

MARIA DE NOBILI<sup>1</sup>

## La complessità della sostanza organica del suolo e le nuove prospettive di ricerca sull'umificazione

<sup>1</sup> Università degli Studi di Udine

Anche partendo da un semplice approccio chimico-fisico, pochi sono i sistemi che risultano così complessi come il sistema suolo. La coesistenza di tre fasi fisiche distinte e di componenti colloidali sia minerali che organici, che agiscono come interfacce attive tra di queste, rendendo anisotropa, ad esempio, la stessa fase liquida e regolando gli equilibri dinamici di adsorbimento di soluti e dissoluzione di solidi sarebbero di per sé già sufficienti a dare ragione di una complessità difficilmente descrivibile con modelli semplici. A tutto questo si aggiunge comunque il contributo fondamentale della componente biologica che si esplica sia in termini di estrema biodiversità, la quale supera quella presente alla superficie del suolo, sia in termini di numero e varietà di interazioni e interdipendenze che si stabiliscono, non solo tra gli organismi stessi, ma anche con le componenti non viventi.

La necessità di un approccio sistemico, cioè di un paradigma scientifico generale incentrato sulle relazioni complesse (Noble, 2006) al sistema suolo è stata recentemente indicata come l'unica che possa aiutarci a sviluppare una prospettiva chiara su come le sue funzioni ecologiche e agricole si originino dai processi di interazione su piccola scala costituendo: «un prerequisito per sviluppare strategie scientificamente basate per la gestione sostenibile del suolo» (Vogel et al., 2019).

Ancora maggiore sarebbe la necessità di sviluppare un approccio di tale genere per far avanzare le nostre conoscenze sulla sostanza organica del suolo. Queste conoscenze sono infatti tutt'oggi, per quanto favorite dallo sviluppo di nuove potenti tecniche analitiche, ancora purtroppo frammentate e settoriali. Purtroppo negli ultimi anni, gli studiosi della materia hanno mostrato, al contrario, una decisa tendenza verso la proposta di approcci riduzionisti,

come quelli espressi ad esempio attraverso il recente Soil Continuum Model (SCM) di Lehmann e Kleber (2015).

Secondo questo modello la sostanza organica del suolo esisterebbe «come un continuo di frammenti organici che vengono continuamente trasformati dalla comunità dei decompositori verso dimensioni molecolari più piccole. La rottura delle molecole grandi porta ad una diminuzione nelle dimensioni dei componenti principali dei materiali vegetali primari con un aumento concomitante i gruppi polari e ionizzabili, e perciò ad una aumentata solubilità in acqua» (Lehmann e Kleber, 2015). Questo aumento della solubilità dei prodotti rilasciati dall'idrolisi delle macromolecole naturali dovrebbe, sempre secondo il modello proposto, favorirne l'adsorbimento sulle superfici minerali e l'inclusione negli aggregati strutturali del suolo, aumentando in questo modo la protezione fisica contro il procedere della decomposizione, semplicemente regolando la disponibilità dei substrati nella fase acquosa. Il modello esclude qualsiasi resintesi secondaria spontanea che porti alla formazione di molecole non pre-esistenti come monomeri strutturali, o come componenti semplici dei residui vegetali o animali o del metabolismo cellulare microbico.

Questa visione è stata purtroppo supportata dall'applicazione impropria di tecniche spettroscopiche moderne, quali le tecniche bidimensionali di NMR o alcune applicazioni della spettrometria di massa, che non sono però adatte ad affrontare direttamente il problema della composizione di miscele polidisperse, come quella rappresentata dalle sostanze umiche. Queste tecniche sono state troppo spesso impiegate e acclamate acriticamente come risolutive, senza una piena coscienza dei loro limiti analitici intrinseci e hanno indotto negli ultimi decenni a negare la possibilità che reazioni termodinamicamente favorite possano avvenire tra i molti costituenti reattivi presenti negli apporti organici vegetali, animali e microbici e condurre alla re-sintesi di sostanze umiche.

La realtà della sostanza organica del suolo, tradizionalmente già intuita e comprovata in due secoli di studi sull'umificazione, è molto diversa (De Nobili et al., 2020), ed è possibile rendersene conto soprattutto utilizzando un approccio interdisciplinare, anche completamente indipendente dalle classiche teorie sull'umificazione. Un esame della letteratura più aggiornata riguardante le nuove conoscenze sui processi che avvengono spontaneamente durante la conservazione dei prodotti alimentari, rivela, infatti, come nuovi studi nel campo ad esempio della scienza degli alimenti, abbiano permesso di appurare che nelle cellule dei tessuti vegetali e animali e dei funghi, non appena cessa la regolazione dei processi metabolici attuata attraverso le funzioni vitali, cominci a instaurarsi tutta una serie di processi spontanei (Mishra and Gautam, 2016; Lattanzio, 2003) in cui le componenti fenoliche si legano tra

di loro o ad altre molecole presenti all'interno dello stesso comparto cellulare, attraverso reazioni di ossidoriduzione e di addizione, formando sostanze complesse di colore bruno.

La moderna spettrometria di massa ad alta risoluzione ha permesso in molti casi di seguire con sempre più grande dettaglio e precisione tali reazioni (Garcia et al., 2017; Zhang et al., 2010), che sono catalizzate da enzimi classificati a seconda della loro specificità di substrato e meccanismo di azione come laccasi (E.C:1.10.3.2), catecol-ossidasi (E.C.1.10.3.1) e tirosinasi (1.14.18.1). I meccanismi di reazione comprovano una rapida diagenesi di addotti sempre più complessi, che si formano attraverso reazioni radicaliche. I radicali danno infatti origine a derivati chinonici che attraverso attacco nucleofilo da parte di altri radicali formano dimeri, trimeri ed eventualmente polimeri di colore bruno (Wong, 2009).

La somiglianza dei cammini di reazione oggi osservati dagli scienziati di altre discipline con i meccanismi ipotizzati dalla classica teoria dell'unificazione è più che evidente.

Un'altra conferma deriva dalle conoscenze ormai consolidate sui processi che avvengono all'interno dell'ultimo tratto dell'intestino di molte larve e insetti e ci dimostra allo stesso tempo come le critiche avanzate all'estrazione delle sostanze umiche con estraenti alcalini non siano del tutto giustificate<sup>1</sup>. Numerose ricerche hanno infatti appurato come negli ecosistemi naturali, i residui vegetali apportati alla superficie e la sostanza organica del suolo transitino, anche più volte, attraverso il processo di digestione da parte della pedofauna (Wolters, 2000; Zanella et al., 2018b) dove sono esposti a variazioni estreme di pH e all'azione di enzimi. Sino pochi anni fa, si riteneva che l'azione della pedofauna si limitasse alla frantumazione dei residui vegetali, aumentandone la superficie di contatto con l'ambiente esterno e favorendo la colonizzazione da parte di batteri e funghi. Lo studio delle micromorfologie degli orizzonti organici ha messo in luce come la pedofauna ingerisca gran parte degli apporti organici al suolo, ma ne assimili solo una piccola parte (fig. 1): il resto ritorna al suolo sotto forma di feci, che possono costituire la maggior parte della sostanza organica di orizzonti organici superficiali e anche una frazione consistente di quelli inorganici (Zanella et al, 2018c). La trasformazione della lettiera in feci modifica molti tratti della decomposizione dei residui (Morriën e Prescott, 2018), diminuendo, ad esempio, l'importanza del tipo di lettiera (disponibilità di nutrienti, contenuto di lignina ecc.) ed esercita un controllo importante sulle dinamiche del carbonio e dell'azoto:

<sup>1</sup> Dimenticando completamente peraltro tutti i numerosissimi studi effettuati nel secolo scorso utilizzando estraenti neutri come le soluzioni di pirofosfato di sodio a pH 7.

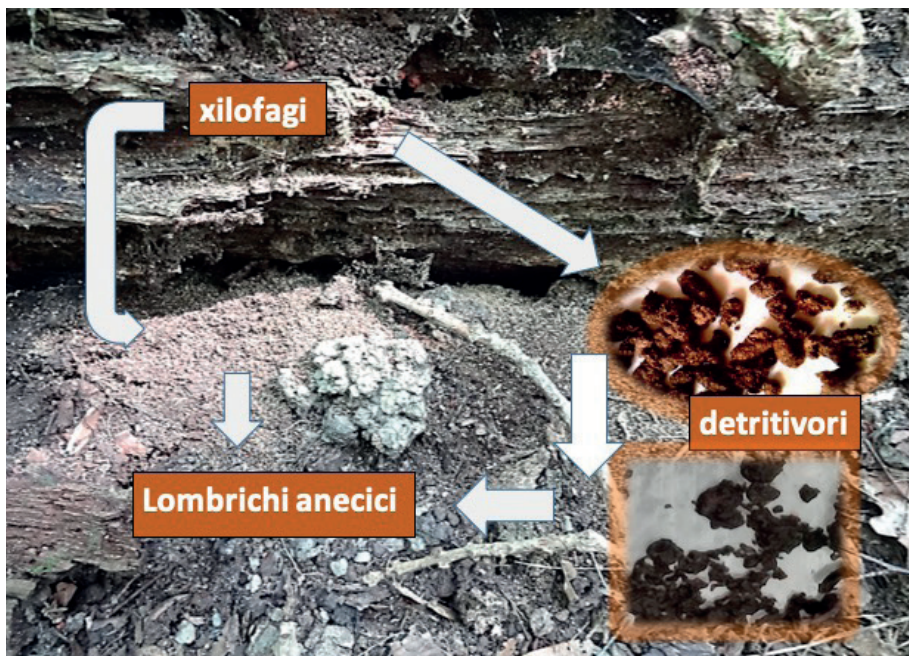


Fig. 1 La complessa catena alimentare costituita dalla pedofauna assimila solo una piccola parte degli apporti organici e li restituisce al suolo dopo averli trasformati

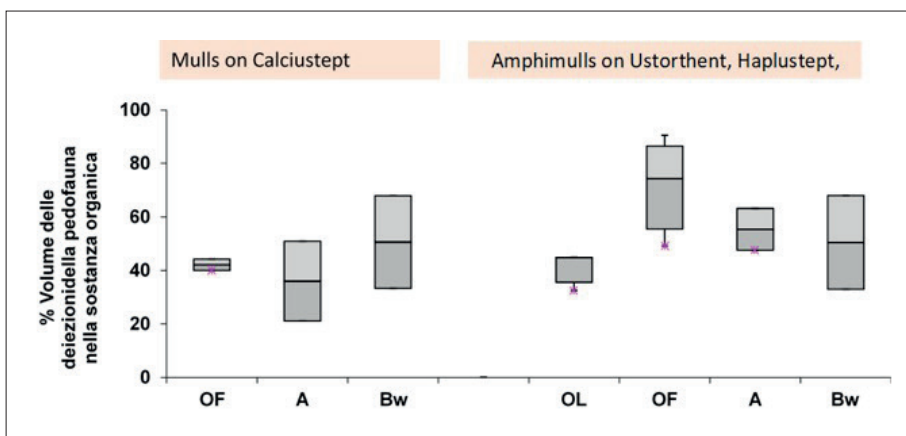


Fig. 2 Contributo volumetrico delle deiezioni morfologicamente riconoscibili della pedofauna agli orizzonti organici e organo-minerali di suoli forestali mediterranei. Modificato da Zaites e Poch (2016)

la respirazione microbica viene solo temporaneamente stimolata, mentre le feci costituiscono una forma di sostanza organica stabilizzata (Rawlins et al., 2007). Infatti, i tessuti ancora non decomposti vengono non solo finemente suddivisi, ma attivamente trasformati nella loro composizione chimica, attraverso l'esposizione all'azione di enzimi non solo idrolitici, ma anche di polifenol-ossidasi e laccasi. Queste ultime hanno la funzione di bloccare la tossicità dei polifenoli, favorendone la polimerizzazione. Durante il passaggio attraverso l'intestino di larve insetti e anellidi, avviene inoltre, la colonizzazione di quanto non viene assimilato da parte di batteri e funghi e in alcuni casi, come ad esempio nei lombrichi, anche la formazione di aggregati organo-minerali.

Un'idea dell'importanza di questi processi si può ottenere (fig. 2) considerando il contributo volumetrico delle deiezioni, ancora morfologicamente riconoscibili, della pedofauna alla sostanza organica degli orizzonti superficiali sia organici che minerali di suoli forestali in ambiente mediterraneo (Zaites e Poch, 2016). Negli orizzonti organici, tale contributo volumetrico va dal 10 al 30%, mentre nel primo orizzonte organo-minerale A arriva anche al 28% e persino al 36% nel sottostante orizzonte Bw, superando di gran lunga il volume occupato dalla sostanza organica amorfa.

Studi di fisiologia, resi oggi possibili dall'uso di microsensori ed effettuati *in vivo* sul tratto digerente di insetti xilofagi e pedonti (Wu et al., 2015; Ceja-Navarro et al., 2019), mostrano anche come sia inconsistente la critica oggi diffusa riguardo ai tradizionali sistemi di estrazione delle sostanze umiche del suolo mediante soluzioni alcaline. Secondo tale critica le sostanze umiche sarebbero in realtà artefatti dell'esposizione di sostanze semplici e di struttura nota a una alcalinità eccessiva che non ha riscontri nel mondo naturale (Shao et al., 2012). Al contrario, il tratto finale dell'intestino di molti degli organismi della pedofauna ha un pH estremamente alcalino (spesso anche  $\text{pH} > 10$ ): le sostanze umiche quindi sarebbero naturalmente esposte a valori di pH paragonabili a quelli delle soluzioni impiegate per la loro estrazione dal suolo.

Esiste naturalmente anche una diagenesi non zoogenica delle sostanze umiche, che è favorita da clima molto freddo o secco, acidità, substrati non sufficientemente nutrienti (Zanella et al., 2018b). In alcuni suoli si osserva infatti la formazione di orizzonti organici caratterizzati da assenza di deiezioni e da decomposizione fungina (*white rot fungi*) e di orizzonti organo minerali non-zoogenici con struttura a grani singoli o massiva o sostenuta solo da ife (Zanella et al., 2018b). Anche in questi casi la sintesi secondaria spontanea delle sostanze umiche avviene con meccanismi molto simili in quanto i funghi sono capaci di rilasciare nel suolo polifenol-ossidasi e laccasi con lo scopo di decomporre ad esempio la lignina e favorire il rilascio di sostanze azotate e substrati energeticamente convenienti.

Sono molteplici le reazioni che è stato dimostrato avvengono spontaneamente e in maniera disordinata, portando alla formazione di addotti e strutture miste, sempre più complesse (Zvarizina, 2018) che immobilizzano i polifenoli e che si originano dall'azione esogena di laccasi (Keller et al., 2014; Eichlerová, 2012), enzimi non specifici che operano a pH anche vicini alla neutralità e in presenza di ossigeno. L'esistenza di queste reazioni extracellulari e spontanee è ampiamente provata oggi dal gran numero di studi nel campo della Chimica Verde che si sono occupati recentemente di questa classe di enzimi per le loro caratteristiche di persistenza, capacità di mantenere l'attività anche dopo adsorbimento sulle superfici solide, e per la possibilità che offrono di venir impiegati nel trattamento di reflui industriali (Witayakran abd Ragauskas, 2009).

La teoria classica dell'umificazione risulta quindi, alla luce delle nuove indagini portate avanti con tecniche innovative, sia in scienza del suolo (Hertkorn et al., 2008; Dou et al., 2020), sia in discipline che vanno dalla Scienza degli Alimenti alla Chimica Verde, ancora assolutamente valida sia da un punto di vista chimico che termodinamico. Essa è stata inoltre, non bisogna dimenticarlo, sempre ampiamente supportata e validata pragmaticamente (Olk et al., 2019 a, b) secondo la definizione data da Blackburn (1994) di verità scientifica, che implica l'esistenza necessaria di «profonde connessioni tra l'idea che un sistema rappresentativo sia accurato e il probabile successo dei progetti e degli obiettivi su questo basati».

L'enorme eterogeneità potenziale dei possibili prodotti di re-sintesi secondaria è essa stessa alla base di quella complessità che fa ancor oggi delle sostanze umiche i componenti della sostanza organica del suolo ancora meno conosciuti da un punto di vista strutturale. La risposta a molte domande ancora insolte riguardo alla loro natura può essere ottenuta proprio attraverso un approccio sistemico che tenga conto delle proprietà funzionali che esse esercitano nel suolo e nell'ambiente e le utilizzi nella validazione di modelli computazionali che leghino ipotesi di struttura molecolare dei componenti della miscela complessa con le funzioni esercitate.

L'approccio sistemico è per molti aspetti simile a un approccio olistico, ma si differenzia fondamentalmente perché considera i sistemi come network dinamici e perché implica un'analisi computazionale e la modellizzazione matematica del sistema oggetto di studio.

Un esempio degli strumenti matematici con cui è possibile oggi affrontare la complessità del processo di umificazione è la chimica dinamica combinatoria, una tecnica computazionale che si basa sull'individuazione dei prodotti più termodinamicamente più stabili e quindi più probabili che si originano all'equilibrio di una miscela interagente. Questo strumento è quindi partico-

larmente utile per testare le ipotesi di combinazioni supramolecolari calcolandone la forza e la stabilità sulla base di parametri termodinamici determinati sperimentalmente e disponibili in diverse banche dati (Corbett et al., 2013).

La validazione delle ipotesi di struttura molecolare potrebbe anche essere effettuata mediante modelli QSAR (*quantitative structure-activity relationship*), diffusamente impiegati nell'approccio sistemico. Tali modelli applicano la chemometria e la chemo-informatica per predire le proprietà chimiche e fisiche delle sostanze sulla base di descrittori variabili consistenti in parametri misurabili sperimentalmente. Essi sono oggi ampiamente impiegati per individuare ad esempio, tra le molte teoricamente possibili, le strutture molecolari capaci di particolari funzioni biologiche, ma l'approccio potrebbe essere capovolto nel caso della sostanza organica del suolo, di cui conosciamo ampiamente le funzioni. Si potrebbe ad esempio utilizzare tali modelli per escludere da un data base di formule brute derivato da analisi di spettroscopia di massa a ultra-elevata risoluzione, quelle ipotetiche composizioni della miscela umica che non siano coerenti con le funzionalità osservate sperimentalmente (Vialikh, 2019).

Ancora più specificamente sarebbe utile applicare un approccio QSPR (*quantitative structure-property relationship*) per costruire un modello di sostanze umiche non basato su una singola ipotesi strutturale, ma, molto più realisticamente, su un sistema interagente di molecole. Un esempio di uno schema di applicazione e validazione di un approccio di tipo QSPR per l'individuazione di possibili strutture molecolari e del loro possibile contributo in termini quantitativi alla miscela polidispersa costituita dalle sostanze umiche potrebbe essere il seguente. In una ipotetica applicazione la computazione iniziale del modello sarebbe fatta descrivendo il sistema attraverso un set di equazioni differenziali che incorporano parametri legati alle proprietà di base sperimentalmente note e considerate determinanti. Da questo primo modello si ottengono nuovi modelli stocastici, caratterizzati da molteplici soluzioni che possiedono diversi gradi di probabilità. Questi modelli dovrebbero venire successivamente testati per la loro sensibilità e robustezza attraverso successivi processi interattivi di feedback che possono portare ad amplificazioni o riduzioni della risposta del modello o alla sua eliminazione. I dati in uscita andrebbero in ogni caso confrontati con dati sperimentali presenti in letteratura (*data mining*) oppure usati per predire il risultato di esperimenti di validazione, disegnati *ad hoc*. Per ultimo la simulazione della dinamica molecolare, normalmente usata per predire le proprietà delle molecole o di loro miscele a partire dalla struttura, dovrebbe essere di nuovo applicata ai risultati finali e validata verificandone la coerenza con dati ricavati da un ampio spettro di tecniche analitiche.

Negli ultimi anni, sono comparsi alcuni interessanti articoli sull'applicazione di tecniche computazionali di questo tipo alle sostanze umiche (Petrescu

et al., 2019; Savy et al., 2020) dimostrandone le notevoli potenzialità. Purtroppo il numero di componenti, il numero di classi e il numero di interazioni, attualmente gestibili, non rispecchiano ancora nemmeno lontanamente la complessità della composizione delle sostanze umiche quale appare dalla spettroscopia di massa di ultra elevata risoluzione (Green and Purdue, 2015). Infatti, attualmente la computazione di modelli applicati a miscele di sostanze composte formate da un numero di componenti anche di due ordini di grandezza minori, rispetto a quello delle possibili strutture derivate da analisi di spettrometria di massa ad alta risoluzione, è ancora assolutamente fuori questione in termini di tempo macchina richiesto. La rapidissima evoluzione tecnica a cui stiamo assistendo in questi campi, assieme alla individuazione di una adatta strategia di scelta euristica, potrebbero però renderla fattibile in tempi non troppo lontani, rendendo possibili avanzamenti a tutt'oggi impensabili.

#### RIASSUNTO

Il suolo è un sistema estremamente complesso su cui agiscono molteplici fattori climatici, geomorfologici e biotici. Questa diversità si riflette nella composizione della sostanza organica, su cui si esplica in misura anche maggiore, l'azione combinata degli organismi che vivono e agiscono nel suolo o sopra di esso. L'adozione di approcci riduzionisti, come quelli sovente proposti negli ultimi anni, sottostima questa estrema complessità e non permette di avanzare la nostra comprensione del ruolo funzionale del suolo nell'ambiente. Grazie allo sviluppo di tecniche analitiche sempre più potenti, sono state recentemente accumulate da parte di diverse discipline scientifiche, informazioni accurate sui processi di re-sintesi spontanea, che avvengono nelle cellule non appena cessa la regolazione vitale dei processi metabolici. La somiglianza dei cammini di reazione osservati con i meccanismi ipotizzati dalla classica teoria dell'umificazione è sorprendente. Un'altra conferma deriva dai processi che avvengono all'interno dell'ultimo tratto dell'intestino di molte larve ed insetti, in cui il pH raggiunge valori che non si discostano molto da quelli delle soluzioni normalmente impiegate per l'estrazione delle sostanze umiche.

Solo un approccio sistemico, del tipo ora applicato con sempre maggiore successo in molti campi delle scienze biologiche, può aiutare a gestire, anche grazie all'impiego di strumenti computazionali che collegano struttura e funzione a livello molecolare, l'enorme interconnessione e la diversità di un simile sistema, aprendo prospettive mai immaginate nello studio della sostanza organica.

#### ABSTRACT

Soil is an extremely complex system affected by several climatic, geomorphologic and biotic factors. This diversity is reflected by the composition of soil organic matter, on which

acts in an even stronger fashion the combined action of living organisms that dwell in or above the soil. The adoption of reductionist approaches, as those often proposed during the last years, underestimates this extreme complexity and does not allow to advance our knowledge of the functional role of soil in the environment. Because of the development of new powerful analytical tools, research carried out in other disciplines has piled up accurate information on the re-synthesis processes that spontaneously occur inside cells as soon as the regulation of metabolic processes by vital functions ceases. The similarity of these reaction mechanisms with those hypothesized by the classic humification theories is striking. Another confirmation derives from the consolidated knowledge of the processes that occur in the final digestive tract of insects and larvae, where the pH is actually not much different from that of the solutions employed to extract humic substances.

Only a systematic approach, of the type that is applied with more and more success in the biological sciences, can help, thanks to the use of advanced computational tools, to deal with the huge interconnection and diversity of such a system, opening up perspectives never imagined before in the study of organic matter.

#### BIBLIOGRAFIA

- CEJA-NAVARRO J.A., KARAOZ U., BILL M., HAO Z., WHITE R.A., ARELLANO A., RAMAN-CULOVA L., FILLEY T.R., BERRY T.D., CONRAD M.E., BLACKWELL M., NICORA C.D., KIM YOUNG M., REARDON P.N., LIPTON M.S., ADKINS J.N., PETT-RIDGE J., BRODIE E.L. (2019): *Gut anatomical properties and microbial functional assembly promote lignocellulose deconstruction and colony subsistence of a wood-feeding beetle*, «Nature microbiology», 4, pp. 864-875.
- BLACKBURN S. (1994): *The Oxford dictionary of philosophy*, Oxford University Press, New York.
- CORBETT P.T., LECLAIRE J., VIAL L., WEST K.R., WIETOR J., SANDERS J.K.M. AND OTTO S. (2013): *Dynamic Combinatorial Chemistry*, «Chem. Rev.», 2006, 106, 9, pp. 3652-3711.
- DE NOBILI M., BRAVO C., CHEN Y. (2020): *The spontaneous secondary synthesis of soil organic matter components: A critical examination of the soil continuum model theory*, «Applied Soil Ecology», 154, 103655-103670.
- DOU S., SHAN J., SONG X., CAO R., WU M. LI C., GUAN S. (2020): *Are humic substances soil microbial residues or unique synthesized compounds? A perspective on their distinctiveness*, «Pedosphere», 30, pp. 159-167.
- EICHLEROVÁ I., ŠNAJDR J., BALDRIAN P. (2012): *Laccase activity in soils: considerations for the measurement of enzyme activity*, «Chemosphere», 88, pp. 1154-1160.
- GARCÍA C.J., GARCÍA-VILLALBA R., GIL M.I., TOMAS-BARBERAN F.A. (2017): *LC-MS untargeted metabolomics to explain the signal metabolites inducing browning in fresh-cut lettuce*, «J. Agric. Food Chem.», 65, pp. 4526-4535.
- GREEN N.W., PERDUE E.M. (2015): *Fast Graphically Inspired Algorithm for Assignment of Molecular Formulae in Ultrahigh Resolution Mass Spectrometry*, «Anal. Chem.», 87, pp. 5086-5094.
- HERTKORN N., FROMMBERGER M., WITT M., KOCH B.P., SCHMITT-KOPPLIN PH. AND PERDUE E.M. (2008): *Natural Organic Matter and the Event Horizon of Mass Spectrometry*, «Anal. Chem.», 80, 23, pp. 8908-8919.

- KELLNER H., LUIS P., PECYNA M.J., BARBI F., KAPTURSKA D., KRÜGER D., ZAK D.R., MARMEISSE R., VANDENBOL M., HOFRICHTER M. (2014): *Widespread occurrence of expressed fungal secretory peroxidases in forest soils*, «PLoS One», 9, pp. 1-9.
- LATTANZIO V. (2003): Bioactive polyphenols: their role in quality and storability of fruit and vegetables, «J. Appl. Bot-Angew. Bot.», 77, pp. 128-146.
- MISHRA B.B., GAUTAM S. (2016): *Polyphenol oxidases: biochemical and molecular characterization, distribution, role and its control*, «Enz. Eng.», 5, pp. 141-150.
- MORRIËN E., PRESCOTT C.E. (2018): *Pellets or particles? How can we predict the effect of soil macro-arthropods on litter decomposition?*, «Functional ecology», 32, pp. 2480-2482.
- NOBLE D. (2006): *The Music of Life: Biology Beyond the Genome*, Oxford University Press, Oxford.
- OLK D.C., BLOOM P.R., DE NOBILI M., CHEN Y., MCKNIGHT D., WELLS M., WEBER J. (2019a): *Using humic fractions to understand natural organic matter processes in soil and water: selected studies and applications*, «J. Environ. Qual.», 48, pp. 1633-1643.
- OLK D.C., BLOOM P.R., PERDUE E.M., MCKNIGHT D.M., CHEN Y., FARENHORST A., SENESI N., CHIN Y.-P., SCHMITT-KOPPLIN P., HERTKORN N., HARIR M. (2019b): *Environmental and agricultural relevance of humic fractions extracted by alkali from soils and natural waters*, «J. Environ. Qual.», 48, pp. 217-232.
- PETRESCU A.M., LUKINICH-GRUIA A.T., PAUNESCU V., ILIA G. (2019): *A Theoretical Study of the Molecular Coupled Structures of Aristolochic Acids and Humic Acid, Potential Environmental Contaminants*, «Chemistry and Biodiversity», 16.
- RIVA S. (2006): *Laccases: blue enzymes for green chemistry*, «Trends Biotechnol.», 24, pp. 219-226.
- SAVY D., BROSTAUX Y., COZZOLINO V., DELAPLACE P., DU JARDIN P. AND PICCOLO A. (2020): *Quantitative Structure-Activity Relationship of Humic-Like Biostimulants Derived From Agro-Industrial Byproducts and Energy Crops*, «Front. Plant Sci., Sec. Crop and Product Physiology», <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00581>
- SHAO Q., YANG B., XU Q., LI X., LU Z., WANG C., HUANG Y., SÖDERHÄLL K., LING E. (2012): *Hindgut innate immunity and regulation of fecal microbiota through melanization in insects*, «J. Biol. Chem.», 287, pp. 14270-14279.
- RODRÍGUEZ COUTO S., TOCA HERRERA J.L. (2006): *Industrial and biotechnological applications of laccases: a review*, «Biotechnol. Adv.», 24, pp. 500-513.
- VIALYKH É.A., SALAHUB D.R., ACHARI G., COOK R.L., LANGFORD C.H. (2019): *Emergent functional behaviour of humic substances perceived as complex labile aggregates of small organic molecules and oligomers*, «Environmental Chemistry», 16, pp. 505-516.
- WITAYAKRAN S., RAGAUSKAS A.J. (2009): *Synthetic applications of laccase in green chemistry*, «Adv. Synth. Catal.», 351, pp. 1187-1209.
- WOLTERS V. (2000): *Invertebrate control of soil organic matter stability*, «Biol. Fertil. Soils», 31, pp. 1-19.
- WU K., ZHANG J., ZHANG Q., ZHU S., SHAO Q., CLARK K.D., LIU Y., LING E. (2015): *Plant phenolics are detoxified by prophenoloxidase in the insect gut*, «Sci. Rep.», 5 (16823).
- ZAIETS O., POCH R.M. (2016): *Micromorphology of organic matter and humus in Mediterranean mountain soils*, «Geoderma», 272, pp. 83-92.
- ZANELLA A., PONGE J.F., JABIOL B., SARTORI G., KOLB E. ET AL. (2018<sup>a</sup>): *Humusica 1, article 4: terrestrial humus systems and forms – specific terms and diagnostic horizons*, «Appl. Soil Ecol.», 122, pp. 56-74.
- ZANELLA A., PONGE J.F., JABIOL B., SARTORI G., KOLB E., LE BAYON R.C., GOBAT J.-M., AUBERT M., DE WAAL R., VAN DELFT B., VACCA A., SERRA G., CHERSICH S., ANDREET-

- TA A., KÓLLI R., BRUN J.J., COOLS N., ENGLISH M., HAGER H., KATZENSTEINER K., BRÊTHES A., DE NICOLA C., TESTI A., BERNIER N., GRAEFE U., WOLF U., JUILLERET J., GARLATO A., OBBER S., GALVAN P., ZAMPEDRI R., FRIZZERA L., TOMASI M., BANAS D., BUREAU F., TATTI D., SALMON S., MENARDI R., FONTANELLA F., CARRARO V., PIZZEGHELLO D., CONCHERI G., SQUARTINI A., CATTANEO D., SCATTOLIN L., NARDI S., NICOLINI G., VIOLA F. (2018): *Humusica 1, article 5: Terrestrial humus systems and forms. Keys of classification of humus systems and forms*, «Applied Soil Ecology», 122, pp. 75-86.
- ZANELLA A., PONGE J.F., BRIONES M.J. (2018b): *Humusica 1, article 8: terrestrial humus systems and forms – biological activity and soil aggregates, space-time dynamics*, «Appl. Soil Ecol.», 122, pp. 103-137.
- ZAVARZINA A.G., LISOV A.V., LEONTIEVSKY A.A. (2018): *The role of ligninolytic enzymes laccase and a versatile peroxidase of the white-rot fungus Lentinus tigrinus in biotransformation of soil humic matter: comparative in vivo study*, «J. Geophys. Res-Biogeol.», 123, pp. 2727-2742.
- ZHANG X., DO M.D., CASEY P., SULISTIO A., QIAO G.G., LUNDIN L., LILLFORD P., KOSARAJU S., (2010): *Chemical cross-linking gelatin with natural phenolic compounds as studied by high-resolution NMR spectroscopy*, «Biomacromolecules», 11, pp. 1125-1132.