

RESSALVA

Atendendo a solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 18/12/2026.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

ISABELLA FIORINI DE CARVALHO

**CRESCIMENTO E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Canavalia ensiformis* EM
SOLO CONTAMINADO POR COBRE: POTENCIAL DE
FITORREMEDIAÇÃO EM ASSOCIAÇÃO COM MICRORGANISMOS
BENÉFICOS**

Ilha Solteira

2025

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA: ECOFISIOLOGIA
VEGETAL

ISABELLA FIORINI DE CARVALHO

**CRESCIMENTO E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Canavalia ensiformis* EM
SOLO CONTAMINADO POR COBRE: POTENCIAL DE
FITORREMEDIAÇÃO EM ASSOCIAÇÃO COM MICRORGANISMOS
BENÉFICOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de
Ilha Solteira – Unesp como parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em agronomia.
Especialidade: Ecofisiologia Vegetal

Nome do orientador
Liliane Santos de Camargos
Nome do coorientador
**Marcelo Carvalho Minhoto
Teixeira Filho**

Ilha Solteira

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

C331c Carvalho, Isabella Fiorini.
Crescimento e respostas fisiológicas de *Canavalia ensiformis* em solo contaminado por cobre: potencial de fitorremediação em associação com microrganismos benéficos / Isabella Fiorini Carvalho. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2025 62 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira, 2025

Orientador: Liliane Santos de Camargos

Coorientador: Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho

Inclui bibliografia

1. Contaminação do solo. 2. Estresse metálico. 3. Microrganismos Promotores de crescimento.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Crescimento e respostas fisiológicas de *Canavalia ensiformis* em solo contaminado por cobre: potencial de fitorremediação em associação com microrganismos benéficos

AUTORA: ISABELLA FIORINI DE CARVALHO

ORIENTADORA: LILIANE SANTOS DE CAMARGOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Agronomia, especialidade: Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LILIANE SANTOS DE CAMARGOS (Participação Virtual)
Departamento de Biologia e Zootecnia / UNESP / Câmpus de Ilha Solteira - FEIS



Documento assinado digitalmente
LILIANE SANTOS DE CAMARGOS
Data: 17/12/2025 12:30:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. MARINA ALVES GAVASSI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / UNESP / Câmpus de Bauru - FC



Documento assinado digitalmente
MARINA ALVES GAVASSI
Data: 07/01/2026 11:52:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. ELISA MONTEZE BICALHO (Participação Virtual)
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Federal de Viçosa - UFV



Documento assinado digitalmente
ELISA MONTEZE BICALHO
Data: 18/12/2025 06:16:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ilha Solteira, 17 de dezembro de 2025.

Dedico

Aos meus pais Paulo Eduardo de Carvalho e Roselene Fiorini de Carvalho que não mediram esforços para realizarem os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças e sabedoria nessa grande jornada;

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela oportunidade de poder cursar o que sempre sonhei e por todas as outras que foram ofertadas;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - 001 pelo financiamento destinado a essa pesquisa;

A minha professora e orientadora, Liliane Santos de Camargos, pela oportunidade concedida, por todos ensinamentos, paciência, acolhimentos e por ter tornado essa trajetória acadêmica um pouco mais leve. Obrigada por todo suporte e por ser esse exemplo de força no qual eu me inspiro tanto;

A equipe do LFMV, especialmente a Thalita Fischer Santini Mendes e a Nayane Cristina Pires Bomfim que foram excepcionais para meu aprendizado e evolução;

Ao meu coorientador, Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho, que me acolheu desde o início com toda paciência e carinho. Obrigada por todos os ensinamentos;

Aos membros desta banca, por terem aceitado o convite e por toda a contribuição ao meu trabalho;

A todos os funcionários da UNESP - FEIS, por toda ajuda fornecida, colaboração e ensinamentos para que esse trabalho pudesse acontecer;

Aos meus pais, Paulo Eduardo de Carvalho e Roselene Fiorini de Carvalho pelo apoio e por me proporcionar todas as condições para chegar até aqui. Sou imensamente grata por todo esforço que fizeram para que eu me torne uma boa profissional. Sem vocês jamais teria chegado onde cheguei;

A minha irmã, Julia Fiorini de Carvalho por sempre me apoiar e vibrar comigo cada conquista;

Aos meus avós, Janete Inês do Prado Fiorini e Carlos Roberto Fiorini por todo carinho, preocupação e por sempre ficarem felizes com as minhas conquistas.

Por último, gostaria de agradecer algumas pessoas que conheci ao longo dessa jornada e que agregaram demais para meu desenvolvimento e crescimento pessoal: Bruno Bonadio Cozin, Mayara Bertalha e Roberta Possas de Souza. Obrigada por sempre estarem comigo e pelas boas lembranças dessa vida universitária que levarei para vida toda.

RESUMO

Altos níveis de cobre (Cu) em solos agrícolas, resultantes do uso intensivo de insumos, impactam negativamente o crescimento e a fisiologia das culturas. Este estudo investigou a influência individual de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* sobre o crescimento, tolerância, potencial de fitorremediação e concentração de metabólitos de *Canavalia ensiformis* em solo com excesso de cobre. O experimento foi implantado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x3, sendo 5 doses de Cu (0, 50, 150, 250 e 350 mg kg⁻¹ de solo), cada dose com 5 repetições/vasos e 3 tratamentos de microrganismos (*T. harzianum*, *B. subtilis* e sem inoculação), totalizando 75 unidades experimentais. Os resultados mostraram que o aumento das doses de Cu reduziu o crescimento, a biomassa, a atividade nodular e o desempenho fisiológico de *C. ensiformis*, além de alterar os teores de proteínas, aminoácidos, ureídeos, ácido alantóico, alantoína e compostos fenólicos na parte aérea e raízes. No entanto, a inoculação com microrganismos mitigou esses efeitos por mecanismos distintos. *B. subtilis* apresentou maior eficiência em doses mais baixas de Cu. Nessas condições, houve aumento no comprimento da parte aérea (63,88 cm a 0 mg kg⁻¹ de Cu vs. 51,42 cm sem inoculação), elevou a taxa fotossintética (92,78 vs. 75,70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e melhorou a condutância estomática. Além disso, contribuiu parcialmente para preservar o metabolismo nitrogenado, promovendo incrementos nos teores de aminoácidos na parte aérea e mantendo níveis de proteínas nos nódulos, embora seu efeito mitigador tenha sido mais limitado sob doses elevadas do metal. Por outro lado, *T. harzianum* demonstrou maior eficácia em concentrações mais altas de Cu. O microrganismo promoveu aumento na biomassa seca da parte aérea sob estresse (6,10 g vs. 3,44 g a 250 mg kg⁻¹ de Cu) e favoreceu maior acúmulo de Cu em raízes e parte aérea (0,40 mg vs. 0,12 mg a 350 mg kg⁻¹ de Cu). Também manteve maior número de nódulos ativos e intensificou o acúmulo e transporte de ureídeos para a parte aérea, indicando melhor desempenho da fixação de nitrogênio. Além disso, *T. harzianum* aprimorou a eficiência no uso da água, contribuindo para maior tolerância ao estresse. Apesar da redução geral da biomassa em doses elevadas de Cu, ambos os microrganismos atenuaram a toxicidade por vias distintas. *B. subtilis* foi mais efetivo em condições de menor contaminação, principalmente por melhorar processos fisiológicos e preservar parcialmente o metabolismo nitrogenado. *T. harzianum*, por sua vez, destacou-se sob maior estresse, mantendo a funcionalidade simbiótica, estimulando rotas ligadas ao transporte de nitrogênio e aumentando a tolerância e o acúmulo de Cu. Assim, *C. ensiformis* apresenta tolerância ao Cu até aproximadamente 250 mg kg⁻¹, e o uso direcionado desses microrganismos pode ser uma estratégia promissora para mitigar a toxicidade do metal e intensificar o potencial de fitorremediação em solos contaminados por metais pesados.

Palavras-chave: contaminação do solo; estresse metálico; microrganismos promotores de crescimento; transporte de nitrogênio.

ABSTRACT

High levels of copper (Cu) in agricultural soils, resulting from intensive input use, negatively affect crop growth and physiology. This study investigated the individual influence of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* on the growth, tolerance, phytoremediation potential, and metabolite concentrations of *Canavalia ensiformis* grown in Cu-contaminated soil. The experiment was conducted in a completely randomized design in a 5×3 factorial scheme, consisting of five Cu doses (0, 50, 150, 250, and 350 mg kg⁻¹ of soil), each with five replicates/pots, and three microbial treatments (*T. harzianum*, *B. subtilis*, and non-inoculated control), totaling 75 experimental units. The results showed that increasing Cu doses reduced growth, biomass, nodular activity, and physiological performance of *C. ensiformis*, and altered the levels of proteins, amino acids, ureides, allantoin, allantoic acid, and phenolic compounds in both shoots and roots. However, microbial inoculation mitigated these effects through distinct mechanisms. *B. subtilis* exhibited greater efficiency at lower Cu doses. Under these conditions, it increased shoot length (63.88 cm at 0 mg kg⁻¹ Cu vs. 51.42 cm in the non-inoculated control), enhanced photosynthetic rate (92.78 vs. 75.70 μmol m⁻² s⁻¹), and improved stomatal conductance. It also partially preserved nitrogen metabolism by increasing amino acid levels in the shoots and maintaining protein concentrations in nodules, although its mitigating effect was more limited under higher Cu concentrations. In contrast, *T. harzianum* was more effective at higher Cu doses. The microorganism increased shoot dry biomass under stress (6.10 g vs. 3.44 g at 250 mg kg⁻¹ Cu) and promoted greater Cu accumulation in both roots and shoots (0.40 mg vs. 0.12 mg at 350 mg kg⁻¹ Cu). It also maintained a higher number of active nodules and enhanced the accumulation and transport of ureides to the shoots, indicating improved nitrogen fixation performance. Additionally, *T. harzianum* improved water-use efficiency, contributing to greater stress tolerance. Despite the general reduction in biomass at elevated Cu levels, both microorganisms alleviated toxicity through distinct pathways. *B. subtilis* was more effective under lower contamination, mainly by improving physiological processes and partially preserving nitrogen metabolism, whereas *T. harzianum* performed better under more severe stress by maintaining symbiotic functionality, stimulating nitrogen-transport pathways, and increasing Cu tolerance and accumulation. Thus, *C. ensiformis* shows tolerance to Cu up to approximately 250 mg kg⁻¹, and the targeted use of these microorganisms may represent a promising strategy to mitigate metal toxicity and enhance the phytoremediation potential of plants grown in heavy metal-contaminated soils.

Keywords: soil contamination; metal stress; plant growth-promoting microorganisms; nitrogen transport.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	9
REFERÊNCIAS	13
2 CAPÍTULO 1: O USO DE <i>Trichoderma harzianum</i> E <i>Bacillus subtilis</i> PODE POTENCIALIZAR A FITORREMEDIAÇÃO EM SOLOS COM EXCESSO DE COBRE (Cu) POR <i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC (FABACEAE)?	16
2.1 INTRODUÇÃO	16
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	18
2.2.1 Característica do solo e local de coleta	18
2.2.2 Contaminação do solo	19
2.2.3 Inoculação da semente e instalação do experimento	19
2.2.4 Medidas de crescimento	20
2.2.5 Trocas gasosas	20
2.2.6 Coleta do material vegetal	20
2.2.7 Determinação da concentração de nutrientes	21
2.2.8 Fertilidade e quantificação de Cu no solo	21
2.2.9 Potencial fitorremediador	21
2.2.10 Análise estatística	21
2.3 RESULTADOS	22
2.3.1 Parâmetros de crescimento e biomassa	22
2.3.2 Trocas gasosas	24
2.3.3 Análise nutricional	26
2.3.4 Quantificação de cobre na parte aérea e raiz	28
2.3.5 Atributos químicos do solo	28
2.3.6 Potencial fitorremediador	30
2.4 DISCUSSÃO	31
2.5 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
3 CAPÍTULO 2: A INOCULAÇÃO COM <i>Trichoderma harzianum</i> E <i>Bacillus subtilis</i> ALTERA A CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITOS DE <i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC (FABACEAE) EM SOLO COM EXCESSO DE COBRE (Cu)?	41
3.1 INTRODUÇÃO	41

3.2 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.2.1 Característica do solo e local de coleta	43
3.2.2 Contaminação do solo	43
3.2.3 Inoculação das sementes e instalação do experimento	44
3.2.4 Coleta, extração e quantificação de metabólitos	44
3.2.5 Avaliação de nódulos ativos e inativos	45
3.2.6 Análise estatística	46
3.3 RESULTADOS	46
3.3.1 Biomassa	46
3.3.2 Concentração de metabólitos de parte aérea e raiz	47
3.3.3 Compostos nitrogenados de nódulos	51
3.3.4 Nódulos ativos ou inativos	52
3.4 DISCUSSÃO	53
3.5 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61

1 INTRODUÇÃO GERAL

A alta demanda por fertilizantes utilizados nos plantios é resultado do crescimento populacional, sendo as aplicações de fertilizantes uma atividade rotineira na produção agrícola como uma tentativa de promover o crescimento das culturas para aumentar a produtividade (Rossi *et al.*, 2023). A necessidade de fertilizantes no campo resulta no acúmulo desses insumos nos solos e na água, causando um aumento na concentração de metais pesados e consequentemente problemas à saúde humana e animal (Angon, *et al.*, 2024).

Nos últimos anos, o interesse no uso de microrganismos em práticas agrícolas aumentou significativamente. Os microrganismos são potenciais substitutos de produtos químicos para promoção do crescimento das plantas e controle biológico de pragas e doenças de plantas, entre outras aplicações que potencialmente favorecem a redução de custos e a preservação do meio ambiente (Chagas Junior *et al.*, 2021; Andrade *et al.*, 2023).

Os microrganismos podem conferir proteção às plantas, seja pela presença em plantas hospedeiras ou pela aplicação como agentes de biocontrole, o que pode resultar na eliminação de pragas agrícolas (Rezaee *et al.*, 2025). Esses microrganismos, conhecidos como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPPC), proporcionam diversos benefícios às plantas, como aumento nas taxas de germinação de sementes, crescimento de raízes, número de grãos, crescimento foliar, área foliar, teor de nutrientes, tolerância à seca e atrasos na senescência foliar e, além disso, também podem servir como biocontrole de doenças por meio de ação direta contra um patógeno e ação indireta que torna uma planta mais tolerante (Lima *et al.*, 2019; Ehinmitan *et al.*, 2024).

Entre esses microrganismos, destacamos o *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*. O *T. harzianum* contribui para melhorar a capacidade das plantas de extrair íons metálicos do solo, ao estimular o desenvolvimento do sistema radicular (Woo *et al.*, 2023). Esse aumento na densidade de raízes é atribuído à regulação da síntese de fitohormônios tanto pelos fungos quanto pelas próprias plantas hospedeiras (Wang *et al.*, 2024). Já o *B. subtilis* promove diversos benefícios nas plantas relacionados à promoção de crescimento, tais como, resistência a condições de estresse biótico e abiótico, proteção vegetal, além de apresentarem amplo potencial biotecnológico, e ao mesmo tempo

mostrando ser uma alternativa para um cultivo com menor uso de insumos agrícolas (Patel *et al.*, 2023).

Uma das formas de enriquecer a retirada de metais pesados utilizando plantas leguminosas, é condicionar o meio para melhorar o desenvolvimento das mesmas, sendo assim a utilização de fungos e bactérias promotoras de crescimento vegetal, como o *T. harzianum* e *B. subtilis*, um incremento no potencial fitorremediador nestas condições (Santoyo *et al.*, 2024). A promoção do crescimento está intimamente ligada à interação entre as plantas, fungos e bactérias, que pode incluir a produção de fitohormônios, redução da disponibilidade de espécies químicas tóxicas, o controle de pragas e doenças, a interação com microrganismos benéficos, como os fungos micorrízicos arbusculares, e a solubilização de nutrientes (Fasusi *et al.*, 2023).

O cobre desempenha um papel essencial para as plantas, contribuindo para o metabolismo de carboidratos, nitrogênio, além da síntese de lignina e clorofila (Wen *et al.*, 2024). A utilização da calda bordalesa (mistura Bordo) na viticultura brasileira, por exemplo, tem levado a aumentos significativos no teor de Cu nos solos agrícolas (Ferreira *et al.*, 2024). Embora seja um micronutriente essencial, o cobre em excesso no solo pode se tornar tóxico às plantas, comprometendo seu crescimento e o funcionamento fisiológico. Essa toxicidade está frequentemente associada ao estresse oxidativo, uma vez que altas concentrações do metal estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (Taiz & Zeiger, 2015; Xu *et al.*, 2024).

A fitorremediação juntamente com a presença de microrganismos é uma alternativa viável para abordar essas questões. Esta técnica envolve o uso de plantas para remover ou reduzir contaminantes no solo, como o cobre, com impacto ambiental mínimo ou praticamente nulo e custo financeiro reduzido (Angon *et al.*, 2024). As plantas são naturalmente receptivas a nutrientes e, conseqüentemente, a metais pesados, tornando a fitorremediação uma abordagem eficaz e atraente no contexto atual (Acharya *et al.*, 2025).

Neste cenário, as plantas produtoras de biomassa são extremamente vantajosas quando se considera a fitorremediação de metais tóxicos, pois mesmo que estas plantas não acumulem altos níveis de determinados metais em seus órgãos, sua grande produção de biomassa proporciona-lhes maior eficácia na extração de metais (Arantza *et al.*, 2022). Dentro deste grupo de plantas, podemos considerar plantas de cobertura como *Canavalia ensiformis*, *Calopogonium mucunoides*, *Stizolobium aterrimum*, *Canavalia gladiata*,

Crotalaria juncea, *Dolichos lablab*, *Pennisetum purpureum*, *Megathyrsus maximus*, *Panicum maximum* e *Sorghum bicolor* (forragem ou biomassa) (Souza *et al.*, 2018).

Entre as leguminosas de cobertura mais utilizadas, destaca-se a *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Fabaceae). O potencial dessa espécie para adubação verde tem sido amplamente reconhecido em diversos estudos, principalmente em associação com cultivos agrícolas (Andrade *et al.*, 2022). A *C. ensiformis* é conhecida por sua rusticidade, originária da América Central e pela capacidade de realizar fixação biológica de nitrogênio em simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium sp* (EMBRAPA, 1998; Rangel *et al.*, 2023). Além disso, apresenta uma ampla distribuição tropical, adaptando-se a solos de baixa fertilidade e contribuindo para o enriquecimento do solo por meio do aporte de nutrientes e matéria orgânica (LI *et al.*, 2022).

Embora microrganismos benéficos como *T. harzianum* e *B. subtilis* sejam amplamente estudados por seus efeitos na promoção do crescimento vegetal e na biorremediação, suas aplicações em solos contaminados por cobre ainda são pouco exploradas. Estudos recentes indicam que a inoculação de sementes com biofilme de *B. subtilis* pode mitigar a toxicidade de Cu em tomateiros (Sarth *et al.*, 2025), enquanto *T. harzianum* tem demonstrado capacidade de aliviar o estresse por metais pesados, como Cd e Pb, por meio de mecanismos que estabilizam a mobilidade dos metais e aprimoram a absorção de nutrientes (Altaf *et al.*, 2024). Além disso, *C. ensiformis* já foi apontada como espécie promissora para a fitorremediação de Cu quando associada à micorrização e à adubação orgânica (Rangel *et al.*, 2023). No entanto, até onde se sabe, não há estudos que comparem de forma integrada os efeitos de *T. harzianum* e *B. subtilis* sobre *C. ensiformis* cultivada sob estresse por cobre. Essa lacuna limita a compreensão sobre como diferentes microrganismos podem modular a tolerância e a eficiência fitorremediadora dessa leguminosa. Assim, o presente estudo se destaca por seu caráter inédito ao investigar comparativamente essas interações, incluindo impactos sobre o metabolismo de nitrogênio e parâmetros fisiológicos, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas sustentáveis voltadas à recuperação de áreas contaminadas.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* na *Canavalia ensiformis* em solo com excesso de Cu nos seguintes parâmetros: (a) Crescimento e produção de biomassa; (b) Trocas gasosas (taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração); (c) Concentração de metabólitos;

(d) Acúmulo e distribuição de Cu nos órgãos da planta; (e) Determinar se ocorre aumento na tolerância e o potencial fitorremediador da *C. ensiformis*.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, A. *et al.* Current Assessment and Future Perspectives on Phytoremediation of Heavy Metals. **Plants**, v. 14, n. 18, p. 2847, 2025. DOI: 10.3390/plants14182847.
- ALTAF, M. *et al.* *Trichoderma* inoculation alleviates Cd and Pb induced toxicity and improves growth and physiology of *Vigna radiata* (L.). **ACS Omega**, v. 9, p. 8557–8573, 2024. DOI: 10.1021/acsomega.3c10470.
- ANGON, P. B. *et al.* Sources, effects and present perspectives of heavy metals contamination: soil, plants and human food chain. **Heliyon**, v. 10, n. 7, e28357, 2024. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e28357.
- ANDRADE, L. A. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 1088, 2023. DOI: 10.3390/microorganisms11041088.
- ANDRADE, R. A. *et al.* Cover crop rates and decomposition of green manure in Southwestern Amazon. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 15, n. 1, e8600, 2022. DOI: 10.17765/2176-9168.2022v15n1e8600.
- ARANTZA, S. J. *et al.* Bio e fitorremediação: plantas e micróbios para o resgate de solos contaminados por metais pesados. **SN Applied Sciences**, v. 4, p. 59, 2022. DOI: 10.1007/s42452-021-04911-y.
- CHAGAS JUNIOR, A. F. *et al.* Eficiência do *Bacillus subtilis* BS10 como inoculante promotor do crescimento vegetal na cultura da soja em condições de campo. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 14, e441101422141, 2021.
- EHINMITAN, E.; OLAWUYI, O.; LAWAL, R. BioSolutions for green agriculture: unveiling the diverse roles of plant growth-promoting microorganisms. **Sustainability**, v. 16, n. 12, 6181491, 2024. DOI: 10.1155/2024/e6181491.
- EMBRAPA. **Feijão de porco, leguminosa para adubação verde e cobertura do solo**. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 1998. 2 p. (RB n. 37).
- FASUSI, O. A.; BABALOLA, O. O.; ADEJUMO, T. O. Aproveitamento de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal e fungos micorrízicos arbusculares na sustentabilidade de agroecossistemas. **CABI Agriculture and Bioscience**, v. 4, p. 26, 2023. DOI: 10.1186/s43170-023-00168-0.
- FERREIRA, G. W. *et al.* Heavy metal-based fungicides alter the chemical fractions of Cu, Zn, and Mn in vineyards in southern Brazil. **Agronomy**, v. 14, n. 5, p. 969, 2024. DOI: 10.3390/agronomy14050969.
- LI, Z. *et al.* A simbiose micorrízica arbuscular aumenta a formação de agregados estáveis em água e a estabilização da matéria orgânica em rejeitos de minério de ferro. **Geoderma**, v. 406, e115528, 2022. DOI: 10.1016/j.geoderma.2021.115528.

XU, E.; ZHANG, X.; DU, A. Molecular mechanisms of plant responses to copper: from deficiency to excess. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, e6993, 2024. DOI: 10.3390/ijms25186993.

REFERENCIAS

- ALTAF, M. *et al.* *Trichoderma* inoculation alleviates Cd and Pb induced toxicity and improves growth and physiology of *Vigna radiata* (L.). **ACS Omega**, v. 9, p. 8557–8573, 2024.
- ANDRADE, R. A. *et al.* Cover crop rates and decomposition of green manure in Southwestern Amazon. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 15, e8600, 2022.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2003.
- BOMFIM, N. C. P. *et al.* Iron phytostabilization by *Leucaena leucocephala*. **South African Journal of Botany**, v. 138, p. 318–327, 2021.
- BOMFIM, N. C. P. *et al.* Could nitrogen compounds be indicators of tolerance to high doses of Cu and Fe in the cultivation of *Leucaena leucocephala*? **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 194, p. 489–498, 2023.
- BRUNETTO, G. *et al.* Copper accumulation in vineyard soils: rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. **Chemosphere**, v. 162, p. 293–307, 2016.
- CAMPILLO-CORA, C. *et al.* Effect of heavy metal pollution on soil microorganisms: influence of soil physicochemical properties. **European Journal of Soil Biology**, v. 124, e103706, 2025.
- CETESB – COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Decisão da diretoria n. 125/2021/E, de 09 de dezembro de 2021: valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo. São Paulo, 2021.
- DANIAL, A. W.; DARDIR, F. M. Biossorção de cobre por *Bacillus pumilus* OQ931870 e *Bacillus subtilis* OQ931871 isolados de Wadi Nakheil, Mar Vermelho, Egito. **Microbial Cell Factories**, v. 22, 152, 2023.
- DANIEL, E. S. *et al.* Potencial de fitorremediação de gramíneas forrageiras em ambientes contaminados com cobre. **Water, Air, Soil Pollution**, v. 236, 252, 2025.
- FASANI, E. *et al.* Metal detoxification in land plants: from bryophytes to vascular plants. **Plants**, v. 11, 237, 2022.
- FERREIRA, T. C. ***Bacillus spp.* como agentes de controle de *Thielaviopsis paradoxa* e *Fusarium verticillioides* e promotores de crescimento de cana-de-açúcar e milho**. 2018. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.
- FONSECA, M. C. *et al.* *Bacillus subtilis* inoculation improves nutrient uptake and physiological activity in sugarcane under drought stress. **Microorganisms**, v. 10, 809, 2022.

GIANNAKOULA, A.; THERIOS, I.; CHATZISSAVVIDIS, C. Effect of lead and copper on the photosynthetic apparatus of citrus plants (*Citrus aurantium* L.): the role of antioxidants in oxidative damage due to heavy metal stress. **Plants**, v. 10, 155, 2021.

GONILHA, D. B. L. *et al.* Estratégias biológicas para minimizar o uso de fertilizantes no milho: eficácia de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*. **Microbiology Research**, v. 15, p. 2261–2273, 2024.

HASHEM, A.; TABASSUM, B.; ALLAH, E. F. *Bacillus subtilis*: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, p. 1291–1297, 2019.

ISLAM, F. *et al.* Copper-resistant bacteria reduce oxidative stress and copper uptake in lentil plants: potential for bacterial bioremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 220–233, 2016.

ISLAM, M. M.; SAXENA, N.; SHARMA, D. Phytoremediation as a green and sustainable prospective method for heavy metal contamination: a review. **RSC Sustainability**, v. 2, p. 1269–1288, 2024.

JEON, D.; ROBINSON, B.; DICKINSON, N. Organic matter mitigates biotic impact of copper in fruit orchard soil. **Environmental Pollution**, v. 363, 125145, 2024.

KABATA-PENDIAS, A.; SZTEKE, B. **Trace elements in abiotic and biotic environments**. Boca Raton, London, New York: Taylor & Francis, 2015.

KAMAL, A. *et al.* Enhancing *Sesbania sesban* growth and metal resilience by synergistic application of *Trichoderma harzianum* loaded biochar and biochar-zinc oxide nanocomposite. **BMC Plant Biology**, v. 25, 771, 2025.

KUMAR, V. *et al.* Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: a comprehensive review. **Chemosphere**, v. 262, e127810, 2021.

KUMAR, V. *et al.* Pollution assessment of heavy metals in soils of India and ecological risk assessment: a state-of-the-art. **Chemosphere**, v. 216, p. 449–462, 2019.

LI, Z. *et al.* Cadmium as the critical limiting factor in the co-disposal of municipal solid waste incineration fly ash in cement kilns: implications for three-stage water washing efficiency and safe dosage control. **Toxics**, v. 13, 593, 2025.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997.

MARQUES, A. C. R. *et al.* Phytoremediation of Cu-contaminated vineyard soils in Brazil: a compendium of Brazilian pot studies. **Journal Environmental Quality**, v. 52, p. 1024–1036, 2023.

NARAYAN, O. P. *et al.* Sulphur nutrition and its role in plant growth and development. **Plant Signaling Behavior**, v. 18, 2030082, 2022.

OLIVEIRA, C. E. S. *et al.* Yield, nutrition, and leaf gas exchange of lettuce plants in a hydroponic system inoculated with *Bacillus subtilis*. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, e1248044, 2023.

POGGERE, G. *et al.* Soil contamination by copper: sources, ecological risks, and mitigation strategies in Brazil. **Journal of Trace Elements and Minerals**, v. 4, e100059, 2023.

R CORE TEAM. **R: The R Project for Statistical Computing [software]**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2022.

RAHMAN, M. M.; AZIRUN, S. M.; BOYCE, A. N. Enhanced accumulation of copper and lead in Amaranth (*Amaranthus paniculatus*) and Indian mustard (*Brassica juncea*). **PloS One**, v. 8, e62941, 2013.

RAIJ, B. V. *et al.* **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001.

RANGEL, L. F. *et al.* Effect of organic fertilization and arbuscular mycorrhizal inoculation on copper phytoextraction by *Canavalia ensiformis*. **Journal of Environmental Management**, v. 333, e117420, 2023.

RANGEL, T. S. *et al.* Organic fertilization and mycorrhization increase copper phytoremediation by *Canavalia ensiformis* in a sandy soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, p. 68271–68289, 2023.

RIGO BELO, E. C. *et al.* Effects of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* on the root and soil microbiomes of soybean. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, e1403160, 2024.

ROCCO, D. H. E. *et al.* *Bacillus subtilis* as an effective tool for bioremediation of lead, copper, and cadmium in water. **Discover Applied Sciences**, v. 6, e430, 2024.

SARTI, G. C. *et al.* Tomato seed inoculation with *Bacillus subtilis* biofilm mitigates toxic effects of excessive copper in the substrate. **Processes**, v. 13, e2509, 2025.

SHENG, Z. *et al.* The addition of biochar enhances remediation efficiency and rapeseed yield in copper-contaminated soil. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, e1481732, 2024.

SILVA, R. N.; MARTINS, I.; RODRIGUES, F. Á. Mecanismos de ação de *Trichoderma spp.* no controle de doenças de plantas. **Revista Ciências Agrárias**, v. 42, p. 887–894, 2019.

TAIZ, L. *et al.* **Plant physiology and development**, 6. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2015.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**, 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

WANG, Y. *et al.* Remediation of copper-contaminated soils and growth enhancement of Pakchoi (*Brassica chinensis* L.) via biofertilizers composed of new *Bacillus amyloliquefaciens* SYNU1. **Annals of Microbiology**, v. 73, e17, 2023.

WU, J. *et al.* Responses of *Phragmites australis* to copper stress: a combined analysis of plant morphology, physiology and proteomics. **Plant Biology**, v. 23, p. 351–362, 2021.

YADAV, M.; GEORGE, N.; DWIBEDI, V. Emergence of toxic trace elements in plant environment: insights into potential of silica nanoparticles for mitigation of metal toxicity in plants. **Environmental Pollution**, v. 333, e122112, 2023.

ZHAO, H. *et al.* The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 1243–1252, 2012.

REFERÊNCIAS

- ABEED, A. A. H. *et al.* Induction of resilience strategies against biochemical deteriorations prompted by severe cadmium stress in sunflower plant when *Trichoderma* and bacterial inoculation were used as biofertilizers. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1004173, 2022.
- AGUILAR, J. V. *et al.* Biomass and nickel tolerance: *Canavalia ensiformis* (L.) DC. as a candidate plant for phytoremediation applications. **Agriculture**, v. 15, n. 21. p. 2200, 2025. DOI: 10.3390/agriculture15212200.
- AHMAD, P. *et al.* Role of *Trichoderma harzianum* in mitigating NaCl stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) through antioxidative defense system. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 868, 2015. DOI: 10.3389/fpls.2015.00868.
- ALMEIDA, N. O. *et al.* *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum* are potential biocontrol agents of *Meloidogyne javanica* in banana cv. Grande Naine. **Biological Control**, v. 175, p. 105054, 2022.
- ALORI, E. T.; FAWOLE, O. B. Microbial inoculants-assisted phytoremediation for sustainable soil management. In: ANSARI, A. A. *et al.* (eds.). **Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants**. Springer International Publishing, 2017. p. 3–17.
- ANDRADE, R. A. *et al.* Cover crop rates and decomposition of green manure in Southwestern Amazon. **Revista de Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 15, p. e8600, 2022.
- BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 17, p. 278–293, 1966.
- BOMFIM, N. C. P. *et al.* Could nitrogen compounds be indicators of tolerance to high doses of Cu and Fe in the cultivation of *Leucaena leucocephala*? **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 194, p. 489–498, 2023. DOI: 10.1016/j.plaphy.2022.11.042.
- BOMFIM, N. C. P. *et al.* From micronutrients to potentially toxic elements: physiological responses of *Canavalia ensiformis* to copper and iron. **Metabolites**, v. 15, p. 706, 2025.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CARVALHO, I. F. *et al.* Effects of iron and copper on emergence and physiology of *Canavalia ensiformis* (L.) DC. **Revista Caatinga**, v. 38, p. e12686, 2025.
- CHEN, J. *et al.* Copper-induced phytotoxicity: Physiological, biochemical and molecular responses in plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 251, p. 114558, 2023. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2023.114558.
- FERREIRA, G. W. *et al.* Heavy metal-based fungicides alter the chemical fractions of Cu, Zn, and Mn in vineyards in Southern Brazil. **Agronomy**, v. 14, p. 969, 2024.

FERREIRA, T. C. *Bacillus spp.* como agentes de controle de *Thielaviopsis paradoxa* e *Fusarium verticillioides* e promotores de crescimento de cana-de-açúcar e milho. 2018. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FERREIRA, T. C. *et al.* Responses of tropical legumes to nickel stress: impacts on growth, foliar structure, and nitrogen metabolism. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 47, p. 69, 2025.

FOLIN, O.; Ciocalteu, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, p. 627–650, 1927. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)84277-6.

GONILHA, D. B. L. *et al.* Estratégias biológicas para minimizar o uso de fertilizantes em milho: Eficácia de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*. **Microbiology Research**, v. 15, p. 2261–2273, 2024.

HASHEM, A.; TABASSUM, B.; ABD-ALLAH, E. F. *Bacillus subtilis*: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, p. 1291–1297, 2019.

HE, H. *et al.* Remediation of copper-contaminated soils and growth enhancement of Pakchoi via biofertilizers composed of new *Bacillus amyloliquefaciens* SYNU1. **Annals of Microbiology**, v. 74, art. 2, 2024.

JAIN, A.; KUMAR, A.; SALUNKE, D. M. Crystal structure of the vicilin from *Solanum melongena* reveals existence of different anionic ligands in structurally similar pockets. **Scientific Reports**, v. 6, p. 23334, 2016.

KRUK, J. Antioxidative properties of phenolic compounds and their role in plant resistance to oxidative stress. **Journal of Plant Science**, v. 15, p. 1–14, 2022.

LATEF, A. A. H. A. *et al.* Mitigation of copper stress in maize by inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus circulans*. **Plants**, v. 9, p. 1513, 2020.

LI, Y. *et al.* Metal nutrition and transport in the process of symbiotic nitrogen fixation. **Plant Communications**, v. 5, p. 100829, 2024.

MENDES, T. F. S. *et al.* Metabolic Responses to Excess Manganese in Legumes. **Legume Science**, v. 6, p. e70003, 2024.

MENDES, T. F. S. *et al.* Differential Mechanisms of Tolerance and Accumulation... **Soil and Sediment Contamination**, v. 34, p. 85–103, 2025.

OROZCO-MOSQUEDA, M. C. *et al.* Plant growth-promoting bacteria as bioinoculants. **Agronomy**, v. 11, p. 1167, 2021.

POMMERESCHE, R.; HANSEN, S. **Examining root nodule activity on legumes**. FiBL, 2017. Disponível em: <https://orgprints.org/id/eprint/31344/>. Acesso em: (28/10/2025).

RAIJ, B. V. *et al.* **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001.

- RANGEL, L. F. *et al.* Effect of organic fertilization and arbuscular mycorrhizal inoculation on copper phytoextraction. **Journal of Environmental Management**, v. 333, p. 117420, 2023.
- RANGEL, T. S. *et al.* Organic fertilization and mycorrhization increase copper phytoremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, p. 68271–68289, 2023.
- REDILLAS, M. C. F. R. *et al.* Allantoin accumulation enhances abiotic stress tolerance in rice by activating antioxidant defense and stress-responsive gene expression. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 7, p. 1289–1301, 2019. DOI: 10.1111/pbi.13042.
- RIGOBELLO, E. C. *et al.* Effects of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* on the root and soil microbiomes of soybean. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1403160, 2024.
- ROMERO-CRUZ, M. C. *et al.* Alterations in nitrogen metabolism caused by heavy metals stress in plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 202, p. 104993, 2024.
- SILVA, R. N.; Martins, I.; Rodrigues, F. A. Mecanismos de ação de *Trichoderma* spp. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, p. 887–894, 2019.
- SUN, X. *et al.* Amino Acids Biostimulants and Protein Hydrolysates in Agricultural Sciences. **Plants**, v. 13, n. 2, p. 210, 2024.
- TEIXEIRA, P. C. *et al.* **Manual de Métodos de Análise de Solo**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 2017.
- VOGELS, G. D.; VAN DER DRIFT, C. Differential analysis of glyphosate derivatives. **Analytical Biochemistry**, v. 33, p. 143–157, 1970.
- VITALE, S. *et al.* Nitrogen source orchestrates pH modulation and secondary metabolism in *Trichoderma harzianum*. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 12, p. 19, 2025.
- YAN, M. *et al.* Mechanistic insights and potential use of siderophores-producing microbes. **Microbial Ecology**, v. 83, p. 325–340, 2022.
- YEMM, E. W.; Cocking, E. C.; Ricketts, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209–213, 1955.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização deste estudo evidencia não apenas o potencial de *Canavalia ensiformis* e de microrganismos benéficos na atenuação da toxicidade do cobre, mas também a importância estratégica de pesquisas que integrem microbiologia agrícola, fisiologia vegetal e recuperação ambiental. Em um cenário em que o uso intensivo de insumos agrícolas aumenta continuamente os níveis de metais pesados no solo, compreender como plantas e microrganismos interagem para tolerar e transformar esses ambientes torna-se fundamental para o desenvolvimento de práticas sustentáveis.

A escassez de estudos que abordem, de forma integrada, o crescimento e respostas fisiológicas de *C. ensiformis* em solo contaminado por cobre: potencial de fitorremediação em associação com microrganismos benéficos, destaca o caráter inédito e necessário da presente investigação. Até o momento, não existem registros na literatura que explorem simultaneamente a atuação de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum* sobre *C. ensiformis* em condições de estresse por Cu, especialmente avaliando parâmetros fisiológicos e metabólicos com essa amplitude. Assim, o estudo contribui para preencher uma lacuna científica importante e amplia o conhecimento sobre o manejo biológico de metais pesados no solo.

Além do avanço conceitual, os resultados gerados oferecem uma base sólida para a aplicação prática de microrganismos como ferramentas bioassistidas para recuperação de áreas degradadas e aumento da resiliência das culturas. A compreensão desses mecanismos é essencial para promover soluções de baixo custo, ambientalmente seguras e alinhadas ao conceito de agricultura regenerativa. A publicação desses achados se faz necessária não apenas pelo seu caráter original, mas também pela relevância da discussão para a comunidade científica, para o setor produtivo e para estratégias de gestão ambiental.

Dessa forma, esta dissertação reforça a importância de se investir em pesquisas que busquem integrar processos biológicos ao manejo agrícola e ambiental. A interação entre plantas e microrganismos, especialmente em condições de estresse por metais pesados, representa uma fronteira promissora e ainda pouco explorada, com potencial para gerar soluções inovadoras e contribuir de forma significativa para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas e para a recuperação de solos contaminados.