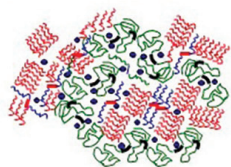




HUMUS, STRUTTURA ED APPLICAZIONI IN AGRICOLTURA

L'humus sostiene la fertilità dei suoli e l'equilibrio biogeochimico dell'ambiente. Il riconoscimento della natura supramolecolare dell'humus ha permesso l'identificazione strutturale del complesso humeoma del suolo e l'uso *in situ* di tecnologie fotossidative catalizzate per il suo sequestro stabile nel suolo. L'humus estratto da compost da biomasse o da residui di bioraffinerie è un surfattante per una rapida ed ecologica bonifica dei suoli, e un efficace biostimolante vegetale per una moderna agricoltura sostenibile.



La sostanza organica o humus del suolo è il fattore principale per il mantenimento e l'accrescimento della fertilità chimica, fisica e biologica dei suoli agrari e per l'equilibrio agroecologico del sistema pianta-suolo [1]. L'humus non solo è essenziale per assicurare la corretta stabilità fisica

del suolo, promuovendo l'associazione delle particelle inorganiche in macroaggregati, ma anche indispensabile per la cessione di macronutrienti (N, P, S) alle piante durante la mineralizzazione biotica, nella quale il carbonio organico è substrato per il metabolismo microbico, i cui prodotti di degradazione giocano un ruolo nel rapporto suolo-rizosfera-pianta. L'humus rappresenta il più grande serbatoio di carbonio nella biosfera terrestre con circa 1300 Petagrammi (Pg) C nel suolo superficiale e fino a 3000 Pg C nel profondo, contribuendo considerevolmente al ciclo biogeochimico del carbonio attraverso la respirazione microbica del suolo in equilibrio con il processo globale di fotosintesi. Il controllo della dinamica molecolare dell'humus riveste, dunque, una fondamentale importanza sia per la sostenibilità della produzione agraria sia per l'equilibrio ambientale ed ecologico della biosfera.

Natura e dinamica chimica

Al di là della tradizionale suddivisione operativa dell'humus del suolo in acidi umici, acidi fulvici ed umina in base alla solubilità in alcali, la reale composizione molecolare dell'humus e la sua genesi sono rimasti ambigui fino a tempi recenti. Dalla metà del secolo scorso si è accreditata la teoria

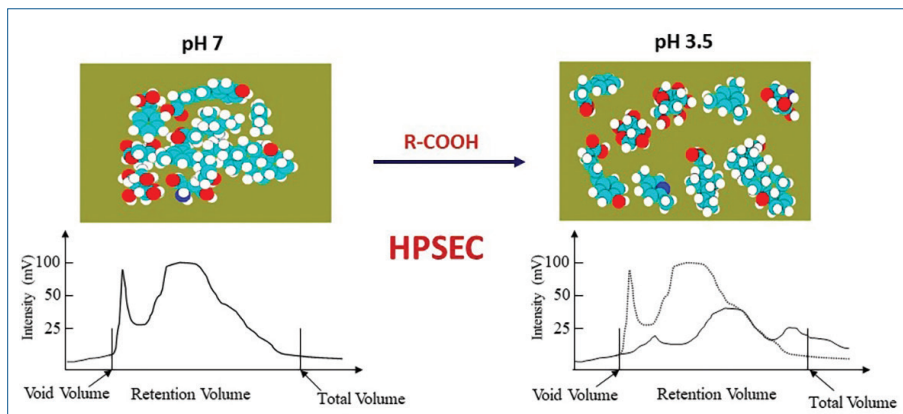


Fig. 1 - Variazione del profilo di *cromatografia liquida ad esclusione molecolare* (HPSEC) quando il pH delle soluzioni umiche sono alterate da quantità micromolari di acidi organici ($10^{-6}/10^{-7}$ M)

macropolimerica secondo la quale i prodotti di decomposizione dei tessuti vegetali e animali nel suolo fossero uniti covalentemente in polimeri eterogenei di notevoli dimensioni (fino a 300 KDa) a carico di reazioni radicaliche catalizzate da enzimi ossidativi extracellulari. Nonostante la debole plausibilità termodinamica e cinetica di tali sintesi (trimolecolari catalizzate) e l'assoluta mancanza di verifiche analitiche-sperimentali *in vivo* nel suolo di tali polimeri, le loro ipotetiche strutture ancora illustrano i libri di testo di Chimica Agraria.

Solo alla fine del secolo, esperimenti in Cromatografia ad Esclusione Molecolare in Alta pressione (HPSEC) hanno mostrato che soluzioni di acidi umici portate da valori di pH 7 a 3,5 con acidi alcanici e dioici modificavano significativamente il profilo cromatografico spostandolo a volumi di eluzioni maggiori (Fig. 1) al contrario di quanto accadeva per reali polimeri covalenti come polisaccaridi e polistirensolfonati il cui profilo HPSEC non veniva alterato dall'azione di acidi organici in concentrazioni micromolari [2]. La spiegazione di questo fenomeno fu lo sviluppo del nuovo paradigma della struttura supramolecolare dell'humus, in cui molecole etero-

genee di massa relativamente piccola (<700 Da), prodotti finali della degradazione biotica dei tessuti vegetali e animali, si autoassociano, grazie a legami non covalenti (Van der Waals, π - π , π -CH, ponti elettrostatici con metalli di- e tri-valenti), in dimensioni molecolari apparentemente grandi, la cui conformazione metastabile, dovuta principalmente a deboli interazioni idrofobiche intermolecolari, può essere ridotta a piccole associazioni dalla formazione di

più stabili legami d'idrogeno all'aggiunta di acidi organici [2]. Un corollario di questa interpretazione della natura chimica dell'humus è il concetto di umificazione che, al posto di un processo in cui le molecole umiche aumentano di massa molecolare per formazione di legami covalenti, consiste invece in una più energeticamente comprensibile autoaggregazione per effetto idrofobico tra molecole relativamente apolari.

Il consenso raggiunto dall'interpretazione supramolecolare della struttura della sostanza organica umificata [3, 4] ha stimolato nuovi approcci analitici per l'identificazione delle molecole umiche non

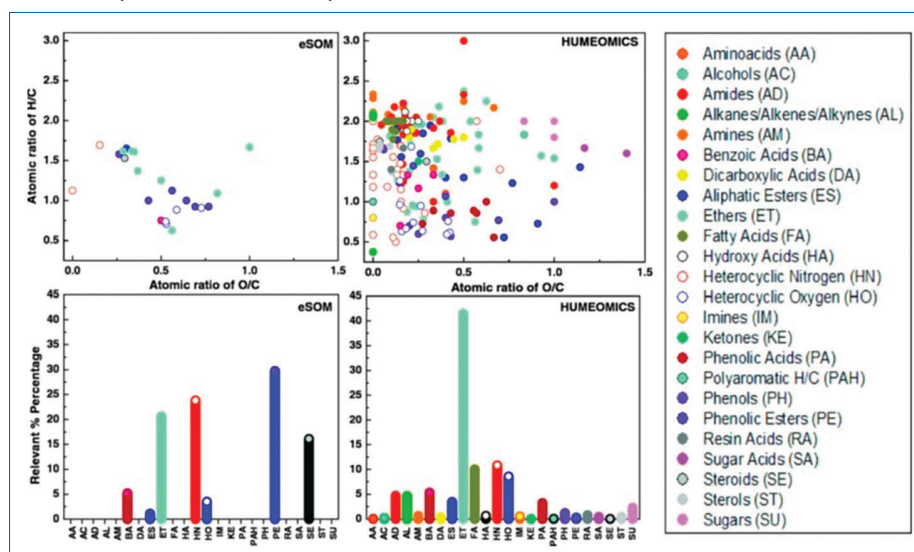


Fig. 2 - Grafici di Van Krevelen delle differenti classi molecolari nell'humoama di un suolo estratte con soluzioni alcaline tradizionali (eSOM) e con tecnica humeomica (somma delle frazioni humeomiche) e loro abbondanza relativa (%)

più macropolimeriche. Nebbioso e Piccolo [5] hanno introdotto la tecnica humeomica con cui un frazionamento chimico condotto senza mai rompere legami C-C, e comprendente prima la solubilizzazione di molecole non legate alla matrice umica e poi di quelle legate rompendo i legami esterei con idrolisi acide e basiche ed i legami eterei con acido iodidrico, permette l'identificazione di più del 70% delle molecole in un estratto umico da suolo attraverso tecniche avanzate quali NMR e cromatografia liquida e gassosa ad alta risoluzione. Un aumento significativo di capacità analitica si è avuto con la procedura humeomica applicata direttamente sul suolo che ha consentito l'estrazione del 235% in più di sostanza organica rispetto alla tradizionale estrazione alcalina [6]. La più grande quantità di classi di composti eterogenei estratti dal suolo con l'humeomica ed il loro contenuto relativo in confronto all'estratto in alcali (Fig. 2), indica che è tracciata la strada per identificare la composizione molecolare dell'humus (humeoma) del suolo. Il frazionamento humeomico è stato utile nel seguire, con un dettaglio molecolare mai raggiunto in precedenza, la dinamica dell'humeoma di un suolo coltivato a mais in funzione del tempo e ad evidenziare la diminuzione progressiva di componenti idrofobici relativamente a quelli polari, mentre stabili risultavano le molecole in complessi con il ferro presente nel suolo [7]. La dinamica molecolare dell'humus in un suolo coltivato a grano mostrava invece una maggiore fragilità della sostanza organica con recuperi di humeoma minore del mais e perdita di molecole legate al ferro, indicando che le misure per la protezione della sostanza organica possono variare a seconda del tipo di coltura [8].

Sequestro del carbonio e riduzione dell'emissione di gas serra

La raggiunta identificazione della composizione molecolare dell'humus del suolo porta ad un più alto livello di potenziale tecnologico la raccomandazione dell'Unione Europea di riservare alla salute del suolo una parte del prossimo programma quadro Horizon Europe [9]. Inoltre, la riconosciuta necessità di mantenere ed aumentare la componente molecolare idrofobica nel suolo al fine di limitare la perdita di preziosa sostanza organica e

di funzionalità produttive del suolo è in linea con la strategia UE in Economia Circolare [10]. Infatti, è stato evidenziato che le componenti idrofobiche di humus esogeno al suolo, come le sostanze umiche da ligniti o il compost umificato maturo, hanno la proprietà di incapsulare l'humeoma labile nel suolo e proteggerlo dalla degradazione microbica attraverso un processo di vero e proprio sequestro del carbonio organico. L'aggiunta al suolo di una molecola mediamente polare come il 2-decanolo marcato al ^{13}C sul carbonio ossidrilato, seguito da soluzioni di humus estratto da lignite o da compost maturo, in ordine di idrofobicità, ha mostrato che, nonostante l'ossidazione biotica del carbonio marcato ad acido carbossilico (evidenziata per spettroscopia ^{13}C -CPMAS-NMR) ed il conseguente aumento di idrofilicità, le misure di diluizione isotopica indicavano una significativa persistenza nel suolo trattato con humus esogeno più idrofobico [11]. Parimente, il sequestro nel suolo di carbonio labile, usando un polisaccaride come modello, per un meccanismo di protezione idrofobica, è stato anche evidenziato con trattamento del suolo con un compost umificato maturo [12]. Il sequestro di carbonio labile nel suolo per protezione idrofobica è stato verificato sperimentalmente per tre anni in campo su suoli a coltura di mais e ad aratura tradizionale con aggiunta di compost umificato maturo e rispetto ad altre pratiche agronomiche di sequestro del carbonio, come l'aratura con lavorazione minima (*minimum tillage*) e il sovescio (*green manuring*). Il compost umificato riusciva a sequestrare carbonio nel suolo in quantità significativamente maggiori degli altri due trattamenti, indicando come il materiale umificato ottenuto dal compostaggio di biomasse e rifiuti organici in un'ottica di economia circolare sia, oltre un biofertilizzante sostenibile, anche un promettente mezzo di lotta contro l'aumento dei gas serra in atmosfera e dei cambiamenti globali [13].

Oltre che per il processo naturale di protezione idrofobica da parte delle strutture supramolecolari apolari dell'humus del suolo, un sequestro di carbonio e la sua stabilizzazione nel suolo si può raggiungere per accoppiamento ossidativo tra le componenti fenoliche dell'humus per catalisi biomimetica, che mima l'attività degli enzimi fenolos-

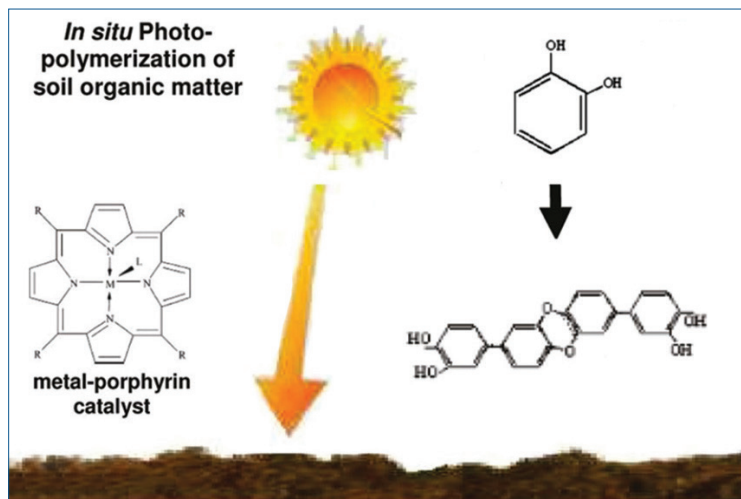
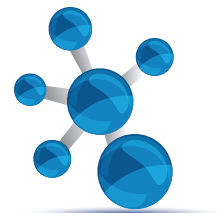


Fig. 3 - Schema di foto-polimerizzazione ossidativa di molecole umiche *in situ* nel suolo con catalisi biomimetica omogenea per applicazione al suolo di soluzioni di meso-tetra(2,6-dicloro-3-sulfonatofenil)porfirinato di ferro(III) cloruro, Fe-(TDCPPS)Cl

sidasici nel favorire l'azione di un ossidante quale il perossido di idrogeno [1]. Catalizzatori biomimetici solubili come le metallo-porfirine fenilsolfonate determinano, in soluzione, la oligomerizzazione ossidativa sia dei precursori fenolici dell'humus [14] sia delle sostanze umiche estratte da suolo [15]. La sintesi catalizzata da metallo-porfirine di molecole umiche singole ad oligomeri eterogenei avviene anche per fotossidazione quando le soluzioni di humus sono sottoposte a radiazione UV [16]. La oligomerizzazione dell'humus *in situ* nel suolo è stata verificata trattando *in vitro* tre diversi suoli con ferro-porfirine ed irradiando con luce solare per cinque giorni (Fig. 3). La stabilizzazione della sostanza organica per accoppiamento fotossidativo catalizzato ha determinato non solo un sensibile aumento della stabilità fisica dei suoli dovuto alla maggiore forza aggregante delle particelle di suolo da parte dei nuovi oligomeri umici, ma anche una significativa riduzione della respirazione dei suoli e dell'emissione di CO₂, a causa della minore biodegradabilità delle molecole umiche energeticamente arricchite dai nuovi legami covalenti indotti dalla oligomerizzazione fotocatalizzata [17]. L'accoppiamento fotoossidativo dell'humus del suolo *in situ* può essere indotto ancora più efficacemente per catalisi biomimetica eterogenea quando le metallo-porfirine sono immobilizzate covalentemente su un minerale argilloso come la caolinite ed ag-

giunte in forma solida al suolo [18]. Un'ulteriore prova che la tecnica di sequestro del carbonio organico nel suolo per fotocatalisi è realisticamente applicabile, efficace e rispettosa della biodiversità del suolo, è stata ottenuta trattando tre suoli agrari diversi con una dose annuale di 10 kg·ha⁻¹ di ferro-porfirine solubili [19]. Il trattamento con catalizzatore della durata di tre anni su suoli sotto grano ha mostrato un significativo sequestro di carbonio organico nell'intervallo tra 2,2 a 3,9 t·ha⁻¹·anno⁻¹ rispetto ai controlli non trattati, nonostante le medesime pratiche di aratura profonda, e mantenendo, al contempo, sia la stessa produttività per ettaro, che la stessa distribuzione di comunità microbiche. Questa tecnologia risulta perciò ben più efficace della comune pratica agronomica di aratura

con lavorazione minima che non va oltre 0,5 t C ha⁻¹ anno⁻¹, mentre riduce notevolmente anche le rese produttive.

Economia circolare e humus per la bonifica di suoli inquinati

Un humus esogeno estratto da depositi geochimici o da compost umificati maturi può essere usato come surfattante naturale al posto dei tensioattivi sintetici per la bonifica di suoli contaminati per lavare sia contaminanti organici sia metalli pesanti. Suoli altamente contaminati del sito di interesse nazionale (SIN) dell'ACNA di Cengio (SV), la più antica fabbrica di coloranti d'Italia, sottoposti ad un solo lavaggio *in situ* e *on site* con soluzioni di acidi umici (10 gL⁻¹) estratti da ligniti, sono stati bonificati rimuovendo quasi il 90% della contaminazione organica, sfruttando la facilità di ripartizione degli inquinanti organici dalle superfici solide del suolo verso i domini idrofobici pseudo-micellari dell'humus nella soluzione di lavaggio [20]. La capacità dei catalizzatori biomimetici metallo-porfirinici di creare legami C-C e C-O nell'humus del suolo, è stata impiegata anche per completare la bonifica dei suoli dell'ACNA di Cengio, i quali, dopo il lavaggio con humus geochimico, sono stati sottoposti alla reazione di accoppiamento ossidativo catalizzata da ferro-porfirine. Le residue molecole umiche nei suoli hanno reagito con i contaminati

organici ancora presenti (principalmente composti aromatici eterociclici) in una co-polimerizzazione ossidativa catalizzata, perdendo così la loro tossicità e finendo inglobati nella matrice umica del suolo [21]. Molto efficace è risultata anche la rimozione di metalli pesanti da suoli inquinati con il lavaggio con humus estratto da compost maturo umificato, in quanto le funzioni acide dell'humus complessano fortemente i metalli divalenti e trivalenti, che sono i principali contaminanti inorganici dei suoli inquinati [22]. Tuttavia, l'efficacia di rimozione di metalli pesanti (40-60%) è risultata funzione del materiale usato per la produzione del compost dal quale si estrae l'humus, che è incrementata da una maggiore quantità di co-compostante ligninico strutturante.

Le due proprietà surfattante e complessante dell'humus che permettono l'efficiente e rapida rimozione di contaminanti da suoli inquinati, possono essere usate contemporaneamente in suoli contaminati sia da composti organici sia da metalli pesanti. I suoli fortemente inquinati da policlorobifenili (PCB) e da metalli pesanti di un altro sito SIN, come la fabbrica di fitofarmaci ex-Caffaro, presso Brescia, sono stati lavati con soluzioni di acidi umici da ligniti ed hanno rimosso simultaneamente con un solo lavaggio più del 75% dei PCB e del 50-70% dei metalli pesanti [23]. Questi lavori indicano che la sostanza organica umificata o humus può essere efficacemente usata per bonificare i suoli inquinati molto più rapidamente dei metodi attualmente impiegati, come il bio-rimedio o il fito-rimedio, che necessitano di anni per una bonifica a norma di legge. Inoltre, il lavaggio con humus non solo è poco costoso ma è anche ecologicamente utile perché in grado di ricostituire velocemente nei suoli le funzionalità chimica, fisica e biologica che solo l'humus può garantire e che addirittura renderebbero i suoli di nuovo produttivi ed in sicurezza.

L'humus come biostimolante in agricoltura sostenibile

L'agricoltura contemporanea è chiamata ad eliminare gradualmente l'uso eccessivo di prodotti agrochimici ad impatto ambientale con l'aiuto crescente di sostanze e/o microorganismi ad azione

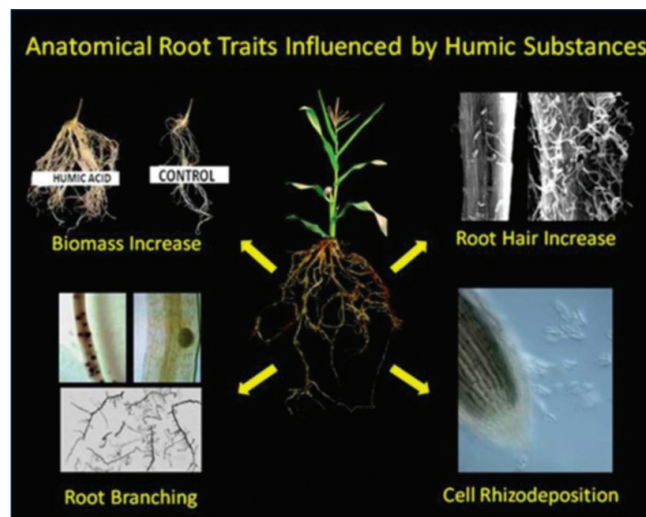
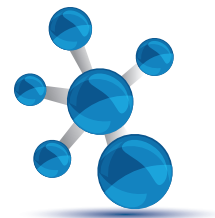


Fig. 4 - Effetti del trattamento con humus biostimolante su radici di mais: aumento della massa, ramificazione, degli essudati radicali, e della produzione metabolica ed enzimatica

biostimolante delle piante. Il mercato globale di questi prodotti sembra che raggiungerà i quattro miliardi di dollari nel 2025 con un tasso di crescita, per la sola Europa, del 13% annuo [24].

In Italia i prodotti più usati in agricoltura sono le sostanze umiche (52%), mentre i prodotti microbici rappresentano solo il 20% del mercato. L'azione delle sostanze umiche è dovuta alle molecole ormono-simili in esse contenute che cambiano l'architettura e la dinamica di crescita delle radici, aumentandone il volume, l'area superficiale e la densità di ramificazioni [25]. Inoltre, accrescono l'attività ATPasica protonica delle radici ed altri meccanismi biochimici che intensificano il gradiente elettrochimico attraverso le membrane plasmatiche, favorendo l'assimilazione dei nutrienti essenziali. Il trattamento con sostanze umiche cambia la composizione molecolare degli essudati radicali, suggerendo un effetto indotto sull'equilibrio biotico ed abiotico del suolo rizosferico e la distribuzione dei metaboliti primari e secondari nei tessuti vegetali, come risultato di una variazione della proteomica e genomica della pianta (Fig. 4). Tuttavia, il materiale umico usato come biostimolante in agricoltura viene estratto prevalentemente da depositi geochimici come le ligniti o dalle torbe. Ambedue questi materiali non sono rinnovabili ed il loro sfruttamento non solo implica rischi per l'equilibrio ecologico ma contraddice il concetto di



economia circolare. Al contrario, un humus molto più bioattivo può essere estratto dal compost umificato maturo riciclando biomasse organiche di scarto sia agrarie che urbane [26, 27] o da scarti lignocellulosici di biomasse usate dalla nuova industria delle bioraffinerie [28]. È stato poi accertato che l'uso in agricoltura di humus da compost verde insieme a microrganismi stimolatori delle piante ha un effetto sinergico sulle piante [29] e concorre ad aumentare l'assimilazione dei macronutrienti ed a variare il metabolismo vegetale [30]. Grazie alle proprietà dell'humus da riciclo di biomasse, ed in sintonia con l'economia circolare, si apre perciò una nuova e promettente stagione per una agricoltura sostenibile che rispetti l'equilibrio dell'ecosistema agrario e mantenga i livelli produttivi dell'agricoltura industriale.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Piccolo *et al.*, Sustainable Agrochemistry, Springer Nature, Heidelberg, 2019, 183.
- [2] A. Piccolo, *Advances in Agronomy*, 2002, **75**, 57.
- [3] R. Sutton, G. Sposit, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**, 9009.
- [4] M.J.M. Wells, *J. Environ. Qual.*, 2019, **48**, 1644.
- [5] A. Nebbioso, A. Piccolo, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 1187.
- [6] M. Drosos *et al.*, *Sci. Total Environ.*, 2017, **15**, 807.
- [7] M. Drosos, A. Piccolo, *Land Degr. Devel.*, 2018, **29**, 1792.
- [8] M. Drosos *et al.*, *Soil Till. Res.*, 2020, **196**, 104448.
- [9] https://ec.europa.eu/info/horizon-europe/missions-horizon-europe/soil-health-and-food_en
- [10] https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_15_6203
- [11] R. Spaccini *et al.*, *Soil Biol. Biochem.*, 2002, **34**, 1839.
- [12] A. Piccolo *et al.*, *Climatic Change*, 2004, **67**, 329.
- [13] R. Spaccini, A. Piccolo, *Land Degr. Devel.*, 2020, **31**, 1206.
- [14] D. Smejkalova, A. Piccolo, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, **40**, 1644.
- [15] A. Piccolo *et al.*, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 351.
- [16] D. Smejkalova, A. Piccolo, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 2120.
- [17] A. Piccolo *et al.*, *Environ. Sci. Technol.*, 2011, **45**, 6697.
- [18] A. Nuzzo, *Biol. Fertil. Soils*, 2016, **52**, 585.
- [19] A. Piccolo *et al.*, *Land Degr. Devel.*, 2018, **29**, 485.
- [20] P. Conte *et al.*, *Environ. Poll.*, 2005, **135**, 515.
- [21] F. Sannino *et al.*, *J. Hazardous Mat.*, 2013, **261**, 55.
- [22] A. Piccolo *et al.*, *Chemosphere*, 2019, **225**, 150.
- [23] A. Piccolo *et al.*, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2021, <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12484-x>
- [24] M.J. Van Oosten, *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 2017, **4**, 5.
- [25] L.P. Canellas, F.L. Olivares, *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 2014, **1**, 3.
- [26] H. Monda *et al.*, *Sci. Total Environ.*, 2017, **590-591**, 40.
- [27] M. Verrillo *et al.*, *Waste Management*, 2021, **120**, 98.
- [28] D. Savy *et al.*, *Sustainable Chemistry and Engineering*, 2017, **5**, 9023.
- [29] F.L. Olivares *et al.*, *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 2017, **4**, 30.
- [30] G. Vinci *et al.*, *Plant and Soil*, 2018, **429**, 437.

Humus, Structure and Applications in Agriculture

Humus supports soil fertility and the environmental biogeochemical equilibrium. To have reckoned the supramolecular nature of humus allowed the structural identification of the complex soil humeome and the use *in situ* of catalyzed photooxidative technologies for its stable sequestration in soil. Humus extracted from green compost or composted biomasses from biorefineries is used as surfactant for a rapid and ecological soil remediation and as an efficient plant biostimulant in a modern sustainable agriculture.