

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CIÊNCIA DO SOLO

DISSERTAÇÃO

**Caracterização e Avaliação do Uso Agrícola de Humatos
de Vermicomposto**

Maria Rita Cardoso Rodda

2003



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO USO AGRÍCOLA DE HUMATOS DE
VERMICOMPOSTO**

MARIA RITA CARDOSO RODDA

Sob a Orientação do Professor
Gabriel de Araújo Santos
e Co-orientação
Dejair Lopes de Almeida

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Magister Scientiae
em agronomia, Área de Concentração de Ciência do Solo

Seropédica, RJ

Março de 2003

DESEJOS...

Desejo primeiro que você ame,

E que amando, também seja amado.

E que se não for, seja breve em esquecer.

E que esquecendo, não guarde mágoa.

Desejo, pois, que não seja assim,mas se for, saiba ser sem desesperar.

Desejo também que tenha amigos, que mesmo maus e inconseqüentes, sejam corajosos e fiéis, e que pelo menos num deles você possa confiar sem duvidar.

E porque a vida é assim, desejo ainda que você tenha inimigos.

Nem muitos, nem poucos, mas na medida exata para que, algumas vezes, você se interpele a respeito de suas próprias certezas.

E que entre eles haja pelo menos um que seja justo, para que você não se sinta demasiado seguro.

Desejo depois que você seja útil, mas não insubstituível.

E que nos maus momentos, quando não restar mais nada, essa utilidade seja suficiente para manter você de pé.

Desejo ainda que você seja tolerante, não com os que erram pouco, porque isso é fácil, mas com os que erram muito e irremediavelmente, e que fazendo bom uso dessa tolerância, você sirva de exemplo aos outros.

Desejo que você, sendo jovem, não amadureça depressa demais, e que sendo maduro, não insista em rejuvenescer

E que sendo velho, não se dedique ao desespero. porque cada idade tem o seu prazer e a sua dor e é preciso deixar que eles escurram por entre nós.

Desejo por sinal que você seja triste, não o ano todo, mas apenas um dia.

Mas que nesse dia descubra que o riso diário é bom, o riso habitual é insosso e o riso constante é insano.

Desejo que você descubra, com o máximo de urgência, acima e a respeito de tudo, que existem oprimidos, injustiçados e infelizes, e que estão a sua volta.

Desejo ainda que você afague um gato, alimente um cuco e ouça o João-de-Barro erguer triunfante o seu canto matinal porque, assim, você se sentirá bem por nada.

Desejo também que você plante uma semente, por mais minúscula que seja, e acompanhe o seu crescimento, para que você saiba de quantas muitas vidas é feita uma árvore.

Desejo, outrossim, que você tenha dinheiro, porque é preciso ser prático. e que pelo menos uma vez por ano coloque um pouco dele na sua frente e diga: Isso é meu!, só para que fique bem claro quem é dono de quem.

Desejo também que nenhum de seus afetos morra, por ele e por você, mas que se morrer, você possa chorar sem se lamentar e sofrer sem se culpar.

Desejo por fim que você sendo homem, tenha uma boa mulher, e que sendo mulher, tenha um bom homem e que se amem hoje, amanhã e nos dias seguintes, e quando estiverem exaustos e sorridentes, ainda haja amor para recomeçar.

E se tudo isso acontecer, não tenho mais nada a te desejar.

(Original de Victor Hugo, adaptado por Vinícius de Moraes)

Àqueles que me ajudaram nos momentos mais difíceis.

DEDICO E AGRADEÇO

BIOGRAFIA

Maria Rita Cardoso Rodda, nasceu em São Paulo aos 17 de janeiro de 1976. Em 2000, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de São Carlos. Em 2001, iniciou o curso de Mestrado em Ciências do Solo pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO

RODDA, Maria Rita Cardoso. **Caracterização e avaliação do uso agrícola de humatos de vermicomposto**. Seropédica: UFRRJ, 2002. 53p. (Dissertação, Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo).

Os objetivos deste trabalho foram de caracterizar os humatos de diferentes fontes de vermicomposto (esterco de curral – HV1, esterco de curral + bagaço de cana-de-açúcar – HV2, esterco de curral + leguminosa - HV3 e esterco de curral + bagaço de cana-de-açúcar + leguminosa – HV4) e avaliar o crescimento das plântulas de milho e alface, utilizando área e comprimento radiculares como indicadores fisiológicos e número de sítios mitóticos e atividade da H^+ -ATPase como indicadores bioquímicos. A caracterização química dos humatos revelou que a substituição da fonte de matéria orgânica para a vermicompostagem produz substâncias húmicas semelhantes. Entretanto, algumas diferenças quanto as características espectroscópicas foram observadas. Pode-se notar que o HV1 obteve maior relação E_4/E_6 e maior intensidade de fluorescência, indicando ser o mais quimicamente estável e humificado. No ensaio I foram testados os humatos de vermicomposto em plântulas de alface e pode-se observar que o HV1 proporcionou incremento da área e comprimento radiculares e estimulou a atividade à vanadato sensível de hidrólise de ATP na fração microsomal em relação ao controle, enquanto que o HV2 e HV3 inibiram o incremento e o estímulo. No ensaio II foram testadas as doses de humatos extraídos de HV1 nas plântulas de alface. O melhor incremento na área e comprimento radiculares e estímulo da atividade à vanadato sensível de hidrólise de ATP foi encontrado na concentração de 25 mg C. L⁻¹ e a medida que as concentrações se elevam os incrementos e estímulo decaem. No ensaio 3 os humatos de vermicomposto foram extraídos e testados em milho. Pode-se observar que HV1 foi o que proporcionou melhor aumento da área e comprimento radiculares, massas - seca e fresca –e número de sítios mitóticos elevados, entretanto o estímulo da V-ATPase foi superior com HV2 e o da H^+ - Ppiase com HV3. Através dos experimentos pode-se perceber que o esterco bovino dos vermicompostos pode ser parcialmente substituído por outro material orgânico menos nobre, sem que haja alterações relevantes nas características químicas. Os humatos afetam positivamente o crescimento das plantas através das H^+ - ATPases, devido a sua ação hormonal. Elevadas concentrações reduzem o crescimento e a hidrólise de ATP das raízes. As bombas do vacúolo funcionam de forma diferente em relação a da membrana plasmática, quando em contato com ácidos húmicos.

Palavras – chaves: vermicompostagem, substâncias húmicas, H^+ -ATPase.

ABSTRACT

RODDA, Maria Rita Cardoso. **Characterization and evaluation of the agricultural application of vermicompost humic substances** Seropédica: UFRRJ, 2002. 53p. (Dissertação, Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo).

The objectives of this work were to distinguish the humic substances of different sources of vermicompost (cow manure – HV1, cow manure + cane sugar bagasse – HV2, cow manure + vegetable – HV3 and cow manure + cane sugar bagasse + vegetable – HV4), and to estimate the maize and lettuce seedling growth, utilizing root area and length as physiological indicators, frequency of roots mitotic sites and H^+ - ATPase activity as biochemical indicators of humic substances bioactivity. The chemistry characterization of humic substances revealed that the source of organic substance substitution for the vermicompost work produces similar humic substances. However some differences as for spectroscopy characteristics were observed. It can be noted that the HV1 acquired a greater relation E_4/E_6 and greater fluorescence intensity, indicating to be the most stable and humic chemically. In the first experiment were tested vermicompost humic substances in lettuce seedlings and we observed that the HV1 provided the root area and length increase, and stimulated the activity at the sensitive vanadate of ATP on the microsomal fraction in relation to the control while the HV2 and HV3 inhibited the increase and stimulus. In the second experiment were tested the humic substance portions extracted from HV1 in lettuce seedlings. The best root area and length increase, and activity stimulus at the sensitive vanadate of ATP was found in the concentration of 25 mg C.L⁻¹ and while the concentrations rise, the increases and stimulus decline. In the third experiment, the vermicompost humic substances were extracted and tested in maize. We observed that the HV1 provided the root area and length increase, high mass – dry and fresh – and frequency of roots mitotic, however the V-ATPase stimulus was superior with HV2 and of the H^+ - ATPases, due its hormonal action. High concentrations reduce the root growth and ATP. The plasma membrane V – type H^+ - ATPase work in a different manner of the plasmatic membrane when they are in contact with the humic substances.

Key words: vermicomposting, humic substances, H^+ -ATPase.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.1. PRODUÇÃO DO VERMICOMPOSTO	9
2.2- CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO VERMICOMPOSTO	10
2.3. EXTRAÇÃO DOS HUMATOS DE VERMICOMPOSTO	11
2.4. CARACTERIZAÇÃO DOS HUMATOS.....	11
2.5 – ENSAIO I: EFEITO DOS HUMATOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO RADICULAR DE PLÂNTULAS DE ALFACE (<i>LACTUVA SATIVA L.</i>) E SOBRE AS BOMBAS DE PRÓTONS DA FRAÇÃO MICROSSOMAL ISOLADAS DE RAÍZES.....	13
2.6 – ENSAIO II: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE HUMATOS ISOLADOS DO VERMICOMPOSTO DE ESTERCO SOBRE O DESENVOLVIMENTO RADICULAR DE PLÂNTULAS DE ALFACE (<i>LACTUVA SATIVA L.</i>) E SOBRE AS BOMBAS DE PRÓTONS DA FRAÇÃO MICROSSOMAL ISOLADAS DE RAÍZES.	15
OBTENÇÃO DAS PLÂNTULAS DE ALFACE	15
AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO RADICULAR	16
ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
2.7 – ENSAIO III: EFEITO DOS HUMATOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO RADICULAR DE PLÂNTULAS DE MILHO (<i>ZEA MAYS L.</i>) E SOBRE AS BOMBAS DE PRÓTONS (H^+ -ATPASE DE MEMBRANA PLASMÁTICA E VACÚOLO E PIROFOSFATASE DE VACÚOLO) ISOLADAS DE VESÍCULAS DE RAÍZES.	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 – CARACTERIZAÇÃO DOS VERMICOMPOSTOS.....	19
4.2 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS HUMATOS	21
4.3 –ENSAIO I - EFEITO DOS HUMATOS SOBRE DESENVOLVIMENTO RADICULAR DE PLÂNTULAS DE ALFACE E SOBRE A ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DE ATP VANADATO SENSÍVEL DA FRAÇÃO MICROSSOMAL ISOLADA DE RAÍZES.	29
4.4 –ENSAIO II – EFEITO DAS DOSES DE HUMATO DE ESTERCO DE CURRAL (HV1) SOBRE DESENVOLVIMENTO RADICULAR DE PLÂNTULAS DE ALFACE E SOBRE A ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DE ATP VANADATO SENSÍVEL DA FRAÇÃO MICROSSOMAL ISOLADA DE RAÍZES.	33
4.5 - BIOENSAIO III – EFEITO DOS HUMATOS SOBRE DESENVOLVIMENTO RADICULAR DE PLÂNTULAS DE MILHO E SOBRE A ATIVIDADE DAS BOMBAS DE PRÓTONS ISOLADAS DE RAÍZES.	38
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA.....	47

1. INTRODUÇÃO

Um dos problemas centrais do século XXI é a sustentabilidade da produção agrícola. O uso exacerbado de agroquímicos e a agricultura intensiva têm como consequência a degradação do meio ambiente pela erosão, lixiviação de nutrientes, contaminação do lençol freático. Uma das alternativas para uma agricultura viável econômica e ecologicamente é a agricultura orgânica. Alguns trabalhos foram conduzidos utilizando a matéria orgânica como fornecedora de nutrientes e para melhoria das características físicas, químicas e biológicas do solo, e como promotora do desenvolvimento das plantas.

A matéria orgânica ou húmus do solo é composto por uma parte não humificada, que inclui os carboidratos, aminoácidos, lipídeos, proteínas, hormônios e uma variedade de ácidos orgânicos e uma outra humificada, que consiste de um grupo de compostos mais complexos como os ácidos húmicos e fúlvicos (Tan; 1994).

O processo de humificação que é acelerado pelas minhocas tem como produto final um material quimicamente estável (vermicompostos). Os resíduos utilizados pela vermicompostagem podem ser de origem biológica ou industrial, resultando num vermicomposto com diferentes características.

Extratos alcalinos de matéria orgânica, genericamente conhecidos como humatos, tem proporcionado efeitos diretos sobre a fisiologia das plantas incluindo diversos processos metabólicos (respiração, teor e atividade de proteínas). No entanto, são raros os estudos que avaliam o efeito da matéria orgânica sobre esses processos, sendo o mais comum avaliar a sua eficiência como fornecedora de nutrientes.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar as características químicas e espectroscópicas de humatos extraídos de vermicompostos com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, além de estudar os mecanismos bioquímicos envolvidos no sistema radicular de plântulas de milho e alface, quando aplicados humatos na água de irrigação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A vermicompostagem é a transformação da matéria orgânica, resultante da ação combinada das minhocas e dos microrganismos que vivem em seu trato digestivo, acelerando a mineralização dos resíduos orgânicos (Albanell, et al, 1988). As minhocas aumentam a velocidade de decomposição (Vinceslas & Loquet, 1987) e também produzem substâncias húmicas com atividade hormonal que podem influenciar o metabolismo e o desenvolvimento das plantas (Albuzio et al., 1996; Dell'Agnola & Nardi, 1987; Nardi et al., 1991, 1994; Muscolo et al., 1996, 1998, 1999; Masciandaro et al., 1999).

O vermicomposto difere do composto convencional, entre outras características, devido a maior estabilização dos resíduos que, ao passarem pelo trato digestivo da minhoca, sofrem reações enzimáticas adicionais (Hartenstein & Hartenstein, 1981; Albanell et al., 1988).

A espécie de minhoca mais utilizada para a vermicompostagem tem sido a *Eisenia foetida*, conhecida vulgarmente como vermelha da Califórnia, devido a sua habilidade de conversão de resíduos orgânicos, pelo seu rápido crescimento (Neuhauser et al., 1980) e grande capacidade de multiplicação (Hartenstein et al., 1979).

A capacidade reprodutiva da Oligochaeta pode variar com as condições ambientais e com a disponibilidade do substrato orgânico (Neuhauser et al., 1980; Kale et al., 1982; Hard et al., 1988; Reinecke & Viljoen, 1990). Durante a vermicompostagem a matéria orgânica ingerida é macerada, misturada com material orgânico e mineral, passada através do trato digestivo das minhocas e excretada como coprólitos.

A matéria prima mais utilizada na vermicompostagem tem sido o esterco bovino. Como a quantidade de esterco é um fator limitante para os produtores de vermicomposto, diversas pesquisas têm avaliado alternativas para substituição parcial ou total desse substrato (Hartenstein, 1979; Chan & Griffiths, 1988; Albanell et al, 1988; Silva, 1992; Aquino et al, 1996).

Aquino (1991) avaliou a atividade reprodutiva das minhocas e constatou que o substrato produzido com a mistura de esterco bovino e cana-de-açúcar na proporção 1:1

(v/v) aumentou a população de minhocas em até 30 vezes, apesar do bagaço de cana-de-açúcar ser um resíduo resistente a transformação em função da sua elevada relação C/N que varia entre 100-200 (Orlando Filho et al., 1983).

Apesar dos benefícios proporcionados pela mistura de palha ao esterco, o produto final é mais empobrecido em nitrogênio quando comparado ao esterco. Uma opção para obtenção de vermicomposto com relação C/N mais estreita seria a incorporação de leguminosas durante o processo de compostagem.

A adição de fitomassa de leguminosa no processo de vermicompostagem pode servir como fonte de N de baixo custo para as minhocas e microrganismos e produção de vermicomposto mais rico neste elemento (Silva, 1992) uma vez que essas plantas se associam a bactérias fixadoras de N₂.

O produto da vermicompostagem geralmente apresenta uma quantidade maior de carbono na forma humificada (Almeida, 1991; Albanell et al., 1988) e maior proporção de compostos aromáticos e polissacarídeos (Loquet & Vincelas, 1987). Devido ao maior estágio de humificação, os vermicompostos apresentam mineralização secundária mais lenta do que os compostos produzidos sem minhocas. Os benefícios da utilização de um material mais estabilizado como fertilizante orgânica incluem a diminuição da incidência de plantas doentes (Szczec et al., 1993; Nakamura, 1996), assim como o aumento da atividade de micorrizas arbusculares (Cavender et al., 1999). O vermicomposto aumenta a disponibilidade de nutriente, melhorando a estrutura e a capacidade de reter água. (Landgraf et al., 1999), além de incorporar substâncias húmicas ao solo.

As substâncias húmicas (SH) participam de reações importantes que ocorrem nos solos, influenciando a fertilidade através da liberação de nutrientes (mineralização), pela detoxificação de elementos químicos (complexação) e pela melhoria das condições físicas e biológicas (Santos & Camargo, 1999) além da produção de substâncias fisiologicamente ativas (Vaughan & Malcolm, 1985). A reatividade das substâncias húmicas depende da sua natureza química que pode ser geralmente caracterizada pela composição elementar e através de técnicas espectroscópicas.

A composição elementar das SH é uma propriedade estável que, segundo Kuwatsuka *et al.* (1978), é o reflexo das condições de formação, ou seja, do ambiente e

varia pouco com manejo do solo (Ceretta, 1995). Os teores de C, H, N e O são obtidos através de analisadores elementares disponíveis comercialmente.

A presença dos diferentes grupamentos funcionais nas substâncias húmicas pode ser facilmente avaliada através das técnicas espectroscópicas que utilizam diferentes regiões do espectro eletromagnético para obter informações sobre a estrutura e funcionalidade dos compostos orgânicos. As espectroscopias na região do infravermelho e do visível são especialmente úteis para o estudo de grupamentos funcionais oxigenados, os grupamentos mais reativos presente nas substâncias húmicas.

A espectroscopia de infravermelho (IV) é um método analítico baseado na absorção de radiação infravermelha pela vibração das ligações entre átomos com polaridades diferentes. A frequência de absorção é dependente do modo vibracional, do comprimento das ligações, da massa dos átomos e da magnitude de diferença de polaridade entre os átomos envolvidos na ligação. A espectroscopia de IV é muito proveitosa para estudo de ligações polares e é particularmente usada para o estudo da natureza do oxigênio nas moléculas orgânicas. A espectroscopia na região do IV tem sido usada para a caracterização de substâncias húmicas, principalmente com o avanço de técnicas não dispersivas, como a espectroscopia de infravermelho com transformada em Fourier (FT-IR). A energia de infravermelho é utilizada mais eficientemente, o que permite alta sensibilidade na análise e obtenção de espectros de alta resolução, com baixa relação sinal/ruído.

Apesar da espectroscopia de IV ser utilizada amplamente para análise qualitativa, a técnica também pode ser aplicada à análise semi-quantitativa de alguns grupamentos funcionais, principalmente os oxigenados. Freixo (2000), determinou o índice de hidrofobicidade e de condensação de ácidos húmicos, a partir da relação obtida pela integração da área de banda correspondente aos grupamentos alifáticos (C-H)/grupamentos polares (C-O).

A absorção de radiação na região do ultravioleta (UV) e do visível (Vis) resultam das transições eletrônicas de cromóforos que apresentam elétrons livres como os oxigenados. É observada forte absorção na região do UV pelas substâncias húmicas que contêm uma variedade de grupos aromáticos, carboxílicos, OH fenólicos que absorvem luz no UV-Vis deixando o espectro com pouca resolução e diminuição gradativa da absorbância com o aumento do comprimento de onda resultando em pouca informação

sobre as características estruturais das substâncias húmicas. No entanto, Kononova (1966) verificou que a relação obtida entre a absorvância em 465 nm e 665 nm além de ser independente da concentração de C está relacionada com o grau de evolução das substâncias húmicas. Essa relação, denominada de E_4/E_6 apresenta valores entre 2 e 5 para ácidos húmicos e entre 6 e 10 para ácidos fúlvicos sendo, portanto, menor para substâncias húmicas mais humificadas. Chen et al (1977) correlacionaram a relação E_4/E_6 com a aromaticidade, acidez total e carboxílica e distribuição da massa molecular das substâncias húmicas confirmando o uso desse indicador para avaliar o grau de humificação da matéria orgânica.

A espectroscopia de fluorescência também é uma técnica sensível para observar transições eletrônicas de grupamentos que quando excitados pela absorção de luz emitem um *quenching* de luz proporcional e em comprimentos de ondas maiores que luz absorvida. Estruturas com ligações π conjugadas como os compostos aromáticos ou com elétrons livres como grupos COO^- apresentam fluorescência e são os principais fluoróforos da matéria orgânica. Sistemas mais conjugados (condensados) apresentam fluorescência mais intensa e em menores comprimentos de ondas do que sistemas de ligações π de SH com menor grau de evolução química.

Os ácidos húmicos têm maior comprimento de onda de fluorescência de excitação e emissão que os ácidos fúlvicos, devido ao aumento do grau de aromaticidade, o conteúdo de grupos carboxílicos e aromáticos policondensados e as estruturas conjugadas nos ácidos húmicos. Assim, a matéria orgânica derivada de solos ou compostos com alta proporção de ácidos húmicos e fúlvicos terá maiores comprimentos de onda de fluorescência de excitação e emissão que àquelas com baixa razão AH/AF (Baker & Genty, 1999).

A espectroscopia de fluorescência sincronizada possui um pico de melhor resolução que os obtidos pela fluorescência convencional – emissão e excitação, desta forma, fornece parâmetros distintos de diferenciação entre as amostras e a alta possibilidade para identificação de estruturas moleculares responsáveis pela fluorescência da amostra (Senesi, 1990).

As diferentes técnicas espectroscópicas são eficientes para caracterizar a funcionalidade química das SH e representam uma ferramenta essencial para o estabelecimento de uma relação entre os aspectos funcionais da matéria orgânica e sua

reatividade química no solo. A relação entre a estrutura e a bioatividade das SH é ainda um desafio para a Ciência do Solo.

As SH podem favorecer o crescimento das plantas e aumentar a eficiência na absorção de nutrientes (Vaughan & Malcolm, 1985). A magnitude das respostas é dependente da concentração das SH, da espécie e da idade das plantas (Kononova, 1982). Chen & Avid (1990), mostraram que a promoção do desenvolvimento das plantas em solução nutritiva é aumentada na presença de SH. O crescimento das plantas, segundo esses autores, poderia estar relacionado ao aumento da solubilidade de alguns elementos traços (e.g., Fe^{3+}) através da formação de um complexo solúvel com as SH. A magnitude dos efeitos sobre o crescimento obtidos em meio mínimo sugere, entretanto, ação de mecanismos adicionais sobre a nutrição de plantas provocadas pelas SH, além do fornecimento de nutrientes.

As bombas de H^+ , enzimas transmembranares capazes de hidrolizar ATP (H^+ -ATPases do tipo P e V localizadas na membrana plasmática e no vacúolo, respectivamente, e pirofosfato (pirofosfatases – PPIase – localizadas no vacúolo) geram um gradiente eletroquímico que está diretamente envolvido em dois mecanismos fundamentais para o desenvolvimento vegetal. Esse sistema primário de transporte de prótons (i) energiza o sistema secundário de translocação de íons fundamental para absorção de macro e micronutrientes e (ii) promove o aumento da plasticidade da parede celular através da acidificação do apoplasto, fator fundamental para o processo de crescimento e alongação da célula vegetal (Cosgrove, 1997). Esse último mecanismo está relacionado com a teoria do crescimento ácido que postula um aumento de extrusão de prótons mediado pela H^+ -ATPase da membrana plasmática promove a acidificação do apoplasto, que por sua vez ativa enzimas específicas que atuam sobre a parede celular aumentando sua plasticidade e, conseqüentemente, permitindo o alongamento da célula (Rayle & Cleland, 1992)

O incremento da absorção de nutrientes proporcionado pelas SH em solução tem sido justificado pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática através da ação surfactante e ativação da H^+ -ATPase da membrana plasmática por SH de baixo peso molecular (essencialmente ácidos fúlvicos) (Nardi et al., 1991; Varanini et al. 1993). No entanto seria improvável que a perda de seletividade da membrana ocasionasse efeito positivo sobre a nutrição de plantas onde é necessária a manutenção da homeostase celular.

Recentemente Façanha et al. (2002), demonstraram que SH de massa molecular elevada (essencialmente ácidos húmicos) isolada de vermicomposto e lodo obtido da estação de tratamento de esgoto promoveram desenvolvimento radicular de plantas mono e dicotiledôneas (milho e café) e um estímulo proporcional na atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática. Esses autores postularam que em função da forte alteração na distribuição de tamanho dos ácidos húmicos após o cultivo das plantas, pequenas subunidades estruturais com uma possível atividade hormonal poderiam acessar receptores na superfície ou no interior das células das raízes desencadeando processos de estímulo do desenvolvimento radicular. Canellas et al. (2002) confirmaram esses dados e, além da atividade de hidrólise de ATP, verificaram que os ácidos húmicos isolados de vermicomposto promoveram aumento significativo do transporte de H^+ acoplado à hidrólise de ATP. Esses autores observaram também uma superexpressão da enzima (H^+ -ATPase de MP) evidenciada pela maior quantidade de H^+ -ATPase detectada imunologicamente. Esse efeito é típico de ação hormonal, já que auxinas induzem aumento do número de H^+ -ATPases expressas na membrana plasmática (Frias et al., 1996) e o aumento no número de sítios de mitose e de raízes laterais emergidas. Pode se concluir portanto que a ativação das diferentes bombas de H^+ são um importante marcador metabólico da bioatividade de substâncias húmicas.

O objetivo desse trabalho é de avaliar o efeito de humatos isolados de diferentes tipos de vermicomposto sobre o desenvolvimento de plântulas de milho e alface, utilizando a atividade de hidrólise de H^+ -ATPase isoladas do sistema radicular como marcador metabólico, o número de sítios formadores de mitoses nas raízes como um indicador morfológico e o crescimento radicular e foliar como indicadores fisiológicos da ação das SH.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produção do vermicomposto

O vermicomposto foi preparado em anéis de concreto de 50 cm de altura e 80 cm de diâmetro, utilizando esterco bovino, bagaço de cana-de-açúcar e fitomassa de leguminosa (*Gliricidia sepium*). Cada anel recebeu 200 L do material misturado, com a seguinte proporção:

A – esterco

B – esterco + bagaço de cana-de-açúcar (1:1, v/v)

C – esterco + leguminosa (1:1, v/v)

D – esterco + bagaço de cana-de-açúcar + leguminosa (2:1:1, v/v)

O esterco foi obtido de gado de leite criado em regime semi-extensivo na área da Pesagro – Rio, km 47, o bagaço de cana-de-açúcar de um vendedor de caldo do comércio local e a leguminosa da poda de árvores localizadas no Campo Experimental da EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia (CNPAB). Na época da poda foram colhidas apenas as folhas e hastes com diâmetro inferior a 2 cm.

O esterco foi deixado em pousio por cerca de 30 dias, até atingir temperatura igual ou inferior a 35°C. O bagaço da cana-de-açúcar e a leguminosa foram triturados em picadeira.

Os anéis para a vermicompostagem foram instalados na área do Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA– Fazendinha Agroecológica, km 47). A “Fazendinha” representa um espaço destinado ao exercício da agroecologia, localizada no município de Seropédica – RJ a uma latitude de 22°45’ Sul, longitude de 43°42’ Norte e altitude média de 33 metros, é conduzida em parceria entre o Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia – Embrapa Agrobiologia e o Centro Nacional de Pesquisa de Solos – Embrapa Solos, a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e a Empresa de pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro – Estação Experimental de Itaguaí.

A região caracteriza-se pela concomitante elevação da temperatura média do ar e início do período chuvoso em outubro, estendendo-se até março. Frequentemente uma

estiagem prolongada ocorre nos meses de janeiro e/ou fevereiro. Nos meses de junho, julho e agosto geralmente há uma queda na temperatura, mantendo-se amena.

A mistura dos materiais nos anéis foi feita com base em volume, corrigindo-se o teor de umidade de cada material. No fundo de cada anel foi colocada uma camada de 5 cm de pedra britada coberta com saco de ráfia. Este procedimento teve como objetivo a garantia da drenagem nos anéis. Os materiais foram misturados, colocados nos anéis e irrigados, ficando em pousio por uma semana, a fim de manter a temperatura abaixo de 40° C. Em seguida, foram colocadas 200 minhocas (*Eisenia foetida*) em cada anel e estes cobertos com palha para sombrear e manter a umidade do ambiente.

A maturação dos vermicompostos foi acompanhada através do monitoramento da temperatura até sua estabilização.

Após a estabilização, o vermicomposto foi peneirado para retirada das minhocas e caracterizado quimicamente.

2.2- Caracterização química do vermicomposto

O vermicomposto estabilizado foi caracterizado através da análise dos seguintes parâmetros:

- C total (Brasil. Ministério da Agricultura, 1983).
- N total (Bremmer et al, 1965)
- pH (H₂O): medido potenciométricamente, com eletrodos de vidro e calomelano na relação substrato/amostra 1:2,5 (Haimi & Huhta, 1987).
- Ca pela digestão nitroperclórica para preparação de extrato e leitura por absorção atômica (Sarruge & Haag, 1974).
- Mg pela digestão nitroperclórica para preparação de extrato e leitura por absorção atômica (Sarruge & Haag, 1974).
- K pela digestão nitroperclórica para preparação de extrato e leitura em fotômetro de chama.
- P total pela digestão nitroperclórica e dosagem colorimétrica em meio sulfúrico utilizando ácido ascórbico como redutor (Murphy & Riley, 1962).

2.3. Extração dos humatos de vermicomposto

A extração das substâncias húmicas alcalino solúveis dos vermicompostos foi realizada utilizando-se KOH 0,1 mol L⁻¹ na relação vermicomposto/extrator de 1:10 com base em volume, por 16 horas. Em seguida, as substâncias húmicas alcalino solúveis foram separadas do resíduo por decantação e sifonação. O excesso de íons foi retirado através do uso de resina de troca de íons Amberlite IR – 120 (forma H⁺) (Stevenson, 1994). Uma parte do extrato contendo as substâncias húmicas alcalino solúveis foi seca por liofilização para posterior caracterização química e outra permaneceu solúvel para uso nos bioensaios.

2.4. Caracterização dos humatos

Análise da composição elementar: A determinação da composição elementar foi realizada com analisador elementar automático Perkin Elmer 2400 em amostras de 10 mg de humatos em duplicata. O conteúdo de O foi determinado por diferença, descontado o teor de cinzas obtidos com a incineração de três amostras dos humatos por tratamento em mufla a 700°C.

Acidez total: A acidez total foi obtida colocando amostras de 50 a 100 mg de SH em um Erlenmeyer de 125 mL, adicionando-se 20 ml de Ba(OH)₂ 0,25 N preparado com água sem CO₂ dissolvido. O ar dos frascos foi deslocado pela passagem de N₂ ou através de vácuo e o sistema submetido à agitação por 24 horas a temperatura ambiente. A suspensão foi filtrada e o resíduo lavado com água sem CO₂ (fervida). O filtrado foi titulado potenciométricamente até pH 8,4 com HCl 0,5 N e o cálculo realizado através da equação: Acidez Total = (título do branco – título da amostra) x N do HCl x 1000/massa da amostra em mg (Schinitzer & Gupta, 1965).

Determinação da acidez carboxílica: As amostras de 50 a 100 mg de humato foram colocadas em Erlenmeyer de 125 ml, adicionando-se 40 ml de água sem CO₂ e 10 ml de Ca(OAc)₂ 1 N. O sistema é submetido a agitação por 24 horas, à temperatura ambiente.

A suspensão foi filtrada e o resíduo lavado com água sem CO₂. O filtrado foi titulado potenciométricamente até pH 9,8 com NaOH 0,1 N e o cálculo realizado conforme a equação:

$$\text{COOH} = (\text{título branco} - \text{título da amostra}) \times N \text{ do NaOH} \times 1000 / \text{massa da amostra em mg}$$

Espectroscopia na região do Ultravioleta-visível: A relação E₄/E₆ foi obtida através da razão da absorvância de uma solução dos humatos (4 mg em 10 mL de NaHCO₃ 0,05 mol L⁻¹) em 465 nm e 665 nm num espectrofotômetro Shimadzu.

Espectroscopia na região do infravermelho (IV): Os espectros de IV dos humatos foram obtidos na faixa de 400 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹, utilizando-se pastilhas com 1 mg de amostra em 100 mg de KBr, num aparelho Shimadzu com correção da linha base com absorção igual a zero em 4000 cm⁻¹ e em 2000 cm⁻¹. O índice de resistência (índice de hidrofobicidade) foi estabelecido através da relação entre a banda de absorção em 2929cm⁻¹ e 1050 cm⁻¹ (grupamentos alifáticos/polissacarídeos) e índice de condensação pela razão entre 1660cm⁻¹ e 2929 cm⁻¹ (grupamentos aromáticos/grupamentos alifáticos).

Espectroscopia de fluorescência: A intensidade de fluorescência foi determinada para solução de 20 mg de C .L⁻¹ dissolvida em NaOH 0,05 mol L⁻¹, ajustado para pH 7,0. O aparelho utilizado foi HITACHI F- 4500 com velocidade de scan de 1200 nm. min⁻¹. A excitação foi fixada em 350 nm e a emissão variou entre 290-500 nm para o espectro de fluorescência sincronizada.

Índice de hidrofobicidade: É a relação entre a absorvância da banda de absorção de 2929 cm⁻¹, correspondente ao estiramento C-H do grupamento hidrofóbico -CH₃ alifático, e a absorvância da banda entre 105 cm⁻¹, que corresponde ao estiramento C-O de grupamentos hidrofóbicos de polissacarídeos.

$$\text{IH} = \frac{\text{Abs } 2929 \text{ cm}^{-1}}{\text{Abs } 1050 \text{ cm}^{-1}}$$

Índice de condensação: É a razão entre a absorvância de grupamentos aromáticos, quinonas e/ou carboxilatos, com alto grau de condensação, correspondentes a banda de absorção em 1660 cm^{-1} , e grupamentos alifáticos.

$$\text{IC} = \frac{\text{Abs } 1660\text{ cm}^{-1}}{\text{Abs } 2929\text{ cm}^{-1}}$$

2.5 – Ensaio I: Efeito dos humatos sobre o desenvolvimento radicular de plântulas de alface (*Lactuca sativa L.*) e sobre as bombas de prótons da fração microsomal isoladas de raízes.

Obtenção das plântulas de alface

As sementes de alface (*Lactuca sativa var - Regina*), obtidas comercialmente foram esterilizadas por imersão numa solução de NaClO 0,5 % e mantidas em água, por seis horas após a lavagem. Em seguida, as sementes foram acondicionadas em papel e germinadas no escuro a 28°C . As plântulas foram transferidas para copos plásticos (dez plantas por vaso e quatro vasos por tratamento) contendo meio mínimo somente com CaCl_2 2 mMol L^{-1} (tratamento controle) e com meio mínimo complementado com humatos obtidos de vermicomposto de esterco (HV1), de esterco + bagaço de cana-de-açúcar (HV2), de esterco + leguminosa (HV3), esterco + bagaço de cana-de-açúcar + leguminosa (HV4) na concentração entre $20\text{-}25\text{mg C L}^{-1}$. O pH da solução foi ajustado para 6,0 com solução diluída de NaOH ou HC e a aeração foi forçada. Após quinze dias de crescimento nestas condições, as plântulas foram coletadas. Uma parte das amostras foi utilizada para avaliação do desenvolvimento radicular e outra utilizada para obtenção da fração microsomal (membrana plasmática + tonoplasto) através do fracionamento celular.

Avaliação do desenvolvimento radicular

As raízes dos tratamentos foram digitalizadas (300 dpi) e a área e comprimento radiculares foram estimados pelo programa computacional DeltaT-scan™ (versão demo – www.deltascan.com). Foram avaliadas também as massas fresca e seca das raízes.

Determinação do número de sítios formadores de raízes laterais

Segmentos nodais de raízes de seis plântulas submetidas aos diferentes tratamentos, foram coletados, lavados em água destilada, e submetidos a clareamento, utilizando KOH a 5% solução aquosa, em banho-maria a 75 °C por 20 minutos, decorrido este período, o material foi lavado em água destilada, e posta para corar por um período de 14-24 horas em hematoxilina-férrica. Então, as raízes foram lavadas em água destilada e a seguir clareadas com solução aquosa de ácido láctico a 80% em banho maria a 75 °C por 30 a 90 segundos. Este material foi lavado em tampão fosfato 50 mM pH 7,2 e em seguida observado em microscópio estereoscópico para contagem dos sítios mitóticos, que aparecem como pontos vermelhos em um fundo claro (Canellas et al., 2002).

Obtenção da Fração microssomal – Fracionamento Celular

A fração isolada das raízes de alface foi obtida através de centrifugação diferencial essencialmente como descritas por De Michelis & Spanswich (1986). As raízes foram cortadas e pesadas e então homogeneizadas em meio tamponado, usando grau e pistilo. O tampão de extração foi composto de sacarose 250 mM, glicerol a 10 %, DTT 3,3 mM, 5 mM EDTA, 0,5 % de PVP-40, KCl 150 mM, BSA 0,13 %, PMSF 1 mM, Tris-HCl (pH 8,0) 0,1 M, na relação peso de tecido/volume de tampão de 1:2. As soluções usadas na preparação estavam geladas e toda a manipulação foi realizada de 0 a 4°C. O pH foi monitorado durante a homogeneização mantendo-se entre 7,6 e 8,0. O homogenato resultante foi então filtrado através de quatro camadas de gaze e submetido a centrifugação a 3000 x g durante dez minutos para a remoção de células não rompidas e núcleos. Para o isolamento das mitocôndrias o sobrenadante foi novamente centrifugado a 10.000 x g por mais 15 minutos. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação, agora a 100.000 x g por 40 minutos. O precipitado dessa segunda centrifugação foi solubilizado em solução tampão contendo: glicerol a 15 %, DTT 1 mM, PMSF 0,02 mM, Hepes-KOH 10 mM pH 7,6 e EDTA 1 mM, resultando numa concentração de proteína total de 8 a 12 mg/mL.

Determinação da hidrólise de ATP da fração microsomal isoladas de raízes de alface vanadato sensível

A atividade de hidrólise de ATP foi determinada através do Pi colorimetricamente, segundo o método clássico descrito por Fiske & Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína obtida da fração microsomal e parada através da adição de ácido tricloroacético (gelado) para uma concentração final de 10 % (v/v). Composição do meio reacional: MOPS-Tris pH 6,5, 50 mM; MgCl₂ 3 a 5 mM, KCl 100 mM, ATP 1 mM e 50 µg de proteína. A hidrólise de ATP representa a atividade sensível a 0,2 mM de vanadato.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 8 repetições para análise do desenvolvimento radicular (duas plantas por vaso). A preparação microsomal foi obtida com a reunião do restante das raízes, em duas preparações independentes. A análise estatística foi realizada através de análise da variância (ANOVA) e as médias testadas pelo teste de Duncan utilizando o programa SAEG for windows (versão demo da UFV –www.ufv.Br)

2.6 – Ensaio II: Efeito da concentração de humatos isolados do vermicomposto de esterco sobre o desenvolvimento radicular de plântulas de alface (*Lactuca sativa* L.) e sobre as bombas de prótons da fração microsomal isoladas de raízes.

Obtenção das plântulas de alface

As mudas de alface foram semeadas em copo plástico com substrato comercial sem turfa. O substrato foi colocado em copos plásticos de 300 ml.

As mudas permaneceram em casa de vegetação com temperatura em torno de 22 a 28°C e irrigadas com solução contendo doses de humato de vermicomposto de esterco. As doses de humato utilizadas foram de 0, 25, 50, 75, 100 mg de C.L⁻¹. O experimento teve 3 repetições em esquema fatorial de 3 X 5.

Após quinze dias de crescimento nestas condições, as plântulas foram coletadas. Uma parte das amostras foi utilizada para avaliação do desenvolvimento radicular e outra utilizada para obtenção da fração microsomal (membrana plasmática) através do fracionamento celular.

Avaliação do desenvolvimento radicular

O desenvolvimento radicular das plântulas de alface foi realizado através da estimativa da área e do comprimento pelo software SIARCS (Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária).

A determinação dos sítios mitóticos formadores de raízes laterais a obtenção da fração microssomal foram determinados conforme descrito no Ensaio I.

Obtenção da Fração microssomal – Fracionamento Celular

A obtenção da fração microssomal e a determinação de ATP da fração microssomal isoladas de raízes de alface a vanadato sensível foram determinadas conforme a metodologia do Ensaio I.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 10 repetições para análise do desenvolvimento radicular. A preparação microssomal foi obtida com a reunião do restante das raízes. A análise estatística foi realizada através de análise da variância (ANOVA) e as médias testadas pelo Tukey utilizando o programa SISVAR for windows (versão demo da UFLA –www.ufla.br).

2.7 – Ensaio III: Efeito dos humatos sobre o desenvolvimento radicular de plântulas de milho (*Zea mays* L.) e sobre as bombas de prótons (H^+ -ATPase de membrana plasmática e vacúolo e Pirofosfatase de vacúolo) isoladas de vesículas de raízes.

Obtenção das plântulas de milho

As sementes de milho (*Zea mays* L., var UENF – 506), obtidas na UENF (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro), Laboratório de Fitotecnia (LFIT), foram esterilizadas por imersão numa solução de NaClO 0,5 % e mantidas em água, por seis horas após a lavagem. Em seguida, as sementes foram acondicionadas em papel e germinadas no escuro a 28°C. As plântulas foram transferidas para um meio mínimo contendo somente $CaCl_2$ 2 mMol L⁻¹. O meio mínimo foi complementado com

humatos obtidos de vermicomposto de esterco (HV1), de esterco + bagaço de cana-de-açúcar (HV2), de esterco + leguminosa (HV3), esterco + bagaço de cana-de-açúcar + leguminosa (HV4) na concentração entre 20 -25 mg C L⁻¹. O pH da solução foi ajustado para 6,0 com solução diluída de NaOH ou HCl. Após sete dias de crescimento nestas soluções, as plântulas foram coletadas. Uma parte das amostras foi utilizada para avaliação do desenvolvimento radicular e outra utilizada para obtenção de vesículas enriquecidas de membrana plasmática e tonoplasto através do fracionamento celular.

Avaliação do desenvolvimento radicular

O desenvolvimento radicular das plântulas de alface foi realizado através da estimativa da área e do comprimento pelo programa computacional de forma descrita anteriormente

Purificação das vesículas de membrana plasmática e de tonoplasto:

A purificação das vesículas de membrana plasmática foi realizada essencialmente como descrito por Façanha e de Meis (1995), onde 4 mL da fração microsomal foram aplicadas sobre um gradiente descontínuo trifásico de sacarose nas concentrações de 30/46 % p/v, para preparação de raízes contendo ainda: Tris-HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 1 mM e DTT 1 mM. O gradiente com a fração microssomal foi submetido a uma centrifugação de 100.000 x g num rotor SW40 (Beckman), durante 3 horas. As bandas contendo MP e tonoplasto foram coletadas e diluídas 3 vezes em água gelada e novamente centrifugadas a 100.000 x g por 40 minutos. O precipitado foi ressuspensão num tampão contendo: glicerol a 10 %, DTT 1 mM , 10 mM de Tris-HCl pH 7,6 e EDTA 1 mM . A proteína total contida na preparação foi dosada pelo método clássico descrito por Lowry et al., (1951).

Determinação da atividade ATPásica de Membrana Plasmática:

A atividade ATPásica foi avaliada pelo Pi colorimetricamente, segundo o método clássico descrito por Fiske & Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada através da adição de ácido tricloroacético (gelado) para uma concentração final de 10 % (v/v). Composição do meio reacional: MOPS-Tris pH 7,0, 50 mM; MgCl₂ 3 a

5 mM, KCl 100 mM, ATP 1 mM e 50 µg de proteína. A hidrólise de ATP representa a atividade sensível a 0,2 mM de vanadato.

Determinação da atividade ATPásica de Vacúolo:

A atividade ATPásica foi determinada pelo Pi colorimetricamente, segundo o método clássico descrito por Fiske & Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada através da adição de ácido tricloroacético (gelado) para uma concentração final de 10 % (v/v). Composição do meio reacional: MOPS-Tris pH 7,0 50 mM; MgCl₂ 3 a 5 mM, KCl 100 mM, ATP 1 mM e 50 µg de proteína. A hidrólise de ATP representa a atividade sensível a bafilomicina 50 nM.

Determinação da atividade Pirofosfatásica:

A atividade pirofosfatásica foi determinada pelo Pi colorimetricamente, segundo o método clássico descrito por Fiske & Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e parada através da adição de ácido tricloroacético (gelado) para uma concentração final de 10 % (v/v). Composição do meio reacional: MOPS-Tris pH 7,0 50 mM; MgCl₂ 3 a 5 mM, KCl 100 mM, PPI 1 mM e 50 µg de proteína.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 10 repetições para análise da área e comprimento radicular e seis repetições para análise da frequência dos sítios de mitose. A preparação microssomal foi obtida com a reunião do restante das raízes, em duas preparações independentes. A análise estatística foi realizada através de análise da variância (ANOVA) e as médias testadas pelo teste de Duncan utilizando o programa SAEG for windows (versão demo da UFV –www.ufv.Br)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Caracterização dos vermicompostos

A Quadro 1 evidencia que a maioria das características químicas dos diferentes vermicompostos é similar, independente do tipo de material orgânico utilizado na vermicompostagem.

Quadro 1 – Caracterização química dos vermicompostos de esterco de curral (V1); esterco de curral + bagaço de cana-de-açúcar (V2); esterco de curral + leguminosa (V3) e esterco de curral + bagaço de cana-de-açúcar + leguminosa (V4).

Vermicomposto	pH em água	C	N	C/N	Ca	Mg	P	K
		g.kg ⁻¹			cmol _c .dm ⁻³		mg.dm ⁻³	
V1	6,3	197	14,9	13,22	16,0	13,8	1064	1140
V2	6,4	288	11,2	25,7	20,3	19,1	2005	1320
V3	6,5	212	15,3	13,85	16,3	19,7	1883	1340
V4	6,4	259	13,9	18,63	15,5	15,4	2284	1920

A relação C/N dos vermicompostos variou de acordo com a fonte do material orgânico utilizado. O V2 obteve uma maior relação C/N devido a quantidade de lignina no bagaço de cana-de-açúcar, enquanto o V1 e V3 tiveram menores relações C/N, devido ao menor teor de carbono, já que a quantidade de N foi similar em todos os vermicompostos.

No Quadro 2 encontra-se a caracterização química da matéria prima utilizada na vermicompostagem.

Quadro 2. - Caracterização química da matéria prima dos vermicompostos.

Matéria prima	N	Ca	Mg	P	K
	g.kg ⁻¹				
Glirícidia	28,81	17,73	5,94	10,84	10,84
Cana-de-açúcar	3,829	0,81	0,78	4,37	4,37
Esterco de curral	20,90	20,36	8,36	17,09	17,09

Aquino (1991), misturando esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 1:1 e 1:3, constatou uma relação C/N de 22 e 37,8, respectivamente e Albanell et al. (1988), encontraram a relação C/N de vermicomposto de esterco bovino igual a 9, corroborando com os dados encontrados.

Silva (1992), verificou que a utilização da mistura para vermicompostagem de esterco bovino + palha de cana-de-açúcar + leucena, na proporção de 1:1:1 (v/v), incrementou o material em 30% de N, reduzindo 56% o uso de esterco, Aquino et al. (1996), verificaram que a mistura contendo esterco bovino + bagaço de cana-de-açúcar + leucena, na proporção de 2:1:1, aumentou somente 2% o valor de N.

Os valores de Ca, Mg, P, K foram similares para todos os vermicompostos. Atiyeh et al. (2002), encontraram para humatos extraídos de vermicomposto de esterco de porco $7,7 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$, $14,00 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$, $2,19 \text{ g.kg}^{-1}$ e $15,46 \text{ g.kg}^{-1}$, respectivamente.

Os teores de substâncias húmicas extraídas dos vermicompostos estão apresentados na Figura 1, mostrando que as diferenças observadas não são significativas.

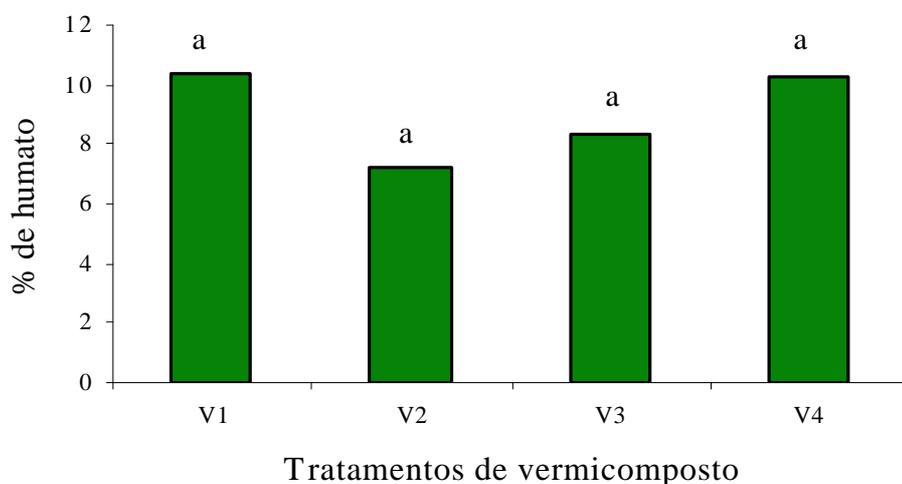


Figura 1 – Humatos (%) extraídos do vermicomposto de esterco de curral (V1); de esterco de curral + bagaço de cana-de-açúcar (V2); de esterco de curral + leguminosa (V3) e de esterco de curral + bagaço de cana-de-açúcar + leguminosa (V4). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.2 – Caracterização química dos humatos

Composição elementar

No Quadro 3 estão apresentados os dados de composição elementar das relações atômicas e grau de oxidação das substâncias húmicas extraídas de vermicomposto de esterco de curral (HV1), esterco de curral + bagaço de cana-de-açúcar (HV2), esterco de curral + leguminosa (HV3) e esterco de curral + bagaço de cana-de-açúcar + leguminosa (HV4).

Pode-se observar que a composição elementar dos humatos é bastante similar, independente do resíduo orgânico utilizado para a vermicompostagem. Os teores de C, H, N e O obtidos nos diferentes humatos estão dentro dos limites normalmente encontrados nas SH alcalino solúveis (AH e AF) por Schnitzer & Khan (1978).

O HV2 apresentou maior conteúdo de carbono e menor de oxigênio em relação aos demais vermicompostos.

As relações atômicas H/C, O/C e C/N podem ser usadas para descrever características estruturais das SH. Assim, HV2 e HV3 obtiveram valores mais elevados na relação H/C, indicando presença de C em grupos alifáticos em maior proporção do que C em grupos aromáticos (Steelink, 1985).

As teorias sobre o processo de humificação foram resumidas por Stevenson (1994) na policondensação de grupos fenólicos oriundos dos resíduos orgânicos, polimerização de açúcares provenientes do metabolismo microbiano e transformação das ligninas. O bagaço de cana-de-açúcar é resíduo enriquecido em ligninas e a formação de SH com maior grau de evolução pode ser consequência direta da maior presença de precursores primários para a sua formação.

Razão E_4/E_6 (espectroscopia na região do visível)

A análise de UV-Vis é amplamente utilizada na caracterização das SH. A razão E_4/E_6 pode ser usada como parâmetro do grau de humificação. Há uma relação inversa entre a razão e o grau de humificação e a massa molecular. Assim pode-se confirmar que os

humatos extraídos do vermicomposto produzidos a partir da mistura de bagaço de cana com esterco apresenta o maior grau de evolução uma vez que apresenta o menor valor para a razão E_4/E_6 . (Quadro 4). Era de se esperar uma relação direta entre os valores da razão E_4/E_6 e os valores da relação atômica H/C uma vez que a presença de estruturas alifáticas conferem valores maiores para a relação atômica indicando menor grau de humificação.

Chen et al. (1977) demonstraram que o parâmetro mais relacionado com a razão E_4/E_6 foi a massa molecular das substâncias húmicas, mais do que a sua composição elementar. No entanto, foi observado que o humato com maior relação E_4/E_6 foi o que apresentou maior valor para relação C/N indicando que o humato produzido com esterco pode apresentar SH com menor grau de evolução. Nessa linha pode-se indicar o humato produzido com mistura de esterco + bagaço de cana (fonte de lignina) + leguminosas (fonte de N) como o mais humificado devido a sua menor relação C/N, H/C e E_4/E_6 . Presença de precursores fenólicos de ligninas e N para reações de polimerização.

Quadro 4. Análise de composição elementar, das relações atômicas e acidez de substâncias húmicas extraídas de vermicomposto de esterco (HV1), vermicomposto de esterco + bagaço de cana-de-açúcar (HV2), vermicomposto de esterco + leguminosa (HV3) e vermicomposto de esterco + bagaço de cana-de-açúcar + leguminosa (HV4).

Propriedade	HV1	HV2	HV3	HV4
C (%)	48,2 ± 0,08 ¹	53,2 ± 0,15	47,3 ± 0,06	48,3 ± 0,23
H (%)	4,84 ± 0,003	5,71 ± 0,024	5,05 ± 0,034	4,40 ± 0,30
N (%)	2,44 ± 0,04	3,01 ± 0,17	2,54 ± 0,034	32,1 ± 0,11
O (%)	44,5 ± 0,043	38,0 ± 0,003	45,1 ± 0,0043	47,3 ± 0,42
C/N	23,0	20,6	21,7	17,6
H/C	1,20	1,29	1,28	1,09
O/H	0,69	0,54	0,71	0,73
W ²	-0,76	-1,17	-0,89	-0,91
E ₄ /E ₆	7,55	5,73	5,94	5,74
Acidez Total (cmol _c .kg ⁻¹)	454,76	188,60	488,10	784,09
Acidez carboxílica (cmol _c .kg ⁻¹)	337,50	122,73	112,27	70,51
Acidez fenólica (cmol _c .kg ⁻¹)	305,36	285,47	375,82	713,58

¹Erro padrão da média; ²W = grau de oxidação

Espectroscopia de IV

A espectroscopia de IV foi usada para caracterizar a presença de grupamentos funcionais nos humatos obtidos dos diferentes vermicompostos. Na Figura 2 são apresentados os espectros de IV que são bastante semelhantes entre si e característicos de substâncias húmicas do tipo 2 (Stevenson, 1994) No Quadro 5 estão apresentadas as possíveis atribuições das bandas de absorção dos espectros de IV dos humatos de vermicomposto.

Quadro 5 – Principais atribuições das bandas de absorção dos espectros de IV dos humatos de vermicopmposto.

Bandas de absorção (cm⁻¹)	Possíveis atribuições
3490 - 3470	? _{as} O – H (H ligado a grupos OH) e/ou N – H
3090 - 3080	? _s C – H de anel aromático
2990 - 2900	? _{as} C – H alifático
1680 – 1640	? C=O de amida (banda 1), quinona e C=O conjugado, ? C=C aromático e/ou ? assimétrico – COO
1570 - 1530	? simétrico COO.
1397 – 1387	d OH e ? OH fenólico, d simétrica C – H de grupos CH ₂ e CH ₃ , ? assimétrico COOH
1275– 1260	? _{as} C – O
1134 - 1095	? C –O de polissacarídeos

Em todos os espectros foi observada uma banda de absorção na região de 3400–3500 cm⁻¹, que pode ser atribuída a estiramentos assimétricos de ligações OH e/ou N-H livre. A largura da banda de absorção é consequência das interações dos sistemas O-H através de pontes de hidrogênio entre moléculas diferentes (pontes intermoleculares) e na mesma molécula (intramolecular). Assim, a presença de bandas de absorção menos definidas e mais alargadas nesta região indica a formação mais intensa de pontes de hidrogênio e intramoleculares, o que pode caracterizar maior complexidade estrutural.

Os espectros de IV dos humatos HV1 e HV2 apresentaram uma absorção adicional (ombro alargado) entre 3080-3090 cm⁻¹ que pode ser atribuído provavelmente a presença de estruturas aromáticas. A banda de absorção em 2900 cm⁻¹, atribuída ao estiramento assimétrico de ligações C-H em sistemas alifáticos, também esteve presente em todos os espectros.

A banda de absorção em torno de 1630-1600 cm⁻¹ pode ser atribuída à presença de grupos C-C aromático em conjugação com grupos C=O, COO e/ou quinonas e esteve presente em todos os humatos. A presença de absorções em 1380 e 1260 cm⁻¹ indica a

possível participação de OH fenólicos e C-O de ácidos carboxílicos (Nakanishi et al., 1962).

A região entre 1300 e 1000 cm^{-1} é denominada como região de “impressão de digital” da molécula, podendo ser usada para comparações inequívocas entre os diferentes humatos (Garcés, 1987), indicando que as diferentes fontes de matéria orgânica podem produzir compostos de mesma natureza química..

O Quadro 6 revela que HV2 possui baixa relação entre as estruturas alifáticas e as de polissacarídeos (IH), sendo que os grupamentos alifáticos são mais hidrofóbicos e menos suscetíveis a oxidação, quando comparados com os polissacarídeos. Assim, o HV2 é o humato menos resistente a degradação e o HV4 é o humato de maior resistência.

O IC representa a relação entre grupamentos aromáticos e alifáticos. Os grupamentos aromáticos caracterizam moléculas mais condensadas e os alifáticos moléculas com cadeias saturadas. O HV2 possui maior IC, indicando maior grau de humificação, já os outros humatos possuem grau de humificação menor. Esses dados reforçam a análise de composição elementar e de espectroscopia na região do UV-vis.

Quadro 6 – Índices de hidrofobicidade e de condensação dos humatos de vermicomposto.

Amostras	Índice de hidrofobicidade	Índice de condensação
HV1	1.31	1.42
HV2	0.51	2.17
HV3	0.99	1.47
HV4	1.71	0.81

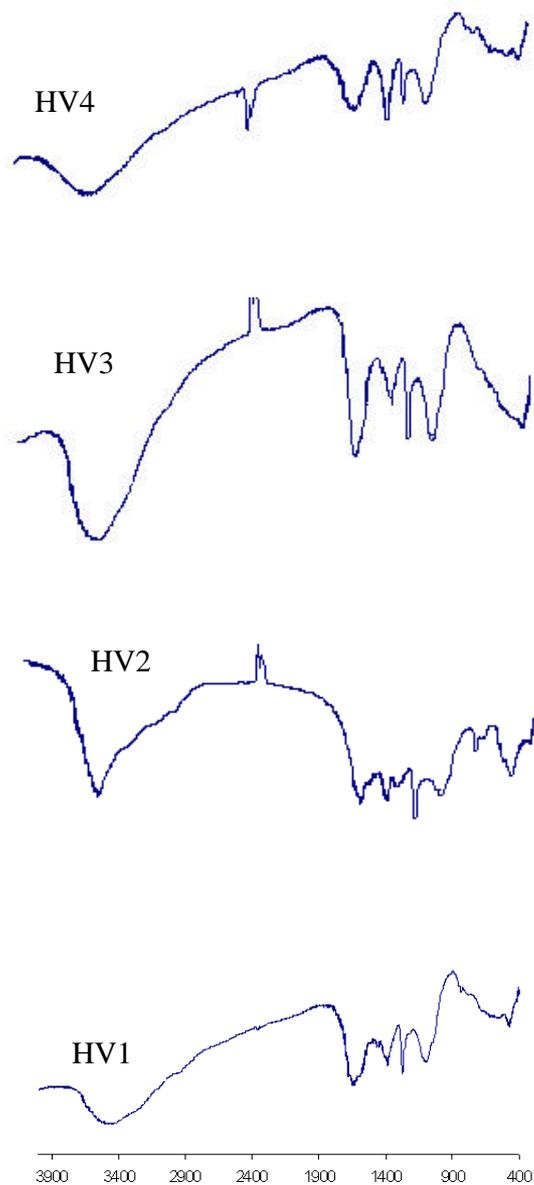


Figura 2 – Espectros de Infravermelho dos humatos: HV1 (vermicomposto de esterco); HV2 (vermicomposto de esterco + bagaço de cana-de-açúcar); HV3 (esterco + leguminosa); HV4 (esterco + bagaço de cana-de-açúcar + leguminosa).

Espectroscopia de Fluorescência

A Figura 3 mostra os espectros de fluorescência sincronizada obtidos de humatos de vermicomposto com excitação fixa em 350 nm e a faixa de emissão entre 290 – 500 nm. Os humatos de HV2, HV3 e HV4 apresentaram espectros similares, caracterizando um pico principal na região de comprimento de onda intermediária, acompanhado por outro ombro fraco na região de comprimento de onda mais curta. O HV1 obteve um único pico na região intermediária.

A elevada intensidade de fluorescência encontrada nos espectros e o curto comprimento de onda indicam a presença de componentes estruturais simples e de baixo peso molecular, baixo grau de policondensação aromática, baixos níveis de cromóforos condensados e baixo grau de humificação.

Ghosh & Schinitzer (1974) extraíram substâncias húmicas de diferentes fontes e observaram que a espectroscopia de fluorescência de excitação revelou bandas características na região de 465 nm independente da origem.

Visser (1983) concluiu que a espectroscopia de fluorescência traz informações sobre as características estruturais das SH e que a intensidade de fluorescência aumenta com o decréscimo da massa molecular e com o aumento do pH.

Miano et al (1988) observaram que a técnica de fluorescência sincronizada serviu para distinguir ácidos húmicos de fúlvicos e mostrar diferenças entre suas origens, apesar de serem fortemente dependentes de pH. O pH pode mudar as características fluorescentes dos grupos funcionais ácidos (fenóis) na molécula orgânica e/ou mudar a conformação da molécula orgânica que expõe diferentes grupos funcionais na solução.

Apesar da espectroscopia de fluorescência possuir maior seletividade e combinar propriedades de espectros de emissão e excitação, outras técnicas, como composição elementar, espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear, devem ser utilizadas em conjunto para caracterizar as SH extraídas dos humatos.

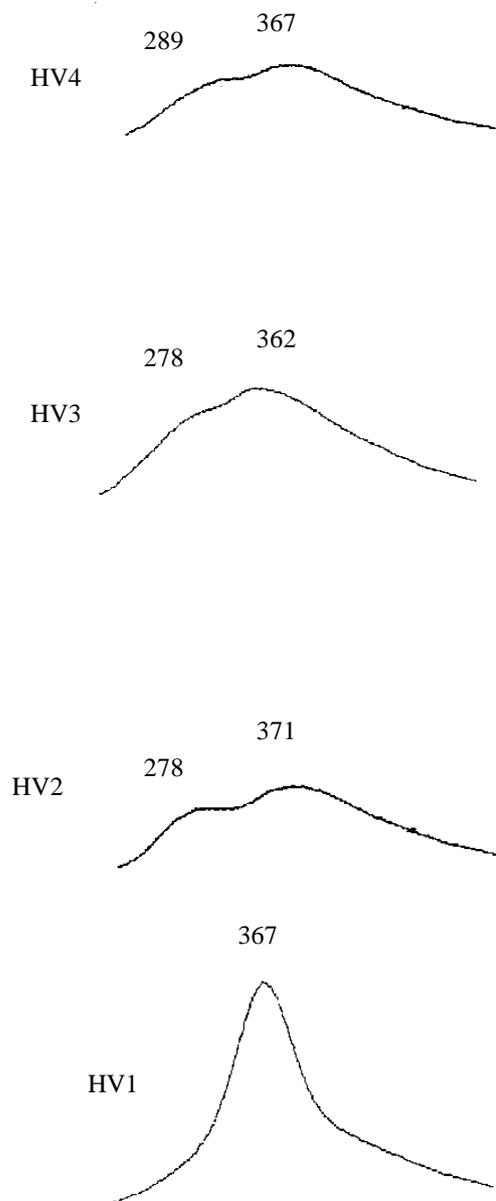


Figura 3 – Espectros de Fluorescência dos humatos: HV1 (vermicomposto de esterco); HV2 (vermicomposto de esterco + bagaço de cana-de-açúcar); HV3 (esterco + leguminosa); HV4 (esterco + bagaço de cana-de-açúcar + leguminosa).

4.3 –Ensaio I - Efeito dos humatos sobre desenvolvimento radicular de plântulas de alface e sobre a atividade de hidrólise de ATP vanadato sensível da fração microsomal isolada de raízes.

Na Figura 4 estão apresentados os incrementos de área e comprimento radiculares de plântulas de alface tratadas com humatos de vermicomposto de esterco de curral (HV1), esterco de curral + bagaço de cana-de-açúcar (HV2), esterco de curral + leguminosa (HV3) e esterco de curral + bagaço de cana-de-açúcar + leguminosa (HV4).

Pode-se observar que as plântulas de alface tratadas com humatos mostraram desenvolvimento radicular significativamente superior em relação ao controle (água).

As plântulas tratadas com humatos extraídos de esterco de curral (HV1) e esterco de curral + bagaço de cana-de-açúcar (HV2) foram as que melhor desenvolveram a parte radicular em relação ao controle. O HV1 apresentou estímulo de 180% para área e 150% para o comprimento total radicular e o HV2 estímulo em 190% e 140%, respectivamente, em relação ao controle.

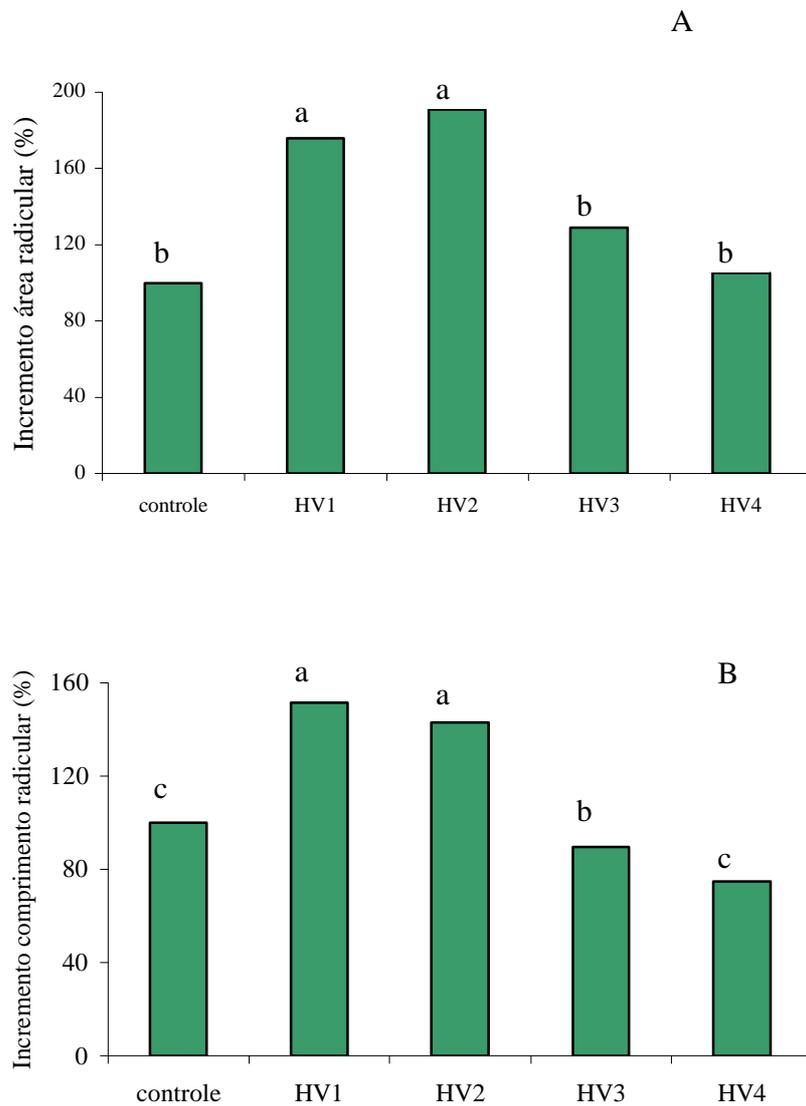


Figura 4 - Incremento na área radicular (A) e no comprimento total de raízes (B) de plântulas de alface tratadas com 20 mg C L⁻¹ de humatos extraídos de vermicomposto de esterco de curral (HV1), de esterco de curral + bagaço de cana de açúcar (HV2), esterco de curral + folhas de leguminosas (HV3) e de esterco de curral + bagaço de cana de açúcar + folhas de leguminosas (HV4). Os valores representam a média de doze repetições (n=12). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan (P<0,05).

Uma das explicações para o estímulo do desenvolvimento de plântulas sob SH é baseado em duas hipóteses: i) ação direta dos humatos nas plantas, funcionando como um hormônio natural, juntamente com a ii)ação indireta no metabolismo dos microrganismos do solo, na dinâmica de absorção de nutrientes do solo e nas condições físicas do solo (Cacco & Dell’Agnola, 1984; Nardi et al., 1988; Albuizio et al., 1989; Chen & Aviad, 1990; Muscolo et al., 1993, 1996, 1999).

Nardi et al. (1999), observaram que a atividade hormonal das substâncias húmicas é maior quando há elevadas quantidades de grupos carboxílicos, corroborando com as características encontradas para HV1 (Quadro 4).

A Figura 5 mostra o estímulo da atividade a vanadato sensível de hidrólise de ATP da fração microsomal extraídas de raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto.

A atividade hidrolítica da fração microsomal a vanadato sensível do HV1, que corresponde em grande parte a atividade de P-ATPase porém não em estrito senso, demonstraram forte estímulo em relação ao controle, porém o HV2 e HV3 inibiram a atividade hidrolítica de ATP. O maior estímulo em HV1 pode ser atribuído a maior relação E_4/E_6 , que indica maior grau de humificação e estabilização comparado com os outros humatos.

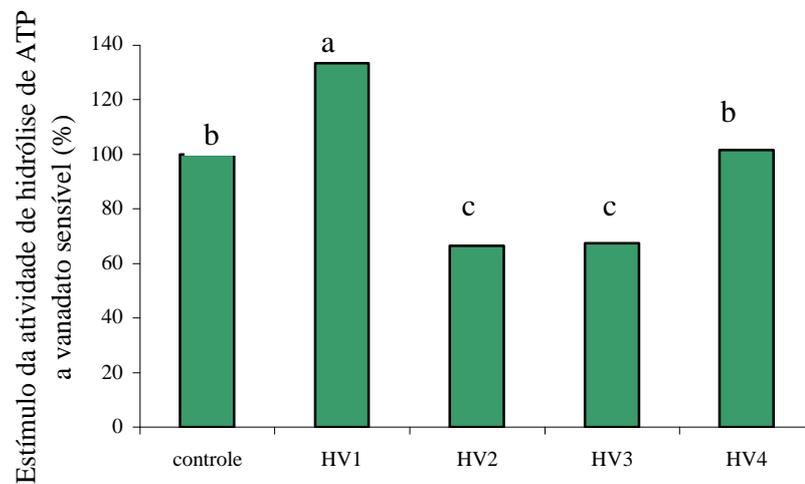


Figura 5 – Estímulo da atividade vanadato sensível de hidrólise de ATP da fração microsomal extraída de raízes de alface tratadas com 20 mg C L⁻¹ de humatos extraídos de vermicomposto de esterco de curral (HV1), de esterco de curral + bagaço de cana de açúcar (HV2), esterco de curral + folhas de leguminosas (HV3) e de esterco de curral + bagaço de cana de açúcar + folhas de leguminosas (HV4). Os valores das médias são referentes a quatro repetições (n=4). As médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste t (P<0,05).

Para Varanini et al. (1993) o efeito estimulatório das substâncias húmicas na nutrição e crescimento de plantas pode ser baseado na ação direta apenas das moléculas húmicas de baixo peso e neste trabalho não houve a purificação das substâncias húmicas.

Porém, para Nardi et al (2002) as SH influenciam no crescimento e no metabolismo das plantas, sendo exclusivamente dependentes de sua concentração, fonte e peso molecular. Essas influências são reflexo da capacidade quelante das substâncias e principalmente da sua atividade hormonal., já que o estímulo das SH sobre a H⁺-ATPase é tido como conclusão simplista quando comparado com a complexa natureza das SH.

As avaliações do desenvolvimento das raízes de plântulas de alface associado ao estímulo da hidrólise de ATP corroboram para demonstrar a influência das substâncias húmicas na extrusão de prótons.

4.4 –Ensaio II – Efeito das doses de humato de esterco de curral (HV1) sobre desenvolvimento radicular de plântulas de alface e sobre a atividade de hidrólise de ATP vanadato sensível da fração microsomal isolada de raízes.

No ensaio I a melhor resposta para o desenvolvimento radicular e estímulo da atividade à vanadato sensível de hidrólise de ATP da fração microsomal foi com humato extraído de vermicomposto de esterco de curral, a partir deste humato foram testadas cinco diferentes doses em plântulas de alface.

A Figura 6 revela que o incremento da área e comprimento radiculares das plântulas de alface em diferentes concentrações.

O melhor incremento foi observado na concentração de 25 mg C.L⁻¹, decrescendo exponencialmente até os 100 mg C.L⁻¹.

As curvas de respostas de crescimento de plantas tratadas com SH encontradas por Chen & Avid (1990) mostraram progressivo aumento das concentrações, porém quando muito elevadas o crescimento diminuiu. Este fato pode ser explicado pela indução da síntese de etileno a altas concentrações de auxina, inibindo o crescimento.

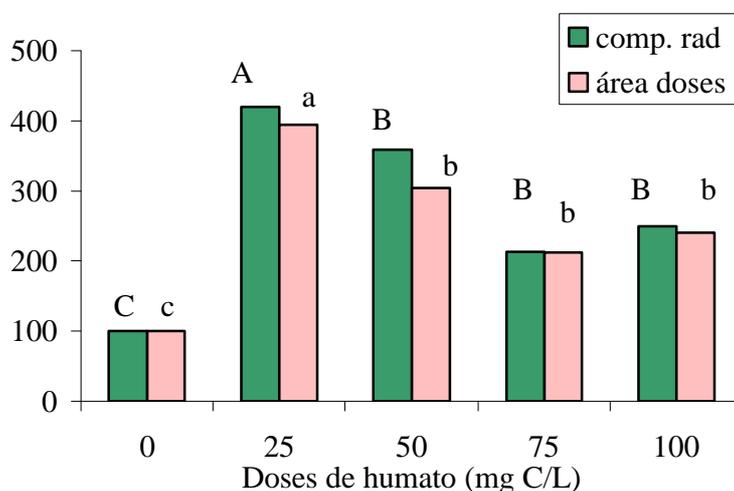


Figura 6– Incremento do comprimento e da área radicular da alface em relação ao controle.

Os valores representam a médias de cinco repetições (n=5). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey (P<0,05).

O acúmulo de massas fresca e seca das raízes das plântulas de alface tratadas com doses de humato foi maior que o controle, apesar de não terem diferido entre si significativamente (Figura 7). O número de sítios mitóticos e de raízes emergidas mostra a indução do crescimento radicular pelas SH (Figura 8).

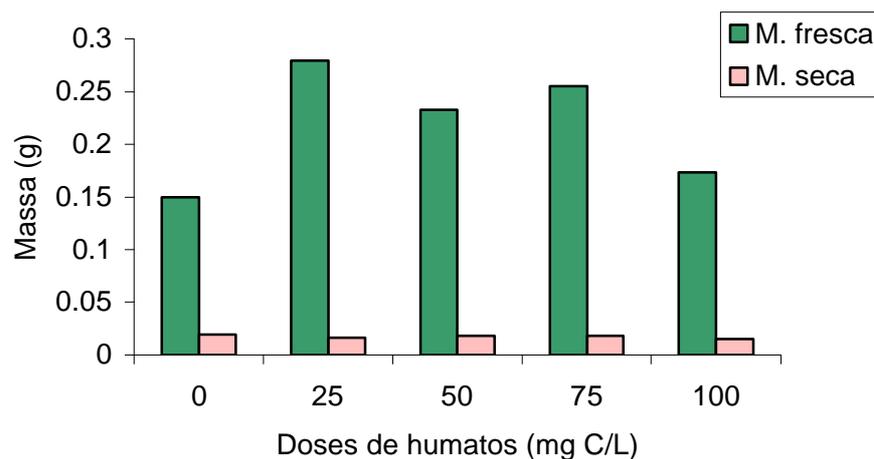


Figura 7 – Massas fresca e seca das raízes de alface em relação ao controle. Os valores representam a médias de cinco repetições (n=5).

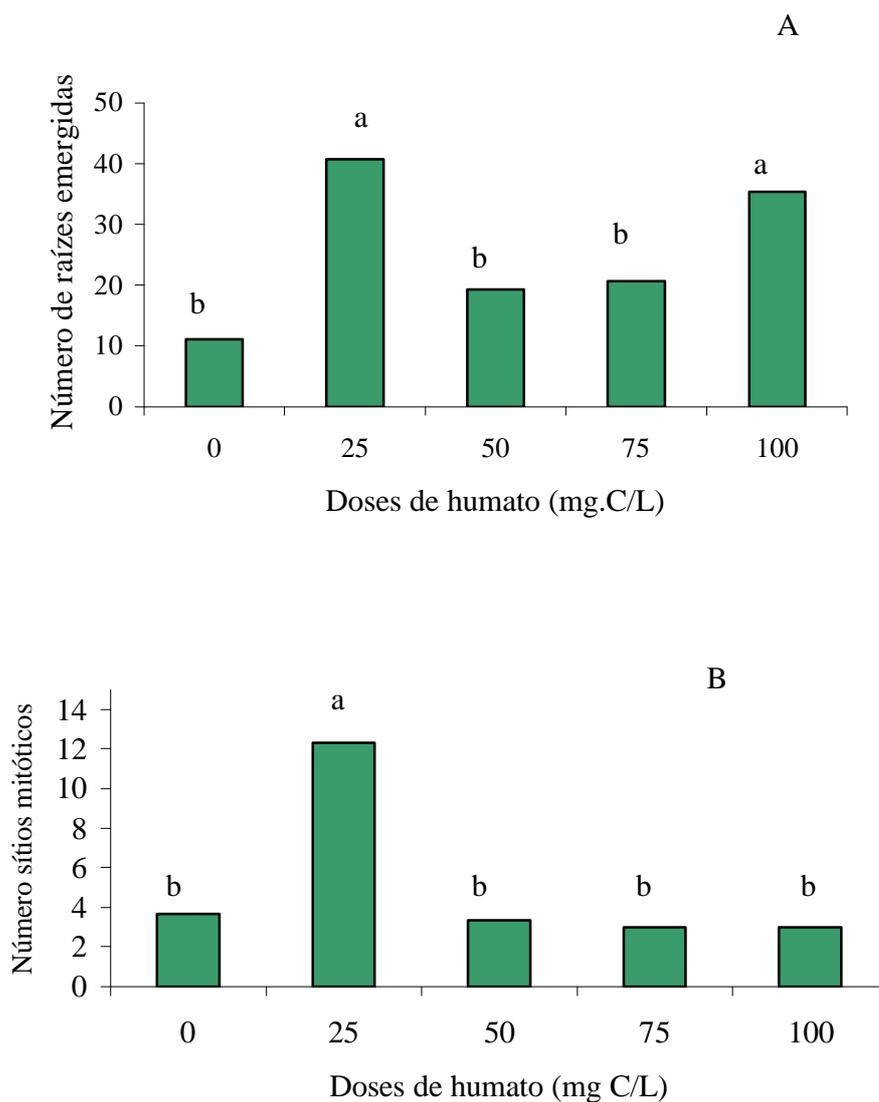


Figura 8 - Número de raízes laterais emergidas (A) e de sítios de mitose (B) em plântulas de alface tratadas humatos extraídos de vermicomposto de esterco de curral (HV1) nas doses de 0, 25, 50, 75, 100 mg de C. L⁻¹. Os valores representam a média de três repetições (n=3). Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey (P<0,05).

O efeito das doses de humatos no estímulo da atividade à vanadato sensível da hidrólise de ATP mostrado na Figura 9, revela a forte indução em torno de 25 mg C.L⁻¹ e um declínio a maiores doses. Pinton et al (1997) aumentaram a concentração das SH nas raízes de aveia de 10 para 50 µg de C. ml⁻¹ e observaram que o estímulo da acidificação extracelular diminuiu, afetando a nutrição das plantas, já que a acidificação do apoplasto possui forte interação com a absorção dos íons

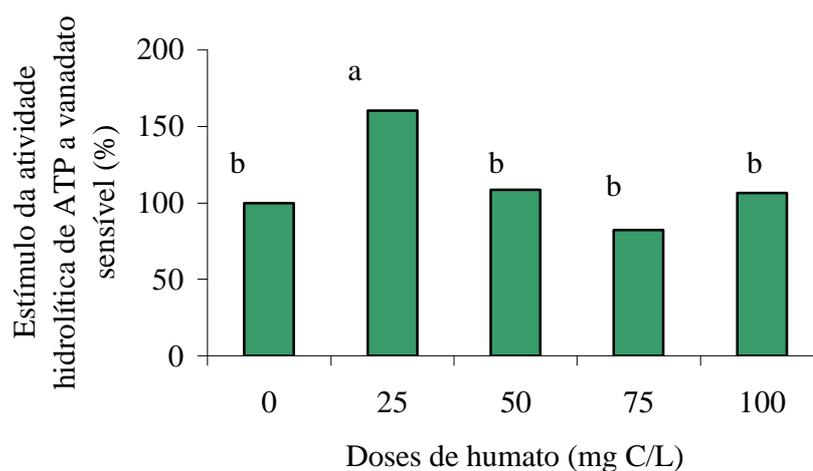


Figura 9 – Estímulo da atividade vanadato sensível de hidrólise de ATP da fração microsomal extraída de raízes de alface tratadas com humato de de vermicomposto de esterco de curral (HV1) em diferentes doses. As médias com mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey (P<0,05).

Adani et al (1998) testaram ácidos húmicos comerciais no crescimento e nutrição mineral de plantas de tomate e observaram que houve aumento na absorção de N, P, Fe e Cu e estímulo no crescimento nas concentrações de 20 e 50 mg .L⁻¹.

Masciandro et al. (1999) usaram substâncias húmicas extraídas de vermicomposto e observaram que os estados nutricional e bioquímico do solo e a produtividade de tomate e aveia foram afetados positivamente.

A matéria orgânica extraída de vermicompostagem possui um produto final com atividade hormonal (Muscolo et al., 1999) . A atividade hormonal é devido, principalmente, a presença de microrganismos no trato digestivo das minhocas, que aceleram o processo de humificação, melhoram a qualidade dos humatos (Dell’Agnola & Nardi, 1987) e podem

atuar indiretamente no crescimento das plantas, inibindo a AIA oxidase, protegendo a auxina da degradação (Mato & Mendez, 1970, Mato et al., 1971, 1972) e pela extrusão de prótons.

Esses resultados evidenciam a hipótese das bombas de prótons serem estimuladas pela ação das auxinas presentes nas SH sobre o desenvolvimento radicular das plântulas. Os grupamentos auxínicos presentes nas SH aumentam a atividade da enzima responsável pelo funcionamento das bombas, a H^+ -ATPase, e exercem forte efeito sobre a acidificação do apoplasto e sobre os sistemas de transportes de íons. Porém, os efeitos das SH sobre as raízes das plantas dependem da concentração.

4.5 - Bioensaio III – Efeito dos humatos sobre desenvolvimento radicular de plântulas de milho e sobre a atividade das bombas de prótons isoladas de raízes.

A Figura 10 apresenta os incrementos de área e comprimento radiculares do milho em a utilização de humatos de ermicomposto de estrco de curral (HV1), esterco de curral + bagaço de cana-de-açúcar (HV2), esterco de curral + leguminosa (HV3), esterco de curral + bagaço de cana-de-açúcar + leguminosa(HV4).

O estímulo promovido pelo humato isolado do vermicomposto de esterco de curral foi de 420% para área radicular e de 380% no comprimento total das raízes em relação ao controle. Foi verificado nesse ensaio um estímulo provocado pelos humatos no número de raízes laterais emergidas. No entanto, o número de sítios de mitose só foi maior que o controle no tratamento com humato de esterco. Canellas et al. (2002) observaram um forte estímulo no número de sítios de mitose em raízes de plântulas de milho por ácidos húmicos isolados de vermicomposto. Esses autores verificaram que o estímulo é dependente do tempo de exposição da plântula a solução de substância húmica sendo maior aos quatro dias de exposição. Aos sete dias, o número de sítios mitóticos foi menor com concomitante aumento do número de raízes emergidas. Esse efeito foi observado também nesse ensaio. Porém, o HV1 além do maior número de raízes laterais emergidas aos sete dias de tratamento promoveu também maior número de sítios de mitose, que indica um potencial de crescimento maior do sistema radicular das plântulas tratadas com esse humato (Figura 11).

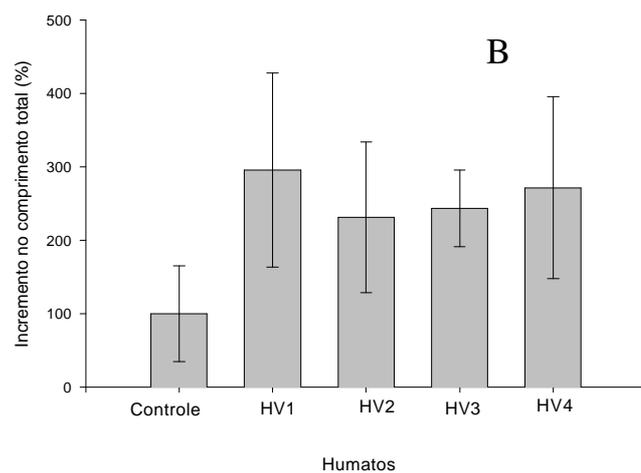
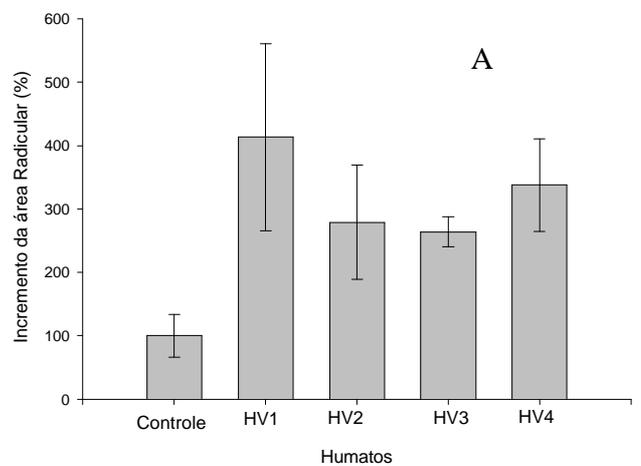


Figura 10 - Incremento na área (a) e comprimento radicular (b) do milho com diferentes humatos de vermicomposto: esterco (HV1), esterco + bagaço de cana-de-açúcar (HV2); esterco + leguminosa (HV3); esterco + bagaço de cana-de-açúcar (HV4)

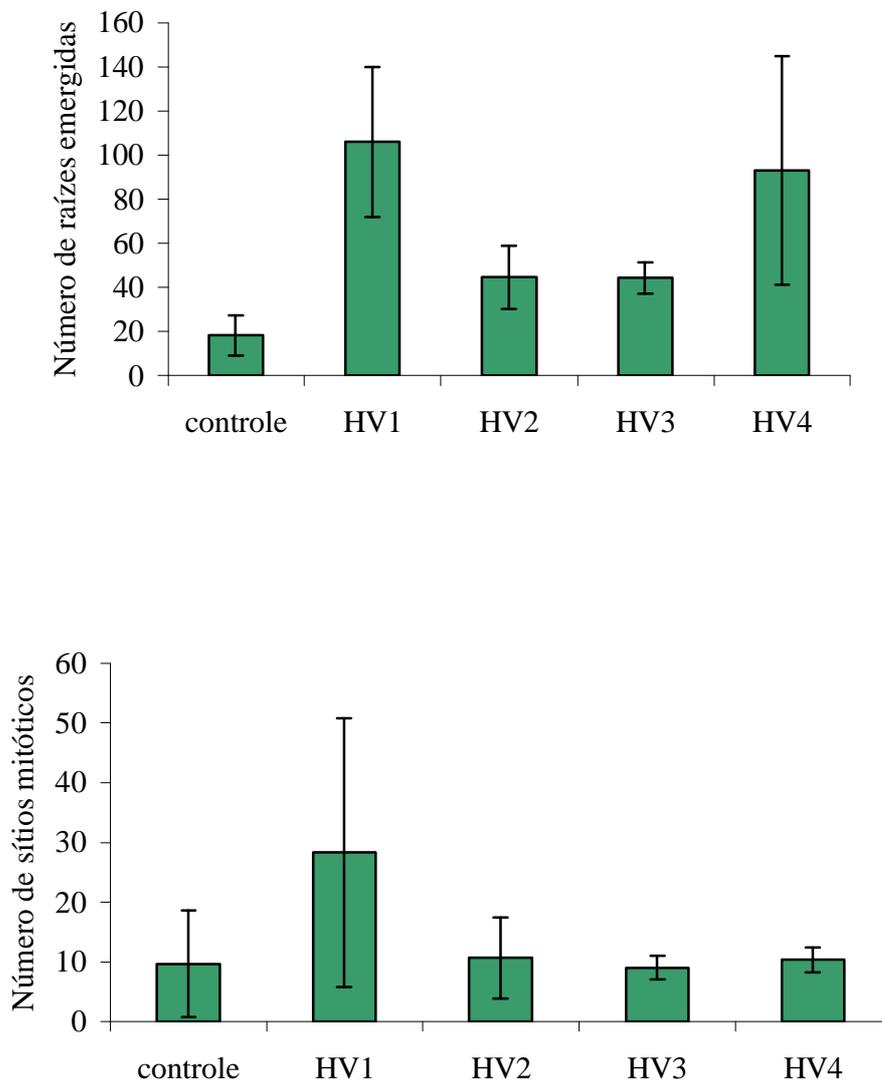


Figura 12 - Número de raízes laterais emergidas (A) e de sítios de mitose (B) em plântulas de milho tratadas por 7 dias com 20 mg C L^{-1} de humatos extraídos de vermicomposto de esterco de curral (HV1), de esterco de curral + bagaço de cana-de-açúcar (HV2), de esterco de curral + leguminosa (HV3) e de esterco de curral + bagaço de cana-de-açúcar + leguminosa (HV4). Os valores representam a média de três repetições ($n=3$) \pm desvio padrão.

As substâncias húmicas influenciam os mecanismos bioquímicos das plantas, como a permeabilidade da membrana plasmática, proteínas carregadoras, ativação da respiração e ciclo de Krebs (Vaughan & Malcolm, 1985), afetam a fotossíntese, formação de ATP, aminoácidos, carboidratos e proteínas, síntese de ácidos nucleicos e possui efeito seletivo na atividade enzimática (Vaughan & Malcolm, 1985), porém há possibilidade das SH se comportarem como reguladora de crescimento das plantas (Bottomley, 1917; Cacco & Dell'Agnolla, 1984; Nardi et al, 1996).

O efeito dos humatos sobre a hidrólise de ATP pelas H^+ -ATPases de membrana plasmática e de tonoplasto e hidrólise de pirofosfato pela PPiase de tonoplasto é mostrado nas Figuras 13 e 14, onde foi verificado forte estímulo sobre a hidrólise de ATP e de pirofosfato pelos humatos, indicando que as bombas de H^+ são um dos principais alvos moleculares envolvidos na ação das substâncias húmicas sobre o crescimento das plantas (Façanha et al., 2002).

A força protomotriz gerada pela atividade das bombas de prótons é responsável pela energização de transportadores de íons fundamentais para absorção de micro e macronutrientes necessários para crescimento vegetal. Além disso, a hidrólise de ATP ou pirofosfato gera uma acidificação necessária para o aumento da plasticidade da parede celular, fenômeno fundamental para a elongação celular.

Assim, há uma possível regulação nas bombas de H^+ pelos humatos. O humato isolado de esterco apresentou maior estímulo na H^+ -ATPase de tipo P do que os outros humatos. Entretanto foi o que menos estimulou a atividade do H^+ -ATPase do tipo V e da PPase ainda que o estímulo foi maior que no tratamento controle. Dessa forma parece haver uma certa compensação na atividade das bombas (Figura 13 e 14).

Os efeitos de promoção de área radicular, número de raízes emergias e estímulo na atividade da H^+ -ATPase do tipo P é característico da ação de hormônios vegetais como as auxinas (Frias et al., 1996). A presença de AIA nas substâncias húmicas foi detectada por Muscolo (1998) e Façanha et al (2002) .

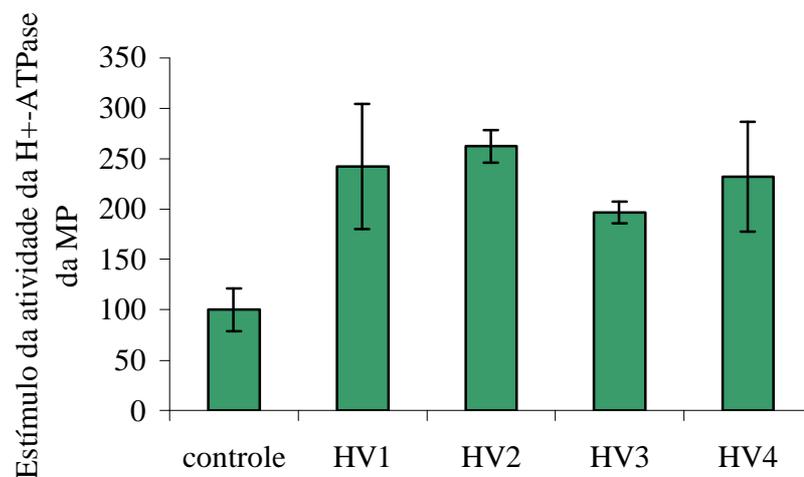


Figura 13 – Estímulo da atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática extraídas de raízes de milho tratadas com 20 mg C L⁻¹ de humatos extraídos de vermicomposto de esterco de curral (HV1), de esterco de curral + bagaço de cana de açúcar (HV2), esterco de curral + folhas de leguminosas (HV3) e de esterco de curral + bagaço de cana de açúcar + folhas de leguminosas (HV4). Os valores representam a média de duas repetições ± desvio padrão.

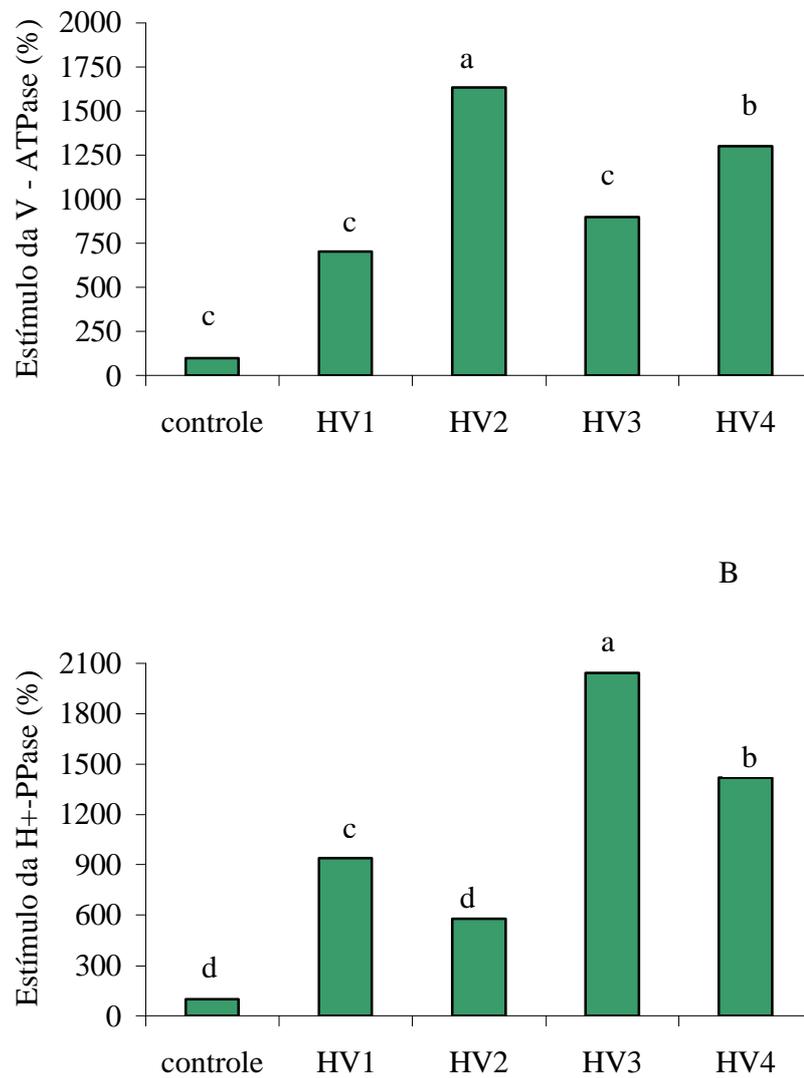


Figura 14 – Estímulo da V-ATPase (A) e da H⁺-Ppase (B) do tonoplasto extraídas de raízes de milho tratadas com 20 mg C. L⁻¹ de humatos de vermicomposto de de esterco de curral (HV1), de esterco de curral + bagaço de cana de açúcar (HV2), esterco de curral + folhas de leguminosas (HV3) e de esterco de curral + bagaço de cana de açúcar + folhas de leguminosas (HV4). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan (P<0,05).

Nardi et al. (1994) reportaram que material húmico produzido por *Apporectodea rosea* e *A. caliginosa* exibiram atividades hormonais parecidas com auxinas, giberelinas e citocininas e Muscolo (1999) extraiu substâncias húmicas da vermicompostagem com *A. rosea* e tratando células de cenoura obteve aumento do crescimento das células e indução de mudanças morfológicas, similar com as obtidas com AIA.

Peltier & Rossegnol (1996) demonstraram “in vitro” que a auxina estimulou a atividade da bomba de prótons isolada de vesículas da MP de tabaco em 20% e o aumento foi observado quando as células vivas foram tratadas com AIA antes da membrana ser isolada, sugerindo que a AIA estimula a ATPase pré-existente. A H⁺-ATPase e a extrusão de prótons são os mecanismos mais afetados pelo AIA (Frankenberger & Muhammad Arshad, 1995).

Exsudados de raízes podem mobilizar nutrientes minerais diretamente pela acidificação da rizosfera, pela solubilização de cátions absorvidos ou precipitados e pela secreção de substâncias quelantes (ácidos orgânicos) que podem aumentar a absorção de nutrientes.

Ácidos orgânicos simples adicionadas a macromoléculas húmicas podem produzir molécula de peso reduzido e liberar íon metálico adsorvido. Moléculas de baixo peso molecular obtidas pelo tratamento de material húmico com ácido acético estimularam a absorção de nitrato bem como a ATPase e atividade hormonal. (Nardi et al, 1991).

Resultados mostram que os ácidos orgânicos entram nas micelas húmicas e alteram o arranjo estereoquímico hidrofóbico (Piccolo et al, 1996). Em condições alcalinas, a carga negativa desenvolvida rompe a configuração aparente da molécula de elevado peso e dispersa o material húmico nas micelas de tamanhos menores (Nardi et al. ,1997). Essas subunidades podem apresentar grupamentos auxínicos, que ao entrarem em contato com as raízes podem ativar a H⁺-ATPase (Façanha et al, 2002).

Com o estímulo da H⁺ - ATPase e a acidificação das paredes celulares, decorrente da extrusão de prótons para a solução do apoplasto, as enzimas que quebram ligações entre polissacarídeo da parede celular, permitem a liberação e o deslizamento das microfibrilas e conseqüentemente a expansão da parede celular.

Neste bioensaio, foram apresentados resultados que ressaltam a possível ação bioquímica das substâncias húmicas sobre o sistema de transporte primário da membrana

plasmática e sobre os efeitos fisiológicos no desenvolvimento das raízes, corroborando com as evidências encontradas por Façanha et al. (2002).

5.CONCLUSÕES

As avaliações dos vermicompostos mostraram que o esterco bovino, em sendo um material nobre para a agricultura, pode ser parcialmente substituído por outro material sem que haja alterações relevantes em suas características químicas. Entretanto, a substituição do material orgânico pode diminuir alguns processos metabólicos.

Os ensaios I, II e III com humatos de vermicompostos demonstraram que as substâncias húmicas influenciam o desenvolvimento radicular e a hidrólise de ATP a vanadato sensível, porém as respostas são dependentes da espécie de planta e das concentrações.

A faixa ótima de concentração de humatos foi entre 20 – 25 mg de C.L⁻¹.

O ensaio III mostrou que as bombas do vacúolo tratadas com humatos não são bons indicadores bioquímicos, devido ao fato das respostas encontradas por cada uma delas.

Mais estudos devem ser feitos na tentativa de encontrar outros indicadores bioquímicos e principalmente de saber o modo exato de ação dos humatos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIA

- Adani, F., Genevini, P., Zaccheo, P., Zocchi, G. (1998) The effect of commercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 21: 561-575.
- Albanell, E.; Plailats, J.; Cabrero, T.; Capellas, M. (1988) Composición química del estiércol de vaca fresco y maduro durante el vermicompostaje. In: CONGRESO DE BIOLOGIA AMBIENTAL. *Acta...* Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, p.247-252.
- Albuzio, A., Nardi, S., Gullim, A. (1989) Plant growth regulator activity of small molecular size humic fractions. *The Science of the Total Environment*, 81/82: 671-674.
- Albuzio, A., Ferrari, G., Nardi, S. (1996) Effects of humic substances on nitrate uptake and assimilation in barley seedlings. *Canadian Journal of Soil Science*, 66: 731-736.
- Almeida, D.L. de (1991) *Contribuição da matéria orgânica na fertilidade do solo*. Tese de Doutorado, Itaguaí, RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 188p.
- Aquino, A.M. (1991) *Vermicompostagem de esterco bovino e bagaço de cana-de-açúcar inoculado com bactérias fixadoras de N₂ (Acetobacter diazotrophicus)*. Tese de Mestrado, Itaguaí, RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 246p.
- Aquino, A.M. (1996) *Vermicompostagem: caracterização da demanda e alternativas de substratos enriquecidos com leguminosas e fósforo*. Tese de Doutorado, Seropédica, RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Atiyeh, R.M., Lee, S., Edwards, C.A., Arancon, N.Q., Metzger, J.D. (2002) The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technology*, 84: 7-14.
- Baker, A., Genty, D. (1999) Fluorescence wavelength and intensity variations of cave waters. *Journal of Hydrology*, 217:19-34.
- Bottomley, W.B. (1917) Some effects of organic-promotion substances (auxinones) on the growth of *Lema minor* in mineral cultural solutions. *Proceedings of the Royal Society of London series B Biological Sciences*, 89: 481 – 505.

- Brasil Ministério da Agricultura (1993) Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Vegetal. *Análise de corretivos, fertilizantes e inoculantes; métodos oficiais*. Brasília, 104p.
- Bremner, J.M. (1965) Organic Nitrogen in Soils. In: Betholomew, W.V., Clark, F. (eds). *Soil Nitrogen*. Madison: American Society of Agronomy, p. 93–132.
- Cacco, G., Dell'Agnola, G. (1984) Plant growth regular activity of soluble humic complexes. *Canadian Journal of Soil Sciences*, 64:225 – 228.
- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Façanha, A.L.O., Façanha, A.R. (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology*, 130: 1951-1957.
- Cavender, N.D., Atiyeh, R.M., Edwards, C.A. (1999) Influence of vermicomposts na arbuscular mycorrhizal infection of *Sorghum bicolor* and plant growth. **2nd International Soil Ecology Conference Abstract**, Chicago, p.23.
- Ceretta, C.A. (1995) *Fracionamento de N orgânico, substâncias húmicas e caracterização de ácidos húmicos de solo em sistemas de cultura sob plantio direto*. Tese de Doutorado, Porto Alegre, RS, UFRGS, 150p.
- Chan, P.L.S., Griffiths, D.A. (1988) The vermicomposting of pre-treated pig manure. *Biological wastes*, 24: 57-69.
- Chen, Y., Senesi, N., Schinitzer, M. (1977) Information provided on humic substances by E₄/E₆ rations. *Soil Science Society of Journal*, 41: 352-358.
- Chen, Y., Aviad, T. (1990) Effects of humic substances on plant growth. In: Maccarthy, P., Capp, C.E., Malcolm, R.L., Bloom P.R (eds) *Humic substances in soil and crop sciences: selected readings*. ASA and SSSA, Madison, p. 161-186.
- Cosgrove, D.J. (1997) Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell*, 9: 1031-1041.
- De Michelis, M.I., Spanswick, R.M (1986) H⁺-pumping driven by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corns roots. *Plant Physiology*, 81: .542-547.
- Dell'Agnola, G., Nardi, S. (1987) Hormone-like effect and enhanced nitrate uptake induced by depolycondensated humic fractions obtained from *Allolobofora rosea* and *A. caliginosa* faeces. *Biology and Fertility of Soils*, 4: 115-118.

- Façanha, A.R., De Meis, L. (1995) Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. *Plant Physiology*, 108: 241-246.
- Façanha, A.R., Façanha, A. R., Olivares, F.L., Velloso, A.C.X.; Braz-Filho, R., Santos, G.A., Canellas, L.P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento de prótons. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 1301-1310.
- Fiske, C.F., Subbarow, Y. (1925) The colorometric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66: 375.
- Frankenberger, W.T., Muhammad arshad, J.R. (1995) *Phytohormones in Soils*. New York: Marcel Dekker.
- Freixo, A.A. (2000) *Caracterização da matéria orgânica de latossolos sob diferentes sistemas de cultivo através de fracionamento físico e espectroscopia de infravermelho*. Tese de mestrado, Seropédica, RJ, Universidade federal Rural do Rio de Janeiro, 77p.
- Frias, I., Caldeira, M.T., Perez, C.J.R., Navarro, A.J.P., Culianez, M.F.A., Kuppinger, O., Stransky, Pages, M., Hager, A.; Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell*, 8: 1533-1544.
- Garcès, G.P. (1997) *Características actuales del humus en los principales tipos de suelos de Cuba*. Tese de Doutorado, Nitra: Universidad De Agricultura de Nitra, 200p.
- Gosh, K., Schinitzer, M. (1974) Molecular structures of humic substances. *Soil Science*, 129: 266-276.
- Haimi, J., Huhta, V. (1987) Comparison of composts produced from identical waster by “vermiestabilization” and conventional composting *Pedologia*, 30: 137-44.
- Hard, P., Hates, W.A., Frankland, J.C., Satchell, J.E. (1988) Vermicomposting of cow slurry. *Pedobiologia*, 31: 199-209.
- Hartenstein, R., Hartenstein, F. (1981) Physicochemical changes affected in activated sludge by the earthworm *Eisenia foetida*. *Journal Environmental Quality*, 10: 377-382.
- Hartenstein, R.; Neuhauser, E.F.; Kapean, D.L. (1979) Reproductive potencial of earthworms *Eisenia foetida*. *Oecologia*, 43: 329-340.
- Kale, R.D., Band, K., Krishnamoorthy, R.V. (1982) Potential of *Perionyx excavatus* for utilizing organic wastes. *Pedobiologia*, 23: 419-425.

- Kononova, M.M. Soil organic matter. (1966) *Pergamon Press*. Oxford. p.103-106.
- Kononova, M.M. (1982) *Materia orgánica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación*. Barcelona: Oikos-tau s.a. 364p.
- Kuwatsuka, S., Tsutsuki, K., Kumado, K. (1978) Chemical studies on soil humic acids. *Soil Science Plant Nutrition*, 24: 337-347.
- Landgraf, M.D., Alves, M.R., Da Silva, S.C., Rezende, M.O.D. (1999) Characterization of humic acids from vermicompost of cattle manure composting by 3 and 6 months. *Química Nova*, v. 22,: 483-486.
- Loquet, M., Vincelas, M. (1987) Cellulolytic and ligninolytic activities in the gut of *Eisenia foetida*. *Revue d'ecologie et de biologie du sols*, 24: 559-560.
- Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Masciandaro G., Ceccanti B., Garcia C. (1999) Soil agro-ecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. *Bioresourse Technology*, 59: 199-206.
- Mato, M.C., Mendez, J. (1970) Inhibition of indolacetic acid oxidase by sodium humate. *Geoderma*, 3: 255-257.
- Mato, M.C., Fabregas, R.; Mendez, J. (1971) Inhibitory effect of soil humic acids on indolacetic acid oxidase. *Soil Biology & Biochemistry*, 3: 285-288.
- Mato, M.C., Olmedo, M.G., Mendez, J. (1972) Inhibition of indolacetic acid oxidase by soil humic acids fractionated in Sephadex. *Soil Biology & Biochemistry*, 4: 469-473.
- Miano, T.M., Sposito, G., Martin, J.P. (1988) Fluorescence spectroscopy of humic substances. *Soil Science Society of American Journal*, 52: 1016-1019.
- Murphy, J.; Riley, J.P. (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 27: 31-36.
- Muscolo, A., Cutrupi, S., Nardi S. (1998) IAA detection in humic substances. *Soil Biology & Biochemistry*, 30: 1199-1201.
- Muscolo, A., Felicim, M., concheri, G., Nardi, S. (1993) Effect of earthworm humic substances on estrase and peroxidase activity during growth of leaf explants of *Nicotina plumbaginiliolia*. *Biology and Fertility of soils*, 15: 125-131.
- Muscolo, A., Panuccio, M.R., Abenavoli, M.R., Concheri, G., Nardi S. (1996) Effect of molecular complexity and acidity of earthworm faeces humic fractions on glutamate

- dehydrogenase, glutamine synthetase, and phosphoenolpyruvate carboxylase in *Daucus carota* cells. *Biology and Fertility of soils*, 22: 83-88.
- Muscolo, A., Bovalo F., Gionfriddo F., Nardi S. (1999) Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biology & Biochemistry*, 31: 1303-1311.
- Nakamura, Y. (1996) Interactions between earthworms and microorganisms in biological control of plant root pathogens. *Farming Japan*, 30: 37-43.
- Nakanishi, K. (1962) *Infrared absorption spectroscopy*. Tokyo: Nankonda, 233p.
- Nardi, S., Armoldim, G., Dell'Agnola, G. (1988) releas of hormone-like activies from *Allolobophora rosea* (Sav.) and *Allolobophora caliginosa* (Sav.) feces. *Canadian Journal of Soil science*, 68: 563 – 567.
- Nardi, S., Concheri, G., Dell'Agnola, G., Scrimin, P. (1991) Nitrate uptake and ATPase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions. *Soil Biology and Biochemistry*, 23: 833-836.
- Nardi, S., Panuccio, M.R., Abenavoli, M.R., Muscolo, A. (1994) Auxin-like effect of humic substances extracted from faeces of *Allolobophora caliginosa* and *A. rosea*. *Soil Biology & Biochemistry*, 26: 1341-1346.
- Nardi, S., Concheri, G., Dell'Agnolla, G. (1996) Biological activity of humus. In: Piccolo, A. (ed), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. p.361-406.
- Nardi, S., Reniero, F.; Concheri, G. (1997) Soil organic matter mobilization by root exudates of three maize hybrids. *Chemosphere*, 35: 2237-2244.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Reniero, F., Muscolo, A. (1999) Biological activity of humic substances extracted from soils under different vegetation cover. *Communication in Soil Science and Plant Analyses*, 30: 621-634.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A. (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 1527-1536.
- Neuhauser, E.F., Hartenstein, R., Kaplan, D.L.(1980) Growth of the earthworm *Eisenia foetida* in relation to population density and food rationing *Oikos*, 35: .93-98.
- Orlando Filho, J., Silva, G.M., Leme, E.J.A. (1983) Utilização agrícola dos resíduos da agroindústria canavieira. In: Orlando Filho, J (ed). *Nutrição e adubação de cana-de-açúcar no Brasil*. Piracicaba: Planalsucar, p. 229-264.

- Piccolo, A., Nardi, S., Conchire, G. (1996) Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids. *European Journal Soil Science*, 47: 319-328.
- Pinton, R., Cesco, S., Santi, S., Varanini, Z. (1997) Soil humic substances stimulated proton released by intact oat seedling roots. *Journal of Plant Nutrition*, 20: 857-869.
- Rayle, D.L., Cleland, R.E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99:1271-1274,.
- Reinecke, A.J., Viljoen, S.A. (1990) The influence of feeding patterns on growth and reproduction of the vermicomposting earthworm *Eisenia foetida* (Oligochaeta). *Biology and Fertility of Soil*, 10: 184-187.
- Santos, G. de A., Camargo, F.A.O. (1999) *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre:Gênesis. 544p.
- Sarruge, J.R., Haag, H.P. (1974) *Análises químicas de plantas*. Piracicaba: Departamento de química – ESALQ. 56p.
- Schinitzer, M., Gupta, V.C. Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Science Society Proceedings*, 27.
- Schnitzer, M., Khan, S.U. (1978) *Soil organic matter*. Amsterdam:Elsevier scientific Publishing, 319p.
- Senesi, N. (1990) Application of electron spin resonance (ESR) spectroscopy in soil chemistry. In: Stewart, B.A. (ed) *Advances in Soil Science*, 14: 77-130.
- Silva, V.F. da (1992) *Vermicompostagem utilizando esterco e palha enriquecida com N e P: processo de produção e avaliação para a cultura da cenoura (Daucus carota L.)*. Tese de Mestrado, Itaguaí, RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 116p.
- Steelink, C. (1985) Implications of elemental characteristics of humic substances. In: Aiken, G.R, Maknight, D.M, Wershow, R.L, Maccarthy, P. (eds) *Humics substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization*. pp.457-476.
- Stevenson, J.F. (1994) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. New York: John Wiley, 443p.
- Szczzech, M., Rodomanski, W., Brzeski, M.W., Smolinska, V.; Kotowski, J.F (1993) Suppressive effect of a commercial earthworm compost on some root-infecting pathogens of cabbage and tomato. *Biological Agriculture and Horticulture*, 10: 47-52.

- Tan, K.H. (1984) *Environmental Soil Science*. New York: Marcel Dekker, p. 255.
- Varanini, Z., Pinton R., De Biase, M.G., Astolfi, S., Maggioni, A. (1993) Low molecular weight humic substances stimulate H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sativa* L.) roots. *Plant and Soil*, 153: 61-69.
- Vaughan, D., Malcolm, R.E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological processes. In: D. Vaughan and R.E. Malcolm (eds.) *Soil Organic Matter and Biological Activity*. Martins Nijhoff Dr W. Junk Publisher, Dordrecht, 37-75.
- Visser, S.A. (1983) Fluorescence phenomena og humic matter of aquatic origin and microbial cultures. In: Christman, R.F., Gessing, E.T (eds) *Aquatic and terretrial humic materials*. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, pp.183-202.