



## Efeito do bio sólido e da inoculação com bactérias no teor de clorofila de *Canavalia ensiformis* durante a fitorremediação de cobre no solo

Effect of biosolid application and bacterial inoculation on the chlorophyll content of *Canavalia ensiformis* during copper phytoremediation in soil

R. S. Lima<sup>1\*</sup>; F. Tamiozzo<sup>1</sup>; L. S. S. Viero<sup>2</sup>; B. C. L. Lima<sup>2</sup>; L. P. Alves<sup>2</sup>;  
R. J. S. Jacques<sup>3</sup>; N. A. Santana<sup>4</sup>; A. O. Silveira<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Santa Maria, 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil

<sup>2</sup>Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Santa Maria, 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Solos, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Santa Maria, 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil

<sup>4</sup>Secretaria da Agricultura, Pecuária, Produção Sustentável e Irrigação, 97020-010, Santa Maria-RS, Brasil

<sup>5</sup>Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Santa Maria, 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil

\*raphaellasl@hotmail.com

(Recebido em 31 de julho de 2025; aceito em 18 de outubro de 2025)

A contaminação gerada pela mineração de cobre (Cu) é um desafio ambiental em muitos países, pois compromete a qualidade do solo, da água, do ar e impacta os seres vivos. O teor de clorofila das plantas que crescem nos solos contaminados é um indicador sensível do estado nutricional destes vegetais, da sua capacidade fotossintética e do estresse induzido pelos metais pesados. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de bio sólido e da inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Bacillus aryabhattai* sobre o teor de clorofila da *Canavalia ensiformis* cultivada em solo contaminado por Cu. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em delineamento fatorial 3×2, com três doses de bio sólido (equivalente a 0, 45 e 90 kg N ha<sup>-1</sup>), com e sem a inoculação. Foram determinados a massa seca da parte aérea e radicular, e o teor de clorofila com auxílio de um clorofilômetro. Os resultados indicaram que a aplicação de bio sólido e a inoculação com bactérias não promoveram aumentos significativos na biomassa vegetal, embora tenha sido observada uma tendência de aumento da biomassa radicular com a inoculação das bactérias. O aumento das doses de bio sólido incrementou de forma linear o teor de clorofila das folhas. No entanto, a inoculação com as bactérias não influenciou significativamente esse parâmetro. A aplicação de bio sólido é uma estratégia promissora para melhorar o desempenho fisiológico de *C. ensiformis* durante a fitorremediação de solos contaminados com Cu.

Palavras-chave: spad, feijão-de-porco, nitrogênio.

Copper (Cu) mining pollution is an environmental challenge in many countries, as it compromises the quality of soil, water, and air, and affects living organisms. The chlorophyll content of plants growing in contaminated soils is a sensitive indicator of their nutritional status, photosynthetic capacity, and the stress induced by heavy metals. This study aimed to evaluate the effect of biosolid application and inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Bacillus aryabhattai* on the chlorophyll content of *Canavalia ensiformis* grown in Cu-contaminated soil. The experiment was conducted in a greenhouse using a 3×2 factorial design, with three biosolid doses (equivalent to 0, 45, and 90 kg N ha<sup>-1</sup>), with and without bacterial inoculation. Shoot and root dry mass and chlorophyll content were determined using a chlorophyll meter. The results indicated that biosolid application and bacterial inoculation did not significantly increase plant biomass, although there was a trend toward increased root biomass with bacterial inoculation. Increasing biosolid doses linearly enhanced leaf chlorophyll content. However, bacterial inoculation did not significantly influence this parameter. Biosolid application is a promising strategy to improve the physiological performance of *C. ensiformis* during the phytoremediation of Cu-contaminated soils.

Keywords: spad, jack bean, nitrogen.

## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação do solo por cobre (Cu) é um problema comum em diversas regiões do mundo, resultante principalmente de atividades agrícolas, industriais e de mineração [1-3]. Esse impacto é mais acentuado em solos arenosos, que possuem menor capacidade de retenção de Cu na fase sólida, favorecendo sua biodisponibilidade e dispersão no ambiente [4-5]. No município de Caçapava do Sul, localizado no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, existe uma área com concentrações ~400 vezes superiores aos teores naturais deste elemento. Essa contaminação é consequência do acúmulo de rejeitos de mineração provenientes do rompimento de uma barragem ocorrido em 1984. Nessa área, o desenvolvimento vegetal é severamente comprometido, resultando em cobertura do solo escassa ou inexistente, o que favorece processos erosivos intensos e a dispersão do Cu para regiões adjacentes.

A fitorremediação surge como uma alternativa viável para mitigar os efeitos do Cu no solo. A fitorremediação consiste no uso de plantas para estabilizar, remover ou reduzir contaminantes do solo ou da água [6, 7]. Entre as espécies vegetais com potencial para essa técnica, destaca-se o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC) por sua capacidade de acumular metais pesados tanto na raiz quanto na parte aérea, produzir grandes quantidades de matéria seca, estabelecer simbiose com fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio (N) [8-10].

No entanto, em solos altamente contaminados, até mesmo plantas fitorremediadoras podem ser incapazes de se estabelecer, pois o excesso de Cu pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio que danificam as proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e membranas em tecidos vegetais [11], resultando em um desequilíbrio metabólico [12]. Os sintomas de toxicidade de Cu também podem ser detectados pelas alterações no conteúdo de pigmentos fotossintéticos e redução da taxa fotossintética [13-15]. Por essas razões, as plantas apresentam crescimento reduzido, clorose e necrose foliar, o que leva à morte [16-18].

Nesse contexto, o uso de bio sólidos desponta como uma alternativa promissora para aumentar a eficiência da fitorremediação de solos contaminados ou poluídos por metais pesados, devido a sua capacidade de melhorar as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo e favorecer o crescimento vegetal e atuar como um amenizante do excesso do Cu no solo [19]. O bio sólido é o produto do tratamento do lodo de esgoto sanitário e, quando atende aos critérios microbiológicos e químicos estabelecidos por regulamentações nacionais [20], pode ser aplicado em solos com segurança, até certos limites. Sua utilização como condicionador orgânico pode promover a elevação do pH, aumento da retenção de água, fornecimento de nutrientes e estímulo à atividade biológica do solo, beneficiando o crescimento vegetal [21]. A fitorremediação associada à aplicação de bio sólido pode se constituir em uma estratégia eficiente para a recuperação de áreas contaminadas [22].

As bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) têm demonstrado grande potencial para melhorar a eficiência da fitorremediação em solos contaminados por metais pesados, auxiliando no estabelecimento e no crescimento das plantas em condições adversas [23, 24]. As BPCP são microrganismos que habitam o solo, a rizosfera e frequentemente os tecidos aéreos e radiculares das plantas [25]. O *Azospirillum brasilense* e o isolado EB-40 de *Bacillus* sp. são bactérias promotoras do crescimento das plantas que aprimoram o desenvolvimento e a produtividade das plantas por meio da fixação de nitrogênio atmosférico [26, 27], da produção e liberação de hormônios vegetais [25] e da solubilização de fosfatos inorgânicos [28]. A co-inoculação do *A. brasilense* e do isolado EB-40 pode aumentar o crescimento das plantas, funcionando como um recurso biológico eficaz para o desenvolvimento sustentável [29, 30].

Indicadores rápidos, práticos e não destrutivos para avaliação do estado nutricional das plantas, especialmente quanto ao nitrogênio (N), vêm sendo cada vez mais estudados e utilizados [31]. Entre esses, destaca-se o uso do medidor portátil SPAD-502, um clorofilômetro que quantifica indiretamente o teor de clorofila nas folhas, correlacionando-se com o estado da nutrição de N das plantas [32]. Segundo Pan et al. (2019) [33], a inoculação com BPCP pode aumentar os teores de clorofila, melhorar a eficiência fotossintética e estimular a produção de compostos antioxidantes, contribuindo para a melhoria do estado nutricional das plantas. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da aplicação de bio sólido e da inoculação com

*Azospirillum brasilense* e *Bacillus aryabhatai* sobre o teor de clorofila da *Canavalia ensiformis* cultivada em solo poluído por Cu.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Área de estudo

O município de Caçapava do Sul, localizado no sul do Brasil, abrange uma área de aproximadamente 3.047,113 km<sup>2</sup>, com uma população de cerca de 33.515 habitantes [34]. A área em foco é o geossítio Minas do Camaquã, reconhecido por uma significativa presença de depósitos minerais sulfetados e carbonáticos, contendo cobre, ouro, prata, chumbo e zinco, além dos seus arenitos e conglomerados da "Bacia do Camaquã" [35]. Este geossítio faz parte do Geoparque Caçapava, recentemente designado como Geoparque Mundial pela Unesco. Destaca-se nessa área a mina de cobre a céu aberto, conhecida como "Mina do Uruguai", uma barragem de rejeitos (122,28 ha), uma barragem de abastecimento de água construída em pedra e os arroios circundantes ao Rio Camaquã (Figura 1).

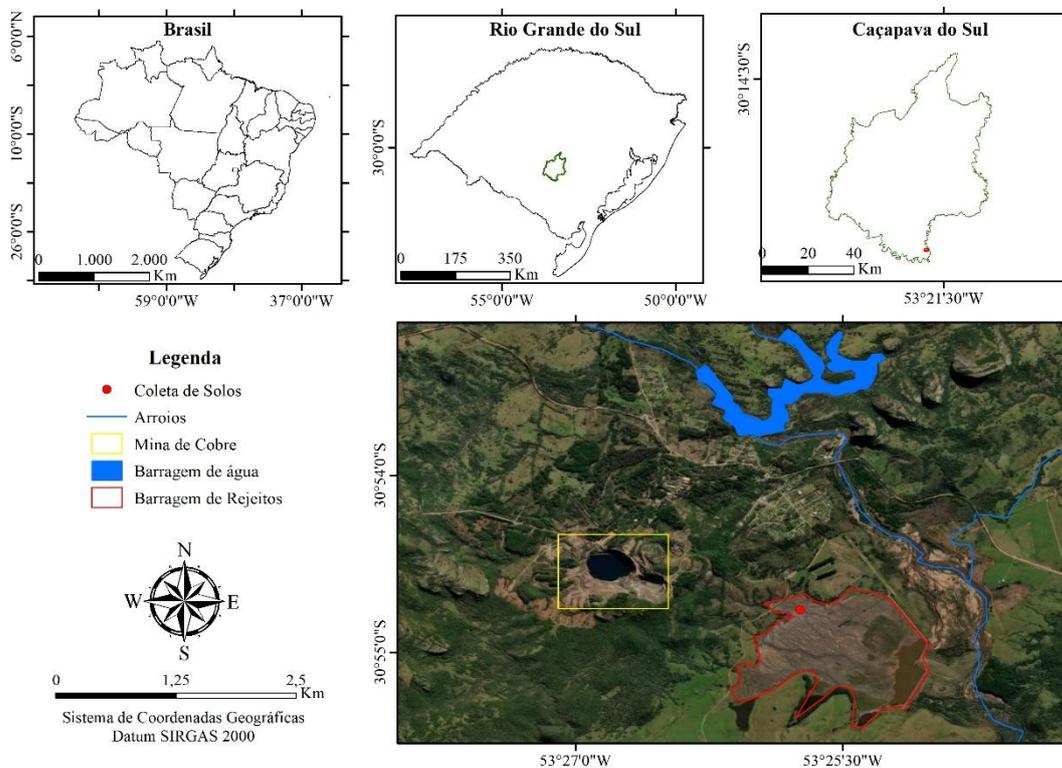


Figura 1: Mapa de localização das Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, RS.

### 2.2 Solo, biossólido e microrganismos

O solo foi coletado em uma área impactada por rejeitos de mineração de Cu em Minas do Camaquã (30°54'55" S; 53°25'40" W). As amostras de solo foram coletadas na camada superficial (0–20 cm de profundidade) utilizando uma pá de aço inoxidável. Posteriormente, o material coletado foi submetido à secagem ao ar em temperatura ambiente, peneirado em malha de 2 mm para remoção de partículas maiores e detritos, e homogeneizado para posterior utilização nos ensaios experimentais. Com base na descrição morfológica, o solo foi classificado como Tecnossolo (Technosols), segundo o sistema da IUSS/WRB [36].

Uma amostra representativa do solo foi encaminhada para a caracterização química. As análises foram realizadas conforme metodologias recomendadas para fins agrícolas, determinando-se o pH em água (1:1), fósforo (P), Zinco (Zn) e potássio (K) pelo extrator Mehlich-1, cálcio (Ca) e magnésio (Mg) extraídos com KCl 1 mol L<sup>-1</sup>, e cobre total (Cu) segundo o método USEPA 3050B. Também foram determinados a saturação por bases e por alumínio, o teor de argila pelo método do densímetro e o teor de matéria orgânica pelo método de Walkley-Black. A capacidade de campo do solo foi determinada em mesa de tensão [37], mediante saturação das amostras por 48 horas e posterior aplicação de potencial de 10 kPa por quatro dias.

O biossólido foi obtido na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) da Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN), localizada no município de Santa Maria, no estado do Rio Grande do Sul. Esse material é resultado do tratamento aeróbio do lodo de esgoto, gerado em um sistema de lodos ativados, que trata exclusivamente esgoto domiciliar. O biossólido foi coletado após 180 dias de secagem no leito da ETE, em diferentes profundidades. Posteriormente, as amostras foram submetidas à secagem ao ar, homogeneizadas, moídas e peneiradas com malha de 2 mm. A caracterização do material seguiu os critérios estabelecidos pela Resolução CONAMA n° 498/2020 [20].

Os teores de metais pesados, determinados pelo método 3050B da USEPA [38], foram: arsênio (As) < 1,00 mg kg<sup>-1</sup>, mercúrio (Hg) < 0,020 mg kg<sup>-1</sup>, selênio (Se) < 1,00 mg kg<sup>-1</sup>, bário (Ba) 710,51 mg kg<sup>-1</sup>, cádmio (Cd) < 0,05 mg kg<sup>-1</sup>, chumbo (Pb) 20,13 mg kg<sup>-1</sup>, cobre (Cu) 129,10 mg kg<sup>-1</sup>, cromo (Cr) 33,59 mg kg<sup>-1</sup>, molibdênio (Mo) < 1,00 mg kg<sup>-1</sup>, níquel (Ni) 12,05 mg kg<sup>-1</sup>, zinco (Zn) 1466,92 mg kg<sup>-1</sup>, fósforo (P) 18,23 g kg<sup>-1</sup> e potássio (K) 1,64 g kg<sup>-1</sup>. Os teores de nitrogênio (N) 40,35 g kg<sup>-1</sup> e carbono (C) 246,50 g kg<sup>-1</sup> foram determinados em analisador elementar (Flash 1112, Thermo Finnigan, Itália), conforme Silva e Bohnen (2001) [39]. O pH em água (1:5) foi de 5,20 [40]. A presença de *Escherichia coli* foi < 100 UFC 100 mL<sup>-1</sup> de sólidos totais (ST), determinada pelo método do substrato enzimático [41].

As bactérias *Azospirillum brasilense* e *Bacillus aryabhattai* estão armazenadas no banco de microrganismos do Laboratório de Biologia do Solo/UFSM e já possuem registro no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado). A cepa de *Bradyrhizobium elkanii* foi solicitada ao Laboratório de Microbiologia Agrícola da Secretaria de Agricultura, Pecuária, Produção Sustentável e Irrigação do estado do Rio Grande do Sul e multiplicada no laboratório.

### 2.3 Delineamento experimental, cultivo das plantas e análises

Os tratamentos foram compostos por um arranjo fatorial 3×2, com três doses de biossólido (equivalentes a 0, 45 e 90 kg N ha<sup>-1</sup>), com e sem inoculação conjunta de *Azospirillum brasilense* e *Bacillus aryabhattai*. Cada tratamento contou com quatro repetições, totalizando 24 unidades experimentais. Utilizaram-se vasos com capacidade de 2 L, preenchidos com 1,8 kg de solo seco para o cultivo de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). As doses de biossólido de 45 e 90 kg N ha<sup>-1</sup> corresponderam a 3,27 e 6,54 g de material seco por kg de solo, respectivamente. Estas doses foram definidas com base em resultados preliminares de estudos ainda não publicados, nos quais demonstraram ser eficazes em promover o desenvolvimento vegetal e mitigar os efeitos da toxicidade do metal, justificando sua aplicação neste experimento. Os valores foram ajustados para atender aos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA n° 498/2020 [20], garantindo segurança ambiental e compatibilidade com o uso agrícola. O biossólido foi incorporado de forma homogênea em todo o volume de solo de cada vaso e após 7 dias foi realizada a semeadura com quatro sementes inoculadas com bactérias *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 6158) para fixação de nitrogênio simbiótico. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sob luz natural nos meses de verão e aos 7 dias após a semeadura realizou-se o desbaste, mantendo-se duas plantas por vaso.

A umidade do solo durante o cultivo foi mantida em 70% da capacidade de campo e as plantas foram colhidas no florescimento, aos 61 dias após a emergência. A parte aérea foi cortada próximo à superfície do solo e as raízes foram manualmente separadas do solo. As raízes foram lavadas com água corrente, seguidas por uma solução de EDTA (0,02 mol L<sup>-1</sup>) e, por fim, com água

destilada. A utilização do EDTA tem como objetivo remover os íons metálicos adsorvidos externamente à superfície das raízes, evitando que esses resíduos influenciem nas análises químicas subsequentes [42]. Os nódulos radiculares foram removidos com pinças. Após a coleta, a parte aérea e as raízes foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa a 65 °C até atingirem peso constante. O teor de clorofila nas folhas foi estimado durante o florescimento utilizando um clorofilômetro (SPAD-502, Chlorophyll Meter, Japão).

A análise estatística foi realizada no software R 4.5.1 [43]. Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para verificação dos pressupostos da análise de variância. Posteriormente, foi conduzida uma análise de variância (ANOVA) fatorial de duas vias, considerando os efeitos principais e a interação entre os fatores avaliados (dose de bio sólido e inoculação bacteriana). Quando o teste F indicou diferença significativa ( $p < 0,05$ ), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As análises foram realizadas utilizando os pacotes ExpDes.pt [44], e readr [45]. O pacote ExpDes.pt foi empregado para a execução da ANOVA fatorial (função fat2.dic) e dos testes de comparação de médias, enquanto o pacote readr foi utilizado para a leitura dos arquivos de dados (.csv).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Biomassa de *Canavalia ensiformis*

O solo da área impactada por rejeitos de mineração de Cu apresentou um pH em água (1:1) de 6,60, indicando um solo levemente ácido a neutro. O teor de fósforo (Mehlich-1) foi elevado, atingindo 249,10 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto os teores de potássio (Mehlich-1), magnésio (KCl) e cálcio (KCl) foram de 52 mg kg<sup>-1</sup>, 0,20 e 2,60 cmolc kg<sup>-1</sup>, respectivamente. O teor de cobre total (USEPA 3050B) apresentou concentração elevada (1129,32 mg kg<sup>-1</sup>), e o zinco (Mehlich-1) foi de 1,17 mg kg<sup>-1</sup>. A saturação por bases atingiu 79,3%, enquanto a saturação por alumínio foi nula, refletindo boas condições de disponibilidade de cátions para as plantas. Quanto às propriedades físicas e orgânicas, o solo apresentou 40 g kg<sup>-1</sup> de argila e 7 g kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica (Walkley-Black), com capacidade de campo de 135,1 mg dm<sup>-3</sup>, evidenciando uma textura arenosa a franco-arenosa e bom teor de água disponível para as culturas.

A produção de massa seca da parte aérea de *Canavalia ensiformis* cultivada no solo contaminado com o elevado teor de cobre total de 1129,32 mg kg<sup>-1</sup> (USEPA 3050B), não foi significativamente modificada pela adição das doses de bio sólido ( $p = 0,91467$ ), nem pela inoculação das bactérias ( $p = 0,72118$ ) ou pela interação entre esses fatores ( $p = 0,75091$ ) (Figuras 2 e 3).

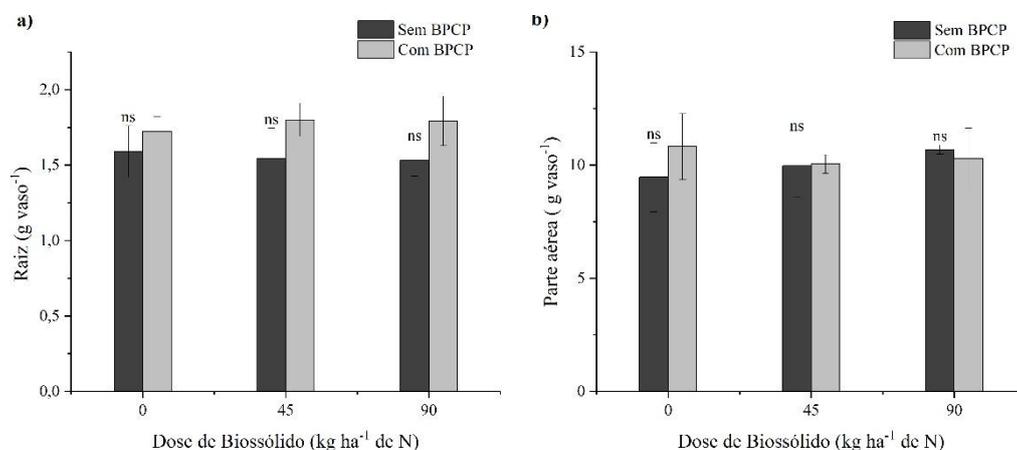


Figura 2: Produção de massa seca de raízes (a) e parte aérea (b) das plantas de *Canavalia ensiformis* cultivadas em solo poluído por Cu, adicionado de doses de bio sólido equivalentes a 0, 45 e 90 kg ha<sup>-1</sup> de N e inoculado com as bactérias *Azospirillum brasilense* e *Bacillus aryabhatai*.

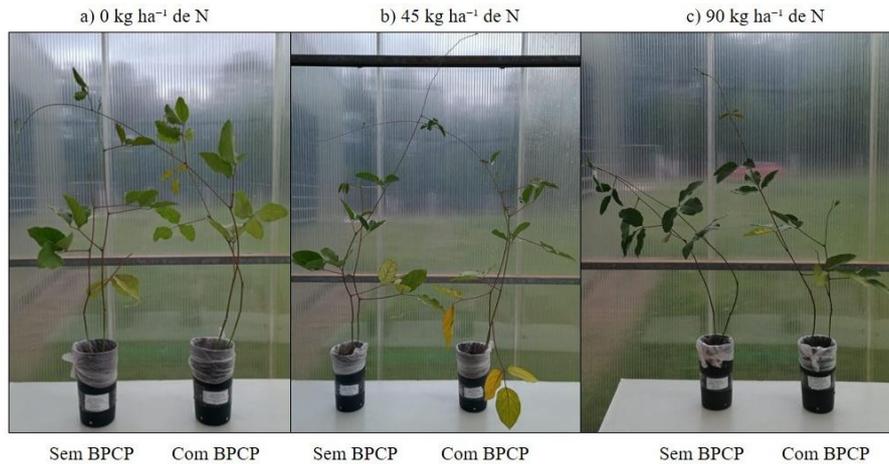


Figura 3: Efeito da aplicação de biofertilizante em doses equivalentes a 0, 45 e 90 kg N ha<sup>-1</sup> e da inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) *Azospirillum brasilense* + *Bacillus aryabhatai* no desenvolvimento de *Canavalia ensiformis* cultivada em solo poluído por cobre (Cu), aos 61 dias após a emergência.

Esse comportamento pode estar relacionado ao efeito tóxico da elevada concentração de Cu no solo, que compromete significativamente a morfologia e fisiologia vegetal, principalmente em estágios iniciais do desenvolvimento das plantas [46, 47]. O excesso de Cu é conhecido por afetar negativamente a fotossíntese, reduzir a eficiência do transporte de elétrons e provocar estresse oxidativo, o que compromete o crescimento e o acúmulo de biomassa [5, 21]. Entre os sintomas visíveis observados nas plantas do presente trabalho destacam-se a clorose, a necrose foliar e a má formação do sistema radicular, o que afeta a absorção de água e nutrientes [48]. A não ocorrência de efeito do biofertilizante sobre o crescimento das plantas pode indicar que há necessidade da aplicação de doses maiores, tendo em vista que as condições de contaminação do solo eram extremas. Da mesma forma, o curto período de tempo de contato do biofertilizante com o solo antes da semeadura (7 dias) pode resultar em baixa eficiência na imobilização do Cu pela matéria orgânica do biofertilizante, resultando em elevada toxicidade do metal às plantas devido a sua alta biodisponibilidade no solo.

Apesar da ausência de efeito estatisticamente significativo da inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Bacillus aryabhatai*, observou-se uma tendência de aumento médio de 14% na biomassa radicular das plantas inoculadas (1,77 g vaso<sup>-1</sup>) em comparação às não inoculadas (1,56 g vaso<sup>-1</sup>). Este comportamento está alinhado com estudos que destacam o papel das BPCP na mitigação de estresses e no estímulo ao crescimento radicular [49, 50]. Terra et al. (2024) [51] relataram maior estímulo de *A. brasilense* + *Bacillus sp.* EB-40 na raiz do que na parte, sugerindo que as BPCP atuam inicialmente no sistema radicular, favorecendo a absorção de água e nutrientes. *Bacillus* e *Priestia* também são reconhecidos por sua capacidade de solubilizar fósforo, aumentar a resistência a estresses abióticos e favorecer a absorção de nutrientes [52]. A inoculação com bactérias que promovem a absorção de fósforo aumentou os níveis de clorofila das plantas inoculadas [53].

No estudo de Terra et al. (2024) [51], a inoculação de *A. brasilense* + *Bacillus sp.* EB-40 promoveu aumentos significativos na massa seca da parte aérea de *Brachiaria brizantha*, especialmente nas coletas aos 60 e 90 dias. A ausência de resposta significativa em *C. ensiformis* pode estar associada à sensibilidade diferencial da espécie à toxicidade do cobre ou à menor eficiência da combinação de bactérias testadas neste tipo de solo. Os mesmos autores afirmam que a eficácia da inoculação depende da espécie vegetal, do tempo de cultivo e das condições ambientais. Contudo, nem sempre os efeitos positivos observados no sistema radicular se traduzem em aumento da massa seca da parte aérea, especialmente em ambientes contaminados, onde há múltiplos fatores limitantes ao crescimento vegetal [54, 55].

### 3.2 Teor de clorofila

A análise do teor de clorofila nas folhas de *C. ensiformis* revelou ausência de interação significativa entre dose de biofósforo e inoculação das bactérias ( $p = 0,61638$ ), permitindo a avaliação isolada dos fatores. A dose de biofósforo apresentou efeito significativo ( $p = 0,00574$ ), com resposta linear positiva ( $R^2 = 0,89$ ), indicando que 89% da variação no índice de clorofila foi explicada pela dose do biofósforo aplicada (Figura 4).

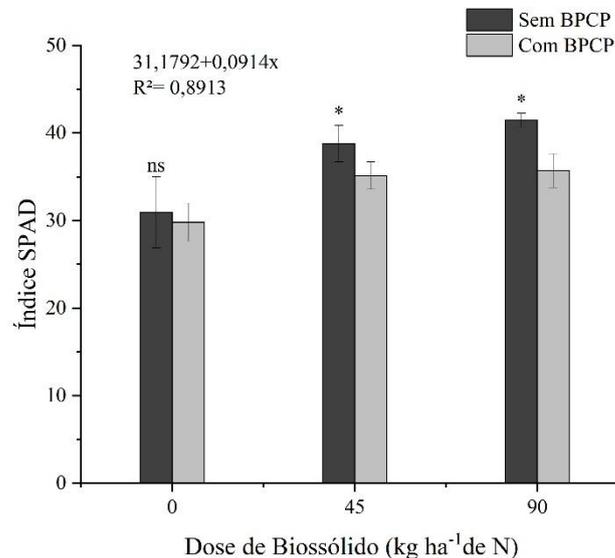


Figura 4: Estimativa do teor de clorofila foliar das plantas de *Canavalia ensiformis* cultivadas em solo poluído por Cu, adicionado de doses de biofósforo equivalentes a 0, 45 e 90 kg ha<sup>-1</sup> de N e inoculado com as bactérias *Azospirillum brasilense* e *Bacillus aryabhatai*.

A clorofila é o principal pigmento fotossintético das plantas e seu teor é frequentemente usado como indicador do estado nutricional, especialmente em relação ao nitrogênio [56, 57]. O fornecimento de N pelo biofósforo pode explicar o aumento no teor de clorofila, pois o nitrogênio compõe a estrutura da molécula de clorofila [58] e está diretamente associado à fotossíntese e ao desenvolvimento vegetal [59]. Resultados semelhantes foram relatados por Elalami et al. (2020) [60], que observaram melhorias significativas na fertilidade do solo e no estado nutricional das plantas com o uso de biofósforo. Esse resultado reforça o potencial do biofósforo como insumo orgânico promotor do desempenho fisiológico vegetal em ambientes degradados, especialmente pela sua contribuição ao fornecimento de nitrogênio, nutriente essencial para a síntese de clorofila e para os processos fotossintéticos.

Não houve efeito estatisticamente significativo ( $p = 0,08017$ ) da inoculação das bactérias sobre o teor de clorofila das plantas, com médias do índice SPAD de 33,53 para plantas inoculadas e 37,06 para plantas não inoculadas. Embora o uso de BPCP possa aumentar o teor de clorofila em outras plantas, como soja e milho [61, 62], os efeitos são dependentes das condições ambientais, da cultura e da disponibilidade de nutrientes. No estudo de Terra et al. (2024) [51], a inoculação das duas bactérias aumentou significativamente o conteúdo de clorofila em *Brachiaria*, porém *Bacillus sp.* isoladamente não foi eficaz para melhorar esse parâmetro aos 30 e 60 dias. Em solos poluídos por metais pesados, a resposta benéfica da inoculação pode ser atenuada pela toxicidade do Cu, que reconhecidamente afeta a formação de pigmentos fotossintéticos e prejudica o transporte de elétrons na fotossíntese [63, 64]. A ausência de efeito significativo da inoculação sobre o teor de clorofila reforça a complexidade das respostas fisiológicas em condições de estresse por metais pesados, nas quais múltiplos fatores interagem para limitar o crescimento e a eficiência metabólica das plantas.

Os resultados reforçam que o teor de clorofila é uma variável sensível e útil para avaliar o estado nutricional e fotossintético das plantas em sistemas de fitorremediação [31]. Ainda que a

inoculação das bactérias não tenha promovido aumentos significativos sob as condições testadas, a tendência positiva no incremento da biomassa radicular e a resposta linear ao bio sólido indicam que ajustes experimentais — como variação de dose de bio sólido ou aumento no tempo de cultivo — podem otimizar os efeitos benéficos dessa estratégia.

#### 4. CONCLUSÃO

A aplicação do bio sólido nas doses equivalentes a 45 e 90 kg ha<sup>-1</sup> de N ao solo contaminado com Cu não aumenta o crescimento das raízes e parte aérea das plantas de *Canavalia ensiformis* mas aumenta o teor de clorofila de suas folhas. Neste solo, a inoculação com as bactérias *Azospirillum brasilense* e *Bacillus aryabhatai* não resulta em aumentos da produção de biomassa das plantas nem dos teores de clorofila, mas apresentou tendência de incremento da biomassa radicular. No entanto, os resultados indicam que estratégias baseadas na combinação de bio sólidos e bactérias promotoras do crescimento vegetal possuem potencial para uso em programas de fitorremediação, desde que ajustadas às características do solo, da espécie vegetal e do tempo de cultivo.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os Autores gostariam de agradecer a Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e a Universidade Federal de Santa Maria pelo apoio recebido.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ali A, Guo D, Mahar A, Ping W, Wahid F, Shen F, et al. Phytoextraction and the economic perspective of phytomining of heavy metals. *Solid Earth Discuss.* 2017;1-40. doi: 10.5194/se 2017-75
2. Khan S, Naushad M, Lima EC, Zhang S, Shaheen SM, Rinklebe J. Global soil pollution by toxic elements: Current status and future perspectives on the risk assessment and remediation strategies – A review. *J Hazard Mater.* 2021 Sep.;417:126039. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126039
3. Zwolak A, Sarzyńska M, Szyrka E, Stawarczyk K. Sources of soil pollution by heavy metals and their accumulation in vegetables: A review. *Water, Air, Soil Pollut.* 2019 Jul 06;230:164. doi: 10.1007/s11270-019-4221-y
4. Giroto E, Ceretta CA, Brunetto G, Miotto A, Tiecher TL, De Conti L, et al. Copper availability assessment of Cu-contaminated vineyard soils using black oat cultivation and chemical extractants. *Environ Monit Assess.* 2014 Sep 23;186:9051-63. doi: 10.1007/s10661-014-4065-2
5. Kumar V, Pandita S, Singh Sidhu GP, Sharma A, Khanna K, Kaur P, et al. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. *Chemosphere* 2021 Jan;262:127810. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127810
6. Nedjimi B. Phytoremediation: a sustainable environmental technology for heavy metals decontamination. *SN Appl Sci.* 2021 Feb;3:286. doi: 10.1007/s42452-021-04301-4
7. Tripathi S, Sharma P, Purchase D, Chandra R. Distillery wastewater detoxification and management through phytoremediation employing *Ricinus communis* L. *Bioresour Technol.* 2021 Aug;333:125192. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125192
8. Santana NA, Ferreira PAA, Soriani HH, Brunetto G, Nicoloso FT, Antonioli ZI, et al. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost on copper phytoremediation in a sandy soil. *Appl Soil Ecol.* 2015 Nov;96:172-82. doi: 10.1016/j.apsoil.2015.08.001
9. Da Silva M, De Andrade SAL, De-Campos AB. Phytoremediation potential of jack bean plant for multi-element contaminated soils from Ribeira Valley, Brazil. *CLEAN - Soil, Air, Water.* 2017 Feb;46(6):1700321. doi: 10.1002/clen.201700321
10. Santana PHL, Burak DL, Thiengo CC, Peçanha AL, Neves MA, Mendonça ES. Jack beans and vetiver grass growth on iron ore tailing sediments from the Doce River dam disaster in Brazil: Plant growth regulator effects under different edaphic conditions. *J Soils Sediments.* 2020 Sep 10;20:4103-10. doi: 10.1007/s11368-020-02774-1
11. Pilon M, Tapken W. Copper homeostasis: Regulation in plants. In: Scott RA, editor. *Encyclopedia of inorganic and bioinorganic chemistry.* Chichester (UK): John Wiley & Sons, Ltd; 2013. p. 1-11. doi: 10.1002/9781119951438.eibc2128

12. Hanaka A, Wójcik M, Dresler S, Mroczek-Zdyrska M, Maksymiec W. Does methyl jasmonate modify the oxidative stress response in *Phaseolus coccineus* treated with Cu? *Ecotoxicol Environ Saf.* 2016 Feb;124:480-8. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.11.024
13. Zancheta ACF, De Abreu CA, Zambrosi FCB, Erismann NM, Lagôa AMMA. Cadmium accumulation by jack-bean and sorghum in hydroponic culture. *Int J Phytoremediation.* 2015 Mar 04;17:298-303. doi: 10.1080/15226514.2014.883492
14. Yusuf M, Khan TA, Fariduddin Q. Interaction of epibrassinolide and selenium ameliorates the excess copper in *Brassica juncea* through altered proline metabolism and antioxidants. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2016 Jul;129:25-34. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.03.001
15. Islam F, Yasmeen T, Ali Q, Mubin M, Ali S, Arif MS, et al. Copper-resistant bacteria reduces oxidative stress and uptake of copper in lentil plants: potential for bacterial bioremediation. *Environ Sci Pollut Res.* 2016 Jan;23:220-33. doi: 10.1007/s11356-015-5354-1
16. Meier S, Cornejo P, Cartes P, Borie F, Medina J, Azcón R. Interactive effect between Cu-adapted arbuscular mycorrhizal fungi and biotreated agrowaste residue to improve the nutritional status of *Oenothera picensis* growing in Cu-polluted soils. *J Plant Nutr Soil Sci.* 2015 Jan;178:126-35. doi: 10.1002/jpln.201400092
17. Santana NA, Rabuscke CM, Soares VB, Soriani HH, Nicoloso FT, Jacques RJS. Vermicompost dose and mycorrhization determine the efficiency of copper phytoremediation by *Canavalia ensiformis*. *Environ Sci Pollut Res.* 2018 Feb 21;25:12663-77. doi: 10.1007/s11356-018-1533-1
18. Saleem MH, Kamran M, Zhou Y, Parveen A, Rehman M, Ahmar S, et al. Appraising growth, oxidative stress and copper phytoextraction potential of flax (*Linum usitatissimum* L.) grown in soil differentially spiked with copper. *J Environ Manage.* 2020 Mar;257:109994. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.109994
19. Harris M, Gardner WC, Pypker T. Influence of a one-time biosolids application on elemental and nutrient concentrations on mine tailings. *Can J Soil Sci.* 2021 Jun 25;101(4):703-16. doi: 10.1139/cjss 2020-0022
20. Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 498, de 19 de agosto de 2020. Define critérios e procedimentos para produção e aplicação de biossólido em solos, e dá outras providências. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 21 ago. 2020. Disponível em: [https://conama.mma.gov.br/index.php?option=com\\_sisconama&view=atonormativo&id=726](https://conama.mma.gov.br/index.php?option=com_sisconama&view=atonormativo&id=726)
21. Zhou H, Chen C, Wang D, Arthur E, Zhang Z, Guo Z, et al. Effect of long-term organic amendments on the full-range soil water retention characteristics of a Vertisol. *Soil Tillage Res.* 2020 Aug;202:104663. doi: 10.1016/j.still.2020.104663
22. Vítková M, Z arzsevskij S, Šillerová H, Karlova A, Šimek P, Wimmerová L, et al. Sustainable use of composted sewage sludge: Metal(loid) leaching behaviour and material suitability for application on degraded soils. *Sci Total Environ.* 2024 Jun;929:172588. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.172588
23. Benidire L, Pereira S, Abouddrar W, Hafidi M, Castro P, Boularbah A. Remediation of metal-contaminated mine tailings by the application of organic and mineral amendments. *J Soils Sediments* 2022 Feb;22:482-95. doi: 10.1007/s11368-021-03081-z
24. Madline A, Benidire L, Boularbah A. Alleviation of salinity and metal stress using plant growth-promoting rhizobacteria isolated from semiarid Moroccan copper-mine soils. *Environ Sci Pollut Res.* 2021 Jul 10;28:67185-202. doi: 10.1007/s11356-021-15168-8
25. Lan Y, Liao L, Yao X, Ye S. Synergistic effects of nitrogen and plant growth-promoting rhizobacteria inoculation on the growth, physiological traits and nutrient absorption of intercropped *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* and *Dalbergia odorifera*. *Trees.* 2023 Apr;37:319-30. doi: 10.1007/s00468-022-02350-9
26. Xie L, Lehvävirta S, Timonen S, Kasurinen J, Niemikapee J, Valkonen JPT. Species-specific synergistic effects of two plant growth—Promoting microbes on green roof plant biomass and photosynthetic efficiency. *PLoS One.* 2018 Dec 31;13(12):e0209432. doi: 10.1371/journal.pone.0209432
27. Fukami J, Cerezini P, Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Expr.* 2018 May;8:73. doi: 10.1186/s13568-018-0608-1
28. Hungria M, Rondina ABL, Nunes ALP, Araujo RS, Nogueira MA. Seed and leaf-spray inoculation of PGPR in brachiarias (*Urochloa* spp.) as an economic and environmental opportunity to improve plant growth, forage yield and nutrient status. *Plant Soil.* 2021 Mar 11;463:171-86. doi: 10.1007/s11104-021-04908-x
29. Wani PA, Khan MS, Zaidi A. Co-inoculation of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea. *Acta Agron Hungarica.* 2007 Sep;55(3):315-23. doi: 10.1556/AAgr.55.2007.3.7
30. Takahashi WY, Galvão CW, Cassán FD, Urrea-Valencia S, Stremel AC, Stets MI, et al. Tracking maize colonization and growth promotion by *Azospirillum* reveals strain-specific behavior and the influence

- of inoculation method. *Plant Physiol Biochem.* 2024 Oct;215:108979. doi: 10.1016/j.plaphy.2024.108979
31. Cortazar B, Koydemir HC, Tseng D, Feng S, Ozcan A. Quantification of plant chlorophyll content using Google Glass. *Lab Chip.* 2015 Feb;15(7):1708-16. doi: 10.1039/C4LC01279H
  32. Vidigal SM, De Carvalho Lopes IP, Puiatti M, De Freitas Ribeiro MR, Sediya MAN. SPAD index in the diagnosis of nitrogen status in cauliflower as a function of nitrogen fertilization. *Cientifica.* 2018 Aug;46(3):307-14. doi: 10.15361/1984-5529.2018v46n3p307-314
  33. Pan W, Lu Q, Xu QR, Zhang RR, Li HY, Yang YH, et al. Abscisic acid-generating bacteria can reduce Cd concentration in pakchoi grown in Cd-contaminated soil. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019 Aug;177:100-7. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.04.010
  34. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Panorama: Caçapava do Sul [Internet]; 2022 [citado em 29 jun 2025]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/cacapava-do-sul/panorama>.
  35. De Borba AW, Guadagnin F. The *Guaritas*, *Serra do Segredo*, and *Minas do Camaquã* geosites of the 'Caçapava UNESCO Aspiring Geopark' (southernmost Brazil): world-class sites for Gondwanan sedimentation, tectonics, copper mining, and cavernous weathering research. *Geoheritage.* 2022 Jan;14:14. doi: 10.1007/s12371-022-00648
  36. IUSS Working Group WRB. Base de référence mondiale pour les ressources en sol 2014, mise à jour 2015: système international de classification des sols pour nommer les sols et élaborer des légendes de cartes pédologiques. Rome (IT): FAO; 2015 (Rapport sur les ressources en sols du monde; n° 106). Disponível em: <https://www.fao.org/3/i3794fr/I3794FR.pdf>.
  37. Klute A. Water retention: laboratory methods. In: Klute A, editor. *Methods of soil analysis: physical and mineralogical methods*. 2nd ed. Madison (WI): American Society of Agronomy; 1986. p. 635-60. doi: 10.2136/sssabookser5.1.2ed.c26
  38. United States Environmental Protection Agency (USEPA). SW-846 test method 3050B: acid digestion of sediments, sludges, and soils. Washington (DC): USEPA; 1996.
  39. Silva LS, Bohnen H. Mineralização de palha de milho e adsorção de carbono, cálcio, magnésio e potássio em substratos com caulinita natural e goethita sintética. *Rev Bras Cienc Solo.* 2001 Jun;25(2):289-96. doi: 10.1590/S0100-06832001000200005
  40. Tedesco JM, Gianello C, Bissani CA, Bohnem H, Volkweiss SJ. *Análise de solo, plantas e outros materiais*. 2. ed. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1995. (Boletim Técnico de Solos; n° 5).
  41. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). ABNT NBR 16097: Determinação do teor de umidade — Métodos expeditos de ensaio. Rio de Janeiro (RJ): ABNT; 2012.
  42. Yang Y, Jiang M, Liao J, Luo Z, Gao Y, Yu W, et al. Effects of simultaneous application of double chelating agents to Pb-contaminated soil on the phyto remediation efficiency of *Indocalamus decorus* QH Dai and the soil environment. *Toxics.* 2022;10(12):713. doi: 10.3390/toxics10120713
  43. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna (AT): R Foundation for Statistical Computing; 2024. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.
  44. Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA. ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portuguese). Version 1.2.0 [R package]; 2018. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>.
  45. Wickham H, Hester J, Bryan J. readr: Read Rectangular Text Data. Version 2.1.5 [R package]; 2024. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=readr>.
  46. Li Y, Luo J, Yu J, Xia L, Zhou C, Cai L, et al. Improvement of the phyto remediation efficiency of *Neyraudia reynaudiana* for lead-zinc mine-contaminated soil under the interactive effect of earthworms and EDTA. *Sci Rep.* 2018 Apr 23;8:6417. doi: 10.1038/s41598-018-24715-2
  47. Saleem MH, Fahad S, Khan SU, Din M, Ullah A, Sabagh A El, et al. Copper-induced oxidative stress, initiation of antioxidants and phyto remediation potential of flax (*Linum usitatissimum* L.) seedlings grown under the mixing of two different soils of China. *Environ Sci Pollut Res.* 2020 Feb;27(5):5211-21. doi: 10.1007/s11356-019 07264-7
  48. De Marco R, Da Silva RF, Scheid DL, Da Ros CO, Da Silva VR. Amenizante orgânico e *Eucalyptus grandis* para fitoestabilização de solo contaminado com cobre. *Floresta Ambient.* 2017;24:e00029315. doi: 10.1590/2179-8087.029315
  49. El-Komy H, Hamdia M, Abd El-Baki G. Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. *Biol Plant.* 2003 Mar;46:281-7. doi: 10.1023/A:1022819114860
  50. Sumner ME. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. In: Stewart BA, editor. *Advances in soil science*. Vol. 12. New York (NY): Springer; 1990. p. 53-123.
  51. Terra LEM, Dos Santos MM, Lopes MCS, Pinheiro DA, Lopes ÉMG, Soares AS, et al. Co-Inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Bacillus* sp. enhances biomass and photosynthetic efficiency in *Urochloa brizantha*. *Agric.* 2024 Dec;14(12):2349. doi: 10.3390/agriculture14122349

52. Dahmani MA, Desrut A, Moumen B, Verdon J, Mermouri L, Kacem M, et al. Unearthing the plant growth-promoting traits of *Bacillus megaterium* RmBm31, an endophytic bacterium isolated from root nodules of *Retama monosperma*. *Front Plant Sci.* 2020 Feb;11:124. doi: 10.3389/fpls.2020.00124
53. Szilagyizecchin VJ, Mógor ÁF, Ruaro L, Röder C. Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 em cultura orgânica. *Rev Cienc Agrar.* 2015;38(1):26-33. doi: 10.19084/rca.16865
54. Fages J. *Azospirillum* inoculants and field experiments. In: Okon Y, editor. *Azospirillum/plant associations*. Boca Raton (FL): CRC Press; 1994. p. 87-109. doi: 10.1007/978-1-4612-3316-9\_2
55. Bashan Y, Holguin G. Azospirillum – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can J Microbiol.* 1997 Feb;43(2):103-21. doi: 10.1139/m97-015
56. Kluge RA, Tezotto-Uliana JV, Da Silva PPM. Aspectos fisiológicos e ambientais da fotossíntese. *Rev Virtual Quim.* 2015 Jan;7(1):56-73. doi: 10.5935/1984-6835.20150004
57. Yang H, Yang J, Lv Y, He J. SPAD values and nitrogen nutrition index for the evaluation of rice nitrogen status. *Plant Prod Sci.* 2014;17(1):81-92. doi: 10.1626/pp.s.17.81
58. Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6. ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2017. Tradução: Mastroberti AA, et al. Revisão técnica: Oliveira PL.
59. Riccardi M, Mele G, Pulvento C, Lavini A, D'Andria R, Jacobsen SE. Non-destructive evaluation of chlorophyll content in quinoa and amaranth leaves by simple and multiple regression analysis of RGB image components. *Photosynth Res.* 2014 Jan 19;120(3):263-72. doi: 10.1007/s11120-014-9970-2
60. Elalami D, Monlau F, Carrere H, Abdelouahdi K, Oukarroum A, Zeroual Y, et al. Effect of coupling alkaline pretreatment and sewage sludge co-digestion on methane production and fertilizer potential of digestate. *Sci Total Environ.* 2020 Nov;743:140670. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140670
61. Costa LC, Tavanti RFR, Tavanti TR, Pereira CS. Desenvolvimento de cultivares de soja após inoculação de estirpes de *Bacillus subtilis*. *Nativa.* 2019 Mar;7(2):126-32. doi: 10.31413/nativa.v7i2.6261
62. Lima FF, Nunes LAPL, Figueiredo MDVB, De Araújo FF, Lima LM, De Araújo ASF. *Bacillus subtilis* e adubação nitrogenada na produtividade do milho. *Rev Bras Ciências Agrar.* 2011;6(4):657-61. doi: 10.5039/agraria.v6i4a1429
63. Croft H, Chen JM, Luo X, Bartlett P, Chen B, Staebler RM. Leaf chlorophyll content as a proxy for leaf photosynthetic capacity. *Glob Chang Biol.* 2017 Sep;23(9):3513-24. doi: 10.1111/gcb.13599
64. Luo X, Croft H, Chen JM, He L, Keenan TF. Improved estimates of global terrestrial photosynthesis using information on leaf chlorophyll content. *Glob Chang Biol.* 2019 Jul;25(7):2499-514. doi: 10.1111/gcb.14624