

Revisión bibliográfica

LAS SUSTANCIAS HÚMICAS COMO BIOESTIMULANTES DE PLANTAS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS AMBIENTAL

Bibliographic review

Humic substances as plants biostimulants under environmental stress conditions

Helen Veobides Amador[✉], Fernando Guridi Izquierdo y Vladimir Vázquez Padrón

ABSTRACT. Plants are frequently subjected to unfavorable situations for their optimal development and operation caused by alterations in the environment. This set of unfavorable situations is known as environmental stress. Biostimulants are substances that by their action can stimulate the plant growth, improve the absorption of nutrients and increase yields under environmental stress conditions regardless of whether they contain nutrients in their composition. There are several categories of specific biostimulants, among them protein hydrolysates, algae extracts, chitosan, humic and fulvic acids, mycorrhizal fungi and growth promoting bacteria. The objective of this review is to inform the biostimulating effect of the application of humic substances in plants under stress conditions. It also synthesizes aspects related to humic substances such as their structural characteristics and classification. Results are shown using humic substances as biostimulants where their potential to stimulate different metabolic and physiological processes in abiotic stress conditions is demonstrated. It concludes that humic substances present a complex structure, a multiplicity of functional groups and small molecules that interact by weak junctions, which makes them exhibit a great variety of beneficial functions among which is their potential to increase the yields and attenuate the effects of abiotic stresses. Therefore they constitute a viable alternative to avoid the consequences of climate change and use natural and environmentally friendly products.

RESUMEN. Las plantas están sometidas frecuentemente a situaciones desfavorables para su desarrollo y funcionamiento óptimos, ocasionadas por alteraciones en el medio ambiente. Este conjunto de situaciones desfavorables se conoce con el nombre de estrés medio ambiental. Los bioestimulantes constituyen sustancias, que por su acción pueden estimular el crecimiento de la planta, mejorar la absorción de nutrientes e incrementar los rendimientos en condiciones de estrés ambiental, independientemente de que contengan elementos nutrientes en su composición. Existen diversas categorías de bioestimulantes específicos, entre ellos, los hidrolizados de proteínas, extractos de algas, quitosana, ácidos húmicos y fúlvicos, hongos micorrízicos y bacterias promotoras del crecimiento. El objetivo de esta revisión es mostrar el efecto bioestimulante de la aplicación de sustancias húmicas en plantas, bajo condiciones de estrés. También se sintetizan aspectos relacionados con las sustancias húmicas como son sus características estructurales y su clasificación. Se informan resultados empleando sustancias húmicas como bioestimulantes, donde se comprueba su potencial para estimular diferentes procesos metabólicos y fisiológicos en condiciones de estrés ambiental. Se concluye que las sustancias húmicas presentan una estructura compleja variable, una multiplicidad de grupos funcionales y pequeñas moléculas heterogéneas que interactúan mediante uniones débiles, lo cual hace que exhiban una gran variedad de funciones beneficiosas entre las que se encuentra su potencial para incrementar los rendimientos y atenuar los efectos de estreses abióticos. Por tanto, constituyen una alternativa viable para evadir las consecuencias del cambio climático y emplear productos naturales y amigables con el medio ambiente.

Key words: humus, climate change, physiological effects, abiotic stress, yield

Palabras clave: humus, cambio climático, efectos fisiológicos, estrés abiótico, rendimiento

INTRODUCCIÓN

Las plantas están sometidas, frecuentemente, a situaciones desfavorables para su desarrollo y funcionamiento óptimos, ocasionadas por alteraciones en el medio ambiente. Este conjunto de situaciones desfavorables se conoce con el nombre de estrés medioambiental (1).

Los factores externos a la planta que constituyen condiciones de estrés pueden ser de dos tipos: bióticos y abióticos (físicos, químicos y físico-químicos). Los abióticos cubren una amplia gama de factores ambientales, entre los que se encuentran: la temperatura, el agua, las radiaciones, las sustancias químicas y otros. Los estreses abióticos son la principal causa de pérdidas de cultivos en el mundo y causan disminución en el rendimiento de más del 50 % de la mayoría de los cultivos (2).

Para elevar la productividad agrícola es necesario acrecentar la búsqueda de cultivares que se desarrollen con mayor tolerancia a los estreses abióticos (3). Los aportes científicos realizados en este sentido, hasta hace poco, estaban encaminados a adaptar el medio ambiente para un mejor desarrollo de las plantas, aplicando una gran cantidad de productos químicos, como herbicidas e insecticidas, agotando los recursos agua y nutrientes necesarios para que la planta tolere las condiciones estresantes.

Sin embargo, actualmente existe una nueva concepción que es adaptar la planta a ese medio ambiente cambiante, sin agotar los recursos o emplear productos químico-sintéticos, solamente logrando una mayor eficiencia en el uso de estos recursos y una mayor producción, con el empleo de las mismas estrategias que quizás contribuyeron a la supervivencia de estos seres vivos durante su evolución en condiciones aún más estresantes.

Entre los productos que se han empleado para combatir los efectos de estreses y elevar los rendimientos de las plantas, se encuentran los productos Bioestimulantes (4). Estas sustancias y materiales, cuando se aplican a las plantas o medios de cultivo, han demostrado potencial para modificar la fisiología de las plantas, promover su crecimiento y mejorar su respuesta al estrés; su acción se distingue de la de nutrientes y pesticidas (5).

La definición de bioestimulantes incluye a materiales orgánicos y microorganismos que son aplicados a los cultivos para mejorar la absorción de nutrientes, estimular el crecimiento, mejorar la tolerancia al estrés y la calidad de los mismos (5). De acuerdo a dicho autor existen diversas categorías de bioestimulantes específicos, entre ellos, los hidrolizados de proteínas (6), extractos de algas (7), quitosana (8), ácidos húmicos y fúlvicos (9), hongos micorrízicos (10) y bacterias promotoras del crecimiento (11). Los bioestimulantes se clasifican en tres grandes grupos en base a la fuente y el contenido. Las sustancias húmicas han sido reconocidas por su acción bioestimulante, estas constituyen uno de los tres grupos, en el que, además, figuran los diferentes productos, conteniendo hormonas y aquellos que presentan aminoácidos en su formulación (4).

Las sustancias húmicas tienen impacto directo en la fisiología de la planta. Por efectos directos se entiende que no están mediadas por características del suelo o disponibilidad de nutrientes, pero involucran la regulación de la actividad celular, cambios metabólicos, alteran la expresión de genes y tienen acción hormonal (5).

El objetivo de esta revisión es mostrar el efecto bioestimulante de la aplicación de sustancias húmicas en plantas en condiciones de estrés abiótico.

También se sintetizan aspectos, tales como las características estructurales y clasificación de las sustancias húmicas. Se muestran resultados empleando bioestimulantes a base de sustancias húmicas, donde se comprueba su potencial para estimular diferentes procesos metabólicos y fisiológicos en condiciones de estrés.

SUSTANCIAS HÚMICAS

Las sustancias húmicas, (SH), se definen como los más ampliamente distribuidos productos orgánicos de biosíntesis en la superficie de la tierra (12), que exceden la cantidad de carbono contenido en todos los organismos vivos por aproximadamente un orden de magnitud (13). Respecto al origen y formación de las sustancias húmicas se plantea que dichos materiales orgánicos son resultantes de reacciones concertadas de varios procesos bióticos y abióticos (14), que resultan de la descomposición de los residuos vegetales, animales y de microbios pero también provienen de la actividad metabólica de los microorganismos del suelo usando estos sustratos (5).

Las SH constituyen más del 80 % de la materia orgánica del suelo (MOS) (15), aunque pueden estar presentes en ambientes acuáticos y en la atmósfera (16). Estas pueden encontrarse, en varias concentraciones, en diferentes fuentes como por ejemplo: ríos, lagos, océanos, materiales orgánicos, minerales como la leonardita, sedimentos, entre otros (17).

Debido a que representan el mayor componente de la mezcla de materiales que comprende la MOS (14) resulta de gran importancia el estudio de su estructura y propiedades y cómo estas contribuyen a la fertilidad del suelo, actuando en las propiedades físicas, físico-químicas, químicas y biológicas

del suelo (5). Aunque la elucidación estructural de estas sustancias, dadas sus características, resulta aún bastante compleja, se han realizado investigaciones a lo largo de la historia en la búsqueda de un modelo estructural que esté en correspondencia con las características de las SH (18).

ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

Existen varias concepciones sobre la estructura de las SH, entre estas concepciones la más aceptada es que constituyen macromoléculas de un polielectrolito que tienen una conformación variable, en dependencia de las condiciones de la solución del suelo (pH, fuerza iónica). Es decir, constituyen coloides orgánicos que presentan masa molecular, densidad de carga eléctrica y acidez. Este modelo permite explicar las principales interacciones de las SH, tales como: la interacción con minerales del suelo, la capacidad de adsorción y complejación de iones; es decir, reacciones de interés agronómico-productivo.

En otros modelos se plantea que las SH son poseedoras de estructura micelar, con una parte hidrofóbica y una parte hidrofílica (18). Actualmente se acepta que el humus constituye un conjunto formado por asociaciones supramoleculares de moléculas orgánicas, relativamente pequeñas y heterogéneas (9), ensambladas básicamente por interacciones débiles (9,19). El fraccionamiento molecular secuencial de esa estructura supramolecular se basa en las fuerzas de enlaces de las sustancias orgánicas en la matriz húmica (20).

Se acepta que existen tres fracciones dentro de las sustancias húmicas que se clasifican de acuerdo a su solubilidad en función del pH: humina (H), ácido húmico (AH) y ácido fúlvico (AF); donde la humina constituye la fracción insoluble en agua a cualquier

valor de pH, los ácidos húmicos son solubles en medio básico e insoluble en medio francamente ácido, mientras que los ácidos fúlvicos, son la fracción soluble a cualquier valor de pH (21).

A la luz de estudios más modernos se redefinen los ácidos fúlvicos como resultantes de asociaciones de moléculas hidrofílicas pequeñas, en las cuales hay suficientes grupos funcionales para mantener el agregado fúlvico disperso en solución a cualquier valor de pH, mientras los ácidos húmicos están formados de asociaciones de compuestos predominantemente hidrofóbicos (ácidos grasos, compuestos esteroidales, cadenas de grupos metileno), las que están estabilizadas a pH neutro por fuerzas dispersivas hidrofóbicas. Estas conformaciones crecen en tamaño cuando aumentan los puentes de hidrógeno intermoleculares a bajos valores de pH, lo cual hace que estos materiales húmicos floquen (22).

Aunque la elucidación estructural de estas sustancias, dadas sus características, resulta aún bastante compleja pues está influenciada en buena medida por su fuente de origen, se ha logrado encontrar información cuantitativa y cualitativa sobre los grupos funcionales presentes en los AH y AF (23). Según los estudios espectroscópicos, las SH generalmente presentan estructuras aromáticas (bencenos y fenoles polisustituídos), así como -OH fenólicos y de alcoholes, -COOH de ácidos carboxílicos, ésteres, quinonas, entre otros (21).

En la actualidad se discute que estas sustancias estructuralmente poseen un dominio hidrofóbico y otro hidrofílico y una determinada relación entre ambos es la causante de los efectos biológicos de estimulación encontrados en las plantas ya enunciados por diferentes autores (24,25). Se han presentado, evidencias experimentales (26) mostrando

que la hidrofobicidad y la cantidad de grupos funcionales ácidos de AH son necesarios en la estimulación de la bioactividad de estas sustancias. De acuerdo a los estudios introducidos en "Humeomics" (20,27), las SH presentan una organización estructural supramolecular con estructuras hidrofóbicas grandes y otras hidrofílicas pequeñas. Las fracciones hidrofóbicas son básicamente compuestas de fracciones húmicas de cadenas lineales alifáticas y anillos aromáticos condensados, mientras las fracciones hidrofílicas son compuestas de fracciones húmicas irregulares.

Se concluye que el ordenamiento supramolecular estructural de SH es el resultado de moléculas húmicas heterogéneas de relación no-uniforme que interactúan en función de su talla, forma, afinidad química e hidrofobicidad (20).

Entre las técnicas físico-químicas para el estudio de las características estructurales de SH de diferentes fuentes de origen se han empleado la Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), Espectroscopía (UV-vis) y Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13 (^{13}C -NMR) y Cromatografía. Estas técnicas son aún más poderosas cuando se encuentran acopladas entre sí o a otros métodos como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y a pirolisis (Py) (28). A través de dichas técnicas se ha podido verificar que SH de aguas residuales presentan carácter alifático, con estructuras que pertenecen a proteínas y polisacáridos y una elevada presencia de grupos funcionales de ácidos y elevada aromaticidad (29).

La variabilidad de la estructura de SH durante el vermicompostaje ha sido estudiada. En dichos estudios fueron identificados más de 300 compuestos, principalmente los derivados de

ligninas, de carbohidratos, de proteínas, alcoholes y ácidos grasos, compuestos terpénicos e hidrocarburos, cuyas abundancias relativas varían de acuerdo con el avance de la estabilización de la materia orgánica (29).

ACCIÓN BIOESTIMULANTE DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS

Los efectos indirectos de las SH en las plantas incluyen el mejoramiento de las características químicas, físico-químicas y biológicas del suelo, a través de aumento en la retención de agua y nutrientes, influencia en la diversidad de microorganismos benéficos y la formación de complejos con iones, principalmente micronutrientes como el Fe y Zn. Estos efectos son ampliamente aceptados como contribuyentes a la fertilidad del suelo y los mecanismos de la acción indirecta dilucidados y ampliamente aceptados.

Los efectos bioestimulantes de las SH sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas han sido extensamente estudiados, encontrándose incremento en la longitud del tallo, raíz, hojas, masa fresca y seca, tamaño y calidad de los frutos; así como el aumento de los rendimientos en las cosechas (30). La promoción del crecimiento de plantas por SH, definida aquí como bioestimulación, está bien documentada en la literatura (15,31–33). En soporte de esto, un estudio previo mostró que la masa seca de brotes y raíces de plantas herbáceas, se incrementó cerca de un 22 % en respuesta a la aplicación exógena de SH (34).

El Grupo de Investigaciones de Materia Orgánica y Bioestimulantes (MOBI) del Departamento de Química de la Universidad Agraria de la Habana, ha obtenido un nuevo extracto acuoso de SH a partir de vermicompost de estiércol vacuno (35). La bioestimulación de diferentes dosis del extracto de vermicompost se ha comprobado

en cultivos de interés agronómico como maíz (*Zea mays* L.) (36), lechuga (*Lactuca sativa* L.) (37), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (38) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (39). La aplicación foliar de dichos extractos en plantas de tomate (40) promovió el desarrollo biológico de las plantas, así como la productividad agrícola en indicadores como la masa del fruto y el rendimiento durante dos años consecutivos. La caracterización físico química de dichos extractos ha mostrado la presencia de sustancias húmicas como ácidos húmicos y fúlvicos, fitohormonas, microorganismos benéficos, aminoácidos, y elementos esenciales (21) que pudieran contribuir en su acción bioestimulante, no sólo centrada en la presencia de sustancias húmicas.

Entre los procesos metabólicos que contribuyen a promover el crecimiento y desarrollo de las plantas se encuentra la estimulación de la actividad de enzimas clave en el metabolismo del C y N por las SH. Enzimas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno como la nitrato reductasa, glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa fueron estimuladas por SH en diferentes condiciones experimentales (19,41). Fue descrito el efecto positivo de AH a diferentes dosis en las principales enzimas involucradas en la reducción y asimilación de nitrógeno inorgánico (41).

Otra de las enzimas cuya actividad es incrementada por las SH es la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática (42,43), también denominada bomba de protones por estar involucrada en el transporte primario de dichos iones, estimulando un gradiente que proporciona energía para la transportación de otros iones y que contribuye con el elongamiento celular.

La estimulación de dicha enzima en las raíces se relacionó con la promoción en el transporte secundario de iones y la absorción de nutrientes (19). En otras investigaciones se comprueba que la modificación en el desarrollo del sistema radical, su arquitectura y la emergencia de raíces laterales (15) aumenta la eficiencia en la absorción de nutrientes y su utilización por las plantas.

En resumen, los efectos de SH sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, señalan la influencia positiva sobre el transporte de iones facilitando la absorción, la acción directa sobre procesos metabólicos tales como: respiración, fotosíntesis y síntesis de proteínas, mediante el aumento o disminución de la actividad de diversas enzimas, el contenido de metabolitos y la actividad tipo hormonal de estas sustancias (44,45).

Estas claras modificaciones en el metabolismo primario inducidas por las SH han sido confirmadas mediante técnicas de biología molecular (46), lo cual demuestra que las sustancias húmicas ejercen sus efectos en la fisiología de la planta por medio de complejas redes transcripcionales y mecanismos de acción de múltiples facetas, parcialmente conectados a su comprobada actividad auxínica pero involucrando vías independientes del ácido indolacético (IAA) (47). Estos mecanismos siguen siendo ampliamente estudiados y discutidos.

EFFECTO BIOESTIMULANTE EN CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO

Además del rol de las SH como reguladores del metabolismo primario y secundario, se discute la posibilidad de usar estas sustancias para mitigar los efectos de diferentes estreses abióticos como el estrés hídrico, salino y por altas concentraciones de

metales pesados. Dichos estreses inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que consecuentemente causan un estrés oxidativo, lo cual resulta en serias pérdidas del rendimiento en cultivos (48). En frijol común la aplicación de ácidos húmicos bajo condiciones de elevada salinidad (120 mM NaCl) incrementó los niveles de prolina endógenos y redujo la ruptura de la membrana, los cuales constituyen indicadores de adaptación a un ambiente salino (9).

Se realizó un experimento con la aplicación foliar de sustancias húmicas en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) que fue cultivado en un suelo con niveles naturales de salinidad. Las plantas que recibieron las aplicaciones foliares de SH mostraron una mejoría en las condiciones y calidad interna del fruto (49,50).

Se ha probado la eficiencia de humatos de vermicompost como atenuantes del efecto de la salinidad en la emergencia y crecimiento de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) utilizando dos variedades de albahaca (Napoletano y Sweet Genovese). Se midió el porcentaje y tasa de emergencia, longitud de radícula, altura de plántula, biomasa fresca y seca de radícula y de parte aérea. El uso de humatos estimuló todas las variables en condiciones de salinidad, destacando la variedad Napoletano con aplicación del bioestimulante como el tratamiento con mejores resultados, permitiendo que la variedad tolerante mejore su emergencia y crecimiento y la variedad sensible incremente su tolerancia al estrés salino (51).

En arroz (*Oryza sativa* L.) se comprobó que los AH aplicados a las raíces sujetas a estrés hídrico incrementaron la actividad de la peroxidasa (POX), el contenido de prolina y redujeron el contenido de H_2O_2 (52). Recientemente fue reportado el estímulo de varios mecanismos enzimáticos

asociados a los sistemas de defensa antioxidante, así como los genes para las acuaporinas que son proteínas asociadas con el transporte de agua y H_2O_2 .

En plantas de arroz sometidas a estrés hídrico y tratadas vía radicular con solución nutritiva de AH se reportaron modificaciones en hojas y raíces en la expresión de acuaporinas, lo cual se tradujo en una mayor permeabilidad de la membrana de las raíces, atribuyéndole a estas sustancias un efecto protector ante el estrés hídrico (53). Las acuaporinas son conocidas como las principales proteínas intrínsecas (MIPs) que regulan el flujo de agua transmembrana y cuya actividad está regulada por vías dependientes e independientes de ácido abscísico (ABA) (53).

La aplicación de AH a plantas de maíz ejerció un efecto en la producción de ERO e incrementó la actividad de catalasa (CAT) (54). La importancia de la defensa antioxidante enzimática y no enzimática ha sido demostrada en condiciones de estrés hídrico (55). La defensa enzimática es también estimulada por la presencia de SH. Los niveles de superóxido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa (APX) mejoraron con la aplicación de un bioestimulante basado en SH y aminoácidos, aunque esta mejoría en el sistema antioxidante no fue capaz de incrementar la tolerancia de plantas de soya (*Glycine max* L.) y maíz (*Zea mays* L.) bajo condiciones de estrés hídrico (55).

La aplicación foliar de los mismos compuestos a plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) crecidas en suelos con alto contenido de metales pesados demostró efectos protectores, mediados por la activación de mecanismos de defensa antioxidativa (56). La actividad de la δ^1 pirrolin-5-carboxilato reductasa (P5CR) y la fenilalanina amonioliasa (PAL) fue estimulada, resultando en

incrementos en el contenido de prolina y compuestos fenólicos (56). Ácidos húmicos de elevada masa molecular ejercieron efectos en el metabolismo secundario, asociado con la síntesis de fenoles (57).

Aunque el mecanismo que explica la relación entre las ERO y auxinas en regular la respuesta antiestrés aún no está bien esclarecido (58) se conoce que compuestos como el óxido nítrico, (NO) poseen un rol intermediario en la acción de las SH en plantas el cual, además, tiene propiedades antioxidantes y actúa como una molécula de señalización en la síntesis de enzimas relacionadas a la catálisis del ERO. Esta molécula interviene en la resistencia de plantas a estreses abióticos. En plantas de maíz tratadas con ácidos húmicos de vermicompost se reportó una estimulación en la biosíntesis de (NO), el cual se plantea puede actuar como mensajero en estadios tempranos del desarrollo de la raíz (59).

Estudios futuros podrían dedicarse a investigar los efectos protectores de extractos de vermicompost ricos en ácidos húmicos en plantas, aplicados por vía foliar o en el medio de cultivo, dada la probada acción de los ácidos húmicos en condiciones de estrés y los efectos bioestimulantes de los extractos de vermicompost, conteniendo sustancias orgánicas y naturalmente enriquecidos por sustancias húmicas.

CONCLUSIONES

- ◆ Se concluye que las sustancias húmicas se caracterizan por presentar una estructura compleja, variable y una multiplicidad de grupos funcionales y pequeñas moléculas heterogéneas que interactúan mediante uniones débiles, lo cual hace que exhiban una gran variedad de funciones beneficiosas,

entre las que se encuentra su potencial para incrementar los rendimientos y atenuar los efectos de estreses medio ambientales y cuyas fuentes de origen se encuentran en la materia orgánica del suelo, en minerales como la leonardita y residuos orgánicos de diversos orígenes, luego de un proceso de transformación por la flora microbiana.

- ◆ Aunque su modo de acción sigue siendo uno de los aspectos más debatidos, se han realizado estudios con relación a su estructura, sus propiedades y su función, que han permitido establecer posibles mecanismos como la actividad like-auxine para explicar los efectos bioestimulantes. Ello, además, de la significativa acción sobre el metabolismo secundario con la estimulación de compuestos antioxidantes, permite concluir que las sustancias húmicas y la gran variedad de productos que las contienen, podrían ser una alternativa viable para evadir las consecuencias del cambio climático y emplear productos naturales y amigables con el medio ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moreno LJ. Respuesta de plantas *in vitro* de banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*) transformadas con el gen de osmotina ap24 al estrés hídrico [Tesis de Doctorado]. [Santa Clara, Cuba]: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas; 2015. 100 p.
2. Bray E, Bailey-Serres J, Weretilnyk E. Response to abiotic stress. In: Gruissem W, Jones R, editors. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville; 2000. p. 1158–203.
3. Pimentel C. Respostas das plantas à seca. In: Pimentel C, editor. A relação da planta com a água. Brasil: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2004. p. 119–41.
4. Van Oosten MJ, Pepe O, De Pascale S, Silletti S, Maggio A. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2017;4(5):1–12. doi:10.1186/s40538-017-0089-5
5. du Jardin P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*. 2015;196:3–14. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.021
6. Colla G, Nardi S, Cardarelli M, Ertani A, Lucini L, Canaguier R, et al. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*. 2015;196:28–38. doi:10.1016/j.scienta.2015.08.037
7. Battacharyya D, Babgohari MZ, Rathor P, Prithiviraj B. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*. 2015;196:39–48. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.012
8. Pichyangkura R, Chadchawan S. Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae*. 2015;196:49–65. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.031
9. Canellas LP, Olivares FL, Aguiar NO, Jones DL, Nebbioso A, Mazzei P, et al. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*. 2015;196:15–27. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.013
10. Roupheal Y, Franken P, Schneider C, Schwarz D, Giovannetti M, Agnolucci M, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*. 2015;196:91–108. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.002
11. Ruzzi M, Aroca R. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*. 2015;196:124–34. doi:10.1016/j.scienta.2015.08.042
12. Tan KH. Colloidal chemistry of organic soil constituents. In: Tan KH, editor. Principles of Soil Chemistry, Marcel Dekker, New York. Third Edition. Marcel Dekker, New York: CRC Press; 1998. p. 177–258.
13. Steinberg CE, Paul A, Pflugmacher S, Meinelt T, Klöcking R, Wiegand C. Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals-A review. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2003;12(5):391–401.
14. Nardi S, Pizzeghello D, Schiavon M, Ertani A. Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Scientia Agricola*. 2016;73(1):18–23. doi:10.1590/0103-9016-2015-0006
15. Canellas LP, Olivares FL. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2014;1(1):3. doi:10.1186/2196-5641-1-3
16. Graber ER, Rudich Y. Atmospheric HULIS: how humic-like are they? A comprehensive and critical review. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2006;6(3):729–53. doi:10.5194/acp-6-729-2006
17. Fujitake N, Yanagi Y. Relation between biostability and chemical properties of soil humic substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta Supplement*. 2003;67(18):112.
18. Canellas LP, Xavier Velloso AC, de Araújo Santos G. Modelos estruturais de substâncias húmicas. In: Canellas LP, de Araújo Santos G, editors. *Humosfera : tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Seropédica e Campos dos Goytacazes: UENF; 2005. p. 34–53.
19. Piccolo A. The nature of soil organic matter and innovative soil managements to fight global changes and maintain agricultural productivity. In: Piccolo A, editor. *Carbon Sequestration in Agricultural Soils*. Heidelberg, Germany: Springer; 2012. p. 1–19.
20. Nebbioso A, Piccolo A. Advances in humeomics: Enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid. *Analytica Chimica Acta*. 2012;720:77–90. doi:10.1016/j.aca.2012.01.027
21. Caro I. Caracterización de algunos parámetros químico-físicos del Liplant, humus líquido obtenido a partir del vermicompost de estiércol vacuno [Tesis de Maestría]. [Mayabeque, Cuba]: Universidad Agraria de La Habana; 2004. 91 p.

22. Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy*. 2002;75:57–134. doi:10.1016/S0065-2113(02)75003-7
23. Chang Chien S-W, Chun-Chia H, Min-Chao W. Analytical and spectroscopic characteristics of refuse compost-derived humic substances. *International Journal of Applied Science and Engineering*. 2003;1(1):62–71.
24. Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*. 2001;166(11):810–32.
25. Canellas LP, Piccolo A, Dobbss LB, Spaccini R, Olivares FL, Zandonadi DB, et al. Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere*. 2010;78(4):457–66. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.018
26. Durand C, Ruban V, Amblès A. Characterisation of complex organic matter present in contaminated sediments from water retention ponds. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2005;73(1):17–28. doi:10.1016/j.jaap.2004.09.001
27. Calderín A, Guridi F, Berbara RLL. Effects of Humic Materials on Plant Metabolism and Agricultural Productivity. In: Ahmad P, Rasool S, editors. *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance* [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2018 Oct 16]. p. 449–66. doi:10.1016/B978-0-12-800876-8.00018-7
28. Aguiar NO, Olivares FL, Novotny EH, Dobbss LB, Balmori DM, Santos-Júnior LG, et al. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant and Soil*. 2013;362(1/2):161–74. doi:10.1007/s11104-012-1277-5
29. Martínez Balmori D. Caracterização molecular da matéria orgânica durante a vermicompostagem [Internet] [Tesis de Doctorado]. [Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil]: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias; 2012. 112 p. Available from: [http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/ PRODVEGETAL_3434_1344947740.pdf](http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PRODVEGETAL_3434_1344947740.pdf)
30. Trevisan S, Francioso O, Quaggiotti S, Nardi S. Humic substances biological activity at the plant-soil interface: From environmental aspects to molecular factors. *Plant Signaling & Behavior*. 2010;5(6):635–43. doi:10.4161/psb.5.6.11211
31. Nardi S, Pizzeghello D, Muscolo A, Vianello A. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*. 2002;34(11):1527–36. doi:10.1016/S0038-0717(02)00174-8
32. Chen Y, Clapp CE, Magen H. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Soil Science and Plant Nutrition*. 2004;50(7):1089–95. doi:10.1080/00380768.2004.10408579
33. Nardi S, Carletti P, Pizzeghello D, Muscolo A. Biological activities of humic substances. In: Senesi N, Xing B, Huang PM, editors. *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2009 [cited 2018 Oct 16]. p. 305–39. doi:10.1002/9780470494950.ch8
34. Rose MT, Patti AF, Little KR, Brown AL, Jackson W, Cavagnaro TR. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. In: Sparks D, editor. *Advances in Agronomy* [Internet]. 1st Edition. Academic Press; 2014 [cited 2018 Oct 16]. p. 37–89. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128001387000024>
35. Hernández O. Modificaciones al proceso de extracción de sustancias húmicas. Efectos biológicos. [Tesis de Maestría]. [Mayabeque, Cuba]: Universidad Agraria de la Habana; 2010. 78 p.
36. Calderín A, Pimentel J, Martínez D, Huelva R, Guridi F. Efeitos no cultivo do milho de um extrato líquido humificado residual, obtido a partir de vermicomposto. *Revista Ciências Técnicas Agropecuárias*. 2016;25(1):38–43.
37. Hernandez OL, Calderín A, Huelva R, Martínez D, Guridi F, Aguiar NO, et al. Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. *Agronomy for Sustainable Development*. 2015;35(1):225–32. doi:10.1007/s13593-014-0221-x
38. Arteaga M, Garcés N, Guridi F, Pino JA, López A, Menéndez JL, et al. Evaluación de las aplicaciones foliares de humus líquido en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) var. Amalia en condiciones de producción. *Cultivos Tropicales*. 2006;27(3):95–101.
39. Hernández G, Hernández O, Guridi F, Arbelo N. Influencia de la siembra directa y las aplicaciones foliares de extracto líquido de Vermicompost en el crecimiento y rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. cc-25-9. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 2012;21(2):86–90.
40. Arteaga M. Liplant: alternativa para la producción ecológica del tomate (*Solanum lycopersicum* Linneo) y la conservación del medio edáfico [Tesis de Doctorado]. [Mayabeque, Cuba]: Universidad Agraria de la Habana; 2013. 137 p.
41. Vaccaro S, Ertani A, Nebbioso A, Muscolo A, Quaggiotti S, Piccolo A, et al. Humic substances stimulate maize nitrogen assimilation and amino acid metabolism at physiological and molecular level. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2015;2(1):5. doi:10.1186/s40538-015-0033-5
42. Huelva R, Martínez D, Calderín A, Hernández OL, Guridi F. Propiedades químicas y química-físicas de derivados estructurales de ácidos húmicos obtenidos de vermicompost. *Actividad biológica*. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 2013;22(2):56–60.
43. Quaggiotti S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*. 2004;55(398):803–13. doi:10.1093/jxb/erh085

44. Hernandez OL, Huelva R, Guridi F, Olivares FL, Canellas LP. Humates isolated from vermicompost as growth promoter in organic lettuce production. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 2013;22(1):70–5.
45. Canellas LP, Martínez D, Oliveira L, Oliveira N, Campostrini E, Rosa RCC, et al. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil*. 2013;366(1–2):119–32. doi:10.1007/s11104-012-1382-5
46. Jannin L, Arkoun M, Ourry A, Laïné P, Goux D, Garnica M, et al. Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms. *Plant and Soil*. 2012;359(1–2):297–319. doi:10.1007/s11104-012-1191-x
47. Trevisan S, Botton A, Vaccaro S, Vezzaro A, Quaggiotti S, Nardi S. Humic substances affect *Arabidopsis* physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Environmental and Experimental Botany*. 2011;74:45–55. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.04.017
48. Calderín A, Guridi F, Hernández OL, Diaz MM, Huelva R, Mesa S, et al. Biotechnology of humified materials obtained from vermicomposts for sustainable agroecological purposes. *African Journal of Biotechnology*. 2013;12(7):625–34. doi:10.5897/AJBX12.014
49. Reyes JJ, Guridi F, Reynaldo IM, Ruisánchez Y, Larrinaga JA, Murillo B, et al. Efectos del humus líquido sobre algunos parámetros de calidad interna en frutos de tomate cultivados en condiciones de estrés salino. *Revista Centro Agrícola*. 2011;38(3):57–61.
50. Barbara RLL, García AC. Humic Substances and Plant Defense Metabolism. In: Ahmad P, Wani M, editors. *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment* [Internet]. Springer, New York, NY; 2014 [cited 2018 Oct 17]. p. 297–319. doi:10.1007/978-1-4614-8591-9_11
51. Reyes JJ, Murillo B, Nieto A, Troyo E, Reynaldo IM, Rueda EO, et al. Humatos de vermicompost como mitigador de la salinidad en albahaca (*Ocimum basilicum* L.). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. Universidad Nacional de Cuyo. 2014;46(2):149–62.
52. Calderín A. Humic acids of vermicompost as an ecological pathway to increase resistance of rice seedlings to water stress. *African Journal of Biotechnology* [Internet]. 2012 [cited 2018 Oct 17];11(13). doi:10.5897/AJB11.1960
53. Calderín A, Azevedo L, Guridi F, Loss MV, Castro RN, Barbara RLL. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. *Ecological Engineering*. 2012;47:203–8. doi:10.1016/j.ecoleng.2012.06.011
54. Cordeiro FC, Santa-Catarina C, Silveira V, de Souza SR. Humic acid effect on catalase activity and the generation of reactive oxygen species in corn (*Zea mays*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2011;75(1):70–4. doi:10.1271/bbb.100553
55. de Vasconcelos ACF, Zhang X, Ervin EH, Kiehl J de C. Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in maize and soybean subjected to drought. *Scientia Agrícola*. 2009;66(3):395–402. doi:10.1590/S0103-90162009000300015
56. Portuondo L. Structural and functional evaluation of humic acids in interaction with toxic metals in a cultivar of agricultural interest. *Revista de Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 2017;26(3):39–46.
57. Schiavon M, Pizzeghello D, Muscolo A, Vaccaro S, Francioso O, Nardi S. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Chemical Ecology*. 2010;36(6):662–9. doi:10.1007/s10886-010-9790-6
58. Tognetti VB, Mühlhenbock P, Van Breusegem F. Stress homeostasis - the redox and auxin perspective: Stress homeostasis. *Plant, Cell & Environment*. 2012;35(2):321–33. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02324.x
59. Zandonadi DB, Santos MP, Dobbss LB, Olivares FL, Canellas LP, Binzel ML, et al. Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta*. 2010;231(5):1025–36. doi:10.1007/s00425-010-1106-0

Recibido: 9 de julio de 2018

Aceptado: 5 de octubre de 2018