

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

MONIQUE ELLEN FARIAS BARCELOS

**EFEITO DE ÁCIDOS HÚMICOS PROVENIENTES DO LODO DE ESGOTO, SOLO
DE MANGUEZAL E VERMICOMPOSTO EM *Zea mays* L.**

**VITÓRIA
2015**

MONIQUE ELLEN FARIAS BARCELOS

**EFEITO DE ÁCIDOS HÚMICOS PROVENIENTES DO LODO DE ESGOTO, SOLO
DE MANGUEZAL E VERMICOMPOSTO EM *Zea mays* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof^a Dr^a Silvia Tamie Matsumoto

Co-orientador: Prof Dr Leonardo Barros Dobbss.

**VITÓRIA
2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

- B242e Barcelos, Monique Ellen Farias, 1987-
Efeito do ácido húmico, proveniente de lodo de esgoto sanitário, ecossistema manguezal e vermicomposto, sobre resposta fisiológica e bioquímica em cultivar de milho (*zea mays* L.) / Monique Ellen Farias Barcelos. – 2015.
66 f. : il.
- Orientador: Sílvia Tamie Matsumoto.
Coorientador: Leonardo Barros Dobbss.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.
1. Crescimento (Plantas). 2. Lodo residual. 3. Vermicompostagem. 4. *Zea mays* L. I. Matsumoto, Sílvia Tamie. II. Dobbss, Leonardo Barros. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

MONIQUE ELLEN FARIAS BARCELOS

**EFEITO DE ÁCIDOS HÚMICOS PROVENIENTES DO LODO DE ESGOTO, SOLO
DE MANGUEZAL E VERMICOMPOSTO EM *Zea mays* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em 26 de Fevereiro de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Silvia Tamie Matsumoto
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof Dr Leonardo Barros Dobbss
Universidade de Vila Velha
Coorientador

Prof Dr Geral Rogério F. Cuzzuol
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

Prof^a Marcela Ferreira Paes
Instituto Federal do Espírito Santo - IFES
Examinador Externo

Dedico aos meus pais amados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo, pela infraestrutura e ensino a mim concedido.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de mestrado concedida.

Agradeço a Deus por me sustentar durante esta caminhada e me dar forças para nunca desistir.

Agradeço aos meus pais, Zenilda e Jair, por sempre me apoiarem e darem o sustento necessário para mais esta conquista. Sem vocês não conseguiria ir tão longe. Amo vocês.

A professora e orientadora Dra. Silvia Tamie Matsumoto por toda a orientação necessária ao longo destes dois anos de trabalho. Muito obrigada!

Agradeço as minhas cunhadas amadas, Aline e Vanézia por todas as brincadeiras e momentos ao lado de vocês. Com certeza sem o apoio e o amor de vocês não chegaria tão longe. Obrigada também por gerarem minhas preciosidades e isso me fazem amá-las cada dia mais. Obrigada pela Brenda, Pedro e Ester (*in memoriam*).

Agradeço ao meu sobrinho amado Thales, por ser tão compreensivo e entender a minha falta de tempo ao longo destes dois anos. Seu amor me conforta.

Obrigada aos meus irmãos, Marco Aurélio e Fábio, por me suportarem e amarem tanto. As brigas e conflitos diários são detalhes perto do amor que sinto por vocês!

Obrigada a minha querida amiga Georgette, sem sua orientação jamais teria entrado no mestrado. Você é muito especial na minha vida, obrigada por mudar minha vida de uma forma tão delicada e generosa. Obrigada!

Agradeço a equipe do GEMUT (Ian Drumond, Ian Martins, Lívia e Edvar), sem a colaboração de vocês não teria desempenhado tão bem o trabalho. Obrigada Equipe!

Obrigado especial aos meus amigos queridos Leonardo, Dayanna, Tatiane e Vinícius que para mim são respectivamente “velhin, menina day, menina tati e vini balada”. Obrigada por todo o companheirismo, conversas, apoio, amor, equipe...etc. Obrigada por serem o que são, e estarem tão presentes na minha vida, um beijo especial ao nosso “Amigos do Ananas”. Muito obrigada!

Em especial também a minha amiga Amanda Bertolazi, que me ajudou e muito nas análises em Campos dos Goytacazes (UENF), sem você com certeza não teria conseguido desempenhar tão bem o trabalho. Obrigada pelo seu acolhimento, e por me suportar por tanto tempo...e lá se vão quase 10 anos. Obrigada ao Lucas por me apoiar também e ceder espaço na casa de vocês.

Obrigada a minha amiga Monique Barbosa que mesmo em momentos de exaustiva pressão não me deixou cair. A casa queda fazemos o impulso para levantar e seguir sempre! Obrigada Amiga!!!

Obrigada aos professores Dr. Alessandro Coutinho e Dr. Arnaldo Façanha, por cederem espaço no laboratório na UENF para desempenhar as análises.

Obrigada ao prof e co-orientador Dr. Leonardo Dobbss por suas orientações e conversas. Muito Obrigada!

Aos meus amigos muito obrigada pela dedicação e compreensão pela minha falta de tempo. Sem esse amor e carinho jamais teria conseguido chegar até aqui. Vocês com certeza fazem parte desta jornada e desta vitória na minha vida.

Agradeço a TODOS do programa do PPGBV, a todos os colegas, a todos os momentos de risadas, conversas, bate-papo...etc. Com certeza existe reciprocidade neste enorme carinho que recebi ao longo deste período. Obrigada por suportarem minhas cantorias e som alto pelos corredores. Em especial a NOSSA BETH, amigona, companheira, dedicada...com certeza cada projeto, artigo, tcc, dissertação e tese tem suas mãos de forma indireta! Você é muito especial!!!!!! Amo vocês!

Obrigada aos professores do programa do PPGBV, por me auxiliarem quando necessário e pelas aulas. Com certeza obtive enorme enriquecimento profissional e pessoal ao lado de vocês. Muito obrigada!

Ao amigo Sandro dos Santos Lemos, da CEDERJ/UERJ pela contribuição pedagógica e críticas construtivas ao meu trabalho.

Enfim, deixo aqui os meus sinceros agradecimentos a TODOS que passaram e prevaleceram na minha vida ao longo destes dois anos.

RESUMO

O Húmico desempenha um papel importante na a fertilidade e estrutura dos solos. O lodo pode ser utilizado com biofertilizante e contribuir na redução dos custos dos agricultores com adubos fosfatados e nitrogenados, e incrementar a acumulação de nutrientes no solo. Os ácidos húmicos (AH) isolados de vermicomposto aumentam a capacidade de troca catiônica do solo e a liberação de nutrientes para as plantas, promovendo o crescimento vegetal. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas, anatômicas e bioquímicas de plantas de *Zea mays* L. tratadas ou não com AH extraído de lodo de esgoto, ecossistema manguezal e vermicomposto, avaliando se a origem do AH influencia na sua bioatividade. Os resultados obtidos demonstram que respostas significativas no crescimento inicial, teor pigmentos fotossintéticos e densidade estomática foram obtidas em plantas tratadas com a concentração de 1 mMC L⁻¹ AHLE, sendo que tal estímulo não foi detectado na atividade hidrolítica das bombas de H⁺ de membrana plasmática (P-H⁺-ATPase).

Termos para indexação: *Zea mays* L., crescimento vegetal, lodo de esgoto, vermicomposto.

ABSTRACT

The humic plays an important role in the structure and fertility of the soil. The sludge can be used as a bio fertilizer and contribute to the reduction of costs for farmers with phosphate and nitrogen fertilizers, and increase the accumulation of nutrients in the soil. Humic acid (HA) isolated from vermicompost increase the cation exchange capacity of the soil and the release of nutrients to the plants, promoting plant growth. The aim of this study was to evaluate the physiological, anatomical and biochemical responses of *Zea mays* L. plants treated or not with HA extracted from sewage sludge, mangrove ecosystem and vermicompost, assessing whether the source of the HA influence on their bioactivity. The results show that significant responses in early growth, photosynthetic pigments content and stomatal density were obtained in plants treated with the concentration of 1 mM C L^{-1} AHLE, and such stimulus was not detected in the hydrolytic activity of the plasma membrane proton pumps (P-H⁺-ATPase). On the other hand, PPases activity were significantly activated by the treatments.

Index terms: *Zea mays* L., plant growth, sewage sludge, vermicompost.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 MATÉRIA ORGÂNICA.....	15
2.2 LODO DE ESGOTO	15
2.3 ECOSSISTEMA MANGUEZAL.....	18
2.4 USO DO VERMICOPOSTO EM LANTAS.....	19
2.5 ACIDOS HUMICOS E SEUS EFEITOS FISIOLÓGICO EM PLANTAS	21
2.6 <i>Zea mays</i> L. COMO PLANTA TESTE	23
2.7 ANÁLISE DE CRESCIMENTO E DENSIDADE ESTOMÁTICA DO CULTIVAR.....	24
2.8 BOMBAS DE PRÓTONS EM CÉLULAS VEGETAIS.....	25
3 OBJETIVOS	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 AMOSTRAGEM DO MATERIAL	29
4.2 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO HÚMICO E SUBSTANCIAS HUMICAS	29
4.3 CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS	29
4.4 ÁREA DE ESTUDO	30
4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS	30
4.5.1 CRESCIMENTO INICIAL DE <i>Zea mays</i> L. COM TRATAMENTO DO ACIDO HUMICO.....	30
4.6 ANÁLISE DE CRESCIMENTO	31
4.7 DENSIDADE ESTOMÁTICA.....	31
4.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PIGMENTOS	31
4.9 BOMBAS DE PRÓTONS EM CÉLULAS VEGETAIS	32
4.9.1 OBTENÇÃO DAS VESÍCULAS DO PLASMOLEMA.....	32
4.9.2 ATIVIDADE HIDROLÍTICA H ⁺ -ATPase TIPO P	33
4.9.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	33
4.10 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO	33
5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

RESULTADOS	44
Artigo 1: Respostas Fisiológica e bioquímicas de milho exposto à ácidos húmicos provenientes de três diferentes fontes	44

1 INTRODUÇÃO

A alta produtividade de resíduos sólidos no Brasil, bem como a sua disposição, seja para descarte ou reutilização, é muito discutida. A principal destinação de resíduos ainda são os aterros sanitários, que por muitas vezes, não atendem os padrões ambientais para tal descarte (PIRES, 2008).

O lodo de esgoto sanitário é um resíduo sólido, gerado a partir de processo de tratamento do efluente sanitário, havendo em sua composição elevada carga de matéria orgânica e nutrientes com alto risco à saúde pública, e ao meio ambiente (BADERNA et al., 2011).

O lodo vem sendo bem difundido em espécies, como culturas de milho e eucalipto. Essa disposição em cultivares é uma alternativa promissora (MARIA et al., 2007). A aplicabilidade de lodo de esgoto em cultivares agrícolas, na forma de fertilizante ou condicionador do solo é crescente. O uso destes resíduos, em meio agrícola, tem sido recomendado por proporcionar benefícios agronômicos tais como, elevação do pH do solo, redução da acidez potencial e aumento da disponibilidade de macronutrientes (BERTON; CAMARGO; VALADARES, 1989; DA SILVA et al., 2001; SIMONETE et al., 2003).

A aplicação de lodo de esgoto em áreas degradadas também é uma prática de disposição final, para melhorar as características físicas, químicas e biológicas dos solos, com melhoria de infiltração, retenção de água e areação, redução da erosão e a consequente melhoria da qualidade dos recursos hídricos entre as variáveis químicas, físicas e biológicas que afetam a estrutura dos solos (ALAMINO, 2010; KOCSSIS; DE MARIA, 2004; TSUTYA; BETTIOL; CAMARGO, 2000).

A matéria orgânica é apresentada como um complexo de substâncias, na qual a dinâmica é baseada pela adição de resíduos orgânicos de diversas naturezas e por uma transformação contínua sob ação de fatores biológicos, químicos e físicos (FONTANA et al., 2001).

O processo de vermicompostagem acelera a decomposição dos resíduos orgânicos, a partir do momento que o resíduo orgânico passa pelo trato digestivo da minhoca e pela ação de enzimas, converte de forma eficiente o resíduo em substâncias húmicas. O uso de vermicomposto já é estabelecido que existam melhorias na estruturação e armazenamento de água, propriedades físicas, químicas além da capacidade de troca catiônica, regulação do crescimento de plantas, este último muito semelhante à ação de hormônios como auxina e giberelinas (RODDA et al., 2006).

O Ecossistema Manguezal, juntamente com a Restinga, são ecossistemas recentes em escala geológica, sendo constituído por um sistema ecológico localizado em meio de interfaces, meio marinho e fluvial. É composto por comunidades de plantas que sofreram adaptações a determinadas condições de salinidade e alagamento. O solo dos Manguezais é predominante hidromórficos com presença de sais, podendo ou não apresentar tiomorfismo ou grande acúmulo de matéria orgânica (GOMES, 2002). A matéria orgânica (MO) do Manguezal é apresentada como uma alternativa de reciclagem, e estudos do funcionamento e do comportamento dessa substância dentro do Ecossistema (ROCHA et al., 2009).

O húmus ou matéria orgânica (MO), contida no solo, possui papel fundamental na agregação de solos e sedimentos, controle de acidez, ciclo de nutrientes e eliminação de compostos indesejáveis (DA SILVA, 2001)

O material proveniente destas transformações pode ser dividido em dois grupos: Substâncias não húmicas, constituído por proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, ácidos graxos e outros compostos orgânicos de características físicas e químicas bem definidas. O segundo são as Substâncias Húmicas (SH), origina-se da oxidação e polimerização da MO, na qual é uma mistura heterogênea de moléculas polidispersas, sendo classificadas em ácidos fúlvicos (AF), ácido húmico (AH) e humina (MESSIAS, 2004). A reatividade da MO é determinada pelo seu alto teor de grupos funcionais contendo oxigênio (hidroxilas, carboxilas, cetonas, ésteres e éteres) (DA SILVA, 2001).

Os Ácidos Húmicos contribuem para solubilização de fósforo além de apresentarem capacidade de adsorção de metais pesados, servindo de tampão da solução, além de servir como reserva de nutrientes às plantas, fornecendo uma restauração a sustentabilidade, assim o AH proveniente de diferentes áreas influencia no crescimento e desenvolvimento do vegetal (CANELLAS et al., 2002; DE ARAUJO SANTOS, 1984; SIQUEIRA et al., 1990)

Os AH podem obter diferença em sua composição, justamente pelas unidades moleculares disponíveis presentes no ambiente durante a formação, todos apresentam as mesmas características e propriedades semelhantes, grupos COOH e OH fenólicos (FERREIRA, 2006).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Matéria Orgânica

A constante utilização de matéria orgânica em locais agrícolas é devido à necessidade de uma destinação adequada para sua reciclagem. Os resíduos podem ser divididos em dois grupos distintos: um composto pela fração não-humificada, como os restos vegetais e animais, pelos compostos orgânicos de característica bioquímica definida. E outro, grupo formado pelas substâncias humificada (CANELLAS et al., 2001).

A MO é apresentada como um complexo de substâncias, na qual a dinâmica é baseada pela adição de resíduos orgânicos de diversas naturezas e por uma transformação contínua sob ação de fatores biológicos, químicos e físicos (FONTANA et al., 2001). É evidente a larga deposição de resíduos orgânicos em áreas agrícolas, devido à alta concentração de nutrientes e matéria orgânica que proporcionam ao vegetal nutrientes e capacidade de armazenar água (CALDEIRA et al., 1999).

Os resíduos orgânicos vêm sendo fundamental para ligar ao solo de maneira ordenada com o intuito de minimizar a geração de resíduos, possibilitando sua ciclagem. Essa prática é muito utilizada em países como Estados Unidos, Holanda, Austrália entre outros. Sendo difundida mundialmente, essa disposição atua como uma alternativa de fertilização/condicionador de solo (CALDEIRA et al., 1999).

2.2 Lodo de Esgoto

O Lodo de esgoto é proveniente do tratamento de água para abastecimento de público, ETE (Estação de Tratamento de Efluente), por meio do processo de coagulação e floculação do soluto a ser tratado, finalizando-o em material solubilizado ou agregados, que por via de decantação, forma-se o lodo ao fundo. Nas ETE, as águas residuais são geradas com baixa carga poluidora, denominada de lodo ou biossólido, é composto por matéria orgânica, nutrientes e alguns

elementos com potencialidade tóxica (GALDOS; DE MARIA; CAMARGO, 2004; GUERRA; ANGELIS, 2005; NAGASHIMA et al., 2010)

O processo convencional para tratamento do lodo de esgoto é baseado em processo físico-químico e biológico. O primeiro é fundamental para adsorção e precipitação de floculados, não havendo degradação de substâncias contaminantes proporcionando geração de uma fase sólida (lodo) contaminada que posteriormente irão passar pelo processo biológico com bactérias anaeróbias e aeróbicas ou facultativas, no entanto existe uma deficiência na remoção de compostos recalcitrantes necessitando longos períodos de processo (PACHECO; PERALTA-ZAMORA, 2004)

O lodo de esgoto possui uma mistura, média, de água (99,9%) e sólidos (0,1%) dependendo do seu tipo de tratamento e sua procedência, uma vez que o tratamento de esgoto resulta na produção de um lodo rico em nutrientes, apresentando composição variável, na qual um lodo típico possui em torno de 40% de matéria orgânica, 4% de nitrogênio, 2% de fósforo e os demais macro (Mg, S e Ca) e micronutrientes (B, Cu, Fe, Zn, Mo, Cl, Co, Si, Mn e Na). A qualidade da matéria orgânica está relacionada com a densidade populacional, hábitos sanitários, condições ambientais, perfil da comunidade que produz o lodo a partir do sistema de tratamento existente (FERNANDES, 1999; ALAMINO, 2010;).

É constituído de matéria orgânica e de nutrientes, em que a sua aplicação ao solo pode trazer benefícios à agricultura, no entanto o lodo pode conter resíduos químicos e patógenos que podem causar danos a saúde e ao meio ambiente, havendo necessidade de critérios e procedimentos para o seu uso, em áreas agrícolas, conforme a resolução CONAMA 375/2006 (PACHECO; PERALTA-ZAMORA, 2004).

O uso do lodo na agricultura é uma alternativa inovadora, podendo agir como corretor da acidez do solo, contribuir para a adubação e assim reduzir a utilização de fertilizantes inorgânicos pelos agricultores (CARVALHO; BARRAL, 1981; DA SILVA et al., 2001). No entanto, o lodo pode apresentar quantidades significativas de poluentes químicos e orgânicos, podendo ocasionar em uma adição direta, de

inúmeros patógenos e substâncias químicas, ao solo e assim atingindo a cadeia alimentar. Além de outro fator alarmante, com relação à composição do resíduo em diferentes épocas e regiões ao longo do ano, acarretando na dificuldade de monitoramento dos possíveis contaminantes químicos e patógenos (SAITO, 2007).

O lodo pode contribuir para redução de gastos com fertilizantes, em principal fosfatado e nitrogenado, além do retorno ao solo parte dos nutrientes “exportados” as cidades. Contudo, pode apresentar em sua composição metais pesados, tais como: Cd, Zn, Mn, Cu, Cr, Ni e Pb, que possuem capacidade bioacumulativa na cadeia trófica, limitando assim o uso de lodo de esgoto como fertilizante, quando que adotados por anos sucessivos podendo haver poluição do ambiente com os metais pesados (DA SILVA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2001).

A destinação, do lodo, é aplicada seguindo recomendações da normativa técnica NBT 10.004 (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1985), que é responsável por dar classificações ao resíduo sólido em seus diferentes níveis de periculosidade, avistando os riscos ambientais e saúde pública. Diante disso, os lodos provenientes do sistema de tratamento de água são definidos como resíduos sólidos e devem ser tratados por meio de critérios definidos pela resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente, que determina o lançamento de efluentes ou qualquer fonte poluidora em corpos d’água. Essas medidas impedem que haja lançamento do lodo produzido sem tratamento, sendo passível de descarte em aterro sanitário.

A grande vantagem do lodo de esgoto é o fornecimento de nutrientes que podem estar contidos ou ligados ao seu conteúdo orgânico, podendo ocasionar a manutenção ou elevar o teor de matéria orgânica no solo (PIRES, 2008). Além de humificar, existem fatores que não enfatizam as vantagens para a disposição deste resíduo, tais como: o pouco conhecimento da composição e características do material orgânico contido no resíduo, embora não encontrado microorganismos patogênicos em grandes quantidades que possam proporcionar problemas sanitários, os resíduos urbanos podem se tornar um grande cofator de contaminação do solo proveniente de metais pesados (PIRES, 2008).

BELL e colaboradores (1991) observaram que após uma aplicação, de lodo de esgoto, em larga escala e proporção espacial havendo um aumento de metais pesados no solo, principalmente cádmio em fração trocável podendo obter o risco de incorporação do elemento na cadeia alimentar.

No entanto, o solo submetido a degradação ambiental tende a perder a estrutura original, por haver fracionamento de agregados em unidades menores e aumento de microporos e na densidade do solo, iniciando o processo de degradação das propriedades físicas, podendo essa estabilidade dos agregados ser um indicador da degradação ou da recuperação da qualidade do solo (VEGA et al., 2004).

2.3 Ecossistema Manguezal

O Ecossistema Manguezal é constituído por uma comunidade de vegetal em área contíguas ao mar. Apresentam características periodicamente inundáveis por meio da entrada e saída de marés e podem sofrer variação de salinidade, sendo influenciado pelo regime de marés, sendo esse aspecto um cofator de grande transição entre os ambientes marinho terrestre e água doce, além de grande deposição de sedimentos e matéria orgânica. Os mangues são formados por comunidade vegetal arbórea que desenvolve adaptações anatômicas e fisiológicas para sobreviver e reproduzir neste ambiente (DA SILVA, 2001; ROSSI; MATTOS, 2002).

O Manguezal é o ecossistema que possui alta relevância como fonte de alimentos, compostos fitoterápicos e combustível. Além de permanência no local de inúmeros nichos que vários animais usam como habitat para alimentação, reprodução, desova, crescimento e proteção contra predadores. Esse ecossistema possui um papel importante de estabilização ambiental, funcionando como barreira natural contra inundações, erosão e ação das ondas. Além de funcionarem como despoluidores, havendo mobilização de metais pesados nas plantas e no solo (GOMES, 2002).

Os sedimentos possuem característica autóctone ou alóctone, havendo depósito de frações finas devido à baixa atividade no ambiente. O manguezal é encontrado em

regiões subtropicais e tropicais, estando presente em 118 países e cerca de 75% dos manguezais estão concentrados em apenas 15 países (CINTRÓN MOLERO; SCHAEFFER NOVELLI, 1983; GIRI et al., 2011). No Espírito Santo, os manguezais, possui distribuição desde o extremo norte, na foz do Riacho Doce, até o Rio Itabapoana, divisa com o Estado do Rio de Janeiro.

Devido à elevada densidade populacional, no litoral brasileiro, e com isso, o aumento da industrialização são fatores que colaboram com o elevado impactos ambientais que afetam os manguezais. De forma antrópica, o constante impacto é com a presença de aquicultura, atividade portuária, agricultura, urbanização e especulação imobiliária com construções de torres para linhas elétricas, aterros sanitários, rodovias entre outros. Além de fenômenos naturais que causam inúmeros distúrbios, atuando de forma direta ou indireta sobre o manguezal, podendo alterar sua estrutura e distribuição (VARJABEDIAN; SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

2.4 Uso do Vermicomposto em plantas

O processo de humificação é um processo químico e biológico, em condições aeróbias, que converte o húmus em dióxido de carbono e água. Do contrário, em condição anaeróbia, para-se a degradação e a matéria orgânica são parcialmente degradada e denominada de substâncias húmicas. Este último, é a parte da matéria orgânica que após diversas transformações permanece no ambiente por meio de uma mistura heterogênea polifuncional, e diante da solubilidade em água as SH são divididas em ácidos fúlvicos (AF), ácidos húmicos (AH) e humina (FU) (CANELLAS et al., 2001; DA SILVA, 2001; RAUEN et al., 2002).

Segundo KIEHL (1985) e VIERA (1993) o húmus são as fezes das minhocas e de acordo com MARTINEZ (1991), o húmus é um pó granulado fino, escuro e sem-cheiro, rico em macroelementos cruciais a planta como N, P, K, Mg e S, e possui bactérias fixadoras de N₂.

A vermicompostagem apresenta estabilização dos resíduos que, ao passarem pelo trato digestivo das minhocas, sofrem reações enzimáticas transformando

rapidamente o resíduo em substância húmica, rica de compostos aromáticos e polissacarídeos (RODDA et al., 2006).

O uso de vermicomposto aumenta na capacidade de troca catiônica, pela geração de cargas elétricas negativas, ocasionando em uma liberação lenta de nutrientes para a planta e conseqüentemente aumentando o número de microrganismos no solo (CAVENDER; ATIYEH; EDWARDS, 1999). Este composto também promove o crescimento da planta, quando a SH é isolada a partir do vermicomposto, sendo comumente comparadas as ações das auxinas e giberelinas.

A aplicabilidade do vermicomposto em locais agrícolas é principalmente em culturas tropicais, nas quais processam a matéria orgânica mais rapidamente no solo. Assim, a MO é um componente de extrema importância, atuando como fonte de nutrientes para o vegetal (ALVES; PASSONI, 1997). Além de ser uma fonte alternativa para suprir o uso de fertilizantes químicos (SCHUMACHER et al., 2001).

Assim, a vermicompostagem acelera a decomposição dos resíduos orgânicos, a partir do momento que o resíduo orgânico passa pelo trato digestivo da minhoca e pela ação de enzimas, converte de forma eficiente o resíduo em substâncias húmicas. O efeito do uso de vermicomposto já é estabelecido que existam melhorias na estruturação e armazenamento de água, propriedades físicas, químicas além da capacidade de troca catiônica, regulação do crescimento de plantas (RODDA et al., 2006).

O revestimento vegetal como fonte principal de adubação, permite que a planta cresça com maior resistência, além de restaurar o ciclo biológico natural do solo, diminuindo a infestação de pragas e uso de agrotóxicos. O húmus produzido pelas minhocas é 70% mais rico em nutrientes do que o húmus convencional, apresentando vantagem de ser neutro e ajudam na correção do pH do substrato (LONGO, 1987; CALDEIRA, 1999).

2.5 Ácidos Húmicos e efeitos fisiológicos em plantas

Os ácidos húmicos (AH) são provenientes das substâncias húmicas, que por sua vez, é o resultado da dinâmica de transformação de resíduos orgânicos, biomassa, e polimerização de compostos orgânicos até a formação de macromoléculas que resistam à degradação biológica. Os ácidos húmicos é uma fração, que de acordo com sua solubilidade, insolúvel em meio fortemente ácido (FERREIRA, 2008). Os resíduos de plantas sofre uma transformação, por microorganismos, dando formação a compostos nitrogenados, açúcares, polifenóis e produtos de decomposição da lignina que por sua vez, dão formação as substâncias húmicas (Figura 1).



Figura 1: Aparato da formação das Substâncias Húmicas (Modificado de Stevenson, 1994).

O AH, é a fração dentro das SH solúvel em meio básico e insolúvel em meio ácido, havendo precipitação e coloração escura. São utilizados em avaliações das condições do meio onde estão localizados, são mais estudados pela facilidade de isolamento mesmo possuindo uma complexa estrutura química, havendo diferentes tamanhos em sua estrutura molecular podendo agregar outros compostos orgânicos tais como, carboidratos, lipídios, proteínas, agrotóxicos entre outros compostos inorgânicos como íons, argilas, óxidos e hidróxidos metálicos (Figura 2) (FERREIRA, 2008).

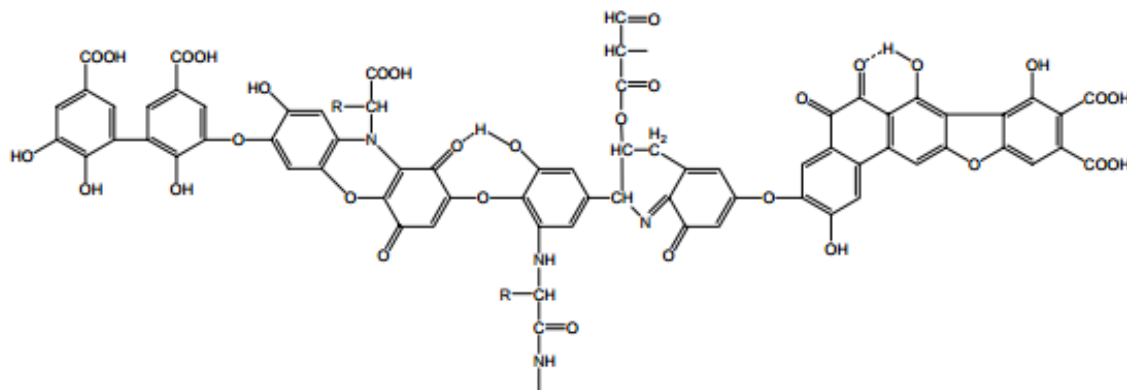


Figura 2: Modelo estrutural do Ácido Húmico, proposto por Stevenson em 1982. Modificado.

A junção de AH com compostos inorgânicos possui propriedade tensoativa química, com capacidade de mobilização de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, e alta capacidade de biorremediação e descontaminação de solos através de estudos comprovados de dose dependente, na qual o aumento de AH fornece uma chance de aumentar a solubilidade e assim facilitar a biodegradação (PICCOLO, 2002; KE et al., 2009).

Essa associação de blocos moleculares é uma interação fraca que pode ser desfeita com utilização de solventes anfifílicos como soluções aquosas de ácido acético. Diante disso, teria a explicação sobre a função do hormônio de crescimento de plantas, que são estimuladas pelo AH e a excreção de ácidos orgânicos de pequenos pesos moleculares, como exemplo ácido acético, feita por raízes de plantas (PICCOLO; CONTE, 2000).

Este modelo de associações, húmicas, foi através de forças de Van der Waals, que baseado em experimentos obtidos por cromatografia de exclusão de baixa pressão, havendo assim a determinação do tipo de ligação e do tipo de sítio da matéria orgânica que os íons faziam a ligação, no caso íons vanadilo de AH naturais e sintéticos para formar grandes blocos moleculares. Nos dois casos houve a constatação de que as estruturas complexas formavam-se pela união de grupos salicilatos das estruturas dos blocos moleculares menores (BUDZIAK, 2002).

Os AH favorecem o desenvolvimento radicular, acúmulo de nutrientes e a biossíntese de clorofilas, por meio do mecanismo de formar agregados moleculares heterogêneos e estabilizados por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Além da promoção de crescimento por indução foliar. Em estudos com abacaxi, o AH foi uma estratégia viável para aclimação, podendo promover maior crescimento e reduzindo o longo período para a transferência das plantas para o cultivo em campo (BALDOTTO et al., 2009).

Relações de crescimento de cultivares e substâncias húmicas, denotam um crescimento progressivo em relação ao nível de concentração das SH, porém pode ocasionar diminuição no crescimento quando expostas a altas concentrações de SH (CHEN & AVIAD, 1990).

A interação da baixa concentração com a alta atividade das SH é decorrente de uma ação direta sobre o cultivar/planta, a partir de efeitos hormonais, atividade enzimática, juntamente com uma relação indireta sobre o metabolismo de microorganismo do solo e absorção de nutrientes do solo e melhoramento das condições físicas do solo, além do aumento da captação de íons metálicos (aumento da capacidade de troca catiônica) e aumento da permeabilidade celular (ATIYEH et al., 2002; AYUSO et al., 1996).

2.6 *Zea mays* L. como planta teste

O cultivo do milho (*Zea mays* L.) é um dos mais tradicionais cultivados e amplamente utilizados pelo homem e animais, possui grande interesse agrônomo, além de ser uma importante matéria-prima para a indústria. Possui alta relevância em relação ao valor de produção agropecuária, área plantada e volume produzido. O milho faz parte da família Poaceae, é amplamente conhecido como cultivar bem sucedido em ambientes adversos, devido ao seu crescimento rápido (MELO et al., 2007; SEVERINO; CARVALHO; CHRISTOFFOLETI, 2005).

O milho é um cultivar de característica de clima tropical, necessita de calor e umidade para produzir de forma satisfatória e haver rendimentos compensadores. Possui grande importância econômica brasileira, sendo cultivado em praticamente

em todo o território. A melhor exploração do poder produtivo do milho é diante do aumento da densidade populacional. Na qual se tem o desenvolvimento de cultivares com menor porte, folhas menores, e mais eretas, fazendo com que a agricultura obtenha uma melhor produtividade (ALMEIDA et al., 2000; PINOTTI, E.B. & RYAL, 2006; CATUNDA, 2008).

Diante de estudos no Brasil, foi evidenciado que em culturas de milho é um produto que revela uma perspectiva animadora, havendo para este cultivar um potencial de substituição de fertilizantes minerais (OLIVEIRA et al., 1995). Além de responder melhor aos estímulos das substâncias húmicas e por haver muitos estudos com o vegetal com relação a promoção do crescimento e bioatividade (FAÇANHA et al., 2002).

2.7 Análise de Crescimento e Densidade Estomática do cultivar

A análise de crescimento vem sendo empregada para o entendimento da função dos componentes estruturais das plantas, pelo método de acompanhamento do crescimento do cultivar, de forma total, e a distribuição dos órgãos durante o crescimento. Além de ser um método descritivo, para o padrão de crescimento ou de suas partes, permitindo comparações e dinâmica da produção fotossintética obtendo como resultado o desempenho do sistema assimilatório em decorrência do período cultivado (CARDOSO et al., 1988; CONCEIÇÃO; LOPES; FORTES, 2005; MOROZESK, 2014; NOGUEIRA; CONCEICAO, 2000).

O modelo não destrutivo é importante para o estudo do desenvolvimento do cultivar por meio de dados durante o ciclo biológico, possuindo valores primários relativos à altura da planta, diâmetro do caule e área foliar, este é comumente utilizado para estudos de fenômenos ecológicos em resposta ao crescimento a adaptação de espécimes dentro de Ecossistemas adversa. Essas alterações anatômicas são decorrentes da proteção da planta contra o tipo de estresse envolvido ou induzido, podendo haver alterações na densidade estomática, alongação celular e expansões de regiões de crescimento (MELO et al., 2007; SEGATTO et al., 2004; CARDOSO et al., 2006).

2.8 Bombas de Prótons em células vegetais

As bombas de prótons são proteínas, de membrana, que realizam transporte de íons como H^+ ou Ca^{2+} , e funcionam a partir da hidrólise de moléculas de ATP, ocasionando um gradiente ao transportar íons contra o gradiente de concentração, efetuando um transporte ativo dos prótons na membrana da célula, fazendo-se o uso de compostos ricos em energia e objetivo manter a composição iônica intracelular (importação de solutos, balanço da pressão osmótica de ambos os lados da membrana e manutenção do potencial da membrana celular). Para que haja absorção, é necessário um transporte secundário de H^+ , no qual os solutos são transportados via membrana a favor de uma gradiente eletroquímica, vinculado a uma combinação do H^+ com íon. Este último é denominado de transporte secundário de H^+ , onde a energia necessária é decorrente da força próton-motriz, proveniente do ATP realizada pelas H^+ -ATPases (BERTOLAZI, 2013; CATUNDA, 2008; MORSOMME; BOUTRY, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2002)

A H^+ -ATPase, presente na membrana plasmática das plantas, possui a função de transportar íons e moléculas por meio de transporte ativo, pelo gradiente de pH e potencial elétrico. Utilizando o ATP como substrato para bombear prótons pela membrana plástica para o apoplasto, sendo assim constituída por uma cadeia polipeptídica de 100kDa, aproximadamente, podendo dar formação a dímeros. Estas H^+ -ATPase formam um gradiente de pH e um potencial elétrico através da membrana, exercendo funções de acidificação da parede celular, plasticidade e expansão celular (AZEVEDO, 2006; SZE; LI; PALMGREN, 1999).

As ATPase do tipo P são divididas em grupos baseando-se na seleção de íons que transportam, estas são envolvidas no transporte de metais pesados como Cd^{2+} , Cu^{2+} e Hg^{2+} , estas enzimas transportam vários cátions sendo reguladas pela concentração do substrato (ATP), pH e temperatura. Podendo ser ativadas/desativadas pelos hormônios, resposta a luz, ataque de patógenos etc. Esse mecanismo é auto-inibitório na região C-terminal da cadeia polipeptídica agindo como um mecanismo regulatório da atividade de bomba de prótons (Figura 3) (AZEVEDO, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2002).

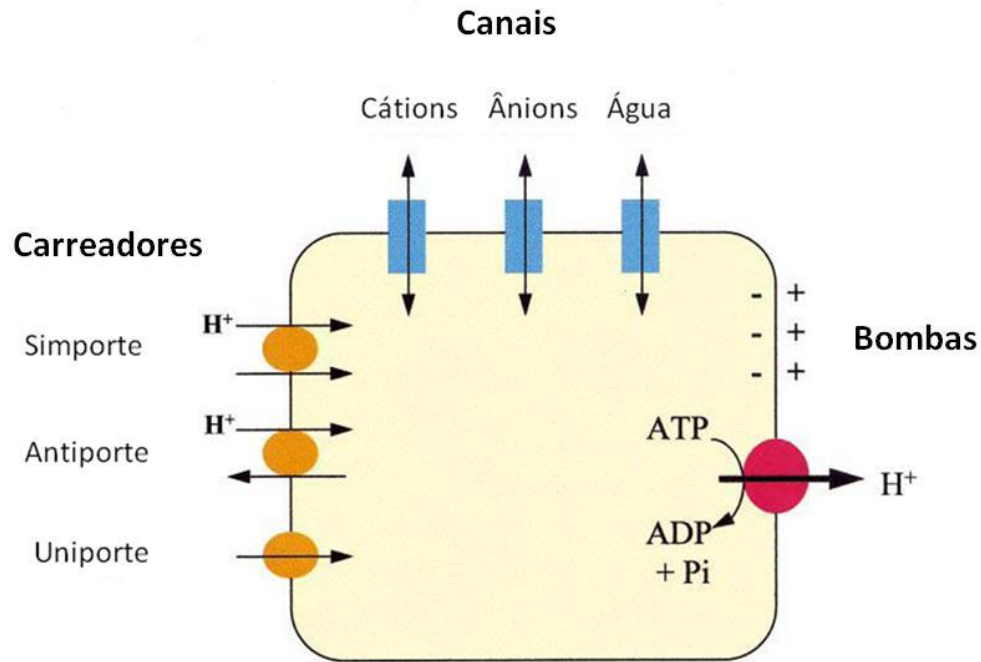


Figura 3: Esquema demonstrando transporte primário e secundário através de membranas biológicas de células vegetais. Fonte: Adaptado de Morsomme & Boutry, 2000.

A H⁺PPase tem papel importante para o metabolismo energético, na qual o pirofosfato (PPi) é um sub-produto natural decorrente de inúmeras biossínteses. O PPi é hidrolisado pelas PPases, favorecendo as polimerizações biossintéticas ao promover a diminuição da concentração citoplasmática deste material. Existem inúmeras PPases associadas à membrana de bactérias fotossintéticas, à membrana interna mitocondrial, e a membrana vacuolar (tonoplasto) (Figura 4), esta última é uma enzima transportadora de prótons, composta por um polipeptídeo de 73 kDa e possui aproximadamente 770 resíduos de aminoácidos. Não possui inibidores específicos, mas é muito sensível a altas concentrações de vanadato e fluoreto, e a baixas concentrações de pirofosfato inorgânico (AZEVEDO, 2006).

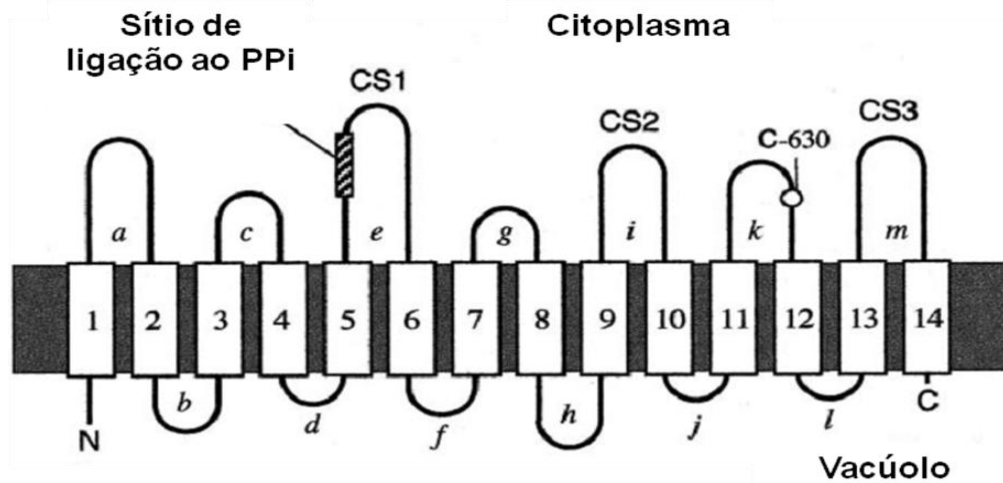


Figura 4: Modelo estrutural da H^+ -PPase de ervilha, com quatorze domínios transmembrana, indicação do sítio de ligação do PPI e dos segmentos conservados CS1, CS2 e CS3 (Adaptado de Maeshima, 2000).

O aparato bioquímico do vegetal possui finalidade de promover a desintoxicação intracelular, uma vez que as moléculas dos compostos químicos são translocadas para o interior do citoplasma via transporte de membrana. Esse processo é dependente de um gradiente eletroquímico gerado por transportadores primários de prótons (H^+) (OGLIARI et al., 2009).

A fração microssomal, é constituída por vesículas de membranas provenientes da plasmalema e do tonoplasto, na qual as enzimas principais responsáveis pela catálise da hidrólise de ATP é a H^+ -ATPase, na membrana microssomal é possível observar a hidrólise do pirofosfato (PPi), que é catalisada pela pirofosfatase translocadora de prótons (H^+ -PPase), em vegetais as condições fisiológicas e estresse pode fazer com que o pirofosfato assumo o papel de ATP, sendo um doador de energia. A H^+ PPase é funcional na energização dos transportes secundários da membrana vacuolar (RAMOS; ANTÔNIO, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos ácidos húmicos, proveniente do lodo de esgoto sanitário, Ecosistema Manguezal e Vermicomposto, em plântulas de *Zea mays* L. sobre os aspectos anatômicos, morfológicos e bioquímicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar alterações morfofisiológicas e bioquímicas, tais como: análise de crescimento e teor de pigmentos fotossintetizantes em plântulas de milho submetidas a diferentes concentrações de ácidos húmicos oriundos dos substratos orgânicos;
- b. Avaliar a atividade das enzimas H^+ -ATPase e H^+ -PPase em resposta à aplicação de diferentes concentrações de ácido húmico isolados de diferentes substratos orgânicos;
- c. Analisar a densidade estomática das folhas de plântulas de milho submetidas aos tratamentos supracitados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM DO MATERIAL

E amostras de lodo de esgoto foram coletadas no Centro de tratamento de resíduos de Vila Velha, Espírito Santo, Brasil ($20^{\circ}27'28''\text{S}$ e $40^{\circ}23'21''\text{O}$) (ROCHA, 2014), de acordo com os procedimentos de amostragem e condicionamento especificados na Norma Brasileira para Amostragem de Resíduos Sólidos ABNT NBR: 10007.

Amostras de ácido húmico do Manguezal, da localidade ($20^{\circ} 14' \text{ S}$ a $20^{\circ} 17' \text{ S}$ e $40^{\circ} 16' \text{ W}$ a $40^{\circ} 20' \text{ W}$), da Estação Ecológica Municipal Ilha do Lameirão (EEMIL) (TORRICO, 2011) e Vermicomposto foram cedidas pelo Laboratório de Ecologia e Matéria Orgânica da Universidade Vila Velha,ES.

4.2 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO HÚMICO DAS SUBSTÂNCIAS HUMICAS

Após a coleta do solo proveniente do Lodo de Esgoto Sanitário, Manguezal e Vermicomposto foi feita secagem e peneiramento do solo e lodo separadamente. Foram realizadas extrações, primeiramente, das substâncias húmicas pelo método recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), fazendo-se uso de solução de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, em razão sólido:solvente 1:10 (m:v). Após a separação de duas frações Humina (decantada) e Substâncias Húmicas (suspensão), a solução em suspensão foi acidificado com HCl a 6 mol/L^{-1} e o pH ajustado entre 1,0 – 1,5 induzindo o processo de floculação. A fração decantada, ácido húmico, foi seco em estufa e depois ressolubilizado com NaOH e pH ajustado a 7 e posteriormente dialisado com membrana de 14 KDa e liofilizados.

4.3 CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS

A determinação da composição elementar via analisador elementar automático (Leco, CHNS 932, Alemanha), a porcentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio total. Sendo utilizadas as concentrações de ácido húmico de lodo de esgoto $0,5 \text{ mMC L}^{-1}$, 1 mMC L^{-1} , 2 mMC L^{-1} , 4 mMC L^{-1} (ROCHA, 2014), melhor dosagem para

vermicomposto pela literatura 1,85 mMC L⁻¹ (GOULART, 2013) e Ecossistema Manguezal 6,76 mMC L⁻¹ (TORRICO, 2011).

4.4 ÁREA DE ESTUDO

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e as análises foram feitas em laboratório no Setor de Botânica (-20° 16' 29.46"S e -40° 18' 17.04"O), Departamento de Ciências Biológicas/CCHN, localizado na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), campus Goiabeiras, Vitória, ES.

4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.5.1 Crescimento inicial de *Zea mays* L. com tratamento de ácido húmico

Sementes de *Zea mays* L. (Híbrido Embrapa - BR 206), foram utilizadas para o experimento. As sementes foram descontaminadas com NaClO (1%) por 30 minutos e colocadas em água deionizada por 3 horas. As sementes foram germinadas em papel filtro e mantidas no escuro, em câmara germinativa, em temperatura média de 28°C. Plântulas, com aproximadamente 0,5 cm, foram transferidas para vasos, sendo oito por tratamento em sistema de hidroponia, contendo solução de Hoagland e utilizando-se compressores de ar para aeração (HOAGLAND; ARNON, 1950), modificada para ½ força molar, com presença ou ausência (controle, submetidas apenas à solução nutritiva) das diferentes concentrações de Ácido Húmico. O pH foi ajustado entre 5,8 – 6,0.

Após os 15 dias de experimento, três repetições de cada tratamento, foram encaminhadas para a Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF, localizada em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, e mantidas para aclimação por três dias em casa de vegetação, para posteriores análises de ATPase e Gradiente de Próton.

4.6 ANÁLISE DE CRESCIMENTO

Após o término do experimento (15 dias) foram coletadas de forma aleatória 10 plantas de cada tratamento. Foram mensurados a altura, área foliar total utilizando Area Meter (LI-COR 3100) massa fresca e seca (estufa 60°C), medições de diâmetro e comprimento das raízes e enumeração dos números de folhas.

Com tais medidas foram determinadas a razão de raiz e parte aérea (MSR/MSPA) e comprimento específico de raiz (CR/MSR). A partir da massa seca foi possível calcular a biomassa acumulada na parte aérea (MSPA/MST) e na raiz (MSR/MST) conforme metodologia descrita por HUNT (1982) e ROCHA e colaboradores (2009).

4.7 DENSIDADE ESTOMÁTICA

Para cada tratamento, foram retiradas cinco amostras aleatórias de folhas para análise de densidade estomática. Foram confeccionadas lâminas no momento da coleta, com o auxílio de uma cola instantânea universal (TEK BOND), em uma lâmina histológica. Cinco campos ópticos, totalizando cinquenta campos analisados por indivíduo as impressões abaxiais e adaxiais.

4.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PIGMENTOS

A folha basal mais expandida foi coletada de cinco plantas de cada tratamento. Um disco de 1,00 cm² foi feito com perfurador e retirado de cada folha, imerso em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), posteriormente colocados em banho-maria a 70°C por 30 minutos, no escuro (HISCOX; ISRAELSTAM, 1979). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, EUA) em absorvâncias de 480, 645, 663 nm. Os teores de pigmentos foram baseados nas equações de Lichtenthaler e Welbum (1983) pelas fórmulas:

$$\text{Chl } a = [(12,7.A_{663}) - (2,69.A_{645})].V/(1000.M)$$

$$\text{Chl } b = [(22,9.A_{645}) - (4,68.A_{663})].V/(1000.M)$$

$$\text{Chl. total} = [(20,2.A_{663}) - (2,69.A_{645})].V/(1000.M)$$

$$\text{Carot} = [(1000.A470) - (1,82.\text{Chl } a - 85,02.\text{Chl } b)].V/(198.1000.M)$$

Onde,

Chl e Carot. Significam clorofila e carotenóides, respectivamente. A663, A645 e A470 representam os valores das absorvâncias; V é o volume de DMSO (em mL) utilizado para a extração e M é a massa fresca dos discos.

4.9 BOMBAS DE PRÓTONS EM CÉLULAS VEGETAIS

4.9.1 Obtenção das vesículas de plasmalema

Inicialmente foi obtida a vesícula de plasmalema com as enzimas H⁺-ATPases, sendo isoladas da raiz do cultivar de milho. Foi utilizado o processo de centrifugação, descrito por GIANNINI; BRISKIN (1987), com modificações.

Após pesagem, as amostras, foram homogeneizadas em meio tamponado com volume na proporção (1:1) a quantidade do material fresco. Esse procedimento é realizado com utilização de graal e pistilo, e sob-banho de gelo. A composição e concentração dos reagentes no tampão de extração foram as seguintes: 500mM Sacarose, 30% (v/v) Glicerol, 210 mM tampão Tris pH 8,0 , 100 mM KCl e 15 mM EDTA, 2 mM PMSF, 2 mM Benzamidina, 10 mM DTT, 0,4% BSA (p/v) e 0,3% PVPP (p/v). Todo material homogeneizado foi filtrado em gaze, 4 camadas, e submetido à centrifugação (centrífuga HITACHI, himac CP) a 1500 x g por 15 minutos para retirada de células não rompidas e núcleos. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação (ultra-centrífuga HITACHI, himac CP 85 β) a 21.000 x g por 10 minutos para retirada de mitocôndrias. O sobrenadante, centrifugado novamente a 100.000 x g por 35 minutos, onde o precipitado foi resuspenso em solução tampão contendo: glicerol 15%, Tris-HCl 70 mM (pH 7,6), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, PMSF 1 mM e 1 mM Benzamidina, obtendo as vesículas de plasmalema.

4.9.2 Atividade Hidrolítica H⁺-ATPase tipo P

Com as vesículas de plasmalema, a atividade H⁺-ATPasica foi determinada pelo método de (FISKE; SUBBAROW, 1925), que consiste na dosagem colorimétrica de fosfato inorgânico (Pi) liberado durante a hidrólise enzimática de ATP. Esta reação é iniciada com a adição das vesículas ao meio de reação interrompida pela adição de ácido tricloroacético (TCA) em concentração final de 5%. As amostras foram lidas por espectrofotometria (SHIMADZU UV-120) em comprimento de onda de 750nm. A concentração final constituída foram as seguintes: 50 mM Tris-KCL pH 6,5; 3 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1 mM ATP e 0,06 mg.mL⁻¹ de proteína.

O ATP hidrolisado é representado como atividade sensível ao inibidor. Sua atividade total subtraída da atividade inibida por 0,2 mM de ortovanadato de sódio.

4.9.3 Determinação das proteínas totais

A concentração das proteínas pode ser determinada em espectrofômetro a 595 nm (espectrofômetro SHIMADZU UV-120), descrito por Bradford (1976), utilizando-se de BSA (Albumina Sérica Bovina) como proteína padrão.

4.10 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

O objetivo de verificar os efeitos dos ácidos húmico, proveniente do lodo de esgoto sanitário, Ecossistema Manguezal e Vermicomposto, em plântulas de *Zea mays* L. sobre os aspectos densidade estomática, morfológicos e bioquímicos foi avaliado pela análise de variância há um fator (ANOVA) e quando os dados não seguiram a distribuição normal, se requereu o teste de Kruskal-Wallis.

As análises anteriormente citadas somente indicam que há pelo menos um par de médias ou medias que se diferem, portanto, para verificar onde que se encontram estas diferenças foi utilizado o teste de Tukey, utilizando o programa Graphpad Prism 6.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAMINO, R. C. J. **A utilização de lodo de esgoto como alternativa sustentável na recuperação de solos degradados:** Viabilidade, avaliação e biodisponibilidade de metais. Rio de Janeiro, 2010.xxi, 221 f. Tese (Doutorado em Geologia), Programa de pós-Grauação em geologia, Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

ALMEIDA, M. L.; MEROTTO-JUNIOR, A.; SANGOI L.; ENDER, M.; GUIDOLIN, A.. Incremento na densidade de Plantas: uma alternativa para aumentar o rendimento de grãos de milho em regiões de curta estação estival de crescimento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1. p. 23- 29, 2000.

ALVES, W. L.; PASSONI, A. A. Composto e vermicomposto de lixo urbano na produção de mudas de oiti (*Licania tomentosa* (Benth) para arborização. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 1053–1058, 1997.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 8849: Apresentação de Projetos de aterros controlados de resíduos sólidos urbanos.** Procedimento. Rio de Janeiro: ABNT, 1985.

ATIYEH, R.M.; LEE, S.; EDWARDS, C.A.; ARANCON, N.Q.; METZGER, J.D. The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. **Bioresource technology**, v. 84, n. 1, p. 7–14, 2002.

AYUSO,M.; HERNÁNDEZ,T.; GARCIA,C.; PASCUAL,J.A. Stimulation of barley growth and nutrient absorption by humic substances originating from various organic materials. **Bioresource technology**, v. 57, n. 3, p. 251–257, 1996.

AZEVEDO, I.G. **Caracterização das bombas de prótons da polpa de frutos de mamão (*Carica papaya* L.) e relação com a ocorrência do distúrbio da gelificação.** Campos dos Goytacazes, 2006. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2006.

BADERNA, D.; MAGGIONI, S.; BORIANI, E.; MOLTENI, M.; COLOMBO, A.; ROTELLA, G.; LODI, M.; BENFENATI, E. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. **Environmental research**, v. 111, n. 4, p. 603–613, 2011.

BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; GIRO V.B.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.; BRESSAN-SMITH, R. Desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 4, p. 979–990, 2009.

BELL, P. F.; JAMES, B. R.; CHANEY, R. L. Heavy metal extractability in long-term sewage sludge and metal salt-amended soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 20, n. 2, p. 481–486, 1991.

BERTOLAZI, A.A. **Bombas de H⁺ na interação simbiótica *Pisolithus microcarpus*-*Eucalyptus urograndis***: Efeitos do alumínio e papel da melanina. Campos dos Goytacazes, 2013. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2013.

BERTON, R. S.; CAMARGO, O. A.; VALADARES, J. Absorção de nutrientes pelo milho em resposta à adição de lodo de esgoto a cinco solos paulistas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 13, n. 1, p. 187–192, 1989.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-259. 1976.

BUDZIAK, C. R. **Grupos ácidos e capacidade de oxidação de ácidos húmicos como método de avaliação de processos de compostagem**. Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Química), Pós-Graduação em Química, Setor Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

CALDEIRA, M.V.W.; SHUMACHER, M.V.; BARICHELLO, K.R.; VOGEL, H.K. M.; CANELLAS, L.P.; NELSON, G.A.S.; SOBRINHO, M.B.A.; MORAES, A. A.; RUMJAMEK, V.M. adsorção de Cu²⁺ e Cd²⁺ em ácidos húmicos extraídos de

resíduos orgânicos de origem urbana. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.1, p.21-26, 1999.

CANELLAS, L.P.; SANTOS, G.A.; RUMJANEK,V.M.; MORAES, A.A.; GURIDI, F. Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1529–1538, 2001.

CANELLAS, L.P; OLIVARES, F.L; OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L; FAÇANHA, A. R. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, v.130, n.4, p.1951-1957, 2002.

CARDOSO, M. J; FONTES, L. A. N.; LOPES, N. F.; GALVÃO, J. D. Particao de assimilados e producao de materia seca do milho em dois sistemas de associacao com feijao (*Phaseolus vulgaris* L.) **Revista Ceres**, v. 35, n. 201, p. 513-527, 1988.

CARDOSO, G. D.; ALVES, P. L. C. A.; BELTRÃO, N. E. M.; BARRETO, A. F. Uso da análise de crescimento não destrutiva como ferramenta para avaliação de cultivares de mamoneira. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 6, n. 2, p. 79-84, 2006.

CARVALHO, P. C. T.; BARRAL, M. F. Aplicação de lodo de esgoto como fertilizante. **Fertilizantes**, v. 3, n. 2, p. 3–5, 1981.

CAVENDER, N. D.; ATIYEH, R. M.; EDWARDS, C. A. **Influence of vermicomposts an arbuscular mycorrhizal infection of Sorghum bicolor and plant growth** In: 2nd International Soil Ecology Conference. p.23, 1999.

CATUNDA, M. G. **Caracterização das bombas de prótons vacuolares e seu papel nas respostas adaptativas de plantas ao estresse hídrico**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008.

CHEN, Y, AVIAD, T. Effects of humic substances on plant growth. In: MacCarthy, P., Clapp, C.E., Malcolm, R.L., Bloom, P.R. (Eds.), *Humic Substances in Soil and Crop Sciences: Selected Readings*. **ASA and SSSA, Madison**, WI, p. 161–186, 1990.

CINTRÓN MOLERO, G.; SCHAEFFER NOVELLI, Y. **Introducción a la ecología del manglar**. Montevideo. Rostlac, 1983.

CONCEIÇÃO, M. K. DA; LOPES, N. F.; FORTES, G. R. DE L. Análise de crescimento de plantas de batata-doce (*Ipomea batatas* (L) LAM), cultivares Abóbora e Da Costa. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, n. 3, p. 273–278, 2005.

DA SILVA, L. **Estruturas químicas dos ácidos húmicos de sedimento de mangue e o nível de poluição ambiental**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Química). Química Inorgânica do Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, , 2001.

DE ARAUJO SANTOS, G. **Contribution à l'étude des interactions matière organique et phosphore dans un sol ferrallitique**, 1984.

FAÇANHA, A.R.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L.; OLIVARES, F.L.; GURIDI, F.; SANTOS, G.A.; VELLOSO, A.C.X.; RUMJANEK, V.M.; BRASIL, F.; SCHRIPISEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, M.A.; CANELLAS, K.P. Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 1301–1310, 2002.

FERNANDES, F. Manual prático para a compostagem de bio sólidos. In: **Manual prático para a compostagem de bio sólidos**. Universidade Estadual de Londrina. PROSAB, 1999.

FERREIRA, A. R. **Caracterização química e espectroscópica de ácidos húmicos e sedimentos retirados da Baía de Guaratuba-PR e avaliação do nível de poluição ambiental**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. biol. Chem**, v. 66, n. 2, p. 375–400, 1925.

FONTANA, A.; PEREIRA, M.G.; NASCIMENTO, G.B.; ANJOS, L.H.C.; EBELING, A.G. Matéria orgânica em solos de tabuleiros na região Norte Fluminense-RJ. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 114–119, 2001.

GALDOS, M. V; DE MARIA, I. C.; CAMARGO, O. A. Atributos químicos e produção de milho em um Latossolo Vermelho eutroférico tratado com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 3, p. 569–577, 2004.

GOMES, F.H. **Caracterização de solos de Manguezais e de Restinga no município de Ilhéus-BA**. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

GOULART, J.N. **Incremento ao crescimento inicial de plântulas de milho (*Zea mays* L.) tratadas com substâncias húmicas de diferentes locais**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Vila Velha, Vila Velha, 2013.

GIANNINI, J. L.; BRISKIN, D. P. Proton Transport in Plasma Membrane and Tonoplast Vesicles from Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Storage Tissue A Comparative Study of Ion Effects on ΔpH and $\Delta\Psi$. **Plant physiology**, v. 84, n. 3, p. 613–618, 1987.

GIRI, C.; OCHIENG, E.; TIESZEN, L.L.; ZHU, Z.; SINGH, A.; LOVELAND, T.; MASEK, J.; DUKE, N. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, v. 20, n. 1, p. 154–159, 2011.

GUERRA, R. C.; ANGELIS, D. F. D. Classificação e biodegradação de lodo de estações de tratamento de água para descarte em aterro sanitário. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 1, p. 87–91, 2005.

HISCOX, J. D. T; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n. 12, p. 1332–1334, 1979.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.

HUNT, R. **Plant growth analysis**. Institute of Terrestrial Ecology, 1982.

KE,L.; BAO,W.;CHEN,L.; WONG. Y.S.; TAM, N.F.Y. Effects of humic acid on solubility and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid media and mangrove sediment slurries. **Chemosphere**, v.76, p.1102-1108, 2009.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes orgânicos**. São Paulo, Agronômica Ceres, 492p, 1985.

KOCSSIS, M. A.; DE MARIA, I. C. **O efeito do lodo de esgoto na recuperação da estrutura física de solos degradados** Congresso Brasileiro de Geógrafos. **Anais...2004**.

LICHTENTHALER, H.K., WELBURN, A.R., Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochem. Biochemical Society Transactions**. n.11, p.591–592, 1983.

LONGO A.D. **Minhoca: de fertilizadora do solo a fonte alimentar**. São Paulo: Icone, 1987.

MAESHIMA, M. Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1465, p.37-51, 2000.

MARTINEZ, A. A. Folder sobre minhocultura. **Campinas: CAT**, p. 1–8, 1991.

MELO O,H.; CASTRO, E.M.; SOARES, A.M.; MELO, L.A.; ALVES, J.D. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, v. 34, n. 2, p. 145–153, 2007.

MESSIAS, R.A. **Avaliação estrutural de ácidos húmicos de vermicomposto e turfa por diferentes técnicas de caracterização**. Tese de Doutorado, Instituto de Química de São Carlos, USP, 2004.

MOROZESK, M. **Efeitos dos ácidos húmicos provenientes de aterro sanitário em plantas**. Dissertação, 2014. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), PRograma de Pós Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

MORSOMME, P.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1465, n. 1, p. 1–16, 2000.

NAGASHIMA, L. A. et al. Caracterização do lodo gerado no tratamento de lixiviado de aterro sanitário com coagulante à base de tanino. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 31, n. 1, p. 37–50, 2010.

NOGUEIRA, O. L.; CONCEICAO, H. E. O. DA. Análise de crescimento de açaizeiros em áreas de várzea do estuário amazônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 11, p. 2167–2173, 2000.

OGLIARI, J.; FREITAS, S.P.; RAMOS, A.C.; BRESSAN SMITH, R.E.; FAÇANHA, A.R. Sistemas primários de transporte de prótons integram os mecanismos de desintoxicação do mesotrione em plantas de milho. **Planta daninha**, v. 27, n. 4, p. 799–807, 2009.

OLIVEIRA, F.C.; MARQUES, M.O.; BELLINGIERI, P.A.; PERECIN, D. Lodo de esgoto como fonte de macronutrientes para a cultura do sorgo granífero. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 2, p. 360–367, 1995.

OLIVEIRA, F.C.; MATTIAZZO, M.E.; MARCIANO, C.R.; MORAES, S.O. Lixiviação de nitrato em um Latossolo Amarelo distrófico tratado com lodo de esgoto e cultivado com cana-de-açúcar. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 1, p. 171–180, 2001.

PACHECO, J. R.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Integração de processos físico-químicos e oxidativos avançados para remediação de percolado de aterro sanitário (chorume). **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, n. 4, p. 306–311, 2004.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. **Advances in Agronomy**, v. 75, p. 57–134, 2002.

PICCOLO, A.; CONTE, P. Molecular size of humic substances. Supramolecular associations versus macromolecular polymers. **Advances in Environmental Research**, v. 3, n. 4, p. 508–521, 2000.

PINOTTI, E.B.; RYAL, M. Avaliação de três cultivares de milho (*Zea mays* L.) sob quatro populações de plantas em espaçamento reduzido. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**. n.10, 2006.

PIRES, A. M. M. P. **Avaliação da viabilidade do uso de resíduos na agricultura**. Embrapa Meio Ambiente, 2008. 9 p., 2008.

RAMOS, A. C.; ANTÔNIO, M. Atividade ATPásica e pirofosfatásica em microsomas de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 2, p. 207–213, 2005.

RAUEN, T.G.; DEBACHER, N.A.; SIERRA, M.M.S.; SIERRA, E.J.S. Tensoatividade de Ácidos Húmicos de procedências distintas. **Química Nova**, v. 25, n. 6/A, p. 909–913, 2002.

ROCHA, A. C.; CANAL, E. C.; CAMPOSTRINI, E.; REIS, F. O.; CUZZUOL, G. R. F. Influence of chromium in *Laguncularia racemosa* (L). Gaertn f. physiology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 21, n. 2, p. 87–94, 2009.

ROCHA, L. D. Ácidos húmicos extraídos do lodo de esgoto sanitário e seus efeitos em plantas. 2014.

RODDA, M.R.C.; CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.R.; ZANDONADI, D.B.; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D.L.; SANTOS, G.A. Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. II-Efeito da fonte de vermicomposto. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 30, p. 657–664, 2006.

ROSSI, M.; MATTOS, I. F. DE A. Solos de mangue do Estado de São Paulo: caracterização química e física. **Revista do departamento de Geografia**, v. 15, p. 101–113, 2002.

SAITO, M. L. O uso do lodo de esgoto na agricultura: precauções com os contaminantes orgânicos. **Embrapa Meio Ambiente. Documentos**, 2007.

SCHUMACHER, M. V. et al. Influência do vermicomposto na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Ciência Florestal**, v. 11, n. 2, p. 121–130, 2001.

SEGATTO, F. B.; BISOGNIN, D. A.; BENEDETTI, M.; COSTA, L. C.; RAMPELOTTO, M. V.; NICOLOSO, F. T. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência rural**, v. 34, n. 5, p. 1597–1601, 2004.

SEVERINO, F. J.; CARVALHO, S. J. P.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Interferências mútuas entre a cultura do milho, espécies forrageiras e plantas daninhas em um sistema de consórcio. I-implicações sobre a cultura do milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 589–596, 2005.

SIMONETE, M.A.; KIEHL, J.C.; ANDRADE, C.A.; TEIXEIRA, C.D.A. Efeito do lodo de esgoto em um Argissolo e no crescimento e nutrição de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 10, p. 1187–1195, 2003.

SIQUEIRA, C.; LEAL, J.R.; VELLOSO, A.C.X.; SANTOS, G.A. Eletroquímica de solos tropicais de carga variável. II, Quantificação do efeito de matéria orgânica sobre o ponto de carga zero. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 14, n. 1, p. 13–17, 1990.

STEVENSON E. J. Humus Chemistry: Genesis. Composition, Reactions. **Wiley-Interscience**, NY, 1982.

STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. J. Wiley & Sons. 2nd ed. New York, 1994. 496p.

SZE, H.; LI, X.; PALMGREN, M. G. Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. **The Plant Cell Online**, v. 11, n. 4, p. 677–689, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology. **New York: Sinauer**, 2002.

TORRICO, K.S.N. **Efeitos das substâncias húmicas do Ecossistema Manguezal sobre o sistema radicular e atividade da H⁺-ATPase em plântulas de *Oryza sativa* E *Laguncularia raemosa***. Trabalho de conclusão de curso. Centro Universitário Vila Velha, Vila Velha, 2011.

TSUTYA, M. T.; BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. Alternativas de disposição final de biossólidos gerados em estações de tratamento de esgotos. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**, p. 69–107, 2000.

VARJABEDIAN, R.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Impactos sobre os manguezais. **NOVELLI, Yara Schaeffer. Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. São Paulo: USP**, p. 49–53, 1995.

VEGA, F. V. A. et al. Aplicação de biossólido na implantação da cultura da pupunheira. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 131–135, 2004.

VIERA, M. I. Minhoca dão lucro: reprodução, produção, instalação, comercialização. **São Paulo: Ed. Prata**, 1993.

6. RESULTADOS

Artigo 1

Este artigo será submetido à revista

“Pesquisa Agropecuária Brasileira”

ISSN: 1678-3921

1 **Respostas fisiológicas e bioquímicas de milho exposto à ácidos húmicos provenientes**

2 **de três diferentes fontes**

3 Monique Ellen Farias Barcelos⁽¹⁾, Leonardo Barros Dobbss⁽²⁾, Amanda Azevedo
4 Bertolazi⁽³⁾, Alessandro Coutinho Ramos⁽³⁾, Ian Drumond Duarte⁽¹⁾, Leonardo Valandro
5 Zanetti⁽¹⁾, Silvia Tamie Matsumoto⁽¹⁾.

6

7 ⁽¹⁾Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciências Biológicas, Av.

8 Fernando Ferrari, nº 514, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil. E-mail:

9 monique_barcelos@yahoo.com.br, iandduarte@gmail.com, valandroleo@gmail.com,

10 siltamie@gmail.com ⁽²⁾Universidade Vila Velha, Laboratório de Ecologia e Matéria

11 Orgânica, Rua Comissário José Dantas de Melo, nº 21, CEP 29102-770, Vila Velha, ES,

12 Brasil. E-mail: leonardo.dobbss@uvv.br ⁽³⁾Universidade Estadual do Norte Fluminense

13 Darcy Ribeiro, Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, Av. Alberto Lamego, nº

14 2000, Campos dos Goytacazes, CEP 28013-602, Brazil. E-mail:

15 alessandro.uenfrj@gmail.com.

16

17 Resumo – O Húmico desempenha um papel importante na fertilidade e estrutura dos

18 solos. O lodo pode ser utilizado com biofertilizante e contribuir na redução dos custos dos

19 agricultores com adubos fosfatados e nitrogenados, e incrementar a acumulação de
20 nutrientes no solo. Os ácidos húmicos (AH) isolados de vermicomposto aumentam a
21 capacidade de troca catiônica do solo e a liberação de nutrientes para as plantas,
22 promovendo o crescimento vegetal. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas
23 fisiológicas, anatômicas e bioquímicas de plantas de *Zea mays* L. tratadas ou não com AH
24 extraído de lodo de esgoto, ecossistema manguezal e vermicomposto, avaliando se a
25 origem do AH influencia na sua bioatividade. Os resultados obtidos demonstram que
26 respostas significativas no crescimento inicial, teor pigmentos fotossintéticos e densidade
27 estomática foram obtidas em plantas tratadas com a concentração de 1 mMC L⁻¹ AHLE,
28 sendo que tal estímulo não foi detectado na atividade hidrolítica das bombas de H⁺ de
29 membrana plasmática (P-H⁺-ATPase).

30 Termos para indexação: *Zea mays* L., crescimento vegetal, lodo de esgoto, vermicomposto.

31

32 **Physiological and biochemical responses of maize exposed to humic acid from three**
33 **diferente source**

34 Abstract – The humic plays an important role in the structure and fertility of the soil. The
35 sludge can be used as a bio fertilizer and contribute to the reduction of costs for farmers
36 with phosphate and nitrogen fertilizers, and increase the accumulation of nutrients in the
37 soil. Humic acid (HA) isolated from vermicompost increase the cation exchange capacity
38 of the soil and the release of nutrients to the plants, promoting plant growth. The aim of
39 this study was to evaluate the physiological, anatomical and biochemical responses of *Zea*
40 *mays* L. plants treated or not with HA extracted from sewage sludge, mangrove ecosystem
41 and vermicompost, assessing whether the source of the HA influence on their bioactivity.
42 The results show that significant responses in early growth, photosynthetic pigments
43 content and stomatal density were obtained in plants treated with the concentration of 1

44 mMC L⁻¹ AHLE, and such stimulus was not detected in the hydrolytic activity of the
45 plasma membrane proton pumps (P-H⁺-ATPase). On the other hand, PPases activity were
46 significantly activated by the treatments.

47 Index terms: *Zea mays* L., plant growth, sewage sludge, vermicompost.

48 **Introdução**

49 A ciclagem de matéria orgânica é uma prática muito utilizada como
50 condicionador/fertilizante do solo, sendo amplamente difundida em países como Estados
51 Unidos, Holanda e Austrália. O grande destaque é o uso de subprodutos e do lodo de
52 esgoto sanitário, devido à alta concentração de nutrientes e matéria orgânica que podem
53 proporcionar benefícios ao crescimento vegetal em áreas agrícolas (Canellas et al., 1999).

54 O uso do lodo como fertilizante é uma medida de contribuição à redução de gastos do
55 agricultor, como uso de fosfatados e nitrogenados. No entanto, para que haja disposição
56 deste resíduo, o lodo deve passar por inúmeras avaliações, incluindo as técnicas
57 econômicas e ambientais, tendo em vista a possibilidade de potenciais impactos ao meio
58 ambiente (Da Silva et al., 2001; Oliveira et al., 2001).

59 Compostos decorrentes da decomposição da matéria orgânica denominados de
60 substâncias húmicas (SH), é um grupo de moléculas complexas de elevado peso molecular
61 composta de carbono, são conhecidos por desempenhar papel importante para a
62 contribuição na fertilização do solo, além de influenciar o metabolismo das plantas,
63 facilitando a absorção de nutrientes, aumento da respiração e velocidade das reações
64 enzimáticas (Nannipieri et al., 1993; Stevenson, 1994; Palanivell et al., 2013).

65 A utilização da vermicompostagem na agricultura caracteriza-se pela maior
66 estabilização dos resíduos, já que estes ao passarem pelo trato digestivo das minhocas
67 sofrem reações enzimáticas que os transformam em substância húmica (Rodda et al.,

68 2006). O uso de resíduos orgânicos juntamente com minhocas, aumenta a capacidade de
69 troca catiônica e liberação de nutrientes para o cultivar. Logo, promove o crescimento da
70 planta, sendo muito bem aceita e comparada com outros hormônios de crescimento, como
71 auxinas e giberelinas (Cavender et al., 1999). quando a SH é isolada a partir do
72 vermicomposto,

73 Solos do Ecossistema Manguezal são caracterizados por possuírem alta carga de matéria
74 orgânica, devido a decomposição constante de serapilheira, e pela alta influência da maré.
75 Esta possui saturação da água por salinidade, ampla variação do pH, e capacidade de troca
76 catiônica. Além disso, dependendo da ocupação ao entorno deste ecossistema, pode ocorrer
77 o acúmulo de matéria orgânica pelo acúmulo de efluentes tratados e não tratados,
78 tornando-se determinante na qualidade ambiental desse ecossistemas bem como
79 impactando a vegetação dos mesmos (Ferreira, 2002).

80 Dentro da composição das SH está presente a fração de ácido húmico (AH), definido
81 como a associação de compostos hidrofóbicos estabilizados em pH neutro (Piccolo, 2002).
82 Estudos relatam que o AH tem promovido um aumento no crescimento do vegetal,
83 promovendo desenvolvimento de raízes laterais, além de muitos estímulo a partir de
84 moléculas bioativas. Essas podem ocasionar modificações no metabolismo do cultivar e
85 influenciar o transporte iônico, proporcionando a melhora da absorção, respiração e de
86 reações enzimáticas (Canellas et al., 2002; Canellas et al., 2010; Nannipieri et al., 1993).

87 O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos fisiológicos e bioquímicos de espécimes de
88 *Zea mays* L. expostos à concentrações de ácido húmico extraídos de lodo de esgoto,
89 vermicomposto e Ecossistema Manguezal, visando o uso destes como insumos agrícolas.

90 **Material e Métodos**

91 A amostra do lodo utilizada no presente estudo foi disponibilizada pela Companhia
92 Espírito Santense de Saneamento (CESAN), enquanto a amostra do ácido húmico do

93 mangue e vermicomposto foi disponibilizada pelo Laboratório de Ecologia e Matéria
94 Orgânica, Universidade Vila Velha, Vila Velha, Espírito Santo, Brasil. As amostras,
95 citadas acima, foram peneiradas e secas para que fosse realizada a extração das substâncias
96 húmicas pelo método recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas
97 (IHSS). Por meio de solubilidade de NaOH 0,5 mol L⁻¹, na proporção sólido:soluto 1:10
98 (m:v). Para obter o ácido húmico foi efetuada a acidificação da solução até pH 1 – 1,5, com
99 HCl 6 mol^l. Posteriormente os AH foram lavados com água deionizada, dispostos em
100 membrana de 14 kDa para diálise e liofilizados.

101 Com relação às concentrações utilizadas no estudo, ácido húmico extraído do lodo de
102 esgoto, utilizou-se as concentrações de 0,5 mMC L⁻¹; 1 mMC L⁻¹; 2 mMC L⁻¹; 4 mMC L⁻¹ ,
103 conforme Rocha (2014). O ácido húmico do mangue (Goulart, 2013) foi definida a
104 concentração de 6,76 mMC L⁻¹. E foi utilizado o ácido húmico vermicomposto a 1,85
105 mMC L⁻¹ (Torrice, 2011) como controle positivo.

106 Para a realização da avaliação fisiológica e metabólica no cultivar milho, foram
107 utilizadas sementes de *Zea mays* L. (Híbrido Embrapa- BR 206, Brasil). As mesmas foram
108 imersas em solução de NaClO (1%) por 30 minutos para desinfestação, sendo
109 posteriormente mantidas em água deionizada por três horas. As sementes foram colocadas
110 em papel-filtro para germinação no escuro com temperatura média de 26°C.

111 Após quatro dias de germinação, as plântulas foram transferidas para vasos tipo
112 hidroponia sobe aeração constante, contendo solução de Hoagland, modificada para ½ de
113 força molar (Hoagland & Arnon, 1950). Esta solução foi considerada como controle
114 negativo, enquanto os demais tratamento receberam a adição dos ácidos húmicos nas
115 respectivas concentração, conforme citado anteriormente.. O pH foi mantido ajustado entre
116 5.8 e 6.0 nos tratamentos durante a exposição.

117 Os tratamentos tiveram período de 15 dias de exposição ao cultivar em casa de
118 vegetação do Departamento de Ciências Biológicas/CCHN na Universidade Federal do
119 Espírito Santo (UFES), campus Goiabeiras (20°16'29.97"S e 40°18'21.19" O).

120 Após 15 dia de experimento, realizado em casa de vegetação do Departamento de
121 Ciências Biológicas/CCHN na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), campus
122 Goiabeiras (20°16'29.97"S e 40°18'21.19" O), 10 indivíduos foram retirados de forma
123 aleatória de cada tratamento para a realização das medições de altura, área foliar (Area
124 Meter, LI-COR 3100, USA), massa fresca e seca (Estufa a 60°C), comprimento das raízes,
125 diâmetro e contagem do número de folhas. A partir disso, foram calculadas as a razão de
126 área foliar por número de folhas, razão de raiz por parte aérea, massa foliar específica,
127 razão de área foliar e comprimento da raiz, e a proporção de biomassa no indivíduo por
128 meio das massas secas de parte aérea e raízes (Hunt, 1982; Rocha et al., 2009).

129 O teor de pigmentos cloroplastídicos foi determinado por meio da extração via DMSO
130 (dimetilsulfóxico), consistindo na retirada da folha basal mais desenvolvida coletada de
131 cinco indivíduos de cada tratamento. Um disco de 1cm² foi retirado de cada folha e imerso
132 em 7mL de DMSO, sendo posteriormente colocado em banho-maria a 70°C por 30
133 minutos no escuro. A leitura do extrato foi realizada em espectrofotômetro (Genesys 10 S
134 UV-Vis, Thermo Scientific, EUA) em absorvâncias de 480, 645 e 663 nm (Hiscox &
135 Israelstam, 1979; Argenta et al., 2001).

136 Para a avaliação da densidade estomática (mm²), cinco amostras de folhas de cada
137 tratamento foram retiradas e utilizadas para a realização da impressão estomática
138 utilizando uma gota de cola instantânea (TEKBOND) em uma lâmina histológica. Foram
139 analisados cinco campos ópticos aleatórios, por indivíduo/lâmina, totalizando 25 campos
140 ópticos por tratamento.

141 Para realização da atividade hidrolítica das bombas de próton foi realizado o isolamento
142 da fração microsomal por meio de centrifugação diferencial (Giannini e Briskin, 1987). O
143 material biológico foi pesado e homogeneizado em tampão de extração (sacarose 250 mM,
144 glicerol a 10 %, DTT 5 mM, EDTA 5 mM, PVP-40 0,4 %, KCl 100 mM, BSA 0,3 %, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, Tris-HCl pH 8,0 100 mM) na relação 1:2 (peso de
145 tecido/volume de tampão). O homogenato foi filtrado e submetido à centrifugação a
146 300.000 rpm durante 15 min. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação a
147 100.000 g por 45 min. O precipitado foi ressuscitado em solução tampão contendo
148 glicerol a 15 %, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, Hepes-KOH 10 mM pH
149 7,6 e EDTA 5mM. Toda a manipulação foi realizada entre 0 e 4°C

151 As atividades hidrolíticas das bombas de H⁺ foram determinadas
152 colorimetricamente segundo o método descrito por Fiske & Subbarow (1925). A reação foi
153 iniciada com a adição de ATP 1mM ou PPi 1mM, e finalizada com a adição de ácido
154 tricloroacético em uma concentração final de 10 % (v/v) após 50 minutos de reação. O
155 meio de reação foi composto por Hepes-Tris pH 6,5 (membrana plasmática) ou 7,0
156 (membranas vacuolares) 50 mM, MgSO₄ 3 mM, NaMoO₄ 0,2 mM, KCl 100 mM, e 30 µg
157 de proteína. O inibidor ortovanadato de sódio 0,2 mM foi utilizado para diferenciar as
158 atividades das ATPases tipo P das atividades das ATPases do tipo V. A hidrólise de PPi foi
159 aferida através de sua dependência por K⁺. A proteína total contida na preparação foi
160 dosada pelo método clássico descrito por Bradford (1976), utilizando BSA como proteína
161 padrão.

162 O objetivo de verificar os efeitos dos ácidos húmico, proveniente do lodo de esgoto
163 sanitário, Ecossistema Manguezal e Vermicomposto, em plântulas de *Zea mays* L. sobre os
164 aspectos densidade estomática, morfológicos e bioquímicos foi avaliado pela análise de

165 variância há um fator (ANOVA) e quando os dados não seguiram a distribuição normal, se
166 requereu o teste de Kruskal-Wallis.

167 As análises anteriormente citadas somente indicam que há pelo menos um par de
168 médias ou medias que se diferem, portanto, para verificar onde que se encontram estas
169 diferenças foi utilizado o teste de Tukey, utilizando o programa Graphpad Prism 6.

170 **Resultados e Discussão**

171 Diante dos dados analisados foi possível mensurar que a concentração de 1,0 mMC L⁻¹
172 do AHLE apresentou ser melhor significativamente do que o controle em vários
173 parâmetros, tais como: MFPA (massa fresca de parte aérea), MSPA (massa seca de parte
174 aérea), MST (massa seca total), MFE (massa fresca específica), AFE (área foliar
175 específica), AFU (área foliar unitária). Sendo o mesmo evidenciado para a melhor
176 concentração de 6,76 1 mMC L⁻¹ do AHM, e 1,85 mMC L⁻¹ do AHV apenas para os
177 parâmetros MSPA (massa seca de parte aérea), MST (massa seca total), MFE (massa
178 fresca específica), AFE (área foliar específica).

179 O aumento da matéria seca pode estar relacionado com a disponibilidade de nitrogênio,
180 uma vez que é o nutriente mais requerido pelas culturas e a resposta das plantas é
181 diretamente proporcional à interação deste elemento, juntamente com o potássio (Higuti et
182 al., 2010). Esse acúmulo de massa seca também foi evidenciado por Berton et al. (1997),
183 que mensurou maior incremento de matéria seca em plântulas de milho tratadas com lodo
184 de esgoto não pelletizado e adição de CaCO₃ e Simonete et al. (2003), que tratou plantas de
185 milho com concentrações de lodo de esgoto e evidenciou que houve uma interação entre as
186 oncentrações independentes e juntamente com o potássio proporcionando maior produção
187 de matéria seca.

188 Com relação à AFE as plantas investem na maior proporção de fotoassimilados, e
189 outros recursos no aumento da área foliar. Geralmente esta alteração possui o objetivo de

190 aumentar a captação de luz, aumentando a eficiência fotossintética do vegetal, além de
191 maximizar o ganho de carbono por unidade de massa foliar (Gobbi et al., 2011).

192 Parâmetros como MFE e AFE apresentaram valores significativos para concentrações
193 de 0,5 mMC L⁻¹ do AHLE, 2 mMC L⁻¹ do AHLE e 4 mMC L⁻¹ do AHLE. Estas duas
194 últimas também apresentaram valores significativos para AFU.

195 Estudos apontam que as SH influenciam no crescimento das plantas (Canellas et al.,
196 2002; Canellas et al., 2010), estes efeitos podem ser explicados pela interação entre as SH
197 e os processos metabólicos e fisiológicos do vegetal (Trevisan et al., 2010), podendo a SH
198 estimular a absorção de nutrientes além de influenciar a permeabilidade celular, havendo
199 regulação de mecanismos relacionados ao crescimento vegetal (Piccolo, 2002).

200 Diante dos dados obtidos e analisados, houve um aumento na concentração das
201 clorofilas a, b, total e carotenóides para o tratamento AHLE na concentração 1,0 mMC L⁻¹
202 (Tabela 2), quando comparado ao controle e a melhor concentração de AHM (6,76 mMC
203 L⁻¹). O aumento de clorofila b no tratamento citado pode ser decorrente a uma
204 característica de adaptação, uma vez que a clorofila b possui capacidade de absorção de
205 comprimentos de ondas diferentes da clorofila a, e assim transfere para o centro de reação,
206 proporcionando o aumento da captura energética que atua nas reações fotoquímicas
207 (Martins et al., 2009).

208 Alterações na biossíntese das clorofilas podem proporcionar vantagens no crescimento
209 e sucesso reprodutivo do vegetal além de auxiliar no seu desempenho fotossintético.
210 Valores altos da fotossíntese são capazes de atingir um alto valor da concentração de
211 clorofila, no entanto, esta relação pode não ser evidenciada uma vez que a fase bioquímica
212 da fotossíntese pode limitar o processo (Taiz & Zeiger, 2004). De forma ecológica, as
213 diversas alterações na biossíntese de clorofilas podem proporcionar uma eficiência no
214 crescimento e sucesso reprodutivo dos vegetais (Larcher, 2004). Maiores quantidades de

215 carotenóides possui relação com o funcionamento das moléculas fotoprotetoras por meio
216 de dissipação do estado excitado da clorofila (Garcia-Plazaola et al., 1999), obtendo um
217 papel fundamental da captura de luz, sendo importante para a proteção da reação da
218 fotossíntese (Ort, 2001).

219 Essa variação da clorofila também foi evidenciado por Costa (1994), que estudou a
220 ação de compostos orgânicos em plantas de alface, e verificou que a fertilização dos solos
221 com compostos orgânicos promoveu significativo aumento no teor de clorofila. Assim, de
222 uma maneira geral os materiais húmicos, quando em solução, tiveram a capacidade de
223 disponibilizar ao substrato minerais que são absorvidos pelas raízes das plantas. Alguns
224 destes fazem parte da estrutura química da clorofila, tais como Ca, Mg, Fe e P, que podem
225 alterar na sua formação quando não disponíveis em quantidades suficientes na planta. Essa
226 evidências foi relatada por Nardi et al. (2002), Ertani et al. (2013) e Rocha (2014), na qual
227 tratamentos de diferentes espécies de plantas com SH proporcionou um aumento no teor de
228 clorofila, influenciando diretamente na taxa fotossintética líquida.

229 Por meio de análise da quantidade de estômatos na folha, foi possível observar que não
230 obteve variação significativa dos tratamentos em relação ao controle (Tabela 3), no entanto
231 a concentração de 1 mMC L⁻¹ do AHLE apresentou diferença na quantidade no número de
232 estômatos, adaxial, juntamente com as concentrações 6,76 mMC L⁻¹ do AHM e 1,85
233 mMC L⁻¹ do AHV quando que comparadas ao controle. O mesmo ocorre com o parâmetro
234 abaxial destas últimas citadas.

235 Trabalho de Palanivell et al. (2013) também relatam sobre materiais húmicos e suas
236 diferenças de pesos moleculares promovem alteração na quantidade de estômatos. Sendo,
237 os estômatos, de extrema importância para avaliação e determinação do mecanismo de
238 transpiração e controle de trocas gasosas com o meio ambiente, sendo este mecanismo
239 influência direta da fotossíntese e produtividade vegetal (Azevedo et al., 2012). Sendo

240 clara a contribuição do material vegetal sobre a fração húmica do solo, e a contribuição
241 deste na absorção de nutrientes e a fisiologia das plantas (Demétrio et al., 1998).

242 Diante dos dados obtidos para as enzimas do metabolismo energético vegetal (ATPase
243 e PPase), observa-se que a atividade da P-H⁺-ATPase foi estimulada pela dosagem de 1,85
244 mMC L⁻¹ do AHV quando comparada ao controle, no entanto, tal estímulo não foi o
245 suficiente para provocar mudanças expressivas sobre a bioenergética do vegetal, atribuindo
246 a algumas dosagens atividade menor que ao controle, 6,75 mMC L⁻¹ do AHM e 0,5 mMC
247 L⁻¹ do AHLE, sendo assim, nenhuma das concentrações aumentou a atividade da P-H⁺-
248 ATPase (Figura 1).

249 A P-H⁺-ATPase funciona como um indicador do funcionamento celular e a atividade é
250 afetada por diversos fatores ambientais, sendo possível detectar estresse em nível celular
251 (Palmgren, 1999). A queda da atividade para as demais concentrações pode ser explicada
252 pela baixa disponibilidade de energia para que haja transporte de íons, podendo clarificar a
253 menor concentração de K⁺ (Azevedo, 2006). Uma vez que AH quando adicionados ao
254 meio de reação inibem a atividade hidrolítica das P-ATPases, corroborando com o trabalho
255 de Canellas et al.(2002).

256 Com relação à atividade da pirofosfatase (PPase) o tratamento com a concentração 1
257 mMC L⁻¹ do AHLE de lodo de esgoto sanitário apresentou maior atividade hidrolítica da
258 bomba (Figura 2). O aumento dessa atividade promove uma maior liberação de Pi
259 inorgânico, que juntamente com o ADP dão formação ao ATP. Esse processo foi também
260 evidenciado em trabalho de Catunda (2008), com cultivares de milho quando submetidas a
261 estresse hídrico.

262 Esse aumento das atividades ATPásica e PPásica, utilizando-se diferentes materiais
263 húmicos em relação ao controle, demonstra que o tecido da raiz pode estar com aumento

264 da atividade transportadora de íons para dentro do vacúolo resultando em uma maior
265 demanda energética (Catunga, 2008).

266 **Conclusões**

267 1. A adubação com ácidos húmicos de diferentes fontes promovem acúmulo de carbono e
268 aumento da área foliar em milho;

269 2. Ácidos húmicos proveniente de lodo de esgoto sanitário, lama de manguezal e
270 vermicomposto, apresentam comportamento distinto quanto à concentração ideal.

271 **Agradecimentos**

272 Os autores agradecem a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), à Coordenação de
273 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida
274 e à Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro pelas análises.

275 **Referências**

276 ARGENTA, G; SILVA, P.R.F; BORTOLINI, C.G; FORSTHOFER, E.L; STRIEDER,
277 M.L. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de
278 nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.158-
279 167, 2001.

280 AZEVEDO, C.F; BRUNO, R.L.A; QUIRINO, Z.G.M; REGO, E.R; GOMES, K.R;
281 BEZERRA, A.K.D. Efeito de sistemas de consórcio e inseticida na formação dos
282 estômatos em plântulas de erva-doce (*Foeniculum vulgare* mill.). **Revista Brasileira de**
283 **Plantas Mediciniais**, v.14, n.SPL.ISS, p.205–213, 2012.

284 AZEVEDO, I.G. **Caracterização das bombas de prótons da polpa de frutos de mamão**
285 **(*Carica papaya* L.) e relação com a ocorrência do distúrbio da gelificação**. 2006. 69p.
286 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
287 Campos dos Goytacazes.

- 288 BERTON, R.S; VALADARES, J.M.A.S; CAMARGO, O.A; BATAGLIA, O.C.
289 Peletização do lodo de esgoto e adição de CaCO_3 na produção de matéria seca e absorção
290 de Zn, Cu e Ni pelo milho em três latossolos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.21,
291 p.685-691, 1997.
- 292 CANELLAS, L.P; OLIVARES, F.L; OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L; FAÇANHA, A.
293 R. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root
294 emergence, and plasma membrane H^+ -ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**,
295 v.130, n.4, p.1951-1957, 2002.
- 296 CANELLAS, L.P; NELSON, G.A.S.; SOBRINHO, M.B.A.; MORAES, A.A.;
297 RUMJAMEK, V.M. Adsorção de Cu^{2+} e Cd^{2+} em ácidos húmicos extraídos de resíduos
298 orgânicos de origem urbana. **Ciência Rural**, v.29, n.1, p.21–26, 1999.
- 299 CANELLAS, L.P; OLIVARES, F.L; OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L; FAÇANHA, A.R.
300 Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root
301 emergence, and plasma membrane H^+ -ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**,
302 v.130, n.4, p.1951-1957, 2002.
- 303 CANELLAS, L.P; PICCOLO, A; DOBBSS, L.B; SPACCINI, R; OLIVARES, F.L;
304 ZANDONADI, D.B; FAÇANHA, A.R. Chemical composition and bioactivity properties
305 of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. **Chemosphere**, v.78, n.4,
306 p.457-466, 2010.
- 307 CAVENDER, N. D.; ATIYEH, R. M.; EDWARDS, C. A. Influence of vermicomposts an
308 arbuscular mycorrhizal infection of *Sorghum bicolor* and plant growth. In: **2nd**
309 **International Soil Ecology Conference**. 1999. p.23.
- 310 CATUNGA, M.G. **Caracterização das bombas de prótons vacuolares e seu papel nas**
311 **respostas adaptativas de plantas ao estresse hídrico**. 2008. 55p. Tese (Doutorado) -
312 Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

- 313 COSTA, C.A. **Crescimento e teores de sódio e de metais pesados da alface e da**
314 **cenoura adubadas com composto orgânico de lixo urbano.** 1994. 89p. Dissertação
315 (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- 316 ERTANI, A; SCHIAVON, M; MUSCOLO, A; NARDI, S. Alfalfa plant-derived
317 biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. **Plant and**
318 **soil**, v.364, n.1-2, p.145-158, 2013.
- 319 FERREIRA, T.O. **Solos de Mangue do Rio Crumahú (Guarujá-SP): pedologia e**
320 **contaminação por esgoto doméstico.** 2002. 113p. Dissertação (Mestrado) - Universidade
321 de São Paulo, Piracicaba.
- 322 FISKE, C.H; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **The**
323 **journal of biological chemistry**, v.66, n.2, p.375-400, 1925.
- 324 GARCÍA-PLAZAOLA, J. I; ARTETXE, U; BECERRIL, J.M. Diurnal changes in
325 antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus*
326 *ilex* (L) during winter. **Plant Science**, v.143, n.2, p.125-133, 1999.
- 327 GOBBI, K.F; GARCIA, R; VENTRELLA, M.C; GARCEZ NETO, A.F; ROCHA, G.C.
328 Área foliar específica e anatomia foliar quantitativa do capimbraquiária e do amendoim-
329 forrageiro submetidos a sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.7,
330 p.1436-1444, 2011.
- 331 GOULART, J.N. **Incremento ao crescimento inicial de plântulas de milho (*Zea mays***
332 **L.) tratadas com substâncias húmicas de diferentes locais.** 2013. Trabalho de conclusão
333 de curso (Monografia) - Universidade Vila Velha, Vila-Velha.
- 334 HISCOX, J.T; ISRAELSTAM, G.F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf
335 tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v.57, n.12, p.1332-1334, 1979.

- 336 HIGUTI, A.R.O; SALATA, A.D.C; GODOY, A.R. CARDOSO, A.I.I. Produção de mudas
337 de abóbora com diferentes doses de nitrogênio e potássio. **Bragantia**, v.69, n.2, p.377-380,
338 2010.
- 339 HOAGLAND, D.R; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without
340 soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, v.347, n.2nd edit, 1950.
- 341 HUNT, R. **Plant growth analysis**. Institute of Terrestrial Ecology, 1982.
- 342 LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMA Artes e Textos, 2004. 531p.
- 343 MARTINS, J.R; ALVARENGA, A.A.D; CASTRO, E.M.D; SILVA, A.P.O.D; ALVES, E.
344 Teores de pigmentos fotossintéticos e estrutura de cloroplastos de Alfavaca-cravo
345 cultivadas sob malhas coloridas; Pigments content and Alfavaca-cravo chloroplast
346 structure cultivate under colored nets. **Ciências Rural**, v.40, n.1, p.64-69, 2010.
- 347 NARDI, S; PIZZEGHELLO, D; MUSCOLO, A; VIANELLO, A. Physiological effects of
348 humic substances on higher plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.34, n.11, p.1527-
349 1536, 2002.
- 350 NANNIPIERI, P; GREGO, S; DELL'AGNOLA, G; NARDI, S. Proprietà biochimiche e
351 fisiologiche della sostanza organica. **Ciclo della sostanza organica nel suolo: aspetti**
352 **agronomici, chimici, ecologici, ecologici & selvicolturali**. Bologna: Patron, p.67-78,
353 1993.
- 354 OLIVEIRA, F.C; MATTIAZZO, M.E; MARCIANO, C.R; MORAES, S.O. Lixiviação de
355 nitrato em um Latossolo Amarelo distrófico tratado com lodo de esgoto e cultivado com
356 cana-de-açúcar. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p.171-180, 2001.
- 357 ORT, D.R. When there is too much light. **Plant physiology**, v.125, n.1, p.29-32, 2001.
- 358 PALANIVELL, P; SUSILAWATI, K; AHMED, O.H; MAJID, N.M. Compost and crude
359 humic substances produced from selected wastes and their effects on *Zea mays* L. nutrient
360 uptake and growth. **The Scientific World Journal**, v.2013, 2013.

- 361 PALMGREN, M.G. Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient
362 uptake. **Annual review of plant biology**, v.52, n.1, p.817-845, 2001.
- 363 PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of
364 humus chemistry and implications in soil science. **Advances in Agronomy**, v.75, p.57-
365 134, 2002.
- 366 ROCHA, A.C; CANAL, E.C; CAMPOSTRINI, E; REIS, F.O; CUZZUOL, G.R.F.
367 Influence of chromium in *Laguncularia racemosa* (L). Gaertn f. physiology. **Brazilian**
368 **Journal of Plant Physiology**, v.21, n.2, p.87-94, 2009.
- 369 ROCHA, L.D. Ácidos húmicos extraídos do lodo de esgoto sanitário e seus efeitos em
370 plantas. 2014. 42p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo,
371 Vitória.
- 372 RODDA, M.R.C; CANELLAS, L.P; FAÇANHA, A.R; ZANDONADI, D.B; GUERRA,
373 J.G. M; ALMEIDA, D.L.D; SANTOS, G.D.A. Estímulo no crescimento e na hidrólise de
374 ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. II-Efeito da fonte de
375 vermicomposto. **Revista Brasileira Ciências do Solo**, v.30, p.657-664, 2006.
- 376 DA SILVA, F.C; BOARETTO, A.E; BERTON, R.S; ZOTELLI, H.B; PEXE, C.A;
377 BERNARDES, E.M. Efeito de lodo de esgoto na fertilidade de um Argissolo Vermelho-
378 Amarelo cultivado com cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.5,
379 p.831-840, 2001.
- 380 SIMONETE, M.A; KIEHL, J.D.C; ANDRADE, C.A; TEIXEIRA, C.F.A. Efeito do lodo
381 de esgoto em um Argissolo e no crescimento e nutrição de milho. **Pesquisa Agropecuária**
382 **Brasileira**, v.38, n.10, p.1187-1195, 2003.
- 383 STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. J. Wiley & Sons.
384 2nd ed. New York, 1994. 496p.
- 385 TAIZ, L; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3.ed. Sinauer, 2004. 690p.

386 TORRICO, K.S.N. **Efeitos das substâncias húmicas do Ecossistema Manguezal sobre o**
387 **sistema radicular e atividade da H⁺- ATPase em plântulas de *Oryza sativa* E**
388 ***Laguncularia raemosa*. 2011. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) - Centro**
389 **Universitário Vila Velha, Vila-Velha.**

390 TREVISAN, S; PIZZEGHELLO, D; RUPERTI, B; FRANCIOSO, O; SASSI, A; PALME,
391 K; NARDI, S. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early
392 auxin- responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in Arabidopsis. **Plant Biology,**
393 v.12, n.4, p.604-614, 2010.

394

395

396

397

398

399

Tabela 1: Análise de crescimento e anatomia de *Zea mays* L. para os tratamentos com concentrações de ácidos húmicos (AH) provenientes de lodo de esgoto sanitário (LE), Mangue (M), Vermicomposto (V). Onde: Altura parte aérea (PA); Comprimento de raiz (CR); Número de folhas (NF); Área foliar (AF); Massa fresca de parte aérea (MFPA); Massa seca de parte aérea (MSPA); Massa fresca de raiz (MFR); Massa seca de raiz (MSR); Massa seca total (MST); Razão raiz /Parte aérea (Raiz:PA); Massa fresca específica (MFE); Área foliar específica (AFE); Razão de área foliar (RAF); Razão de massa radicular (RMR); Razão de massa foliar (RMF); Razão de Área Foliar e Número de Folha (AF/F); Área foliar unitária (AFU); Razão massa seca raiz e massa seca parte aérea (MSR/MSPA); Razão comprimento raiz e massa seca raiz (CR/MSR); Razão massa seca parte aérea e massa seca total (MSPA/MST); Massa seca raiz e massa seca total (MSR/MST).

	AH - LE (0,5 mMC L ⁻¹)	AH-LE (1,0 mMC L ⁻¹)	AH-LE (2,0 mMC L ⁻¹)	AH -LE (4,0 mMC L ⁻¹)	AH - M (6,76 mMC L ⁻¹)	AH-V (1,85 mMC L ⁻¹)	Controle
Altura (PA)*	26.121±1.839 ^a	33.84±4.042 ^{bc}	26.725±4.404 ^a	26.725±4.190 ^a	29.413±4.960 ^{ab}	27.025±4.292 ^a	35.513±3.997 ^c
CR**	22.688±2.721 ^a	30.388±2.721 ^{ab}	27.600±2.721 ^{ab}	25.563±2.721 ^{ab}	26.163±2.721 ^{ab}	28.163±2.721 ^{ab}	35.063±2.721 ^a
NF*	4.375±0.518 ^{ab}	4.125±0.641 ^{ab}	4.0±0.535 ^a	4.0±0.535 ^a	4.625±0.518 ^b	4.25±0.463 ^{ab}	4.75±0.463 ^b
AF**	37.695±6.712 ^b	54.378±6.712 ^{ab}	48.479±6.712 ^{ab}	46.505±6.712 ^{ab}	67.913±6.712 ^a	45.966±6.712 ^{ab}	60.715±6.712 ^{ab}
MFPA*	1.604±0.463 ^a	2.683±0.696 ^{cd}	1.685±0.166 ^{ab}	2.043±0.253 ^{bc}	2.696±0.275 ^d	1.98±0.434 ^b	1.806±0.310 ^{ab}
MSPA*	0.711±0.010 ^{ab}	0.969±0.010 ^{de}	0.686±0.007 ^a	0.781±0.011 ^{bc}	1.088±0.014 ^e	0.835±0.008 ^{cd}	0.834±0.009 ^{cd}
MFR**	0.395±0.075 ^a	0.578±0.075 ^a	0.485±0.075 ^a	0.528±0.075 ^a	0.653±0.075 ^a	0.5±0.075 ^a	0.64±0.075 ^a
MSR*	0.021±0.008 ^a	0.029±0.020 ^a	0.03±0.000 ^a	0.02±0.008 ^a	0.031±0.010 ^a	0.024±0.009 ^a	0.02±0.008 ^a
MST*	0.73±0.018 ^{ab}	0.995±0.053 ^{cd}	0.713±0.009 ^{ab}	0.779±0.063 ^{ab}	1.119±0.018 ^d	0.773±0.167 ^{bc}	0.64±0.119 ^a
Raiz:PA*	0.031±0.011 ^a	0.028±0.018 ^a	0.04±0.000 ^a	0.028±0.012 ^a	0.029±0.010 ^a	0.033±0.016 ^a	0.031±0.015 ^a
MFE (g/cm2)*	0.044±0.011 ^a	0.079±0.073 ^a	0.04±0.020 ^a	0.048±0.010 ^a	0.044±0.020 ^a	0.066±0.053 ^a	0.36±0.051 ^b
AFE (cm2/g)*	52.99±10.999 ^{bc}	56.321±30.739 ^{bc}	70.816±21.363 ^c	62.059±19.788 ^{bc}	52.338±26.443 ^{bc}	37.304±28.184 ^b	2.851±0.454 ^a
RAF (cm2/g)**	51.411±9.751 ^a	54.781±9.751 ^a	68.209±9.751 ^a	60.26±9.751 ^a	50.978±9.751 ^a	36.229±9.751 ^a	74.521±9.751 ^a
RMR*	0.028±0.009 ^a	0.028±0.018 ^a	0.039±0.004 ^a	0.028±0.012 ^a	0.028±0.009 ^a	0.03±0.013 ^a	0.031±0.015 ^a
RMF*	0.973±0.009 ^a	0.973±0.018 ^a	0.961±0.004 ^a	0.973±0.012 ^a	0.973±0.009 ^a	0.97±0.013 ^a	1.334±0.225 ^b
AF/F**	8.636±1.934 ^a	13.24±1.934 ^a	12.464±1.934 ^a	11.491±1.934 ^a	12.736±1.934 ^a	7.338±1.934 ^a	10.031±1.934 ^a
AFU**	46.699±3.758 ^{cd}	79.036±3.758 ^a	72.559±3.758 ^{ab}	65.356±3.758 ^{ab}	61.259±3.758 ^{bc}	29.516±3.758 ^e	40.914±3.758 ^{de}
MSR/MSPA**	0.030±0.004 ^a	0.029±0.004 ^a	0.044±0.004 ^a	0.026±0.004 ^a	0.029±0.004 ^a	0.034±0.004 ^a	0.033±0.004 ^a
CR/MSR*	1162.500±323.761 ^a	1355.625±562.787 ^a	920.000±252.530 ^a	1362.708±583.673 ^a	918.021±336.393 ^a	1437.292±1009.553 ^a	2053.125±1012.912 ^a
MSPA/MST*	0.975±0.011 ^a	0.974±0.018 ^a	0.963±0.007 ^a	0.974±0.012 ^a	0.972±0.007 ^a	0.969±0.015 ^a	1.000±0.000 ^a
MSR/MST**	0.029±0.004 ^a	0.028±0.004 ^a	0.042±0.004 ^a	0.026±0.004 ^a	0.028±0.004 ^a	0.032±0.004 ^a	0.033±0.004 ^a

Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente

*Teste Kruskal Wallis. Valores expressos por média± desvio padrão.

** Anova, Teste de Tukey (p<0,05). Valores expressos por média ± erro padrão.

Tabela 2: Teor de pigmentos fotossintéticos em *Zea mays* L. para os tratamentos com concentrações de ácidos húmicos (AH) de lodo de esgoto sanitário (LE), Mangue (M) e Vermicomposto (V).

	Tratamentos						
	AH - LE (0,5 mMC L ⁻¹)	AH-LE (1,0 mMC L ⁻¹)	AH-LE (2,0 mMC L ⁻¹)	AH -LE (4,0 mMC L ⁻¹)	AH - M (6,76 mMC L ⁻¹)	AH-V (1,85 mMC L ⁻¹)	Controle
Clorofila a*	30,536±3,813 ^{ab}	52,221±16,422 ^c	46,831±13,773 ^{bc}	44,61±18,080 ^{bc}	27,451±2,476 ^a	47,51±23,002 ^{bc}	30,622±9,989 ^{ab}
Clorofila b*	6,751±1,127 ^{bc}	11,578±4,317 ^c	8,175±3,807 ^c	7,875±3,471 ^{bc}	4,25±0,685 ^a	7,578± 4,131 ^{abc}	4,326±1,612 ^{ab}
Clorofila Total*	49,875±6,228 ^{ab}	85,294±26,537 ^c	76,331±22,493 ^{bc}	72,717 ±29,467 ^{bc}	44,704±3,981 ^{bc}	77,387±37,482 ^{bc}	49,837±16,248 ^{ab}
Clorofila a/b**	4,574±0,720 ^a	4,909±0,720 ^a	6,143±0,720 ^a	5,9± 0,720 ^a	6,609±0,720 ^a	6,538± 0,720 ^a	7,478±0,720 ^a
Carotenóides*	59,967±13,536 ^{abc}	146,727±67,271 ^c	101,31±62,685 ^c	96,924± 61,755 ^c	32,927±6,061 ^a	108,9±110,853 ^{bc}	39,654±21,914 ^{ab}

Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente

*Teste Kruskal Wallis. Valores expressos por média± desvio padrão.

** Anova, Teste de Tukey (p<0,05). Valores expressos por média ± erro padrão.

Tabela 3: Quantificação da densidade estomática em folhas de *Zea mays* L. para os tratamentos com concentrações de ácidos húmicos (AH) de lodo de esgoto sanitário (LE), Mangue (M) e Vermicomposto (V).

	Tratamentos						Controle
	AH - LE (0,5mMC L ⁻¹)	AH-LE (1,0 mMC L ⁻¹)	AH-LE (2,0 mMC L ⁻¹)	AH -LE (4,0 mMC L ⁻¹)	AH-M (6,76mMC L ⁻¹)	AH-V (1,85mMC L ⁻¹)	
Abaxial	63,68±6,506 ^a	63,160±8,237 ^a	63,640±7,300 ^a	58,400±6,086 ^a	68,840±5,210 ^a	69,240±8,562 ^a	64,360±6,303 ^a
Adaxial	38,32±5,959 ^a	48,920±6,792 ^a	41,360±3,675 ^a	43,600±4,022 ^a	45,800±4,539 ^a	46,560±11,366 ^a	43,320±43,320 ^a

Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente.

Teste Kruskal Wallis. Valores expressos por média± desvio padrão.

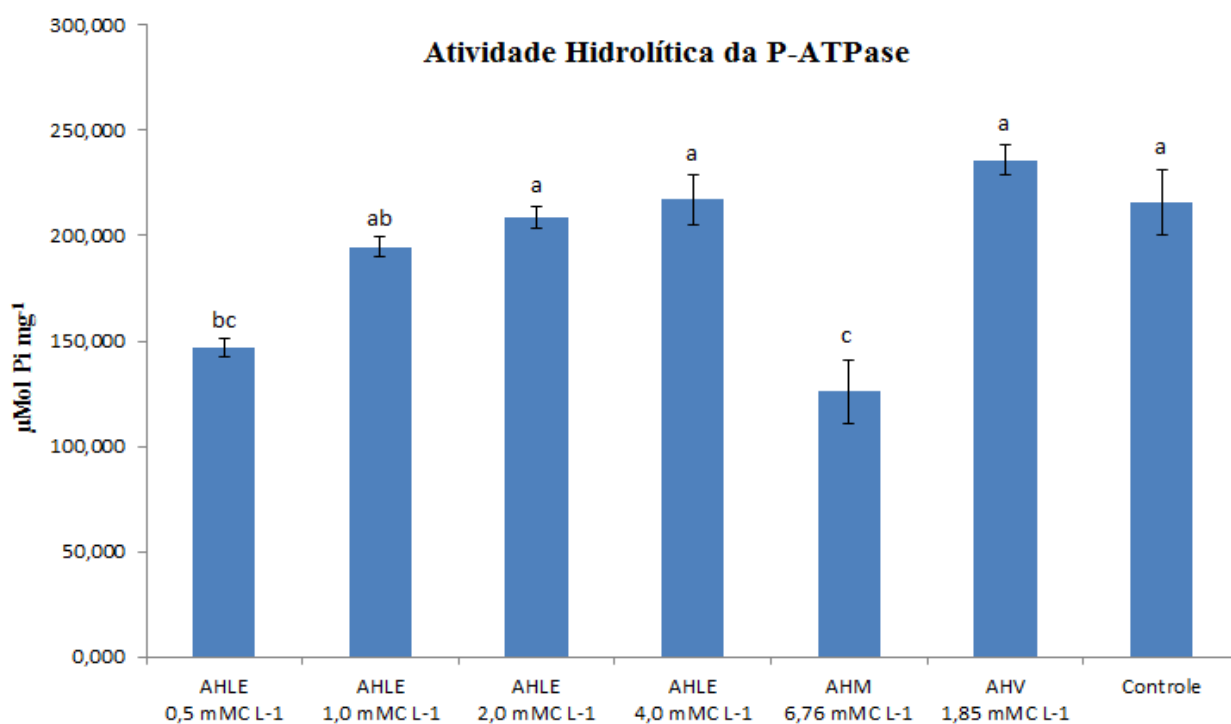


Figura 1: Atividade da bomba hidrolítica H⁺- ATPase em vesículas isoladas de raiz em relação as concentrações de AHLE (0,5 mMC L⁻¹): ácido húmico lodo de esgoto; AHLE (1,0 mMC L⁻¹): ácido húmico lodo de esgoto; AHLE (2,0 mMC L⁻¹): ácido húmico lodo de esgoto; AHLE (4,0 mMC L⁻¹): ácido húmico lodo de esgoto; AHM (6,76 mMC L⁻¹): ácido húmico mangue; AHV (1,85 mMC L⁻¹): ácido húmico vermicomposto.

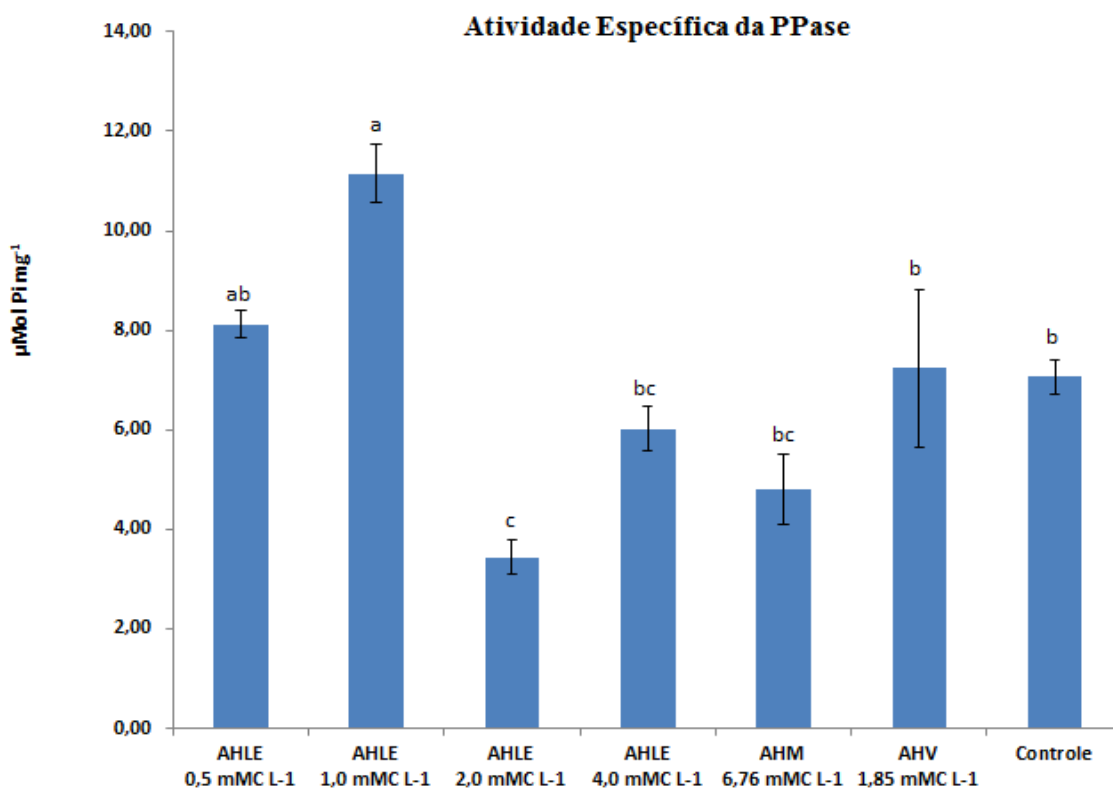


Figura 2 Atividade da pirofosfatase H⁺- PPase em vesículas isoladas de raiz em relação as concentrações as concentrações de AHLE (0,5 mMC L⁻¹): ácido húmico lodo de esgoto; AHLE (1 mMC L⁻¹): ácido húmico lodo de esgoto; AHLE (2 mMC L⁻¹): ácido húmico lodo de esgoto; AHLE (4 mMC L⁻¹): ácido húmico lodo de esgoto; AHM (6,76 mMC L⁻¹): ácido húmico mangue; AHV (1,85 mMC L⁻¹): ácido húmico vermicomposto.