

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dip. **AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE**

Corso di laurea in **SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE**

Agricoltura sostenibile attraverso le sostanze umiche

Relatore

Prof.ssa Serenella Nardi

Correlatore

Dott.ssa Maria Cristina Della Lucia

Laureando

Alessandro Cappellotto

Matricola n. 2000005

Anno accademico 2022-2023

RIASSUNTO

A partire dalla metà del secolo scorso, l'uso eccessivo di fertilizzanti e fitosanitari di sintesi ha comportato una generale e progressiva degradazione dell'agroecosistema e dell'ambiente. È pertanto necessario cercare delle soluzioni sostenibili che possano virtuosamente integrarsi con i prodotti chimici, aumentandone l'efficienza d'uso e riducendone di conseguenza la quantità impiegata. A tal proposito, le sostanze umiche, derivate dal processo di trasformazione chimica e biologica (umificazione) dei residui organici, inducono cambiamenti morfologici e fisiologici nella pianta che si concretizzano in un migliore assorbimento e assimilazione dei nutrienti e in una più efficace capacità di difesa da stress biotici e abiotici. La complessa struttura conformazionale, stabile e recalcitrante alla degradazione, consente di migliorare le proprietà fisico-chimiche del suolo, di incrementare la biodiversità delle comunità batteriche presenti nella rizosfera e di ridurre la percolazione verso la falda di molte molecole xenobiotiche normalmente utilizzate in agricoltura. Pertanto, l'impiego di sostanze umiche rappresenta una valida strategia verso la transizione a un'agricoltura sostenibile in grado di salvaguardare la salute ambientale e di incrementare la produttività delle piante agrarie.

ABSTRACT

Since the middle of the last century, the excessive use of synthetic fertilizers and plant protection products has led to a general and progressive degradation of the agroecosystem and the environment. It is, therefore, necessary to look for sustainable solutions that can virtuously integrate with chemical products, increasing their efficiency of use and consequently reducing the quantity used. In this regard, humic substances, thanks to properties acquired during the transformation process of organic residues, induce morphological and physiological modifications in the plant that result in better absorption and assimilation of nutrients and a more effective capacity of defense against biotic and abiotic stresses. The complex conformational structure, which is stable and recalcitrant to degradation, improves the physical and chemical properties of the soil, increases the biodiversity of the bacterial community in the rhizosphere, and reduces the leaching of many xenobiotic molecules normally used in agriculture into the groundwater. Therefore, humic substances represent a necessary step towards the transition to a sustainable agriculture able to safeguard environmental health and increase the productivity of crops.

INDICE

RIASSUNTO	3
ABSTRACT	4
CAPITOLO 1.....	6
1.1 Verso un'agricoltura sostenibile	6
1.2 Le sostanze umiche come biostimolanti nell'agricoltura sostenibile	8
CAPITOLO 2.....	11
2.1 La sostanza organica e le sostanze umiche: caratteristiche generali e dibattito.....	11
2.1.1 La sostanza organica nel suolo: caratteristiche generali	11
2.1.2 Il problema della definizione delle sostanze umiche: il Soil Continuum Model	13
2.1.3 La critica al SCM	15
2.2 Le sostanze umiche: definizione e struttura molecolare.....	16
2.3 L'impossibilità di standardizzare gli effetti delle sostanze umiche	19
CAPITOLO 3.....	21
3.1 Gli effetti biostimolanti delle sostanze umiche: le interazioni rizosferiche.....	21
3.1.1 Crosstalk suolo-radice.....	21
3.1.2 Regolazione della biodisponibilità e dell'assorbimento degli elementi nutritivi	23
3.1.3 Regolazione dei meccanismi fisiologici e dell'espressione genica	26
3.1.3 Regolazione della composizione e dell'attività delle comunità batteriche	28
3.1.4 Regolazione di altre proprietà chimico-fisiche del suolo	31
3.2 Regolazione dei sistemi di difesa della pianta e opportunità del priming.....	31
CAPITOLO 4.....	35
4.1 Dati di campo sugli effetti biostimolanti delle sostanze umiche	35
4.2 Proprietà del vermicompost come matrice organica per le sostanze umiche	36
4.3 Servizi ecosistemici generati dalle sostanze umiche	37
CONCLUSIONI	39
BIBLIOGRAFIA/SITOGRAFIA	41

CAPITOLO 1

1.1 Verso un'agricoltura sostenibile

La parola agricoltura deriva dalla composizione di altri due termini di origine latina: il sostantivo “*ager*” e il verbo “*colo*” che significano rispettivamente “campo” e “coltivare” (Castiglioni e Mariotti, 2019). Si deduce quindi che questa pratica richieda una attiva azione dell'uomo, il quale modifica l'ecosistema naturale a proprio favore e lo gestisce per trarne la maggior quantità di nutrienti. Così, nel corso dei secoli svariate innovazioni hanno consentito un graduale aumento della produttività e di conseguenza un miglioramento delle condizioni di vita, ma pur sempre nel solco di una integrazione e interazione quasi simbiotica con l'ambiente, seguendone i ritmi e i cicli biologici.

Tuttavia, a partire dalla seconda metà del secolo scorso, l'introduzione di macchinari agricoli con motore a scoppio, di prodotti di sintesi quali pesticidi e concimi e di un moderno approccio al miglioramento genetico ha trasformato l'agricoltura da un'attività prossima alla sussistenza a un'economia di scala capace di produrre eccedenze. E poiché i ricavi sono, in generale, direttamente proporzionali alla resa, si cercò di sfruttare al massimo grado le potenzialità produttive dell'agroecosistema e in particolare del suolo, immettendovi sempre maggiori quantità di fertilizzanti minerali che presto presero il posto di quelli organici: al 2020 se ne sono utilizzate ben 200 milioni di tonnellate di cui 123 di azoto (FAO, 2022).

Nell'immediato, i risultati furono eclatanti e, ancor oggi, è innegabile che per poter soddisfare la domanda crescente di prodotti agricoli, trainata dall'esplosione demografica, sia necessario continuare a utilizzare, ma con un approccio radicalmente diverso, i fertilizzanti minerali, la cui applicazione sproporzionata ha prodotto effetti non solo disastrosi per l'ecosistema, ma addirittura controproducenti per l'agricoltura stessa, con un decremento della resa delle colture. In effetti, l'abuso di concimi chimici concorre significativamente all'acidificazione e alla salinizzazione del suolo producendo uno squilibrio nei rapporti tra nutrienti presenti nella soluzione circolante e anche la biodiversità microbica viene fortemente compromessa dalle alterazioni del pH e dalla

carenza di sostanza organica: si vengono così a creare condizioni particolarmente sfavorevoli all'insediamento delle colture agrarie (Grignani, 2016). Dal punto di vista ambientale, le reazioni chimiche a cui vanno incontro le componenti dei concimi nel suolo, contribuiscono alla produzione di residui che, venuta meno la barriera delle sostanze umiche, percolano facilmente lungo il profilo raggiungendo le falde acquifere (Bisht et al., 2020). Infine, alcuni studi hanno calcolato l'impatto dei fertilizzanti nella produzione diretta o indiretta di gas climalteranti (GHGs), noto anche come *carbon footprint*, secondo il protocollo LCA (Life Cycle Assessment). Ebbene, i concimi di sintesi concorrono alla produzione del 78% delle emissioni totali di CO₂-eq per tonnellata di grano raccolto (Grignani, 2016).

Pertanto, appare evidente che sia quantomai necessario applicare tecniche agronomiche che consentano la conservazione della salute del suolo, intesa come "abilità di un suolo vivente [...] di preservare la produttività di piante e animali, di conservare e migliorare la qualità dell'acqua e dell'aria [...], di formare la base per la produzione di cibo salutare e di contribuire quindi alla sicurezza alimentare" (Bisht et al., 2020). In altri termini, ciò significa che occorre procedere nella direzione di un'agricoltura sostenibile che sia in grado di proteggere e incrementare la potenzialità produttiva, garantendo così il soddisfacimento del fabbisogno umano di alimenti e la fattibilità economica delle imprese agricole, e al contempo di impedire la degradazione del suolo, delle risorse naturali e delle acque migliorando così la qualità di vita degli agricoltori e dell'intera collettività (Violante, 2013).

Questi nobili obiettivi vanno tuttavia calati nella pratica agronomica e concretizzati in criteri di gestione direttamente applicabili in campo. A tal proposito, l'Unione Europea sostiene economicamente l'efficiente gestione del suolo attraverso le "buone condizioni agronomiche e ambientali" (BCAA) della PAC, tra cui la numero 7. Diversi sono i principi d'azione che consentono di ottimizzare o ridurre l'utilizzo dei concimi preservando la salute del suolo: in questo lavoro approfondiremo lo studio delle potenzialità delle sostanze umiche come biostimolanti.

1.2 Le sostanze umiche come biostimolanti nell'agricoltura sostenibile

I biostimolanti rappresentano di certo un passaggio obbligato nella transizione verso un'agricoltura sostenibile: si tratta infatti di molecole biologiche ricavate prevalentemente da materie prime organiche, spesso di scarto, o di microrganismi che consentono di migliorare direttamente o indirettamente alcuni processi biochimici e fisiologici delle colture sulle quali sono applicati. I requisiti qualitativi e di sicurezza vengono definiti nella PFC 6 dell'allegato I – parte II del Regolamento (UE) 2019/1009 secondo cui “un biostimolante delle piante è un prodotto fertilizzante dell'UE con la funzione di stimolare i processi nutrizionali delle piante indipendentemente dal tenore di nutrienti del prodotto, con l'unico obiettivo di migliorare una o più delle seguenti caratteristiche delle piante o della rizosfera: a) l'efficienza d'uso dei nutrienti; b) la tolleranza allo stress abiotico; c) le caratteristiche qualitative ; d) la disponibilità di nutrienti contenuti nel suolo o nella rizosfera”. La legge prevede dei valori massimi di contaminanti ammessi e distingue tra “biostimolante microbico delle piante” (PFC 6 A) contenente microrganismi e “biostimolante non microbico delle piante” (PFC 6 B). Seguono nell'allegato III – parte II alcune prescrizioni da mostrare in etichetta, tra cui la forma fisica, i metodi di applicazione e l'effetto dichiarato per ogni pianta bersaglio.

I meccanismi d'azione che consentono un miglioramento della produttività e dello stato di salute delle colture sono complessi e ancor oggi in parte ignoti poiché sono conseguenza di un'articolata interazione delle molecole attive tra di loro e con la pianta. Tuttavia, è possibile verificare l'efficacia dei prodotti biostimolanti attraverso la genomica e l'osservazione degli effetti fenotipici. Per definizione, il biostimolante consente di migliorare la tolleranza agli stress abiotici, di aumentare le rese e di garantire una produzione qualitativamente superiore rispetto al controllo non trattato. Si dovrebbero allora poter osservare significativi cambiamenti nei processi trascrizionali e post trascrizionali dei geni che codificano, ad esempio, per la produzione di alcuni fitormoni che innescano o silenziano specifiche pathways metaboliche. Di conseguenza, a livello fisiologico dovremmo assistere a un miglioramento dell'assimilazione netta di CO₂ e a una riduzione della traspirazione fogliare, che consentirebbe di aumentare il valore del WUE (Water Use Efficiency), oppure all'incremento di alcuni parametri qualitativi.

Le sostanze umiche si inseriscono a pieno titolo tra i prodotti biostimolanti. Innanzitutto, consentono un netto miglioramento della fertilità del suolo grazie alla loro elevata capacità di scambio cationico (CSC) perché attraverso gruppi carbossilici e idrossilici chelano e mobilizzano i micronutrienti. Questi verranno assorbiti da un sistema radicale reso più esteso ed efficiente dalla maggiore attività di una pompa protonica detta H⁺-ATPasi, implicata anche nella acidificazione della rizosfera. La crescita viene poi stimolata attraverso l'induzione del metabolismo dell'azoto regolando enzimi come la nitrato reductasi e la glutammato sintasi. È evidente che una pianta, quando sottoposta a stress biotico o abiotico, alloca le risorse prodotte in maniera preferenziale verso la produzione di strutture o sostanze metaboliche necessarie alla difesa a scapito della produzione. Le sostanze umiche possono essere efficaci strumenti per evitare o quantomeno mitigare i danni prodotti, attraverso l'attivazione di diversi meccanismi fisiologici o biochimici. A titolo d'esempio, è noto che l'elevata intensità luminosa del periodo estivo induce la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) capaci di danneggiare i fotosistemi: la pianta risponde aumentando la biosintesi di fotoprotettori che può essere ulteriormente migliorata con l'applicazione di acidi umici evitando così scottature e perdite produttive. Ciononostante, il successo di un dato composto bioattivo dipende in maniera molto significativa dalla materia prima di origine, dai processi di estrazione, dalle dosi, dal momento e dai metodi di applicazione, dalla soglia di sensibilità di ciascuna specie e dalla eventuale azione sinergica o antagonista con i metaboliti della coltura (Ferrante, 2019).

Possiamo dunque affermare che le sostanze umiche e i biostimolanti in generale, pur non potendo sostituire totalmente i fertilizzanti e i pesticidi di sintesi, sono cruciali nello sviluppo di un'agricoltura intelligente dal momento che migliorano l'efficienza d'uso dei nutrienti e la resilienza agli stress climatici preservando al contempo la salute del suolo. Inoltre, essendo molti composti derivati da sottoprodotti agricoli, animali o forestali ben si inseriscono all'interno di un'economia circolare (www.biostimulants.eu/issue/plant-biostimulants-contribute-to-climate-smart-agriculture/): a tal proposito è stato dimostrato che le emissioni di CO₂-eq sono state ridotte dell' 8-12% su zuccino e fino al 24% su spinacio attraverso l'applicazione di biostimolanti (Rajabi Hamedani et al., 2020).

Tuttavia, i benefici ambientali devono essere accompagnati da una comprovata sostenibilità economica che passa attraverso la quantificazione degli incrementi produttivi e del margine lordo differenziale ottenuti rispetto al controllo. Infatti, l'efficacia di un biostimolante viene testata in campo confrontando non solo le rese finali, ma anche parametri come il tasso di crescita relativo che esprime l'efficienza di una pianta di produrre sostanza secca, cioè biomassa. L'impatto sulla redditività dell'azienda viene invece valutato attraverso il calcolo degli indici di efficienza economica, cioè quanti euro di margine lordo differenziale rispetto alla coltura non trattata si sono ottenuti per ogni euro di costo di biostimolante applicato. Cortignani (2022) ha evidenziato un indice di efficienza medio di 2,78 in ricerche condotte in pieno campo e in serra su cerealicole, ortive da foglia e ortive da frutto nel 2017-2018, con risultati più soddisfacenti (3,22) per quest'ultime (Tabella 1). Infine, stando ai dati del mercato internazionale, i biostimolanti sono particolarmente apprezzati per un valore di 3,5 miliardi di euro nel 2022 e un valore previsto di 6,9 miliardi nel 2027 (www.agronotizie.imagelinenetwork.com/fertilizzazione/2023/03/07/biostimolanti-ritorno-economico-effetti-ambientali-e-criticita-normative/78534).

Corre però l'obbligo di precisare che i dati agronomici ed economici relativi alle sperimentazioni di campo scarseggiano in letteratura ed è quindi difficile, allo stato attuale dell'arte, affermare di poter ottenere risultati certi per qualsiasi applicazione su qualsiasi specie di interesse agrario. È allora necessario approfondire la ricerca per definire protocolli operativi specie-specifici superando le criticità legate a tempi, dosi e metodi di applicazione.

Tabella 1 Convenienza economica dei biostimolanti, riadattata da Colla et al. (2019)

Coltura	Produzione commerciale (t/ha)	Incremento produzione commerciale rispetto al controllo (%)	Differenziale di costo complessivo (euro/ha)	Valore dell'incremento di produzione (euro/ha)	Margine operativo lordo differenziale (euro /ha)	Indice efficienza economica
Frumento duro	3,80	18,70	42,00	120,00	78,00	1,86
Lattuga	18,00	50,00	1270,00	3237,50	1967,50	1,55
Spinacio	20,80	43,40	1232,28	4275,00	3042,72	2,47
Cetriolo	265,00	5,60	1525,73	8137,50	6611,77	4,33
Pomodoro allungato	119,00	21,40	2407,46	7692,14	5284,69	2,20
Vite da vino	11,30	31,20	1199,67	1269,00	69,34	0,06

CAPITOLO 2

2.1 La sostanza organica e le sostanze umiche: caratteristiche generali e dibattito

Le sostanze umiche si formano a seguito di complessi processi di trasformazione della sostanza organica (di seguito detta SOM, Soil Organic Matter) che avvengono sia naturalmente a carico dei residui colturali o degli ammendanti sia indotti da processi industriali che utilizzano come materia prima sottoprodotti agro-alimentari o forestali da cui si ottengono degli estratti da distribuire per via fogliare o radicale.

2.1.1 La sostanza organica nel suolo: caratteristiche generali

La SOM del suolo è “l’insieme di tutti i materiali organici presenti nella pedosfera” (Violante, 2013) e si compone di diverse tipologie di molecole biologiche ciascuna presente in una certa proporzione. Gli zuccheri (5-25%), ricchi di gruppi ossidrilici e aldeidi o chetoni, si suddividono in monosaccaridi e polisaccaridi: i primi sono caratterizzati da un’elevata solubilità e sono facilmente degradabili dai microrganismi che ne ricavano energia e nutrienti; i secondi, invece, poiché costituiscono prevalentemente le fibre di cellulosa protette dalla lignina, sono meno accessibili e permangono inalterati per tempi maggiori. I lipidi (1-20%), al contrario, sono idrofobici ed essendo formati da catene carboniose piuttosto lunghe sono poco labili. Sono presenti anche composti azotati (15-45%), fosforati (1-3%) e solforati (0,5-3%). Particolare attenzione va rivolta alla lignina: essendo costituita da polimeri aromatici derivati dagli alcoli coniferilico, sinirgilico e cumarilico può essere degradata solo dai funghi ligninolitici che producono unità fenoliche recalcitranti e particolarmente reattive che tendono a interagire con altri composti organici, per formare prodotti di maggiore complessità e ancora più resistenti, o con cationi polivalenti per dare chelati. Queste componenti prendono parte a un continuo e articolato processo di trasformazione (*Figura 1*) che dipende da numerose variabili come, ad esempio, le caratteristiche della matrice di partenza, il tipo di suolo, il pH della soluzione circolante,

temperatura e umidità, l'azione di microflora e pedofauna e, nell'agroecosistema, le tecniche colturali. La decomposizione consta infatti di diverse fasi: in prima battuta, i residui vegetali e animali vanno incontro a un amminutamento fisico grazie all'intervento di lombrichi e di altri organismi tellurici. In un secondo momento, diverse specie di microrganismi attaccano dapprima i composti più labili e in seguito il materiale più refrattario ricavandone energia utile al proprio sviluppo. Inoltre, le reazioni di ossidazione a carico dei legami formati dal carbonio producono CO₂ liberata in atmosfera e rilasciano nella soluzione circolante micro e macronutrienti che si trovavano prima in forma organica, attraverso un processo noto come mineralizzazione. Contemporaneamente, reazioni di condensazione, addizione nucleofila o neosintesi a carico di metaboliti intermedi producono "una miscela di composti di struttura e composizione molto variabile e *non riconducibile ad alcuna delle classi di composti organici noti*". Si ritiene che la formazione di nuovi composti eterociclici e carbonilici possa essere conseguenza della condensazione tra zuccheri e composti azotati e che i sottoprodotti della degradazione della lignina polimerizzino in molecole di maggiore complessità e minore degradabilità. Si verrebbero infine a formare le sostanze umiche (di seguito chiamate anche HS, Humic Substances) che costituiscono circa il 60-70% della SOM e ne rappresentano la frazione biochimicamente più stabile. Sono costituite da aggregati supramolecolari in cui le singole unità sono tenute assieme da legami ionici, ponti a idrogeno e interazioni idrofobiche: le caratteristiche di queste strutture non sono in alcun modo riconducibili a uno specifico composto chimico o biologico di partenza (Sequi, 2017). In realtà, esiste un dibattito a riguardo e pertanto tratteremo in maniera più approfondita questo argomento nella prossima sezione.

Considerando che le trasformazioni appena descritte sono condizionate da molte variabili, che non sono istantanee ma distribuite nel tempo e che substrati chimicamente diversi vanno incontro a processi differenti, possiamo identificare nel suolo diversi pool di SOM. Ai fini di questa trattazione basta richiamare i concetti di DOM e Humus: la prima è la frazione di SOM solubile in acqua e dunque particolarmente dinamica, la seconda è diretta conseguenza del suddetto processo di umificazione e si riferisce al "materiale organico amorfo che rimane nel suolo dopo l'estrazione delle frazioni idrosolubili e l'esclusione di frammenti organici" (Baldock e Nelson, 2000).

Consiste in un misto di molecole non umiche e di sostanze umiche a loro volta formate da: i) umina, insolubile sia in condizioni acide sia basiche; ii) acidi umici, molecole solubili in soluzioni alcaline dalle quali flocculano per acidificazione ($\text{pH} < 3$), di seguito denominati HA (Humic Acids) (*Figura 2*); iii) acidi fulvici, solubili a qualsiasi pH che rispetto agli acidi umici sono meno aromatici, più ramificati, più ricchi in gruppi $-\text{COOH}$ e $-\text{OH}$ e in ossigeno, ma di minore peso e dimensione, di seguito chiamati FA (Fulvic Acids). La struttura è però molto simile e si compone di un *core* di anelli aromatici, fenoli, chinoni ed eterocicli condensati attraverso catene alifatiche o ponti ossigeno, azoto e zolfo. A queste unità sono legati residui di svariate tipologie (Sequi, 2017). Le sostanze umiche agiscono come biostimolanti attraverso effetti diretti e indiretti sui processi biochimici di suolo e pianta (Pinton et al., 2009).

2.1.2 Il problema della definizione delle sostanze umiche: il Soil Continuum Model

Come accennato in precedenza, le sostanze umiche vengono definite in base alla loro solubilità in una soluzione alcalina, ma secondo Lehmann e Kleber (2015) questo metodo darebbe una rappresentazione falsata della realtà poiché a loro dire non vi è prova scientifica che dimostri l'esistenza di acidi umici, fulvici e umina nel suolo in maniera indipendente dal processo di estrazione. Ritengono pertanto improprio utilizzare il termine generale "sostanze umiche" per definire delle particolari molecole ottenibili soltanto attraverso specifici trattamenti chimici usati in laboratorio. Tant'è vero, affermano, che diversi gruppi di ricerca usano gli stessi termini con notazioni addirittura contraddittorie e si sforzano di "allineare la teoria con il comportamento e le proprietà di una proxy dei componenti del suolo definibile solo a pH alcalino".

La procedura di estrazione, nella sua versione moderna, prevede che un campione di terreno venga aggiunto a una soluzione di NaOH di pH 13 tale per cui i gruppi funzionali della matrice contenenti ossigeno vengano ionizzati rendendo i composti organici più solubili. A seguito di acidificazione gli HA precipitano, gli FA restano in soluzione mentre la parte che non risponde al trattamento è detta umina che, costituendo ben il 50-70% del carbonio totale, rende le altre due componenti inadatte a rappresentare la struttura chimica del campione. Inoltre, vengono estratte anche le

sostanze non-umiche, come biomassa vivente e semplici biomolecole. Infine, poiché generalmente il pH del suolo varia tra 3,5 e 8,5, ma mai raggiunge 13, è evidente che le HS sono frutto di un procedimento selettivo e artificioso. La situazione è chiara, secondo questa visione: “il metodo di estrazione ha preceduto la teoria” e ha indotto gli scienziati a formulare tesi sui processi di sintesi delle HS che hanno assecondato una falsa rappresentazione della realtà indotta da protocolli scientifici per nulla adeguati (Lehmann e Kleber, 2015).

Il vecchio modello di umificazione prevedeva che una prima fase di decomposizione fosse seguita da una sintesi dei prodotti ottenuti in molecole di grandi dimensioni di colore scuro, ricche in carbonio, resistenti alla decomposizione e assai stabili. Nulla di tutto ciò sarebbe vero a detta degli autori, poiché anche le sostanze più recalcitranti possono essere decomposte velocemente, mentre il colore scuro è un’alterazione di laboratorio. L’elevata età radiocarbonica delle HS sarebbe invece quella del carbonio fissato con la fotosintesi, le grandi molecole sono autoassemblaggi di composti minori e gli anelli aromatici che formano le HS sono in realtà specifici prodotti delle piante con un ruolo fisiologico ben determinato e non frutto di un casuale processo di umificazione. Altri modelli contestati sono quello della decomposizione progressiva e della decomposizione preferenziale dei frammenti più labili rispetto a quelli recalcitranti (Lehmann e Kleber, 2015).

Viene allora proposto un nuovo modello detto *Soil Continuum Model* (SCM) secondo cui “la materia organica esiste come un *continuum* di frammenti organici che vengono continuamente elaborati dalla comunità dei decompositori verso dimensioni molecolari più piccole” (Lehmann e Kleber, 2015). La scomposizione consente un aumento dei gruppi polari e dunque una maggiore solubilità in acqua, mezzo da preferire per il processo di estrazione avendo come stella polare ciò che accade in fiumi e oceani. Le variazioni del tempo di turnover dei composti organici sono allora spiegabili attraverso la presenza-assenza degli organismi decompositori e i processi di adsorbimento e deadsorbimento ai colloidali minerali: i primi sono migliori per l’aumentata reattività e consentono di preservare la materia organica. Il SCM sostituisce dunque il concetto di stabilità della SOM con quello di protezione reversibile facendo riferimento a un modello dinamico dei processi chimico-fisici.

E poiché le sostanze umiche nella loro definizione storica non sono altro che una parziale brutta copia delle vere componenti del suolo, allora tutti i modelli che ci si sono costruiti sopra presentano un insanabile vizio di fondo. In agricoltura, ad esempio, si è portati a pensare che sia importante garantire un adeguato accumulo di sostanza organica stabile nei suoli ottenuta tramite il processo di umificazione: in realtà, sostengono gli autori, questa pratica è controproducente. Se riconoscessimo il comportamento dinamicamente continuo dei metaboliti di decomposizione come suggerito nel SCM, risulterebbe evidente che è molto più efficace garantire il ricambio di sostanza organica, poiché questa quando si decompone rilascia energia e nutrienti. Infine, sarebbe meglio gestire la salute del suolo attraverso lo studio dei composti solubili in acqua anziché quelli estratti dagli alcali, che invece sono proprio l'oggetto della nostra trattazione basata su decine di articoli pubblicati sulle maggiori riviste scientifiche (Lehmann e Kleber, 2015).

2.1.3 La critica al SCM

De Nobili, Bravo e Chen (2020) hanno criticato il SCM portando alla luce alcune inesattezze. Il metodo di estrazione a pH alcalino è valido, tant'è vero che in alcuni studi sono state riscontrate differenze strutturali maggiori tra HS estratti da suoli differenti piuttosto che cambiando procedura di analisi. Tra l'altro, pH alcalini molto vicini a quelli utilizzati in laboratorio non sono affatto estranei al sistema suolo. In effetti, le comunità edafiche giocano un ruolo chiave nei processi di trasformazione della sostanza organica. Lepidotteri e ditteri che si cibano di fogliame hanno un pH intestinale di circa 9 e alcune termiti arrivano a 10. Negli ultimi tratti del digerente le feci vengono poi arricchite di enzimi e batteri che continuano la decomposizione.

Inoltre, non è vero che il processo continuo di degradazione porterebbe all'aumento dei gruppi polari, che sarebbero responsabili di un aumento della solubilità e dell'adsorbimento contemporaneamente. Si può ipotizzare che l'azione sia limitata alla DOM, ma non di certo all'interazione con i colloidali minerali che, come è noto, è guidata dalle interazioni idrofobiche. Tuttavia, alcuni studiosi hanno misurato la concentrazione di DOM durante un processo di decomposizione in assenza di superfici minerali: se fosse vero quanto asserito nel SCM, dovremmo osservare un aumento della

DOM cosa che non è avvenuta. È stato anche dimostrato che, spontaneamente o per mezzo di reazioni mediate da funghi ed esoenzimi, i metaboliti vanno incontro sovente a processi di sintesi secondaria portando alla formazione di composti oligomerici misti che a loro volta possono reagire, ma che non erano originariamente presenti nelle cellule viventi e che non trovano corrispondenza in nessun metabolita vegetale noto. Il colore bruno della SOM non è causato dai processi di estrazione, poiché essa stessa si colora così nel tempo. In contrasto con il classico modello di umificazione è però evidente che le HS sono formate da aggregati supramolecolari di piccole unità e pertanto presentano bassi pesi molecolari. Infine, al contrario di quanto sosteneva il SCM, il processo di degradazione della lignina, mediato dalla pedofauna è lungo e produce molecole come i residui poliacarbossilici alifatici che possono essere incorporati in prodotti di sintesi secondaria.

Serve dunque adottare un approccio di indagine olistico che consideri i diversi pool della SOM e le molteplici interazioni di questi tra di loro e con i principali attori del sistema suolo: “la reattività naturale dei prodotti intermedi di decomposizione di piccola taglia e la residuale attività di enzimi extracellulari si combinano a trasformare metaboliti microbici e vegetali in una bruna e complessa miscela polidispersa che per la sua complessità è meno facilmente attaccabile da enzimi idrolitici e che si identifica con le HS” (De Nobili, Bravo e Chen, 2020).

2.2 Le sostanze umiche: definizione e struttura molecolare

Alla luce del dibattito precedentemente descritto, va sottolineato che il metodo di estrazione alcalina, pur con qualche criticità, resta la procedura che assicura la massima resa di materiale organico rispetto ad altri solventi, dal momento che la maggior parte di questo è intimamente legato ai colloidali minerali, ed è pertanto riconosciuta dall'International Humic Substances Society (IHSS). È possibile studiare le HS attraverso l'umeomica: vengono prodotte frazioni omogenee rompendo i legami esteri ed eteri ma non quelli C-C e le molecole così separate vengono identificate tramite spettroscopia e dette umeone. Si ottiene quindi una dettagliata caratterizzazione della struttura delle HS nel suolo (Piccolo et al., 2019).

Le caratteristiche delle HS non sono standardizzate, ma variano a seconda della matrice organica di partenza e delle condizioni pedoclimatiche in cui avvengono i diversi processi metabolici: in merito alla composizione elementare, sono formate dal 50-60% di carbonio, dal 0,7-5,1% di azoto, dal 3,5-4,8% di idrogeno e per un 31,6-45,5% di ossigeno con differenze tra HA e FA. I gruppi funzionali formati da O attaccati a una catena R sono carbonilici e carbossilici; invece, quelli presenti in alcoli e fenoli sono idrossilici: le varie caratteristiche e funzioni delle HS sono dovute prevalentemente ai gruppi carbossilici e fenolici che sono responsabili della acidità debole e i primi anche della reattività e della solubilità. I gruppi C-alchilici sono in genere propri dei lipidi e degli idrocarburi alifatici, gli O-alchilici degli zuccheri e i carbossilici degli acidi organici. Quanto alla struttura, per il 35-40% è formata da singole unità di anelli aromatici che conferiscono stabilità contro la degradazione chimica e biologica, tra cui ricordiamo gli acidi fenolici (35% delle HS) che rappresentano una sorta di mattoni dotati di un *core* aromatico, gruppi fenolici e carbossilici e hanno capacità riducente. Al contrario, i chinoni sono in grado di accettare elettroni riducendosi a semichinoni e idrochinoni a elevata stabilità: in generale, le HS possiedono un potenziale standard di riduzione che si aggira tra 0,5 e 0,7 V e se il pH della soluzione è uguale a 4 riducono i metalli, se maggiore formano con essi dei complessi. Come accennato in precedenza, le HS si dividono in HA solubili a pH alcalino ma insolubili per successiva acidificazione, FA solubili a tutti i pH e umina insolubile (Nardi et al., 2021; Pinton et al., 2009).

In passato si pensava che le HS fossero formate da macropolimeri con peso molecolare di circa 500-100000 Da: oggi però si ritiene che si dispongano in una associazione supramolecolare di molecole eterogenee e relativamente piccole con dimensione attorno ai 400-1000 Da autoassemblate grazie a forze dispersive deboli non covalenti come interazioni idrofobiche (van der Waals, ione dipolo, π - π) e legami idrogeno formando strutture di taglia solo apparentemente più grande, con i domini idrofilici (gruppi polari) rivolti all'esterno e quelli idrofobici all'interno (*Figura 4*) (Pazhanisamy et al., 2019; Nardi et al., 2017). A pH basici, i gruppi fenolici e carbossilici vengono deprotonati e le forze di repulsione favoriscono la dispersione delle HS poiché i legami idrogeno intermolecolari sono completamente distrutti. Quando però si acidifica utilizzando per esempio acido acetico, il pH scende, i gruppi funzionali tornano

ad essere protonati, la repulsione decresce e si instaurano nuovi legami idrogeno intra e intermolecolari con conseguente interruzione delle forze deboli. Si ha così una separazione delle sovrastrutture in associazioni più piccole ma stabili, poiché le molecole si dispongono in una forma arrotolata, si aggregano e l'acqua circostante le loro superfici viene espulsa: allora le HS divengono insolubili e precipitano. Questo è ciò che accade nel suolo a opera degli acidi organici a basso peso molecolare essudati dalle radici che, così facendo, influenzano la dimensione molecolare e la solubilità delle HS. Un'analisi HPSEC (High-Performance Size-Exclusion Chromatography) ha provato che le HS non hanno la stessa stabilità dei polimeri reali, legati covalentemente, ma sono sovrastrutture che si compongono e scompongono a seconda del pH, che fa rompere i grandi assemblaggi, o della possibile complessazione con cationi metallici che instaurano una competizione con le molecole umiche, inducono la rottura dei legami idrofobici e causano una disgregazione delle HS (Piccolo et al., 2019). Resta tuttavia da chiarire come sia possibile che tali molecole apparentemente labili persistano nei suoli: la stabilità è dovuta alla formazione di un "complesso ed eterogeneo network molecolare", che conferisce una certa recalcitranza, e all'adsorbimento dei gruppi funzionali alla superficie delle argille che consentono una protezione tra i pori e dunque una minore accessibilità per i microrganismi (*Figura 3*) (Nardi et al., 2021). Riassumendo, le HS sono "un complesso ed eterogeneo miscuglio di materiali polidispersi formato da reazioni chimiche e biologiche avvenute durante il decadimento e la trasformazione dei residui vegetali e microbici [...], sono altamente reattive ma recalcitranti alla biodegradazione" (Muscolo et al., 2013).

Se ne possono isolare differenti frazioni che non sono per nulla standardizzabili e la loro capacità di interagire con le piante (*crosstalk*) dipende dalla loro composizione elementare, dalla forma e dalla dimensione, quest'ultime influenzate significativamente dal pH della soluzione: è stato osservato che piante diverse, attraverso la produzione di acidi organici, sono in grado di determinare specifiche dimensioni delle molecole umiche, distinguibili in HMW (>3500 Da, High Molecular Weight) e LMW (<3500 Da, Low Molecular Weight) che hanno effetti biologici diversi. Le prime sono dotate di gruppi peptidici e carbossilici, hanno un'attività minore, inducono una maggiore differenziazione delle radici, ma sono meno efficaci nel favorire l'assorbimento di azoto.

Le seconde (LMW), invece, sono particolarmente reattive, hanno una maggiore capacità di legame metallico grazie al più alto contenuto di gruppi aromatici, fenolici e carbossilici e incrementano l'assorbimento di NO_3^- . L'elevata attività biologica delle LMW è dovuta alla loro minore rigidità conformazionale, a un minore contenuto di lignina e a un maggiore contenuto di altri composti aromatici. Un altro tipo di frazione sono le WEHS (Water Extractable Humic Substances) che giocano un ruolo importante nell'assorbimento dei nutrienti (Muscolo et al., 2013; Nardi et al., 2021).

2.3 L'impossibilità di standardizzare gli effetti delle sostanze umiche

Alla luce di quanto appena detto e prima di affrontare i capitoli successivi è doveroso premettere che gli effetti delle sostanze umiche, siano essi diretti o indiretti, non sono standardizzabili e ripetibili in qualsiasi condizione. L'attività biostimolante dipende infatti da fattori intrinseci ed estrinseci alle HS. La materia prima organica da cui sono estratte determina in modo significativo il tipo di gruppi funzionali e le proprietà strutturali, che a loro volta influenzano il comportamento biochimico nel suolo e verso la pianta che risponderà in maniera diversa a seconda della specie e dell'età. Infatti, le frazioni LMW entrano facilmente nelle cellule radicali, mentre quelle HMW non vengono assorbite, ma interagiscono con i componenti e i ricettori della parete cellulare. Altri fattori critici sono le modalità, la frequenza e la dose di applicazione per cui è possibile tracciare una curva dose-risposta a campana e notare che all'aumentare della concentrazione di HS distribuite gli effetti sono migliori, ma fino a una certa soglia oltre la quale compare tossicità. Vanno poi considerate le condizioni pedoclimatiche e vedremo più avanti che i maggiori effetti si osservano in condizioni di stress.

Tutto ciò rappresenta una delle maggiori criticità delle HS come biostimolanti ed è pertanto fondamentale che la ricerca incrementi gli studi di campo.

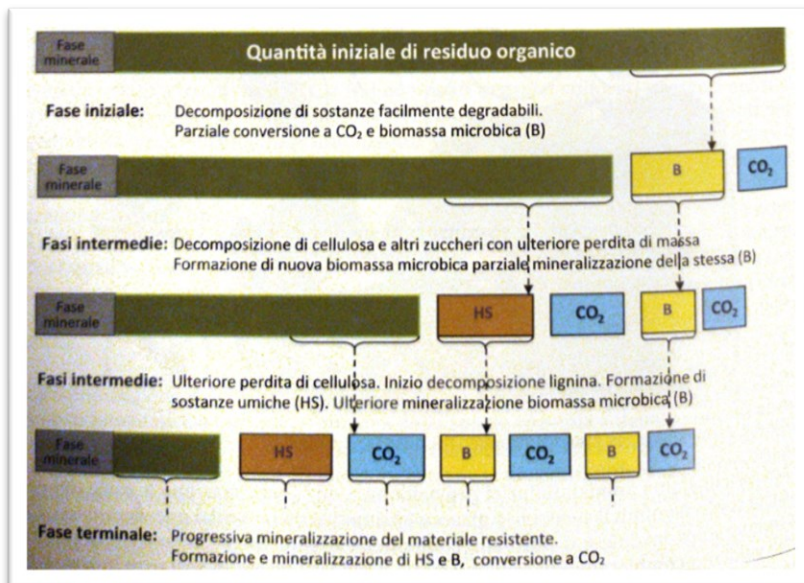


Figura 1 Trasformazione della sostanza organica (Sequi, 2017).

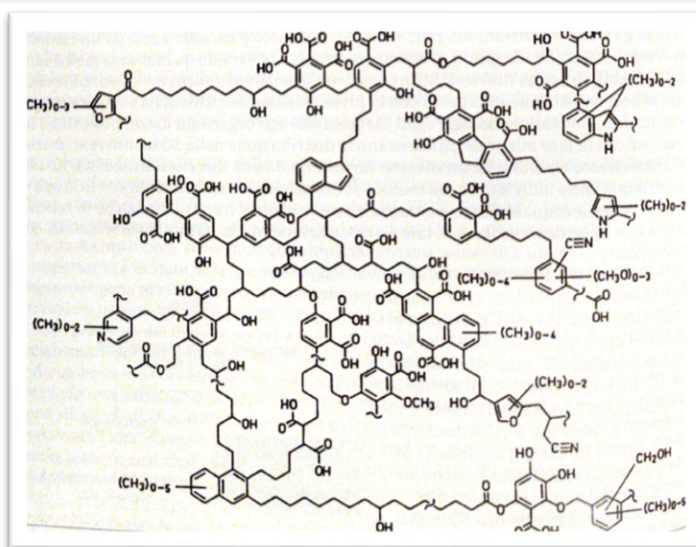


Figura 2 Struttura di un acido umico (Sequi, 2017).

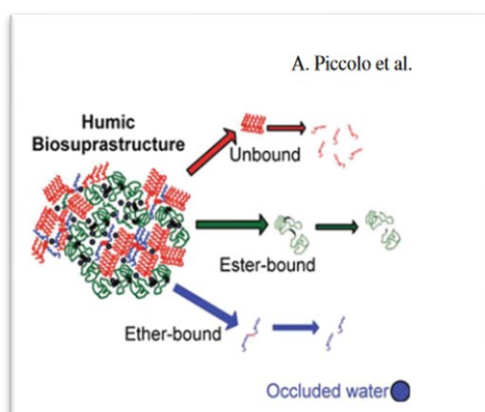


Figura 4 Struttura supramolecolare (Piccolo et al., 2019).

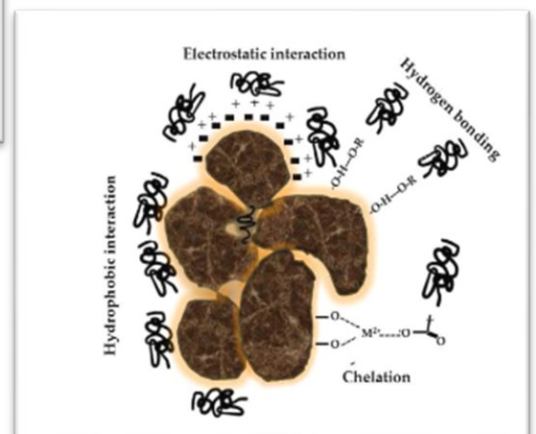


Figura 3 Interazione suolo – HS (Nardi et al., 2021).

CAPITOLO 3

3.1 Gli effetti biostimolanti delle sostanze umiche: le interazioni rizosferiche

3.1.1 Crosstalk suolo-radice

La rizosfera è quella porzione di suolo che si trova nelle immediate vicinanze della radice, ma i cui confini non sono nettamente identificabili. Si potrebbe allora dire che è “il campo d’azione o di influenza di una radice”, cioè quel microambiente dove si instaurano delle relazioni privilegiate tra pianta e suolo che vanno sotto il nome di *Soil-Root Crosstalk*, cioè dialogo suolo-radice che consiste in un vero e proprio scambio di informazioni e in una regolazione reciproci. Le sostanze umiche si inseriscono in questo spazio influenzando le proprietà del suolo, le “nutritional-environmental pathways” (Piccolo et al., 2019) e agendo come bioeffettori (*Tabella 2*). Infatti, “l’attività delle sostanze umiche è legata alla loro composizione molecolare e alla conseguente stabilità della struttura conformazionale in soluzione, la cui interazione dinamica con la rizosfera determina il rilascio di molecole bioattive (LMW) che influenzano direttamente o indirettamente la crescita delle piante” (Piccolo et al., 2019).

Gli essudati organici e i loro derivati sono in grado di regolare la composizione della popolazione microbica, la disponibilità dei nutrienti modificando il pH, la solubilità di eventuali elementi tossici, la capacità di far fronte a condizioni avverse, le reazioni del suolo e la dimensione delle HS. La pianta alloca il 20-70% della CO₂ fissata alle radici di cui circa il 4-70% viene escreta e prende il nome di rizodeposizione (*Figura 5*) che è maggiormente stimolata in condizioni di stress e che si compone di diverse frazioni. I tessuti morti in seguito alla crescita rilasciano cellule intere dette “border cells” mentre quelli vivi secernono composti organici ad alto e basso peso molecolare. I primi comprendono mucillagini implicate nella protezione del meristema apicale ed enzimi come fosfatasi e proteasi, spesso coinvolte nel ciclo dei maggiori nutrienti, e altri per la degradazione delle lignine. Nei secondi rientrano fenoli e fitosiderofori con proprietà

complessanti e zuccheri, aminoacidi e carbossilati come substrato per determinate popolazioni di microrganismi che, in cambio, rendono solubili alcuni minerali e rilasciano fitoregolatori e acidi organici di vario tipo (Pinton et al., 2009). Quest'ultimi, come già accennato in precedenza sono in grado di alterare la macrostruttura delle HS portando all'estrazione di frazioni che possono entrare nella cellula (LMW) o che hanno come bersaglio i componenti della parete cellulare o i ricettori (HMW) inducendo così cascate di trasduzione del segnale.

A loro volta le HS hanno come target primario la radice. Infatti, agiscono come molecole segnale rilasciando ormoni e sostanze ormonosimili, a seguito della loro disgregazione dovuta agli anioni organici essudati, o ne promuovono la produzione da parte delle piante e dei microrganismi; inoltre, gli HA incrementano la rizodeposizione nelle plantule di mais del 71% andando a stimolare la pathway dei fenilpropanoidi, il ciclo degli acidi tricarbossilici e altre vie metaboliche (Canellas et al., 2019). Le HS agiscono dunque come biostimolanti proprio perché sono in grado di regolare i processi fisiologici delle piante e ciò si riverbera nell'ambiente rizosferico. Le HS favoriscono l'allungamento e la differenziazione nella zona meristemica delle radici e la formazione di peli radicali. Ciò si deve agli effetti HS-dipendenti sul trasporto polare delle auxine e sulla pathway di segnalazione di NO; quest'ultimo agisce come messaggero e la sua concentrazione in alcuni siti dell'emergenza radicale è critica negli stadi precoci di sviluppo delle radici laterali. Viene prodotto anche attraverso una via enzimatica che coinvolge la nitrato reductasi e che dipende dall'assorbimento di N: ebbene, le sostanze umiche stimolano entrambi questi meccanismi. Al contempo, la regolazione del trasporto polare dell'auxina e l'incremento della sintesi e dell'attività della H⁺-ATPasi dovute all'effetto ormonosimile influenzano il meccanismo della crescita e di conseguenza l'allungamento e la proliferazione di peli radicali: ecco allora che si avrà un aumento della superficie radicale assorbente, una migliore esplorazione del suolo e una più efficace intercettazione dei nutrienti meno concentrati. È infatti noto che IAA (Indol-Acetic Acid) e HS hanno effetti morfogenetici simili poiché quest'ultime contengono nella loro struttura proprio l'acido indol-acetico o si comportano da "buffer" assorbendo o rilasciando molecole ormonosimili nella rizosfera. Ciò è stato confermato dal fatto che anticorpi anti IAA inibiscono l'attività biologica delle HS, le quali stimolano

geni di risposta all'auxina come IAA5 e IAA19 e inducono la sintesi e l'attività della pompa protonica. Applicazioni fogliari attivano un controllo a distanza dell'architettura radicale, ma senza effetti sulla H⁺-ATPasi. Contemporaneamente, le HS accrescono l'essudazione di acidi organici e di idrogenioni che modificano il pH della soluzione e le reazioni redox alla superficie radicale influenzando così l'attività degli ectoenzimi e la biodisponibilità di alcuni elementi: ciò consente un miglior adattamento delle piante in condizioni avverse e una migliore efficienza d'uso dei nutrienti (NUE) (Nardi et al., 2021; Nardi et al., 2017).

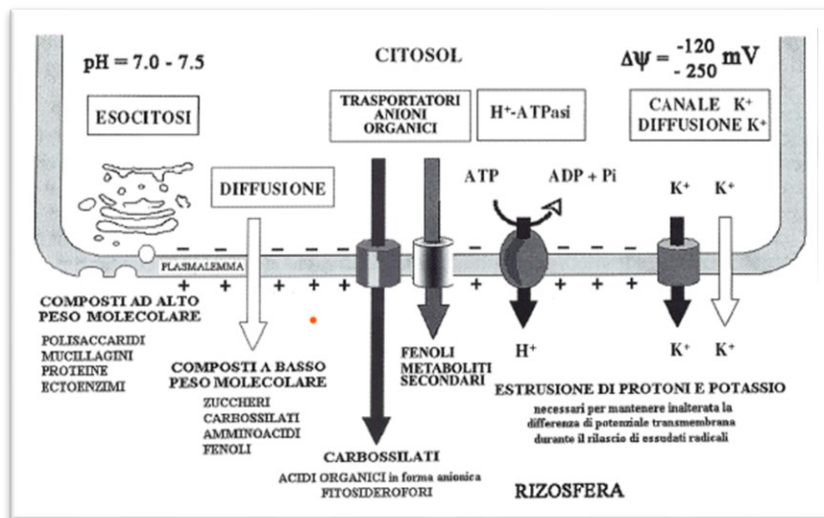


Figura 5 Rizodeposizione (Sequi, 2017).

3.1.2 Regolazione della biodisponibilità e dell'assorbimento degli elementi nutritivi

È noto che le piante assorbono dal terreno i nutrienti in forma minerale e che questi si muovono nella soluzione circolante verso le radici secondo gradiente di concentrazione per diffusione o perché trascinati dal flusso di massa dell'acqua. Spesso però le condizioni di pH sono critiche soprattutto per fosforo e micronutrienti perché fanno sì che alcuni elementi precipitino come ossidi (Fe(OH)₃) o siano insolubili a pH alcalini (Zn, Cu, Mn), vengano dilavati o retrogradati (P) oppure sono talmente poco concentrati nel terreno da essere difficilmente reperibili. Le HS giocano un ruolo fondamentale nel migliorare la biodisponibilità e l'assorbimento dei nutrienti (Pinton et al., 2009).

Innanzitutto, possiedono un'elevata capacità tampone e cioè sono in grado di opporsi alle variazioni di pH tramite la protonazione, in caso di aggiunta di un acido, e deprotonazione, se aggiungiamo una base, dei gruppi R-OH. I gruppi funzionali, dunque, essendo molto reattivi, partecipano ai processi di attrazione elettrostatica, di co-assorbimento e di chelazione. In effetti, potendo donare elettroni, si comportano da leganti polidentati andando a formare complessi con i metalli e regolandone la disponibilità e la solubilità. Possono essere formati dei legami deboli di semplice attrazione elettrostatica dovuta alla CSC o forti, come coordinazione con singoli gruppi o formazione di strutture ad anello dette chelati tramite i gruppi ossidrilici, carbossilici e aminici. Ecco allora che i cationi sono sottratti alla precipitazione e successiva cristallizzazione e viene così a crearsi una riserva di micronutrienti: tuttavia, se la concentrazione di ioni è alta si otterrà l'effetto opposto e cioè la limitazione dei metalli in soluzione e la precipitazione delle molecole umiche con effetto negativo per i componenti utili, ma potenzialmente positivo in caso di composti tossici (Hg, Pb, Cd). Le HS ad alto peso molecolare sono di certo le più efficienti nella chelazione poiché più insolubili e trattengono una maggiore quantità di metalli rispetto alle LMW, specie in ambienti alcalini. Complessi con Fe^{3+} o Al^{3+} nei suoli acidi o con Ca^{2+} nei suoli calcarei, possono formare dei ponti con il fosforo che è noto formare ossidi o retrogradare. Allora, la complessazione rende i nutrienti biodisponibili, ne accresce il trasporto per diffusione verso la rizosfera e ne favorisce l'assorbimento (Pinton et al., 2009; Violante, 2013). Un caso degno di nota è quello del ferro che si trova in soluzione nella forma ridotta nei suoli acidi, nella forma ossidata insolubile e precipitato in forma amorfa o cristallina come $Fe(OH)_3$ nei suoli basici. Ebbene, alcune forme di HS chelano il ferro attraverso i gruppi carbossilici e fenolici creando complessi ad alta stabilità e solubilità facilmente trasportabili verso le radici, mentre le frazioni HMW stabilizzano anche gli ossidi poiché coprecipitano, formando una riserva di ferro insolubile, ma che potrà facilmente essere mobilizzato dalla pianta al bisogno. È inoltre noto che le piante adottano due modalità di assorbimento del ferro: la Strategia I prevede la solubilizzazione del Fe^{3+} con un aumento dell'acidificazione della rizosfera tramite l'estrusione di idrogenioni e la successiva chelazione grazie agli acidi organici; la Strategia II consiste nella sintesi di molecole leganti specifiche con elevata affinità al

ferro dette fitosiderofori, quando questo scende sotto date concentrazioni. Le WEHS (Water Extractable Humic Substances) sono una particolare frazione idrosolubile delle sostanze umiche coinvolte nell'acquisizione del ferro a livello fisiologico, trascrizionale e post trascrizionale: in effetti, formando un complesso con il Fe^{3+} , in entrambi i casi descritti, mediano i processi di chelazione rivelandosi essere molto più stabili contro la degradazione microbica e accumulando una maggior quantità di elemento (Figura 6). Si è inoltre notato che, in casi di carenza, i complessi Fe-WEHS inducono una sovraregolazione del gene per la Fe(III)-chelato reduttasi (LeFRO1) e dei geni LeIRT1 e LeIRT2 (Iron-Regulated Transporter) in radici di pomodoro, mentre HA da leonardite promuovono l'espressione dei geni CsFRO1 e CsIRT1 che codificano per la Fe(III)-chelato reduttasi e i trasportatori radicali Fe(II) in cetriolo. Inoltre, WEHS applicate su *Arabidopsis thaliana* hanno causato un incremento della lunghezza e della densità dei peli radicali, poiché colpiscono i geni coinvolti nella differenziazione delle cellule dell'epidermide, rimodellando così la morfologia radicale verso un aumento della superficie il che si innesta in una strategia di risposta all'acquisizione dei nutrienti favorendone l'assorbimento. Le molecole umiche possono anche mantenere condizioni acide favorevoli alla solubilizzazione del Fe^{3+} e favorire l'attività della la Fe(III)-chelato reduttasi stimolando l'attività della pompa elettrogenica di membrana detta PM H^+ -ATPasi (Zanin et al., 2019; Pinton et al., 2009; Muscolo et al., 2013; Trevisan et al., 2010). Infine, alcuni hanno proposto di inoculare HS nei granuli di fertilizzanti per sfruttarne le proprietà chelanti, ma ci sono ancora delle dinamiche industriali da chiarire (Erro et al., 2016).

Le sostanze umiche sono anche direttamente coinvolte nella regolazione dei processi di assorbimento dei nutrienti. In generale, l'azoto viene assorbito nel simplasto prevalentemente come NO_3^- attraverso cotrasportatori ($2H^+/NO_3^-$) grazie alla forza proton-motrice generata dalla PM H^+ -ATPasi (Carfagna et al., 2021). Diversi studi hanno rivelato che, trattando le radici di diverse piante con differenti frazioni di HS, è stata incrementata l'attività della pompa protonica per via della presenza di IAA legata in forma scambiabile alle HS (Pinton et al., 2009). Al contempo, viene stimolata l'espressione dei geni per i simportatori NRT1.1 e NRT2.1 (Nitrate Transporter): di conseguenza è evidente che aumenterà l'assorbimento di nitrato (Nardi et al., 2021).

Infine, anche l'organizzazione di N è un target delle HS: innanzitutto, consentono una migliore mobilità delle citochinine (CK) verso il germoglio che a loro volta aumentano la crescita fogliare e in condizioni di stress consentono alla macchina fotosintetica di fissare efficientemente carbonio, che è il substrato in cui viene incorporato proprio l'azoto. Questo passaggio è mediato da enzimi come nitrato reduttasi, glutamina sintetasi e GOGAT (Glutamine Oxoglutarate Aminotransferase) la cui espressione ed attività sono state stimolate dal trattamento con HS (LMW). Così, oltre alla fotosintesi, anche gli attori della respirazione cellulare, come la piruvato chinasi, sono stimolati: la coltura produrrà maggiore biomassa, ma anche metaboliti da secernere come essudati radicali; si chiude allora il ciclo del *crossstalk* pianta-suolo. Anche l'anione fosfato viene reso più biodisponibile tramite ponti metallici e, come osservato in piante di pomodoro, anche grazie a una sovraregolazione del gene LePT2 (Phosphate Transporter) per il trasportatore di P inorganico ad alta affinità (Nardi et al., 2021; Vaccaro et al., 2015; Piccolo et al., 2019).

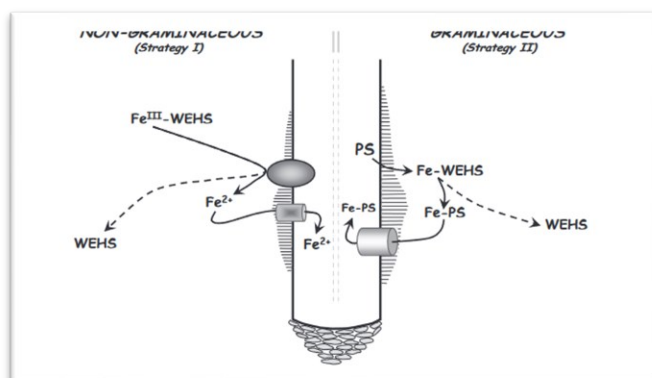


Figura 6 Assorbimento del ferro mediato da WEHS (Pinton et al., 2009).

3.1.3 Regolazione dei meccanismi fisiologici e dell'espressione genica

Le piante regolano i processi di sviluppo interno e la risposta agli stimoli ambientali attraverso la traslocazione di molecole segnale dette fitormoni che colpiscono i recettori delle cellule bersaglio dove, a seguito della trasduzione del segnale, verranno regolati specifici meccanismi genetici o fisiologici. Souza et al. (2022) hanno dimostrato, su una radice di mais trattata con HA, che le sostanze umiche possono intervenire significativamente nella regolazione del cross-talk ormonale. Le

RPKs (Receptor Protein Kinases) sono un variegato gruppo di proteine transmembrana responsabili dell'interazione con l'ambiente extracellulare: ben 261 di queste sono state espresse differentemente dal controllo di cui 126 sovraespresse e 135 sottoespresse. Anche le fosfatasi, che si trovano a valle della cascata di trasduzione del segnale e regolano l'attività delle proteine, e le PAPs (Purple Acid Phosphatases), implicate nell'assorbimento del fosforo, sono state regolate dalla applicazione di acidi umici. Alcuni enzimi che catalizzano la riduzione del gliossilato a glicolato e che sono coinvolti nella detossificazione delle aldeidi sono stati sovraregolati, così come 37 dei 63 geni coinvolti nel metabolismo dell'auxina.

In realtà, molti dei geni studiati risultano sottoespressi in risposta al trattamento, ma di seguito riportiamo quelli che invece hanno beneficiato delle HS. È noto che il trasporto polare dell'auxina attraverso le cellule parenchimatiche dello xilema è mediato dal trasportatore di influsso AUX1 (Auxin Resistant 1) e da quello di efflusso PIN (PIN-formed) che ha un alto livello di trascrizione nelle plantule trattate; si è notata anche una regolazione nei processi di formazione dei coniugati dell'auxina (regolazione della disponibilità, dell'attività e dell'omeostasi) e di risposta trascrizionale al segnale ormonale. Ancora, i geni SAUR (Small Auxin Up-regulated RNA), indotti dall'IAA, inibiscono la PP2CD (Protein Phosphatase 2C-Delta), consentendo l'attività della PM H⁺-ATPasi della cellula e promuovendo l'espansione e la crescita cellulare. Proprio questi sono i meccanismi che consentono la modificazione dell'architettura radicale. Per quanto riguarda l'ABA (Acido Abscissico), 29 geni sono stati negativamente regolati e 14 positivamente tra cui alcune fosfatasi serina/treonina che danno il via alla cascata di segnalazione. Sono state sovraespresse anche alcune proteine coinvolte nella sintesi di steroidi e nella biosintesi delle citochinine (isopentil-transferasi 1). Allora gli HA sono un elemento chiave nella regolazione del *cross-talk* degli ormoni poiché alterano l'espressione genica di proteine correlate alla percezione e trasduzione del segnale, modificando l'attività dei recettori, delle fosfatasi e dei TFs (Transcription Factors). Il fatto che la maggior parte dei geni sovraregolati facciano parte del sistema auxina e che quelli negativamente regolati siano correlati a ormoni impiegati nella risposta agli stress (ABA, JA (acido jasmonico),...) suggerirebbe che gli HA siano più utili come stimolo alla crescita anziché come regolatori dello stress (Souza et al., 2022). Tuttavia è noto che le

HS agiscono anche a livello del metabolismo secondario regolando la quantità di ROS a livello cellulare e l'espressione dei geni per la superossido dismutasi (SOD) e contribuiscono ad aumentare la conduttività idraulica per mezzo di pathways ABA-dipendenti (Piccolo et al., 2019).

3.1.3 Regolazione della composizione e dell'attività delle comunità batteriche

Come abbiamo già detto, le sostanze umiche sono abbastanza recalcitranti alla degradazione microbica, ma possono promuovere indirettamente l'instaurazione di simbiosi mutualistiche. Infatti, i cambiamenti morfologici indotti nell'architettura radicale, la maggiore secrezione di essudati organici, che possono fare da substrato nutritivo, o di sostanze chemioattrattive consente di aumentare il numero delle comunità microbiche, la loro biodiversità, l'attaccamento, la sopravvivenza sulla superficie radicale e la colonizzazione endofitica. I microrganismi sono infatti i mediatori fondamentali del turnover del carbonio e dei nutrienti e del processo stesso di decomposizione della sostanza organica; inoltre, con i loro essudati contribuiscono al riarrangiamento termodinamico delle HS, favorendo il rilascio delle molecole bioattive, e a loro volta i composti organici umificati influenzano composizione e attività delle comunità batteriche agevolando la conservazione selettiva dei microrganismi benefici e la soppressione di quelli patogeni (Piccolo et al., 2019; Nardi et al., 2021).

I PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) sono un gruppo variegato di batteri in grado di promuovere la crescita e la produttività di molte colture attraverso meccanismi che: a) migliorano l'assorbimento di nutrienti attraverso la fissazione dell'azoto, la solubilizzazione del fosforo e la produzione di siderofori; b) interagiscono con la fisiologia della pianta producendo fitormoni o inducendo resistenza sistemica; c) consentono di alleviare stress abiotici. Le specie di PGPB sono dunque strategiche nell'aumentare l'efficienza d'uso dei nutrienti e la resistenza alle avversità. In questo quadro, si è visto che l'applicazione di una soluzione di HA e DEB (Diazotrophic Endophytic Bacteria) su canna da zucchero ha comportato aumenti nella lunghezza della radice tra il 60% e il 118% e dal 33 al 233% in termini di superficie (Olivares et al., 2017). Un biostimolante di K⁺-umato con *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum*

rubrisubalbicans e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, applicato a 60 giorni dall'emergenza ha migliorato del 37% la resa dello stelo. In campo, l'aumento delle rese è stato di circa il 18% con 13 t in più del controllo. In un test in serra a siccità controllata, nelle piante trattate con HA gli enzimi antiossidanti (SOD, CAT (catalasi) e POX (perossidasi)) sono rimasti alti anche dopo reidratazione, in quelle con DEB si è notata una forma di resistenza con meccanismo "insorgenza ritardata degli stress" mentre in quelle con HA+DEB si è notato un aumento della traspirazione, della conduttanza stomatica e della fotosintesi netta. Gli autori hanno concluso che gli HA aiutano il recupero dallo stress inducendo l'attività degli enzimi antiossidanti, mentre i DEB hanno consentito di mantenere il potenziale idrico fogliare chiudendo efficacemente gli stomi. In semi di mais rivestiti con HA+DEB si è notato un incremento della proliferazione di cellule batteriche e a livello fisiologico c'è stato un aumento dell'attività delle H⁺-ATPasi e della fotosintesi e un'alterazione del metabolismo del carbonio e dell'azoto: ciò si è manifestato in campo con una resa in granella del 65% in più rispetto al controllo, mentre nelle parcelle trattate singolarmente con HA e DEB l'aumento è stato del 20%. Gli autori hanno inoltre condotto una sperimentazione in due anni con applicazione fogliare di HA+DEB a dosi differenti di azoto. Nel primo anno, siccitoso, le parcelle indipendentemente dalla dose di fertilizzante hanno avuto incrementi in resa; nel secondo anno invece, con piovosità normale, gli aumenti significativi si sono visti solo fino alla dose di 75 kg/ha. L'effetto della coinoculazione si è accentuato nelle condizioni di stress ed è stato tanto migliore quanto più tardiva è stata l'applicazione; le piante trattate hanno inoltre mostrato un sistema radicale più espanso lasciato nel suolo dopo la raccolta. Infine, la biofortificazione di un substrato per la crescita di piantine di pomodoro con HA+DEB ne ha incrementato lo sviluppo e i benefici si sono mantenuti anche in fase post trapianto. Applicazioni fogliari, invece, hanno avuto effetti sulla resa e sulla resistenza alle malattie (Olivares et al., 2017).

Poiché si è accertato che tali risultati sono ottenibili solo inoculando HA e DEB assieme, è necessario approfondire in che modo gli HA possano implementare l'azione dei batteri (*Figura 7*). Questi entrano nella pianta attraverso le aperture naturali come ferite, stomi e tricomi danneggiati e poiché, come abbiamo ampiamente spiegato, le sostanze umiche promuovono la densità e la lunghezza dei peli radicali e l'emergenza di

radici laterali che forano l'epidermide, si avranno una maggiore superficie disponibile per l'attacco e l'ancoraggio batterico e nuovi siti di infezione. Stimolando anche un aumento della biosintesi di chemioattrattivi nelle parti distali, si è osservato un incremento di *H.seropedicae* attorno alla punta della radice e a livello delle "border cells". D'altro canto, gli HA aumentano la secrezione di essudati organici che vengono utilizzati dai batteri come substrato carbonioso e che smontano la struttura supramolecolare facendo sì che vengano rilasciati composti bioattivi: questi stimolano la crescita radicale che a sua volta aumenta il numero di colonizzazioni endofitiche ed epifitiche. Tanto gli acidi umici quanto alcuni batteri possono rilasciare molecole auxinosimili che stimolano l'attività della H⁺-ATPasi: questa guida il meccanismo della crescita, l'assorbimento dei nutrienti e l'ingresso stesso dei batteri nella pianta poiché l'abbassamento di pH creato favorisce l'attività di enzimi che idrolizzano la parete cellulare. La coinoculazione di HA+ *H.seropedicae* induce l'attività della nitrato riduttasi e della glutammina sintetasi sulle foglie e si sono notati effetti anche sullo stimolo della Fenilalanina Ammonio Liasi (PAL) in pomodoro, impegnata nella biosintesi di fenoli usati nei meccanismi di difesa (Olivares et al., 2017).

Alcuni autori (Galambos et al., 2020) hanno valutato la risposta di alcuni geni (DEGs, Differentially Expressed Genes) dopo l'applicazione su pomodoro di inoculati formati da HA e tre ceppi batterici. Nel controllo con solo batteri i geni erano per la maggior parte sottoespressi, ma l'aggiunta di HA ha fatto sì che fossero maggiormente sovraespressi (80%). Molti sono correlati al metabolismo di biosintesi della parete cellulare, ai sistemi di difesa da stress ossidativi, alla trascrizione e trasduzione dei segnali ormonali, al metabolismo secondario energetico e proteico, al trasporto di microelementi e all'attivazione della H⁺-ATPasi e di meccanismi legati a IAA, JA e CK.

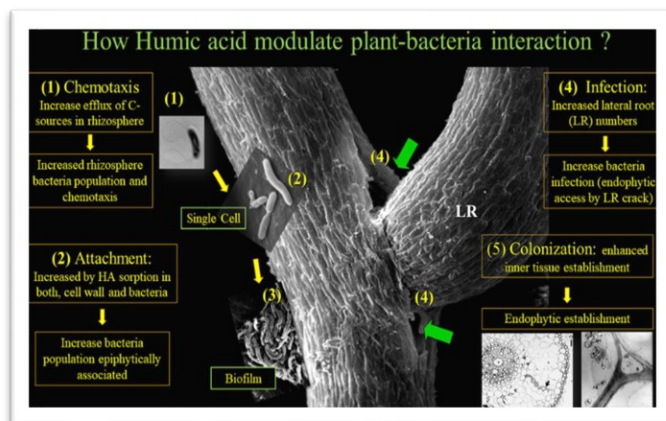


Figura 7 Interazione HA-batteri (Olivares et al., 2017).

3.1.4 Regolazione di altre proprietà chimico-fisiche del suolo

Le sostanze umiche apportano benefici anche attraverso il miglioramento di altre proprietà fisiche del suolo. Si comportano infatti come agente cementante e stabilizzante dei microaggregati del suolo formando complessi organo-minerali. L'associazione delle particelle argillose si deve alle componenti idrofobiche delle HS, che sfuggono all'interazione con la soluzione circolante e che invece interagiscono con le superfici apolari e a bassa carica dei colloidi minerali formando una sorta di "cappotto organico": consentono così una stabilizzazione a lungo termine degli aggregati, poiché vengono a crearsi microambienti impermeabili all'acqua. Si assiste inoltre a un incremento della macroporosità e a una maggior resistenza al compattamento. Le sostanze umiche possiedono anche un'elevata capacità di scambio cationico, mantengono uniforme la temperatura del suolo e hanno un'elevata capacità di ritenzione idrica. Limitano la lisciviazione degli agrofarmaci, soprattutto di quelli con struttura aromatica, immobilizzandoli attraverso l'azione dei gruppi funzionali; formano legami covalenti con alcuni enzimi extracellulari, anche patogeni (Violante, 2013; Piccolo et al., 2019).

3.2 Regolazione dei sistemi di difesa della pianta e opportunità del priming

Le attuali pratiche agricole non si limitano a un uso eccessivo e sproporzionato dei fertilizzanti chimici, ma impiegano anche ingenti quantità di agrofarmaci per poter controllare la maggior parte delle avversità biotiche delle colture agrarie. Tuttavia, la gamma di molecole utilizzabili sta via via diminuendo a causa della loro tossicità acuta e cronica; inoltre, il miglioramento genetico non è sufficiente a contrastare la pressione dei cambiamenti climatici e i danni che ne conseguono. Ancora una volta la SOM e le sue componenti si confermano essere soluzioni sostenibili per affrontare queste sfide. L'applicazione di sostanza organica nei terreni agricoli modifica in maniera positiva le proprietà del suolo consentendo alle piante di svilupparsi in maniera più robusta e di sopportare meglio eventuali stress e incrementa indirettamente la resistenza, poiché consente lo sviluppo di comunità batteriche benefiche. In effetti, si è osservato che in

generale il materiale organico è in grado di inibire malattie e patogeni, rispetto al controllo, per alcune colture: asteracee (85%), cucurbitacee (80%) e solanacee (70,6%) rispondono meglio delle fabacee (53,5%), quelle in idroponica (80%) meglio di quelle su suolo (72,6%), con effetti superiori contro i nematodi (81%) e funghi (75%) rispetto agli insetti (56%): pare infatti che questi composti agiscano anche sul meccanismo di resistenza sistemica indotta. Una buona dose di sostanza organica nel terreno, ad esempio, aumenta le popolazioni microbiche avverse a *Ralstonia solanacearum*. D'altro canto, le HS vengono utilizzate per fronteggiare le infezioni fungine da *Fusarium* spp. o contro *Xanthomonas* in pesco poiché stimolano i geni coinvolti nella difesa diretta. Infatti, sono il composto con il maggior effetto poiché, modificando il profilo metabolico della pianta, promuovono una forte risposta contro i patogeni e le malattie. Ad esempio, sono in grado di indurre ISR (Induced Systemic Resistance) in cetriolo e pesco ed è stato dimostrato in mais che possono anche promuovere l'attività della PAL, che permette la sintesi di acido salicilico, e che aumentano il contenuto di composti fenolici, fondamentali nella difesa da stress abiotici (Silva e Canellas, 2022).

Ritorna tuttavia un problema di cui abbiamo già parlato: gli effetti non sono standardizzabili e ottenibili in qualsiasi situazione poiché dipendono significativamente dall'origine del materiale organico, dalla dose e dalla modalità di applicazione e dalla specie patogena contro cui sono applicati. Per questo motivo, allo stato attuale dell'arte, non è pensabile proporre una gestione delle avversità biotiche utilizzando esclusivamente materiale organico, poiché non sarebbe economicamente sostenibile, ma sarebbe interessante poterlo inserire nelle linee tecniche di lotta integrata.

Dal lato degli stress abiotici, è noto che le sostanze umiche possono accrescere la difesa enzimatica antiossidante (POX, SOD), aumentare l'assorbimento di nutrienti, stimolare il metabolismo secondario e ridurre lo stress da siccità e salinità grazie a cambiamenti nel bilancio ionico. E poiché prevenire un danno è di certo più vantaggioso che curarlo, recentemente si è pensato di utilizzare le HS nella tecnica del *priming*, che consiste in un "precondizionamento attraverso precedente esposizione a una appropriata dose di HA con l'obiettivo di ridurre la tossicità causata da una successiva esposizione dannosa a un agente di stress abiotico" (Canellas et al., 2020). Uno studio su mais sottoposto a *priming* ha evidenziato che una dose di 100mg/L di HA ha

aumentato del 20% l'attività della CAT, che catalizza la decomposizione di H₂O₂, e del 18% la concentrazione della prolina, aminoacido importante nella resistenza alla siccità. Si è osservata una differenza statisticamente significativa tra le radici del controllo non trattate e quelle preconditionate dopo esser state sottoposte a stress indotti da NaCl e polietilenglicole: le prime hanno avuto un calo significativo del peso fresco, le seconde non sono state intaccate. Sono state trovate maggiori quantità di trascritto di geni che codificano per recettori ormonali, segnalazione cellulare, percezione dello stress, attività di chinasi e fosfatasi e fattori di trascrizione di geni di risposta allo stress. Tra i geni correlati alla percezione delle avversità abiotiche e stimolati da HA, ricordiamo quelli implicati nell'attività della CDPK (Calcium-Dependent Protein Kinase) e dei trasportatori di membrana del Ca²⁺, fondamentali nel processo di trasduzione del segnale. Un alto livello trascrizionale è stato osservato anche per SAUR e brassinosteroidi implicati rispettivamente nel meccanismo dell'auxina e della tolleranza al calore, siccità e salinità. Altri sono legati all'antiporto Na⁺/K⁺, all'attività della H⁺-ATPasi per la detossificazione dei metalli pesanti e altri ancora sono correlati alla sorveglianza dei patogeni, alla riduzione dei sintomi di malattia e del danneggiamento indotto dall'accumulo dei ROS. Anche il meccanismo legato alla risposta del segnale di ABA è stato stimolato. Gli HA inducono l'espressione di geni non solo direttamente coinvolti nella risposta allo stress (*functional genes*), ma anche codificanti per proteine (TFs) che regolano la trasduzione del segnale e l'espressione di altri geni. Allora il priming è uno straordinario strumento di prevenzione poiché consente l'espressione genica anche in assenza dello stress (Canellas et al., 2020).

È noto che alte concentrazioni di sale nel suolo causano un generale disturbo dell'omeostasi degli ioni, problemi osmotici e stress ossidativi e, in definitiva, limitano la crescita e riducono le rese. Tra i rimedi possibili, l'acclimatamento ai cambiamenti ambientali esterni consiste in "aggiustamenti interni tra tessuti e cellule abilitando il metabolismo della pianta a procedere sotto qualsiasi condizione alterata" (Souza et al., 2021). In uno studio di Souza et al. (2021), plantule di mais e pomodoro sono state preconditionate con HA e trattate con una certa concentrazione di NaCl. Nel primo caso il priming ha avuto come effetto immediato l'aumento del peso fresco di germoglio e radice che si è mantenuto in maniera significativa (+35% e +30% rispettivamente) anche

dopo l'esposizione allo stress. L'analisi trascrittomico ha rivelato che molti geni della famiglia SOS, legati alla detossificazione da Na⁺ e coinvolti nella regolazione dell'omeostasi osmotica, e alcuni codificanti per chinasi sono stati trovati ad un alto livello di trascrizione in mais. In pomodoro la conduttanza stomatica e la traspirazione, che erano state ridotte a metà e del 37% con NaCl, non sono diminuite nelle piante pretrattate, nelle quali si sono riscontrati anche aumenti dell'attività delle H⁺-ATPasi, una mancata inibizione della nitrato reductasi e una membrana più integra. In generale, si è assistito ancora a un aumento della concentrazione di calcio, dell'attività delle pompe protoniche e della trascrizione di altri geni codificanti per proteine coinvolte nelle pathways di segnalazione ormonale (Souza et al., 2021).

Tabella 2 Riassunto delle proprietà delle sostanze umiche

Suolo	Nutrienti e metabolismo della pianta	Sistemi di difesa	Servizi ecosistemici
1. capacità cementante: aggregazione dei colloid minerali e aumento della stabilità e della macroporosità 2. capacità di ritenzione idrica 3. mantenimento della temperatura del suolo 4. colore scuro 5. capacità tampone 6. elevata CSC 7. capacità chelante 8. rendono il suolo resistente al compattamento	1. aumento della biodisponibilità dei nutrienti nel suolo 2. regolazione dell'assorbimento dei nutrienti 3. regolazione del trasporto dei nutrienti 4. regolazione dell'assimilazione dei nutrienti 5. hanno effetti morfogenetici e modificano l'architettura radicale stimolando il meccanismo della crescita 6. stimolano la rizodeposizione 7. influenzano il numero e la composizione delle comunità batteriche 8. partecipano al crosstalk radice-suolo-microrganismi	1. promozione delle vie di ricezione e trasduzione dei segnali ormonali 2. espressione dei geni di risposta agli stress 3. stimolano l'attività enzimatica 4. biosintesi di metaboliti secondari di difesa 5. sequestro di specie ossidanti 6. induzione di resistenza 7. modulazione della traspirazione, della conduttanza stomatica, dell'omeostasi degli ioni, della pressione osmotica 8. regolazione del crosstalk ormonale 9. sono agenti di priming	1. sequestro del carbonio atmosferico 2. prevenzione dell'erosione del suolo 3. capacità di chelare gli inquinanti 4. utilizzo nel biorisanamento

CAPITOLO 4

4.1 Dati di campo sugli effetti biostimolanti delle sostanze umiche

Per poter valutare a pieno la sostenibilità delle sostanze umiche come biostimolanti è necessario dare uno sguardo ai dati di campo anche se in letteratura se ne trovano pochi. Un' applicazione fogliare su aglio ha fatto registrare un aumento degli spicchi esterni per bulbo, della loro massa fresca e secca, del loro calibro e della pungenza (Balmori et al., 2019). Su vite hanno stimolato un aumento dell'attività fotosintetica, della clorofilla totale, del contenuto di solidi solubili, del peso e delle dimensioni medie della bacca (Jindo et al., 2022). In particolare, uno studio condotto su uva da tavola cv Italia con applicazione fogliare di HA a diverse dosi (Ferrara e Brunetti, 2008) ha rilevato un aumento della lunghezza del germoglio (+14%), un aumento della clorofilla totale e del contenuto di azoto nella lamina e nel picciolo. In merito alle caratteristiche del frutto, c'è stato un aumento della resa in kg per vite da 28,2 del controllo a 29,9 e 32,2 delle piante trattate, della lunghezza della bacca da 23,8 mm a 24,5 mm e dei solidi solubili e una diminuzione dell'acido tartarico. Invece, Delfine et al. (2005) hanno concluso che gli effetti degli acidi umici su frumento in ambiente mediterraneo sono insoddisfacenti.

Gli EOs (Essential Oils) sono metaboliti secondari bioattivi delle piante aromatiche usate nel settore farmaceutico e terapeutico. Sono terpeni e fenilpropanoidi con proprietà antibatteriche, antifungine e antiossidanti. Da compost da residui di stocchi di mais e carciofo sono state prodotte HS ricche di carbonio aromatico e di catene alifatiche lineari delle molecole lipidiche. Applicandone gli estratti su basilico si è assistito a un aumento del peso fresco tra il 16 e il 25% attribuito dagli autori al rilascio di componenti fenoliche con capacità biostimolante. In generale, la resa di EOs (in particolare eugenolo e metil-eugenolo) è aumentata rispetto al controllo da 0,34 mg/g a 0,54 e 0,61 mg/g con dosi di 50 e 100 g/l di HS. Si è inoltre osservato un incremento dell'attività antibatterica contro Gram negativi, dovuta alla capacità delle sostanze fenoliche di distruggere la parete cellulare, e dell'attività antiossidante cresciuta tra il 12

e il 22%. Tutti questi effetti sono stati attribuiti dagli autori alla capacità delle piccole molecole fenoliche bioattive contenute nelle HS di influenzare la via dell'acido scichimico, la sintesi dei fenilpropanoidi, l'attività della PAL e delle perossidasi (Verrillo et al., 2021).

4.2 Proprietà del vermicompost come matrice organica per le sostanze umiche

Molte sono le matrici organiche utilizzabili in campo e da cui si possono estrarre le sostanze umiche, ma la più usata è certamente il vermicompost. Infatti, "il vermicompostaggio è un processo di ossidazione biologico non termofilo nel quale il materiale organico si converte in una matrice organica complessa altamente umificata e stabilizzata detta vermicompost [...] che possiede alta porosità, trattenuta idrica e attività microbica" (Silva e Canellas, 2022). È la conseguenza dell'attività combinata dei lombrichi e dei microbi a loro associati e la sua qualità dipende dalla matrice, dal tipo di lombrichi, dalle condizioni ambientali e dalla maturità. Elenchiamo di seguito alcune proprietà (Yatoo et al., 2021):

1. produzione di HS e velocità di umificazione maggiore (1-2 mesi) rispetto al compost (almeno 5 mesi) grazie all'attività dei lombrichi che ospitano microrganismi ed enzimi idrolitici;
2. si degrada in molecole di piccole dimensioni ma molto stabili;
3. ottimi parametri chimici come pH, conduttività e stato dei nutrienti che migliorano resa e crescita delle colture: aumento del 26% della produzione commerciale e del 13% della biomassa totale. Riduzione dei metalli pesanti;
4. alto potenziale di ritenzione idrica;
5. è fonte concentrata e a lungo termine di micro e macronutrienti facilmente assimilabili; l'azoto, ad esempio, è presente come nitrato grazie all'attività di batteri e funghi mesofili;
6. minore EC (Electrical Conductivity) rispetto al compost;
7. preserva e ristora la fertilità del suolo, ne migliora areazione e porosità;

8. accresce la biodiversità del suolo migliorando la biomassa microbica utile (*Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Nitrobacter* spp.) anche grazie alle feci dei lombrichi altamente nutritive e ricche in umato di calcio;
9. contiene batteri azotofissatori e fosforo solubilizzatori;
10. presenza di acidi umici, vitamine, enzimi difensivi e ormoni come gibberelline, auxine, citochinine;
11. consente una forma di controllo biologico: può sopprimere o controllare malattie, nematodi e fitopatogeni del suolo grazie anche alla produzione di antibiotici e alla presenza di microrganismi antagonisti e attinomiceti, che competono con i patogeni per i nutrienti o li parassitizzano o predano. Induce nella pianta resistenza contro i parassiti ed è utilizzabile in interventi di biofortificazione contro *Fusarium oxysporum*. I lombrichi possono controllare alcuni parassiti artropodi;
12. buon sostituto dei fertilizzanti inorganici;
13. migliora germinazione e resa.

Il vermicompost *tea*, invece, è una soluzione derivata dalla macerazione del vermicompost. Contiene anch'esso molti microrganismi che possono indurre resistenza sistemica contro i patogeni: infatti, riduce la crescita miceliale di *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* e *Corticium rolfsii* e inibisce *Fusarium oxysporum*. Inoltre, mostra tossicità contro alcuni nematodi dannosi e, quando spruzzato, può promuovere l'inoculo di organismi antagonisti che agiscono contro i patogeni distruggendoli o producendo composti tossici, mentre i fenoli contenuti rendono la foglia sgradevole agli insetti; aumenta anche il numero e la diversità dei microrganismi attivi e dei nematodi predatori.

4.3 Servizi ecosistemici generati dalle sostanze umiche

Il concetto di economia circolare che abbiamo definito all'inizio, si concretizza nel fatto che le sostanze umiche possono essere estratte da sottoprodotti dell'agricoltura, dagli effluenti zootecnici palabili compostati o da scarti delle bioraffinerie. La sostenibilità delle sostanze umiche passa anche attraverso la loro

capacità di fornire servizi ecosistemici. L'umeoma, infatti, rappresenta il pool di carbonio del suolo (SOC, Soil Organic Carbon) più importante. Come abbiamo visto, il processo di umificazione porta alla formazione di composti idrofobici meno decomponibili e più persistenti, poiché tale struttura li protegge dall'acqua e dalla degradazione microbica. Le molecole vengono poi adsorbite sulle superfici dei minerali da forze non covalenti dando vita a un accumulo stabile di carbonio, contribuendo al sequestro della CO₂ atmosferica. La formazione di aggregati con le particelle di argilla consente inoltre di ridurre drasticamente il fenomeno dell'erosione. Le sostanze umiche sono anche un "tampone ambientale" poiché controllano il destino degli inquinanti nei suoli e nei sistemi acquosi, complessandoli attraverso i gruppi funzionali e diminuendone così l'adsorbimento sulla superficie minerale. Questa proprietà viene anche sfruttata nelle tecniche di biorisanamento poiché, rispetto ai prodotti chimici, le HS causano una minore alterazione del suolo (Piccolo et al., 2019).

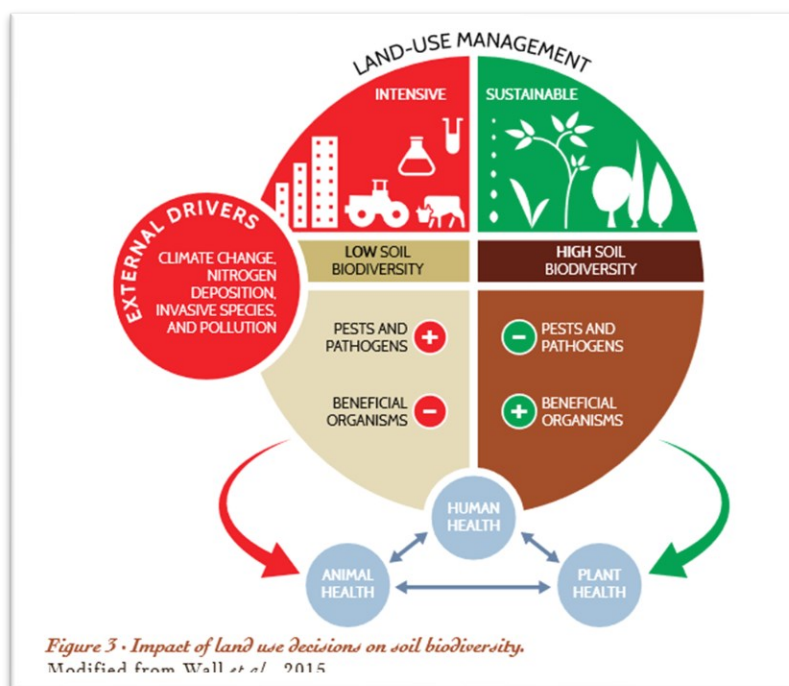


Figura 8 L'importanza della sostanza organica nel suolo (FAO, 2017 «Soil Organic Carbon: The Hidden Potential»)

CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo lavoro era quello di verificare la possibilità di utilizzare le sostanze umiche come biostimolanti al fine di ridurre l'utilizzo sempre più eccessivo e sproporzionato dei fertilizzanti e dei pesticidi di sintesi. Infatti, questa pratica ha comportato ingenti danni non soltanto per l'ambiente e per la salute dell'uomo, ma anche per l'agricoltura stessa rivelandosi controproducente, poiché è stata compromessa la salute del suolo rendendolo inospitale per la coltivazione delle piante agrarie o riducendone le rese. La corsa verso un'agricoltura sostenibile è ineluttabile, ma è necessario valutare con cura quali sono gli strumenti più adatti a raggiungere questo scopo, poiché la sostenibilità ambientale va sempre accompagnata da quella economica e sociale. Le sostanze umiche, che si presentano come un aggregato supramolecolare e polidisperso di molecole organiche, si formano attraverso il processo di umificazione e vengono estratte con soluzione alcalina dai sottoprodotti agricoli, dagli scarti dei biodigestori, dagli effluenti zootecnici palabili e dai rifiuti organici urbani inserendosi così all'interno del concetto di economia circolare. Grazie a particolari proprietà conferite dalla struttura conformazionale, sono in grado di interagire e dialogare attivamente con i diversi attori del suolo rizosferico. Le piante estraggono le componenti a basso peso molecolare che a loro volta si comportano come bioeffettori, influenzandone significativamente l'espressione genica, la morfologia e la fisiologia. Colture più pronte nella risposta alle avversità biotiche e abiotiche e più efficienti nell'assorbimento e nella assimilazione dei nutrienti saranno in grado di produrre di più, ma con una minore quantità di input. Un suolo sano, ricco in sostanza organica e con un elevato numero di comunità microbiche benefiche è di certo più adatto a sostenere le produzioni agrarie e meno ospitale per alcuni tipi di patogeni. Tuttavia, le sostanze umiche non hanno degli effetti standardizzabili e sempre uguali in qualsiasi condizione, poiché la capacità di agire come bioeffettori dipende fortemente dalla materia prima, dalla dose e dalla specie su cui vengono applicate. Ancora pochi, inoltre, sono gli studi effettuati sulla convenienza economica del loro utilizzo in pieno campo. In generale, però, si può affermare che le sostanze umiche rappresentano sicuramente una strada privilegiata verso una agricoltura sostenibile poiché, integrandosi con i prodotti di

sintesi, ne potranno consentire una migliore efficienza d'uso e dunque una significativa riduzione, senza per questo diminuire i profitti, ma incrementandoli e contribuendo a ridurre l'impatto ambientale del settore primario.

BIBLIOGRAFIA/SITOGRAFIA

Baldock, J. e Paul, N. 2000. «Soil organic matter». In *Nature*, 194:B25–84. <https://doi.org/10.1038/194324b0>.

Balmori, D. M., Domínguez C. Y. A., Carreras C. R., Rebatos S. M., Fariás L. B. P., Izquierdo F. G., Berbara R. L. L., e García, A. C. 2019. «Foliar application of humic liquid extract from vermicompost improves garlic (*Allium sativum* L.) production and fruit quality». *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture* 8 (1): 103–12. <https://doi.org/10.1007/s40093-019-0279-1>.

Biostimolanti: ritorno economico, effetti ambientali e criticità normative. <https://agronotizie.imagelinenetwork.com/fertilizzazione/2023/03/07/biostimolanti-ritorno-economico-effetti-ambientali-e-criticita-normative/78534>, marzo 2023

Bisht, N., Puneet, S. C. 2020. *Excessive and Disproportionate Use of Chemicals Cause Soil Contamination and Nutritional Stress. Soil Contamination - Threats and Sustainable Solutions*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94593>.

Canellas, L. P., Canellas, N. O. A., Souza da Silva Irineu, L. E., Olivares, F. L., e Piccolo, A. 2020. «Plant Chemical Priming by Humic Acids». *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 7 (1): 12. <https://doi.org/10.1186/s40538-020-00178-4>.

Canellas, L. P., Olivares, F. L., Canellas, N. O. A., Mazzei, P., e Piccolo, A. 2019. «Humic acids increase the maize seedlings exudation yield». *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 6 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/s40538-018-0139-7>.

Carfagna, S., Esposito S., La Rocca, N., Lo Gullo, M. A., Trafilò, P., Trost, P. e Vona, V. 2021. *Elementi di fisiologia vegetale*. Edises.

Castiglioni, L. e Mariotti, S. 2019. *Il vocabolario della lingua latina. Latino-italiano, italiano-latino-Guida all'uso*. Loescher.

Colla, G. 2019. *Biostimolanti per un'agricoltura sostenibile. Cosa sono, come agiscono e modalità di utilizzo*. L'Informatore Agrario.

Cortignani, R. 2022. Costi e benefici dell'impiego dei biostimolanti in orticoltura. In Atti convegno Biostimolanti tra sostenibilità e cambiamento climatico: ricerca, strategie ed esperienze in campo. 25 novembre 2022, Legnaro

De Nobili, M., Bravo, C., e Chen, Y. 2020. «The Spontaneous Secondary Synthesis of Soil Organic Matter Components: A Critical Examination of the Soil Continuum Model Theory». *Applied Soil Ecology* 154 (ottobre): 103655. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103655>.

Delfine, S., Tognetti, R., Desiderio, E., e Alvino, A. 2005. «Effect of Foliar Application of N and Humic Acids on Growth and Yield of Durum Wheat». *Agronomy for Sustainable Development* 25 (2): 183–91. <https://doi.org/10.1051/agro:2005017>.

EBIC, Plant Biostimulants contribute to Climate-Smart Agriculture, <https://biostimulants.eu/issue/plant-biostimulants-contribute-to-climate-smart-agriculture/>, marzo 2023.

Erro, J., Urrutia, O., Baigorri, R., Fuentes, M., Zamarreño, A. M. e Garcia-Mina, J. M. 2016. «Incorporation of humic-derived active molecules into compound NPK granulated fertilizers: main technical difficulties and potential solutions». *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 3 (1): 18. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0071-7>.

FAO. 2022. *Inorganic Fertilizers 1990–2020*. FAOSTAT Analytical Briefs 47. Rome, Italy: FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0947en>.

Ferrante, A. 2019. «Biostimolanti in agricoltura: presupposti scientifici e applicazioni pratiche». *EDAGRICOLE UNIVERSITÀ & FORMAZIONE*.

Ferrara, G. e Brunetti, G. 2008. «Influence of Foliar Applications of Humic Acids on Yield and Fruit Quality of Table Grape Cv. Italia». *OENO One* 42 (2): 79. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2008.42.2.822>.

Galambos, N., Compant, S., Moretto, M., Sicher, C., Puopolo, G., Wäckers, F., Sessitsch, A., Pertot, I. e Perazzolli, M. 2020. «Humic Acid Enhances the Growth of Tomato Promoted by Endophytic Bacterial Strains Through the Activation of Hormone-, Growth-, and Transcription-Related Processes». *Frontiers in Plant Science* 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.582267>.

Grignani, C. 2016. *Fertilizzazione sostenibile. Principi, tecnologie ed esempi operativi*. Edagricole.

Jindo, K., Goron, T. L., Paloma Pizarro-Tobías, Sánchez-Monedero M. A., Audette, Y., Ayodeji, O., Deolu-Ajayi, van der Werf, A., et al. 2022. «Application of Biostimulant Products and Biological Control Agents in Sustainable Viticulture: A Review». *Frontiers in Plant Science* 13 (ottobre): 932311. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.932311>.

Lehmann, J., e Kleber, M. 2015. «The contentious nature of soil organic matter». *Nature* 528 (7580): 60–68. <https://doi.org/10.1038/nature16069>.

Muscolo, A., Sidari, M., e Nardi, S. 2013. «Humic Substance: Relationship between Structure and Activity. Deeper Information Suggests Univocal Findings». *Journal of Geochemical Exploration* 129 (giugno): 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.10.012>.

Nardi, S., Ertani, A., e Francioso, O. 2017. «Soil–Root Cross-talking: The Role of Humic Substances». *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 180 (1): 5–13. <https://doi.org/10.1002/jpln.201600348>.

Nardi, S., Schiavon, M. e Francioso, O. 2021. «Chemical Structure and Biological Activity of Humic Substances Define Their Role as Plant Growth Promoters». *Molecules* 26 (8): 2256. <https://doi.org/10.3390/molecules26082256>.

Olivares, F. L., Busato, J. G., de Paula, A. M., da Silva Lima, L., Oliveira Aguiar, N. e Canellas L. P. 2017. «Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action». *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4 (1): 30. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0112-x>.

Pazhanisamy, S, Sai Linga Reddy, e Rodda Chandana Devi, 2019. «Effect of Humic Substance in Soil and Plant System: A Review». *International Journal of Chemical Studies*.

Piccolo, A., Spaccini, R., Savy, D., Drosos, M. e Cozzolino, V. 2019. «The Soil Humeome: Chemical Structure, Functions and Technological Perspectives». In *Sustainable Agrochemistry: A Compendium of Technologies*, a cura di Sílvia Vaz Jr., 183–222. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-17891-8_7.

Pinton, R., Cesco, S., e Varanini, Z. 2009. «Role of Humic Substances in the Rhizosphere». In *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems*, a cura di Nicola Senesi, Baoshan Xing, e Pan Ming Huang, 341–66. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470494950.ch9>.

Rajabi Hamedani, S., Roupheal, Y., Colla, G., Colantoni, A. e Cardarelli, M. 2020. «Biostimulants as a Tool for Improving Environmental Sustainability of Greenhouse Vegetable Crops». *Sustainability* 12 (12): 5101. <https://doi.org/10.3390/su12125101>.

Regolamento (UE) 2019/1009 del Parlamento europeo e del Consiglio

Silva, R. M. e Canellas, L. P. 2022. «Organic Matter in the Pest and Plant Disease Control: A Meta-Analysis». *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 9 (1): 70. <https://doi.org/10.1186/s40538-022-00332-0>.

Sequi, P. 2017. *Fondamenti di chimica del suolo*. Pàtron.

Souza, A. C., Olivares, F. L., Pereira Peres, L. E., Piccolo, A. e Canellas, L. P. 2022. «Plant Hormone Crosstalk Mediated by Humic Acids». *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 9 (1): 29. <https://doi.org/10.1186/s40538-022-00295-2>.

Souza, A. C., Basílio Zandonadi, D., Pupo Santos, M., Oliveira Aguiar Canellas, N., Cleiton de Paula, S., Souza da Silva Irineu L. E., de Rezende, C. E. et al. 2021. «Acclimation with humic acids enhances maize and tomato tolerance to salinity». *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 8 (1): 40. <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00239-2>.

Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S. e Nardi, S. 2010. «Humic Substances Biological Activity at the Plant-Soil Interface: From Environmental Aspects to Molecular Factors». *Plant Signaling & Behavior* 5 (6): 635–43. <https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11211>.

Vaccaro, S., Ertani A., Nebbioso, A., Muscolo, A., Quaggiotti, S., Piccolo, A. e Nardi, S. 2015. «Humic Substances Stimulate Maize Nitrogen Assimilation and Amino Acid Metabolism at Physiological and Molecular Level». *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 2 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/s40538-015-0033-5>.

Verrillo, M., Cozzolino, V., Spaccini, R., e Piccolo, A. 2021. «Humic Substances from Green Compost Increase Bioactivity and Antibacterial Properties of Essential Oils in Basil Leaves». *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 8 (1): 28. <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00226-7>.

Violante, P. 2013. *Chimica e fertilità del suolo*. Edagricole Bologna, Italy.

Yatoo, A. M., Md Niamat Ali, Zahoor Ahmad Baba, e Birjees Hassan. 2021. «Sustainable Management of Diseases and Pests in Crops by Vermicompost and Vermicompost Tea. A Review». *Agronomy for Sustainable Development* 41 (1): 1–26. <https://doi.org/10.1007/s13593-020-00657-w>.

Zanin, L., Tomasi, N., Cesco, S., Varanini, Z. e Pinton, R. 2019. «Humic Substances Contribute to Plant Iron Nutrition Acting as Chelators and Biostimulants». *Frontiers in Plant Science* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00675>.