

## Esplorando alternative sostenibili: il Distillato di Legno allevia l'impatto della bioplastica nelle piante di basilico

Silvia Celletti <sup>a,\*</sup>, Riccardo Fedeli <sup>a</sup>, Majid Ghorbani <sup>a</sup>, Jonan Mbela Aseka <sup>a</sup>, Stefano Loppi <sup>a,b</sup>

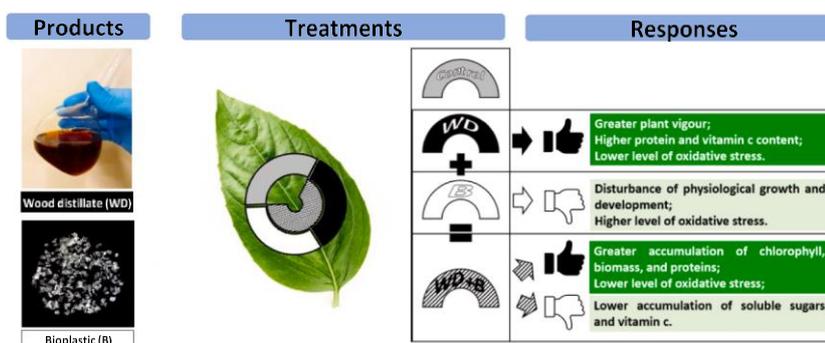
<sup>a</sup> Department of Life Sciences (DSV), University of Siena, 53100 Siena, Italy

<sup>b</sup> BAT Center - Interuniversity Center for Studies on Bioinspired Agro-Environmental Technology, University of Naples "Federico II", 80138 Naples, Italy

### IN EVIDENZA

- Primo studio ad esaminare le risposte del basilico alla combinazione fra WD e basilico
- il WD ha migliorato I valori nutrizionali (ha aumentato I livelli di protein e vitamina C) nelle parti edibili del basilico.
- L'aggiunta di bioplastica a base di amido ha ostacolato lo sviluppo fisiologico delle piante.
- Il WD ha mostrato potenzialità nel mitigare lo stress ossidativo causato dalla bioplastica.

### ABSTRACT GRAFICO



### ARTICLE INFO

Editor: Damià Barceló

#### Keywords:

Ascorbic acid  
Lipid peroxidation  
Pyroligneous acid  
Soluble sugars  
Starch-based bioplastic  
Wood vinegar

### ABSTRACT

Il crescente interesse per le bioplastiche e i prodotti di gestione delle colture a base biologica in agricoltura è guidato dagli obiettivi di sviluppo sostenibile dell'Agenda 2030. Tuttavia, recenti ricerche hanno sollevato preoccupazioni sulla sostenibilità delle bioplastiche a causa del loro potenziale impatto negativo sulla crescita e sulla resa delle colture, con implicazioni per l'ambiente e la salute umana. In questo studio, il distillato di legno (WD) è stato valutato come potenziatore naturale della crescita delle piante e del sistema di difesa per mitigare l'impatto negativo di una bioplastica a base di amido sulle piante di basilico (*Ocimum basilicum* L.). Lo studio ha analizzato i cambiamenti fisiologici e biochimici nelle piante di basilico sottoposte per 35 giorni a trattamenti singoli o combinati di WD e bioplastica misurando biomarcatori di crescita sana, come proteine solubili, zuccheri, vitamina C e malondialdeide (MDA). I risultati hanno mostrato che il WD ha favorito lo sviluppo del basilico, mentre la presenza di bioplastica lo ha ostacolato. È interessante notare che il WD non ha influenzato gli zuccheri ma ha aumentato la vitamina C del 12%, il che è considerato un effetto positivo poiché i cambiamenti nei livelli di zucchero potrebbero indicare uno stress delle piante. Al contrario, la bioplastica ha comportato una riduzione degli zuccheri (-41%) e un aumento (+17%) del livello di MDA, mentre il contenuto di vitamina C è rimasto invariato. Tuttavia, quando il WD è stato aggiunto alle piante coltivate con bioplastica, ha aumentato i livelli di tutti i parametri esaminati, ad eccezione degli zuccheri e della vitamina C, che hanno subito riduzioni (-66% e 33%, rispettivamente). Curiosamente, nonostante questa riduzione, la correlazione diretta osservata tra zucchero e contenuto di vitamina C è stata mantenuta, indicando che la diminuzione del contenuto di zucchero potrebbe aver raggiunto una soglia critica. Questo studio suggerisce che l'uso del WD ha il potenziale per alleviare gli effetti avversi della

\* Corresponding author at: DSV - Università degli Studi di Siena, Via Pier Andrea Mattioli, 4, 53100 Siena, Italy.

E-mail addresses: [silvia.celletti@unisi.it](mailto:silvia.celletti@unisi.it) (S. Celletti), [riccardo.fedeli@student.unisi.it](mailto:riccardo.fedeli@student.unisi.it) (R. Fedeli), [m.ghorbani@student.unisi.it](mailto:m.ghorbani@student.unisi.it) (M. Ghorbani), [j.aseka@student.unisi.it](mailto:j.aseka@student.unisi.it) (J.M. Aseka), [stefano.loppi@unisi.it](mailto:stefano.loppi@unisi.it) (S. Loppi).

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166484>

Received 28 March 2023; Received in revised form 20 August 2023; Accepted 20 August 2023

Available online 21 August 2023

0048-9697/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

della bioplastica sulla crescita e sullo sviluppo del basilico e sottolinea l'importanza di adottare pratiche sostenibili in agricoltura, nonché la necessità di una valutazione critica dell'impatto ambientale delle nuove tecnologie e prodotti

## 1. Introduzione

L'inquinamento da plastica è tra le principali sfide che la società umana contemporanea deve affrontare, invadendo tutti i comparti della nostra Terra: atmosfera, biosfera, litosfera e idrosfera (Rodi, 2019). Lo scenario attuale è dovuto principalmente a due ragioni. Il primo è che la domanda globale per l'utilizzo della plastica è aumentata notevolmente nel corso degli anni a partire dal 1950 (Statista, 2020; Zhao et al., 2022) e si prevede che, con l'aumento esponenziale della crescita demografica, la sua produzione raddoppierà nei prossimi 20 anni, a causa delle proprietà essenziali che contraddistinguono questo materiale (leggerezza, resistenza, costo relativamente basso e lunga durata) (Atiweh et al., 2021). Il secondo è che dei 300 milioni di tonnellate di plastica prodotte ogni anno (Rocha-Santos e Malafaia, 2022), solo una parte viene riciclata (in Europa i tassi di riciclo sono intorno al 30%) e la maggior parte viene invece accumulata nelle discariche, generando enormi cumuli di rifiuti, o finiscono negli inceneritori, che potrebbero essere un utile percorso da implementare per il recupero energetico se gli impianti di combustione fossero gestiti correttamente (Barnes et al., 2009). Inoltre, è bene sottolineare che la plastica è tossica per i sistemi naturali, agricoli e per la salute umana, essendo un polimero artificiale derivato da fonti energetiche non rinnovabili, come il petrolio, ed è inoltre persistente e difficilmente biodegradabile, rimanendo nell'ambiente per centinaia o addirittura migliaia di anni (Müller et al., 2012). Per questi motivi, le recenti politiche governative (Obiettivi di sviluppo sostenibile delle Nazioni Unite), focalizzate sulla preservazione della vita dell'ecosistema e sulla diminuzione dell'inquinamento da plastica, stanno spingendo la ricerca verso la produzione di materiali "verdi", cioè sostenibili, rinnovabili e rispettosi dell'ambiente nella lavorazione e nel consumo. Tra questi, le bioplastiche sono materiali polimerici molto apprezzati poiché condividono le caratteristiche favorevoli delle plastiche convenzionali, come convenienza, leggerezza e adattabilità. Tuttavia, a differenza della plastica convenzionale, che proviene da fonti fossili, la bioplastica può provenire da materiali rinnovabili (a base biologica) o da materiali che subiscono una degradazione naturale (biodegradabile), o da entrambi (Zimmermann et al., 2020; Vijayalakshmi et al., 2022). In vista della transizione ecologica, si stima che la produzione globale di bioplastiche aumenterà da circa 2,4 milioni di tonnellate nel 2021 a 7,5 milioni di tonnellate nel 2026 (European Bioplastics, 2022). Le bioplastiche a base di amido sono sia a base biologica che biodegradabili e tra le più utilizzate, rappresentando circa il 50% della quota di mercato di tutte le bioplastiche prodotte (Marichelvam et al., 2019). Questo tipo di bioplastica trova applicazioni in una varietà di settori, tra cui l'imballaggio alimentare, il settore medico e biomedico (Parisi et al., 2015) e l'agricoltura (ad esempio, per produrre teli di pacciamatura, tecnologie di fissaggio, vasi per piante e aste per lo spargimento di fertilizzanti) (Colzi et al., 2022; Bioplastica europea, 2021). La ricerca è stata a lungo dedicata alla ricerca di teli di pacciamatura da utilizzare in agricoltura che abbiano prestazioni simili alle plastiche convenzionali, ma si degradino in pochi mesi senza la necessità di rimuoverli dal campo alla fine del ciclo colturale (Kijchavengkul et al., 2008). Tuttavia, poco è stato indagato sulle possibili minacce poste dall'uso massiccio e crescente di bioplastiche, in quanto miniaturizzate e degradate, sulle specie coltivate e sul possibile accumulo di additivi contenuti nelle bioplastiche nei prodotti alimentari e, di conseguenza, sui loro possibili effetti sull'uomo. salute (Brizga et al., 2020). Solo recentemente l'attenzione è stata rivolta ad indagare il possibile impatto del nascente utilizzo delle bioplastiche negli agroecosistemi; a questo proposito, i risultati scientifici ottenuti sono piuttosto divergenti (Abe et al., 2022; Huerta-Lwanga et al., 2021; Liwarska-Bizukojc, 2021) e alcuni di questi studi hanno osservato solo effetti tossici sulla crescita delle colture (Brown et al., 2023; Celletti et al., 2023; Meng et al., 2021; Qi et al., 2018; Wang et al., 2022; Zhou et al., 2023).

L'attuale transizione ecologica sta spingendo all'utilizzo in agricoltura di biostimolanti e corroboranti, che migliorano la crescita delle piante e aumentano la resistenza delle colture contro gli agenti patogeni, con il requisito fondamentale che siano di origine naturale, ottenuti da scarti agricoli, e, quindi, abbiano un basso impatto ambientale in una prospettiva di economia circolare e di efficienza delle risorse. Tra la vastità di prodotti naturali utilizzati in campo agricolo, il distillato di legno (WD – noto anche come aceto di legno o acido piroligneo) merita un'attenzione particolare come corroborante innovativo, grazie ai significativi effetti positivi della sua applicazione sulla performance e sulla resa delle colture (Fedeli et al., 2023c; Fedeli et al., 2022; Ofoe et al., 2022; Mungkunkamchao et al., 2013); inoltre possiede caratteristiche di biodegradabilità e non altera la vitalità degli organismi del suolo non bersaglio (Hagner et al., 2010) e dei bioindicatori sensibili (es. licheni e muschi), per cui il suo utilizzo è considerato assolutamente sicuro per l'ambiente. Secondo la legislazione italiana (D.M. n. 6793/, 2018), la WD è stata recentemente inclusa nell'elenco dei prodotti agricoli, che possono essere utilizzati anche in agricoltura biologica. Più nel dettaglio, il WD è un liquido brunastro, contenente >300 molecole bioattive (Wei et al., 2010a, 2010b), ottenuto da scarti di biomassa vegetale raffreddando e ricondensando i gas esausti rilasciati durante la pirolisi a fini energetici (Yargicoglu et al., 2015; Grewal et al., 2018). Attualmente, questo prodotto è effettivamente utilizzato in condizioni di campo mediante fertirrigazione del suolo (dove le piante assorbono molecole solo dalle radici) e irrorazione fogliare (dove le piante assorbono molecole principalmente dalle foglie, ma anche dalle radici) (Fedeli et al., 2022; Mungkunkam - Chao et al., 2013).

Gli effetti benefici sulle piante sono principalmente attribuibili alla presenza di antiossidanti e fitochimici stimolanti la crescita ad azione ormono-simile (es. polifenoli, flavonoidi, tannini, acidi organici, alcani, alcoli ed esteri) in grado di migliorare l'assimilazione dei nutrienti (Mu et al., 2006; Wei et al., 2010a, 2010b; Zulkarami et al., 2011). Inoltre, queste molecole svolgono anche un ruolo importante nel preservare la salute delle piante coltivate, proteggendole dagli attacchi degli agenti patogeni e sopprimendo le erbe infestanti (Mourant et al., 2005; Ratanapisit et al., 2009). Il distillato di legno è anche particolarmente apprezzato in agricoltura per i suoi effetti benefici sulla qualità e sulla fertilità del suolo (Shibayama et al., 1998; Tsuzuki et al., 2000), come ad esempio l'aumento della disponibilità e dell'apporto di importanti nutrienti del suolo. (Jeong et al., 2015; Pan et al., 2017; Polthanee et al., 2015) e migliorando le attività biochimiche del suolo (Cardelli et al., 2020), con rese agricole positive. In questo contesto, sulla base dei risultati ottenuti nel nostro recente studio (Celletti et al., 2023), che ha evidenziato che un accumulo del 2,5% (p/p) di bioplastica a base di amido nel suolo comporterebbe effetti deleteri sul basilico (*Ocimum basilicum* L.) sulla crescita delle piante e considerati i numerosi effetti positivi che il trattamento WD apporta al funzionamento delle piante, questo è il primo studio volto ad analizzare le variazioni dei parametri fisiologici e biochimici delle piante di basilico soggette a coltivazione con WD da solo o in combinazione con bioplastiche e con sola bioplastica, al fine di verificare se la WD potrebbe mitigare lo stress indotto dalla bioplastica nel basilico.

## 1. Materiali e metodi

### 2.1 Bioplastica

I piccoli pezzi di bioplastica sono stati ottenuti dal film bioplastico biodegradabile e di origine biologica preparato seguendo la procedura descritta in Celletti et al. (2023). In breve, la quantità desiderata di bioplastica è stata ottenuta da una dose base composta da 1,5 g di amido di mais in polvere, 10 mL di acqua distillata, 1,5 g di glicerolo e 1 mL di acido acetico glaciale. La miscela lattiginosa risultante è stata agitata continuamente con una bacchetta di vetro su una piastra riscaldata a 85 °C finché non si è addensata ed è diventata più chiara. Innanzitutto, la pasta morbida calda è stata stesa su una lastra di vetro e indurita in forno a 100 °C per 1 ora. E' stato poi lasciato asciugare per una settimana a temperatura ambiente. Infine, il film bioplastico è stato rimosso manualmente dalla piastra e tagliato con le forbici in piccoli pezzi di lunghezza uniforme (circa 5 mm) da aggiungere al terreno. con una bacchetta di vetro su piastra riscaldata a 85 °C finché non si sarà addensata e diventata più chiara. Innanzitutto, la pasta morbida calda è stata stesa su una lastra di vetro e indurita in forno a 100 °C per 1 ora. Successivamente è stato lasciato asciugare completamente per una settimana a temperatura ambiente. Infine, il film bioplastico è stato rimosso manualmente dalla piastra e tagliato con le forbici in piccoli pezzi di lunghezza uniforme (circa 5 mm) da aggiungere al terreno.

### 2.2 Condizioni di crescita delle piante

I semi di basilico (*Ocimum basilicum* L., cv. Riviera Ligure) sono stati imbibiti in acqua distillata per 1 ora, seminati tra strati di carta bagnata in un vasoio verticale e lasciati germinare per 6 giorni a 22 °C al buio. Successivamente, piantine uniformi sono state trapiantate in vasi di vetro (3 piantine/vaso), ricoperti con un foglio di alluminio, contenenti 80 g di terreno colturale commerciale (VigorPlant Italia srl). Quest'ultima era una miscela di torba acida, ammendante organico non compostato, pomice, perlite, concime organico e presentava le seguenti caratteristiche: 43% di umidità; 92% di porosità;  $5,30 \pm 0,03$  di pH(H<sub>2</sub>O:1:20, p/v);  $1,12 \pm 0,01$  mS cm<sup>-1</sup> di conduttività elettrica [EC(H<sub>2</sub>O:1:20, w/v)];  $56,89 \pm 2,67$  meq 100 gDW<sup>-1</sup> di capacità di scambio cationico (CEC). Il disegno sperimentale consisteva in quattro trattamenti con 8 repliche ciascuno: controllo (C), senza fertirrigazione e bioplastica; fertirrigazione (WD), con 0,5 % (v/v) di distillato di legno e senza bioplastica; bioplastica (B), con il 2,5% (p/p) di bioplastica e senza fertirrigazione; bioplastica e fertirrigazione (B + WD), con 2,5 % (p/p) di bioplastica e 0,5 % (v/v) di distillato di legno.

Il WD è stato fornito da BioDea® (Arezzo, Italia) e ottenuta dalla linfa della castagna dolce (*Castanea sativa* Mill., 1768) distillata a vapore corrente durante la gassificazione. Le sue principali caratteristiche fisico-chimiche sono elencate nella Tabella 1.

Inizialmente i vasi sono stati irrigati fino al 60% della capacità di ritenzione idrica. Durante il periodo di crescita, questa condizione del terreno è stata mantenuta pesando ogni vaso quotidianamente e aggiungendo acqua quando necessario. Per il trattamento WD, 0,5% (v/v) La WD è stata aggiunta al terreno una volta alla settimana, invece dell'irrigazione standard, per 4 settimane. Il dosaggio dell'WD fornito in fertirrigazione è stato scelto secondo le raccomandazioni del produttore (BioDea®, Arezzo, Italia), mentre quello della bioplastica (2,5 %, p/p) è stato stabilito alla luce del previsto forte incremento nell'uso di bioplastiche in agricoltura nel prossimo futuro guidato dalla transizione ecologica (Celletti et al., 2023). Dal trapianto, le piante sono state coltivate in una camera climatica con fotoperiodo di 16/8 ore, temperatura di 25/20 °C (giorno/notte), intensità della luce di 250 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PAR e umidità relativa del 70%. All'11° giorno dal trapianto era rimasta una sola pianta per vaso. Durante il periodo di crescita sperimentale, i vasi sono stati ruotati e spostati casualmente ogni giorno per ridurre al minimo ogni possibile influenza delle condizioni microclimatiche all'interno della camera climatica. Dopo 35 giorni di crescita, le piante sono state raccolte e valutate come descritto di seguito.

### 2.3 Indici di biomassa superficiale e contenuto di clorofilla totale

Al momento della raccolta è stata misurata l'altezza di ciascuna pianta considerando la distanza tra la superficie del suolo e l'apice della pianta, è stato contato il numero di foglie, la biomassa fresca dei germogli è stata pesata e poi immediatamente conservata in congelatore a -20 °C fino alle analisi. Il contenuto totale di clorofilla per unità di area è stato determinato nelle foglie attaccate delle piante di basilico utilizzando un misuratore di clorofilla portatile, modello CCM - 300 (Chlorophyll Content Meter). Sono state effettuate dodici misurazioni sulle due foglie più giovani completamente espanse (sei misurazioni/foglia), evitando la nervatura centrale, e ne è stata calcolata la media per ciascuna pianta (Fedeli et al., 2023a).

### 2.4 Contenuto totale di proteine e zuccheri solubili

La determinazione del contenuto totale sia di proteine solubili che di zuccheri solubili (dati dalla somma di fruttosio, glucosio e saccarosio) è stata effettuata negli estratti di germogli di basilico secondo Celletti et al. In breve, il tessuto congelato è stato omogeneizzato (ULTRA-TURRAX® – T 10 basic, Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germania) in acqua distillata in un rapporto di 1:6 (p/v) e quindi centrifugato (centrifuga PK110, Alc International S.r.l., Cologno Monzese, MI, Italia) a 3000 giri/min per 5 min. I surnatanti sono stati raccolti e centrifugati (Z 233 MK-2, Hermle, LaborTechnik GmbH, Wehingen, Germania) a 12000 giri al minuto per 7 minuti per ottenere gli estratti.

Il contenuto proteico è stato determinato negli estratti secondo il metodo Bradford (1976), utilizzando come standard l'albumina sierica bovina (BSA), leggendo l'assorbanza dei campioni a 595 nm (spettrofotometro UV-Vis - 8453, Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Il contenuto di zucchero è stato determinato negli estratti, che sono stati filtrati (dimensione dei pori di 45 μm, diametro di 25 mm, filtri per siringa CA, Lab Logistic Group GmbH, Meckenheim, Germania), completamente essiccati sotto vuoto a 40 °C e risospesi in 30 μL di acqua distillata. Questo volume è stato inserito nell'HPLC (sistema 600E, Waters, Milford, MA, USA). Gli zuccheri sono stati separati utilizzando una colonna a scambio ionico (10 μm, 300x6,5 mm, Sugar-Pak I, Waters, Milford, MA, USA), mantenuta costantemente a 90 °C tramite un controller di temperatura esterno (Column Heater Module, Waters, Milford, MA, USA) e acqua distillata come fase mobile a una portata di 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Per la rilevazione degli zuccheri, l'HPLC è stata dotata di un rilevatore dell'indice di rifrazione (2410 RI, Waters, Milford, MA, USA). Gli standard per ciascun analita sono stati preparati come soluzioni madre individuali, utilizzando composti analitici di grado reagente zuccherino (D-fruttosio, α-D-glucosio, saccarosio, Merk KGaA, Darmstadt, Germania).

## 2.5 Contenuto di acido ascorbico

Il contenuto di acido L-ascorbico (vitamina C) è stato determinato nei germogli di piante di basilico, seguendo il metodo riportato in Celletti et al. (2023). In breve, 0,2 g di tessuto congelato sono stati omogeneizzati con 0,8 mL di TCA al 10% (p/v), utilizzando un ULTRA-TURRAX® (T 10 basic, Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germania). Gli omogenati sono stati filtrati su garza e, prima della centrifugazione (3000 giri per 5 minuti), sono stati mantenuti per 5 minuti in un bagno di ghiaccio. Un'aliquota (0,4 mL) di surnatante limpido è stata diluita con acqua distillata in un rapporto di 1:4 (v/v). Infine, ai campioni diluiti sono stati aggiunti 0,2 mL di reagente Folin – Ciocalteu 0,2 M (Carlo Erba, Cornaredo, MI, Italia). Sono stati agitati vigorosamente e mantenuti per 10 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, l'assorbanza è stata misurata a 760 nm utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis (8453, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Il contenuto di acido ascorbico è stato stimato utilizzando la curva di calibrazione preparata prelevando 0,05–0,2 mL di soluzione madre di acido ascorbico (BioXtra, >99,0%, cristallina) (100 µg mL<sup>-1</sup>).

## 2.6 Livello di perossidazione lipidica

Il livello di perossidazione lipidica è stato stimato secondo Fedeli et al. (2023b) ed espresso come contenuto di malondialdeide (MDA), poiché la MDA è considerata un biomarker del danno ossidativo, essendo un metabolita altamente reattivo prodotto dalla degradazione dei PUFA (acidi grassi polinsaturi) perossidati. In breve, 0,5 g di germogli congelati di piante di basilico sono stati omogeneizzati in 5 mL di reagente pre-raffreddato precedentemente preparato sciogliendo lo 0,25% (p/v) di acido 2-tiobarbiturico (TBA) in 10% (p/v) di TCA. Dopo l'incubazione a 95 °C per 30 minuti, la reazione è stata interrotta raffreddando i campioni su ghiaccio. Successivamente, i campioni sono stati centrifugati a 5000 giri al minuto per 20 minuti e l'assorbanza è stata misurata nei surnatanti a 532 nm e 600 nm (spettrofotometro UV-Vis 8453, Agilent, Santa Clara, CA, USA). La correzione per la torbidità non specifica è stata ottenuta sottraendo il valore di assorbanza misurato a 600 nm. Il livello di perossidazione lipidica è stato calcolato utilizzando un coefficiente di estinzione molare (155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) del complesso MDA – TBA formato.

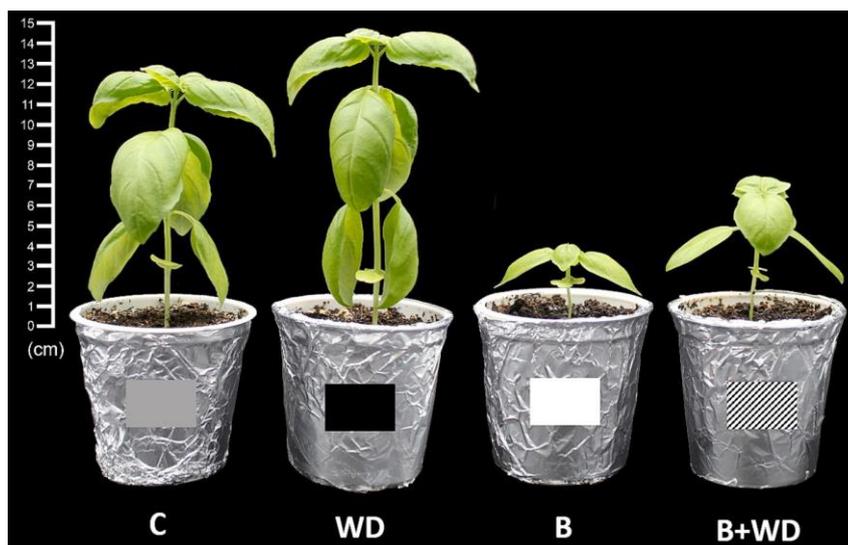
## 2.7 Analisi statistica

La normalità dei dati è stata verificata con il test di Shapiro-Wilk. I dati sono presentati come media di 8 repliche biologiche con errore standard eseguite in triplicato. Tutti i risultati sono stati sottoposti ad ANOVA unidirezionale e LSD come test posthoc ( $p < 0,05$ ), utilizzando il software CoStat versione 6.45 (CoHort, Barkeley, CA, USA).

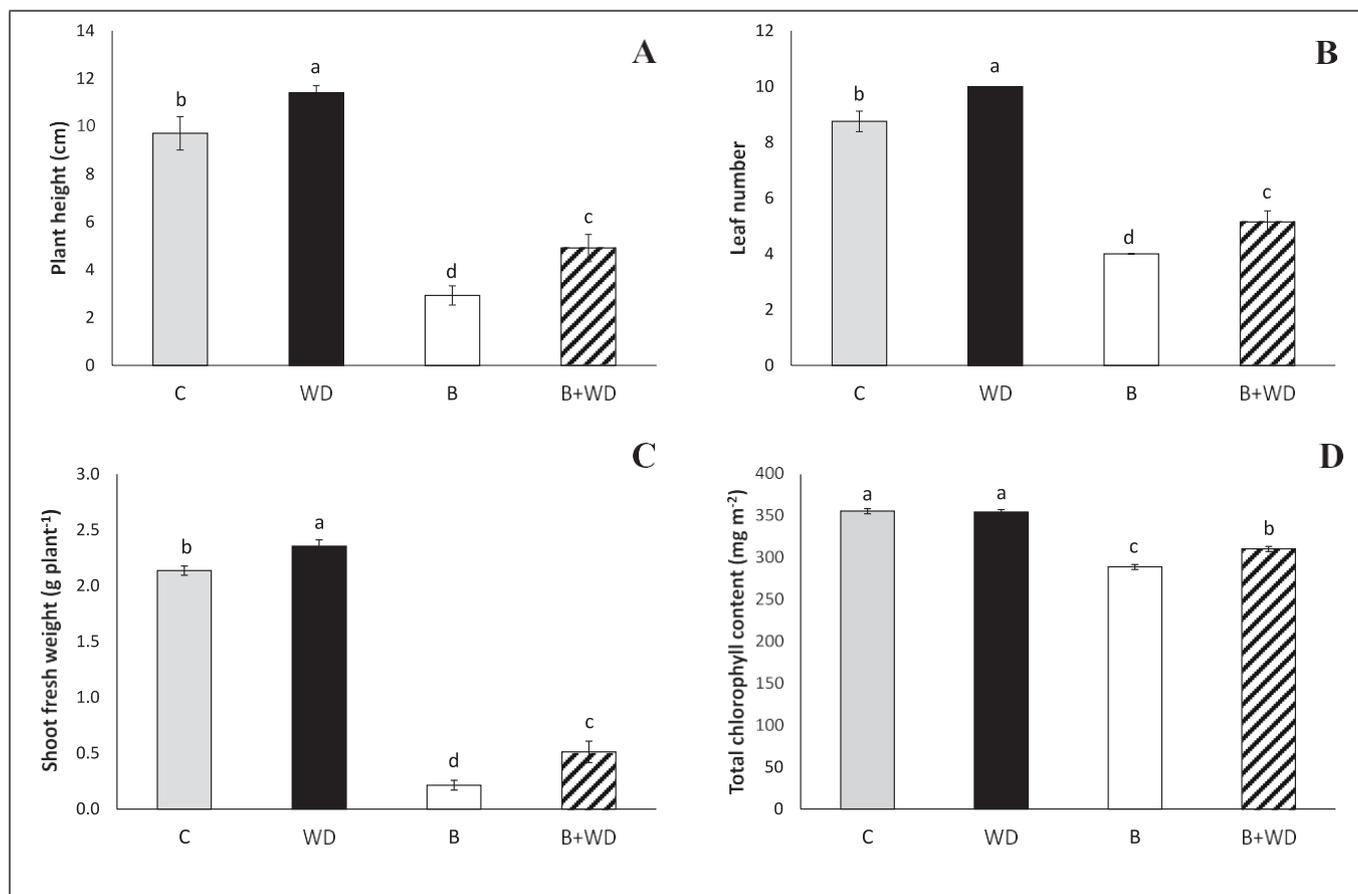
## 2. Risultati

### 2.1. Parametri di crescita e vegetazione

Al termine del periodo di crescita sperimentale, le piante di basilico dei 4 trattamenti mostravano visivamente fasi di sviluppo diverse (Fig. 1). L'andamento dei trattamenti è stato lo stesso in tutti e tre i parametri biometrici analizzati (altezza della pianta, numero di foglie e peso fresco dei germogli) (Fig. 2A, B e C, rispettivamente), con le piante fertirrigate con WD che hanno mostrato il valore più alto valori, seguiti da piante C > piante B trattate con WD > piante trattate con B. Nello specifico, l'altezza delle piante WD, il numero di foglie e la biomassa fuori terra erano superiori del 17% (Fig. 2A), del 14% (Fig. 2B) e del 10% (Fig. 2C) rispetto ai relativi controlli (piante C). Le piante B hanno mostrato una riduzione dell'altezza della pianta del 70% (Fig. 2A), del numero di foglie di quasi la metà (54%, Fig. 2B) e del peso fresco dei germogli del 90% (Fig. 2C) rispetto alle corrispondenti piante C. Questi parametri sono stati significativamente meno influenzati dal trattamento combinato (B WD), che ha causato riduzioni inferiori rispetto al solo trattamento B in termini di altezza della pianta (49 %, Fig. 2A), numero di foglie (41 %, Fig. 2B) e peso fresco (76%, Fig. 2C), rispetto ai relativi controlli. Infatti, confrontando i trattamenti B e B WD, si può riscontrare che l'altezza della pianta, il numero di foglie e il peso fresco dei germogli sono aumentati rispettivamente del 68% (Fig. 2A), 29% (Fig. 2B), e 117% (Fig. 2C).



**Fig. 1.** Differenze visive nello stadio di sviluppo delle piante di basilico coltivate nel terreno per 35 giorni con i 4 diversi trattamenti: C = controllo; WD = fertirrigazione con 0,5 % (v/v) di distillato di legno; B = 2,5% (p/p) di bioplastica mescolata con terra; B + WD = 2,5 % (p/p) bioplastica mescolata con terreno con fertirrigazione con 0,5 % (v/v) distillato di legno..



**Fig. 2.** Cambiamenti nell'altezza (A), nel numero delle foglie (B), nel peso fresco dei germogli (C) e nel contenuto totale di clorofilla fogliare (D) delle piante di basilico coltivate nel terreno per 35 giorni sotto i quattro diversi trattamenti: C = controllo; WD = fertirrigazione con 0,5 % (v/v) di distillato di legno; B = 2,5% (p/p) di bioplastica mescolata con terra; B + WD = 2,5 % (p/p) bioplastica mescolata con terreno accoppiato con fertirrigazione con 0,5 % (v/v) distillato di legno. I dati sono presentati come media  $\pm$  SE. Lettere diverse indicano la significatività statistica tra i quattro diversi trattamenti secondo l'ANOVA unidirezionale seguita dal test LSD con  $p < 0,05$ .

I cambiamenti nel contenuto totale di clorofilla nelle foglie delle piante di basilico sono mostrati in Fig. 2D; anche questo parametro fisiologico ha seguito un andamento simile a quello dei parametri biometrici. Unica eccezione sono state le piante fertigate con WD, che non differivano significativamente dalle piante C, raggiungendo valori intorno a 350 mg di clorofilla  $m^{-2}$ ; mentre il contenuto di clorofilla è diminuito del 19% quando le piante sono state coltivate solo con bioplastica (B vs. C). Sebbene nelle piante esposte al trattamento combinato la riduzione del contenuto di clorofilla fosse ancora significativamente evidente (13%, B WD vs. C), queste piante hanno comunque mostrato un aumento del 7% rispetto al trattamento con sola bioplastica (B + WD vs. B) (Fig. 2D).

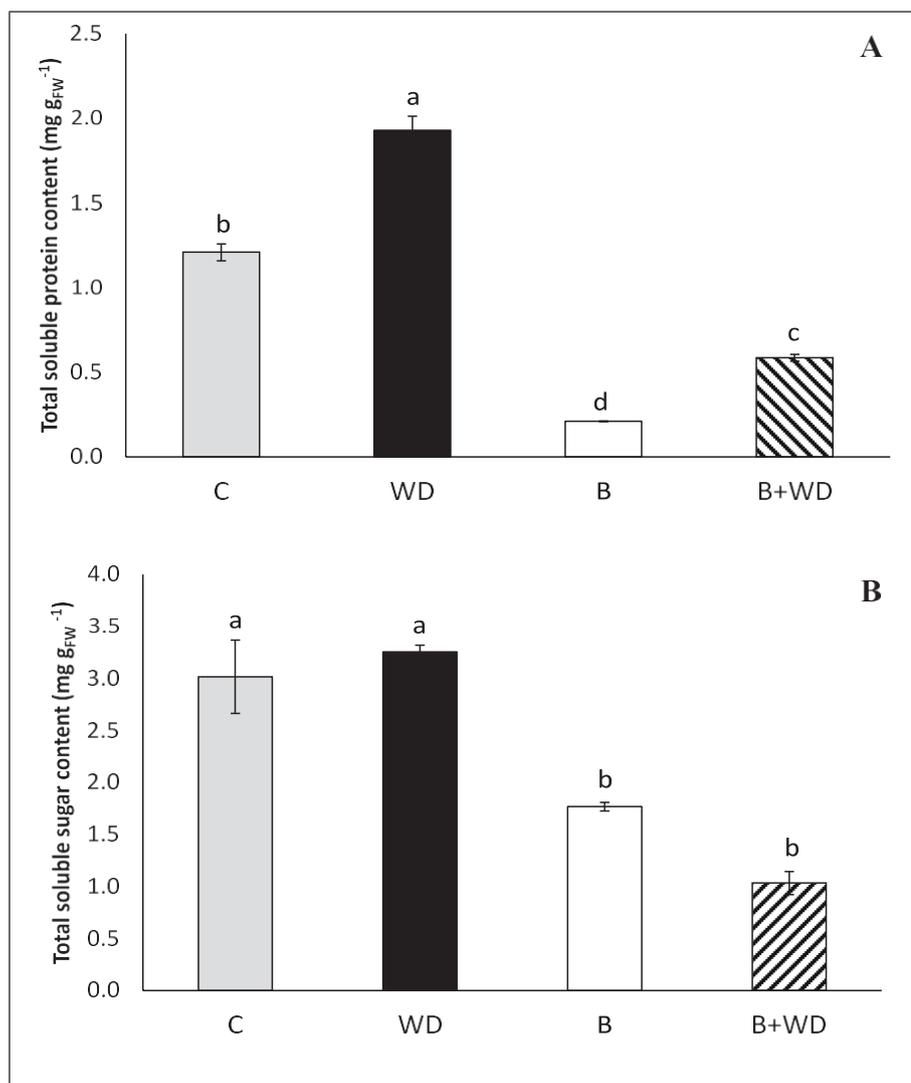
## 2.2. Contenuto di Macromolecole

Il trattamento con WD ha promosso un aumento del contenuto proteico totale solubile nei germogli delle piante di basilico superiore al 50% rispetto a quello nei germogli delle piante C (Fig. 3A). Un risultato inverso è stato osservato quando le piante di basilico sono state coltivate solo con bioplastica, indipendentemente dalla presenza di WD. È interessante notare che il trattamento con la sola bioplastica ha ridotto il contenuto proteico in modo molto più forte (83%) rispetto a quando la bioplastica è stata combinata con la fertirrigazione (52%) rispetto a C. L'aggiunta di WD alla bioplastica trattata con B le piante hanno aumentato notevolmente (179%) il contenuto proteico a livello dei germogli (B+WD vs. B) (Fig. 3A).

## 2.3. La Fig. 3B mostra il contenuto totale di zuccheri solubili nei germogli, dato dalla somma del contenuto di fruttosio, glucosio e

saccarosio. Non sono state osservate differenze significative per questo parametro tra i trattamenti WD e C, raggiungendo valori rispettivamente di 3,254 e 3,016 mg  $g^{-1}$  FW. Al contrario, la presenza di bioplastica ha ridotto il contenuto totale di zuccheri solubili, indipendentemente dalla presenza o assenza di WD. In particolare, il trattamento con sola bioplastica lo ha ridotto del 41%, mentre in questo caso è stata la combinazione di bioplastica con fertirrigazione WD a far registrare la riduzione maggiore (66%), rispetto al contenuto di zuccheri analizzato nei germogli C. (Fig. 3B). Sebbene non siano stati evidenti cambiamenti significativi tra le piante B integrate con WD (trattamento B WD) rispetto alle piante trattate con la sola bioplastica (trattamento B), è possibile rilevare una forte diminuzione percentuale (-42%) (Fig. 3B). *Contenuto dei biomarcatori*

Un aumento (12%) del contenuto di acido ascorbico è stato osservato nei germogli con WD rispetto a C (Fig. 4A). D'altra parte, le piante trattate con B non differivano statisticamente dalle piante C in questo parametro. Solo quando le piante sono state sottoposte contemporaneamente al trattamento B e WD, l'accumulo di acido ascorbico è stato ridotto (33%), rispetto a quello determinato nei germogli C. Confrontando il trattamento combinato (B WD) con B, la riduzione è stata del 27% (Fig. 4A). Il più alto livello di perossidazione lipidica della membrana cellulare (stimato come contenuto di MDA) è stato osservato nei germogli di piante di basilico coltivate in presenza di bioplastica (trattamento B), che è aumentato del 17% rispetto alle piante trattate con C. (Fig. 4B). La fertirrigazione con WD ha ridotto il contenuto di MDA del 9% per il trattamento WD e del 17% per il trattamento B+WD rispetto al C. Inoltre, non erano evidenti differenze significative nel contenuto di MDA tra i trattamenti WD e B+WD, mostrando valori intorno a 0,6  $\mu g$   $g^{-1}$  FW.



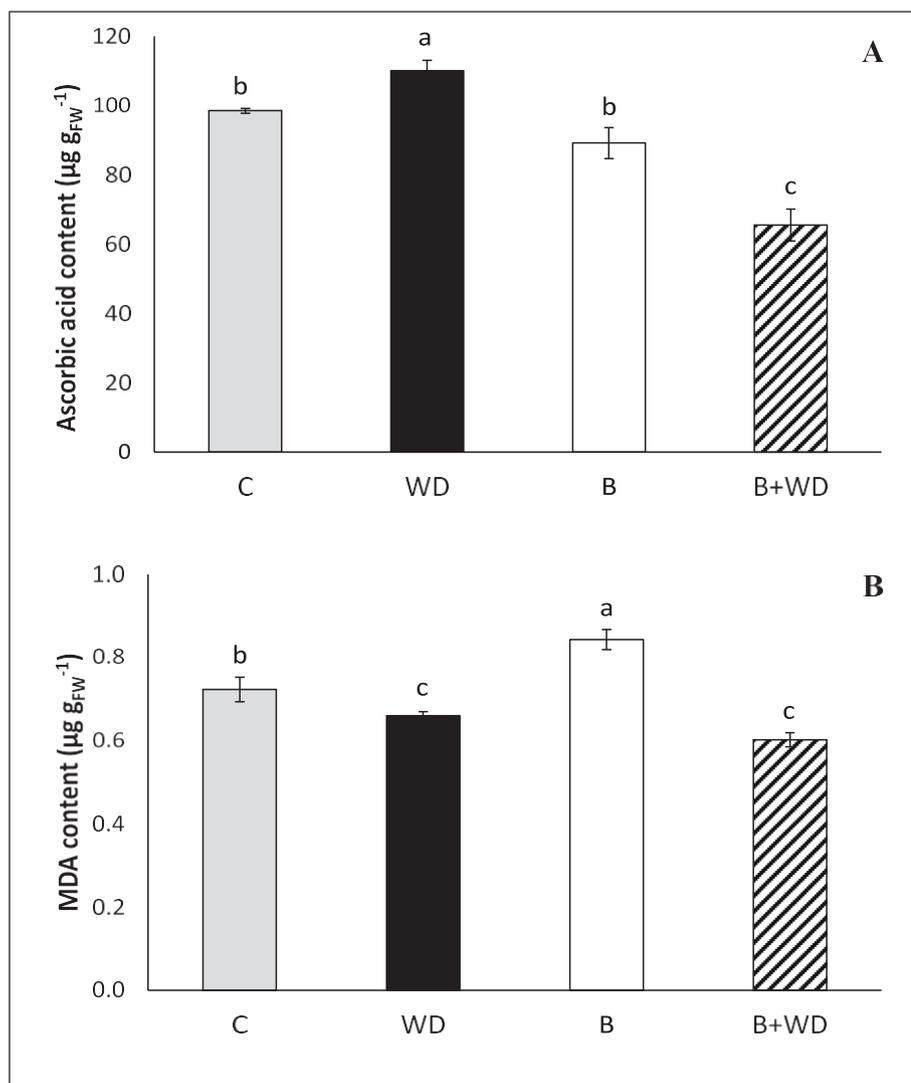
**Fig. 3.** Cambiamenti nel contenuto totale di proteine solubili (A) e zuccheri solubili (dati dalla somma del contenuto di fruttosio, glucosio e saccarosio) (B), determinati nei germogli di piante di basilico coltivate nel terreno per 35 giorni sotto i quattro diversi trattamenti : C = controllo; WD = fertirrigazione con 0,5 % (v/v) di distillato di legno; B = 2,5% (p/p) di bioplastica mescolata con terra; B + WD = 2,5 % (p/p) bioplastica miscelata con terreno accoppiato con fertirrigazione con 0,5 % (v/v) distillato di legno. I dati sono presentati come media  $\pm$  SE. Lettere diverse indicano la significatività statistica tra i quattro diversi trattamenti secondo l'ANOVA unidirezionale seguita dal test LSD con  $p < 0,05$

La combinazione di WD con bioplastica (B+WD) ha comportato una riduzione del 29% rispetto alle piante trattate con B (Fig. 4B).

### 3. Discussione

I risultati confermano la nota azione biostimolante del WD sulla crescita e sullo sviluppo delle piante. Numerose evidenze scientifiche, infatti, hanno ampiamente discusso gli effetti benefici del WD sulla crescita di varie piante come, ad esempio, riso (Berahim et al., 2014), pomodoro (Mungkumchao et al., 2013), lattuga, colza e cetriolo (Mu et al., 2006). Inoltre, i nostri risultati supportano alcune ricerche scientifiche molto recenti riguardanti l'impatto delle bioplastiche sulla crescita delle colture. Gli effetti benefici del WD sono in gran parte attribuibili alla sua ricchezza di molecole organiche (in particolare acidi organici e polifenoli) che promuovono vari processi di sviluppo delle piante, tra cui l'induzione della rete ormonale vegetale e la fotosintesi. Al contrario, non sono ancora noti i composti specifici all'interno della bioplastica responsabili degli effetti negativi osservati sulla crescita delle piante, così come il modo in cui interferiscono con le funzioni delle piante. Sebbene i meccanismi d'azione del WD rimangano poco chiari, la letteratura esistente supporta l'idea che l'aumento della crescita delle piante osservato con i trattamenti con WD potrebbe essere dovuto all'azione sinergica di diverse molecole bioattive nel WD che migliorano la crescita delle piante in un senso più ampio, ma anche ad un maggiore apporto di nutrienti, essendo il WD

ricco di nutrienti, in particolare calcio, tra i macronutrienti e ferro (Fe), tra i micronutrienti. Questo effetto è apparso anche nel nostro esperimento quando il WD è stata combinato con la bioplastica. In questo caso il WD è riuscito ad attenuare significativamente l'effetto inibitore della crescita della bioplastica e quindi a favorire la produzione di biomassa fogliare, anche se non ha consentito di raggiungere i livelli di controllo almeno con il dosaggio testato. Nel nostro caso, l'aggiunta di WD non ha comportato alcun cambiamento nel contenuto di clorofilla, sebbene molti studi abbiano rivelato che le applicazioni di WD hanno aumentato il contenuto di clorofilla in diverse piante coltivate come, ad esempio, la lattuga (Vannini et al., 2021), senape (Benzon e Lee, 2017) e riso (Theerakulpisut et al., 2017; Berahim et al., 2014). Al contrario, la presenza della bioplastica ha comportato un forte calo del contenuto di clorofilla, in linea con una riduzione della crescita e del contenuto proteico di queste piante, poiché la clorofilla è una molecola contenente azoto (N) e N è una parte importante dei composti che la compongono. regolano la crescita e la struttura delle piante ed è l'elemento caratterizzante delle proteine (Wen et al., 2019). È importante notare che l'effetto benefico del WD nel migliorare il contenuto di clorofilla era evidente quando veniva applicato al terreno delle piante coltivate con la bioplastica. Quando le piante sono esposte a condizioni di stress, come la presenza di bioplastica, le attività degli enzimi responsabili della biosintesi della clorofilla potrebbero essere compromesse, presumibilmente perché la bioplastica potrebbe aver interferito negativamente con il sistema radicale, portando a un ridotto assorbimento di nutrienti e innescando stress nutrizionale nelle piante.



**Fig. 4.** Variazioni del contenuto di acido ascorbico (vitamina C) (A) e malondialdeide (MDA) (B), determinate nei germogli di piante di basilico coltivate nel terreno per 35 giorni sotto i quattro diversi trattamenti: C = controllo; WD = fertirrigazione con 0,5 % (v/v) di distillato di legno; B = 2,5% (p/p) di bioplastica mescolata con terra; B + WD = 2,5 % (p/p) bioplastica miscelata con terreno accoppiato con fertirrigazione con 0,5 % (v/v) distillato di legno. I dati sono presentati come media  $\pm$  SE. Lettere diverse indicano la significatività statistica tra i quattro diversi trattamenti secondo l'ANOVA unidirezionale seguita dal test LSD con  $p < 0,05$ .

Tra i nutrienti interessati, il Fe riveste particolare importanza poiché è coinvolto nella sintesi della clorofilla e funziona come componente di vari enzimi (tra cui catalasi, perossidasi, citocromo ossidasi, ferredoxina e flavoproteine), che partecipano alle reazioni redox della fotosintesi. L'effetto del WD sul contenuto totale di proteine solubili differiva dall'effetto osservato sul contenuto di clorofilla; tuttavia, somigliava alla risposta osservata nei parametri relativi alla crescita delle piante. Questa discrepanza può essere attribuita al duplice ruolo di molte proteine vegetali, che non solo partecipano alle reazioni enzimatiche, compreso il processo di biosintesi della clorofilla, ma svolgono anche un ruolo significativo ruolo strutturale e funzionale, agendo come macromolecole biologiche essenziali per la sopravvivenza di tutti gli organismi viventi, comprese le piante. In effetti, il contenuto proteico misurato nei germogli delle piante di basilico che avevano ricevuto WD era quasi il doppio di quello delle piante di controllo, in linea con i risultati riportati nella colza (Zhu et al., 2021), tabacco (Mao et al., 2019) e riso (Simma et al., 2017), che hanno mostrato un miglioramento della crescita delle piante. Il fatto che la bioplastica abbia abbassato il contenuto proteico e che molte proteine abbiano la caratteristica di essere catalizzatori biologici suggerisce che la bioplastica potrebbe aver ostacolato alcune reazioni enzimatiche vitali per il metabolismo vegetale, come ipotizzato da Celletti et al. (2023). Tra i vari parametri associati alla crescita delle piante, è stato osservato che il peso fresco dei germogli mostrava la più vicina somiglianza con il contenuto proteico in termini di grado di riduzione causata dalla

presenza di bioplastica e di recupero da parte di piante coltivate con bioplastica insieme all'aggiunta di WD. Questa scoperta supporta l'ipotesi precedentemente espressa secondo cui, in condizioni di crescita favorevoli, esiste una corrispondenza diretta tra un aumento dell'accumulo di proteine, una migliore struttura della pianta e, di conseguenza, una biomassa più elevata, come indicato dal peso fresco. Considerando che gli zuccheri fungono anche da molecole segnale e la loro biosintesi viene potenziata quando i fattori ambientali non sono benefici per la sopravvivenza delle piante. Al contrario, la risposta della pianta al trattamento con bioplastica ha comportato una significativa riduzione del contenuto di zuccheri solubili nei germogli. Questo potrebbe essere l'effetto della rimozione degli zuccheri, accumulati dallo stress nutrizionale, per evitare l'inibizione della fotosintesi. Il meccanismo di segnalazione mediato dallo zucchero nelle piante è costoso in termini di energia metabolica. Se le piante B avessero destinato una parte sostanziale della loro energia all'aumento della sintesi degli zuccheri, ciò sarebbe stato dannoso per la loro sopravvivenza complessiva. Questo rappresenta un esempio di risposte di risparmio energetico che sono cruciali per l'adattamento allo stress. Nel caso del trattamento combinato (B WD), l'effetto negativo della bioplastica ha superato l'effetto benefico del WD. Si è quindi verificata un'ulteriore riduzione del contenuto di zucchero nei germogli di queste piante, che è stata ancora più pronunciata rispetto alle piante B. Lo stesso effetto è stato osservato per il contenuto di acido ascorbico, un potente antiossidante nelle piante, se si considera il trattamento combinato. La diminuzione del

livello di vitamina C osservata nel trattamento B+WD potrebbe essere attribuita al fatto che il livello di zucchero in queste piante è sceso al di sotto di un limite critico (circa 1 mg g<sup>-1</sup> FW), che ha poi portato ad un calo dei livelli di vitamina C. Contenuto di C, poiché la vitamina C è biosintetizzata da monosaccaridi esosi come fruttosio e glucosio. Al contrario, la sola applicazione del WD è stata in grado di aumentare il livello di vitamina C endogena nei germogli delle piante di basilico. Si può dedurre che il WD, che contiene quantità sostanziali di altri composti antiossidanti come i fenoli (Loo et al., 2008), ha facilitato il loro accumulo e disponibilità all'interno delle piante in condizioni di crescita stabili. Questi composti probabilmente hanno rafforzato i meccanismi di difesa complessivi delle piante, salvaguardando le membrane cellulari da potenziali stress ambientali. L'ipotesi è supportata dall'analisi del livello di stress ossidativo (MDA). Nello specifico, gli impianti WD hanno mostrato un livello di stress ossidativo significativamente inferiore rispetto agli impianti di controllo. Sorprendentemente, le piante B+WD, nonostante avessero un contenuto di vitamina C inferiore, hanno mostrato un livello di stress ossidativo equivalente a quello delle piante WD. D'altro canto, l'azione disturbante indotta dalla bioplastica era evidente poiché aumentava fortemente il livello di stress ossidativo della membrana cellulare nelle piante B. Questo fenomeno è coerente con risultati precedenti che dimostrano un elevato stress ossidativo nelle piante che crescono in presenza di plastica, ponendo una minaccia per le normali funzioni vitali delle piante.

## Conclusioni

In particolare, quando il WD è stato combinato con la bioplastica, ha migliorato la produttività, il contenuto di clorofilla e di proteine, riducendo al tempo stesso lo stress ossidativo. Questi risultati indicano che il WD mitiga efficacemente i danni indotti dalla bioplastica e supporta una sana alimentazione umana. In questo contesto, per colmare efficacemente queste lacune, è necessario intraprendere una caratterizzazione chimica completa delle molecole specifiche all'interno del WD, compresi ormoni e proteine. Questo sforzo sarebbe utile per proporre uno schema strutturato per svelare il meccanismo preciso attraverso il quale il WD migliora la crescita delle piante. Lo studio incoraggia ulteriori ricerche per comprendere meglio gli effetti negativi della bioplastica sulle piante e sviluppare strategie sostenibili utilizzando prodotti naturali, come WD, che si allineino ai principi di sostenibilità in agricoltura e nell'economia circolare. Indubbiamente, il coinvolgimento di diverse specie vegetali, dosaggi variabili sia di bioplastica che di WD, nonché diversi tipi di terreno e condizioni del campo, saranno indispensabili per indagini future mirate a chiarire i meccanismi sottostanti che governano l'interazione tra WD, bioplastica, e suolo nelle piante.

**Funding sources - This article has received funding from the Research Support Plan USiena 2022.**

## CRedit authorship contribution statement

**Silvia Celletti:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Formal analysis, Visualization, Writing – original draft, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Writing – review & editing. **Riccardo Fedeli:** Data curation, Investigation, Writing – original draft. **Majid Ghorbani:** Investigation, Writing – original draft. **Jonan Mbela Aseka:** Investigation. **Stefano Loppi:** Writing – review & editing, Supervision. All authors have read and approved the final manuscript.

## Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Silvia Celletti reports a relationship with Research Support Plan USiena

2022 that includes: funding grants.

## Data availability

Data are made available by the authors to any qualified researcher who makes a request.

## Acknowledgments

The authors are thankful to Massimo Guarnieri for his technical help with HPLC analysis and Francesco Barbagli (BioDea® - Arezzo, Italy) for having provided the wood distillate.

## References

- Abe, M.M., Branciforti, M.C., Montagnoli, R.N., Morales, M.A.M., Jacobus, A.P., Brienza, M., 2022. Production and assessment of the biodegradation and ecotoxicity of Xylan-and starch-based bioplastics. *Chemosphere* 287, 132290. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132290>.
- Alscher, R.G., Donahue, J.L., Cramer, C.L., 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiol. Plant.* 100 (2), 224–233. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.1997.TB04778.X>.
- Atiweh, G., Mikhael, A., Parrish, C.C., Banoub, J., Le, T.A.T., 2021. Environmental impact of bioplastic use: a review. *Heliyon* 7 (9), 07918. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07918>.
- Barnes, D.K., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 364 (1526), 1985–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>.
- Benzon, H.R.L., Lee, S.C., 2017. Pyrolytic acids enhance phytoremediation of heavy metal-contaminated soils using mustard. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 48 (17), 2061–2073. <https://doi.org/10.1080/00103624.2017.1406102>.
- Berahim, Z., Panhwar, Q.A., Ismail, M.R., Saud, H.M., Monjurul, M., Mondal, A., Naher, U.A., Islam, M.R., 2014. Rice yield improvement by foliar application of phytohormone. *J. Food Agric. Environ.* 12, 399–404.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brizga, J., Hubacek, K., Feng, K., 2020. The unintended side effects of bioplastics: carbon, land, and water footprints. *One Earth* 3 (1), 45–53.
- Brown, R.W., Chadwick, D.R., Zang, H., Graf, M., Liu, X., Wang, K., Greenfield, L.M., Jones, D.L., 2023. Bioplastic (PHBV) addition to soil alters microbial community structure and negatively affects plant-microbial metabolic functioning in maize. *J. Hazard.* 441, 129959. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129959>.
- Cardelli, R., Becagli, M., Marchini, F., Saviozzi, A., 2020. Soil biochemical activities after the application of pyrolytic acid to soil. *Soil Res.* 58 (5), 461–467. <https://doi.org/10.1071/sr19373>.
- Celletti, S., Fedeli, R., Ghorbani, M., Loppi, S., 2023. Impact of starch-based bioplastic on growth and biochemical parameters of basil plants. *Sci. Total Environ.* 856, 159163. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159163>.
- Colzi, I., Renna, L., Bianchi, E., Castellani, M.B., Coppi, A., Pignatelli, S., Loppi, S., Gonnelli, C., 2022. Impact of microplastics on growth, photosynthesis and essential elements in *Cucurbita pepo* L. *J. Hazard.* 423, 127238. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127238>.
- Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S., Smirnov, N., 2007. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J.* 52 (4), 673–689. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2007.03266.x>.
- European Bioplastic, 2021. Applications for bioplastics. <https://www.european-bioplastics.org/market/applications-sectors/> (accessed on 15 January 2023).
- European Bioplastics, 2022. Bioplastics market data 2022. <https://www.european-bioplastics.org/market/> (accessed on 13 January 2023).
- Fačková, Z., Vannini, A., Monaci, F., Grattacaso, M., Paoli, L., Loppi, S., 2020. Effects of wood distillate (pyrolytic acid) on sensitive bioindicators (lichen and moss). *Ecotoxicol.* 204, 111117. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111117>.
- Fedeli, R., Vannini, A., Guarnieri, M., Monaci, F., Loppi, S., 2022. Bio-based solutions for agriculture: foliar application of wood distillate alone and in combination with other plant-derived corroborants results in different effects on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Biology* 11 (3), 404. <https://doi.org/10.3390/biology11030404>.
- Fedeli, R., Alexandrov, D., Celletti, S., Nafikova, E., Loppi, S., 2023a. Biochar improves the performance of *Avena sativa* L. grown in gasoline-polluted soils. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 30, 28791–28802. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24127-w>.
- Fedeli, R., Celletti, S., Loppi, S., Vannini, A., 2023b. Comparison of the effect of solid and liquid digestate on the growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. *Agronomy* 13, 782. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030782>.
- Fedeli, R., Vannini, A., Celletti, S., Maresca, V., Munzi, S., Cruz, C., Alexandrov, D., Guarnieri, M., Loppi, S., 2023c. Foliar application of wood distillate boosts plant yield and nutritional parameters of chickpea. *Ann. Appl. Biol.* 182 (1), 57–64. <https://doi.org/10.1111/aab.12794>.
- Grewal, A., Abbey, L., Gunupuru, L.R., 2018. Production, prospects and potential application of pyrolytic acid in agriculture. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 135, 152–159. <https://doi.org/10.1016/J.JAAP.2018.09.008>.

- Hagner, M., Pasanen, T., Lindqvist, B., 2010. Effects of birch tar oils on soil organisms and plants. *Agric. Food Sci.* 19 (1), 13–23. <https://doi.org/10.2137/145960610791015096>.
- Huerta-Lwanga, E., Mendoza-Vega, J., Ribeiro, O., Gertsen, H., Peters, P., Geissen, V., 2021. Is the polylactic acid fiber in green compost a risk for *Lumbricus terrestris* and *Triticum aestivum*? *Polymers* 13 (5), 703. <https://doi.org/10.3390/polym13050703>.
- Italian Ministerial Decree 6793 18/07/2018, 2018. <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2018/09/05/18A05693/sg> (accessed on 25 October 2022).
- Jeong, K.W., Kim, B.S., Ultra Jr., V.U., Chul, S., 2015. Effects of rhizosphere microorganisms and wood vinegar mixtures on rice growth and soil properties. *Korean J. Crop. Sci.* 60 (3), 355–365. <https://doi.org/10.7740/KJCS.2015.60.3.355>.
- Kijchavengkul, T., Auras, R., Rubino, M., Ngouajio, M., Fernandez, R.T., 2008. Assessment of aliphatic-aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part I: field study. *Chemosphere* 71 (5), 942–953. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00113>.
- Kroh, G.E., Pilon, M., 2020. Regulation of iron homeostasis and use in chloroplasts. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (9), 3395. <https://doi.org/10.3390/ijms21093395>.
- Lastdrager, J., Hanson, J., Smeekens, S., 2014. Sugar signals and the control of plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 65 (3), 799–807. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert474>.
- Liawska-Bizukojc, E., 2021. Effect of (bio) plastics on soil environment: a review. *Sci. Total Environ.* 795, 148889. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148889>.
- Loo, A.Y., Jain, K., Darah, I., 2008. Antioxidant activity of compounds isolated from the pyrolytic acid, *Rhizophora apiculata*. *Food Chem.* 107 (3), 1151–1160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.044>.
- Mao, K., Li, S., Li, B., Wu, W., Wei, C., Yuan, S., Niu, Y., Zhang, L., 2019. Effect of wood vinegar on growth, yield and quality of upper leaves of flue-cured tobacco of Nanzheng. *Southwest China J. Agric. Sci.* 32 (3), 645–652.
- Marichelvam, M.K., Jawaid, M., Asim, M., 2019. Corn and rice starch-based bio-plastics as alternative packaging materials. *Fibers* 7 (4), 32. <https://doi.org/10.3390/fib7040032>.
- Meng, F., Yang, X., Riksen, M., Xu, M., Geissen, V., 2021. Response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth to soil contaminated with microplastics. *Sci. Total Environ.* 755, 142516. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142516>.
- Mourant, D., Yang, D.Q., Lu, X., Roy, C., 2005. Anti-fungal properties of the pyrolytic lignols from the pyrolysis of softwood bark. *Wood Fiber Sci.* 542–548.
- Mu, J., Yu, Z.M., Wu, W.Q., Wu, Q.L., 2006. Preliminary study of application effect of bamboo vinegar on vegetable growth. *For. Stud. China.* 8, 43–47. <https://doi.org/10.1007/s11632-006-0023-6>.
- Müller, C., Townsend, K., Matschullat, J., 2012. Experimental degradation of polymer shopping bags (standard and degradable plastic, and biodegradable) in the gastrointestinal fluids of sea turtles. *Sci. Total Environ.* 416, 464–467. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.10.069>.
- Mungkunkamchao, T., Kesmala, T., Pimratch, S., Toomsan, B., Jothiyangkoon, D., 2013. Wood vinegar and fermented bioextracts: natural products to enhance growth and yield of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Sci. Hortic.* 154, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.02.020>.
- Murray, D.T., Kato, M., Lin, Y., Thurber, K.R., Hung, I., McKnight, S.L., Tycko, R., 2017. Structure of FUS protein fibrils and its relevance to self-assembly and phase separation of low-complexity domains. *Cell* 171 (3), 615–627. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.048>.
- Ofoe, R., Qin, D., Gunupuru, L.R., Thomas, R.H., Abbey, L., 2022. Effect of pyrolytic acid on the productivity and nutritional quality of greenhouse tomato. *Plants* 11 (13), 1650. <https://doi.org/10.3390/plants11131650>.
- Pan, X., Zhang, Y., Wang, X., Liu, G., 2017. April. Effect of adding biochar with wood vinegar on the growth of cucumber. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Vol. 61, No. 1. IOP Publishing, p. 012149. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/61/1/012149>.
- Parisi, O.I., Morelli, C., Scrivano, L., Sinicropi, M.S., Cesario, M.G., Candamano, S., Puoci, F., Sisci, D., 2015. Controlled release of sunitinib in targeted cancer therapy: smart magnetically responsive hydrogels as restricted access materials. *RSC Adv.* 5 (80), 65308–65315. <https://doi.org/10.1039/C5RA12229E>.
- Pego, J.V., Kortstee, A.J., Huijser, C., Smeekens, S.C.M., 2000. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *J. Exp. Bot.* 51, 407–416.
- Polthane, A., Kumla, N., Simma, B., 2015. Effect of *Pistia stratiotes*, cattle manure and wood vinegar (pyrolytic acid) application on growth and yield of organic rainfed rice. *Paddy Water Environ.* 13, 337–342. <https://doi.org/10.1007/s10333-014-0453-z>.
- Qi, Y., Yang, X., Pelaez, A.M., Lwanga, E.H., Beriot, N., Gertsen, H., Garbeva, P., Geissen, V., 2018. Macro-and micro-plastics in soil-plant system: effects of plastic mulch film residues on wheat (*Triticum aestivum*) growth. *Sci. Total Environ.* 645, 1048–1056. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.229>.
- Rasheed, F., Markgren, J., Hedenqvist, M., Johansson, E., 2020. Modeling to understand plant protein structure-function relationships—implications for seed storage proteins. *Molecules* 25 (4), 873. <https://doi.org/10.3390/molecules25040873>.
- Ratanapisit, J., Apiraksakul, S., Rerngnarong, A., Chungsiriporn, J., Bunyakarn, C., 2009. Preliminary evaluation of production and characterization of wood vinegar from rubberwood. *Warasan Songkhla Nakharin* 31 (3).
- Rhodes, C.J., 2019. Solving the plastic problem: from cradle to grave, to reincarnation. *Sci. Prog.* 102 (3), 218–248. <https://doi.org/10.1177/0036850419867204>.
- Rocha-Santos, T., Malafaia, G., 2022. Special collection "microplastics 2022". *J. Hazard.* 434, 128838. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128838>.
- Rolland, F., Moore, B., Sheen, J., 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14 (Suppl), s185–s205. <https://doi.org/10.1105/tpc.010455>.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J., 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 675–709. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441>.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J.A., Hilal, M., Prado, F.E., 2009. Soluble sugars: metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. *Plant Signal. Behav.* 4 (5), 388–393. <https://doi.org/10.4161/psb.4.5.8294>.
- Shibayama, H., Mashima, K., Mitsutomi, M., Arima, S., 1998. Effects of Application of Pyrolytic Acid Solution Produced in Karatsu City on Growth and Free Sugar Contents of Storage Roots of Sweet Potato. *Marine and Highland Bioscience Center Report-Saga University (Japan)*.
- Simma, B., Polthane, A., Goggi, A.S., Siri, B., Promkhambut, A., Caragea, P.C., 2017. Wood vinegar seed priming improves yield and suppresses weeds in dryland direct-seeding rice under rainfed production. *Agron. Sustain. Dev.* 37, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0466-2>.
- Smirnoff, N., 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3 (3), 229–235. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)80070-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)80070-9).
- Statista, 2020. Production of plastics worldwide from 1950 to 2018. <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/> (accessed on 17 January 2023).
- Theerakulpit, P., Kanawapee, N., Panwong, B., 2017. Seed priming alleviated salt stress effects on rice seedlings by improving Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> and maintaining membrane integrity. *Int. J. Plant Biol.* 7 (1), 6402. <https://doi.org/10.4081/PB.2016.6402>.
- Tomé, F., Nägele, T., Adamo, M., Garg, A., Marco-Llorca, C., Nukarinen, E., Pedrotti, L., Peviani, A., Simeunovic, A., Tatkievicz, A., Tomar, M., 2014. The low energy signaling network. *Front. Plant Sci.* 5, 353. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00353>.
- Tsuzuki, E., Morimitsu, T., Matsui, T., 2000. Effect of chemical compounds in pyrolytic acid on root growth in rice plant. *Report of the Kyushu Branch of the Crop Science Society of Japan* 66, 15–16.
- Vannini, A., Moratelli, F., Monaci, F., Loppi, S., 2021. Effects of wood distillate and soy lecithin on the photosynthetic performance and growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *SN Appl. Sci.* 3, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04028-8>.
- Vijayalakshmi, M., Govindaraj, V., Anisha, M., Vigneshwari, N., Gokul, M., Nithila, E.E., Bebin, M., Prasath, T.A., Chezhian, P., 2022. Synthesis and characterization of banana peel starch-based bioplastic for intravenous tubes preparation. *Mater.* 33, 104464. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104464>.
- Wang, Y., Qiu, L., Song, Q., Wang, S., Wang, Y., Ge, Y., 2019. Root proteomics reveals the effects of wood vinegar on wheat growth and subsequent tolerance to drought stress. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (4), 943. <https://doi.org/10.3390/ijms20040943>.
- Wang, Q., Adams, C.A., Wang, F., Sun, Y., Zhang, S., 2022. Interactions between microplastics and soil fauna: a critical review. *Crit. Rev. Environ.* 52 (18), 3211–3243. <https://doi.org/10.1080/10643389.2021.1915035>.
- Wei, Q., Ma, X., Dong, J., 2010a. Preparation, chemical constituents and antimicrobial activity of pyrolytic acids from walnut tree branches. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 87 (1), 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2009.09.006>.
- Wei, Q., Ma, X., Zhao, Z., Zhang, S., Liu, S., 2010b. Antioxidant activities and chemical profiles of pyrolytic acids from walnut shell. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 88 (2), 149–154. <https://doi.org/10.12691/jfmr-8-1-7>.
- Wen, B., Li, C., Fu, X., Li, D., Li, L., Chen, X., Wu, H., Cui, X., Zhang, X., Shen, H., Zhang, W., Xiao, W., Gao, D., 2019. Effects of nitrate deficiency on nitrate assimilation and chlorophyll synthesis of detached apple leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 142, 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.07.007>.
- Yargicoglu, E.N., Sadasivam, B.Y., Reddy, K.R., Spokas, K., 2015. Physical and chemical characterization of waste wood derived biochars. *Waste Manag.* 36, 256–268. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.10.029>.
- Zhang, S., Gao, W., Cai, K., Liu, T., Wang, X., 2022. Effects of microplastics on growth and physiological characteristics of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Agronomy* 12 (11), 2692. <https://doi.org/10.3390/agronomy12112692>.
- Zhao, S., Wang, C., Bai, B., Jin, H., Wei, W., 2022. Study on the polystyrene plastic degradation in supercritical water/CO<sub>2</sub> mixed environment and carbon fixation of polystyrene plastic in CO<sub>2</sub> environment. *J. Hazard.* 421, 126763. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126763>.
- Zhou, J., Jia, R., Brown, R.W., Yang, Y., Zeng, Z., Jones, D.L., Zang, H., 2023. The long-term uncertainty of biodegradable mulch film residues and associated microplastics pollution on plant-soil health. *J. Hazard.* 430, 130055. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130055>.
- Zhu, K., Gu, S., Liu, J., Luo, T., Khan, Z., Zhang, K., Hu, L., 2021. Wood vinegar as a complex growth regulator promotes the growth, yield, and quality of rapeseed. *Agronomy* 11 (3), 510. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030510>.
- Zimmermann, L., Dombrowski, A., Völker, C., Wagner, M., 2020. Are bioplastics and plant-based materials safer than conventional plastics? In vitro toxicity and chemical composition. *Environ. Int.* 145, 106066. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106066>.
- Zulkarami, B., Ashrafuzzaman, M., Husni, M.O., Ismail, M.R., 2011. Effect of pyrolytic acid on growth, yield and quality improvement of rockmelon in soilless culture. *Aust. J. Crop. Sci.* 5 (12), 1508–1514.