alifatyczny łańcuch boczny w środowisku o pH 7 po procesie hydrolizy z udziałem mirozynazy ulegają przekształceniu do odpowiednich izotiocyanianów, natomiast w kwaśnym środowisku (o pH 3÷5) lub w obecności jonów żelaza Fe(II) powstają mniej szkodliwe nitryle [31]. Na aktywność mirozynazy ma także wpływ obecność innych substancji, np. kwas askorbinowy może działać jak kofaktor, ułatwiając odszczepienie molekuly glukozy [41-44].

Kinetyka działania i aktywność mirozynazy różni się także w zależności od gatunku i części rośliny, z której enzym pochodzi. Przykładowo, w rzodkiewniku pospolitym (*A. thaliana*) znajduje się kilka rodzajów mirozynazy. Geny odpowiedzialne za syntezę tych enzymów mogą być odmiennie uruchamiane w tej samej roślinie: w korzeniu ulegają ekspresji geny *TGG4*, *TGG5*, a w części naziemnej geny *TGG1*, *TGG2* [35].

Na kierunek reakcji hydrolizy glukozynolanów wpływ mają także dodatkowe czynniki białkowe (rys. 3). Należą do nich: białko nitrylospecyficzne NSP, białko epitiospecyficzne ESP, modyfikujące białko epitiospecyficzne ESM oraz białko tworzące tiocyaniany TFP. Obecność białka epitiospecyficznego ESP sprzyja powstawaniu nitryli i epinitryli z glukozynolanów [45, 46]. W roślinach, w których powstają wyłącznie izotiocyaniany, nie zachodzi ekspresja genów odpowiedzialnych za syntezę białek ESP. Jest to cecha gatunkowa roślin, np. niektóre gatunki rzodkiewnika *Arabidopsis* (ekotyp Landsberg *erecta*) syntetyzują białko ESP, a w innych roślinach, które są zdolne do wytwarzania alkenowych glukozynolanów hydroliza biegnie raczej do nitryli jako produktów enzymatycznego rozkładu niż izotiocyanianów [31]. Natomiast epitiospecyficzne białko modyfikujące (*epithiospecifier modifier protein* - ESM), zidentyfikowane m.in. w rzodkiewniku, promuje powstawanie izotiocyanianów, a nie nitryli jak w przypadku działania ESP. Okazało się, że owad błyszczka ni (*Trichoplusia ni*) preferuje liście roślin pozbawionych ESM ze względu na mniejszą zawartość izotiocyanianów [47]. Oprócz białek ESP i ESM opisano jeszcze jedno białko, tzw. białko tworzące tiocyaniany (*thiocyanate-forming protein* - TFP), które także ma wpływ na rodzaj produktów hydrolizy glukozynolanów. Zostało ono zidentyfikowane w nasionach i kwiatach rzeżuchy (*Lepidium sativum*), a powoduje tworzenie się tiocyanianów z glukotropaeoliny oraz prostych nitryli i epinitryli z alifatycznych glukozynolanów [38, 48].

Oprócz roślinnej mirozynazy zidentyfikowano także mirozynazę pochodzącą z drobnoustrojów obecnych w glebie oraz bakterii zasiedlających przewód pokarmowy

ludzi i zwierząt. Wyniki badań dowiodły, że zachodzi proces degradacji syningryny do izotiocyanianu allilu przez mikroflorę jelitową człowieka [41, 49].



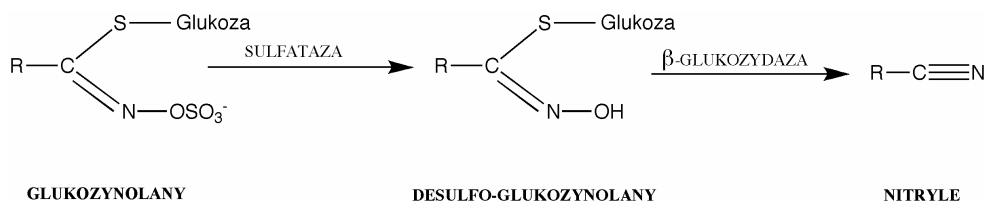
Rys. 3. Schemat przebiegu reakcji hydrolizy glukozynolanów w zależności od obecności czynników białkowych [ESP - białko epitiospecyficzne, NSP - białko nitylospecyficzne, TFP - białko tworzące tiocyjaniany, ESM - epitiospecyficzne białko modyfikujące]

Fig. 3. The routes of hydrolysis of glucosinolates depending on the presence of specific protein factors [ESP - epithiospecifier protein, NSP - nitrile-specifying protein, TFP - thiocyanate-forming protein, ESM - epithiospecifiermodifier protein]

Bakterie *Pseudomonas boreopolis* także mają zdolność degradacji syningryny i glukonapiny do odpowiednich izotiocyanianów. Związki te działają toksycznie na grzyby *Rhizoctonia solani* i *Sclerotium rolfsii*, patogeny warzyw i owoców, co być może będzie można wykorzystać w ochronie upraw [50]. Szczególnie ważna z punktu widzenia biofumigacji jest aktywność mirozynazy drobnoustrojów zasiedlających glebę. Wyniki badań próbek gleby na zawartość glukonasturcyny mogą być podstawą do stwierdzenia, że mikroorganizmy, dla których ziemia jest naturalnym środowiskiem bytowania, mają zdolność do rozkładu glukozynolanów. Po 44 godzinach w niesterylizowanej próbce gleby stwierdzono obecność tylko śladowych ilości glukonasturcyny, natomiast w sterylnej ziemi taki efekt osiągnięto po 91 godzinach [51]. Potwierdzają to wyniki innych badań, w trakcie których także oznaczono większe stężenie glukozynolanów w sterylnej glebie niż w glebie z naturalną mikroflorą [52]. Kolejne wyniki badań dowodzą zwiększonej aktywności enzymatycznej mirozynazy w glebie, na której uprawiane były rośliny z rodziny kapustowatych, syntetyzujące ten enzym. Wynika z tego, że obecność glukozynolanów, pochodzących z uprawianych warzyw, może stymulować produkcję enzymu przez mikroorganizmy glebowe [33, 53].

Jednak z drugiej strony pewna aktywność enzymatyczna wynikająca z obecności drobnoustrojów może przyczyniać się do obniżenia skuteczności stosowania

biofumigantów. Grzyb *Aspergillus niger* obecny w glebie syntetyzuje enzym sulfatazę (EC 3.1.5.6), który hydrolizuje glukozynolany do desulfoglukozynolanów. Są one następnie przekształcane przez  $\beta$ -glukozydazę (EC 3.2.1.21) także syntetyzowaną przez *A. niger* do nityli, które wykazują mniejsze właściwości biobójcze (rys. 4) [54].



Rys. 4. Schemat przebiegu reakcji rozkładu glukozynolanów do nityli przez grzyby *A. niger*

Fig. 4. The reaction of glucosinolate decomposition to nitriles induced by fungi *Aspergillus niger*

Mirozynazę zidentyfikowano także w tkankach szkodników, m.in. w mszycy kapuściance (*Brevicoryne brassica*) i kapustnicy wielożernej (*Lipaphis erisimi*) [20]. Owady te potrafią wykorzystywać glukozynolany zawarte w roślinach, na których żerują, do obrony przed atakami innych szkodników. Mirozynaza obecna w ich organizmach bierze udział w hydrolizie glukozynolanów, a uwalniane izotiocyjaniiny działają synergicznie z E- $\beta$ -farnezenem, feromonem, który sygnalizuje innym mszycom nadchodzące niebezpieczeństwo [55].

Dzięki naturalnej zawartości glukozynolanów i mirozynazy rośliny z rodziny kapustowatych są w stanie skutecznie bronić się przed atakami grzybów, bakterii oraz większością roślinożerców, a mechanizm ten można też wykorzystać w ochronie innych roślin.

### Aktywność roślin z rodziny kapustowatych jako biofumigantów

Jak wspomniano, właściwości biobójcze wykazują produkty hydrolizy glukozynolanów, a spośród nich największe znaczenie mają izotiocyjaniiny. Ich szeroki zakres aktywności antybiologicznej obejmuje zarówno bakterie, grzyby, jak i owady. Dane literaturowe wskazują na zróżnicowany wpływ tych związków na drobnoustroje. Na przykład, ekstrakt z mielonych nasion rzepaku (*B. napus*) wykazuje działanie hamujące wzrost grzybów *Aphanomyces euteiches*, ale i lekko stymulujące wzrost bakterii propionowych [56, 57].

Toksyczne działanie izotiocyjaniinów w stosunku do patogenów korzysta z dwóch głównych mechanizmów: hamowania syntezy ATP lub inaktywacji enzymów wewnątrzkomórkowych. U podłoża tych zjawisk leży zdolność izotiocyjaniinów do rozrywania mostków disiarczkowych oraz wchodzenia w reakcje z grupami  $\text{NH}_2$ , występującymi w strukturze białek [34].

### Aktywność bakteriobójcza

Wyniki badań wskazują, że izotiocyjaniiny działają przeciwko takim Gram-ujemnym bakteriom, jak: *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas tomato*, *Xanthomonas campestris*, *X. juglandis*. Bakterie te powodują



żółknięcie lub ciemnienie liści, zaburzenia rozprzeczania składników odżywczych w roślinie, gnicie owoców, łodyg i korzeni. W efekcie prowadzi to do śmierci roślin i wpływa na obniżenie wydajności upraw. Co więcej, atakowane są wewnętrzne części roślin, co utrudnia stosowanie tradycyjnych środków ochrony. Najskuteczniejsze w hamowaniu wzrostu wymienionych patogenów okazały się izotiocyjaniiny powstające w wyniku hydrolizy glukonasturcyny oraz glukorafaniny. Generalnie, izotiocyjaniiny otrzymane z aromatycznych glukozynolanów wykazują silniejsze właściwości bakteriobójcze niż produkty hydrolizy alifatycznych glukozynolanów [34]. Wśród tych ostatnich znaczące właściwości antybakteryjne ma izotiocyjaniin allilu, produkt rozpadu rozpowszechnionej w roślinach z rodziny kapustowatych synigriny, który stanowi aż 90% wszystkich lotnych związków obecnych w świeżym chrzanie. Ma on zdolność niszczenia komórek patogenów w każdym stadium rozwoju. Badane bakterie Gram-ujemne, *Salmonella* oraz *E. coli* były bardziej wrażliwe niż Gram-dodatnie pałeczki *Listeria monocytogenes*, natomiast bakterie fermentacji mlekowej (*Lactobacillus sake*) okazały się być odporne na jego działanie. Izotiocyjaniin allilu wykazuje skuteczne działanie zarówno w stanie gazowym, jak i ciekłym, co daje możliwość jego wykorzystania również w technologii utrwalania produktów spożywczych [34, 58, 59].

### Aktywność grzybobójcza

Niektóre gatunki grzybów powodują choroby roślin, przez co są przyczyną dużych strat w rolnictwie i przechowalnictwie płodów rolnych. Izotiocyjaniiny w różnym stopniu hamują rozwój grzybów, co dokumentują dane zawarte w tabeli 2.

Tabela 2

Zakres toksycznego działania produktów hydrolizy glukozynolanów na różne gatunki grzybów

Table 2

Spectrum of toxicity of glucosinolates hydrolysis products towards various species of fungi

Roślina wykorzystana w badaniach	Glukozynolany, których produkty hydrolizy są toksyczne	Badane grzyby	Literatura
gorczyca czarna ( <i>Brassica nigra</i> ), kapusta sitowata ( <i>Brassica juncea</i> )	synigrina	<i>Fusarium sambucinum</i>	[60]
ubiorek gorzki ( <i>Iberis amara</i> ), rokieta siewna ( <i>Eruca sativa</i> )	glukoiberyna, glukoerucyna	<i>Fusarium culmorum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Diaporthe phaseolorum</i> <i>Pythium irregulare</i>	[61]
rokieta siewna ( <i>Eruca sativa</i> ), kapusta sitowata ( <i>Brassica juncea</i> ), ubiorek gorzki ( <i>Iberis amara</i> )	glukoerucyna, synigrina, glukoiberyna	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Pythium irregulare</i>	[62]
gorczyca etiopska ( <i>Brassica carinata</i> ), kapusta sitowata ( <i>Brassica juncea</i> ), gorczyca czarna ( <i>Brassica nigra</i> )	glukotropaeolina	<i>Fusarium oxysporium</i>	[63]
kapusta sitowata ( <i>Brassica juncea</i> )	synigrina	<i>Pythium irregulare</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	[64]
gorczyca biała ( <i>Brassica mirra</i> )	glukotropaeolina	<i>Meloidogyne javanica</i> <i>Tylenchulus semipenetrans</i>	[65]
gorczyca etiopska ( <i>Brassica carinata</i> )	synigrina	<i>Sclerotinia minot</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	[66]

kapusta rzepek ( <i>Brassica napus</i> )	glukonasturcyna	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Phytophthora erythroseptica</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Fusarium sambucinum</i>	[67]
rokieta siewna ( <i>Eruca sativa</i> )	glukoerucyna	<i>Monilinia laxa</i>	[68]
kapusta polna ( <i>Brassica rapa</i> ) kapusta rzepek ( <i>Brassica napus</i> )	glukonapina, glukonasturcyna	<i>Rhizoctonia fragariae</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Fusarium oxysporium</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Phytophthora cactorum</i>	[8]

Ważną obserwacją jest to, że gatunek pożytecznego grzyba obecnego w glebie, *Trichoderma*, jest mniej wrażliwy na działanie izotiocyanianów niż patogeny, np. *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* czy *Fusarium oxysporium*. Stąd też propozycja, żeby połączyć grzybobójcze działanie izotiocyanianów z wypieraniem patogennych grzybów przez pożyteczne gatunki mikroorganizmów. Jednak analiza wyników, które uzyskano w efekcie przeprowadzenia doświadczenia polegającego na wspólnym stosowaniu mączki z gorczycy *Brassica carinata* i grzybów *Trichoderma* do ochrony uprawy buraka cukrowego, świadczy, że nie nastąpiła redukcja populacji badanego patogena *P. ultimum*, chociaż znacznie zmniejszyła się liczba zaatakowanych przez niego buraków. Wydaje się więc, że połączenie działania izotiocyanianów oraz kolonizacji uprawianych roślin przez grzyby *Trichoderma* może dać dobre efekty, ale możliwość wykorzystania takiego podejścia w praktyce rolniczej i ogrodniczej wymaga dalszych badań [69].

#### Zwalczanie roślinożerców

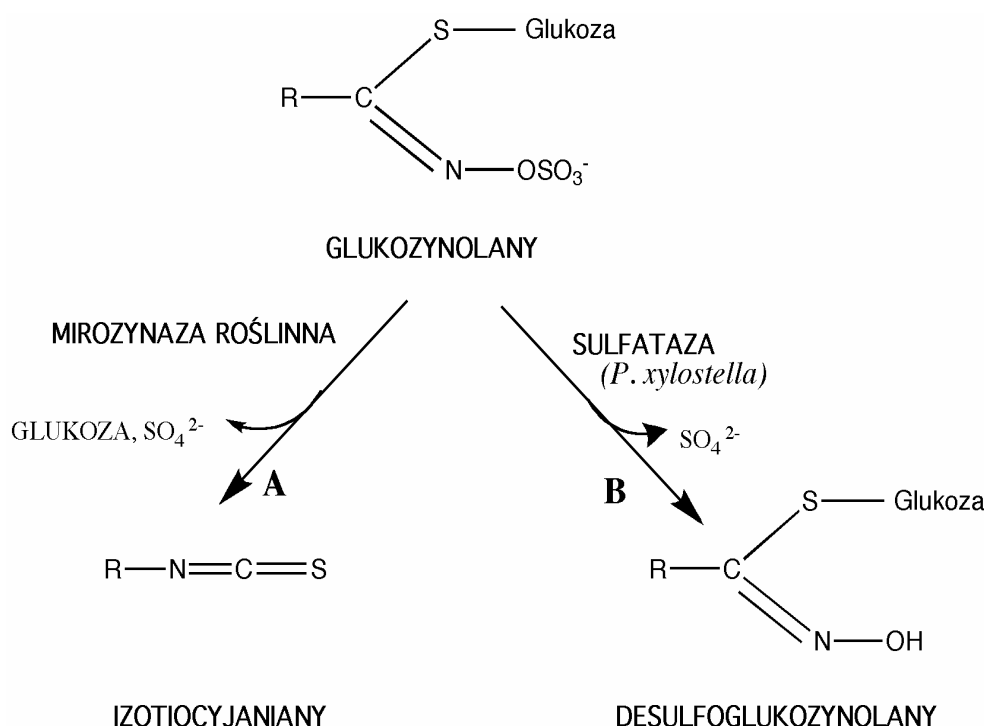
Szkodniki, takie jak nicienie, stonki czy wołki, są pasożytami roślin o znaczeniu gospodarczym, w uprawie których mogą powodować olbrzymie straty. Zwalczanie szkodników za pomocą biofumigacji daje możliwość ograniczenia tych strat, a ponadto chroni konsumentów przed szkodliwym działaniem syntetycznych pestycydów, co jest szczególnie ważne w przypadku roślin jadalnych.

Nicienie *Meloidogyne incognita* są przyczyną sękowacenia korzenia roślin uprawianych w szklarniach, głównie pomidorów i ogórków. Izotiocyaniany, zwłaszcza produkty hydrolizy synigryny, glukoerucyny i glukotropaeoliny, zastosowane w stężeniu 11÷35  $\mu\text{M}$ , skutecznie hamują rozwój tych szkodników [70]. Zbadano także wpływ omawianych związków na nicienie *Heterodera schachtii*. Glukozytolany: sinalbina, synigryna i glukotropaeolina nie wykazały żadnego efektu letalnego wobec badanych roślinożerców nawet po 96 godzinach ekspozycji. Jednak izotiocyaniany otrzymane w trakcie hydrolizy tych samych związków spowodowały śmierć prawie wszystkich nicieni już po 24-48 godzinach, nawet dla małych stężeń (0,05÷0,5% w/v) [7]. Dowiedziono także, że aromatyczne izotiocyaniany są najbardziej toksyczne dla jajeczek chrząszcza opuchłaka truskawkowca (*Vine weevil*), natomiast metylowe izotiocyaniany w stosunku do larw wołka.

Wyniki wieloletnich badań wykazały, że uprawa truskawek na jednym polu przez 10 lat powoduje zahamowanie ich wzrostu i rozwoju. Uprawiane w ten sposób truskawki wydają o 50% mniej owoców w porównaniu z truskawką uprawianą przez dwa lata na danym polu. Najczęściej do obniżenia wzrostu i plonowania truskawki dochodzi w 4-6 roku uprawy

[71]. Jednak wyniki niedawnych badań pokazały, że naprzemienna uprawa truskawek, brokułów i kapusty warzywnej (*Brassica oleracea*) zwiększyła plon truskawek o 18÷44% w porównaniu ze zwykłą pojedynczą uprawą. Mieszana uprawa nie wpłynęła natomiast na zmniejszenie zachorowalności owoców na wercycilozę, wywołaną przez grzyby *Verticillium dahliae* [8].

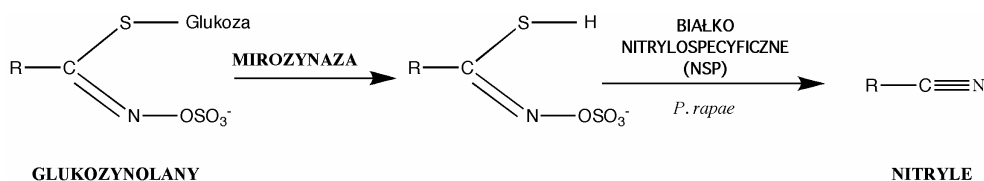
Wyniki licznych badań pokazują, że owady mogą wytworzyć system neutralizowania szkodliwego wpływu izotiocyanianów. Oprócz opisanych wcześniej mszyc *Brevicoryne brassicae* i *Lipaphis erysimi*, należy wspomnieć o motyłu tantnisiu krzyżowiaczku (*Plutella xylostella*), żywiącym się roślinami z rodziny kapustowatych, który usuwa ugrupowanie siarkowe z glukozynolanów za pomocą sulfatazy, przez co przestają być one substratem dla mirozynazy (rys. 5) [72].



Rys. 5. Schematyczne przedstawienie sposobu działania roślinnej mirozynazy (A) oraz sulfatazy pochodzenia mikrobiologicznego (B) na glukozynolany

Fig. 5. Scheme of enzymatic activity of plant mirosinase (A) and microbial sulfatase (B) towards glucosinolates

Z kolei larwy bielinka (*Pieris sp.*), które żywią się wyłącznie roślinami z rodziny kapustowatych, wytworzyły inny mechanizm obronny. Produkują one nitrylospecyficzne białka NSP, przez co glukozynolany są hydrolizowane przez mirozynazę do nitryli, a nie do toksycznych izotiocyanianów (rys. 6) [73-75].



Rys. 6. Schemat reakcji rozkładu glukozynolanów do nityli przez larwy bielinka *Pieris rapae*

Fig. 6. Reaction of glucosinolate degradation to nitriles by *Pieris rapae* caterpillars

Larwy gnatarza rzepakowca (*Athalia rosae*) w celach obronnych w tylnej części tułowia kumulują wybrane glukozynolany ze spożywanej rośliny, głównie sinalbinę i synigrinę. Szkodniki te nie wykazują aktywności związanej z mirozynazą, desulfatazą ani nie mają białek nitylospecyficznych. Glukozynolany są wydalane, a ewentualne produkty ich przemian nie są obecne w organizmie [76, 77].

Niektóre glukozynolany i produkty ich rozkładu mogą działać jak atraktanty podczas wyboru miejsca składania jaj przez owady. W przypadku samic *Piersi rapae* indolowe i aromatyczne glukozynolany stymulują wybór tego miejsca bardziej niż związki alifatyczne. Natomiast genetycznie modyfikowane odmiany rzodkiewnika (*A. thaliana*) cyp79B2 i cyp79B3, które nie są zdolne do syntezy indolowych glukozynolanów, są o wiele mniej atrakcyjne pod tym względem dla *P. rapae* niż tradycyjne odmiany tej rośliny [78].

Izotiocyjaniany uwalniane z glukozynolanów zawartych w roślinach z rodziny kapustowatych są toksyczne dla szkodników, ale mogą też hamować rozwój pożytecznej mikroflory glebowej. W badaniach przydatności nawozów z kapusty i gorczycy w eliminowaniu stonki *Leptinotarsa decemlineata*, pasożyta ziemniaków, okazało się, że zmniejszyła się również populacja nicieni *Steinernema feltiae* i *Steinernema riobrave*, naturalnych wrogów stonki. Niezbędne jest, jak widać, dokładne zbadanie działania biofumigantów na organizmy zarówno te szkodliwe, jak i pożyteczne oraz możliwości łączenia różnych metod ochrony roślin [79-81].

## Problemy związane z wykorzystaniem biofumigacji w rolnictwie

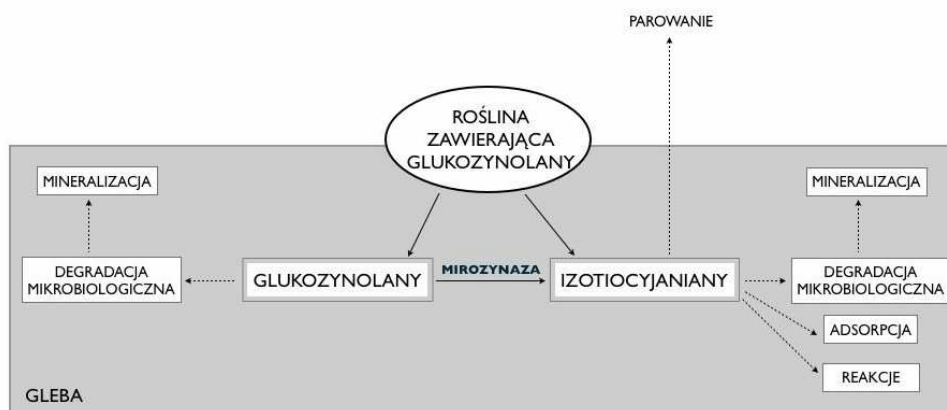
Naturalne właściwości biobójcze roślin z rodziny kapustowatych mogą być potencjalnie wykorzystane w ochronie upraw na większą skalę, dlatego w wielu ośrodkach naukowych prowadzone są szeroko zakrojone badania nad biofumigacją. Proponowane jest stosowanie preparatów otrzymanych z wybranych roślin przez ich wysuszenie i sproszkowanie. W jednym z doświadczeń wykorzystano odtłuszczoną mączkę z gorczycy etiopskiej (*B. carinata*), zawierającą glukozynolany, głównie synigrinę (98%), oraz odpowiednią ilość mirozynazy. Mączkę ręcznie rozprowadzono po polu, a następnie zwilżono na 6 dni przed zasadzeniem cukini. Efektem działania tego preparatu była poprawa jakości badanej gleby i zwiększenie plonu cukini o 14% w porównaniu z plonem uzyskanym z uprawy, w której wykorzystano syntetyczny preparat ochronny. Dodatkowo uzyskano wyraźne zahamowanie rozwoju szkodników *Meloidogyne incognita* [6]. Innym sposobem wprowadzenia glukozynolanów do gleby jest zasadzenie rośliny z rodziny *Brassicaceae* na chronionym polu przed uprawą właściwych warzyw.

Ze względu na duże spożycie ziemniaków na świecie ochrona upraw tej rośliny jest szczególnie ważna. Obserwacje doświadczalnej uprawy ziemniaków w stanie Maine (USA)

mogą być podstawą do stwierdzenia, że przed chorobami bulwy najlepiej chroniła gorczyca, a przed atakiem grzybów *Rhizpous* - rzepak. Rośliny te zasadzono w lipcu i po miesiącu zaorano jako nawóz naturalny, a wiosną następnego roku na tym samym polu posadzono ziemniaki i zbadano ochronny wpływ poprzedniej uprawy roślin z rodziny kapustowatych na jakość plonu [67]. Natomiast wyniki innych badań nad ochroną ziemniaków przed mątwikami *Globodera rostochiensis* za pomocą ekstraktów z roślin *Brassicaceae* pokazują, że najskuteczniejsze w hamowaniu rozwoju tych nicieni są rzeżucha, kalafior i kapusta (*B. rapa*) [34].

Wyniki licznych badań dowiodły zależności pomiędzy ilością glukozynolanów w roślinach od warunków prowadzenia uprawy. Jest to wiedza, którą można wykorzystać w kontrolowanym zwiększaniu zawartości tych związków w roślinach stosowanych w biofumigacji. Ważnym czynnikiem decydującym o zawartości glukozynolanów w roślinie jest żyzność gleby. Przykładowo, zawartość siarki i azotu ma wpływ na ilość glukozynolanów w nasionach rzepaku [72]. Mała zawartość wody w glebie zwiększa ilość glukozynolanów w rzepaku i jego nasionach oraz prawdopodobnie w większości roślin krzyżowych. Ograniczenie ilości wody, zwłaszcza we wczesnym stadium rozwoju rośliny (36-62 dni po wysianiu), może doprowadzić do wzrostu zawartości glukozynolanów nawet o ponad 40% w porównaniu z roślinami z uprawy kontrolnej bez ograniczenia wody [34]. Wyniki badań opisanych w literaturze mogą być również podstawą do wniosku, że temperatura uprawy roślin ma wpływ na zawartość glukozynolanów - rośliny rosnące w podwyższonej temperaturze (30°C w dzień i 15°C w nocy) zawierają więcej glukozynolanów niż te, uprawiane przy niższych temperaturach (22°C/15°C oraz 18°C/12°C) [82].

Można by przypuszczać, że glukozynolany i produkty ich hydrolizy, jako naturalne związki, będą szybciej ulegały procesowi degradacji niż syntetyczne środki ochrony roślin. Przeczą temu wyniki badań, które pokazują na przykładzie tropaeoliny i izotiocyjanianu benzylu, że połowa wprowadzonej ilości tych związków jest nadal obecna w glebie po 60 dniach [83]. Jednak inne badania przeprowadzone w podobnych warunkach wskazują na całkowitą degradację tych samych związków w ciągu 15 dni [84].



Rys. 7. Schemat przedstawiający los glukozynolanów i izotiocyjanianów w glebie

Fig. 7. The fate of glucosinolates and isothiocyanates in soil



Wpływ rodzaju gleby na efektywność biofumigacji można rozpatrywać w kilku aspektach. Los badanych związków w ziemi przedstawiono na rysunku 7. Rozkład glukozynolanów następuje szybciej w gliniastych niż w piaszczystych glebach, zależy także od ilości i rodzaju mikroflory występującej na danym terenie, temperatury i wilgotności. Glukozynolany są słabo adsorbowane w ziemi, co pozwala na ich migrację w glebie i skuteczniejsze działanie, ale powoduje także ryzyko przedostania się do wód gruntowych. Natomiast duża zawartość materii organicznej powoduje adsorpcję izotiocyjanianów, przez co obniża skuteczność ich działania. Wilgotność ziemi także jest ważnym czynnikiem w degradacji glukozynolanów. Mniejsza zawartość wody w glebie powoduje wydłużenie czasu hydrolizy tych związków, co znacznie opóźnia antybiologiczne działanie biofumigantów [33, 39, 85, 86].

Kluczową rolę w procesie biofumigacji odgrywają izotiocyjaniany, jako produkty hydrolizy glukozynolanów, dlatego ważna jest ilość mirozynyzy, która umożliwia otrzymanie tych bioaktywnych związków. Enzym ten może pochodzić bezpośrednio z użytych roślin lub z dodatkowego źródła w postaci gotowego preparatu. Należy także uwzględnić aktywność mirozynyzy pochodzącej z glebowej mikroflory, która przyczynia się do hydrolizy glukozynolanów.

Skuteczność biofumigacji zależy także od interakcji produktów hydrolizy glukozynolanów w środowisku. Gdy uprawa na danym polu była wcześniej chroniona za pomocą soli sodowej kwasu ditiokarb-*N*-metyloaminowego, mikroorganizmy glebowe brały udział w procesie degradacji glukozynolanów i izotiocyjanianów pochodzących z roślin krzyżowych zbyt szybko, aby mogły one skutecznie chronić rośliny. Przykładowo, izotiocyjanian allilu uległ degradacji w ciągu 11 dni w glebie, w której nie było pestycydu, natomiast w glebie traktowanej pestycydem - w ciągu 21 godzin, co spowodowało mniejszą śmiertelność szkodników. Ważna jest więc wiedza na temat rodzaju i właściwości wcześniej wykorzystywanych pestycydów oraz opracowanie alternatywnych sposobów ochrony roślin, np. płodozmianu i biofumigacji [52].

## Podsumowanie

Glukozynolany stanowią liczną grupę bioaktywnych związków o różnorodnych właściwościach wynikających z ich zdolności do wiązania się z molekułami i makromolekułami o znaczeniu biologicznym. Stanowią one naturalną ochronę roślin przed szkodliwymi drobnoustrojami i roślinożercami. Możliwość biodegradacji i brak toksyczności dla ludzi pozwala na wykorzystanie glukozynolanów jako biofumigantów w zwalczaniu szkodników w rolnictwie, szczególnie upraw roślin jadalnych. Aby zapewnić w pełni bezpieczne i efektywne stosowanie glukozynolanów i produktów ich hydrolizy jako biofumigantów, należy dokładnie poznać mechanizmy ich działania oraz interakcje, które wywołują w środowisku. Wyniki dotychczas prowadzonych badań ukazują złożoność tych procesów, ale jednocześnie wyniki doświadczeń zachęcają do kontynuowania prac w kierunku upowszechnienia stosowania biofumigacji w ochronie upraw roślinnych.

Badania nad wykorzystaniem kapusty w ochronie upraw są również prowadzone w ramach projektu AGROBIOKAP, w którym udział biorą: Politechnika Gdańska, Instytut Chemii Przemysłowej w Warszawie oraz Uniwersytet Rolniczy w Krakowie. Celem projektu jest opracowanie technologii wykorzystania kapusty białej w procesach biofumigacji oraz fitoremediacji prowadzonych na terenach zdegradowanych. Badania są



skoncentrowane na określeniu przydatności kapusty jako surowca do produkcji biopreparatu, który mógłby służyć do biofumigacji gleby oraz na opracowaniu wydajnej i przyjaznej środowisku technologii jego uzyskiwania na skalę przemysłową z uwzględnieniem maksymalnego zagospodarowania biomasy ze zbiorów kapusty. Opracowanie i wdrożenie prostej, niskoenergetycznej i niemalże bezodpadowej, a także taniej technologii oczyszczania gleb dodatkowo przyczyni się do stymulacji rozwoju rolnictwa ekologicznego. Zastosowanie w praktyce wyników badań realizowanych w ramach projektu przyczyni się do rozwiązywania najbardziej aktualnych problemów społecznych, do których należy spadek zdrowotności społeczeństwa, związany z postępującym zanieczyszczeniem środowiska i pogorszeniem jakości żywności.

## Podziękowania

Projekt „Wykorzystanie kapusty białej na potrzeby fitoremediacji i biofumigacji gleby (AGROBIOKAP)” jest współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013 (Poddziałanie 1.3.1).

## Literatura

- [1] Rocznik statystyczny RP 2008.
- [2] Biziuk M.: Pesticyny - występowanie, oznaczanie i unieszkodliwianie. WNT, Warszawa 2001.
- [3] Protokół Montrealski, 1987.
- [4] Seńczuk W.: Toksykologia współczesna. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 2005.
- [5] Manahan S.: Toksykologia środowiska - aspekty chemiczne i biochemiczne. WN PWN, Warszawa 2006.
- [6] Lazzeri L., Curto G., Dallavalle E., D'Avino L., Malaguti I., Santi R. i Patalano G.: *Nematicidal efficacy of biofumigation by defatted Brassicaceae meal for control of Meloidogyne incognita (Kofoid et White) Chitw. on a full field zucchini crop*. J. Sustain. Agr., 2009, **33**, 349-358.
- [7] Lazzeri L., Taccioni R. i Palmieri S.: *In vitro activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode Heterodera schachtii*. J. Agr. Food Chem., 1993, **41**, 825-829.
- [8] Mattner S., Porter L., Gounder R., Shanks A., Wren D. i Allen D.: *Factors that impact on the ability of biofumigants to suppress fungal pathogens and weeds of strawberry*. Crop Protect., 2008, **27**, 1165-1173.
- [9] Mercier J. i Smilanick J.: *Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with Muscodor albus*. Biol. Control, 2005, **32**, 401-407.
- [10] Mercier J. i Jiménez J.: *Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus Muscodor albus*. Postharvest Biol. Tec., 2004, **31**, 1-8.
- [11] Schotsmans W., Braun G., DeLong J. i Prange R.: *Temperature and controlled atmosphere effects on efficacy of Muscodor albus as a biofumigant*. Biol. Control, 2008, **44**, 101-110.
- [12] Lacey L., Horton D. i Jones D.: *The effect of temperature and duration of exposure of potato tuber moth (Lepidoptera: Gelechiidae) in infested tubers to the biofumigant fungus Muscodor albus*. J. Invertebr. Pathol., 2008, **97**, 159-164.
- [13] Buena A., García-Álvarez A., Díez-Rojo M., Ros C., Fernández P., Lacasa A. i Bello A.: *Use of pepper crop residues for the control of root-knot nematodes*. Bioresource Technol., 2007, **98**, 2846-2851.
- [14] Łapiński A. i Dubis A.: *Zastosowanie zaawansowanych metod spektralnych w badaniach antyfidantu - peraminy, jako alternatywnego środka ochrony roślin*. Post. Ochr. Rośl., 2008, **48**(2), 730-733.
- [15] Boczek J.: *Rośliny i mikroorganizmy źródłem insektycydów*. Post. Nauk Roln., 2008, **4-5**, 3-14.
- [16] Hossain M., Ahmed S. i Hoque S.: *Abundance and distribution of Bacillus thuringiensis in the agricultural soil of Bangladesh*. J. Invertebr. Pathol., 1997, **70**, 221-225.
- [17] Takatsuka J. i Kunimi Y.: *Intestinal bacteria affect growth of Bacillus thuringiensis in larvae of the Oriental Tea Tortrix, Homona magnanima Diakonoff (Lepidoptera: Tortricidae)*. J. Invertebr. Pathol., 2000, **76**, 222-229.
- [18] Kwa M., de Maagd R., Stiekema W., Vlaskin J. i Bosch D.: *Toxicity and binding properties of the Bacillus thuringiensis delta-endotoxin cry1C to cultured insect cells*. J. Invertebr. Pathol., 1998, **71**, 121-127.

- [19] Gough J., Akhurst R., Ellar D., Kemp D. i Wijffels G.: *New isolates of Bacillus thuringiensis for control of livestock ectoparasites*. Biol. Control, 2002, **23**, 179-189.
- [20] Fahey J., Zalcmann A. i Talalay P.: *The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants*. Phytochemistry, 2001, **56**, 5-51.
- [21] Kirkegaard J. i Sarwar M.: *Biofumigation potential of brassicas*. Plant & Soil, 1998, **201**, 71-89.
- [22] van Dam N., Tytgat T. i Kirkegaard J.: *Root and shoot glucosinolates: a comparison of their diversity, function and interactions in natural and managed ecosystems*. Phytochem. Rev., 2009, **8**, 171-186.
- [23] Bellostas N., Kachlicki P., Sørensen J. i Sørensen H.: *Glucosinolate profiling of seeds and sprouts of B. oleracea varieties used for food*. Hortic. Sci., 2007, **114**, 234-242.
- [24] Brown P., Tokuhisa J., Reichelt M. i Gershenzon J.: *Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry, 2003, **62**, 471-481.
- [25] Cartea M., Velasco P., Obregon S., Padilla G. i de Haro A.: *Seasonal variation in glucosinolate content in Brassica oleracea crops grown in northwestern Spain*. Phytochemistry, 2008, **69**, 403-410.
- [26] Meyer M. i Sieghard T.: *Comparison of glucosinolate levels in commercial broccoli and red cabbage from conventional and ecological farming*. Eur. Food Res. Technol., 2008, **226**, 1429-1437.
- [27] Kusznierewicz B., Bartoszek A., Wolska L., Drzewiecki J., Gorinstein S. i Namieśnik J.: *Partial characterization of white cabbages (Brassica oleracea var. capitata f. alba) from different regions by glucosinolates, bioactive compounds, total antioxidant activities and proteins*, LWT (Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie) - Food Sci. Technol., 2008, **41**, 1-9.
- [28] Vallejo F., Tomás-Barberán F. i García-Viguera C.: *Health-promoting compounds in broccoli as influenced by refrigerated transport and retail sale period*. J. Agric. Food Chem., 2003, **51**(10), 3029-3034.
- [29] Cieślík E., Leszczyńska T., Filipiak-Florkiewicz A., Sikora E. i Pisulewski P.: *Effects of some technological processes on glucosinolate contents in cruciferous vegetables*. Food Chem., 2007, **105**, 976-981.
- [30] Hansen M., Møller P., Sørensen H. i de Trejo M.: *Glucosinolates in broccoli stored under controlled atmosphere*. J. Amer. Soc. Host. Sci., 1995, **120**(6), 1069-1074.
- [31] Lambrix V., Reichelt M., Mitchell-Olds T., Kliebenstein D. i Gershenzon J.: *The Arabidopsis epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences Trichoplusia ni herbivory*. Plant Cell, 2001, **13**, 2793-2807.
- [32] Vig A., Rampa G., Thind T. i Arora S.: *Bio-protective effects of glucosinolates - a review*. LWT - Food Sci. Technol., 2009, **42**, 1561-1572.
- [33] Gimsing A. i Kirkegaard J.: *Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil*. Phytochem. Rev., 2009, **8**, 299-310.
- [34] Aires A., Carvalho R., Barbosa M. i Rosa E.: *Suppressing potato cyst nematode, Globodera rostochiensis, with extracts of Brassicaceae plants*. Am. J. Potato. Res., 2009, **86**, 327-333.
- [35] Andersson D., Chakrabarty R., Bejai S., Zhang J., Rask L. i Meijer J.: *Myrosinases from root and leaves of Arabidopsis thaliana have different catalytic properties*. Phytochemistry, 2009, **70**, 1345-1354.
- [36] Lambdon P., Hassall M., Boar R. i Mithen R.: *Asynchrony in the nitrogen and glucosinolate leaf-age profiles of Brassica: is this a defensive strategy against generalist herbivores?* Agric. Ecosyst. Environ., 2003, **97**, 205-214.
- [37] van Leur H., Raaijmakers C. i van Dam N.: *A heritable glucosinolate polymorphism within natural populations of Barbarea vulgaris*. Phytochemistry, 2006, **67**, 1214-1223.
- [38] Morant A., Jørgensen K., Jørgensen C., Paquette S., Sánchez-Pérez R., Møller B. i Bak S.: *β-Glucosidases as detonators of plant chemical defense*. Phytochemistry, 2008, **69**, 1795-1813.
- [39] Gimsing A. i Kirkegaard J.: *Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of Brassica biofumigants*. Soil Biol. Biochem., 2006, **38**, 2255-2264.
- [40] Mithen R.: *Glucosinolates - biochemistry, genetics and biological activity*. Plant Growth Regul., 2001, **34**, 91-103.
- [41] Bones A. i Rossiter J.: *The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates*. Phytochemistry, 2006, **67**, 1053-1067.
- [42] Burmeister W., Cottaz S., Driguez H., Iori R., Palmieri S. i Henrissat B.: *The crystal structure of Sinapis alba myrosinase and a covalent glucosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase*. Structure, 1997, **5**, 663-675.
- [43] Cheng D., Hashimoto K. i Uda Y.: *In vitro digestion of sinigrin and glucotropaeolin by single strains of Bifidobacterium and identification of the digestive products*. Food Chem. Toxicol., 2004, **42**(3), 351-357.
- [44] Jones A., Winge P., Bones A., Cole R. i Rossiter J.: *Characterization and evolution of a myrosinase from the cabbage aphid Brevicoryne brassicae*. Insect Biochem. Molec., 2002, **32**, 275-284.

- [45] Burow M. i Wittstock U.: *Regulation and function of specifier proteins in plants*. Phytochem. Rev., 2009, **8**, 87-99.
- [46] IARC Handbooks of Cancer Prevention: *Cruciferous vegetables, isothiocyanates and indoles*. IARC Press, Lyon 2004.
- [47] Zhang Z., Ober J. i Kliebenstein D.: *The gene controlling the quantitative trait locus epithiospecifier modifier 1 alters glucosinolate hydrolysis and insect resistance in Arabidopsis*. Plant Cell, 2006, **18**, 1524-1536.
- [48] Burow M., Bergner A., Gershenzon J. i Wittstock U.: *Glucosinolate hydrolysis in Lepidium sativum-identification of the thiocyanate-forming protein*. Plant Mol. Biol., 2007, **63**, 49-61.
- [49] Krul C., Humbolt C., Philippe C., Vermeulen M., van Nuenen M., Havenaar R. i Rabot S.: *Metabolism of singrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic in vitro large-intestinal model*. Carcinogenesis, 2002, **22**(6), 1009-1016.
- [50] Chung W., Huang J., Huang H. i Jen J.: *Control by Brassica seed pomace combined with Pseudomonas boreopolis, of damping-off of watermelon caused by Pythium sp.* Can. J. Plant Pathol., 2003, **25**, 285-294.
- [51] Rumberger A. i Marschner P.: *2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola*. Soil Biol. Biochem., 2003, **35**, 445-45.
- [52] Warton B., Matthiessen J. i Shackleton M.: *Cross-enhancement: enhanced biodegradation of isothiocyanates in soils previously treated with metham sodium*. Soil Biol. Biochem., 2003, **35**, 1123-1127.
- [53] Borek V., Morra M. i McCaffrey P.: *Myrosinase activity in soil extracts*. Soil Sci. Soc. Am. J., 1996, **60**, 1792-1797.
- [54] Galletti S., Sala E., Leoni O., Cinti S. i Cerato C.: *Aspergillus flavus transformation of glucosinolates to nitriles by an arylsulfatase and a  $\beta$ -thio-glucosidase*. Soil Biol. Biochem., 2008, **40**, 2170-2173.
- [55] Bridges M., Jones A., Bones A., Hodgson C., Cole R., Bartlet E., Wallsgrave R., Karapapa V., Watts N. i Rossiter J.: *Spatial organization of the glucosinolate-myrosinase system in brassica specialist aphids is similar to that of the host plant*. Proc. R. Soc. Lond. B, 2002, **269**, 187-191.
- [56] Rutkowski A., Bielecka M., Kornacka D., Kozłowska H. i Roezniakowa B.: *Influence of toxic compounds of rapeseed meal on the technological properties of propionic acid bacteria*. J. Can. Inst. Food Sci. Technol., 1972, **5**, 67-71.
- [57] Smolińska U., Knudsen G., Morra M. i Borek V.: *Inhibition of Aphanomyces euteiches f.sp. pisi by volatiles produced by hydrolysis of Brassica napus seed meal*. Plant Dis., 1997, **81**, 407-412.
- [58] Lin C., Preston J. i Wei C.: *Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate*. J. Food Protect., 2000, **63**(6), 727-734.
- [59] Ward S., Delaquis P., Holley R. i Mazza G.: *Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria on agar and pre-cooked roast beef by volatile horseradish distillates*. Food Res. Int., 1998, **31**(1), 19-26.
- [60] Mayton H., Olivier C., Vaughn S. i Loria R.: *Correlation of fungicidal activity of Brassica species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue*. Dis. Control Pest Manag., 1996, **86**(3), 267-271.
- [61] Manici L., Lazzeri L. i Palmieri S.: *In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi*. J. Agr. Food Chem., 1997, **45**, 2768-2773.
- [62] Manici L., Lazzeri L., Baruzzi G., Leoni O., Galletti S. i Palmieri S.: *Suppressive activity of some glucosinolate enzyme degradation products on Pythium irregulare and Rhizoctonia solani in sterile soil*. Pest Manag. Sci., 2000, **56**, 921-926.
- [63] Smolińska U., Morra M., Knudsen G. i James R.: *Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of Fusarium oxysporum*. Plant Dis., 2003, **87**(4), 407-412.
- [64] Lazzeri L., Leoni O., Manici L.: *Biocidal plant dried pellets for biofumigation*. Ind. Crop. Prod., 2004, **20**, 59-65.
- [65] Zasada I. i Ferris H.: *Nematode suppression with brassicaceous amendments: application based upon glucosinolate profiles*. Soil Biol. Biochem., 2004, **36**, 1017-1024.
- [66] Sanchi S., Odorizzi S., Lazzeri L. i Marciano P.: *Effect of Brassica carinata seed meal treatment on the Trichoderma harzianum t39-Sclerotinia species interaction*. Acta Hort., 2005, **698**, 287-292.
- [67] Larkin R. i Griffin T.: *Control of soilborne potato diseases using Brassica green manures*. Crop Protect., 2007, **26**, 1067-1077.
- [68] Mari M., Leoni O., Bernardi R., Neri F. i Palmieri S.: *Control of brown rot on stonefruit by synthetic and glucosinolate-derived isothiocyanates*. Postharvest Biol. Technol., 2008, **47**, 61-67.
- [69] Galletti S., Sala E., Leoni O., Burzi P. i Cerato C.: *Trichoderma spp. tolerance to Brassica carinata seed meal for a combined use in biofumigation*. Biol. Control, 2008, **45**, 319-327.

- [70] Lazzeri L, Curto G., Leoni O. i Dallavalle E.: *Effects of glucosinolates and their enzymatic hydrolysis products via myrosinase on the root-knot nematode Meloidogyne incognita (Kofoid et White) Chitw.* J. Agric. Food Chem., 2004, **52**, 6703-6707.
- [71] Lugauskas A., Repečkienė J., Uselis N. i Rašinskienė A.: *Problems on a longtime strawberry growing in one plot.* Hort. Cultus, 2003, **2**(2), 59-68.
- [72] Mithen R., Faulkner K., Magrath R., Rose P., Williamson G. i Marquez J.: *Development of isothiocyanate-enriched broccoli, and its enhanced ability to induce phase 2 detoxification enzymes in mammalian cells.* Theor. Appl. Genet., 2003, **106**, 727-734.
- [73] Agerbirk N., Warwick S., Hansen P. i Olsen C.: *Sinapis phylogeny and evolution of glucosinolates and specific nitrile degrading enzymes.* Phytochemistry, 2008, **69**, 2937-2949.
- [74] Agerbirk N., Olsen C., Topbjerg H. i Sørensen J.: *Host plant-dependent metabolism of 4-hydroxybenzylglucosinolate in Pieris rapae: Substrate specificity and effects of genetic modification and plant nitrile hydratase.* Insect Biochem. Molec., 2007, **37**, 1119-1130.
- [75] Wittstock U. i Gershenzon J.: *Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens.* Curr. Opin. Plant Biol., 2002, **5**(4), 300-307.
- [76] Agerbirk N., De Vos M., Kim J. i Jander G.: *Indole glucosinolate breakdown and its biological effects.* Phytochem. Rev., 2009, **8**, 101-120.
- [77] Muller C. i Wittstock U.: *Uptake and turn-over of glucosinolates sequestered in the sawfly Athalia rosae.* Insect Biochem. Molec., 2005, **35**, 1189-1198.
- [78] de Vos M., Kriksunov K. i Jander G.: *Indole-3-acetonitrile production from indole glucosinolates deters oviposition by Pieris rapae.* Plant Physiol., 2008, **146**, 916-926.
- [79] Henderson D., Riga E., Ramirez R., Wilson J. i Snyder W.: *Mustard biofumigation disrupts biological control by Steinernema spp. nematodes in the soil.* Biol. Control, 2009, **48**, 316-322.
- [80] Ramirez II R., Henderson D., Riga E., Lacey L. i Snyder W.: *Harmful effects of mustard bio-fumigants on entomopathogenic nematodes.* Biol. Control, 2009, **48**, 147-154.
- [81] Ratzka A., Vogel H., Kliebenstein D., Mitchell-Olds T. i Kroymann J.: *Disarming the mustard oil bomb.* PNAS, 2002, **99**(17), 11223-11228.
- [82] Bouchereau A., Clossais-Besnard N., Bensaoud A., Lepout L. i Renard M.: *Water stress effects on rapeseed quality.* Eur. J. Agron., 1996, **5**, 19-30.
- [83] Pereira F., Rosa E., Fahey J., Stephenson K., Carvalho R. i Aires A.: *Influence of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (Brassica oleracea Var. italica) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes.* J. Agr. Food Chem., 2002, **50**(21), 6239-6244.
- [84] Poulsen J., Gimsing A., Halkier B., Bjarnholt N. i Hansen H.: *Mineralization of benzyl glucosinolate and its hydrolysis product the biofumigant benzyl isothiocyanate in soil.* Soil Biol. Biochem., 2008, **40**, 135-141.
- [85] Gimsing A., Poulsen J., Pedersen H. i Hansen H.: *Formation and degradation kinetics of the biofumigant benzyl isothiocyanate in soil.* Environ. Sci. Technol., 2007, **41**(12), 4271-4276.
- [86] Gimsing A., Sørensen J., Strobel B. i Hansen H.: *Adsorption of glucosinolates to metal oxides, clay minerals and humic acid.* Appl. Clay Sci., 2007, **35**, 212-217.

## BIOFUMIGATION AS AN ALTERNATIVE METHOD OF CROP PROTECTION

<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry

<sup>2</sup> Department of Food Chemistry, Technology and Biotechnology  
Gdansk University of Technology

**Abstract:** Health risks related to common use of pesticides and artificial fertilizers raised the interest in alternative methods of crop protection, among them biofumigation is becoming the most important. In this process natural compounds, mainly glucosinolates degradation products from *Brassica* species are used to combat pests and microorganisms attacking crops. Moreover, in the case of glucosinolate degradation products also beneficial influence on soil quality and yield efficiency can be expected. This article reviews the information on compounds used in biofumigation, their biocidal activity and describes a few trials of practical application of this method.

**Keywords:** biofumigation, alternative methods of crop protection, glucosinolates, isothiocyanates, myrosinase