

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie ed Alimentari (DISPA)

**Dottorato di Ricerca in Produttività delle Piante Coltivate in Ambiente Mediterraneo
XXVI CICLO**

Dott.ssa Valeria Cadili

**USO DI BIOMASSE DI SCARTO DELL'ATTIVITÀ
AGRO-INDUSTRIALE PER IL MIGLIORAMENTO
DELLA PRODUZIONE AGRICOLA**

Dissertazione Finale

**Coordinatore:
Chiar.ma Prof.ssa D. Romano**

**Tutor:
Dott. A. Baglieri**

Triennio 2010-2013

Indice

1.Prefazione	4
1.1 Ormoni	8
1.1.1 <i>Le auxine</i>	10
1.1.2 <i>Le gibberelline</i>	13
1.1.3 <i>Le citochinine</i>	15
1.2 Biostimolanti e loro effetti sulla crescita e sul metabolismo delle piante	17
1.2.1 <i>Prodotti ad attività biostimolante</i>	19
1.2.1.1 <i>Sostanze umiche</i>	19
1.2.1.2 <i>Alghe</i>	24
1.2.1.3 <i>Idrolizzati proteici</i>	24
1.3 Assorbimento ed assimilazione dell'azoto nelle piante superiori	26
1.4 Enzimi	29
1.4.1 <i>Enzima nitrato reduttasi</i>	30
1.4.2 <i>Enzima glutammato sintetasi</i>	31
1.4.3 <i>Enzima glutammato sintetasi NADH-dipendente</i>	31
1.5 Pigmenti fotosintetici	32
1.5.1 <i>Clorofilla</i>	32
1.5.2 <i>Carotenoidi</i>	33
2.Bibliografia Prefazione	35
3. Scopo dell'attività sperimentale	41
4. Parte sperimentale	42
4.1 <i>Paper N° 1</i>	43
<i>Ertani A., Pizzeghello D., Baglieri A., Cadili V., Tambone F., Gennari M., Nardi S. (2013). Humic-like substances from agro-industrial residues affect growth and nitrogen assimilation in maize (Zea mays L.) plantlets. Journal of Geochemical Exploration, 129, 103-111.</i>	
Riassunto	44
Introduzione	44
Materiali e metodi	45
<i>Sostanze umo-simili (HL)</i>	45
<i>Caratterizzazione di base di HL</i>	45
<i>Spettroscopia FT-IR</i>	45
<i>Spettroscopia CPMAS 13C-NMR</i>	45
<i>Quantificazione dell'acido indolacetico</i>	45

<i>Attività fitormonale-simile</i>	46
<i>Materiali pianta</i>	46
<i>Analisi di azoto totale, nitrati e proteine solubili</i>	46
<i>Determinazione del contenuto di clorofilla</i>	46
<i>Estrazione enzimi e condizioni di analisi</i>	46
Analisi statistica	47
Risultati e discussioni	47
<i>Caratterizzazione di base di HL</i>	47
<i>Spettri FT-IR</i>	47
<i>Analisi ¹³C CP MAS NMR</i>	47
<i>Caratteristiche biochimiche di HL</i>	48
<i>Attività auxina-simile</i>	48
<i>Attività biologica del mais</i>	49
Bibliografia	51
4.2 Paper n° 2	53
<i>Baglieri A., Cadili V., Mozzetti Monterumici C., Tabasso S., Nardi S., Nègre M., Montoneri E. (2013). Elevata valorizzazione della produzione di biomassa, contenuto di clorofilla ed assimilazione di N in piante di fagiolo, coltivate con basse dosi di idrolizzati vegetali di pomodoro. Inviato a rivista Journal of Agricultural and Food Chemistry.</i>	
Riassunto	54
Introduzione	55
Materiali e metodi	56
<i>Sostanze solubili ed insolubili originare da piante di pomodoro e reagenti</i>	56
<i>Analisi chimiche</i>	57
<i>Prove di crescita pianta</i>	57
<i>Determinazione del contenuto di clorofilla</i>	57
<i>Estrazione degli enzimi e condizioni di analisi</i>	58
<i>Determinazione delle proteine solubili</i>	58
Analisi statistica	59
Risultati e discussione	59
Conclusioni	66
Bibliografia	67

1. Prefazione

Nel settore agricolo, l'attività di ricerca è stata per molti anni indirizzata verso il miglioramento delle rese produttive delle colture, ponendo poca attenzione alla qualità del prodotto ottenuto ed alla tutela dell'ambiente.

L'eccessivo sfruttamento del terreno agrario ha così determinato un notevole impoverimento del contenuto di sostanza organica, tale da comprometterne la fertilità. La coltivazione intensiva porta ad una riduzione dell'attività biologica, determinando una diminuzione rapida degli elementi nutritivi organici ed inorganici, ma anche un declino delle qualità fisiche del suolo.

Tuttavia, negli ultimi anni, per molte specie d'interesse agrario, ha assunto un ruolo secondario, la produzione mirata alla quantità dei prodotti ottenuti e, nello stesso momento, è stato attribuito maggior rilievo alla salvaguardia ambientale ed alla limitazione dei costi di produzione.

Si sta, quindi, cercando di razionalizzare l'utilizzo dei fertilizzanti, per ridurre i rischi d'inquinamento ambientale, dovuto soprattutto alla lisciviazione dei macroelementi (ad es. azoto sotto forma nitrica), seguendo anche le disposizioni della politica agricola comunitaria, italiana e regionale.

Una strategia per contrastare la diminuzione della sostanza organica nel suolo, ed allo stesso tempo conservare la produttività delle piante, potrebbe prevedere l'utilizzo di residui agro-industriali.

A livello mondiale, dal settore agricolo vengono generati ogni anno 140 miliardi di tonnellate di biomassa, che possono essere convertite in energia e materie prime. Le biomasse di origine agricola potrebbero sostanzialmente sostituire i combustibili fossili, ridurre le emissioni di gas serra e fornire energia rinnovabile per circa 1,6 miliardi di persone nei paesi in via di sviluppo, che non hanno ancora accesso all'elettricità. Gli scarti di biomassa sono potenzialmente interessanti per le grandi industrie ed imprese. La biomassa è ottenuta da residui di steli, paglia, foglie, radici, noci e semi, legno di scarto e rifiuti dell'allevamento degli animali. La biomassa è, quindi, una risorsa importante poiché ampiamente disponibile, rinnovabile e praticamente gratuita.

Con la campagna globale per combattere il cambiamento climatico, i paesi sono ora alla ricerca di fonti alternative di energia per ridurre il gas serra (GHG). L'uso della biomassa per l'energia riduce la dipendenza dal consumo di combustibili fossili, di conseguenza, contribuisce alla sicurezza energetica ed alla riduzione dei cambiamenti climatici. La biomassa è una risorsa rinnovabile che ha una fornitura costante ed abbondante, soprattutto quella ottenuta dai sottoprodotti dell'attività agricola. Il suo utilizzo può ridurre le emissioni di gas serra e ridurre l'utilizzo di altri combustibili; può fornire reddito aggiuntivo agli agricoltori, senza compromettere la produzione di prodotti alimentari e non.

Inoltre, le biomasse possono essere utilizzate per recuperare energia mediante l'adozione di tecnologie quali la fermentazione anaerobica o la combustione.

Le biomasse, inoltre, pur avendo un valore residuo energetico, svolgono un ruolo importante come fertilizzanti del suolo, per la loro natura organica. Oltre ad un impiego diretto, le biomasse possono essere somministrate al terreno sotto forma di compost.

Il compost, detto anche terriccio o composta, è il risultato della decomposizione e dell'umificazione di un misto di materie organiche rappresentate, ad esempio, da residui di potatura, scarti di cucina, letame, liquame o rifiuti del giardinaggio (foglie ed erba sfalciata), da parte di macro e microrganismi in condizioni particolari: presenza di ossigeno ed equilibrio tra gli elementi chimici della materia coinvolta nella trasformazione.

Il compostaggio, o biostabilizzazione, tecnicamente è un processo biologico di tipo aerobico, controllato dall'uomo, nel corso del quale i microrganismi (batteri e funghi) presenti nell'ambiente, attaccano e degradano la sostanza organica presente nella matrice utilizzata. I microrganismi traggono così energia per le loro attività metaboliche, dando origine ad una serie di reazioni biochimiche che liberano come prodotti finali acqua (inizialmente sotto forma di percolato e poi di vapore acqueo), anidride carbonica, sali minerali e, dopo alcuni mesi di trasformazione, sostanza organica stabilizzata ricca di humus, definita compost o compostato (dal latino *compositum*, costituito da più materiali). Questo processo è un vero e proprio sistema vivente che in natura si verifica spontaneamente; esempi di decomposizione spontanea sono la trasformazione della lettiera del bosco o la maturazione del letame. Questi processi sono, però, caratterizzati da tempi di trasformazione molto lunghi e da una certa discontinuità legata al variare delle condizioni ambientali.

Il compostaggio, invece, è un processo che avviene in condizioni controllate e che si differenzia dal fenomeno naturale per la maggiore velocità di svolgimento ed il notevole sviluppo di calore. Al termine del processo si ottiene un residuo organico umificato (humus) che, una volta immesso nel terreno, si decompone lentamente, migliorandone le proprietà e le caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche (Collana ambiente 25, "Il compostaggio: processo tecniche e applicazione", Regione Piemonte, Assessorato Ambiente, 2002). I vantaggi del compostaggio sono notevoli in quanto il processo impiega principalmente materiali di scarto di attività agricole, urbane ed industriali: prodotti a volte dannosi per l'ambiente e costosi da smaltire.

Il compost può essere utilizzato come fertilizzante su prati o prima dell'aratura.

L'utilizzo di compost di qualità consente un miglioramento della struttura del suolo, apportando sostanza organica che ne migliora la fertilità.

Considerato il contenuto di elementi nutritivi (azoto, fosforo e potassio) presenti nel compost, si determina un risparmio nell'uso di concimi chimici.

I vantaggi elencati sono comunque subordinati alla conduzione dell'intero processo di compostaggio in condizioni controllate e con particolare attenzione agli aspetti gestionali, partendo dalla scelta dei materiali per la formazione della miscela, fino ad arrivare al trattamento di raffinazione finale.

Nell'ultimo decennio, in Italia, è cresciuto l'utilizzo del compost in agricoltura più di qualsiasi altro fertilizzante organico. Il compostaggio delle biomasse derivanti dagli scarti agroindustriali, rifiuti organici urbani e scarti di aziende agricole, è uno strumento importante per riportare ai terreni agricoli quote di sostanza organica essenziale, per mantenere la fertilità dei terreni e per ridurre l'immissione di carbonio in atmosfera.

Per contrastare la scarsa fertilità dei suoli negli ultimi anni si è assistito, oltre al massiccio utilizzo di sostanze ad azione concimante, insetticida, erbicida, fungicida, battericida, anche a sostanze che influenzino il metabolismo ormonale delle piante, dette biostimolanti.

“Per biostimolante si intende qualsiasi prodotto naturale o sintetico, minerale od organico caratterizzato da diverse azioni e modalità d'uso in grado di contribuire positivamente al miglioramento della nutrizione e allo sviluppo delle specie vegetali” (Ertani, 2009).

Da un punto di vista normativo, la categoria merceologica specifica per i “Biostimolanti” è stata inserita il 5 luglio 2006, data in cui è entrato in vigore il Decreto Legislativo 29 aprile 2006 n. 217 “Revisione della disciplina in materia di fertilizzanti (D.Lgs. 217/06), pubblicato sulla G.U. n. 141 del 20 giugno 2006- Supplemento ordinario n. 152.

Il primo atto legislativo in cui è apparso il termine “Biostimolante”, è il Decreto Ministeriale 7 dicembre 2001, nelle Premesse degli Allegati 1.B ed 1.C della Legge 748/84. Tale Decreto Ministeriale ha stabilito che “I prodotti ad attività biostimolante sono inseriti nell'elenco dei concimi nazionali o concimi, previa approvazione da parte della competente autorità del relativo metodo di analisi” (D.M. 7 dic. 2001). Mancava, però un metodo ufficiale per l'accertamento e la determinazione quali-quantitativa dell'attività biostimolante e, quindi, la normativa non poteva consentire l'inserimento di prodotti senza che essi potessero essere controllati dall'autorità competente. Dopo la pubblicazione del D.Lgs. 217/06, molti degli ostacoli sono stati superati. Nell'Articolo 2 del Decreto legislativo precedentemente citato, si legge: “1. Ai sensi del presente decreto si intendono per «fertilizzanti» qualsiasi prodotto o materiale di seguito definito: [...] cc) «prodotti ad azione specifica»: *i prodotti che apportano ad un altro fertilizzante e/o al suolo e/o alla pianta, sostanze che favoriscono o regolano l'assorbimento degli elementi nutritivi o correggono*

determinate anomalie di tipo fisiologico, i cui tipi e caratteristiche sono riportati nell'allegato 6".

“Per tali prodotti è obbligatorio descrivere in etichetta dosi da impiegare e modalità d’uso” (D.M. 7 dicembre 2001). Per ottimizzarne l’utilizzo, bisogna fissare le dosi e le modalità d’uso adeguate, essendo prodotti che esplicano la loro attività a dosi molto più basse rispetto ai tradizionali concimi e che le modalità d’impiego possono cambiare in relazione alla specie vegetale, allo stato fenologico della pianta, al clima e così via. Un altro aspetto importante preso in considerazione riguarda la presenza di fitormoni; il Decreto 217/06, stabilisce che “L’attività biostimolante non deve derivare dall’addizione di sostanze ad azione fitormonale al prodotto”. Questa è una precisazione importante, in quanto estratti di origine vegetale possono contenere per natura fitormoni. Lo stesso decreto, riguardo la possibilità di utilizzare miscele di prodotti con attività biostimolante con altri fertilizzanti, sancisce: “Salvo approvazione della Commissione tecnico consultiva di cui all’Art. 9, non è consentito dichiarare proprietà biostimolanti alle miscele dei prodotti di questa sezione con altri fertilizzanti”. Le proprietà biostimolanti di un fertilizzante, quindi, non possono essere trasferite *sic et simpliciter* ad una miscela, ma debbono essere comprovate da prove sperimentali *ex novo*. La commissione tecnico consultiva si occupa di esaminare la nuova istanza che si riferisce al prodotto ottenuto dalla miscela di un biostimolante e di un fertilizzante. Con l’entrata in vigore del D.Lgs 217/06, solo a due prodotti sono riconosciute le proprietà biostimolanti: idrolizzato proteico di erba medica ed epitelio animale idrolizzato (solido e fluido).

1.1 Ormoni

Un ormone (dal greco *ὀρμάω*- "mettere in movimento") è un messaggero chimico che trasmette segnali da una cellula (od un gruppo di cellule) ad un'altra cellula (od altro gruppo di cellule). Tale sostanza è prodotta da un organismo con il compito di modularne il metabolismo o l'attività dei tessuti ed organi dell'organismo stesso.

Gli ormoni negli animali sono classificati, in base alla struttura, in tre gruppi:

- ormoni peptidici;
- ormoni steroidei;
- ormoni derivati da amminoacidi.

Gli ormoni peptidici sono costituiti da oligopeptidi o proteine. Vengono sintetizzati sotto forma di preormoni e solo dopo una successiva modificazione divengono attivi.

Gli ormoni peptidici viaggiano nel circolo sanguigno fino ad arrivare alle cellule bersaglio. Qui, essendo polari, non riescono ad oltrepassare la membrana ma si legano a particolari recettori intramembrana. Il loro attacco attiva l'adenilato ciclasi, un enzima che forma AMPc (adenosinmonofosfato ciclico) partendo da ATP (adenosintrifosfato) con attivazione, in seguito a fosforilazione, di tutti gli enzimi necessari per la risposta ormonale.

Gli ormoni steroidei sono di natura lipidica e derivano da un precursore comune che è il colesterolo. La trasformazione del colesterolo in ormoni steroidei interessa una quantità di materiale irrilevante, ma di estrema importanza fisiologica. I corticosteroidi derivano dal colesterolo per rimozione della catena laterale dell'anello D del colesterolo ed aggiunta di atomi di ossigeno nella molecola per formare gruppi chetonici ed ossidrilici.

Gli ormoni steroidei si possono suddividere in due classi:

- glucocorticoidi (es. cortisolo), che regolano il metabolismo dei carboidrati;
- mineralcorticoidi (es. aldosterone), che regolano la concentrazione degli elettroliti nel sangue.

Gli ormoni steroidei formano un gruppo di ormoni lipofili che agiscono sul metabolismo, sulla crescita e sulla riproduzione.

Gli ormoni derivati da amminoacidi sono composti chimici derivati dalla modificazione di amminoacidi. Alcuni esempi sono le catecolamine e gli ormoni tiroidei (tiroxina e triiodotironina) derivanti dall'aminoacido tirosina, la serotonina derivante dal triptofano e l'istamina derivante dall'aminoacido istidina.

La definizione di ormone per la pianta è riconducibile a quella data in fisiologia animale. Essa tuttavia non risulta univoca in quanto, da un punto di vista endocrinologico, gli ormoni sono delle sostanze chimiche sintetizzate da particolari organi, le ghiandole endocrine, che riescono a stimolare processi specifici, anche in regioni lontane dell'organismo. Mentre, Went e Thimann nel 1937 definirono un ormone come “una sostanza che viene prodotta in una parte dell'organismo ed è trasferita ad un'altra parte dove influenza specifici processi fisiologici”. Solo successivamente venne aggiunto che la sostanza deve essere di natura organica e capace di agire in piccolissime quantità ($\leq 1\mu\text{M}$).

Sia nelle piante che negli animali gli ormoni devono essere prodotti dall'organismo ed essere capaci di influenzare un processo fisiologico come regolatore e non come substrato metabolico.

Le piante superiori costituiscono un sistema aperto nel cui ciclo vitale si ripetono gli stessi processi organogenetici; per tale motivo sono detti organismi ad “embriogenesi continua” o ad “ontogenesi ricorrente” in cui i meristemi apicali sono destinati a crescere per tutta l'esistenza dell'organismo. Accanto a questo tipo di crescita si affianca l'autotrofia (dal greco *αυτός*, da *σὲ- τροφή*, nutrimento) ed il loro stretto rapporto con l'ambiente circostante, a differenza degli animali che utilizzano le piante per le loro necessità alimentari.

Negli animali, probabilmente a causa della loro eterotrofia (*ἕτερος*, altro) e del loro movimento, si originano specializzazioni morfologiche numerose e complesse. Nelle piante, invece, si osserva una specializzazione in organi molto più ridotta (frutti, fiori, foglie, fusto, radici); poiché esse sono immobili, hanno un enorme sviluppo in superficie, sia radicale che aereo, ed una struttura cellulare caratterizzata dalla parete cellulare e dal grande vacuolo. Il sistema di regolazione delle piante rispetto a quello degli animali è meno elaborato, con un'apparente riduzione della specificità di azione.

Nelle piante è prevista la formazione di un ormone all'interno di uno specifico sito, a livello del tessuto od in ambiente intracellulare, ma sono quasi assenti organi specializzati allo loro sintesi; la sua traslocazione avviene attraverso un sistema di trasporto e partecipa a precisi processi biochimici.

Ciascun ormone è polivalente risultando capace di regolare, a seconda del tipo di tessuto e secondo le condizioni fisiologiche, sia la crescita, per moltiplicazione e per distensione, sia i fenomeni di differenziamento semplici.

Tra i diversi ormoni si verificano fenomeni d'interazione di tipo additivo, sinergico od antagonista a seconda dei casi.

Ogni ormone, però, può manifestare un'azione specifica in tessuti ben precisi ed in stadi di sviluppo determinati; questa caratteristica permette di valutare l'attività biologica dell'ormone. La risposta fisiologica dell'azione ormonale può variare quantitativamente ma anche qualitativamente quando variano i livelli di concentrazione dell'ormone stesso o se varia il tessuto in cui agisce l'ormone.

La maggior parte dei processi fisiologici delle piante è regolata non da un solo ormone ma dal sistema ormonale nel suo insieme.

Gli ormoni vegetali che partecipano principalmente ai processi delle piante sono le auxine, le gibberelline e le citochinine.

1.1.1 Le auxine

L'auxina (dal greco *αὐξανω*, accrescere) è stato il primo ormone vegetale ad essere identificato ed è rappresentante di un insieme di composti conosciuti col nome di fitormoni. L'insieme degli effetti fisiologici del gruppo delle auxine viene indicato con il termine di proprietà auxiniche. L'auxina è un ormone vegetale in grado di regolare e quindi di stabilizzare l'apice della pianta così che la gemma apicale rimanga più in alto delle gemme secondarie che crescono orizzontalmente dando così la classica forma conica alle giovani piante in fase di crescita. Le auxine sono state scoperte grazie ad osservazioni sul fototropismo dei coleottili delle graminacee. Nella Tabella 1 seguente sono illustrati gli effetti fisiologici dell'attività auxinica.

Tabella 1. Attività ormonale ed i suoi effetti fisiologici.

Cellule organi e tessuti bersaglio	Effetto
Cellule nei fusti e coleottili	Distensione della cellula
Parete cellulare nei giovani fusti e nei coleottili in via di sviluppo	Aumento dell'estensibilità
Radici e foglie	Regolazione dell'accrescimento
Vari	Regolazione dei tropismi
Gemme laterali	Inibizione della crescita
Radici	Effetti vari sulla regolazione della crescita
Fruttificazione ed accrescimento	Frutto in via di sviluppo

La molecola dei composti con proprietà auxiniche, è caratterizzata dalla presenza di un anello ciclico e possiede almeno un doppio legame. Il gruppo funzionale è costituito dal gruppo carbossilico (–COOH) o da un altro funzionalmente analogo.

La catena laterale influisce sull'attività della molecola; la più attiva è la catena acetica $-\text{CH}_2-\text{COOH}$.

Le principali auxine naturali sono:

l'Acido Indolo-3-acetico (IAA), prima molecola isolata del gruppo delle auxine è rappresentato in Figura 1:

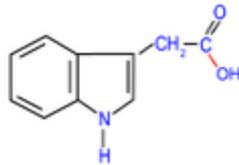


Figura 1. Acido Indolo-3-acetico (it.wikipedia.org)

l'Acido-4-cloindol-3-acetico (4-Cl-IAA) (Cloroauxine), scoperto negli anni 70 nelle leguminose, è rappresentato in Figura 2:

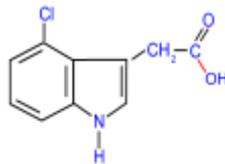


Figura 2. Acido-4-cloindol-3-acetico (it.wikipedia.org)

l'Acido fenilacetico (PAA), è rappresentato in Figura 3:

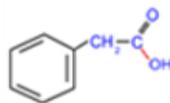


Figura 3. Acido fenilacetico (it.wikipedia.org)

L'auxina fluisce verso il basso, passando all'interno di cellule contigue e sfruttando meccanismi di trasporto specifici oppure attraverso il tessuto vascolare floematico. Il trasporto non avviene con velocità costante ma è soggetto a regolazione in funzione del grado di sviluppo del vegetale ed in risposta agli stimoli ambientali; le principali proteine coinvolte in tale funzione sono due (Alpi A. et al., 1992):

1. la proteina trasportatrice in entrata (AUX 1);
2. la proteina trasportatrice in uscita (PIN 1).

Le proteine PIN 1, sono localizzate nella membrana plasmatica e concentrate nella parte inferiore della stessa.

Trattando la cellula con acido 2,3,5-triiodobenzoico (TIBA) o con altro inibitore del deflusso di auxina, si è visto come questo abbia molteplici effetti sulle proteine di trasporto (Alpi A. et al., 1992).

Le proteine PIN 1 non sono statiche nella membrana plasmatica, ma soggette ad un processo altamente dinamico, ad una circolazione fra membrana plasmatica ed un compartimento situato nel citoplasma. TIBA inibisce tali spostamenti ciclici e blocca il deflusso dell'auxina; ciò indica l'aspetto essenziale di tale circolazione.

I filamenti di actina (proteina di forma globulare, con diametro di circa 7 nm, dal peso di 43 kDa e costituisce una porzione abbondante di tutte le proteine delle cellule eucariote) hanno un ruolo importante nella circolazione delle proteine trasportatrici (PIN1). Gli inibitori che distruggono il legame fra PIN1 (o delle vescicole nelle quali sono contenute) ed i filamenti, provoca il blocco della secrezione di auxina; gli stessi effetti si ottengono con sostanze che alterano o rompono i filamenti stessi.

In Figura 4 viene riportato un modello attuale, rielaborato e semplificato, del meccanismo di trasporto dell'auxina.

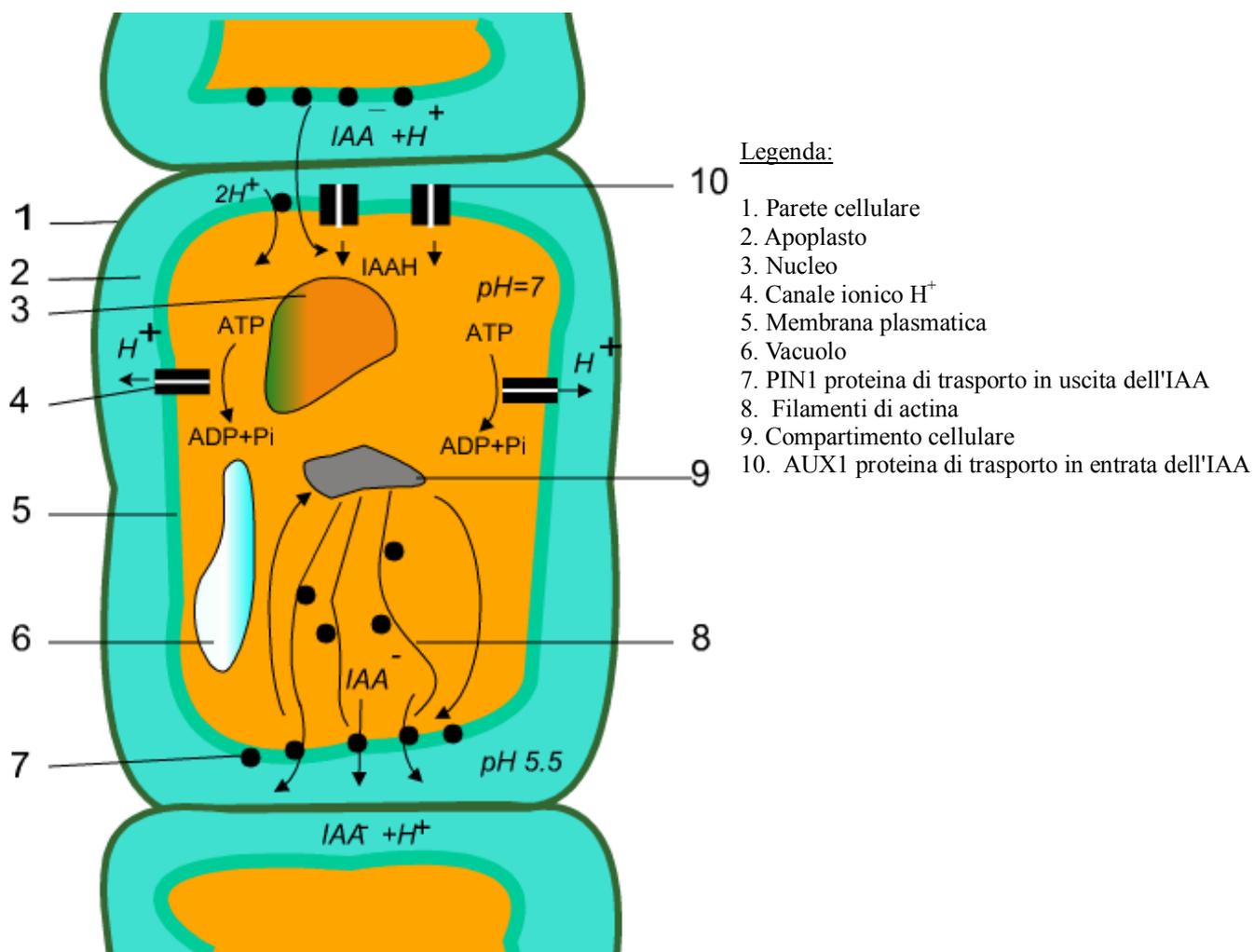


Figura 4: Modello del meccanismo di trasporto dell'auxina (IAA) (fonte: wikipedia.org)

1.1.2 Le Gibberelline

Le gibberelline sono composti terpenici prodotti dai funghi e dalle piante superiori, con attività ormonale. Influenzano la divisione cellulare e la crescita, regolano la germinazione, la fioritura, la lignificazione e la dormienza. Nelle piante superiori è prodotta dai meristemi apicali e sub-apicali del fusto e delle giovani foglioline, da embrioni, dal seme e dai cloroplasti. Per la gibberellina, a differenza dell'auxina, non esiste un movimento polare definito ma si muove in tutte le direzioni ed ha un movimento limitato. Le gibberelline sono molto sensibili al calore, inducono l'allungamento degli internodi ed inibiscono la formazione delle radici. Sono sintetizzate a partire dall'isopentenil-pirofosfato.

La loro scoperta risale ai primi del '900, quando in Giappone sono state effettuate osservazioni di carattere fitopatologico. La coltivazione del riso nella zona orientale del paese era colpita da una malattia che riduceva pesantemente i raccolti. La malattia era caratterizzata da un eccessivo allungamento dei culmi i quali diventavano molto sottili e deboli. L'agente della malattia era un fungo imperfetto, il *Fusarium moniliforme*, la cui forma perfetta viene chiamata *Gibberella fujikuroi*. Per risolvere questo problema, intorno al 1926, le piante di riso sono state trattate con un filtrato del mezzo di coltura su cui era stata allevata la *Gibberella*, riproducendo gli effetti dell'allungamento dello stelo e si è tentato di caratterizzare parzialmente il principio attivo. La struttura precisa della sostanza attiva, un metabolita della *Gibberella*, fu identificato solo dopo la seconda guerra mondiale da alcuni ricercatori occidentali. Dalle colture di fungo fu isolata inizialmente una sostanza chiamata acido gibberellico, oggi chiamata GA_n, rappresentata in Figura 5:

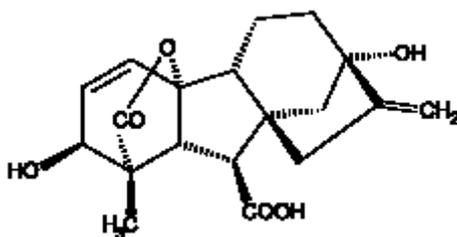


Figura 5. Formula generica dell'acido gibberellico (it.wikipedia.org)

La classificazione comune è data, infatti, dalla sigla GA seguita da un numero. Si conoscono circa 72 gibberelline e la maggior parte delle quali si trovano nelle piante superiori ed anche nei semi. Le gibberelline trovate nei semi possono essere sintetizzate nei tessuti del seme stesso.

Le gibberelline sono associate a moltissime manifestazioni fisiologiche. Quelle più studiate sono: la mobilitazione delle riserve nei semi in germinazione; l'allungamento dei cauli e l'effetto della fioritura di alcune specie.

Uno degli aspetti più importanti della germinazione è la rapida degradazione delle riserve lipidiche, glucidiche, proteiche, etc., accumulate nelle cellule dell'endosperma o dei cotiledoni, attraverso un aumento delle relative attività enzimatiche idrolitiche.

Un sistema molto studiato è quello delle cariossidi dei cereali che mostrano come gli ormoni svolgano un ruolo importante durante la germinazione.

Ad esempio, l' α -amilasi, responsabile con altre idrolasi della digestione dell'amido, non è presente nel seme dormiente ma all'inizio della germinazione. Tale enzima è secreto dagli strati aleuronici del seme e la mobilizzazione del seme non avviene se l'embrione è separato dal seme. Si è osservato che la GA ha, su cariossidi private dell'embrione, lo stesso effetto dell'embrione. Le GA₃ e le GA₁, prodotte dall'asse embrionale, sono trasportate nello strato di aleurone attraverso la zona nodale e lo scutello. Nello strato d'aleurone le GA inducono la sintesi *de novo* di enzimi idrolitici che, secreti nell'endosperma, realizzano l'idrolisi delle riserve. Le varie sostanze sono assorbite dallo scutello e trasferite nell'embrione dal quale vengono utilizzate per i primi stadi della sua crescita. Nella figura 6 sono rappresentate le relazioni che intercorrono tra la produzione di GA, la produzione di α -amilasi e l'accumulo di soluti nella germinazione del seme di orzo. Le GA prodotte nel cotiledone e nello scutello (A) migrano sullo strato dell'aleurone (B), dove avviene la sintesi ed il rilascio degli enzimi idrolitici (C). Tali enzimi intervengono nell'idrolisi delle riserve dell'endosperma (D), producendo soluti che possono inibire l'ulteriore produzione di enzimi idrolitici (E) ed essere utilizzati come nutrimento dall'embrione in crescita (F) (Jones ed Armstrong, 1971).

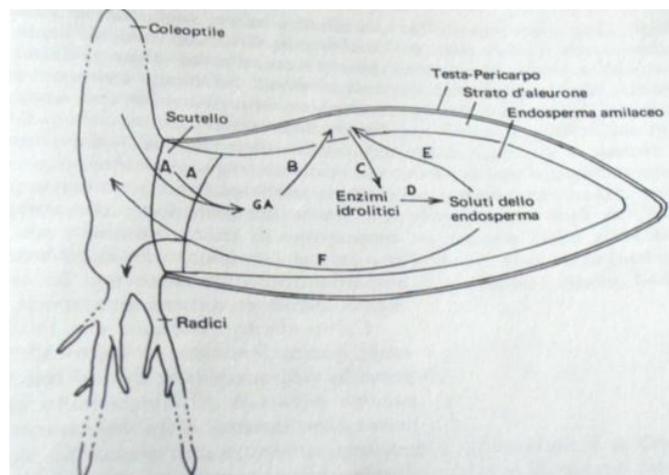


Figura 6. Schema rappresentativo delle relazioni tra produzione di GA, di α -amilasi ed accumulo di soluti nella germinazione del seme di orzo (Jones ed Armstrong, 1971).

1.1.3 Le Citochinine

Le citochinine sono rappresentate da più di 40 composti con struttura simile a quella dell'adenina, presenti in forma libera o come componenti di alcuni tRNA. Questi fitormoni vengono sintetizzati nel meristema radicale per poi trasferirsi tramite xilema nei tessuti con divisione cellulare attiva (foglie e frutti giovani, apice radicale e semi in germogliazione). Lo studio sulle citochinine si fa abitualmente risalire alle osservazioni sul controllo chimico della differenziazione, iniziato negli anni '40 da Skoog che ha utilizzato la tecnica delle colture *in vitro* dei tessuti vegetali.

Nel 1955 dal DNA dello sperma di pesce, trattato in autoclave prima di inserirlo nei mezzi di coltura utilizzati, è stata isolata ed identificata una sostanza che prese il nome di chinetina o furfuril-amino-purina (Miller, 1955). La scoperta della chinetina fu importante perché dimostrò che la divisione cellulare poteva essere indotta da una semplice sostanza chimica. Se una molecola sintetica dà inizio ad una risposta biologica, questo significa che tale molecola sintetica possiede numerose proprietà comuni con le molecole riscontrabili in natura. La scoperta della chinetina suggerì che le molecole che si trovano in natura e che possiedono una struttura simile a quella della chinetina potevano regolare l'attività della divisione cellulare nella pianta. Tale ipotesi si dimostrò corretta, nella maggior parte delle piante la Citochinina naturale è la Zeatina. Numerosi anni dopo la scoperta della chinetina, Miller negli Stati Uniti e Letham in Australia dimostrarono indipendentemente che estratti di endosperma immaturo di mais (*Zea Mays*) contenevano una sostanza che aveva lo stesso effetto biologico della chinetina. Essa stimolava le cellule adulte vegetali a dividersi quando veniva aggiunta ad un mezzo di coltura insieme ad auxina. Letham, nel 1973, ne isolò la molecola e la identificò come la 6-(4-idrossi-3-metilbut-trans-2-enilammino) purina, chiamandola appunto Zeatina. La sua struttura è simile a quella della Chinetina, come si nota dalle formule di struttura riportate in Figura 7.

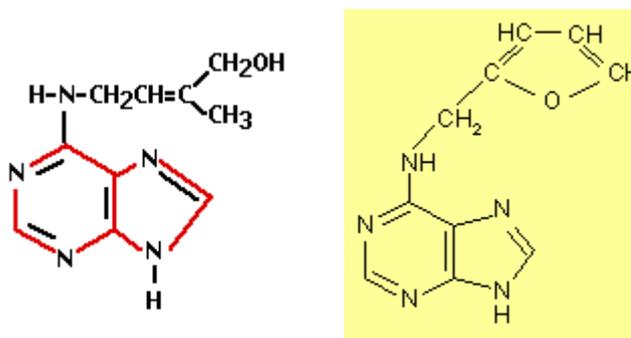


Figura 7. Formule della ZEATINA e della CHINETINA (wikipedia.org)

Le due molecole possiedono differenti catene laterali, ma entrambe sono dei derivati adeninici od amminopurinici con una catena laterale legata all'atomo di N in posizione 6. Poiché la catena laterale possiede un doppio legame, essa può esistere sia nella configurazione *cis*- che *trans*-. La Zeatina libera che si trova in natura nelle piante superiori possiede la configurazione *trans*-, anche se entrambe le forme *cis* e *trans* sono attive come citochinine. Le catene laterali delle citochinine naturali sono chimicamente imparentate con la gomma, i pigmenti carotenoidi, gli ormoni vegetali gibberellina ed acido abscissico ed alcuni composti di difesa delle piante definiti fitoalessine. Tutti questi composti sono formati, almeno in parte, da unità isopreniche. Nell'intera pianta i meristemi apicali delle radici sono i siti principali della sintesi delle citochinine libere, quelle sintetizzate nelle

radici risultano muoversi verso il germoglio attraverso lo xilema. Infatti, esse si muovono attraverso la pianta lungo la corrente di traspirazione, insieme all'acqua ed ai sali minerali che vengono assorbiti dalle radici e vengono trasportate sotto forma di nucleotidi. Una volta raggiunte le foglie possono essere convertiti in basi libere od in glucosidi. I glucosidi delle citochinine si accumulano ad elevate concentrazioni nelle foglie e discrete quantità si trovano anche in foglie senescenti.

Un altro sito di biosintesi è rappresentato dagli embrioni.

L'effetto delle citochinine sulla divisione cellulare (citochinesi) appare più evidente su espianti, ovvero su tessuti excisi ed allevati *in vitro* su di un substrato nutritivo contenente auxina e citochinina. A tali condizioni il tessuto produce cellule poliplodi, indifferenziate e poco compatte; questa massa prende il nome di "callo". Le citochinine svolgono un ruolo importante nel regolare la senescenza e lo sviluppo delle gemme laterali. Sono stati condotti degli studi su foglie recise che hanno dimostrato la partecipazione delle citochinine alla senescenza; si nota una riduzione di clorofilla, RNA, proteine, lipidi, etc., che porta la foglia ad un precoce ingiallimento. Questa induzione alla senescenza è ritardata se sulla lamina si aggiungono citochinine. Nella zona dove vengono applicate le citochinine, determinano un accumulo di metaboliti a basso peso molecolare e contemporaneamente si osserva un ritardo della degradazione della clorofilla e dell'RNA.

Le citochinine hanno varie azioni sulla crescita e sullo sviluppo in combinazione od in opposizione alle auxine a seconda dell'organo bersaglio.

1.2 Biostimolanti e loro effetti sulla crescita e sul metabolismo delle piante

Le ricerche degli ultimi anni hanno evidenziato come i biostimolanti siano prodotti di natura principalmente organica, in grado di incrementare, sia in laboratorio sia in pieno campo, la crescita e lo sviluppo delle piante, in modo differente rispetto ai normali fertilizzanti.

I meccanismi d'azione più frequenti sono: la stimolazione dell'attività microbica, l'aumento dell'attività di diversi enzimi vegetali e del suolo, l'incremento della produzione di ormoni o di regolatori della crescita delle piante e l'attivazione di molteplici parametri del metabolismo vegetale.

Frankenberger e Arshad (1995) hanno osservato che l'azione dei biostimolanti è quella di migliorare l'efficienza di assorbimento dei nutrienti come risultato di un miglior sviluppo dell'apparato radicale delle piante trattate ed una maggiore presenza di peli radicali (Nardi et al., 2006). Conseguentemente l'uso dei biostimolanti porta ad una diminuzione dei costi di produzione e ad una riduzione dei rischi di inquinamento ambientale.

È stato, inoltre, dimostrato che questi prodotti aumentano l'efficienza fotosintetica; favoriscono, infatti, l'accumulo di zuccheri nei frutti, l'allegagione, il miglioramento della pezzatura e la serbevolezza (Presutto e Pezzutto, 2005). Alcuni autori, ancora, hanno provato che i biostimolanti possono rendere le colture meno sensibili alle condizioni di stress (siccità, temperature estreme, eccessiva umidità della rizosfera, alla sovra o sotto-esposizione alla luce) attraverso la maggiore produzione di sostanze antiossidanti (Ertani et al., 2008; Subler et al., 1998). La loro efficacia è stata testata soprattutto in terreni salini, in cui l'applicazione dei biostimolanti diminuisce l'assorbimento del sodio e del cloro, mentre in ambiente arido, il loro utilizzo riduce i danni dovuti alla siccità. Come noto, la pianta soggetta a stress abiotico s'indebolisce, risultando così più vulnerabile agli attacchi da parte di batteri e/o funghi che causano infezioni. Iyer e Caplan (1998) hanno dimostrato che il trattamento con biostimolanti aumenta il contenuto di prolina all'interno delle piante trattate. Com'è noto, la prolina riesce a contrastare gli effetti negativi dovuti alle avversità abiotiche poiché stimola l'abbattimento delle sostanze ossigenate radicaliche che causano danni alla pianta per la loro elevata e non specifica reattività.

I biostimolanti, per manifestare al meglio la loro efficacia, devono essere somministrati in momenti specifici ed in dosi ottimali che mutano in relazione alla coltura e, nell'ambito della stessa, da cultivar a cultivar, considerando il fatto che il giusto apporto della quantità, aumenta i processi di autodifesa e le reazioni agli stress presenti normalmente nella pianta (Zhang et al., 2003). Per scegliere il momento giusto di applicazione, occorrerà tener conto dei tempi di reazione dell'organismo vegetale ed intervenire quando le funzioni vitali non siano state già compromesse. L'Università di Cordoba (Spagna) ha condotto alcune sperimentazioni su piante di limoni coltivate in terreni con indici di salinità elevati. È stato predisposto un allevamento di piante di limone trattate con un prodotto biostimolante, contenente prolina. Dalla prova è emerso che il biostimolante saggiato è stato in grado di alleviare lo stress salino delle piante trattate.

Uno strumento per verificare e quantificare l'attività biostimolante di un composto è il biosaggio o test biologico. Tale test è un metodo standard di laboratorio che utilizza porzioni di piante o piante intere, appositamente preparate per mettere in evidenza la qualità e l'intensità degli effetti macroscopici, indotti da una sostanza, così da includere il prodotto in una classe di composti capaci di stimolare risposte simili. I biosaggi si basano sul confronto delle risposte fisiologiche, date da sostanze note quali l'ormone auxina o giberellina, con quelli dati dalle sostanze da testare. Fra i diversi biosaggi, il test Audus (Audus, 1972) appare il più affidabile in termini di riproducibilità e ripetibilità.

Tale biosaggio si basa sull'inibizione della crescita delle radici di crescione data dall'auxina e sulla stimolazione della crescita dell'ipocotile di cicoria, determinata dall'acido gibberellico. Le potenziali attività biostimolanti possono essere valutate confrontando gli effetti delle sostanze da testare con quelle degli ormoni di riferimento (Nardi et al., 2003).

1.2.1 Prodotti ad attività biostimolante di origine naturale

1.2.1.1 Sostanze umiche (SU)

Le sostanze umiche derivano dai processi di degradazione e di re-sintesi dei residui organici; costituiscono la maggior parte della componente non vivente della sostanza organica del suolo.

La parola *humus*, in latino "terra, suolo, terreno", probabilmente deriva da *humi*, "a terra", o *humilis*, che significa "basso, umile". Nella scienza del suolo questo termine è talvolta usato per indicare il materiale organico presente nel suolo, comprese le sostanze umiche (MacCarthy et al., 1990).

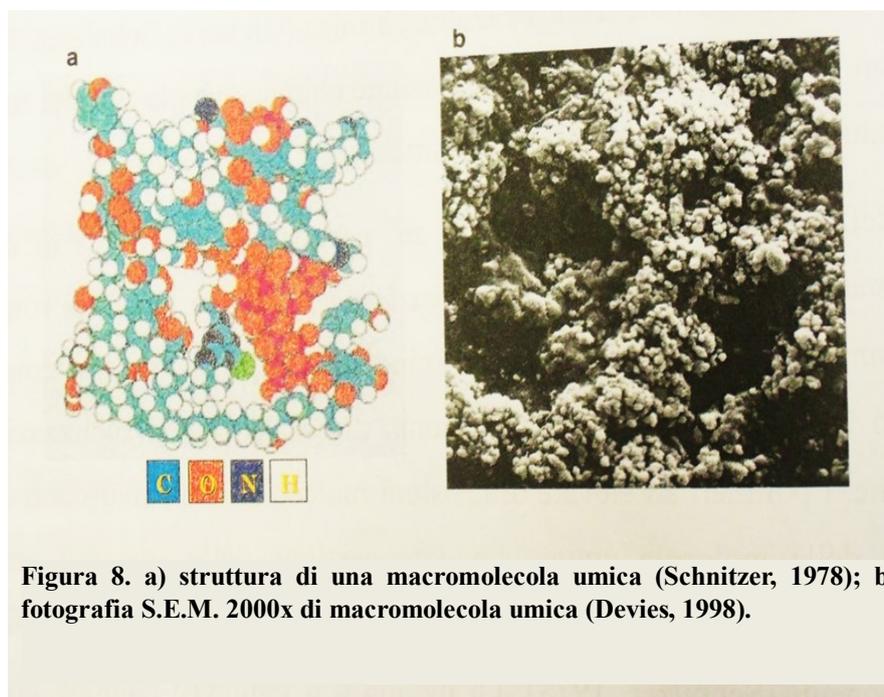
Da tempo è riconosciuta la presenza di tali sostanze umiche nel suolo (Kononova, 1966; Schnitzer e Khan, 1972; Orlov, 1985; Frimmel e Christman, 1988); il termine si riferisce ad una categoria di materiali naturali trovati in, o estratti da, suoli, sedimenti e bacini d'acqua (Woodwell e Houghton, 1977; Woodwell et al., 1978).

Studiando le sostanze umiche s'incontrano alcune difficoltà legate principalmente alla loro origine, ed in particolare nel comprendere l'effetto sulla loro genesi del clima, del tipo di degradazione, delle popolazioni microbiche predominanti nel suolo e del tipo di vegetazione originaria (Pal, 1992; Piccolo, 2001). Tutto questo determina la complessità della struttura delle macromolecole umiche e la difficoltà di caratterizzare il materiale di partenza. Le sostanze umiche sono definite come polimeri di composizione e complessità variabili e, quindi, di difficile identificazione chimica (Ghosh e Schnitzer, 1980; Wershaw, 1986; Stevenson, 1994); sono originate nel suolo dalla degradazione chimica e biologica dei residui animali e vegetali e dall'attività di sintesi dei microrganismi, presenti nel suolo.

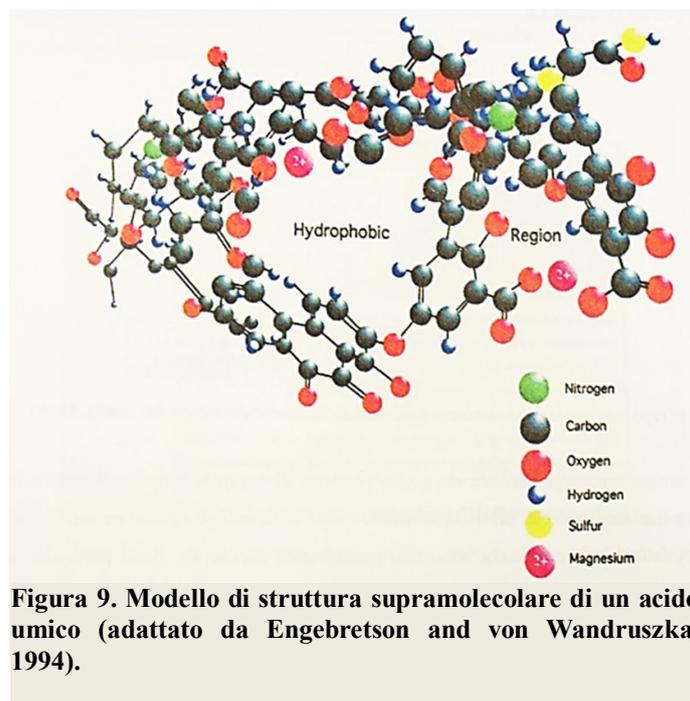
Questa definizione deriva dallo studio dei processi degradativi e di re-sintesi cui va incontro la sostanza organica durante il processo di umificazione; i processi idrolitici rompono i legami chimici fra i componenti dei residui organici, li scindono in molecole più semplici le quali, a loro volta, possono essere sottoposte a reazioni di ossidazione, di ciclizzazione ed ad una nuova polimerizzazione. I polimeri di elevate dimensioni molecolari partecipano alla formazione dello scheletro della molecola umica.

Studi sperimentali recenti hanno definito le sostanze umiche nel suolo come associazioni supramolecolari di molecole eterogenee relativamente piccole (“teoria della struttura supramolecolare”) legate insieme da forze deboli (come i legami a idrogeno ed idrofobici) e di dimensioni molecolari solo apparentemente grandi (Piccolo e Conte, 2001 b; Piccolo, 2001, 2002; Piccolo et al., 1992, 2001 a; Simpson et al., 2001; Piccolo e Spiteller, 2003).

Questa nuova visione della natura chimica delle sostanze umiche implica che le condizioni chimico-fisiche presenti nel suolo e nelle acque possano selettivamente rendere solubili componenti molecolari diversi dalle associazioni supramolecolari della sostanza organica naturale; inoltre, al variare della composizione degli essudati radicali emessi dai vegetali o delle emissioni extracellulari microbiche, si possono rilasciare molecole umiche con una struttura capace di influenzare la permeabilità delle membrane radicali e stimolare sia l’assimilazione di nutrienti sia alcune frazioni fisiologiche delle cellule vegetali (Nardi et al., 2000). Nella seguente Figura 8 è raffigurata la struttura di una macromolecola umica (Schnitzer, 1978); si può, inoltre, vedere una fotografia SEM 2000x di una macromolecola umica (Devies, 1998).



Nella Figura 9 è rappresentato, invece, il modello di una struttura supramolecolare di un acido umico (adattato da Engebretson and von Wandruszka, 1994).



Secondo la classica procedura di estrazione delle componenti del suolo, possiamo individuare tre principali frazioni della sostanza umica: **acidi umici** (HA), anche detti molecole ad alto peso molecolare (HMS tra 2000 e 10^6 Da), solubili in acqua ad alti valori di pH; **acidi fulvici** (FA), o molecole a basso peso molecolare (LMS tra i 600 ed i 900 Da), solubili in acqua a tutti i valori di pH; **umina**, insolubile in acqua a qualsiasi valore di pH: consiste in un aggregato di materiale umico e non umico (Rice e Mac-Carthy, 1990).

La fertilità del suolo dipende dal contenuto di sostanza organica, che può variare da meno dell'1% nei suoli giovani e lavorati ad oltre il 95% in alcune torbe profonde. Le sostanze umiche influenzano le proprietà chimiche e fisiche del terreno ed il suo stato complessivo. Infatti, queste molecole partecipano a molti processi agronomici, ambientali e geochimici (Hayes e Swift, 1978; Stevenson, 1982). La loro composizione e frequenza incidono (a) sulla struttura del terreno e sulla porosità, (b) sull'infiltrazione dell'acqua, sul tasso di umidità e sulla capacità di ritenzione dei suoli, e (c) sulla diversità biologica e sull'attività degli organismi del suolo. La varietà e l'entità di queste reazioni ed interazioni indicano la natura altamente reattiva delle sostanze umiche, evidenziando in tal modo la complessità generale del sistema pianta-suolo.

Le sostanze umiche regolano, infatti, numerose proprietà fisiche e chimiche del suolo e sono in grado di influenzare il metabolismo della pianta. È definita attività biologica delle sostanze umiche l'influenza esercitata dalle sostanze umiche sulla germinazione dei semi e sulla crescita e sviluppo delle piante. Diversi autori hanno studiato il ruolo delle sostanze umiche nel processo di assimilazione dei nutrienti in relazione a diversi macroelementi; l'azione sembra essere più o meno

selettiva, dipendente dal pH e dalla concentrazione delle sostanze umiche (Vaughan e Malcom, 1985; Chen e Aviad, 1990; Varanini e Pinton, 2001; Clapp et al., 2001). I risultati di questi studi spesso sono di difficile interpretazione, poiché sono state utilizzate sostanze umiche di diversa origine e genesi, spesso non sufficientemente caratterizzate dal punto di vista chimico-molecolare. La maggior parte degli studi è stata concentrata sull'assimilazione del nitrato (NO_3^-), a causa dell'importanza dell'azoto sul metabolismo della pianta; è stato ipotizzato che le frazioni, ad alto (HMS) ed a basso peso molecolare (LMS), possano interferire con il processo di trasporto di tale anione da parte della radice, anche influenzandone i parametri cinetici (Vaughan et al., 1985).

L' H^+ -ATPasi della membrana plasmatica ha un ruolo definito e centrale sulla crescita della pianta e sulla nutrizione minerale e viene stimolata dalla frazione LMS (Pinton et al., 1999).

Esperimenti più recenti hanno dimostrato che nelle radici di mais, trattate per 48 ore con sostanze umiche della frazione LMS, si verifica un maggiore assorbimento del nitrato, cui corrisponde un marcato incremento della trascrizione del gene che codifica per Mha2 negli stessi tessuti (Quaggiotti et al., 2004). Tali risultati suggeriscono che il meccanismo attraverso il quale le sostanze umiche stimolano l'assorbimento del nitrato sia mediato da un effetto diretto sull' H^+ -ATPasi di membrana e che tale effetto coinvolga la regolazione della trascrizione del gene che codifica per una principale isoforma di questo enzima. Gli effetti finora descritti sono tuttavia difficili da interpretare e da confrontare; infatti, le sostanze umiche utilizzate hanno origine diversa e sono ottenute con metodi di estrazione differenti.

Diversi lavori scientifici hanno mostrato come i cambiamenti indotti dalle sostanze umiche sulla pianta e, più in generale, dai biostimolanti, riproducano quelli dovuti all'utilizzo di ormoni vegetali (Nardi et al., 2002). La presenza di acido indolacetico (IAA) all'interno delle sostanze umiche, è stato dimostrato sia attraverso approcci di tipo immunologico (Muscolo et al. 1998; Muscolo et al., 1999), che attraverso l'utilizzo del gas cromatografia associata alla spettrometria di massa (Canellas et al., 2002). Eppure le sostanze umiche non possono essere classificate come dei veri e propri ormoni.

Gli effetti misurati in termini di crescita e sviluppo, non sempre hanno evidenziato una correlazione diretta al contenuto di auxina misurato all'interno delle sostanze umiche ma sembra che dipendano anche dalla complessità strutturale delle sostanze utilizzate. Inoltre, non può essere esclusa la presenza di differenti composti auxinici (come acido fenilacetico ed acido indol-butirrico) o di molecole che possano stimolare il metabolismo auxinico endogeno della pianta. È stato in generale dimostrato come i componenti biologicamente più attivi delle sostanze umiche non siano i componenti parentali, ma delle molecole di neosintesi derivate dall'attività microbica del suolo (Frankenberger e Arshad, 1995).

I materiali organici di partenza potrebbero servire come precursori o substrati per la sintesi di sostanze biologicamente attive, tra cui sostanze con effetti ormono-simili. Questi regolatori di crescita potrebbero essere incamerati e preservati dalla degradazione, rendendoli più disponibili per la pianta. Quest'ultima, grazie all'emissione di acidi organici, riesce a scindere le frazioni più attive del cosiddetto "assemblato sopramolecolare" per poi assorbirle (Nardi et al., 2000; Pizzeghello et al., 2001). Inoltre, in uno studio con composti marcati fluorescenti, si è evidenziato come sia l'auxina che le sostanze umiche a basso peso molecolare raggiungano le medesime zone all'interno delle cellule di carota (Muscolo e Nardi, 1999). Più recentemente (Russel et al., 2006), è stato dimostrato come l'auxina e le sostanze umiche agiscano in modo equivalente in termini di effetti e concentrazioni su un enzima chiave del metabolismo vegetale come la fosfolipasi.

È noto che le sostanze umiche del suolo possono influenzare la crescita delle piante, simulando il comportamento degli ormoni vegetali (Hillitzer, 1932; Cacco e Dell'Agnola, 1984). In generale, esse regolano numerose proprietà fisiche, chimiche e microbiologiche del suolo, oltre ad influenzare il metabolismo della pianta. Infatti, viene definita attività biologica delle sostanze umiche l'influenza esercitata dalle stesse sulla germinazione dei semi, sulla crescita e sullo sviluppo delle piante.

Mato et al. (1972), Pflug e Ziechmann (1981) hanno dimostrato che i gruppi funzionali carbossilici ed idrossilici presenti nelle sostanze umiche, sono correlati all'attività biochimica delle sostanze umiche. Vaughan (1967 a, 1967 b), Vaughan et al. (1974) e Nardi et al. (1991) hanno stabilito che la porzione a basso peso molecolare (LMS) dei componenti umici è efficace nel migliorare il metabolismo delle piante, rispetto alla componente ad alto peso molecolare (HMS). Al contrario, Ladd e Butler (1971), Malcolm e Vaughan (1979) hanno osservato che anche la frazione umica ad alto peso molecolare (HMS) può essere attiva.

Dalle biomasse è possibile estrarre frazioni organiche, con procedimenti analoghi a quelli utilizzati per estrarre le sostanze umiche dal suolo, che vengono definite sostanze umo-simili. Diversi studi hanno dimostrato che tali sostanze presentano diverse proprietà. Ad esempio, Montoneri et al. (2008) hanno studiato la capacità di solubilizzare un colorante tessile e contaminati del suolo, come i policiclici aromatici (PAH), utilizzando la frazione umo-simile estratta da rifiuti solidi urbani. Tale capacità è stata confrontata con quella del dodecilsolfato di sodio (SDS). I risultati ottenuti hanno dimostrato come sia la solubilità del colorante che dei contaminanti del suolo è risultata maggiore con l'uso della componente umo-simile rispetto all'SDS. In un altro studio Montoneri et al. (2009) hanno osservato ottime proprietà surfactanti di alcuni acidi umo-simili isolati da rifiuti organici verdi tali da permettere un loro uso industriale come biotensioattivi.

1.2.1.2 Alghe

L'utilizzo delle alghe nella pratica agricola ha origini antiche, ma ciò nonostante mancano in letteratura dei lavori riguardanti la sperimentazione in tale ambito. Dalla seconda metà del XX secolo è iniziata la produzione dei primi derivati algali utilizzati per applicazione fogliare. Solitamente i prodotti a base di alghe utilizzati in agricoltura derivano da pochi generi appartenenti al phylum *Heterocontophyta*. Ai prodotti a base di alghe si attribuiscono molte proprietà, essendo state rilevate diverse azioni di stimolazione e/o inibizione di processi fisiologici, quali la stimolazione della produzione di elicitori. Il termine elicitore od induttore individua quelle sostanze capaci di stimolare nella pianta la produzione di fitoalessine (antimicrobici) anche in assenza di patogeni, aumentando i sistemi di protezione naturale dei vegetali. Numerosi segnali elicitori sono riconducibili ad alcuni oligosaccaridi (Tagliavini et al., 2006), che sono considerati come una classe di fitormoni, come la lamarina ritenuta responsabile dell'aumento delle difese endogene delle piante trattate nei confronti di stress biotici ed abiotici. Infine, le beatine, una classe di ormoni che agiscono come le citochinine, si trovano in quantità rilevanti nei prodotti a base di alghe.

1.2.1.3 Idrolizzati proteici

Gli idrolizzati proteici sono costituiti prevalentemente da peptidi a catena più o meno lunga e da amminoacidi (AA) liberi di tipo levogiro. I peptidi, a loro volta, sono formati da amminoacidi legati tra loro attraverso legami peptidici che formano una catena che può essere costituita da un numero più o meno elevato (oligopeptidi o polipeptidi). Le dimensioni molecolari dei peptidi che costituiscono un idrolizzato proteico possono essere estremamente variabili e comprese tra alcune centinaia e diverse migliaia di dalton (Da). Si ritiene che le diverse proprietà biostimolanti degli idrolizzati proteici sui parametri chimici-fisici e biologici delle piante, siano fondamentalmente collegate alla frazione con dimensioni molecolari più ridotte (Quartieri et al., 2002) in particolare a quella minore di 5.000 Da, oltre che agli amminoacidi liberi (Cavani e Ciavatta, 2007). Questa ipotesi si basa sul fatto che solo molecole di dimensioni ridotte possono essere assimilate direttamente dai tessuti vegetali le quali sono in grado di permeare attraverso la parete e la membrana cellulare ed agire in modo diretto o indiretto sul metabolismo delle piante (Vercesi et al., 1995).

Pertanto per valutarne la qualità, è importante la caratterizzazione della frazione peptidica degli idrolizzati proteici.

La determinazione delle dimensioni molecolari dei peptidi è diventata indispensabile per gli idrolizzati proteici di origine animale in seguito dell'emergenza Tse/Bse ("mucca pazza"). Infatti era stato indicato in 10.000 Da il valore massimo delle dimensioni molecolari per utilizzare in sicurezza un idrolizzato proteico (Supattapone et al., 1999).

Il processo d'idrolisi per la produzione di questi biostimolanti, può essere classificato in base al metodo utilizzato in:

- idrolisi chimica, attuata con un agente chimico ad elevata temperatura ed a pH alcalino o acido;
- idrolisi enzimatica, che prevede l'utilizzo di enzimi, bassa temperatura e pH prossimi alla neutralità;
- idrolisi mista che prevede l'utilizzo di entrambe le tecniche in successione.

Appare chiaro come le differenti metodologie d'idrolisi portino alla formazione d'idrolizzati aventi caratteristiche diverse, e come queste vadano ad incidere sulla composizione del prodotto e sulla sua azione.

I parametri principali che permettono di valutare l'efficacia di un prodotto e le sue dosi d'impiego si possono riassumere in:

- quantità di amminoacidi liberi e totali;
- peso molecolare dei componenti;
- grado di racemizzazione (rapporto percentuale degli amminoacidi destrogiri e levogiri).

Per quanto riguarda gli amminoacidi liberi questi dovrebbero essere in numero maggiore rispetto a quelli totali, in quanto sono maggiormente assorbiti dalla pianta (Cavani et al., 2007).

Idrolisi molto spinte permettono di ottenere esclusivamente AA ed oligopeptidi, mentre da processi idrolitici più blandi si ottengono prevalentemente polipeptidi a peso molecolare più elevato.

Il peso molecolare incide sul grado di assorbimento da parte della pianta che presenta un elevato assorbimento in caso di pesi molecolari ridotti che si riduce via via verso pesi molecolari sempre più elevati (Cavani, 2007).

Anche il grado di racemizzazione viene influenzato dal tipo di processo chimico che subiscono le matrici di partenza. L'idrolisi chimica rompe le catene di amminoacidi in modo irregolare e confuso dando origine ad una maggior quantità di miscele di forma destrogiro (D-); questo tipo di configurazione non è facilmente assorbita dalla pianta e può provocare fitotossicità. Al contrario l'idrolisi enzimatica, favorisce la produzione di miscele di aminoacidi di tipo levogiro (L-), naturalmente prodotti e presenti nei vegetali e per questo non tossiche e attive nella pianta.

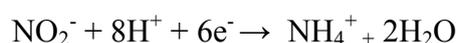
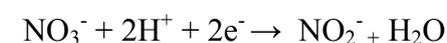
Gli idrolizzati proteici vengono per la maggior parte distribuiti sulla vegetazione, poiché gli amminoacidi sono in grado di entrare attraverso la membrana plasmatica. L'applicazione al suolo, comporta un aumento della dose da distribuire in funzione del fatto che la flora fungina e batterica del terreno, utilizza parte del prodotto distribuito come substrato nutritivo.

1.3 Assorbimento ed assimilazione dell'azoto nelle piante superiori

Le piante superiori sono organismi autotrofi (dal greco: αὐτός, stesso e τροφή, nutrimento) in grado di sintetizzare i loro componenti organici molecolari partendo da elementi nutritivi inorganici, provenienti dall'ambiente circostante. L'azoto è l'elemento più richiesto tra tutti i macronutrienti presenti nella pianta: nei vegetali l'azoto è presente negli amminoacidi e, quindi, nelle proteine e negli enzimi, negli acidi nucleici (DNA e RNA) ed anche in molti altri composti, quali le clorofille; inoltre, contengono azoto ed alcune importanti classi di ormoni vegetali quali le auxine e le citochinine (Taiz e Zeiger, 1998).

A differenza degli animali, le piante sono in grado di assorbire ed assimilare fonti azotate sia inorganiche (come il nitrato, NO_3^- e l'ammonio, NH_4^+) che organiche (come l'urea), ma la maggior parte degli organismi vegetali utilizza come fonte primaria di azoto il nitrato assorbito dall'apparato radicale. Nella maggior parte delle specie vegetali sia le radici che i germogli hanno la capacità di assimilare il nitrato, prima come nitrito e poi come ammonio. In molte piante, il nitrato viene prima ridotto nelle radici, quando esse ne ricevono poco. Una volta assorbito, il nitrato subisce una serie di riduzioni successive che conducono alla formazione di ammonio. Le reazioni sono catalizzate da due enzimi, la nitrato reduttasi (NR; EC 1.6.6.1) e la nitrito reduttasi (NiR; EC 1.7.7.1).

I due sistemi enzimatici hanno rispettivamente localizzazione citosolica e plastidiale: la NR, utilizzando NADH o NADPH, riduce il nitrato a ione nitrito (NO_2^-), il quale viene ridotto dalla NiR che opera la conversione del nitrito in ammonio, utilizzando la ferredossina (Fd) quale donatore di elettroni. Gli enzimi nitrato reduttasi (NR) e nitrito reduttasi (NiR) catalizzano, appunto, le due fasi della riduzione dei nitrati (NO_3^-) ad ammonio (NH_4^+), che viene rapidamente inserito in composti organici attraverso l'attività dell'enzima GS (Lea e Mifflin, 2003). L'NR è presente nelle piante in due isomorfe: una, localizzata nelle foglie, utilizza il NADH (NR-NADH, EC 1.6.6.1); l'altra, presente nelle radici, utilizza come donatore di elettroni il NADPH (NR-NADPH, EC 1.6.6.2). L'azione di entrambe è quella di ridurre l' NO_3^- in NO_2^- , il quale è il substrato della NiR (EC 1.7.7.1), che lo riduce a ioni NH_4^+ , utilizzando come fonte di elettroni la ferredossina.



L'NR è un enzima citosolico, mentre la NiR è totalmente localizzata nel cloroplasto o nel plastidio. La diminuzione dell'attività enzimatica dell'NR sia nelle radici che nelle foglie, può essere causata dai diversi livelli di regolazione indotti da molti fattori, tra i quali, la sorgente luminosa e la fonte di azoto, per adeguare l'assimilazione del nitrato alle esigenze della pianta. Secondo diversi autori (ad esempio, Forde, 2000), l'assimilazione di alcuni composti azotati correlati, hanno un effetto di feedback sull'attività della NR. Le cellule vegetali evitano, quindi, la tossicità dell'ammonio generato dall'assimilazione del nitrato o dalla foto-respirazione, convertendolo rapidamente in amminoacidi. I composti che rivestono un ruolo importante nell'incorporazione dell' NH_4^+ sono quattro amminoacidi: la glutammina, l'acido glutammico, l'asparagina e l'acido aspartico. Questi quattro amminoacidi rappresentano la fonte principale di trasporto dell'N nelle piante e possono talvolta rappresentare più del 60% degli amminoacidi totali estraibili da un tessuto vegetale. In alcune piante le ammidi come l'asparagina rappresentano la fonte principale di esportazione di azoto dalle foglie, mentre la glutammina viene utilizzata per il trasporto dell'azoto assimilato dalle radici verso i fusti (Maffei, 1999).

La via principale per questa conversione coinvolge l'azione sequenziale della glutammina sintetasi (GS; *EC* 6.3.1.2) e della glutammato sintasi (GOGAT, glutammina: α -chetoglutarato amminotransferasi) (Lea et al., 1992), che porta alla sintesi netta di una molecola di acido glutammico, partendo da ammonio ed acido 2-chetoglutarico, attraverso la formazione di glutammina. Il complesso di reazioni viene comunemente denominato ciclo GS/GOGAT.

La glutammina sintetasi catalizza la prima tappa dell'organizzazione dell'ammonio, formando glutammina a partire da glutammato con l'idrolisi concomitante di ATP e presenza di magnesio.

La GOGAT catalizza il trasferimento del gruppo ammidico della glutammina alla posizione α -cheto del 2-chetoglutarato, dando così luogo alla sintesi di due molecole di glutammato (Lea e Miflin, 1980). Quindi la GOGAT, in cooperazione con la GS, ha il compito di mantenere un flusso di azoto ciclico dall'ammonio alla glutammina ed al glutammato mediante quello che è noto come il ciclo GS/GOGAT (Lea e Miflin, 1980; Figura 10). Tale ciclo determina la conversione netta di una molecola di α -chetoglutarato ed ammonio in una molecola di glutammato e gioca, inoltre, un ruolo cruciale nell'assimilazione dell'ammonio rilasciato dal processo foto respiratorio (Lam et al., 1996).

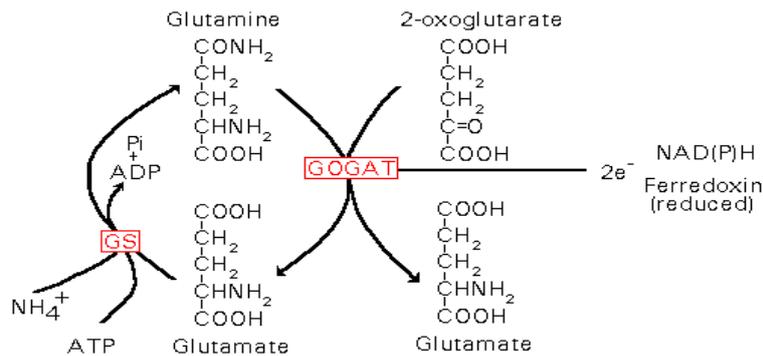
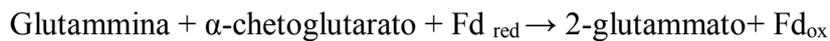


Figura 10. Ciclo GS/GOGAT (Lea et al., 1992)

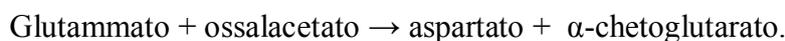
Le piante contengono due tipi di GOGAT: una accetta elettroni dal NADH, l'altra accetta elettroni dalla ferredossina (Fd):



La forma NADH dipendente dell'enzima (NADH-GOGAT; EC 1.4.1.14) è localizzata nei plastidi dei tessuti non foto sintetici, quali radici o fasci vascolari delle foglie in via di sviluppo. Nelle radici la NADH-GOGAT è coinvolta nel processo di assimilazione dell' NH_4^+ assorbito dalla rizosfera; nei fasci vascolari delle foglie in via di sviluppo, la NADH-GOGAT assimila la glutammina traslocata dalle radici o dalle foglie senescenti.

La forma di glutammato sintasi ferredossina dipendente (Fd-GOGAT; EC 1.4.7.1) si trova nei cloroplasti ed ha una massa molecolare di 165 kDa. La Fd-GOGAT dei germogli è coinvolta nel metabolismo dell'azoto liberato durante la foto respirazione; quella delle radici serve, probabilmente, ad incorporare la glutammina generata durante l'assimilazione del nitrato.

L'azoto, dopo essere stato assimilato nella glutammina e nel glutammato, è incorporato in altri amminoacidi, attraverso reazioni di transamminazione. Tali reazioni sono catalizzate da enzimi conosciuti con il nome di amminotrasferasi. Tra questi troviamo l'aspartato amminotrasferasi (ATT; EC 2.6.1.1), che catalizza la reazione in cui l'amminogruppo del glutammato viene trasferito sull'atomo carbossilico dell'aspartato:



Inoltre, l'asparagina si forma per trasferimento di un amminogruppo sull'aspartato, grazie all'asparagina sintetasi (AS; EC 6.3.5.4), che si trova nel citosol delle foglie e delle radici e nei noduli azoto-fissatori. Nelle radici di mais, in particolare quelle sottoposte a concentrazioni tossiche di ammoniaca, l'ammonio può sostituire la glutammina come fonte di gruppi ammidici (Sivasankar e Oaks, 1996).

La glutammina ed il glutammato, così formati, vengono utilizzati come donatori di gruppi amminici in diverse reazioni biochimiche, comprese la sintesi di amminoacidi essenziali, di acidi nucleici, di clorofilla e di molti altri composti contenenti azoto, necessari al metabolismo primario e secondario della pianta.

Nelle piante, la regolazione differenziata di queste vie in competizione, aiuta a bilanciare il metabolismo del carbonio e dell'azoto (Lam et al., 1996).

Quando viene stimolata l'attività della GS e della GOGAT, viene inibita quella dell'AS, favorendo l'assimilazione dell'azoto in glutammina e glutammato, composti ricchi di carbonio che partecipano alla sintesi di nuove sostanze vegetali.

Le interazioni tra N e fotosintesi sono fondamentali per la produzione vegetale, e questo è testimoniato dal notevole aumento di assimilazione dell'azoto dopo i trattamenti che aumentano le attività enzimatiche della GS e della GOGAT. È stato, inoltre, osservato un aumento dei composti organici dell'N (clorofille e proteine) nei campioni in cui è stato riscontrato un incremento delle attività enzimatiche, dopo l'aggiunta di estratti alcalini (Digestato, Brassica) (Ertani et al., 2013). L'aumento del metabolismo dell'azoto nelle piante può essere attribuito alla stimolazione dell'assorbimento del nitrato, come è stato già visto per i biostimolanti (Chen et al., 2003; Quaggiotti et al., 2004).

1.4 Enzimi

Gli enzimi sono i catalizzatori dei sistemi biologici. La parola "enzima" deriva dal greco *ἐν ζύμῳ*, nel lievito (Smith A.D. et al., 1997). Le prime osservazioni sull'esistenza degli enzimi sono state condotte da L. Pasteur (1850), che osservò la fermentazione dello zucchero in alcol. Inizialmente si ritenne che i "fermenti", poi indicati con il termine enzimi, fossero inseparabili dalle strutture cellulari viventi. Solo nel 1897 E. Büchner dimostrò che anche gli estratti acellulari di lievito avevano la capacità di favorire la fermentazione dello zucchero in alcol. Ebbe così inizio lo sviluppo della ricerca sulle metodiche per la separazione, la purificazione e la cristallizzazione (J. Sumner, 1926) degli enzimi, con la conseguente ipotesi sulla loro natura molecolare proteica.

La maggior parte degli enzimi sono proteine (proteine enzimatiche). Una piccola minoranza di enzimi sono molecole di RNA (Lubert Stryer, 1996). Il processo di catalisi indotto dagli enzimi, consiste in una accelerazione della velocità della reazione e quindi in un più rapido raggiungimento dello stato di equilibrio termodinamico. Un enzima accelera unicamente le velocità delle reazioni chimiche, dirette ed inverse, senza intervenire nei processi che ne regolano la spontaneità. Il loro ruolo consiste nel facilitare le reazioni attraverso l'interazione tra il substrato ed il proprio sito attivo, ovvero la parte dell'enzima in cui avvengono le reazioni, formando un complesso. Avvenuta la reazione, il prodotto viene allontanato dall'enzima, che rimane disponibile per iniziarne una nuova. L'enzima, infatti, non viene consumato durante la reazione.

1.4.1. *Enzima nitrato reduttasi*

La nitrato reduttasi catalizza la reazione di riduzione del nitrato a nitrito (Buchanan et al., 2003), catalizzando la seguente reazione, il cui meccanismo è riportato in Figura 11:

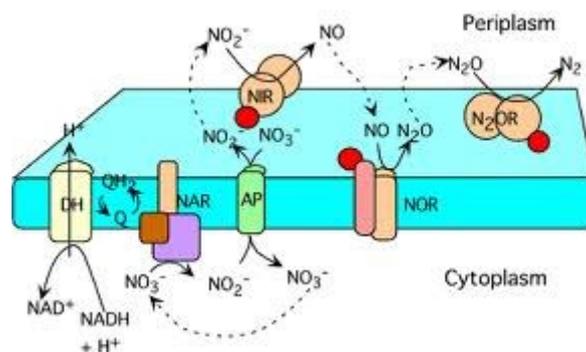
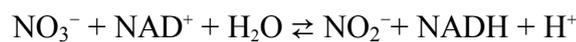


Figura 11. Reazione in cui è coinvolta l'NR (it.wikipedia.org)

L'enzima è una flavo-ferro-zolfo proteina e molibdeno. È un complesso enzimatico interessante sotto il profilo fisiologico vegetale, dal momento che è il catalizzatore di una reazione che comporta la riduzione da nitrato a nitrito. Questa reazione avviene grazie ad una catena di trasferimento elettronico, in cui due elettroni vengono trasferiti dall'NADH all' NO_3^- ; in questo modo, il nitrato viene convertito in nitrito. La reazione di riduzione continua poi tramite la nitrito reduttasi che converte il nitrito ad ammoniaca, quest'ultima verrà poi assemblata a scheletri carboniosi rendendola non tossica, e trasformandola da glutammina ad acido glutammico (Berks et al., 1995).

1.4.2 Enzima glutammato sintetasi

La glutammato sintetasi (GS) è un enzima che catalizza la formazione dell'amminoacido glutammato, a partire da glutammato, ammoniaca ed ATP. L'importanza della glutammato risiede nel suo coinvolgimento come fonte di azoto nella formazione di molti metaboliti. Nella Figura 12 è riportato il meccanismo della reazione in cui è coinvolto l'enzima.

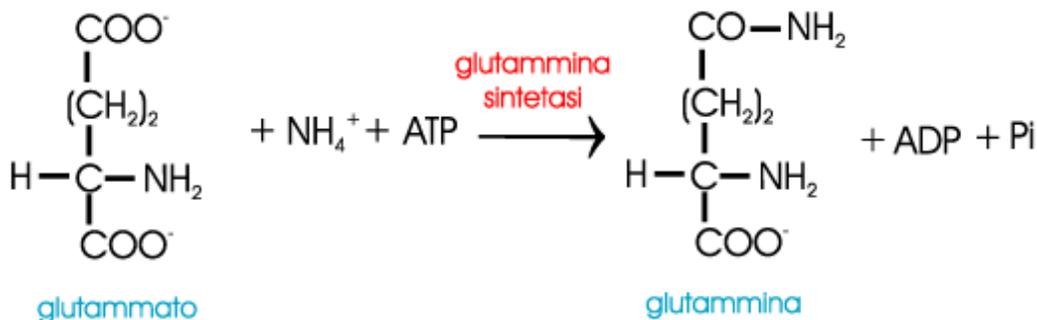


Figura 12. Reazione in cui è coinvolta la GS (it.wikipedia.org)

1.4.3 Enzima glutammato sintetasi NADH-dipendente

L'enzima glutammato sintetasi NADH-dipendente (GOGAT) catalizza il trasferimento del gruppo amminico dalla glutammato al 2-oxoglutarato (od α-chetoglutarato), mediante NADH (Boland e Benny, 1977). In Figura 13 è rappresentata la reazione in cui è coinvolto l'enzima.

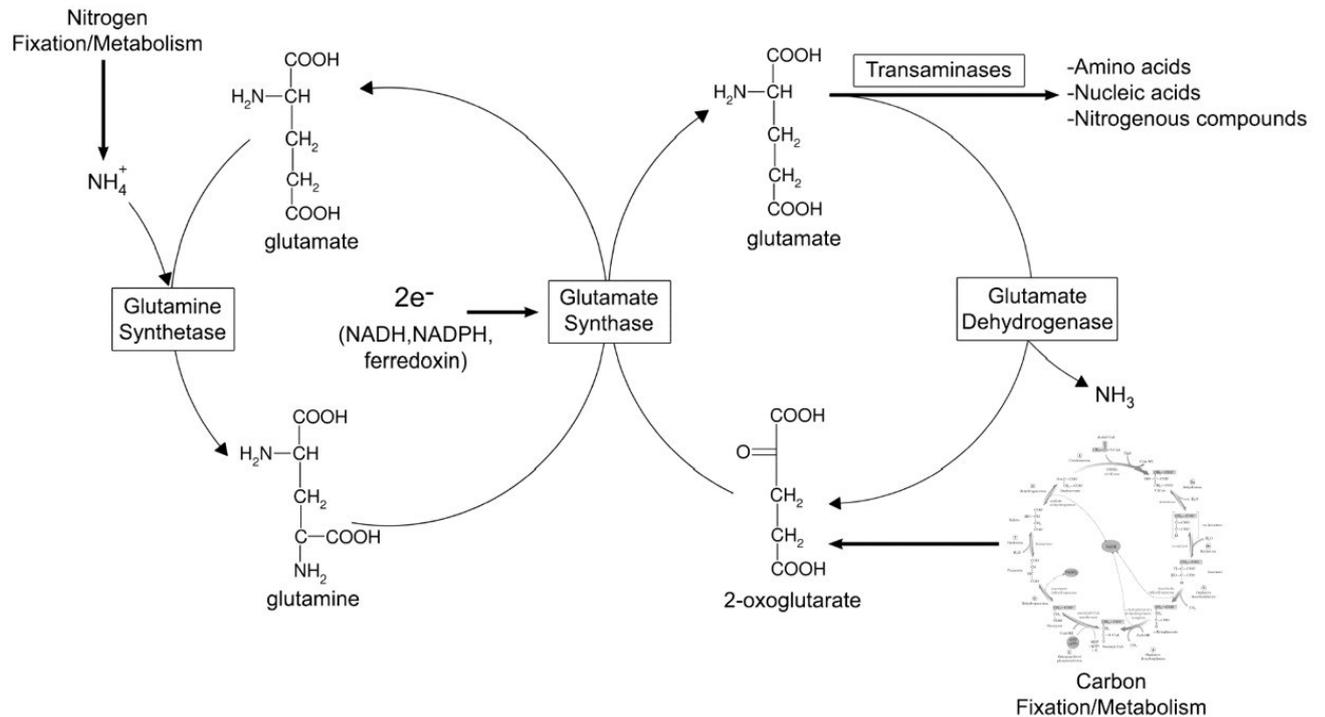


Figura 13. Reazione in cui è coinvolta la GOGAT (it.wikipedia.org)

1.5 Pigmenti fotosintetici

1.5.1 Clorofille

La clorofilla (dal greco $\chi\lambda\omega\rho\acute{o}\varsigma$ = verde e $\phi\acute{\upsilon}\lambda\lambda\omicron\nu$ = foglia) è un pigmento isolato nel 1817 da Joseph Bienaimé Caventou, di colore verde, presente nei grani dei cloroplasti delle cellule vegetali o negli organismi procarioti che realizzano la fotosintesi clorofilliana. Le clorofille sono pigmenti metallo porfirinici caratterizzati da un anello tetrapirrolico ciclico che presenta al centro un atomo di magnesio complessato e da un alcol alifatico a lunga catena, il fitolo.

Nelle piante superiori si distinguono due tipi di clorofilla: la *clorofilla a* (Chl a) e la *clorofilla b* (Chl b) (Figura 14); si differenziano solo per la presenza, rispettivamente, di un gruppo metilico o aldeidico in posizione C3 del secondo anello pirrolico (Beale, 1999).

Le clorofille assorbono la luce visibile nel rosso e nel blu e partecipano al processo fotosintetico come pigmenti antenna e la clorofilla a, come pigmento fotochimicamente attivo (Figura 15).

1.5.2 Carotenoidi

I carotenoidi sono una classe di pigmenti organici che possono essere rinvenuti nelle piante od in altri organismi fotosintetici, come le alghe ed alcune specie di batteri. Esistono oltre 600 tipi di carotenoidi (un esempio è riportato in Figura 16) conosciuti che vengono normalmente distinti in due classi: i caroteni (idrocarburi privi di ossigeno) e le xantofille (contenenti ossigeno). Mentre i caroteni sono presenti soprattutto nei centri di reazione, le xantofille si trovano principalmente nei complessi antenna (Siefermann-Harms, 1985).

I carotenoidi assorbono ad una lunghezza d'onda compresa tra i 390 e i 530 nm ampliando così lo spettro di assorbimento della clorofilla. Sono pigmenti accessori che nella fotosintesi svolgono il duplice ruolo di pigmenti antenna, consentendo di assorbire lunghezze d'onda differenti rispetto alla clorofilla, e di molecole protettive nei confronti dei danni foto-ossidativi dell'apparato fotosintetico (Young et al., 1997). Le clorofilla, infatti, pur avendo un ruolo fondamentale per la fotosintesi, possono rappresentare una potenziale causa di foto-ossidazione dei tessuti vegetali poiché, eccessi di energia luminosa portano le clorofille ad uno stato eccitato di tripletto.

Da questo stato la clorofilla può cedere la sua energia a molecole di ossigeno che passano ad uno stato di singoletto, estremamente reattivo.

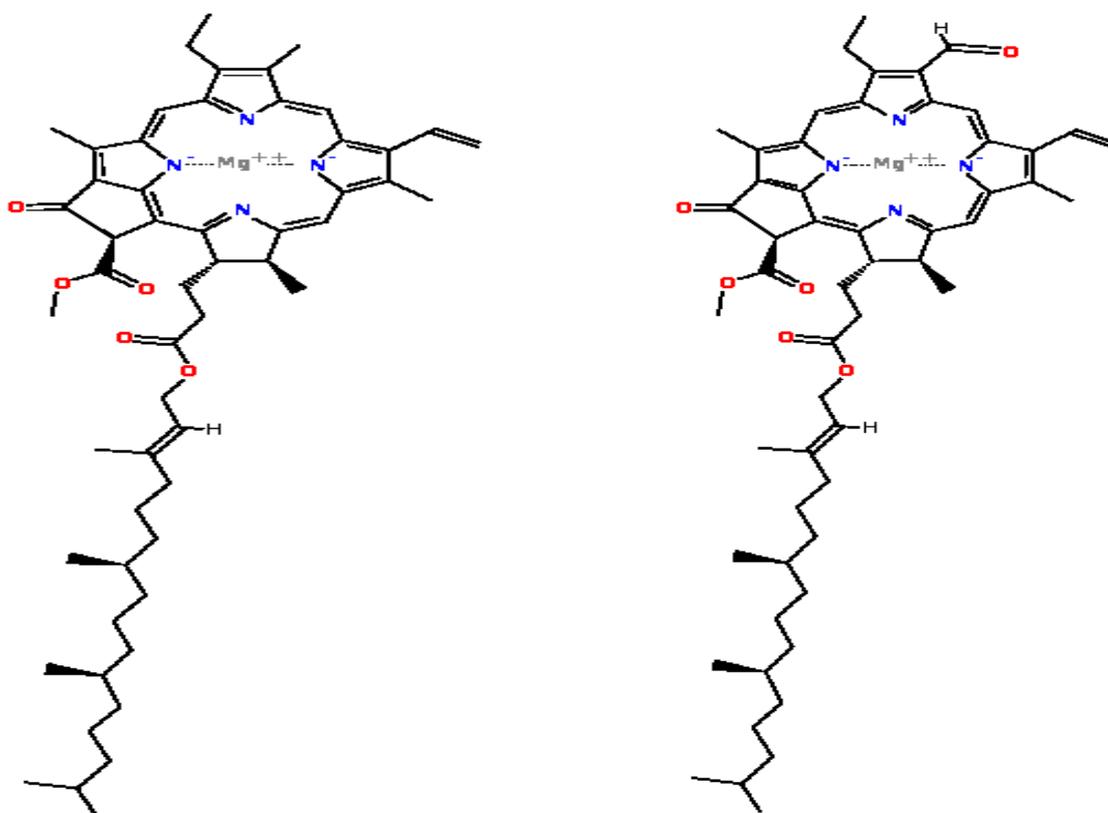


Figura 14. Esempi di clorofilla a (chl a), clorofilla b (chl b) (it.wikipedia.org)

2. BILIOGRAFIA PREFERAZIONE

Audus L. (1972). *J. Plant Growth Substances Chemistry and Physiology*. Hill, L. Ed. London; 1, pp 24-65.

Alpi A., Pupillo P., Rigano C. (1992). "Fisiologia delle piante". Plant Edi SES; Napoli seconda edizione.

Beale S. I. (1999). Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research*, 60: 43-73.

Berks B.C., Ferguson S.J., Moir J.W. and Richardson D.J. (1995). Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim. Biophys. Acta* 1232: 97-173.

Boland M.J. and Benny A.G. (1977). Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules. Purification and properties of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules. *Eur. J. Biochem.* 79: 355-362.

Buchanan B.B., Wihelm G., Russell L.J. (2003): *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists Publisher, Rockville, Maryland, 1044-1100.

Buchner Eduard (1897). "Alkoholische Gärung ohne Hefezellen (Vorläufige Mitteilung)". *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 30: 117-124. doi:10.1002/cber.18970300121.

Cacco G., Dell'Agnola G. (1984). Plant growth regulator activity of soluble humic complexes. *Canadian Journal of Soil Science* 64, 225-228.

Canellas L.P., Olivares F.L., Okorokova-Facanha A.L., Facanha A.R. (2002). Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol*, 130, 1951-1957.

Cavani L., Ciavatta C. (2007). Attività Biostimolante degli Idrolizzati Proteici. *L'Informatore Agrario*, 44, 46-52.

Chen Y., and Aviad T. (1990). Effects of humic substances on plant growth. In *Humic Substances in Soil and Crop Science: Selected Readings*, MacCarthy, P., Malcolm, R. I., Clapp, C. E., and Bloom, P. R., eds., American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 161-187.

Chen S.K., Edwards C.A., Subler S. (2003). The influence of two agricultural biostimulants on nitrogen transformations, microbial activity, and plant growth in soil microcosms. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 9-19.

Clapp C.E., Chen Y., Hayes M.H.B., and Cheng H.H. (2001). Plant growth promoting activity of humic substances. In *Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments, and Waters*, Swift, R. S., and Sparks, K. M., eds., International Humic Science Society, St. Paul, MN, pp. 243-255.

Devies D.G. (1998). The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* 10 April 1998: Vol. 280 no. 5361 pp. 295-298. DOI:10.1126/science.280.5361.29.

D. Lgs 217/06 (2006). “Revisione della disciplina in materia di fertilizzanti”. G.U. n°141, 20 giugno 2006.

D.M. 7 dicembre 2001 (2001).

Engebretson R.R., von Wandruszka R. (1994). Microorganization in dissolved humic acids, *Environ Sci. Technol.*, 28 (11). 19-34.

Ertani A., Peserico L., Brandellero E., Franceschi C., Altissimo A., Nardi S.(2008). The Effect of a biostimulant on salinity plant stress. 17 th International Symposium of CIEC “Plant Nutrient Management under stress conditions”. Cairo- Egypt 24-27 Novembre 2008.

Ertani A. (2009). Attività biostimolante di idrolizzati proteici sulla crescita e metabolismo di *Zea mays* L. Tesi di Dottorato, Agronomia ambientale e Produzioni Vegetali, Ciclo XXI. Padova.

Ertani A., Pizzeghello D., Baglieri A., Cadili V., Tambone F., Gennari M., Nardi S. (2013). Humic-like substances from agro-industrial residues affect growth and nitrogen assimilation in maize (*Zea mays* L.) plantlets. *Journal of Geochemical Exploration* S0375-6742(12)00201-4.

Forde B. G. (2000). Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *BBA Biomembranes* 1465, 219–235.

Frankenberger W.T., Arshad M. (1995). *M. Phytohormones in soils: Microbial Production and Fuction.* Ed. Dekker M.; Inc: New York, 1995.

Frimmel F.H., and Christman, R.F. (1988). *Humic Substances and Their Role in the Environ- ment,* John Wiley & Sons, Chichester.

Ghosh K. e Schnitzer M. (1980). Macromolecular structures of humic substances. *Soil Science,* 129, 266-276.

Hayes M.H.B. and Swift R.S. (1978). The chemistry of soil organic colloids. In *The Chem- istry of Soil Constituents,* greenland, D. J., and Hayes, M. H. B., eds., John Wiley & Sons, Chichester, pp. 179–320.

Hillitzer A. (1932). Uber den Einflusso der Humusstoffe auf das Wurzelwachstum. *Beihefte zum Botanischen Zentralblatt,* 49, 467-480.

Iyer S., Caplan A. (1998). Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiol.*, 116: 203-211.

Kononova M.M. (1966). *Soil Organic Matter,* Pergamon Press, Elmsford, Ny.

Ladd J.M., Butler J.H.A. (1971). Inhibition and stimulation of proteolytic enzyme activities by soil humic acids. *Australian Journal of Soil Research* 7, 253–261.

Lam H.M., Coschigano T., Oliveira I.C., Melo-Oliveira R., Coruzzi G.M. (1996). The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 569-593.

Lea P.J., Mifflin B.J. (1980). Ammonia assimilation. *In*: MIFLIN B.J. (ed.): *The Biochemistry of Plants*, Vol.5, 169-202. Academic Press, New York.

Lea P.J., Blackwell R.D., Joy K.W. (1992). Ammonia assimilation in higher plants. *In* (K. Mengel, D.J. Pilbeam eds) "Nitrogen Metabolism of Plants", Clarendon Press, Oxford, pp 153-186.

Lea P.J., Mifflin B.J. (2003). Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 41, Number 6.

Letham D.S. (1971). Regulator of Cell Division in Plant Tissue. *Planta (Berl.)* 118, 361-364.

Lubert Stryer (1996). *Biochimica Quarta Edizione*. Zanichelli, Bologna.

Maffei M. (1999). *Biochimica Vegetale*. Piccin Editore (Padova): 273-276.

Malcolm R.E., Vaughan, D. (1979). Humic substances and phosphatase activities in plant tissues. *Soil Biology and Biochemistry* 11, 253–259.

Mato M.C., Olmedo M.G., Mendez J. (1972). Inhibition of indoleacetic acid oxidase by soil humic acids fractionated on Sephadex. *Soil Biology and Biochemistry* 4, 469–473.

Miller CO, Skoog F, Von Saltza MH, Strong F (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc* 77: 1392.

Montoneri E., Boffa V., Quagliotto P.L., Mendichi R., Chierotti M.R., Gobetto R., Medana C., (2008). Humic acid-like matter isolated from green urban wastes. Part I: structure and surfactant properties. *Bioresources* 3: 123–141.

Montoneri E., Boffa V., Savarino P., Perrone, D.G., Musso G., Mendichi R., Chierotti M.R., Gobetto R. (2009). Biosurfactants from Urban Green Waste. *ChemSusChem*. 2: 239 – 247.

Muscolo A., Bovalo F., Gionfriddo F., Nardi S. (1999). Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Dacus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biol. and Biochem.*, 31: 1303-1311.

Nardi S., Pizzeghello D., Reniero F., Rascio N. (2000). Chemical and biochemical properties of humic substances isolated from forest soils and plant growth. *SSSAJ* 64: 639- 645.

Nardi S., Pizzeghello D., Muscolo A., Vianello A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1527-1536.

Nardi S., Pizzeghello D., Bragazza L., Gerdol R. (2003). Low-molecular-weight organic acids and hormone-like activity of dissolved organic matter in two forest soils in N Italy. *JOURNAL OF CHEMICAL ECOLOGY*. vol. 29(7), pp. 1549-1564 ISSN: 0098-0331.

Nardi S., Carletti P., Ertani A., Pizzeghello D. (2006a). Biostimolanti e attività biostimolante. *Informatore Agrario*.

Nardi S., Ertani A., Concheri G., Pizzeghello D. (2006b). Metodi di determinazione dell'attività biostimolante. *Fertilitas Agrorum* 1, N1: 47-53.

Nardi S., Carletti P., Pizzeghello D., Muscolo A. (2009). Biological activities of humic substances, *In*: Senesi N., Xing B., Huang P.M. (Eds), Vol. 2– Biophysico-chemical Processes involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems. Part I. Fundamentals and impact of mineral-organic-biota interactions on the formation, transformation, turnover, and storage of natural nonliving organic matter (NOM). John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 305-339.

Orlov D.S. (1985). *Humus Acids of Soils*. Moscow University Press, translated from Russian, Tan, K. H., ed., Amerind Publishers, New Delhi, India.

Pal S. (1992). "Nature and properties of soil humic acid as influence by incorporation of different plant materials". *Plant and Soil* 16: 11-15.

Pflug W., Ziechmann, W. (1981). Inhibition of malate dehydrogenase by humic acids. *Soil Biology and Biochemistry* 13, 293–299.

Piccolo A., Nardi S., Concheri G. (1992). Structural characteristics of humic substances related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. *Soil Biol. Biochem.* 21. 373-380.

Piccolo A. (2001). The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci* 66: 810-832.

Piccolo A., Cozzolino A., Conte P. (2001a). Chromatographic and spectrophotometric properties of dissolved humic substances as compared to macromolecular polymers. *Soil Sci.* 166. 174-185.

Piccolo A., Conte P., Cozzolino A., Spaccini R., (2001 b). Molecular Sizes and association Forces of Humic Substances in solution. *In* "Humic Substances and chemical contaminants" C.E. Clapp, M.H.B. Hayes, N. Senesi, P. Bloom, P.M. Jardine, Eds.

Piccolo A. (2002). The Supramolecular Structure of Humic Substances. A Novel Understanding of Humic Chemistry and Implications in Soil Science. *Adv. Agron.* 75. 57-134.

Piccolo A., Spiteller M. (2003). Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377. 1047-1059.

Pinton R., Cesco S., Iacoletti G., Astolfi S. and Varanini Z. (1999). Modulation of NO_3^- uptake by water extractable humic substances, involvement of root plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant and Soil* 215: 155-161.

Pizzeghello D., Nicolini G. and Nardi S. (2001). Hormone-like activity of humic substances in *Fagus sylvatica* l. forests. *New Phytol.* 151, 647–657.

Presutto e Prezzutto (2005). I vantaggi dell'applicazione di glucosio fosforilato e amminoacidi alla vite. *Phytomagazine speciale biostimolanti*.

- Quaggiotti S.**, Ruperti B., Pizzeghello D., Francioso O., Tugnoli V., and Nardi S. (2004). Effects of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize *Zea mays* L.. *J. Ex Bot.* 398: 803- 813.
- Quartieri M.**, Cavani L., Lucchi A., Marangoni B., Tagliavini M. (2002). Effects of the rate of protein hydrolysis spray concentration on growth of potted kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) plants. *Proceedings of International Symposium on Foliar Nutrition of Perennial Fruit Plants. Acta Hort*, 594: 341-347.
- Regione Piemonte**, Assessorato Ambiente (2002). Il compostaggio: processo tecniche e applicazione. *Collana ambiente* 25.
- Rice J.A.**, and MacCarthy P. (1990). A model of humin. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1875–1877.
- Russel L.**, Stokes A.R., Macdonald H., Muscolo A., Nardi S. (2006). Stomatal Responses to Humic Substances and Auxin are Sensitive to Inhibition of Phospholipase A2. *Plant and Soil*, 283: 175-185.
- Schnitzer M. and Khan S.U.** (1972). *Humic Substances in the Environment*, Marcel Dekker, New York.
- Schnitzer M. and Khan S.U.** (1978). *Soil Organic Matter*. M. Schnitzer and S.U. Khan (eds.). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, pp 1-64.
- Siefermann-Harms D.** (1985). Carotenoids in photosynthesis. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochimica et Biophysica Acta.* 811: 325-355.
- Simpson A.J.**, Kingery W.L., Shaw D.R., Spraul M., Humpfer E., Dvortsak P. (2001). The application of ¹H HR-MAS NMR spectroscopy for the study of structures and associations of organic components at the solid-aqueous interface of a whole soil. *Environ. Sci. Technol.* 2001; 35-3321.
- Sivasankar S.**, Oaks A. (1996). Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. *Plant Physiol Biochem* 34: 609-620.
- Smith A.D.** (Ed) et al. (1997). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press ISBN 0-19-854768-4.
- Stevenson F. J.** (1982). *Humus Chemistry. Genis, Composition, Reactions*, John Wiley & Sons, New York.
- Stevenson F. J.** (1994). *Humus Chemistry. Genis composition and reactions* 2nd ed. Willy- Intersci, New York.
- Subler S.**, Dominguez J., Edwards C.A. (1998). Assessing biological activity of agricultural biostimulants: bioassays for plant growth regulators in three soil additives. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 29 (7&8): 859- 866.
- Sumner J.B.** (1926). The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease. *J. Biol. Chem.* 69:435-441.

Supattapone S., Bosque P., Muramoto T., Wille H., Aagaard C., Peretz D., Nguyen H.O., Heinrich C., Torchia C., Safar J., Cohen F.E. DeArmond S.J., Prusiner S.B. & Scott M. (1999). Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell*, 96: 869-878.

Tagliavini E., Moretti F., Decesari S., Facchini M.C., Fuzzi S., Maenhaut W. (2006). Functional group analysis by H NMR/chemical derivatization for the characterization of organic aerosol from the SMOCC field campaign". *Atmos. Chem. Phys.*, 6: 1003-1019.

Taiz L., Zeiger E. (1998). *Fisiologia Vegetale*. Piccin. 646 pp.

Varanini Z. and Pinton R. (2001). Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition. *In* The Rhizosphere, Pinton, R., Varanini, Z., and Nannipieri, P., eds., Marcel Dekker, Basel, pp. 141–158.

Vaughan D. (1967a). The stimulation of invertase development in aseptic storage tissue slices by humic acids. *Soil Biol. Biochem.* 1, 15–28.

Vaughan D. (1967b). Effect of humic acid on the development of invertase activity in slices of beetroot tissues washed under aseptic conditions. *Humus Planta* iv, 268–271.

Vaughan D., Malcom R.E. (1985). Influence of humic substances on growth and physiological processes. *In*: Vaughan D., Malcom R.E., Eds., *Soil Organic Matter and Biological Activity* Martinus Nijhoff, Dordrecht/ Dr junk W. Publishers, Dordecht, The Netherlands, pp 37-76.

Vercesi B. (1995). *Diserbanti e loro impiego*. Edagricole Bologna.

Went F.W. e Kenneth Thimann V. (1937). *Phytohormones*. New York; The Macmillan Company. <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.5695>.

Wershaw R.L. (1986). A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic chemicals in soil water and sediment-water system. *J. Contam. Hydrol.* 1, 29-45.

Woodwell G.M., and Houghton, R. H. (1977). Biotic influences on the world carbon budget. *In* *Global Chemical Cycles and Their Alterations by Man*, Stumm, W., ed., John Wiley & Sons, New York, pp. 61–72.

Woodwell G.M., Whittaker, R. H., Reiners, W. A., Likens, G. E., Delwiche, C. C., and Botkin, D. B. (1978). The biota and the world carbon budget. *Science* 199, 141–146.

Young A. J., Phillip D., Savill J. (1997). Carotenoids in higher plant photosynthesis. *In*: *Handbook of photosynthesis* (Ed. Pessaraki M.). Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 575-596.

Zhang X., Ervin E.M., Schmidt R.E. (2003). Effects of liquid application of a seaweed extract and a humic acid on creeping bent grass (*Agrostis palustris* Huds A.). *J. Amer Soc. HortSci*, 128: 492-496.

3. SCOPO DELL'ATTIVITÀ SPERIMENTALE

Negli ultimi anni, allo scopo di tutelare l'ambiente, si è ritenuto opportuno ridurre le sostanze chimiche somministrate al terreno attraverso la ricerca di soluzioni alternative più ecocompatibili.

Particolare attenzione è stata posta all'impiego di sostanze naturali da usare in alternativa ai biostimolatori sintetici in grado di favorire la crescita delle piante e migliorare la produttività in termini quantitativi e qualitativi.

Lo scopo dell'attività di ricerca è stato di verificare l'effetto di estratti alcalini da materiali diversi, tutti di origine vegetale, sulla crescita ed il metabolismo di piante coltivate.

Tra i materiali usati, particolare interesse rivestono residui dell'estrazione di olii destinati alla produzione di biodiesel e materiale di scarto della produzione di biogas i quali, possono rappresentare un'importante risorsa per la produzione di sostanze ad alto valore aggiunto quali, appunto, quelle ad azione biostimolante.

4. PARTE SPERIMENTALE

4.1 Paper N° 1

Andrea Ertani, Diego Pizzeghello, Andrea Baglieri, Valeria Cadili, Fulvia Tambone, Mara Gennari, Serenella Nardi.

Humic-like substances from agro-industrial residues affect growth and nitrogen assimilation in maize (*Zea mays* L.) plantlets.

Journal of Geochemical Exploration, 2013, 129, 103-111.



Humic-like substances from agro-industrial residues affect growth and nitrogen assimilation in maize (*Zea mays* L.) plantlets

Andrea Ertani^a, Diego Pizzeghello^a, Andrea Baglieri^{b,*}, Valeria Cadili^b, Fulvia Tambone^c, Mara Gennari^b, Serenella Nardi^a

^a Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente (DAFNAE), Università di Padova, Agripolis, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro, Padova, Italy

^b Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari, Università di Catania, Via S. Sofia 98, 95123 Catania, Italy

^c Gruppo Ricicla, Dipartimento di Produzione Vegetale, Università di Milano, Via Celoria 2, 20133 Milano, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 June 2012

Accepted 1 October 2012

Available online 10 October 2012

Keywords:

Agro-industrial residue

Auxin

Bioactive molecules

Digestate

Humic-like

Nitrogen metabolism

ABSTRACT

Humic-like substances (HL) extracted from the agro-industrial residues of rape (*Brassica napus*) (B-HL), castor-oil (*Ricinus communis*) (R-HL) and flax (*Linum usitatissimum*) (L-HL), and from a digestate (D-HL) were analyzed for their elemental composition and characterized by FT-IR and ¹³CNMR spectroscopy. The indoleacetic acid (IAA), total phenol (TP) and flavonoid (FL) content, and their auxin-like activity were also determined. HL were then applied to maize plantlets in order to evaluate their effect on plant growth, nitrogen metabolism, and photosynthesis. Results showed that all the HL had a physiologically active IAA, TP and FL content. HL positively affected the growth of maize with a noticeable increase in leaf biomass. The HL from digestate showed the highest values of glutamine synthetase and glutamate synthase enzyme activity, whereas both L and B-HL were more efficient in affecting the chlorophyll a, b and total carotene content. In conclusion, the biostimulant activity of the four HL varied, but the greater bioactivity of HL from digestate was a result of its high acidity and carbon distribution together with its high IAA and TP content, and high auxin-like activity.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

For many years agricultural research has aimed at improving crop yields, while placing little importance on the quality of the products or environmental protection. More recently, the environmental impact of production methods, high production costs and the need to reduce chemical substances in the soil have become important agricultural objectives (Gastal and Lemaire, 2002). To promote efficient plant adsorption of nutrients and reduce environmental pollution, a number of chemical molecules have been studied (Ertani et al., 2009, 2011). These compounds are defined as biostimulants and include humic substances (HS), seaweeds and amino acids (Miller, 1990). Over recent years, it has been shown that these compounds are of a mainly organic nature and can increase plant growth and development, both in the laboratory and in the field, in a different way from normal fertilizers (Quilty and Cattle, 2011). The most frequent mechanisms of action are: stimulation of microbial activity, increased activity of a number of

soil enzymes, increased production of hormones in the soil or growth regulators in plants and stimulation of numerous plant metabolism parameters (Nardi et al., 2009). Frankenberger and Arshad (1995) observed that biostimulants lead to a more efficient adsorption of nutrients due to better root development in the treated plants and a greater number of root hairs. Moreover, it was also demonstrated that these compounds increase photosynthetic efficiency by promoting an accumulation of sugars in fruit, fruit set, improved size and conservability (Presutto and Pezzutto, 2005). Some authors have shown that biostimulants can make a crop less sensitive to stressful conditions (drought, extreme temperatures, excessive moisture in the rhizosphere, over or under-exposure to light), due to a greater production of anti-oxidants (Ertani et al., 2011; Subler et al., 1998). Nevertheless, maximum efficiency is only achieved if they are administered at specific times, using the optimal dose which varies according to the crop and even from cultivar to cultivar (Zhang et al., 2003).

It is known that soil HS can affect plant growth by simulating the behavior of plant hormones (Jindo et al., 2012; Nardi et al., 2009; Trevisan et al., 2010). The presence of indoleacetic acid (IAA) has been demonstrated using both immunological approaches (Muscolo et al., 1998) and gas-chromatography mass spectrometry (Canellas et al., 2002). Nevertheless, humic substances cannot be classified as real hormones. It is also known that HS influence the assimilation of nutrients depending on the pH and concentration of the humic substances

* Corresponding author at: via Santa Sofia 98, 95123 Catania, Italy. Tel.: +39 095 7580241; fax: +39 095 7141581.

E-mail addresses: andrea.ertani@unipd.it (A. Ertani), diego.pizzeghello@unipd.it (D. Pizzeghello), abaglie@unicat.it (A. Baglieri), valeriacadili@tiscali.it (V. Cadili), fulvia.tambone@unimi.it (F. Tambone), mgennari@unicat.it (M. Gennari), serenella.nardi@unipd.it (S. Nardi).

themselves (Vaughan et al., 1985). Moreover, carboxylic and hydroxyl functional groups in HS have been correlated to their biochemical activity (Muscolo et al., 2007a,b).

Using similar procedures to those for extracting HS from the soil, it is possible to extract organic fractions, defined as humic-like (HL) substances, from the biomass. Different studies have shown that these substances have a number of properties. For example, Montoneri et al. (2008) took a humic-like fraction extracted from solid urban waste and studied its capacity to solubilize a textile colorant and soil contaminants like the aromatic, polycyclic hydrocarbons (PAH). This capacity was compared to that of sodium dodecyl sulfate (SDS). The results showed that there was a greater solubility of both the colorant and the soil pollutants when using the humic-like substance than when using SDS. In another study Montoneri et al. (2009) observed that some humic-like acids isolated from organic plant wastes had such excellent surfactant properties that they could be used as industrial surfactants.

This work aims at evaluating the possible biostimulant effect of humic-like substances extracted from agro-industrial wastes: rape, castor oil and flax plant and digestate residues. The extracts were characterized by means of elemental analysis, FT-InfraRed (FT-IR) and ^{13}C NMR spectroscopy. The presence of bioactive molecules such as indoleacetic acid (IAA), total phenolic acids (TP) and flavonoids (FL) was determined and then the hormone-like activity was evaluated by a bioassay. HL extracts were then applied to maize plantlets and their effect on the growth, nitrogen metabolism, and photosynthetic parameters of the plants was considered. The relationship between some chemical characteristics of HL and their overall biostimulant activity was then discussed.

2. Materials and methods

2.1. Humic-like substances (HL)

The humic-like components (HL) were extracted from agro-industrial wastes including: oil extraction residues from rape (B-HL, *Brassica napus* L.), castor-oil plant (R-HL, *Ricinus communis* L.) and flax (L-HL, *Linum usitatissimum* L.) and from digestate (D-HL). The latter was obtained from an agro-livestock farm which uses an anaerobic digestion plant to produce biogas. The extraction procedure was inspired by a previously reported procedure (Montoneri et al., 2009) and is described below. 200 g of finely ground waste was treated with aqueous 0.1 mol L^{-1} KOH at a 1:5 w/v (waste/solution ratio). The suspension was shaken under N_2 for 20 h, allowed to settle overnight then centrifuged (3000 rpm for 20 min) to separate the supernatant. A triplicate series of alternate treatments with 0.1 mol L^{-1} KOH was carried out on solid residue in order to solubilize and totally remove the humic-like (HL) substances. The supernatant solutions obtained were collected and freeze dried.

2.2. Basic characterization of HL

The C, N, S content of B, R, L and D-HL was measured using an element analyzer (vario MACRO CNS, Hanau, Germany). The HL were characterized for total acidity group content (TA) in accordance with the barium hydroxide method proposed by Swift (1996). Soluble phenolic acids were extracted with 3 mL pure methanol (1:10 w/v). The extracts were maintained in an ice bath for 30 min and centrifuged at $5000 \times g$ for 30 min at 4°C . The supernatants were stored at -20°C until analysis. Total phenols were measured according to Arnaldos et al. (2001). Flavonoids were extracted from 1 g material using 50 mL of acidified methanol solution. The extracts were kept at 4°C for 16 h before measuring the absorbance at $\lambda = 300 \text{ nm}$. Flavonoids have been expressed as gallic acid equivalents.

2.3. FT-IR spectra

The FT-IR spectra were obtained with a Perkin-Elmer FT-IR 2000 spectrometer (Phoenix Equipment Inc., NY), equipped with an IR source, KBr beam splitter and DTGS KBr detector. For each sample, 64 scans were recorded with a resolution of 4 cm^{-1} , over a range of $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$, on pellets which were obtained by pressing (10,000 kg for 30 min) a mixture of 1 mg of HL sample and 400 mg dried KBr under reduced pressure.

2.4. Solid-state CP MAS ^{13}C NMR spectra

The solid-state CP MAS ^{13}C NMR spectra of the samples were acquired at 10 kHz on a Bruker AMX 600 spectrometer (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten) using a 4 mm CP-MAS probe. The pulse repetition rate was set at 0.5 s, the contact time at 1 ms and the number of scans was 1800. A contact time of 1 ms was obtained after the VCT experiments. The error in signal acquisition caused by using the average contact time was determined by comparing the signal intensity in the absence of carbon relaxation $-I_0$ and the intensity of the signal I_{TCP} measured at the optimal contact time. In these conditions, it was shown that CP MAS ^{13}C NMR provides a quantitative representation of the C content in humic substances (Conte et al., 2002). The reference standard for the chemical shift scale of the CP MAS- ^{13}C NMR spectra was tetramethylsilane ($\delta = 0 \text{ ppm}$). For a semi-quantitative approach, the ^{13}C NMR spectra were subdivided into five regions. Five types of carbon can be distinguished in the NMR spectrum (Table 1): (i) short chain aliphatic carbon (e.g., volatile fatty acid and steroid-like molecules) (Réveillé et al., 2003) (0–28 ppm); (ii) long chain aliphatic carbon (e.g., plant aliphatic biopolymers) (Pereira et al., 2005) and proteins (Dignac et al., 2000) (28–47 ppm); (iii) O-alkyl carbon (e.g., polysaccharides) (Kögel-Knabner, 2002) (47–113 ppm); (iv) aromatic carbon (e.g. lignin) (Ussiri and Johnson, 2003) (113–160 ppm); and (v) carbonyl carbon in aliphatic esters, carboxyl groups, and amide carboxyl (160–210 ppm). Spectra were elaborated using TOPSPIN 1.3 software (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany).

2.5. Indoleacetic acid quantification

Indole-3-acetic acid (IAA) was quantified by using an enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) (Phytodetek, Sigma, St. Louis, MO). The ELISA test utilized monoclonal antibodies sensitive in the 0.05–100 picomol IAA range. The tracer and standard solutions were prepared following the manufacturer's instructions, and the absorbance values were read at $\lambda = 405 \text{ nm}$ with a Biorad microplate reader (Hercules, CA). Details of this test as applied to HS have been previously reported (Schiavon et al., 2010).

2.6. Phytohormone-like activity

The hormone-like activity of B-HL, R-HL, L-HL and D-HL was assessed by measuring the reduction in root growth in watercress (*Lepidium sativum* L.) (Audus, 1972). Watercress seeds were surface-sterilized by immersion in 8% hydrogen peroxide for 15 min.

Table 1
Ash, elemental composition, atomic ratio and total acidity content of the four bio-products.

Sample	Ash (%)	C	N	S	C/N atomic ratio	Total acidity meq g^{-1}
B-HL	19.2	39.3	9.5	0.8	4.8	8.4
R-HL	13.2	48.0	7.5	1.8	7.5	4.3
L-HL	27.6	36.3	6.0	0.6	7.1	13.1
D-HL	54.7	29.2	2.4	0.7	14.2	18.7

After rinsing 5 times with sterile distilled water, 15 seeds were placed on sterile filter paper in a sterile Petri dish. The filter paper was wetted with 1.2 mL 1 mM CaSO_4 (control), or 1.2 mL of 10, 1, 0.1, or 0.01 mg L^{-1} indoleacetic acid (IAA) (Sigma, St. Louis, MO) to obtain the calibration curve, or 1.2 mL of a HL solution ranging from 10 mg mL^{-1} to 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The seeds were allowed to germinate in the dark at 25 °C. After 48 h the seedlings were removed and the root lengths were measured with a TESA-CAL IP67 electronic caliper (TESA, Renens, CH) and Data Direct software, version 1 (ArtWare, Asti, IT). Data from the standard curve were transformed on natural logarithmic scale to obtain the best linear fitting. Regression analysis was used to calculate the HL dose-response curves. Both the standard curve and the progression of HL dilutions were repeated twice with three replicates per experiment. The standard deviations were always less than 5% with $n = \text{c.a. } 90$.

2.7. Plant material

Zea mays L. seeds (var. DKc 5783, DeKalb, Lodi, IT) were soaked in distilled water for one night and then surface-sterilized in 5% (v/v) sodium hypochlorite for 10 min while shaking. The seeds were left to germinate for 60 h in the dark at 25 °C on a filter paper wetted with 1 mM CaSO_4 (Nardi et al., 2000). Germinated seedlings were transplanted into 3 L pots containing an aerated modified Hoagland solution (Hoagland and Arnon, 1950), with a density of 24 plants per pot. The nutrient solution was renewed every 48 h and had the following composition: (μM): KH_2PO_4 (40), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (200), KNO_3 (200), MgSO_4 (200), FeNaEDTA (10), H_3BO_3 (4.6), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.036), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.9), ZnCl_2 (0.09), $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.01). Plants were cultivated in a climate chamber under a 14 h light/10 h dark cycle, with an air temperature of 27/21 °C, relative humidity of 70/85% and at a photon flux density of 280 $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Twelve days after transplanting B, R, L or D-HL was added to the nutrient solution contained in the pots at different concentrations: 0 (Control, CTR), 0.1 and 1 mL L^{-1} from a initial solution of 100 $\text{mg } 10 \text{ mL}^{-1}$. After 48 h, plants were randomly harvested from three pots per treatment and then fresh samples of roots and leaves were carefully washed and dried with blotting paper. A sub-sample of the plant material was immediately frozen with liquid nitrogen and kept at -80 °C for physiological analyses. For dry weight measurement, thirty plants were used (ten per treatment from each pot). Plants were divided into roots and leaves, and weighed separately. The samples were placed in a drying oven for 2 d at 70 °C and allowed to cool for 2 h inside a closed bell jar. The dry weight was measured per plant.

To evaluate the possible physiological effect of a high K^+ or NH_4^+ concentration in the extracts, the concentration of the two ions in the solutions used for the treatments was determined. Aqueous solutions containing HL (100 $\text{mg } 10 \text{ mL}^{-1}$) were diluted 1:1000 (v:v) and analyzed for K^+ and NH_4^+ content by ICP and ion chromatography, respectively. The amount of K^+ was 0.49, 0.49, 0.50 and 1.13 mg L^{-1} for B-HL, R-HL, L-HL, and D-HL, respectively. The NH_4^+ content was 0.03, 0.05, 0.13 and 0.05 mg L^{-1} for B-HL, R-HL, L-HL and D-HL, respectively.

2.8. Analysis of total nitrogen, nitrate, and soluble proteins

The nitrogen content was measured using a dry combustion procedure inside an element analyzer (vario MACRO CNS, Hanau, Germany). Root and leaf tissues (1 g) of five representative plants per pot were frozen in liquid nitrogen and homogenized (1:5 w/v) in 10 mM HCl to determine nitrate content. The extract was filtered through two layers of muslin and clarified by centrifugation at 35,000 $\times g$ for 15 min. All the steps were performed at 4 °C. The supernatant was filtered (0.22 μm ; Membra-Fil® Whatman Brand, Whatman, Milano, Italy). The quantification of NO_3^- was performed by HPLC using an AS 4S-SC anionic exchange column (Dionex, Sunnyvale,

CA, USA), equipped with a Dionex suppressor and a 431 conductivity detector (Waters-Millipore, Milford, MA, USA). The eluent was a solution of sodium bicarbonate and sodium carbonate (1.7 mM NaHCO_3 /1.8 mM Na_2CO_3) at a 2 mL min^{-1} flow rate. Sodium nitrate (Fluka, Buchs, Switzerland) was used as a reference standard. Nitrate concentration is expressed as $\text{NO}_3^- \mu\text{mol g}^{-1}$ fresh weight.

To extract the proteins, the foliar and root tissues (100 mg) of five representative plants per beaker were ground in liquid nitrogen, vortexed with 5 mL of extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM Na_2EDTA , 5 mM DTT), and centrifuged at 14,000 $\times g$. The supernatants were mixed with 10% (w/v) trichloroacetic acid and centrifuged. The pellets obtained were re-suspended in 0.1 N NaOH. The protein concentration was analyzed according to Bradford (1976) using a UV/vis spectrophotometer (Lambda 1, Perkin-Elmer, Monza, Italy) at $\lambda = 595 \text{ nm}$. The soluble protein concentrations are expressed as $\text{mg of protein g}^{-1}$ fresh weight.

2.9. Determination of chlorophyll content

To determine the chlorophyll content, 300 mg of fresh foliar tissue from five representative plants per pot were ground in liquid nitrogen and extracted with 15 mL ethanol (96% v/v). The samples were kept in the dark for 2 d at 4 °C, and the extracts were filtered and then analyzed spectrophotometrically (UV/VIS Lambda 1; PerkinElmer, Norwalk, CT) at $\lambda = 665 \text{ nm}$ for chlorophyll *a*, 649 nm for chlorophyll *b*, and 470 nm for total carotene (TC). Chlorophyll *a*, *b* and TC concentrations were calculated using the Wellburn and Lichtenthaler (1984) formula and expressed in $\text{mg of pigment per g}^{-1}$ of leaf fresh weight. Determination of the relative chlorophyll concentration was also performed using a non-destructive method: a SPAD (Soil Plant Analysis Development) chlorophyll meter (Minolta, SPAD-502, Osaka, Japan) on the last expanded leaf of the maize plants. Three measurements were performed for each plant, on six plants per treatment.

2.10. Enzyme extraction and assay conditions

N reduction and assimilation enzymes were extracted by grinding root and leaf tissues (1 g) in a mortar with a 100 mM Hepes-NaOH solution at pH 7.5, 5 mM MgCl_2 solution, and 1 mM dithiothreitol (DTT) solution. The ratio of plant material to solution mixture was 1:3. The extract was filtered through two layers of muslin and clarified by centrifugation at 20,000 $\times g$ for 15 min. The supernatant was used for enzymatic analysis. All the steps were carefully performed at 4 °C. Nitrate reductase (NR) (EC 1.7.1.1) activity was determined in an assay containing 100 mM KH_2PO_4 , 100 mM KNO_3 and 400 μL of enzyme extract. The activity was measured spectrophotometrically at $\lambda = 540 \text{ nm}$ and the calibration curve was carried out with known concentrations of NaNO_2 (Lewis et al., 1982). For the glutamine synthetase (GS, EC 6.3.1.2) assay the mixture contained 90 mM imidazole-HCl (pH 7.0), 60 mM hydroxylamine (neutralized), 20 mM K_2SO_4 , 3 mM MnCl_2 , 0.4 mM ADP, 120 mM glutamine and the appropriate amount of enzyme extract. The assay was performed in a final volume of 750 μL . The enzymatic reaction was developed for 15 min at 37 °C. The α -glutamyl hydroxamate was colorimetrically determined by adding 250 μL of a mixture (1:1:1) of 10% (w/v) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 0.2 M HCl, 24% (w/v) trichloroacetic acid and 50% (w/v) HCl. The optical density was recorded at $\lambda = 540 \text{ nm}$ (Canovas et al., 1991). The glutamate synthase (GOGAT, EC 1.4.7.1) assay contained 25 mM Hepes-NaOH (pH 7.5), 2 mM glutamine, 1 mM α -ketoglutaric acid, 0.1 mM NADH, 1 mM Na_2EDTA and 100 μL of enzyme extract. GOGAT activity was measured spectrophotometrically by monitoring NADH oxidation at $\lambda = 340$ (Avila et al., 1987). Enzyme activities were repeated twice with three replicates per experiment.

2.11. Statistical analysis

Barlett's test was used on the data to test the homogeneity of variance. A two-way ANOVA was used to compare treatment effects. The factors considered were the type of HL and its concentration. The LSD test was applied to compare the difference between group means. Correlations between variables were determined using Spearman's coefficient. All statistical analyses were performed using SPSS for Windows software, version 18.0 (SPSS, Chicago, IL).

3. Results and discussion

3.1. Basic characterization of HL

The characterization data for HL are shown in Table 1. The ash content is highest for D-HL and lowest for R-HL. The ash content of more than 500 g kg⁻¹ found in the humic-like substances extracted from digestate attest to the presence of more inorganic than organic material. However, the high ash content in all the HL emphasize the importance of a purification step to obtain ash-free humic or humic-like fractions. In the present study, the purification step was intentionally omitted in order to make the extraction process faster and easier.

On a moisture and ash free basis, therefore, the following considerations can be made regarding the organic component of each fraction. The percentage of C is highest for R-HL and lowest for D-HL, while for B-HL and L-HL the contents are similar. The value of carbon for R-HL agrees with those determined for humic-like acids extracted from cattle manure, municipal solid waste and composted herbaceous material (Piccolo et al., 1992; Garcia et al., 1989). The values obtained for B-HL and L-HL are also similar to those determined for humic-like substances from farmyard and poultry litter (about 30% of Carbon - Pandeya, 1992; Prasad and Sinha, 1984). The content of D-HL is very close to that found for fulvic acid-like extracts from sewage sludges (approximately 40% of C; Sposito et al., 1982).

The nitrogen level is high for humic-like acids extracted from the agro-industrial residues while it is low for the extract from the digestate. The latter result is probably due to a loss of this element after anaerobic digestion by microorganisms. The values found for B-HL, R-HL and L-HL are similar to those found by other authors (Senesi et al., 1996) for humic-like acid extracted from various agricultural wastes. As a consequence of the above, the C/N ratio is lowest for B-HL and highest for D-HL.

The values of total acidity content are higher for D-HL and L-HL than those determined for B-HL and R-HL. The D-HL and L-HL values obtained are higher than those reported by Pandeya (1992) and Prasad and Sinha (1984) for humic-like substances from farmyard and poultry litter, respectively (TA about 11.5 meq g⁻¹). The value obtained for R-HL is comparable to those determined for humic-like acids extracted from cattle manure, citrus-pulp, municipal solid waste and composted herbaceous material (Garcia et al., 1989; Hammouda and Adams, 1987; Meli et al., 2007; Piccolo et al., 1992). Finally, a value similar to that found in humic-like acids extracted from sewage sludges (TA about 8.0 meq g⁻¹; Garcia et al., 1989) was obtained for B-HL.

3.2. FT-IR spectra

The assignment of the bands in the FT-IR spectra for the four humic-like substances extracted was performed in accordance with Stevenson (1982), Senesi et al. (1996) and Baglieri et al. (2012).

The 2922 and 2848 cm⁻¹ bands are attributed to the C-H stretching of the -CH₂- aliphatic groups, the 1715 cm⁻¹ band is assigned to the C=O stretching of the -COOH groups, the 1633 cm⁻¹ band is attributed to the C=O stretching of the linked quinones and/or ketones or to the C=O stretching of the amidic groups (amide I

band), the band at about 1515 cm⁻¹ is attributed to the vibration of the C=C of the II amides or -COO⁻ symmetric stretching, the 1460 cm⁻¹ band is attributed to the C-H stretching of the aliphatic groups and the bands at 1125 cm⁻¹ and 1030 cm⁻¹ to the C-O stretching of the polysaccharides or to the Si-O stretching of silicates.

The spectra (Fig. 1) obtained for B-HL and R-HL are very similar in shape. In both the peaks attributable to the C-H stretching of aliphatic groups -CH₂- (2922, 2848 and 1460 cm⁻¹), the C=O stretching of COOH functional groups (1712 cm⁻¹), the C=O stretching of quinones and/or ketones or conjugated to the C=O stretching of the amide groups (amide I band) (1633 cm⁻¹) are very evident. The last assignment is the most probable for organic fractions rich in nitrogen such as those studied (Table 1).

The L-HL and D-HL spectra are also similar but different from those described previously. In the flax and digestate extracts the peaks attributed to the deformation of the aliphatic groups were less evident than in extracts from castor-oil plant and rape (2923, 2852 and 1460 cm⁻¹), the peak at 1715 cm⁻¹ also disappeared in L-HL and D-HL. Finally, peaks attributable to the polysaccharides and inorganic impurities (1125 and 1028 cm⁻¹ respectively) are evident in these HL. The inorganic impurity content would seem to agree with the high ash content of L-HL and D-HL (Table 1). However, the presence of compounds containing Si-O groups, such as silicate minerals, is unlikely in alkaline extracts from biomass.

3.3. ¹³C CP MAS NMR analysis

¹³CPMAS NMR provides qualitative and quantitative information on the composition of the humic-like components by identifying the main C-type constituent of the organic matter (Conte et al., 1997). The relative changes in the levels of C containing groups are presented in Table 2. The B-HL and L-HL spectra are characterized by signals in the 0-47 ppm area attributable to the presence of alkyl-C (fatty acids and lipids) but also to the presence of proteins (Dignac et al., 2000). Peaks in this region (15-25 ppm) were representative of the presence of short alkyl-C chains such as fatty acids (Tambone et al., 2009). On the other hand, peaks observed in all the samples at 30-40 ppm are indicative of the presence of aliphatic-C with long polymethylene chains, typical of vegetables (e.g. cutine, waxes and suberine) and/or of long chain fatty acids present in the

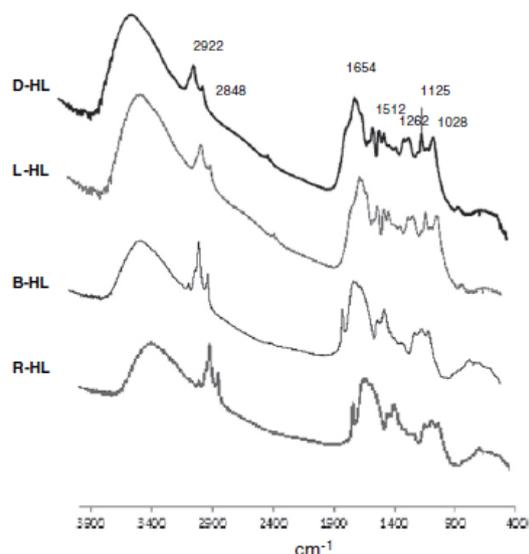


Fig. 1. FT-IR spectra of the humic-like (HL) substances isolated from: B, brassica, R, ricinus, L, linen and D, digestate.

Table 2
¹³CPMAS NMR integrated area of different carbon types for the four bio-products.

Samples	C-type			
	0–47 ppm total aliphatic C	47–113 ppm N-alkyl O-alkyl C di-O-alkyl C	113–160 ppm aromatic C	160–210 ppm carboxyl C keto C
B-HL	39.8	35.8	8.6	15.8
R-HL	10.9	63.8	17.8	7.5
L-HL	34.7	42.2	7.0	16.1
D-HL	23.8	48.6	16.0	11.6

oil extraction residues (Dignac et al., 2000; Pichler et al., 2001). The area at 165–210, was due, above all, to the presence of carboxylic-C, probably associated with the presence of both short and long fatty acids.

The ¹³C NMR spectra of D-HL is dominated by signals in the 47–113 ppm area (O-alkyl carbon, e.g., polysaccharides), in agreement with the FT-IR spectra results. Anaerobic digestion led to a change in the chemical composition of the ingestates. In particular, the process induces a great reduction in the aliphatic-C content and increases the O-alkyl-C content (Pereira et al., 2005). These results indicated that there was a widespread degradation of fatty acid during anaerobic digestion and that a relative concentration of the O-alkyl fraction occurred. This interpretation was confirmed by the fact that the –carboxyl-C area decreased proportionally to the alkyl-C area. The particular peak at 56 ppm corresponds to carbon atoms substituted by amino groups, i.e., in peptides and amino acids but it could also indicate the –OCH₃ of both lignin and hemicelluloses. The peak close to 72 ppm, is due to the O-alkyl C of the C-2, C-3 and C-5 atoms of polysaccharides (cellulose and hemicelluloses). The 105 ppm peak represents the anomeric carbon atoms (C-1) of cellulose and the peak at 65 ppm is due to C-6 in hexose and/or C-5 in pentose (Veecken et al., 2001). In addition in the D-HL spectrum there is a peak at 158 ppm which is higher than that present in the B-HL and L-HL spectra, where it appears at 153 and 157 ppm, respectively (Fig. 2). On the contrary, this signal is not present in R-HL. In ¹³C NMR spectra of humic substances, the adsorption near 158 ppm is usually attributed to the methoxylic group bound to an aromatic ring carbon (Senesi et al., 1989).

Finally, the R-HL spectra is dominated by signals in the 47–113 ppm area (O-alkyl carbon). Interestingly, there are the peaks in this spectra in the 115–160 ppm area, indicating the presence of lignin (Ussiri and Johnson, 2003) but also of phenols and poly-phenols, which are typically contained in oil residues.

In conclusion, on the basis of the distribution of the various types of carbon, B-HL and L-HL are similar; R-HL is richer in substituted aliphatic compounds (e.g., polysaccharides and proteins) and more aromatic than the previous fractions. While D-HL has a similar aromatic C content to R-HL.

3.4. Biochemical characterization of HL

HL substances contained differing amounts of indoleacetic acid (IAA), total phenolic acids (TP), and flavonoids (FL) (Table 3). Of the bio-products, digestate had the highest contents of all three types of biomolecule, R-HL had the lowest amounts of IAA and TP, whereas L and B-HL had intermediate values of IAA and phenolic acids. In order to perform some activities HS and biostimulants must not only possess biomolecules but they should also be present in sufficient quantity to be physiologically active (Nardi et al., 2009; Quilty and Cattle, 2011). In HL IAA was present in a wide concentration range from 9.47 to 32.63 nmol L⁻¹. These amounts are consistent with those hydrolyzed from alfalfa (18 nM) (Ertani et al., 2012) and in different humic fractions extracted from earthworm coprolites (27–34 nM) (Schiavon et al., 2010; Trevisan et al., 2010). Total phenolic acids were low when compared with dry apple and blueberry derived products (530–

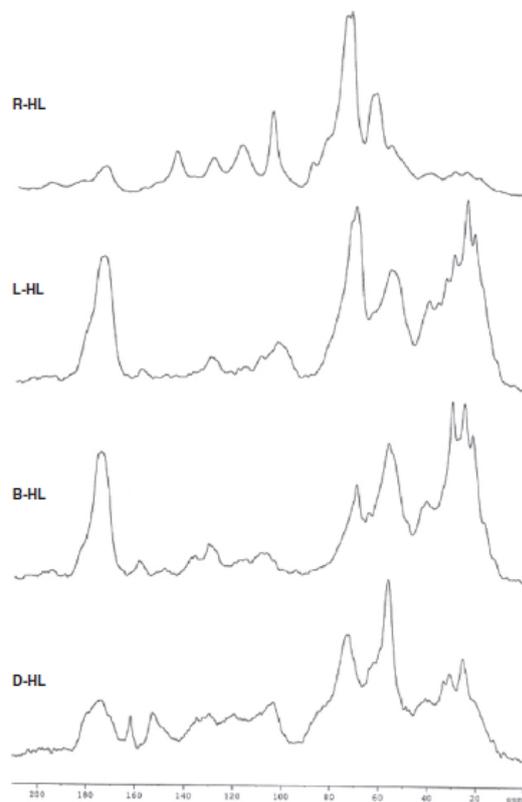


Fig. 2. ¹³C CPMAS NMR spectra of the humic-like (HL) substances isolated from: B, brassica, R, ricinus, L, linen and D, digestate.

710 μM) (Ertani et al., 2011). To our knowledge no comparisons are possible for flavonoids as this is the first time that these compounds have been determined in bio-products to be used for plant nutrition.

3.5. Auxin-like activity

The bioactivity of the IAA present in HL was checked by evaluating the effect of HL on the growth of watercress (*L. sativum* L.) which is a typical bioassay for auxins (Audus, 1972). Results showed that the type of treatment and concentration ($P \leq 0.05$) significantly affected watercress growth. The standard dose–response curve (IAA) fitted at a P value ≤ 0.001 and it was found that as the concentration of auxin increased root lengths shortened considerably (Fig. 3) (Table 4). HL dose–response curves behaved similarly with respect to auxin and a significant shortening in the length of roots was found as the carbon (C) concentration increased (Fig. 3) (Table 4). The type of treatment affected watercress growth in the order IAA > D-HL > B-HL = L-HL > R-HL ($P \leq 0.05$). However, if the curve

Table 3
Indoleacetic acid (IAA), total phenolic acid (TP), and flavonoid (FL) content in the 4 humic-like (HL) substances (brassica, B, ricinus, R, linen, L and digestate, D).

Treatment	IAA nmol L ⁻¹	TP nmo lL ⁻¹	FL mmol L ⁻¹
B-HL	14.42 ± 0.51b*	5.48 ± 0.18c	1.86 ± 31c
R-HL	9.47 ± 0.38d	4.49 ± 0.11d	2.52 ± 15b
L-HL	11.54 ± 0.42c	7.22 ± 0.25b	0.96 ± 33d
D-HL	32.63 ± 1.17a	13.11 ± 0.47a	3.66 ± 45a

* Values in the same column followed by the same letter are not statistically different at $P < 0.05$ as per the LSD test.

parameters (coefficient b) and C concentration intervals at which the curves significantly fitted are taken into consideration, the results show that both D and L-HL were more effective than B-HL. In fact, D and L-HL produced significant curves with a larger carbon concentration range than that of B-HL (Fig. 3). B-HL had a high modal value of b coefficient but was effective only in a narrow C concentration interval whereas R-HL had both a higher b coefficient and a narrower dosage interval, thus indicating a very low level of IAA activity (Table 4) (Fig. 3). The auxin-like effect of HS has long been recognized (for a review see Nardi et al., 2009) and the physiological role of the auxin entrapped in the HS structure has recently been confirmed by a molecular approach (Trevisan et al., 2010). Nevertheless, HS with the same amount of IAA but with a different molecular mass did not induce the same effect (Muscolo et al., 2007a,b). An auxin-like activity is exerted by other humic substance components such as the carboxylic groups, key receptors in triggering the bioavailability of IAA, the functional groups in general, and phenolic compounds (Canellas et al., 2010; Jindo et al., 2012; Muscolo et al., 2007a,b; Napier, 2001, 2004; Rubery, 1981). The role of phenolic acids in plant growth and metabolism has been the object of intensive studies (Inderjit, 1996; Mandal et al., 2010). At concentrations of 0.1–1 mM, many phenolic compounds are toxic to plants, especially seedlings. Nevertheless, at lower concentrations a number of phenolic acids have been shown to have effects similar to those of indoleacetic acid or gibberellic acid (Hrubcová et al., 2000; Pizzeghello et al., 2006). Flavonoids in plants protect against UV radiation, function as antioxidants and auxin transport regulators, have a role in plant micro-organism signalling, and as a defence against pathogens (Hassan and Mathesius, 2012). In the rhizosphere, as well, flavonoids can have multifunctional roles regulating root growth and functions and influencing nutrient cycles such as the N cycle (Cesco et al., 2012). They are present in the rhizosphere in a concentration ranging

Table 4

Parameters of the regression curve ($Y=a+b\log(X)$) of the standard (IAA) and humic-like (HL) substances (brassica, B, ricinus, R, linen, L, and digestate, D) on the root reduction of 48 h-old watercress plantlets.

Treatment	R ²	P _≤	a	b
IAA	0.970	0.001	4.10	-0.490
B-HL	0.509	0.020	6.99	-0.281
R-HL	0.877	0.050	8.65	-0.101
L-HL	0.734	0.001	5.90	-0.270
D-HL	0.953	0.001	5.21	-0.376

R² = R-squared; P_≤95%; a = intercept; b = slope.

from 1 μM to 10⁻¹⁰ M (Hassan and Mathesius, 2012), thus the concentration used in our experiments can be physiologically active. As a result of the above, IAA, total phenolic acids, and flavonoids were among the bioactive components in the four HL.

3.6. Biological activity in maize

Maize plantlets were significantly affected by the type of treatment and concentration used. Treatment affected the fresh and dry weight with slight increments in the roots and high increments in the (Table 5). Root fresh weight was positively influenced when plants were treated with 0.1 mL L⁻¹ of both D-HL (+14%) and L-HL (+12%) or 1 mL L⁻¹ B-HL (+15%), whereas root dry weight was increased when plants were treated with L-HL at a concentration of 1 mL L⁻¹ (+13%). Decrements or no differences with respect to the control were found for the other bio-products. The fresh to dry weight ratios (Table 5) also confirmed the effectiveness of D-HL on root fresh weight and of L-HL on the dry weight. As far as leaves are concerned, almost all the products induced significant increments both in fresh and dry weight (Table 5). The most bioactive products

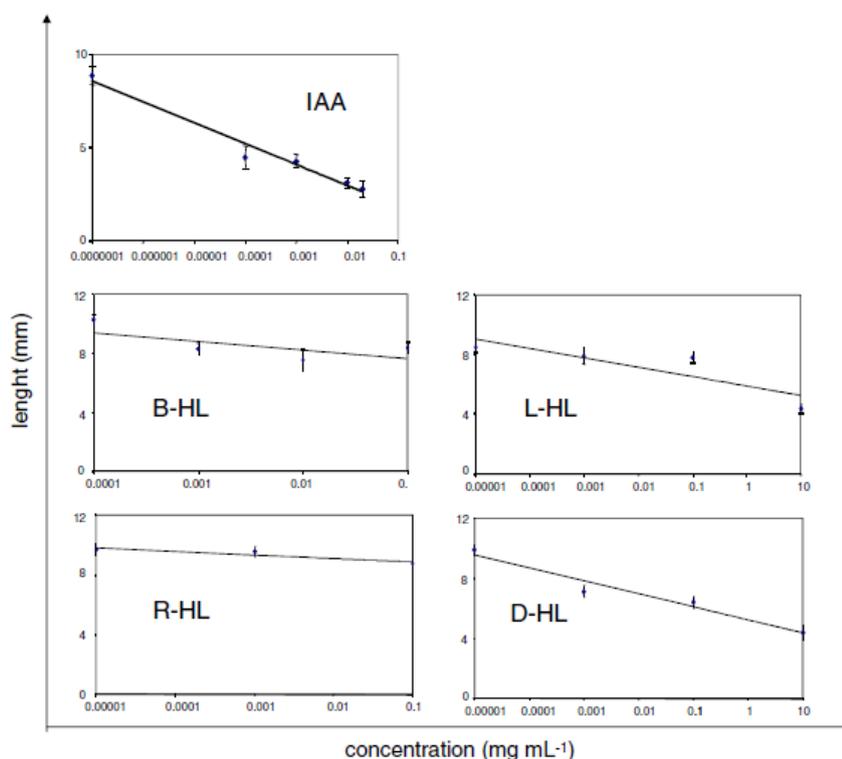


Fig. 3. Indoleacetic (IAA) standard curve and dose-response curves for the four humic-like (HL) substances obtained by checking the changes in length of watercress plantlet roots. In HL fitted points were: B, brassica, R, ricinus, L, linen and D, digestate.

were B-HL at 0.1 mL L⁻¹ (+31%) and D-HL at 1 mL L⁻¹ (+28%) for the fresh weight, and L-HL (+26%), B-HL (+24%) and R-HL (+21%) at 0.1 mL L⁻¹ for the dry weight. These results were confirmed by considering the fresh to dry weight ratio (Table 5). However, from the root to shoot ratio (Table 6) it can be seen that treatment induced decrements as compared to the controls, both for the fresh weight and dry weight and the lowest values were recorded for R-HL at 1 mL L⁻¹ (0.265 and 0.420, respectively). Thus it appears that the bio-products mostly affect the plant weight at shoot level. It is known that HS induce a general increment in the fresh and dry weight of both roots and leaves according to the type and concentration of the HS and the plant species, age and organ (Nardi et al., 2009). These results are also in accordance with the growth increments observed in maize roots and shoots treated with two protein-hydrolyzate-based fertilizers, one from alfalfa and one from meat flour (Ertani et al., 2009). Moreover, the addition of the different extracts to the Hoagland solution determined only a low increase in the K⁺ and NH₄⁺ ion content, therefore it is unlikely that the effects of HL on the plants is due to the presence of these ions.

With regard to the nitrate metabolism, it was evident that all the treatments induced a decrement in the nitrate content and an increment in the protein content, both in roots and leaves, against a steady level of total nitrogen content (Table 7). Both the type of treatment and concentration slightly influenced nitrate reductase (NR), whereas high increments were found in glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT) activity (Table 8). In roots, NR had a slightly positive effect induced by D, L and R-HL (+7%, +10%, and +5%, respectively). For GS and GOGAT, high increments were reported in the order D-HL > R-HL > B-HL. In particular, D-HL showed the highest increments of GS and GOGAT enzyme activity with values up to threefold those of the control. In leaves, slightly positive effects were recorded by L-HL and B-H in the activity of NR, whereas for GS and GOGAT high increments were found in the order D-HL > R-HL = B-HL > L-HL with values up to +190% more than the control.

Nitrogen is the major limiting factor in plant growth and productivity, therefore it is of great importance to study the enzyme activity related to its organization. The enzymes nitrate reductase (NR) and nitrite reductase catalyze the two-step reduction of nitrate (NO₃⁻) to ammonium (NH₄⁺), which is rapidly incorporated into organic compounds

Table 5

Mean values of fresh weight (FW), dry weight (DW), and FW:DW ratio of 14 d-old maize plantlets treated with brassica (B), ricinus (R), linen (L) and digestate (D) humic-like (HL) substances.

Factor	Root			Leaf			
	FW g	DW g	FW/DW	FW	DW	FW/DW	
T	CTR*	0.806B**	0.108A	7.48	2.026C*	0.173D	11.70
	B-HL	0.837A	0.105B	7.96	2.550A	0.207AB	12.33
	R-HL	0.702C	0.092C	7.66	2.405AB	0.200B	10.03
	L-HL	0.792B	0.113A	7.02	2.275B	0.217A	10.47
	D-HL	0.897A	0.088C	10.21	2.413AB	0.184C	13.08
C	0	0.806a	0.108a	7.48	2.026b	0.173b	11.70
	0.1	0.832a	0.100b	8.32	2.442a	0.204a	11.98
	1	0.777b	0.099b	7.89	2.370a	0.200a	11.85
T×C	CTR	0.806c	0.108b	7.48	2.026d	0.173c	11.70
	B-HL 0.1	0.732d	0.102b	7.19	2.651a	0.214a	12.36
	B-HL 1	0.931a	0.108b	8.60	2.460ab	0.200b	12.31
	R-HL 0.1	0.749d	0.101b	7.39	2.390b	0.209a	11.45
	R-HL 1	0.643e	0.079c	8.09	2.424ab	0.189bc	12.83
	L-HL 0.1	0.907a	0.107b	8.46	2.516ab	0.218a	11.54
	L-HL 1	0.612e	0.122a	5.02	1.896d	0.216a	8.77
	D-HL 0.1	0.921a	0.088c	10.47	2.224c	0.171c	12.98
	D-HL 1	0.872b	0.088c	9.94	2.602a	0.198b	13.17

* CTR = control.

** Values in the same column followed by the same letter are not statistically different at P < 0.05 as per the LSD test. T = treatment; C = concentration; T×C = interaction.

Table 6

Root to shoot ratio of fresh weight (FW) and dry weight (DW) of 14 d-old maize plantlets treated with brassica (B), ricinus (R), linen (L) and digestate (D) humic-like (HL) substances.

Factor		Root/shoot	
		FW	DW
T	CTR*	0.398A**	0.622A
	B-HL	0.328B	0.509B
	R-HL	0.292C	0.458C
	L-HL	0.348AB	0.520B
	D-HL	0.372A	0.476C
C	0	0.398a	0.622a
	0.1	0.341b	0.491b
	1	0.328c	0.493b
T×C	CTR	0.398ab	0.622a
	B-HL 0.1	0.276c	0.475
	B-HL 1	0.376b	0.542b
	R-HL 0.1	0.313b	0.485c
	R-HL 1	0.265c	0.420d
	L-HL 0.1	0.361b	0.491c
	L-HL 1	0.323b	0.564b
	D-HL 0.1	0.414a	0.513bc
	D-HL 1	0.335b	0.444d

* CTR = control.

** Values in the same column followed by the same letter are not statistically different at P < 0.05 as per the LSD test. T = treatment; C = concentration; T×C = interaction.

through the activity of the enzyme GS (Lea and Ireland, 1999). GS works in association with the enzyme glutamate synthase (GOGAT) to produce glutamate (Glu) from glutamine and α-ketoglutarate in the GS/GOGAT cycle. Thus, from our results, the reduction in nitrate content and the stimulation of the enzyme activity was transformed into an increment of the protein content both at root and leaf level. HL induced an increment in nitrogen organization, as reported for other biostimulants and humic substances (Chen et al., 2003; Ertani et al., 2009; Quaggiotti et al., 2004).

The interaction between N and photosynthesis is fundamental for crop production, and crosstalk was shown here by the high increase in nitrogen assimilation via GS and GOGAT enzyme activity following treatment. As compared to control plants, the chlorophyll contents

Table 7

Nitrogen, nitrate and protein content of maize plantlets treated with brassica (B), ricinus (R), linen (L) and digestate (D) humic-like (HL) substances.

Factor		Roots			Leaves		
		N	NO ₃ ⁻	Protein	N	NO ₃ ⁻	Protein
		%	mmol g ⁻¹ fw	mg g ⁻¹ fw	%	mmol g ⁻¹ fw	mg g ⁻¹ fw
T	CTR	4.81B*	63.48B	1.16E	3.60B	179.25B	3.01D
	B-HL	9.54A	99.63A	3.37A	7.13A	310.98A	7.92A
	R-HL	4.77B	55.65C	1.67C	3.66B	132.98C	4.45C
	L-HL	4.85B	55.09C	1.42D	3.64B	132.84C	4.81C
	DG-HL	4.78B	54.75C	2.67B	3.58B	138.44C	6.75B
C	0	4.81a	63.48a	1.15c	3.60a	179.25a	3.01c
	0.1	4.77a	53.90b	1.90a	3.62a	143.05b	4.63b
	1	4.82a	53.75b	1.82b	3.60a	136.83b	5.36a
T×C	CTR	4.81a	63.48a	1.16d	3.60a	179.25a	3.01d
	B-HL 0.1	4.79a	49.78c	1.64c	3.57a	163.04b	3.39d
	B-HL 1	4.76a	49.84c	1.73b	3.56a	147.94c	4.53c
	R-HL 0.1	4.73a	55.21b	1.81b	3.66a	135.81c	4.27c
	R-HL 1	4.82a	56.09b	1.53c	3.65a	130.16c	4.64c
	L-HL 0.1	4.76a	56.22b	1.48c	3.71a	130.12c	4.23c
	L-HL 1	4.95a	53.96b	1.36d	3.58a	135.55c	5.38b
	D-HL 0.1	4.78a	54.39b	2.68a	3.56a	143.24c	6.61a
	D-HL 1	4.77a	55.11b	2.67a	3.60a	133.65c	6.90a

* Values in the same column followed by the same letter are not statistically different at P < 0.05 as per the LSD test.

Table 8

Mean values for treatment (T), concentration (C) and T×C interaction of fresh and dry weight (FW, DW), and nitrate reductase (NR), glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT) activities in roots of 14 d-old maize plantlets treated with brassica (B), ricinus (R), linen (L) and digestate (D) humic-like (HL) substances.

Factor		Root			Leaf		
		NR	GS	GOGAT	NR	GS	GOGAT
		nmol g ⁻¹ min ⁻¹	mmol g ⁻¹ min ⁻¹	μmol g ⁻¹	nmol g ⁻¹ min ⁻¹	mmol g ⁻¹ min ⁻¹	μmol g ⁻¹
T	CTR	1.336A*	0.058D	8.30D	1.734C	0.049D	7.489E
	B-HL	1.092B	0.094C	13.38C	1.891B	0.116B	17.953B
	R-HL	1.021C	0.123B	18.74B	1.489D	0.113B	17.174C
	L-HL	1.368A	0.054D	8.56D	1.993A	0.094C	13.926D
	D-HL	1.336A	0.170A	25.71A	1.770C	0.141A	21.129A
C	0	1.336b	0.058c	8.30c	1.734b	0.049c	7.489c
	0.1	1.375a	0.103b	15.91b	1.713b	0.124a	18.849a
	1	1.011c	0.118a	17.29a	1.866a	0.107b	16.242b
T×C	CTR	1.336c	0.058e	8.30 g	1.734d	0.049e	7.489 g
	B-HL 0.1	1.155e	0.068d	10.35e	1.860bc	0.131b	19.876c
	B-HL 1	1.037f	0.118c	16.42d	1.918b	0.104c	16.029d
	R-HL 0.1	1.407b	0.129b	19.52b	1.231e	0.132b	19.751c
	R-HL 1	0.538 g	0.114c	17.97c	1.811c	0.090d	14.596e
	L-HL 0.1	1.465a	0.051f	8.19 g	2.041a	0.099c	14.933e
	L-HL 1	1.216d	0.058e	8.93f	1.918b	0.086d	12.920f
	D-HL 0.1	1.424ab	0.170a	25.58a	1.717d	0.139a	20.836b
	D-HL 1	1.248d	0.169a	25.86a	1.822c	0.142a	21.422a

*Values in the same column followed by the same letter are not statistically different at P<0.05 as per the LSD test. CTR=control.

and SPAD measurements indicated that treatment had induced significant effects on photosynthesis (Table 9). In particular, L-HL and B-HL treated plants had higher chlorophyll *a*, *b* and total carotene contents than the controls, whereas B-HL and D-HL induced the highest SPAD values. In support of this a correlation was also found between GS and GOGAT in roots ($R^2=0.98$, $p\leq 0.000$), and between root and leaf GS ($R^2=0.67$, $p\leq 0.000$), and GS and GOGAT in leaves ($R^2=0.97$, $p\leq 0.000$). A significant relationship between the SPAD index and photosynthesis-related N-metabolites such as chlorophyll *a* and *b* has been also reported (Debaeke et al., 2006). We found significant correlations between SPAD and GS in leaves ($R^2=0.30$, $p\leq 0.000$), and between SPAD and GOGAT in leaves ($R^2=0.31$, $p\leq 0.000$), while a strong correlation was seen between chlorophyll *a* and leaf NR ($R^2=0.81$, $p\leq 0.000$). From our results it was evident

Table 9

Mean values for treatment (T), concentration (C) and T×C interaction of chlorophyll *a*, *b* and total carotene and SPAD of maize plantlets treated with brassica (B), ricinus (R), linen (L) and digestate (D) humic-like (HL) substances.

Factor		Leaf			
		Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Total carotene	SPAD
		mg g ⁻¹			
T	CTR	0.681C*	0.312C	0.651C	28.318C
	B-HL	0.802B	0.365B	0.798B	35.894A
	R-HL	0.289D	0.309C	0.667C	27.511D
	L-HL	1.008A	0.451A	0.939A	29.433C
	D-HL	0.608C	0.278D	0.593D	32.883B
C	0	0.681a	0.312b	0.651b	28.318c
	0.1	0.663a	0.374a	0.814a	30.582b
	1	0.689a	0.324b	0.673b	32.273a
T×C	CTR	0.681d	0.312c	0.651d	28.318d
	B-HL 0.1	0.734c	0.325c	0.725c	34.638b
	B-HL 1	0.863b	0.401b	0.862b	37.011a
	R-HL 0.1	0.197 g	0.401b	0.857b	28.062d
	R-HL 1	0.404f	0.195e	0.430f	26.125e
	L-HL 0.1	1.014a	0.447a	0.954a	28.609d
	L-HL 1	1.000a	0.457a	0.917a	30.729c
	D-HL 0.1	0.691d	0.299c	0.674d	31.567c
	D-HL 1	0.525e	0.258d	0.511e	34.200b

*Values in the same column followed by the same letter are not statistically different at P<0.05 as per the LSD test. CTR=control.

that the SPAD index alone was not sufficient to evaluate photosynthetic efficiency and therefore chlorophylls and/or the activity of related enzymes must also be taken into consideration.

In conclusion, the four HL differed in their auxin, phenolic acid and flavonoid content and in their hormone-like activity. All the HL were efficient in increasing the protein content of maize and the activity of enzymes related to N assimilation and photosynthesis. Other bio-products, as humic-like substances from feces of earthworms and commercial lignosulfonate-humate, have recently been shown to affect plant metabolism by influencing nitrogen assimilation, the Krebs cycle, and the phenylpropanoid metabolism mostly as a result of their hormone-like activity (Ertani et al., 2011; Schiavon et al., 2008). These results, added to the results of our own research, suggest the existence of divergent but overlapping regulation mechanisms between bio-products and humic substances. In summary, this study has found that the humic-like substance from digestate has improved the nutrition and metabolism of maize plants due to the following parameters: high IAA and TP content, the high total acidity and the carbon distribution; similar parameters were found in a bioactive low-molecular weight humic fraction (Nardi et al., 2007). However, further investigations are required for understanding the mode of action of humic-like substances regarding the biostimulation of plants.

References

- Arnaldos, T.L., Munngoz, R., Ferrer, M.A., Calderón, A.A., 2001. Plant Physiology 113, 315–322.
- Audus, L.J., 1972. Plant Growth Substances. Chemistry and Physiology, vol. 1. Leonard Hill Books, London, UK, p. 533.
- Avila, C., Rotella, J.R., Canovas, F.M., De Castro, I.N., Valpuesta, V., 1987. Different characteristics of the two glutamate synthetases in green leaves of *Lycopersicon esculentum*. Plant Physiology 85, 1036–1039.
- Baglieri, A., Gennari, M., Ioppolo, A., Leinweber, P., Nègre, M., 2012. Comparison between the humic acids characteristics of two andisols of different age by FT-IR and ¹H-NMR spectroscopy and py-FIMS. Geochemistry International 50, 148–158.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248–254.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Facanha, A.L., Facanha, A.R., 2002. Plant Physiology 130, 1951–1957.
- Canellas, L.P., Piccolo, A., Dobbss, L.B., Spaccini, R., Olivares, F.L., Zandonadi, D.B., Facanha, A.R., 2010. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. Chemosphere 78, 457–466.
- Canovas, F.M., Canton, F.R., Gallardo, F., Garcia-gutierrez, A., de Vincent, A., 1991. Accumulation of glutamine-synthetase during early development of maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings. Planta 185, 372–378.
- Cesco, S., Mimmo, T., Tonon, G., Tomasi, N., Pinton, R., Terzano, R., Neumann, G., Weisskopf, L., Renella, G., Landi, L., Nannipieri, P., 2012. Plant-born flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review. Biology and Fertility of Soils 48, 123–149.
- Chen, S.K., Edwards, C.A., Subler, S., 2003. The influence of two agricultural biostimulants on nitrogen transformations, microbial activity, and plant growth in soil microcosms. Soil Biology and Biochemistry 35, 9–19.
- Conte, P., Piccolo, A., Van Lagen, B., Buurman, P., de Jager, P.A., 1997. Quantitative aspects of solid-state ¹³C-NMR spectra of humic substances from soils of volcanic systems. Geoderma 80, 327–338.
- Conte, P., Piccolo, A., van Lagen, B., Buurman, P., Hemminga, M.A., 2002. Elemental quantitation of natural organic matter by CP/MAS ¹³C-NMR spectroscopy. Solid State Nuclear Magnetic Resonance 21, 158–170.
- Debaeke, P., Rouet, P., Justes, E., 2006. Relationship between the normalized SPAD index and the nitrogen nutrition index. Application to durum wheat. Journal of Plant Nutrition 1, 75–92.
- Dignac, M.F., Derenne, S., Ginestet, P., Bruchet, A., Kniker, H., Largeau, C., 2000. Determination of structure and origin of refractory organic matter in bio-depurated wastewater via spectroscopic methods. Comparison of conventional and ozonation treatment. Environmental Science & Technology 34, 3389–3394.
- Ertani, A., Cavani, L., Pizzeghello, D., Brandellero, E., Altissimo, A., Clavatta, C., Nardi, S., 2009. Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 172, 237–244.
- Ertani, A., Francioso, O., Tugnoli, V., Righi, V., Nardi, S., 2011. Effect of commercial lignosulfonate-humate on *Zea mays* L. metabolism. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59, 11940–11948.
- Ertani, A., Schiavon, M., Muscolo, A., Nardi, S., 2012. Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. Plant and Soil <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-012-1335-z>.
- Frankenberger, W.T., Arshad, M., 1995. Phytohormones in Soils, Marcel Dekker, New York.
- García, C., Hernandez, T., Costa del Rio, F., 1989. Study of the lipidic and

- humic fractions from organic wastes before and after the composting process. *Science of the Total Environment* 81 (2), 551–560.
- García, C., Hernández, T., Costa, F., del Río, J.C., 1989. Study of the lipidic and humic fractions from organic wastes before and after the composting process. *Science of the Total Environment* 81/82, 551–560.
- Gastal, F., Lemaire, G., 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany* 53, 789–799.
- Hammouda, G.H.H., Adams, W.A., 1987. The decomposition, humification and fate of nitrogen during the composting of some plant residues. In: De Bertoldi, M., Ferranti, M.P., L'Hermite, P., Zuccori, F. (Eds.), *Proceedings of the Symposium on Compost: Production Quality and Use*. Elsevier Applied Science, London, pp. 245–253.
- Hassan, S., Mathesius, U., 2012. The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions. *Journal of Experimental Botany* 2, 1–16.
- Hoagland, D.R., Aron, D., 1950. *The water culture method for growing plants without soil*. Circular, 347. University of California, Agricultural Experimental Station, Berkeley.
- Hrubcová, M., Cvikrová, M., Eder, J., Zon, J., Machácková, I., 2000. Effect of inhibition of phenylpropanoid biosynthesis on peroxidase and IAA-oxidase activities and auxin content in alfalfa suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 949–956.
- Inderjit, 1996. Plant phenolics in allelopathy. *The Botanical Review* 62, 186–202.
- Jindo, K., Martim, S.A., Navarro, E.C., Pérez-Alfocea, F., Hernandez, T., Garcia, C., Aguiar, N.O., Canellas, L.P., 2012. Root growth promoting by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant and Soil* <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-011-1024-3>.
- Kögel-Knabner, I., 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 139–162.
- Lea, P.J., Ireland, R.J., 1999. *Plant Amino Acids*. In: Singh, B.K. (Ed.), *Nitrogen Metabolism in Higher Plants*. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 1–47.
- Lewis, O.A.M., Watson, E.F., Hewitt, E.J., 1982. Determination of nitrate reductase activity in barley leaves and roots. *Annals of Botany* 49, 31–37.
- Mandal, S.M., Chakraborty, D., Dey, S., 2010. Phenolic acids act as signalling molecules in plant–microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior* 5 (4), 359–368.
- Meli, S.M., Baglieri, A., Porto, M., Belligno, A., Gennari, M., 2007. Chemical and microbiological aspects of soil amended with citrus pulp. *Journal of Sustainable Agriculture* 30, 53–66.
- Miller, R.H., 1990. Soil Microbiological Inputs for Sustainable Agricultural Systems. In: Edwards, C.A., Lal, R., Madden, P., Miller, R.H., House, G. (Eds.), *Sustainable Agricultural Systems. Soil and Water Conservation Society*, Ankeny, Iowa, pp. 614–623.
- Montoneri, E., Boffa, V., Quaghiotto, P.L., Mendichi, R., Chierotti, M.R., Gobetto, R., Medana, C., 2008. Humic acid-like matter isolated from green urban wastes. Part I: structure and surfactant properties. *Bioresources* 3, 123–141.
- Montoneri, E., Boffa, V., Savarino, P., Perrone, D.G., Musso, G., Mendichi, R., Chierotti, M.R., Gobetto, R., 2009. Biosurfactants from urban green wastes. *ChemSusChem* 2, 239–247.
- Muscolo, A., Cutrupi, S., Nardi, S., 1998. IAA detection in humic substances. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1199–1201.
- Muscolo, A., Sidari, M., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S., 2007a. The auxin-like activity of humic substances is related to membrane interaction in carrot cell cultures. *Journal of Chemical Ecology* 33, 115–129.
- Muscolo, A., Sidari, M., Attinà, E., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S., 2007b. Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. *Soil Science Society of America Journal* 71, 75–85.
- Napier, M.R., 2001. Models of auxin bindings. *Journal of Plant Growth Regulation* 20, 244–254.
- Napier, R., 2004. Plant hormone binding sites. *Annals of Botany (London)* 93, 227–233.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Gessa, C., Ferrarese, L., Trainotti, L., Casadoro, G., 2000. A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 415–419.
- Nardi, S., Muscolo, A., Vaccaro, S., Baiano, S., Spacini, R., Piccolo, A., 2007. Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and Krebs cycle in maize seedlings. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 3138–3146.
- Nardi, S., Carletti, P., Pizzeghello, D., Muscolo, A., 2009. Biological activities of humic substances. In: Senesi, N., Xing, B., Huang, P.M. (Eds.), *Volume 2 - Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems. PART I. Fundamentals and impact of mineral-organic-biota interactions on the formation, transformation, turnover, and storage of natural nonliving organic matter (NOM)*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 305–339.
- Pandeya, S.B., 1992. Characterization of fulvic acids extracted from some organic manures and wastes by potentiometric titration. *Bioresource Technology* 39, 77–83.
- Pereira, M.A., Pres, O.C., Mota, M., Alves, M.M., 2005. Anaerobic biodegradation of oleic and palmitic acids: evidence of mass transfer limitations caused by long chain fatty acid accumulation onto the anaerobic sludge. *Biotechnology and Bioengineering* 92, 15–23.
- Piccolo, A., Zacheo, P., Genevini, P.G., 1992. Chemical characterization of humic substances extracted from organic-waste-amended soils. *Bioresource Technology* 40, 275–282.
- Pichler, M., Knicker, H., Kögel-Knabner, I., 2001. Solid-state ¹³C NMR spectroscopic, chemolytic and biological assessment of pretreated municipal solid waste. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 26, 83–89.
- Pizzeghello, D., Zanella, A., Carletti, P., Nardi, S., 2006. Chemical and biological characterization of dissolved organic matter from silver fir and beech forest soils. *Chemosphere* 65, 190–200.
- Prasad, B., Sinha, M.K., 1984. Structural characteristics of humic and fulvic acid isolated from soil and poultry litter. *Journal of the Indian Society of Soil Science* 32, 162–164.
- Presutto, P., Pezzutto, S., 2005. I vantaggi dell'applicazione di glucosio fosforilato e aminoacidi alla vite. *Phytomagazine speciale biostimolanti*.
- Quaggiotti, S., Reperti, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S., 2004. Effect of low molecular size humic substances on the expression on genes involved in nitrate transport and reduction in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* 55, 803–813.
- Quilty, J.R., Cattle, S.R., 2011. Use and understanding of organic amendments in Australian agriculture: a review. *Soil Research* 49, 1–26.
- Réveillé, V., Mansuy, L., Jardé, E., Garnier-Sillam, E., 2003. Characterization of sewage-sludge derived organic matter: lipids and humic acids. *Organic Geochemistry* 34, 615–627.
- Rubery, P.H., 1981. Auxin receptors. *Annual Review of Plant Biology* 32, 569–596.
- Schiavon, M., Ertani, A., Nardi, S., 2008. Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 11800–11808.
- Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., Nardi, S., 2010. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Chemical Ecology* 36, 662–669.
- Senesi, N., Miano, T.M., Provenzano, M.R., Brunetti, G., 1989. Spectroscopic and compositional comparative characterization of IHSS reference and standard fulvic and humic acids of various origin. *Science of the Total Environment* 81/82, 143.
- Senesi, N., Miano, T.M., Brunetti, G., 1996. Humic-like substances in organic amendments and effects on native soil humic substances. In: Piccolo, A. (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, Amsterdam, pp. 531–593.
- Sposito, G., Lund, L.J., Chang, A.C., 1982. Trace metal chemistry in arid-zone field soils amended with sewage sludge: II. Comparative study of the fulvic acid fraction. *Soil Science Society of America Journal* 46, 265–270.
- Stevenson, F.J., 1982. *Humus chemistry: genesis, composition and reactions*. John Wiley & Sons, New York.
- Subler, S., Dominguez, J., Edwards, C.A., 1998. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 29, 859–866.
- Swift, R.S., 1996. *Organic Matter Characterisation. Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, pp. 1011–1069.
- Tambone, F., Genevini, P., D'Imporzano, G., Adani, F., 2009. Assessing amendment properties of digestate by studying the organic matter composition and the degree of biological stability during the anaerobic digestion of the organic fraction of MSW. *Bioresource Technology* 100, 3140–3142.
- Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S., Nardi, S., 2010. Humic substances biological activity at the plant–soil interface. From environmental aspects to molecular factors – a review. *Plant Signaling & Behavior* 5, 635–643.
- Ussiri, A.A.N., Johnson, C.E., 2003. Characterization of organic matter in a northern hardwood forest soil by ¹³C NMR spectroscopy and chemical methods. *Geoderma* 11, 123–149.
- Vaughan, D., Malcom, R.E., Ord, B.G., 1985. Influence of humic substances on biochemical processes in plants. In: Vaughan, D., Malcom, R.E. (Eds.), *Soil Organic Matter and Biological Activity*. Martinus Nijhoff/Junk W., Dordrecht, The Netherlands, pp. 77–108.
- Veeken, A.H.M., Adani, F., Nierop, K.G.J., de Jager, P.A., Hamelers, H.V.M., 2001. Degradation of biomacromolecules during high-rate composting of wheat straw-amended faeces. *Journal of Environmental Quality* 30, 1675–1684.
- Wellburn, A.R., Lichtenthaler, H., 1984. Formulae and Program Determine Carotenoids and Chlorophyll a and b of Leaf Extracts Inferent Solvents. In: Nijhoff, M.E., Junk, W. (Eds.), *Advances in Photosynthesis Research*. The Hague, Boston, pp. 272–284.
- Zhang, X., Ervin, E.H., Schmidt, R.E., 2003. Effects of liquid application of a seaweed extract and a humic acid on creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.). *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128, 492–496.

4.2 Paper n° 2

Andrea Baglieri¹, Valeria Cadili¹, Chiara Mozzetti Monterumici², Silvia Tabasso³, Serenella Nardi⁴, Michele Negrè², Enzo Montoneri³.

Elevata valorizzazione della produzione di biomassa, contenuto di clorofilla nelle foglie ed assimilazione di N in piante di fagiolo, coltivate con basse dosi di idrolizzati vegetali di pomodoro.

Inviato a rivista: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*

Elevata valorizzazione della produzione di biomassa, contenuto di clorofilla ed assimilazione di N in piante di fagiolo, coltivate con basse dosi di idrolizzati vegetali di pomodoro.

Andrea Baglieri¹, Valeria Cadili¹, Chiara Mozzetti Monterumici², Silvia Tabasso³, Serenella Nardi⁴, Michele Negrè², Enzo Montoneri³.

RIASSUNTO

È auspicabile sempre più sviluppare pratiche che prevedono il riuso di rifiuti biodegradabili per sviluppare una produzione agricola sostenibile. Infatti, compost comunali, fanghi di depurazione e concimi animali, sono usati come alternative ai fertilizzanti convenzionali. Più di recente, le sostanze solubili isolate da compost urbano hanno dimostrato di essere altamente efficaci e sicuri, per la coltivazione orticola. Nel presente lavoro sono state isolate sostanze solubili ed insolubili da un idrolizzato alcalino di residui di piante di pomodoro e sono stati usati per la coltivazione di piante di fagiolo. Sono stati misurati ed analizzati, per possibili correlazioni, la crescita delle piante, la clorofilla delle foglie, l'attività enzimatica e le proteine solubili. Dal confronto tra le piante non trattate con quelle trattate con residui di piante di pomodoro, sotto forma di polvere, è emerso che gli idrolizzati isolati hanno determinato aumenti dell'87% dei pesi dei germogli, 42% per la clorofilla, 150-300% per gli enzimi e 77-226% per i contenuti di proteine solubili nei germogli e/o nelle radici. I pesi dei germogli sono correlati meglio con la clorofilla rispetto alle proteine solubili dei germogli con gli enzimi. La migliore correlazione è stata mostrata per le proteine solubili dei germogli contro gli enzimi contenuti. Nessuna correlazione è stata trovata per le proteine solubili dei germogli e la clorofilla. La forte crescita della biomassa dopo l'applicazione degli idrolizzati, propone vantaggi economici ed ambientali facilmente apprezzabili da parte degli agricoltori. Il rapporto tra la natura chimica dei materiali e gli effetti osservati, offre spazio per ulteriori attività di ricerca. Relativamente alle conoscenze attuali, i risultati mostrano due importanti novità. I residui delle piante di pomodoro rappresentano fonti di sostanze efficaci da utilizzare per ulteriori pratiche di coltivazione. La prospettiva di ottenere tutti prodotti commerciabili e nessun sottoprodotto da smaltire, proietta l'idrolisi di biomasse residuali come un processo proficuo e praticabile per ottenere prodotti con valore aggiunto e, quindi, per contribuire ad importanti miglioramenti anche per le pratiche di gestione dei rifiuti.

¹Andrea Baglieri, Valeria Cadili- Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari, Università di Catania, Via S. Sofia 98, 95123 Catania, Italy.

²Chiara Mozzetti Monterumici, Michele Negrè- Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DISAFA), Università degli Studi di Torino, via L. Da Vinci 44, 10095 Grugliasco, Torino, Italy.

³Serenella Nardi- Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente (DAFNAE), Università di Padova, Agripolis, v.le dell'Università 16, 35020 Legnaro, Padova, Italy.

⁴Silvia Tabasso, Enzo Montoneri- Dipartimento di Chimica Generale e Chimica Organica, Università di Torino, c.so Massimo d'Azeglio 48, 10125 Torino.

Dipartimento di Chimica, Università di Torino, via P. Giuria 7, 10125 Torino, Italy.

Parole chiave: Biorifiuti, Clorofilla, Fotosintesi, Produttività-crescita pianta, Pomodoro, Fagiolo, Assimilazione di N.

INTRODUZIONE

Molto recentemente, è stato riportato che l'idrolisi alcalina di un compost costituito da una miscela di rifiuti alimentari e prodotti vegetali, produce sostanze solubili ed insolubili in acqua (Sortino et al., 2012). Queste sostanze sono state isolate ed applicate separatamente su un terreno argilloso-sabbioso per la coltivazione in serra del pomodoro (Sortino et al., 2012) e del peperoncino rosso (Sortino et al., 2013). È stato riscontrato che le sostanze solubili migliorano i contenuti di clorofilla delle foglie, la crescita delle piante, la velocità di maturazione dei frutti e il rendimento nel corso del ciclo produttivo delle colture, molto di più rispetto al compost originario e al residuo insolubile co-prodotto. Il risultato più rilevante è stato ottenuto con una dose pari a 140 kg ha^{-1} di sostanze solubili. Gli incrementi sono stati pari al 90% per la resa delle colture precoci, al 66% per la produzione totale del raccolto e al 17% per il peso dei frutti. La crescita delle piante e la produttività sono apparse correlate direttamente con il contenuto di clorofilla. Le sostanze solubili hanno promosso la crescita di diverse specie orticole e floricole, quando è stato utilizzato come sostituto della torba in un substrato commerciale (Nègre et al., 2012). I risultati ottenuti con l'impiego di sostanze solubili risultano interessanti secondo diversi punti di vista. In pratiche agricole vere e proprie, l'utilizzazione di sostanze solubili a basso dosaggio, derivate da rifiuti organici al posto di concimi azotati convenzionali minerali e organici, consentirebbe la promozione della crescita delle piante e la produzione di colture a basso costo, riducendo al minimo il rischio dell'impatto ambientale. Dal punto di vista ecologico più in generale, questa prospettiva implica anche lo scenario affascinante che sostanze ottenute da rifiuti possano entrare nel ciclo naturale del carbonio. Questa pratica, inoltre, risulta un interessante mezzo di gestione ecologica dei rifiuti

I risultati ottenuti nelle sperimentazioni citate (Nègre et al., 2012; Sortino et al., 2012 e 2013), hanno offerto una serie di ipotesi per spiegare gli effetti osservati. In un lavoro di Avetta et al. (2012) sono stati ottenuti risultati positivi sulla promozione della trasformazione fotochimica di contaminanti organici da parte di sostanze solubili ottenute da compost. È stato anche rilevato un legame tra solubilità, proprietà foto-sensibilizzante, contenuto in clorofilla e produttività delle piante (Sortino et al., 2012 e 2013).

Inoltre, le stesse sostanze solubili contengono, oltre alla sostanza organica, il 29% di elementi minerali che potrebbero rappresentare un ulteriore apporto di nutrienti. Essi potrebbero anche stimolare l'assorbimento di nutrienti dal suolo con un effetto ormono-simile e/o la crescita delle piante attraverso la promozione dello sviluppo di rizobatteri.

Il presente lavoro riporta i risultati di prove di coltivazione di fagiolo eseguite su substrato di torba e sabbia, trattato con 140 kg ha^{-1} di sostanze solubili ed insolubili, isolate da idrolizzati alcalini di

piante di pomodoro raccolte alla fine della stagione di raccolta. Indicatori di performance del prodotto sono stati la crescita delle piante di fagiolo, la concentrazione di clorofilla ed il metabolismo dell'azoto della pianta, valutata attraverso la determinazione delle proteine solubili e le attività della nitrato riduttasi, glutammina sintetasi e della glutammato sintasi. Questo approccio ha voluto affrontare alcune delle prospettive e delle domande poste dal lavoro di Sortino et al. (2013) sulle sostanze solubili derivate dal compost. L'idea di utilizzare residui di vegetali coltivati come fonte di sostanze solubili da applicare al terreno per ulteriori prove di coltivazione è stato coerente con l'attuale filosofia del riciclo e rinnovo di materiale bio-organico attraverso le sue fasi di produzione, uso e smaltimento. Sono state scelte piante di fagiolo come specie test, per vedere se gli effetti osservati sulle piante di pomodoro fossero confermate con altre specie vegetali e, quindi, aggiungere un argomento importante per l'utilizzo di sostanze isolate da residui vegetali nelle pratiche agricole vere e proprie. Le misurazioni delle attività enzimatiche ed i contenuti in clorofilla sono stati eseguiti per indagare ulteriormente il ruolo ipotizzato delle sostanze solubili come promotori della fotosintesi e come biostimolanti.

Materiali e metodi

Sostanze solubili ed insolubili originate da piante di pomodoro e reagenti

Le piante di pomodoro sono state raccolte alla fine del ciclo vegetale, all'interno dell'azienda agricola di Angelo Zocco sita a Rosolini (SR), macinate fino alle dimensioni di 5-10 mm e trasportate all'impianto pilota dello Studio Chiono a Rivarolo Cavanese (TO), Italia. Il materiale ricevuto è stato ulteriormente macinato, ottenendo particelle di dimensioni $< 0,5$ mm. La polvere fine è stata trattata con soluzione alcalina ed ultrafiltrata con membrana di polisulfone, come riportato precedentemente (Sortino et al., 2013). La polvere di partenza è stata tenuta per 4 ore in una soluzione di KOH a pH 13, a 60°C; il rapporto acqua/solido è stato di 4. Dalla miscela idrolizzata è stata separata la sostanza solubile da quella insolubile per sedimentazione. La fase liquida recuperata è stata fatta circolare alla velocità di flusso di 40 L h⁻¹ attraverso membrane di ultrafiltrazione, operando con un flusso tangenziale ed una pressione di entrata di 7 bar e di uscita di 4,5 bar; in questo modo si è ottenuta una sostanza solubile con un contenuto di umidità del 5-10%. Il residuo di sostanza insolubile è stato lavato con acqua con un rapporto acqua/solido di 4. Il liquido recuperato dall'ultrafiltrazione ed i residui delle sostanze insolubili sono stati concentrati e/o messi in stufa a 60°C. Dalla sostanza organica presente nelle piante di pomodoro è stato recuperato il 30% di sostanze solubili; la restante parte è rappresentata dalle sostanze insolubili. Tutti i reagenti sono stati forniti da Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Analisi chimiche

Le piante di pomodoro sono state analizzate secondo procedure precedentemente utilizzate (Templeton e Ehrman, 1995), con opportune modifiche. I campioni sono stati trattati per una notte in un estrattore Soxhlet con benzene/etanolo 1:1 per produrre un estratto in benzene/etanolo e un residuo insolubile. Il residuo insolubile in benzene/etanolo è stato trattato con HCl 1 M per 2 h e centrifugato per ottenere un estratto di HCl 1 M ed un residuo insolubile. Il residuo insolubile in HCl 1 M è stato trattato con HCl 12 M a 4°C per 24 h per produrre un estratto di HCl 12 M ed un residuo. Tutti gli estratti ed il residuo insolubile finale, sono stati essiccati sotto vuoto alla temperatura di 40-60 °C e pesati. Tutti i materiali ottenuti sono stati caratterizzati per il loro contenuto di C, N ed elementi minerali e per i gruppi funzionali organici, come previsto dai protocolli di analisi pubblicati (Montoneri et al., 2011). I nitrati sono stati determinati attraverso la cromatografia ionica, con estratti in KCl 1N, usando il sistema Thermo Fisher Scientific Inc Dionex ICS-3000.

Prove di coltivazione di piante di fagiolo

Le piante di pomodoro polverizzate e le sostanze solubili ed insolubili ottenute dall'idrolisi, sono state aggiunte ad un substrato costituito da 1 L di torba (230 g) e 1 L di sabbia (1,5 Kg) in vasi dalle dimensioni 14 x 14 x 15 cm. Quattro semi pregerminati di fagiolo (*Phaseolus vulgaris*) sono stati posti in ciascun vaso e sono state fatte cinque repliche per prova. I vasi sono stati tenuti in cella climatica a 25± 1°C con un fotoperiodo di 16-8 h. Dopo 21 giorni, sono state separate le foglie dalle radici, pesate ed immagazzinate a -80°C.

Determinazione del contenuto di clorofilla

Per la determinazione delle clorofille a e b e dei carotenoidi, 300 mg di foglie fresche sono stati pestati in mortaio con azoto liquido e sottoposti ad estrazione con 10 mL di etanolo al 95% v/v. I campioni sono stati tenuti al buio per 2 giorni alla temperatura di 4°C e gli estratti sono stati filtrati e analizzati spettrofotometricamente, usando uno spettrofotometro Hitachi U-2000. La lettura dell'assorbanza è stata effettuata alle lunghezze d'onda di 665 nm per la clorofilla a, 649 nm per la clorofilla b ed a 470 nm per i carotenoidi totali. Il calcolo delle concentrazioni di clorofilla a e b e dei carotenoidi totali è stato realizzato in accordo con Wellburn e Lichtenthaler (1984).

Estrazione degli enzimi e condizioni di analisi.

Gli enzimi coinvolti nell'assimilazione e nella riduzione di N sono stati estratti dai tessuti delle piante; 1 g di tali tessuti sono stati polverizzati con azoto liquido in un mortaio di porcellana ed omogeneizzati con 6 ml di tampone di estrazione a pH 7,8 (Na-EDTA 1 mM; KH_2PO_4 25 mM; cisteina cloridrata 10 mM, soluzione di siero albumina bovina al 3% w/v) per 1,30 minuti. Successivamente, l'estratto è stato filtrato su doppio strato di garza e centrifugato con centrifuga Eppendorf-Centrifuge 5424 R, alla temperatura di 4°C per 15 minuti a 16000 giri/min ed è stato recuperato il surnatante (Lewis et al., 1982). L'attività della nitrato reductasi (EC 1.7.1.1) è stata determinata addizionando a 400 μL di estratto, 1,4 mL di una soluzione di KH_2PO_4 100 mM e di KNO_3 100 mM. L'attività specifica dell'enzima è stata letta allo spettrofotometro Hitachi U-2000 alla lunghezza d'onda di 540 nm. La misura è stata espressa in $\text{nM NO}_2^- \text{ g f w}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Parallelamente si è determinata una retta di taratura preparando una soluzione madre di NaNO_2 0,1 M (Lewis et al., 1982).

Per la determinazione della glutammina sintetasi (GS, EC 6.3.1.2), a 1,2 mL dell'estratto è stata addizionata una miscela di reazione (1,6 mL) contenente ATP Na_2 50 mM, MgSO_4 250 mM, glutammato sodico 250 mM e idrossilammina 50 mM (neutralizzata); la reazione enzimatica è stata sviluppata per 15 minuti a 37°C. La γ -glutammil-idrossamato è stata determinata colorimetricamente addizionando 3 mL di una miscela (1:1:1) di 10% $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in HCl 0,2 M, 24 % (w/v) acido tricloracetico e 50 % di HCl (w/v). L'assorbanza è stata misurata alla lunghezza d'onda di 540 nm usando uno spettrofotometro Hitachi U-2000 (Canovas et al., 1991).

La glutammina sintetasi (GOGAT, EC 1.4.7.1) è stata determinata addizionando a 100 μL di estratto 1 mL di una miscela di reazione contenente Hepes- NaOH 25 mM (pH 7,5), glutammina 2 mM, acido α -chetoglutarico 1 mM, NADH 0,1 mM, Na_2EDTA 1 mM. L'attività della GOGAT è stata misurata spettrofotometricamente utilizzando uno spettrofotometro Hitachi U-2000, monitorando l'ossidazione della NADH a 340 nm. L'attività specifica è stata espressa in μmol di NADH consumati durante la reazione.

Deteminazione delle proteine solubili

I tessuti vegetali sono stati triturati in N_2 liquido in presenza di tampone Na-P 0,1 M (pH 7) in ragione di 1 mL/g. Gli omogenati sono stati centrifugati a 15000 g per 15 min. Il lavoro è stato eseguito in ambiente refrigerato (4°C).

La concentrazione di proteine è stata determinata nel surnatante in accordo con Bradford et al. (1976) utilizzando uno spettrofotometro UV/Vis a 595 nm. La concentrazione di proteine solubili è stata espressa come μg di proteina g^{-1} di prodotto fresco.

Analisi statistica

I dati sono stati valutati seguendo l'ANOVA one-way ($P < 0,05$) con test Tuckey per le Procedure di Comparazione Multipla usando la versione GraphPad 4.00 per Windows.

Risultati e discussione

I risultati relativi alla composizione chimica delle piante di pomodoro in polvere, hanno indicato l'11,9 % di lipidi e di composti non polari, il 44 % di emicellulose e proteine, il 15,5% di cellulosa ed il 28,5 % di lignina. Maggiori informazioni sulla composizione chimica della polvere di piante di pomodoro e delle sostanze solubili ed insolubili isolate dall'idrolizzato della pianta di pomodoro sono riportate in Tabella 1.

La Tabella 1 mostra che la polvere di piante di pomodoro ed i due prodotti di idrolisi alcalina contengono sostanza organica come componente principale e minori quantità di sostanze inorganiche. I tre materiali, tuttavia, presentano differenze significative nella composizione delle frazioni organica e minerale. Si può osservare che il C organico e l'N totale delle piante di pomodoro non sono distribuiti uniformemente nelle sostanze solubili ed insolubili estratte. Le sostanze solubili hanno una maggiore contenuto di C e di N totale rispetto alla biomassa di origine. Di conseguenza, le sostanze insolubili hanno valori più bassi di C e di N totale. Ciò indica che la sostanza organica della biomassa di partenza subisce importanti modifiche con il trattamento alcalino. I dati relativi ai tipi di C ed ai gruppi funzionali, riportati nella Tabella 1, confermano questa indicazione. I gruppi funzionali delle piante di pomodoro confermano la presenza di materiale polisaccaridico (cellulosa ed emicellulosa), come indicato dal C anomero e dai gruppi alcossi, dalla lignina, come indicato dagli atomi di C aromatici e alifatici, e proteine, come indicato dagli atomi di C carbossilici. Rispetto alla biomassa di origine, l'idrolizzato solubile ha un contenuto molto più alto di idrocarburi alifatici, metossili e ammine, C fenilico e carbossilico ed un minore contenuto di gruppi anomerici e alcossi.

Viceversa, le sostanze insolubili contengono meno C alifatico e più gruppi alcossi ed anomerici rispetto alle piante di pomodoro.

Tabella 1. Composizione chimica di: piante pomodoro (TP), idrolizzati solubili (SOL) ed insolubili (INS).

	pH	Volatile Solids, w/w % ^a	C, w/w % ^a	Total N, w/w % ^a	Nitric N, w/w % ^a	C/N
TP	7.6	79.8	36.44±0.16	3.51±0.05	0.39	10.38
SOL	9.4	76.7	47.30±0.10	6.52±0.06	0.005	7.25
INS	7.3	63.1	28.83±0.09	2.52±0.04	< 0.005	11.44

Elementi minerali (% w/w)							
	Si	Fe	Al	Mg	Ca	K	Na
TP	0.98±0.03	0.30±0.02	0.27±0.02	0.42±0.02	4.65±0.03	3.30±0.02	0.22±0.01
SOL	0.22±0.03	0.33±0.02	0.34±0.03	0.80±0.04	2.10±0.02	9.15±0.06	0.24±0.01
INS	0.85±0.03	0.25±0.01	0.17±0.01	0.27±0.01	4.41±0.02	4.49±0.06	0.15±0.01

Tipi di C e gruppi funzionali^b, concentrazione mole/mole % di C organico totale								
	Af	OMe+ NR	OR	OCO	Ph	PhOY	COX	CO
TP	14.34	7.22	49.60	11.62	6.89	3.44	6.28	0.61
SOL	47.38	9.39	10.39	2.19	11.50	3.81	14.37	0.97
INS	5.00	7.97	58.98	13.19	7.00	3.66	2.97	1.22

^a Valori di concentrazione riferiti alla sostanza secca: media e deviazione standard calcolate per tre repliche.

^b Le sigle presenti indicano il Carbonio presenti nel gruppo funzionale: Alifatico (Af), metossilico (OMe), amminico (NR), alcossilico (OR), anomerico (OCO), aromatico (Ph), fenossidico e fenolico (PhOY, Y = Ph, R, H), ammidico e carbossilico (COX, X = N o H), chetonico (C=O).

I dati indicano che il trattamento con alcali dei residui delle piante di pomodoro converte la maggior parte della lignina e parte dei polisaccaridi, presumibilmente emicellulose, in sostanza organica solubile. Questo è coerente con i risultati di Sun et al. (2000) e Xiao et al. (2001) che indicano che i trattamenti alcalini delle sostanze ligno-cellulosiche disciolgono una gran parte di emicellulosa e lignina. Al contrario, la frazione di cellulosa rimane per lo più come materia organica insolubile. In base al rapporto C/N, è probabile che la frazione di cellulosa nelle sostanze insolubili non è la stessa della cellulosa presente nella biomassa di origine.

Dalla ripartizione dei vari gruppi funzionali, ottenuti per titolazione potenziometrica, si osserva che la frazione solubile presenta il 14% di gruppi carbossilici e ammidici (indicati in Tabella 1 con COX), di cui il 12 % di C carbossilato e il 2 % di C ammidico. Inoltre si osserva che il 9,4% di C è legato a gruppi amminici e quasi nessuno come metossilico (indicato in Tabella 1 come OMe).

La presenza dei gruppi carbossilici e amminici è un'indicazione probabile di residui di proteine, peptidi od aminoacidi che compongono le sostanze solubili oltre che di lignina e di emicellulosa. Ripartizione diversa dei gruppi funzionali è stata riscontrata la biomassa pomodoro di origine e per la componente insolubile, poiché entrambi sono insolubili in alcali e non possono essere titolati in modo affidabile in una soluzione omogenea.

I tre materiali studiati nel presente lavoro presentano differenze anche nella composizione della frazione minerale. Le sostanze solubili hanno il più basso contenuto di Si e Ca, ma il più alto contenuto di Fe, Al e Mg. Inoltre, l'elevato contenuto di K in questo prodotto è il risultato del reagente KOH aggiunto per effettuare la reazione di idrolisi nelle piante di pomodoro. Evidentemente, l'elevato contenuto di K viene recuperato nelle sostanze solubili, essendo questo elemento probabilmente legato ai gruppi funzionali carbossilici della frazione solubile organica.

La Tabella 2 riporta i pesi freschi dei germogli e delle radici ed i contenuti in clorofilla e carotenoidi delle piante di fagiolo coltivate. Per preservare l'attività enzimatica delle foglie e delle radici e per la determinazione e delle proteine in esse, le piante non sono state disidratate in stufa, ma utilizzate tal quali, conseguentemente il peso fresco è stato utilizzato come un indicatore di crescita.

Tabella 2. Valori delle medie^a e deviazioni standard per i pesi di foglie e radici, contenuto di clorofilla e carotenoidi nelle foglie in piante di fagiolo allevate per 21 giorni substrato substrato misto di torba e sabbia (controllo) e su substrato preparato con polvere di piante di pomodoro, idrolizzato solubile ed insolubile.

	Controllo	Pianta Pomodoro	Idrolizzato solubile	Idrolizzato insolubile
Peso Germogli (g)	4.67 ± 2.80 a	7.24 ± 4.26 ab	7.14 ± 2.96 ab	8.75 ± 4.59 b
Peso Radici (g)	3.17 ± 1.14 a	4.22 ± 0.89 a	3.97 ± 0.78 a	5.90 ± 5.77 a
Radici/Germogli	0.68	0.58	0.56	0.67
Chlorophylla a (mg.g⁻¹)	46.70 ± 12.76 a	55.9 ± 14.82 ab	45.91 ± 23.67 a	66.3 ± 18.9 b
Chlorophylla b (mg.g⁻¹)	14.98 ± 7.05 a	18.79 ± 5.55 a	17.54 ± 7.05 a	21.5 ± 7.0 a
Carotenoidi (mg g⁻¹)	13.14 ± 6.33 a	12.52 ± 4.61 a	11.80 ± 7.84 a	10.9 ± 4.5 a

^a All'interno delle righe, i valori seguiti da differenti lettere sono significativamente differenti (P< 0.05).

Tra i dati ottenuti, l'unica differenza significativa riscontrata si riferisce al peso della parte epigea ed al contenuto in clorofilla delle piante di fagiolo sviluppate sul substrato contenente la frazione insolubile.

Questo risultato, appare diverso da quello ottenuto da Sortino et al. (2012) con piante di pomodoro coltivate su terreno trattato con sostanze solubili e insolubili provenienti da compost urbano. Infatti, in questo studio, gli Autori hanno osservato che le sostanze solubili hanno aumentato l'efficienza fotosintetica (espressa come indice SPAD) e la crescita delle piante più delle sostanze insolubili. Risultati simili a quelli di Sortino et al. (2012) sono stati osservati in piante di mais dopo l'aggiunta di sostanze solubili estratte da rifiuti agroindustriali (Ertani et al., 2013).

La Tabella 3 riporta i risultati delle misurazioni delle attività della nitrato riduttasi, glutammina sintetasi e glutammato sintasi in foglie e radici delle piante di fagiolo allevate nelle diverse condizioni. Dai risultati ottenuti non sono state osservate differenze significative tra i dati del controllo rispetto a quelli relativi alle piante trattate con la polvere di pomodoro. Al contrario, le sostanze solubili hanno fortemente stimolato le attività enzimatiche sia nelle foglie che nelle radici. Rispetto al controllo, il trattamento con le sostanze insolubili ha migliorato le attività enzimatiche solo nelle foglie ma non nelle radici. Va comunque osservato che l'attività enzimatica delle radici delle piante trattate con la frazione insolubile è risultata superiore rispetto al controllo.

Tuttavia, l'elevata deviazione standard dei dati relativi al trattamento con la frazione insolubile può essere la ragione del mancato rilevamento della significatività tra le piante coltivate sul substrato contenente la frazione insolubile e il controllo.

La Tabella 3 riporta anche il contenuto di proteine solubili nelle foglie e nelle radici. Si può osservare che il contenuto proteico è risultato significativamente più alto in piante coltivate sul substrato addizionato con le sostanze solubili rispetto alle piante di controllo. Questo risultato è ben coerente con il potenziamento delle attività enzimatiche riportate nella stessa tabella. Al contrario, il trattamento con la sostanza insolubile ha stimolato significativamente la produzione di proteine nelle radici, ma non nelle foglie. Tuttavia, si può osservare che il valore medio del contenuto proteico nelle foglie delle piante trattate con sostanze insolubili è superiore a quello delle piante di controllo ma l'alta deviazione standard relativa, può essere la ragione per non dimostrare una differenza significativa.

Tabella 3. Valori delle medie^a e deviazioni standard per le attività degli enzimi e le concentrazioni delle proteine solubili in foglie e radici di piante di fagiolo dopo 21 giorni in substrato di trattamento (controllo) ed in substrato preparato con pianta di pomodoro (TP) e idrolizzato solubile (SOL) ed insolubile (INS).

Trattamento	Attività Enzimatica					
	Nitrato reduttasi (nmol g ⁻¹ min ⁻¹)		Glutamina sintetasi (mmol g ⁻¹ min ⁻¹)		Glutammato sintetasi (μmol g ⁻¹)	
	foglie	radici	foglie	radici	foglie	Radici
Controllo	2.42±1.31a	2.60±0.30a	0.91±0.50a	0.58±0.617a	12.19±7.77 a	10.51±3.48°
TP	3.52±1.56a	2.38±0.27a	0.90±0.48a	0.77±0.69 a	16.38±9.65 a	12.14±6.45°
SOL	8.65±2.06b	5.44±1.27b	4.69±2.19b	10.73±5.22b	42.93±7.96 b	32.12±3.05b
INS	7.92±1.96b	3.42±0.66a	3.72±2.21b	2.04±1.34 a	30.23±11.64b	16.71±6.16°

Trattamento	Concentrazione proteine solubili (mg g ⁻¹)	
	Foglie	Radici
Controllo	2.79±1.21 a	1.23±1.02 a
TP	3.45±1.18 a,b	1.41±0.93 a,c
SOL	4.95±0.98 b	4.01±0.88 b
INS	4.56±2.37 a,b	3.37±1.43 b,c

^aAll'interno delle righe, i valori seguiti da differenti lettere sono significativamente differenti (P< 0.001).

I risultati riportati nelle Tabelle 1-3 consentono una serie di considerazioni. Indubbiamente, i dati raccolti dimostrano sostanzialmente che l'aggiunta di piante di pomodoro in polvere al substrato di crescita non ha sortito alcun effetto su tutti i parametri misurati sulle piante di fagiolo. Al contrario, le sostanze insolubili e solubili provenienti da idrolisi alcalina della polvere di piante di pomodoro hanno determinato alcuni effetti. Infatti, rispetto al controllo, queste sostanze hanno influenzato positivamente la maggior parte degli indicatori indagati in questo studio.

Al fine di evidenziare eventuali correlazioni tra i parametri misurati, è stata realizzata una regressione lineare tra peso della parte epigea e proteine solubili delle foglie; ciascuno dei due parametri è stato poi separatamente studiato rispetto alla clorofilla *a* ed alle attività enzimatiche. I risultati di tale elaborazione statistica sono riportati in Tabella 4 e mostrano che le migliori correlazioni sono state ottenute tra le proteine solubili delle foglie e ciascuna delle tre attività enzimatiche. Infatti, questi indicatori mostrano valori dei coefficienti di correlazione di 0,96-0,98. L'incremento del contenuto proteico in seguito a stimolazione dell'attività enzimatica da sostanze ad azione biostimolante è coerente con i risultati di diversi studi che riportano che i biostimolanti inducono un aumento dell'organizzazione dell'azoto (Chen et al., 2003; Quaggiotti et al., 2004; Ertani et al., 2009).

Il coefficiente di correlazione più basso (0.24) è stato ottenuto tra le proteine solubili delle foglie e la clorofilla a. Di contro, il peso della parte epigea è correlato con la clorofilla a, ottenendo un coefficiente di correlazione di 0,78. Mentre, il peso della parte epigea non è ben correlato con le proteine solubili delle foglie e le attività enzimatiche in quanto danno coefficienti di correlazione più bassi.

Tabella 4. Risultati delle analisi di regressione lineare, $y = a + b x$, per i valori degli indicatori di crescita delle piante riportati nelle Tabelle 2-3.

y	x	Coeff. di correlazione	a	B
Pesi germogli	Clorophylla a	0.7813	- 0.47 ± 4.24	0.14 ± 0.08
	Proteine solubili germogli	0.7517	1.92 ± 3.19	1.28 ± 0.79
	NR germogli	0.7223	4.75 ± 1.65	0.39 ± 0.26
	GS germogli	0.5843	5.65 ± 1.52	0.51 ± 0.50
	GOGAT germogli	0.5598	5.23 ± 2.00	0.07 ± 0.07
Proteine solubili germogli	NR germogli	0.9892	2.16 ± 0.21	3.16 ± 0.03
	GS germogli	0.9613	2.68 ± 0.30	0.49 ± 0.10
	GOGAT germogli	0.9670	2.19 ± 0.36	0.07 ± 0.01
	Clorofilla a	0.2426	2.58 ± 3.88	0.02 ± 0.07

Le misurazioni delle attività enzimatiche ed i contenuti della clorofilla sono stati effettuati per indagare ulteriormente il ruolo ipotizzato delle sostanze solubili come promotori della fotosintesi e come biostimolatori in generale. I dati disponibili non consentono una spiegazione del maggiore effetto delle sostanze insolubili sul contenuto di clorofilla nelle piante di fagiolo, rispetto alle sostanze solubili. Tuttavia, i diversi effetti sull'assimilazione dell'N sia delle sostanze solubili che di quelle insolubili, possono trovare una giustificazione ragionevole sulla base della diversa composizione chimica mostrata in Tabella 1.

È noto che l'assimilazione dell'azoto è un requisito essenziale per la crescita delle piante. Le fonti di azoto direttamente disponibili per le piante, includono composti inorganici azotati, quali nitrato e ammonio, nonché composti organici, come amminoacidi e piccoli peptidi (Schimel & Bennett, 2004; Bardgett, 2005).

Per le stesse specie vegetali e per gli enzimi esaminati nel presente lavoro, Sanchez et al. (2004) hanno osservato un miglioramento dell'attività dopo l'aggiunta al substrato di diverse quantità di nitrato di ammonio. Le quantità trascurabili di nitrati nei due prodotti idrolizzati (Tabella 1), rispetto al materiale di partenza della pianta di pomodoro, esclude chiaramente qualsiasi ruolo del nitrato sulla manifestazione degli effetti osservati. Oltre alle forme inorganiche di azoto ed alle sostanze umiche, si è visto che le piante sono in grado di assumere N dagli aminoacidi (Lea et al., 2007), anche se tradizionalmente si ritiene che la competizione dei microrganismi nei confronti degli aminoacidi sia troppo intensa per far sì che la disponibilità di questi composti per le piante possa essere significativa. Questa visione sta cambiando e ci sono forti prove che suggeriscono che sia le piante micorrizzate che non micorrizzate in diversi tipi di ecosistemi assorbono direttamente aminoacidi dal terreno (Walch-Liu et al., 2006). L'ipotesi dell'assorbimento di aminoacidi dalle radici di fagiolo trattato con la frazione solubile degli idrolizzati è coerente con la presenza di aminoacidi in questo materiale, rilevata dalla sua caratterizzazione chimica. Per quanto riguarda le sostanze insolubili co-prodotte, non si può escludere la presenza di residui aminoacidici, anche se in quantità minore, probabilmente legati alla materia cellulosica (come si può dedurre dalla presenza di COX ed gruppi funzionali OMe/NR). Questi, con ogni probabilità, sono maggiormente disponibili per le piante rispetto a quelli presenti nel materiale originario.

La stimolazione dell'assimilazione dell'azoto è nota anche per essere promossa dalla presenza di regolatori di crescita come le sostanze umiche e umo-simili che hanno anche un effetto benefico sulla crescita delle piante, sulla concentrazione di clorofilla e sull'assorbimento dei nutrienti attraverso un effetto auxino-simile (Nardi et al., 2009). Le sostanze solubili studiate in questo lavoro provengono da sostanze vegetali fresche, che non hanno subito alcuna possibile umificazione o processo di compostaggio. Le sostanze insolubili originate dallo stesso materiale vegetale, essendo per lo più composte da polisaccaridi e da un basso contenuto di frazioni aromatiche, non possono essere assolutamente assimilabili alle sostanze umiche. Tuttavia pure, Ertani et al. (2013) hanno osservato un effetto auxino-simile in estratti alcalini di materiali vegetali non umificati, come residui dell'estrazione di olio da brassica, lino e ricino, i quali hanno provocato la stimolazione dell'assimilazione dell'azoto in piante di mais. Conseguentemente, i nostri risultati suggeriscono di effettuare ulteriori indagini sul possibile effetto auxino-simile dei prodotti di idrolisi alcalina di materiale vegetale esausto.

Conclusioni

Le frazioni ottenute dal processo di idrolisi di piante di pomodoro triturate (frazione solubile e insolubile) sono state in grado di migliorare fortemente l'assimilazione dell'azoto da parte della pianta di fagiolo, ma solo il prodotto insolubile ha dimostrato di incrementare in modo significativo la crescita delle piante e dei contenuti di clorofilla rispetto al controllo. L'entità degli effetti sulla crescita di biomassa (sviluppo della parte epigea superiore all'87%) rende il prodotto insolubile molto interessante per la coltivazione del fagiolo. I risultati di questo lavoro non aiutano a comprendere i diversi effetti sulla performance della pianta indotti dalle frazioni solubile ed insolubile in funzione della loro composizione chimica. Tuttavia, essi rivelano l'importante proprietà delle sostanze ottenute da rifiuti biologici di origine vegetale che permettono di migliorare l'assimilazione dell'N, aspetto non rilevato negli studi precedenti condotti da Sortino et al. (2012 e 2013) sulla crescita delle piante orticole. Questo fatto offre certamente un punto di partenza utile per uno studio più sistematico sulla possibilità di usare sostanze solubili derivate da diversi rifiuti, sia di origine urbana che di origine agricola, su diverse specie vegetali. I dati raccolti indicano anche che entrambi i prodotti di idrolisi, insolubili e solubili, hanno un buon potenziale per funzionare come promotori della crescita vegetale. La prospettiva di ottenere da un rifiuto due prodotti commerciabili, e nessun sottoprodotto da smaltire, propone l'idrolisi di biomassa residuale come un processo proficuo, praticabile per ottenere prodotti a valore aggiunto e quindi per contribuire ad importanti miglioramenti anche per le pratiche di gestione dei rifiuti.

BIBLIOGRAFIA

- Avetta P.**, Bianco Prevot A., Fabbri D., Montoneri E., Tomasso L. (2012). Photodegradation of naphthalenesulfonic compounds in the presence of a bio-waste derived sensitizer. *Chem Eng J.* 197:193–198. doi:10.1016/j.cej.2012.04.086, and references therein.
- Bardgett** (2005). *The Biology of Soil. A community and ecosystem approach.* Oxford University Press, 02/giu/2005 -1- 242 pp.
- Bradford M.M.** (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Canovas F.M.**, Canton F.R., Gallardo F., Garcíagutierrez A., de Vincent A. (1991). Accumulation of glutamine-synthetase during early development of maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings. *Planta* 185: 372–37.
- Chen S.K.**, Edwards C.A. Subler S. (2003). The influence of two agricultural biostimulant on nitrogen transformations, microbial activity, and plant growth in soil microcosms. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 9–19.
- Ertani A.**, Cavani L., Pizzeghello D., Brandellero E., Altissimo A., Ciavatta C., Nardi S. (2009) Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 172: 237-244.
- Ertani A.**, Pizzeghello D., Baglieri A., Cadili V., Tambone F., Gennari M., Nardi S. (2013). Humic-like substances from agro-industrial residues affect growth and nitrogen assimilation in maize (*Zea mays* L.) plantlets. *Journal of Geochemical Exploration* S0375-6742(12)00201-4.
- Lea U.S.**, Slimestad R., Smedvig P. & Lillo C. (2007). Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta* 225, 1245–1253.
- Lewis O.A.M.**, Watson E.F., Hewitt E.J.(1982). Determination of nitrate reductase activity in barley leaves and roots. *Ann. Bot. (London)* 49:31–37.
- Montoneri E.**, Boffa V., Savarino P., Perrone D.G., Musso G., Mendichi R., Chierotti M.R., Gobetto R. (2009). Biosurfactants from Urban Green Wastes. *ChemSuSChem* 2:239–247. doi.org/10.1002/cssc.200800199
- Montoneri E.**, Boffa V., Savarino P., Perrone D.G., Ghezzi M., Montoneri C., Mendichi R. (2011). Acid soluble bio-organic substances isolated from urban bio-waste. Chemical composition and properties of products. *Waste Management*, 31,10–17; available on line at <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2010.08.029>.
- Nardi S.**, Carletti P., Pizzeghello D., Muscolo A. (2009). Biological activities of humic substances. *In: Senesi N., Xing B., Huang P.M. (eds) Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems. Part I. Fundamentals and impact of mineral-organic-biota interactions on the formation, transformation, turnover, and storage of natural nonliving organic matter (NOM), Vol 2.* John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, pp 305-339.

Nègre M., Mozzetti Monterumici C., Vindrola D., Piccone G., Perrone D.G., Tomasso L., Montoneri E. (2012). Horticultural and floricultural applications of urban wastes originated fertilizers, COMPOST SCIENCE & UTILIZATION (ISSN:1065-657X), pp. 150- 155. Vol. 20.

Quaggiotti S., Reperti B., Pizzeghello D., Francioso O., Tugnoli V., Nardi S. (2004). Effect of low molecular size humic substances on the expression on genes involved in nitrate transport and reduction in maize (*Zea mays* L.). Journal of Experimental Botany 55: 803-813.

Sanchez E., Rivero R.M., Ruiz L.M. (2004). Changes in biomass, enzymatic activities and protein concentration in roots and leafe of green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) under high NH₄NO₃ application rates. Sci Hort 99: 237-248.

Schimel J.P. and Bennett J. (2004). Nitrogen Mineralization: Challenges of a Changing Paradigm. Ecology, Vol. 85, No. 3 (Mar., 2004), pp. 591-602.

Sortino O., Dipasquale M., Montoneri E., Tomasso L., Perrone D.G., Vindrola D., Nègre M., Piccone G. (2012). Refuse derived soluble bio-organics enhancing tomato plant growth and productivity. Waste Manage 32:1788-1797. doi:10.1016/j.wasman.2012.04.020.

Sortino O., Dipasquale M., Montoneri E., Tomasso L., Avetta P., Bianco Prevot A. (2013). 90% yield increase of red pepper with unexpectedly low doses of compost soluble substances. Agron. Sustain. Dev. 33:433-441. doi:10.1007/s13593-012-0117-6.

Sun R.C., Fang J.M., Tomkinson J. (2000). Delignification of rye straw using hydrogen peroxide. Ind. Crop Prod. 2000; 12: 71–83.

Templeton D., Ehrman T. (1995). Determination of acid-insoluble lignin in biomass. <https://engineering.purdue.edu/LORRE/research/LAP-003.pdf> . Accessed 4 August 2013.

Walch-Liu P., Ivanov I.I., Filleur S., Gan Y., Remans T., Forde B.G. (2006). Nitrogen regulation of root branching. Ann. Bot. (London) 97: 875–881.

Wellburn A.R.; Lichtenthaler H. (1984). Formulae and program determine carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts inferent solvents. In Advances in Photosynthesis Research; Nijhorff, M., E Dr. W. Junk Publishers: The Hague, Boston, pp. 272-284.

Xiao B., Sun X.F., Sun R. (2001). Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. Polym. Degrad. Stabil. 74: 307–319.