

ARTÍCULO ORIGINAL

Protección antioxidativa de los ácidos húmicos extraídos de vermicompost en arroz (*Oryza sativa* L.) var. IACuba30

R. Hernández¹; A. García¹; Liane Portuondo¹, Sahylin Muñiz¹; R. Berbara^{II}, F. Izquierdo^I

^IUniversidad Agraria de la Habana, Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Agronomía, Apartado Postal 18-19, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: reinierh@isch.edu.cu;

^{II}Universidad Federal Rural de Río de Janeiro, Brasil

RESUMEN: Las sustancias húmicas son de gran importancia por el efecto que ejercen sobre la actividad enzimática en las plantas, que les posibilita mitigar el estrés oxidativo que se genera por el déficit de agua. El trabajo tuvo como objetivo, evaluar el efecto de ácidos húmicos (AH) extraídos de vermicompost, sobre la germinación y estrés oxidativo en el cultivo del arroz. Los AH fueron obtenidos a partir de vermicompost de estiércol vacuno. Los tratamientos utilizados responden a dos concentraciones de AH (34 y 46 mg.L⁻¹) en condiciones controladas y semicontroladas, además de un tratamiento control. En las condiciones controladas se determinó el efecto de aplicación vía radical de los AH en la fase de germinación, evaluándose los indicadores número y longitud de raíces, altura de plántulas y masa seca foliar y radical. En condiciones semicontroladas se evaluó la dinámica de la actividad de las peroxidasas (POXs), además del contenido de proteínas y aminoácidos. Los resultados mostraron efectos positivos de los AH sobre los indicadores evaluados en la fase de germinación, con un aumento en la emisión de raíces y pelos radicales hasta un 60% superior al control. Los AH estimularon la actividad de las POXs cuando fueron aplicados foliarmente en plantas sometidas a estrés por déficit de agua, mostrándose en el momento de mayor actividad de POXs, un aumento en el contenido de proteínas, indicativo de estimulación en la biosíntesis y consumo de aminoácidos. Los AH mostraron potencialidades como protectores ante el estrés por déficit de agua.

Palabras clave: ácidos húmicos, estrés hídrico, peroxidasas.

Antioxidative protection of humic acids extracted from vermicompost in rice (*Oryza sativa* L.) var. IACuba30

ABSTRACT: Humic substances have great importance for their effect on enzymatic activity in plants, mitigating the oxidative stress generated by water deficit. This work was aimed at evaluating the effect of humic acids (HA) extracted from vermicompost, on the germination and oxidative stress in the cultivation of rice. HA were obtained starting from bovine manure vermicompost. The treatments used respond to two HA concentrations (34 and 46mg .L⁻¹) under controlled conditions, besides a control treatment. Under the controlled and semicontrolled conditions, the application effect was determined via radical of HA in the germination phase, evaluating the indicators: number and longitude of roots, height of seedlings and foliate and radical dry mass. Under semicontrolled conditions the activity dynamics of peroxidases (POXs) was evaluated, besides the content of proteins and aminoacids. The results showed positive effects of HA on the indicators evaluated in the germination phase, with an increase on the emission of roots and radical hairs to a 60% superior to the control. The HA stimulated the activity of POXs when foliage was applied in plants subjected to stress due to water deficit, showing the greatest activity of POXs at the moment, an increase in the content of proteins, indicating stimulation in biosynthesis and a consumption of aminoacids. The HA showed potentialities as protective against stress due to deficit of water.

Key words: humic acids, stress due to water deficit, peroxidases.

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cultivos más antiguos que conoce la humanidad, constituye alimento básico altamente demandado en Cuba y también a nivel mundial. Este requiere grandes volúmenes de agua para lograr un buen desarrollo (1). La falta de este recurso en el país, ha provocado la búsqueda de nuevas alternativas para su producción. Actualmente, los cinco Complejos Agroindustriales existentes, se encuentran produciendo solo al 25% de sus capacidades debido al déficit de agua existente.

Una de las variantes que puede llevar a la sostenibilidad en este cultivo frente al estrés hídrico pudiera ser la utilización de las sustancias húmicas, dada la importancia que se les atribuye a estas en la agricultura, las cuales se basan en primera instancia, en sus posibilidades para mejorar las propiedades físicas y químicas de los suelos (2).

Su aplicación en las plantas influye en diversos procesos del metabolismo primario y secundario, sobre todo porque independientemente de su fuente de origen, las sustancias húmicas guardan una estrecha relación estructural con compuestos activos y sustratos en las plantas (3). Por estas razones, se estudian los efectos protectores de las sustancias húmicas ante estrés fisiológico en las plantas.

Por la importancia que se le atribuyen a las sustancias húmicas, acerca de sus potencialidades para ejercer efectos semejantes a las hormonas y actúan cuando las plantas se encuentran bajo condiciones de estrés, se sugiere que pueden ser utilizadas en la agricultura.

En el cultivo del arroz tendrían un buen campo de aplicación, con el fin de que las mismas ejerzan efectos análogos que promuevan y/o contribuyan a la estimulación de los procesos hormonales que regulan los mecanismos protectores frente a diversos tipos de estrés, entre ellos el hídrico. El trabajo tuvo como objetivo, evaluar el efecto de ácidos húmicos extraídos de vermicompost sobre la germinación y el estrés oxidativo en el cultivo del arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló como parte de las investigaciones que realiza el Grupo de Materia Orgánica y Bioestimulantes del Departamento de Química de la Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana (UNAH), en coordinación con el Instituto de Suelo y la Facultad de Química de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro, Brasil.

Los ácidos húmicos (AH) fueron obtenidos a partir de vermicompost de estiércol vacuno en la UNAH. Para ello se empleó el procedimiento de la Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas (IHSS) (4). Los AH se extrajeron con una solución de NaOH (0,1 mol. L⁻¹) a razón de 1:10 (p:v) seguida de reposo en atmósfera de N₂. Posteriormente, se precipitaron adicionando HCl (6 mol.L⁻¹) hasta pH=1. Los AH se solubilizaron nuevamente en medio alcalino, se precipitaron y se lavaron con agua. A continuación se adicionó una solución diluida de HF_(ac) 0,25 mol.L⁻¹ y HCl 0,1 mol. L⁻¹ agitando durante 8 horas. Los AH se separaron del residuo por decantación y centrifugación utilizando una centrífuga modelo Alreza a una velocidad de 3300 rpm.

Caracterización de los ácidos húmicos

La acidez total se determinó por valoración de los AH con un exceso de Ba(OH)₂. Los grupos carboxilos se determinaron agitando los AH durante 24 horas con una solución en exceso de Ca (CH₃COO)₂. El CH₃COOH liberado se valoró con NaOH a 0,1 M. Los hidroxilos fenólicos se obtuvieron por diferencia. La relación E4/E6 (relación de los coeficientes de extinción a 465nm y 665nm) se determinó disolviendo 1 mg de AH en 5mL de NaHCO₃ (0,05 mol.L⁻¹) y ajustando el pH a 8,3 con NaOH. La absorbancia a 465nm y 665nm se midió en el equipo RayLihght UV-2100. La composición elemental de los A.H (C, H, N, S) fue determinada usando el equipo LECO CHNS-932 elemental analyzer.

Evaluación de los efectos de los AH sobre la germinación del arroz

En los experimentos de germinación se utilizó la variedad de arroz IACuba30. Estos se realizaron bajo condiciones controladas, temperatura 28°C, humedad relativa 90%, e iluminación (16 horas luz y 8 oscuridad) en el cual se utilizaron bandejas plásticas con algodón. Se realizaron tres tratamientos, diez bandejas por cada tratamiento. Un primer tratamiento control con agua y los otros dos con sendas concentraciones de AH (34 y 46 mg.L⁻¹) las cuales se aplicaron directamente a las semillas. Transcurridos 5 días después de la germinación, se evaluaron indicadores en las plantas como masa seca, número de raíces emitidas y longitud de las plántulas. A partir del día 25, las plantas se consideraron bajo condiciones de estrés hídrico, con la anulación del contenido de agua en las bandejas.

Evaluación de los efectos de los AH sobre plantas de arroz sometidas a estrés por déficit de agua

La siembra se realizó entre los meses de enero y febrero en condiciones de campo, en el área de accli-

matación, correspondiente al grupo de Biotecnología Vegetal del Departamento de Biología y Sanidad Vegetal en La Universidad Agraria de la Habana. Las semillas fueron plantadas en canaletas de 2,30 m de largo y 0,50 m de ancho con un suelo Ferráltico Rojo lixiviado (5), utilizándose la técnica de riego por aspersión. Los canteros se dividieron a los 40 días después de germinadas las plantas en tres parcelas para evaluar dos concentraciones de ácidos húmicos y un control. Las aplicaciones fueron realizadas por aspersión foliar, las dos concentraciones (AH) utilizadas fueron de (34 y 46mg (AH).L⁻¹). Se tomaron muestras después de la aplicación a los 30, 60, 120, 240 y 360 minutos, para realizar las evaluaciones sobre emisión de raíces, contenido de masa seca y crecimiento de las plantas. Se utilizó un diseño totalmente aleatorizado.

Evaluación de la actividad de las Peroxidasas (POXs), contenido de proteínas y aminoácidos totales

La actividad de POXs fue determinada por el método de Chance y Machly (6). La lectura de la absorbancia se realizó a 240nm contra un blanco preparado con el extracto enzimático después de la adición de H₂SO₄. La actividad enzimática se expresó en microgramos de H₂O₂ que reaccionaron para la masa de muestra en segundos [ig (H₂O₂).g⁻¹.s⁻¹ (7).

El contenido de proteínas totales se determinó por el método de Lowry (8). Se partió de 0,5 gramos de material vegetal (hojas y raíces) homogenizadas en 10mL de ácido tricloroacético al 20%. La absorbancia de la muestra se determinó contra un blanco, el cual fue preparado a partir de extracto enzimático (maceración utilizando agua destilada a pH 6,8; se centrifugó a una velocidad de 2500rpm y se colectó el sobrenadante, la curva patrón se realiza a partir de un concentrado proteico de, albúmina bovina (BSA) a una longitud de onda de 660nm en un espectrofotómetro RayLihght UV-2100. Se determinó el contenido de aminoácidos totales, y se utilizaron 0,5g de material vegetal que se homogenizaron en 10mL de etanol al 80%. La absorbancia se leyó a 570nm de longitud de onda en un espectrofotómetro RayLihght UV-2100.

Procesamiento de los datos y análisis estadístico

En todos los casos los tratamientos fueron comparados mediante Análisis de Varianza Simple seguido de una prueba de comparación de rangos múltiples de Tukey. Durante todo el análisis se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS (5.1plus).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los ácidos húmicos

La espectroscopía UV-vis resulta una técnica que brinda información general sobre las características estructurales de las sustancias. En un sistema estructural tan complejo como el de las sustancias húmicas resulta difícil obtener información, sin embargo, se pudo conocer sobre las estructuras con presencia de insaturaciones alifáticas y aromáticas.

En la Figura 1 se presenta un decrecimiento de la absorción con el aumento en la longitud de onda. Una banda intensa a las menores longitudes de onda (200nm-250nm) fue observada en el espectro. Esta puede ser asignada a estructuras con enlaces insaturados, los que son responsables de la elevada absorción de luz, que es característica típica de las sustancias húmicas.

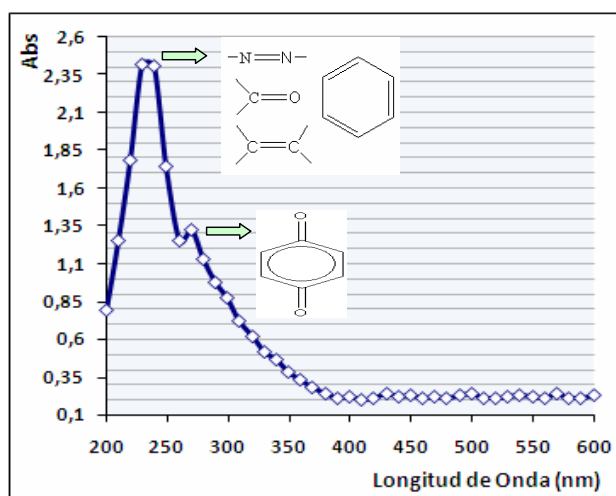


FIGURA 1. Espectroscopía UV-VIS de ácidos húmicos./ *Espectroscopic UV-VIS of humic acids.*

La Tabla 1 muestra la composición elemental y el contenido de los grupos funcionales de los ácidos húmicos evaluados. En cuanto las relaciones H/C, O/C, C/N y acidez total mostraron semejanza a los resultados informados por IHSS (9).

El espectro de los AH obtenido en este estudio fue similar al informado por otros autores, para materiales de suelo y para vermicompostados (10). (Fig. 2).

TABLA 1. Composición elemental y contenido de grupos funcionales ácidos./ *Elementary composition and content of acids functional groups*

| C | H | O | N | S | H/C | O/C | C/N | Carboxilos | Fenoles | Acidez total |
|------|------|------|------|------|------|------|------|--------------------------|---------|--------------|
| | | | | | | | | mol.kg ⁻¹ (C) | | |
| 56,7 | 4,84 | 34,6 | 3,07 | 0,72 | 0,08 | 0,61 | 18,4 | 9,24 | 2,03 | 11,27 |

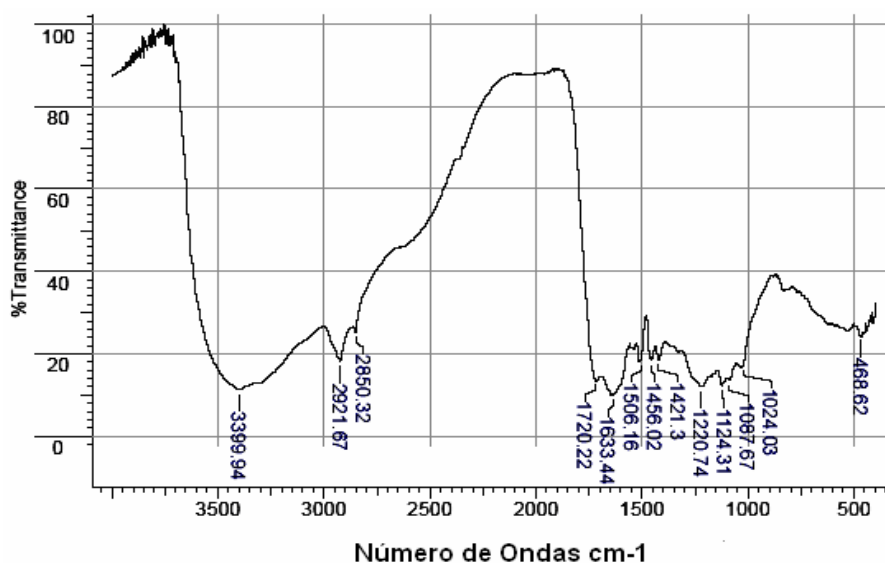


FIGURA 2. Espectro FTIR de los ácidos húmicos procedentes de vermicompost a partir de estiércol vacuno./ *FTIR spectrum of humic acids from bovine manure vermicompost.*

Evaluación de los efectos de los AH sobre la fase de germinación en el arroz bajo condiciones controladas

La Figura 3 muestra el número de raíces emitidas a los cinco días después de germinadas (ddg) las semillas de arroz, para el control y las semillas tratadas con ácidos húmicos. Ambas concentraciones de AH estimularon la emisión de raíces en un 60% por encima del control, lo que puede deberse a que produjeron un aumento en la división meristemática, ya que en estas zonas de elongación y diferenciación celular existe una elevada densidad de células de ese tipo, donde su constante actividad metabólica las hace prominentes para la formación de raíces en las plantas cuando se les asperja foliarmente ácido húmico. Autores, como Rodda *et al.* (11) informaron que el mayor número de raíces emitidas se logró en las concentraciones entre 20 y 40 mg.L⁻¹ y estas a su vez coincidieron con las de mayores efectos en este indicador.

En la figura 4 se observa el contenido de masa seca para la parte radical, la cual se vio estimulada por los AH en las dos concentraciones utilizadas. Para ambos tratamientos el estímulo resultó en un aumento

entre 30% y 70% de la masa seca por encima del control. En la parte aérea se observó cierta estimulación con respecto al control, pues los ácidos húmicos indujeron la síntesis de compuestos protectores de la planta frente al déficit de agua, provocando así, el aumento en la parte aérea de la planta.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Martínez (12) en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). Otro estudio realizado en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), indicaron que las aplicaciones de ácidos húmicos extraídos de vermicompost de estiércol vacuno, utilizando concentraciones semejantes a las evaluadas en este estudio, mostraron que para los distintos estadios fisiológicos de las plantas, se lograron efectos positivos sobre la masa seca de raíces y hojas, relacionado con un aumento en el contenido de proteínas, aminoácidos y pigmentos fotosintéticos (13).

Los resultados del análisis de crecimiento (Fig. 5), evidenciaron que no existió un efecto positivo sobre la multiplicación celular, lo que pudiera estar relacionado con las concentraciones utilizadas, las que pueden haber resultado bajas para esta etapa del crecimiento de las plantas. Sin embargo, un hecho importante a

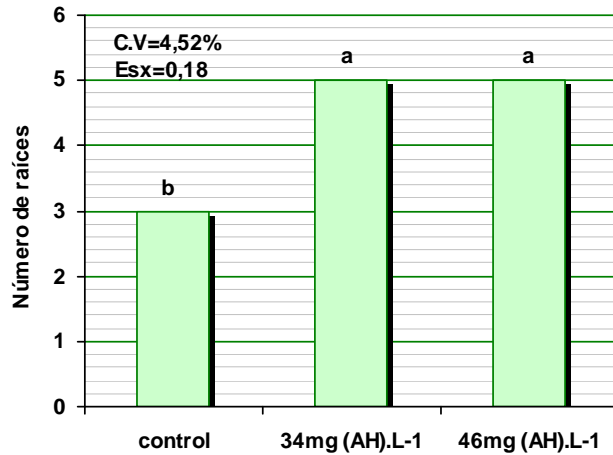


FIGURA 3. Efectos de los AH en la emisión de raíces en el arroz (*O. sativa* var. IACuba30)./ *Effects of HA in the emission of roots in rice (O. sativa* var. IACuba30).

señalar es que, a partir de este momento, la lámina de agua disponible en contacto con las raíces disminuyó considerablemente, ya al día 25 la presencia de agua en el sustrato de algodón se anuló, por lo que estas plántulas fueron consideradas bajo estrés por déficit de agua.

En este momento las plántulas disminuyeron su ritmo de crecimiento y las del control no continuaron creciendo, sin embargo se observó un ligero crecimiento en las plántulas que fueron tratadas con AH, aún con deficiencia de agua.

Este comportamiento está relacionado con el hecho de que los AH actuaron similares a las hormonas,

lo cual químicamente es posible, pues presentan estructuras semejantes a ascorbato peroxidases (APX), superóxido dismutasas (SOD) y glutation reductasa (GR), hormonas que intervienen en el proceso de defensa bajo condiciones de estrés hídrico.

De esta forma se sintetizan por parte de la planta, compuestos que resultan importantes en la defensa de la planta, cuando se encuentra sometida a estrés por déficit hídrico. Autores como Muscolo *et al.* (14) demostraron mediante la caracterización espectroscópica de sustancias húmicas, que sus características estructurales propician efectos de estimulación en las plantas sobre la actividad de una amplia gama de enzimas, ejemplo de esto, es la APX, SOD GR y hormonas como el Ácido abscísico (ABA) del metabolismo primario y secundario.

Actividad y cinética enzimática de POXs en plantas de arroz bajo condiciones semicontroladas

La Figura 6 muestra la actividad de las peroxidases en las raíces y en las hojas. Las peroxidases actúan sobre las especies radicales de oxígeno convirtiéndolas en especies inocuas para las plantas, participando además, en varios procesos metabólicos esenciales incluyendo la regulación del crecimiento celular, lignificación, oxidación fenólica y defensa contra patógenos (15).

Ambas concentraciones de AH evaluadas en este estudio, propiciaron valores de actividad enzimática superiores a las obtenidas en las plantas del testigo no aplicado (Fig. 6). Para la parte aérea de la planta (Fig. 6A) la acción enzimática se vio estimulada pasados solamente 30 minutos después de la aplicación y la

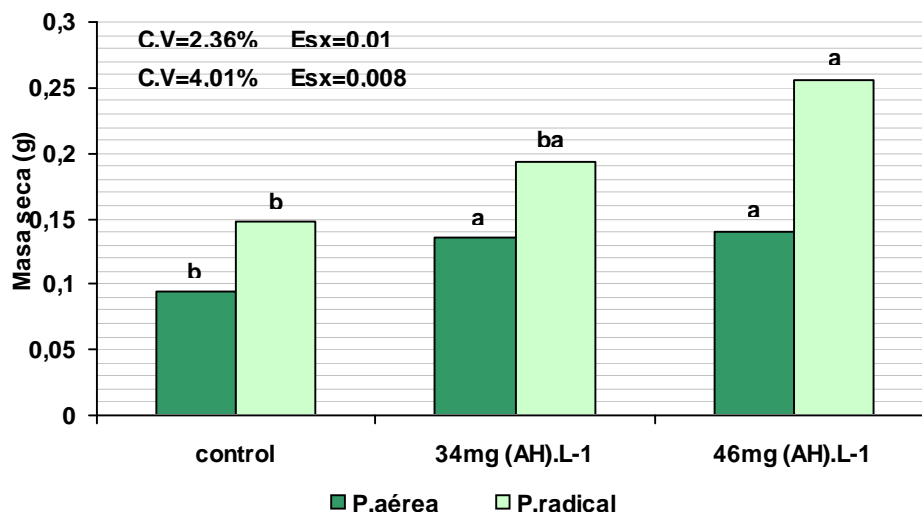


FIGURA 4. Efectos de los AH sobre la masa seca de la parte aérea y radical en las plántulas./ *Effects of HA on the dry mass of the air and radical part in seedlings.*

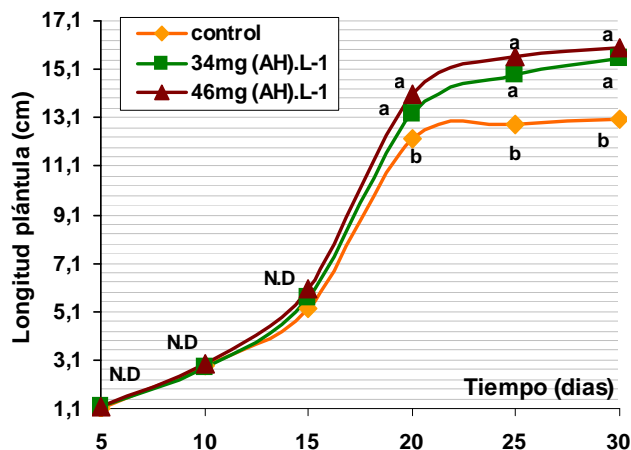


FIGURA 5. Crecimiento de las plántulas de arroz tratadas con ácidos húmicos./ *Growth of rice plants treated with humic acids.*

mayor actividad se logró justamente a las 2 horas posteriores a la aplicación. El mayor efecto se consiguió con la concentración menor, aunque el efecto de la concentración mayor fue mucho más estable en el tiempo.

Por su parte, la Figura 6B evidencia que existieron diferencias con respecto a la parte foliar de la planta, observándose que la estimulación para las dos concentraciones fue lograda una hora después de la aplicación. La mayor actividad fue alcanzada por la concentración de 34mg (AH).L⁻¹ dos horas posterior a la aplicación, coincidiendo con el resultado obtenido en la parte foliar de la planta.

Estos comportamientos, pueden ser explicados a través de la acción análoga de fragmentos estructura-

les de AH semejante a una de las hormonas que participan en la optimización de los mecanismos de defensa de la planta (ABA) y coinciden con la forma de actuar de esta hormona. Estas actúan a partir de una concentración crítica alcanzada mediante su biosíntesis en las plantas. Las moléculas de estas hormonas son transportadas hacia el resto de la planta por vías xilema y floema, tanto en las hojas como en las raíces. Los fragmentos estructurales de ácidos húmicos aplicados, semejantes a la hormona que activa el mecanismo de defensa de planta, contribuyeron a alcanzar esta concentración crítica con más rapidez.

Evaluación del contenido de proteínas y aminoácidos en hojas de las plantas de arroz

Un momento que puede revelar información sobre el estado del contenido de proteínas en las plantas con la aplicación de los ácidos húmicos es el de mayor actividad de las POXs, porque un aumento en el contenido de proteínas pudiera interpretarse indirectamente con una estimulación en la síntesis de compuestos de esta naturaleza química como son las enzimas.

Como se presenta en la Fig.7, a los 120 minutos de la aplicación ocurre un aumento del contenido de proteínas foliares totales en ambos tratamientos. Los incrementos en la síntesis de proteínas se obtuvieron entre 5% y 10% con respecto al control, este último para la concentración menor de AH. Al parecer esto se debe a la relación entre la aplicación de ácidos húmicos-síntesis proteica- actividad enzimática máxima, lo cual muestra un efecto análogo de los ácidos húmicos semejante a las hormonas que activan el mecanismo de defensa de la planta.

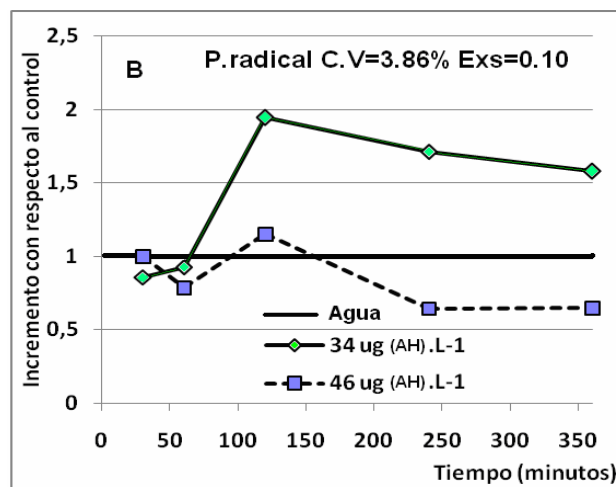
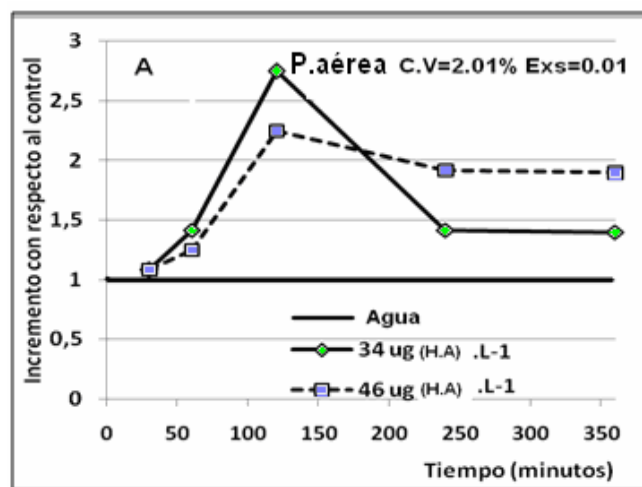


FIGURA 6. Dinámica de la actividad enzimática de POXs, mostrando incrementos con respecto al control (A) hojas y (B) raíces./ *Dynamics of POXs enzymatic activity, showing increments in relation to the control (A) leaves and (B) roots.*

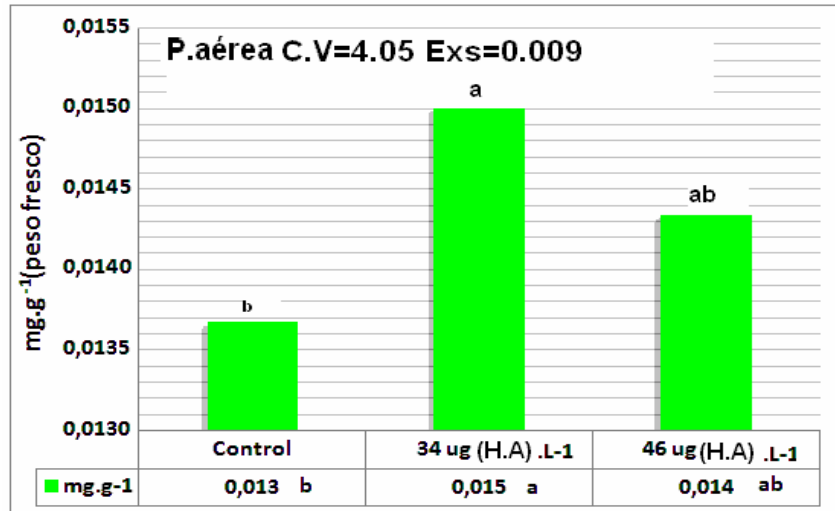


FIGURA 7. Contenido medio de proteínas totales en hojas, a los 120 minutos de la aplicación por tratamientos (ácidos húmicos y control). / *Average of total protein content in leaves at 120 minutes post-treatments (acids humic and control).*

En la Fig. 8 se presenta el contenido de aminoácidos totales en hojas para las dos concentraciones de AH, observándose que como en el caso de las hojas ocurre una disminución de los contenidos de aminoácidos totales, encontrándose en la concentración menor (34mg (AH).L⁻¹), disminuciones de hasta 70%.

Frente al estrés por sequía o deficiencia de agua, las plantas como defensa, acumulan osmolitos protectores para distintas funciones, siendo un ejemplo

de ello el aminoácido L-prolina. Sin embargo, aunque en este trabajo se determinó el contenido total de aminoácidos, los resultados sugieren un elevado consumo de los mismos, presumiblemente para la alta demanda en la síntesis proteica estimulada por los AH. En este sentido, la mayor reducción del contenido de aminoácidos coincide con la concentración de AH que reporta mayor actividad enzimática de las POXs y al mismo tiempo produce mayor contenido de proteínas.

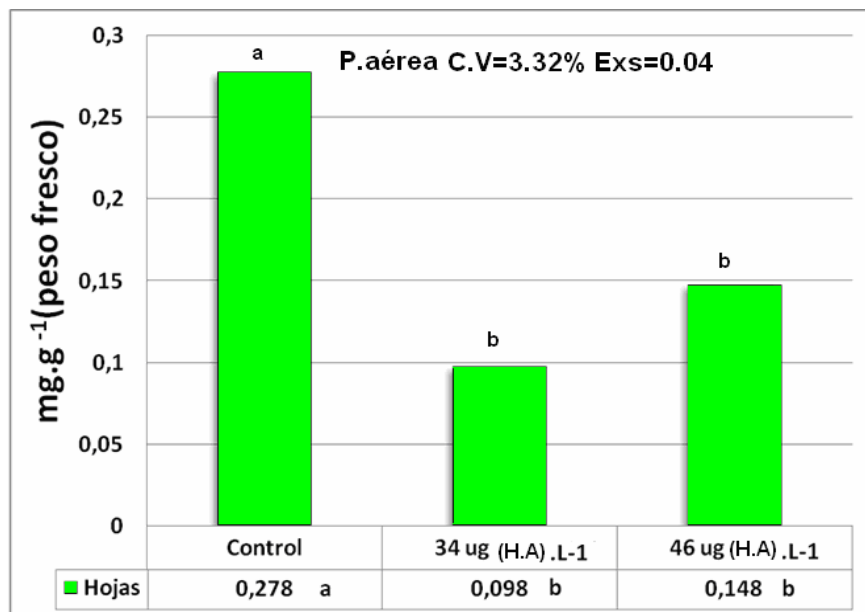


FIGURA 8. Contenido de aminoácidos totales en hojas, a los 120 minutos de aplicación. / *Total aminoacid content in leaves, 120 minutes after application.*

Investigaciones realizadas evidenciaron que la variedad IACuba30 es capaz de presentar respuestas antioxidativas mediante la actividad de las POXs cuando son sometidas a estrés biótico (16). Una posible confirmación de los efectos de los AH obtenidos en este trabajo, pudiera ser las diferencias encontradas en los trabajos realizados con plantas de *Aloe babadensis* Miller frente al estrés hídrico, en el cual no se utilizan AH y en el mismo, se presentó una disminución en la síntesis de proteínas (17). En nuestro trabajo la alta demanda para la síntesis de proteínas estuvo garantizada por la estimulación ejercida por los AH, demostrando que, tuvieron efectos similares a hormonas, las que bajo condiciones de estrés hídrico, estimulan la síntesis de enzimas protectoras de la planta, específicamente las semejantes al ácido abscisico, hormona encargada de activar los mecanismos de defensa de la planta frente a cualquier tipo de estrés sea biótico o abiótico.

Los ácidos húmicos pudieran actuar en el cultivo del arroz como potenciadores de asimilación de nutrientes, estimulando y corrigiendo la carencia de algunos micro y macro elementos que se encuentran en el complejo adsorbente del suelo, necesarios para el buen desarrollo del cultivo. Para este cultivo, que generalmente requiere grandes volúmenes de agua y fertilizantes nitrogenados para obtener óptimos rendimientos, la aplicación de AH, en presencia de déficit hídrico pudiera ser una alternativa para atenuar las pérdidas, pues actúan aumentando la producción de enzimas protectoras en las plantas como las POXs, y otros complejos enzimáticos, capaces de erradicar las especies reactivas de oxígeno que se forman debido al estrés oxidativo provocado por factores bióticos y abióticos. Adicionalmente, los AH tienden a estimular el crecimiento radical en las primeras fases del cultivo, pudiéndose utilizar en condiciones de semilleros, logrando plantas más fuertes para el trasplante. Pueden ser utilizados también con el propósito de acortar el ciclo del biológico del cultivo, lo cual sería beneficioso desde el punto de vista económico (18).

Los extractos húmicos y los AH presentan una composición estructural que permite que las plantas emitan respuestas ante el ataque de patógenos. Una de las acciones es el efecto homeostático (tampón), demostrando la capacidad de moderar los cambios de acidez y neutralizar los compuestos orgánicos tóxicos que llegan por la contaminación. De esta forma, aquellos suelos que posean un nivel adecuado de materia orgánica se encuentra con una mayor defensa frente a invasiones bacterianas y fúngicas tóxicas para la planta, dándole una mayor protección ya sea por vía foliar como radicular, estimulando gran cantidad de microorganismos simbiotes (19).

La función de los AH en la defensa ante patógenos en el arroz en Cuba, podrá ser una vertiente de investigación, teniendo en cuenta la importancia de este cultivo para Cuba.

REFERENCIAS

1. Infoagro com. El cultivo del arroz primera parte [sede Web].infoagro.com;2009- [acceso el 5 de marzo del 2010]. Disponible en: <http://www.infoagro.com/herbaceos/cereales/arroz.htm>
2. Mylavarapu RS, Zinati GM. Improvement of soil properties using compost for optimum parsley production in sandy soils. 2009;120:426-430.
3. Schnitzer M, Gupta UC. Determination of acidity in soil organic matter: Soil Sci. 1965;27:274-277.
4. Swift R. Organic matter characterization Soils Science Society American, Bock Ser.1996;1011-1069.
5. Hernández A, Pérez J, Bosch D, Rivero L. Nueva versión de Clasificación Genética de los Suelos de Cuba. Instituto de Suelos. Ministerio de la Agricultura. 1995; 66 pág.
6. Chance B, Machly AC. Inter Science publications.1967;204-230.
7. Ganesh G, Franklin DW, Gassert R, Imamizu H, Kawato M. Accurate Real-Time Feedback of Surface EMG During FGMRI: J Neurophysiol. 2006;97:912-920.
8. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farra L, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journ Biology Chemistry. 1951;193(4):265.
9. Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas (IHSS) [sede Web]. IHSS.com:2009-[acceso el 10 de septiembre de 2009]. Disponible en: www.Ihss.com
10. Calderín A, Guridi F, García E, Rosado E, Valdés R, Pimentel JJ, et al. Material de origen natural que retiene cationes de metales pesados: Revista Iberoamericana de polímeros. 2007;8:204-214.
11. Rodda MR, Canellas LP, Facanha AR, Zandonadi DB, Guerra JGM, Almeida DL, et al. Estimulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. Bras Cienc. 2006;30(4):102-114.

12. Martínez BD. Evaluación del efecto del Liplant en indicadores bioquímicos-fisiológicos en el cultivo del maíz (*Zea Mays* L.). [Tesis de Máster en Ciencias de la Química Agraria]. Universidad Agraria de La Habana. 2006.
13. Portuondo FL, Calderín GA, Hernández OG, Guridi FI, Krepsky N, Machado JPT. Componentes del metabolismo del nitrógeno en la fase vegetativa del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Modificados por la aplicación de ácidos húmicos. [AGROTROP en CD-ROM]. La Habana Cuba. 2009.
14. Muscolo A, Sidari M, Attinà E. Biological activity of Humin Substances is related to their chemical structure. *Soil Chemistry*. 2007;71:75-83.
15. Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H. Peroxidases in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris* L. Copper and Zinc Phytotoxicity: a comparison. *Jour. Plant Physiol*. 2002;159:869-876.
16. Fernández A, Solórzano E, Miranda I. Actividad peroxidasa, glucanasa, polifenol oxidasa y fenilalanina amonio liasa en variedades de arroz con diferente grado de susceptibilidad al ácaro *Steneotarsonemus spinki*. *Rev Protección Veg*. 2005;20(2):132-136.
17. Ramírez I, Salinas C, Huerta C. Superoxide dismutase activity and sugars and fructans synthesis as protection mechanisms against water deficit and heat shock stress in *Aloe barbadensis* Miller (Aloe Vera). *Biology Research*. 2007;40(3):234-245.
18. Hernández LO. Modificación al Proceso de Obtención de las Sustancias Húmicas: efectos biológicos. [Tesis de Maestría]. La Habana, Universidad Agraria de La Habana; 2011.
19. Sociedad Cooperativa Andaluza (Lombricor) [sede Web]. Lombricor.com; 2012 [acceso el 10 de enero del 2012]. Disponible en: www.lombricor.com

Recibido: 14-11-2011.

Aceptado: 27-1-2012.