



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO SOLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

MARCOS GIOVANE PEDROZA DE ABREU

**TOLERÂNCIA E EFICIÊNCIA DE RIZÓBIOS NATIVOS DE ÁREA DE
MINERAÇÃO DE MANGANÊS NO DESENVOLVIMENTO DE LEGUMINOSAS**

FORTALEZA

2018

MARCOS GIOVANE PEDROZA DE ABREU

TOLERÂNCIA E EFICIÊNCIA DE RIZÓBIOS NATIVOS DE ÁREA DE
MINERAÇÃO DE MANGANÊS NO DESENVOLVIMENTO DE LEGUMINOSAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo. Área de concentração: Química, Fertilidade e Biologia do Solo.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Furtado Mendes Filho.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A99t Abreu, Marcos Giovane Pedroza de.
Tolerância e Eficiência de Rizóbios Nativos de Área de Mineração de Manganês no Desenvolvimento de Leguminosas / Marcos Giovane Pedroza de Abreu. – 2018.
68 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Paulo Furtado Mendes Filho.

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Contaminação. 3. Metal Pesado. I. Título.

CDD 631.4

MARCOS GIOVANE PEDROZA DE ABREU

TOLERÂNCIA E EFICIÊNCIA DE RIZÓBIOS NATIVOS DE ÁREA DE
MINERAÇÃO DE MANGANÊS NO DESENVOLVIMENTO DE LEGUMINOSAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo. Área de concentração: Química, Fertilidade e Biologia do Solo.

Aprovada em: 02/03/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Furtado Mendes Filho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fernando Felipe Ferreyra Hernandez (Examinador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. José Maria Tupinambá da Silva Júnior (Examinador)

A Deus.

A minha mãe, Maria Jocimar pela dedicação e grande exemplo de vida e meus irmãos Estefane e Edmildes Junior pela amizade e carinho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Ceará – UFC e ao Departamento de Ciências do Solo pela acolhida e oportunidade de formação e desenvolvimento deste projeto.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Prof. Titular do Departamento de Ciências do Solo Paulo Furtado Mendes Filho, pela excelente orientação, ensinamentos compartilhado, paciência e estímulo durante o período de convivência.

Aos membros participantes da banca examinadora Prof. Dr. Fernando Felipe Ferreyra Hernandez e Dr. José Maria Tupinambá da Silva Júnior, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas de Pós-Graduação, Ana Caroline, Laura, Acrisio, Wilner, Paul, Tiago, Ryshardson, Israel, Lucas, Ricardo Miranda pelo companheirismo e conhecimentos adquiridos de cada um. Aos amigos James Araujo, Kaio Graculo e Gustavo Albuquerque pela ajuda e ensinamentos para que se fosse possível a realização deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Ciência do Solo, pela grande contribuição que tiveram na minha formação pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Ismail Soares pela grande contribuição com ensinamentos e apoio para a contribuição deste trabalho.

A Deise Maia técnica do laboratório de Manejo do Solo, pelo fundamental apoio e contribuição para a realização das análises dos experimentos, além da amizade pessoal valiosa.

Aos amigos, Ana Barbary, Anne Caroline, Ângelo, Igor, Marlon, Felipe e Ramon pelo apoio e amizade construída a todos esses anos.

A Jussara Lima dos Santos por todo apoio, incentivo e confiança concedido a mim durante esse tempo.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para minha formação e para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

RESUMO

A poluição do solo por metais pesados se dá principalmente pela má gestão de resíduos gerados pela mineração durante os processos de exploração e beneficiamentos dos metais, em virtude da preocupação com o ambiente solo a pesquisa teve o objetivo de: avaliar a tolerância e a efetividade de estirpes nativas de solos de áreas de mineração de Mn em associação com espécies leguminosas cultivadas sob crescentes concentrações de Mn. Inicialmente foram obtidos isolados de rizóbios nativos de solos proveniente de área de mineração de Mn, tendo como plantas iscas as espécies Feijão-caupi e Sabiá. Posteriormente esses isolados foram autenticados e caracterizados morfológicamente. Foram realizados dois experimentos para observação do efeito do Mn sobre o crescimento e nodulação das espécies leguminosas, utilizando um solo natural, onde avaliou-se: número de nódulos (NN); massa de matéria seca de nódulos (MSN); massa de matéria seca da parte aérea (MSPA); teor de nitrogênio na parte aérea; teor de manganês na parte aérea das plantas e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA). Os dados foram submetidos a análise de variância. Os dados qualitativos foram comparados pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) e os quantitativos (doses) foram submetidos à análise de regressão, utilizando o software estatístico Sisvar. Foram obtidos 13 isolados para feijão-caupi e 14 para o sabiá. Os isolados de feijão-caupi apresentaram variabilidade quanto as características morfológicas, pH do meio, tempo de crescimento, cor e transparência das colônias e elasticidade, os isolados de sabiá apresentaram similaridade entre si diferindo apenas na forma das colônias. O Mn não afetou o processo simbiótico entre rizóbios e feijão-caupi, as estirpes nativas do substrato foram iguais ou superior as isoladas de área de mineração de Mn quanto a matéria seca dos nódulos, teor e acúmulo de N. O Mn afetou significativamente a altura, matéria seca da raiz e o teor de Mn na parte aérea das plantas havendo aumento de acordo com os níveis do metal no solo. Quanto ao sabiá o Mn não inibiu o processo simbiótico entre estirpes e a espécie vegetal. Os isolados da área de mineração apresentaram maior eficiência quanto as estirpes nativas na produção de MSPA, NN, MSN, teor e acúmulo de N. Os isolados da área de mineração de Mn influenciaram o teor de Mn na parte aérea das plantas, diminuindo o teor de acordo com o aumento dos níveis do metal no solo. Todos os isolados rizobianos das áreas degradadas pela mineração de manganês e os nativos do substrato são tolerantes ao Mn e capazes de induzir a formação de nódulos radiculares e fixar nitrogênio em feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) e sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.). Os rizóbios nativos do substrato associados ao feijão apresentam tolerância intrínseca ao Mn e são altamente competitivos. Os isolados da área degradada pela mineração de Mn, em simbiose com sabiá,

são capazes de aumentar a tolerância desta espécie ao excesso de Mn no solo, por meio da simbiose efetiva e eficiente na fixação de N₂ promovendo o crescimento da planta.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. contaminação. metal pesado.

ABSTRACT

Soil pollution by heavy metals occurs mainly due to poor management of wastes generated by mining during the exploitation and processing of metals, regarding to soil environment concern, this research aimed to: Evaluate the tolerance and the effectiveness of native rhizobium strains in soils of Mn mining areas in association with leguminous species grown under increasing concentrations of Mn. Initially, isolates of soil native rhizobia from the Mn mining area were obtained, with cowpea and sabiá as trap plants. Subsequently these isolates were authenticated and morphologically characterized. Two experiments were carried out using a natural soil to observe the effect of Mn on the leguminous species growth and nodulation, the evaluated variables were: number of nodules (NN); nodules dry mass (NDM); shoot dry matter mass (SDMM); shoot nitrogen content; manganese content in the aerial part of the plants and nitrogen accumulation in the aerial part (NAAP). Data were submitted to variance analysis. Qualitative variables were compared by the Scott-Knott test ($p < 0.05$) and quantitative (doses) were submitted to regression analysis, using the statistical software Sisvar. 13 isolates were obtained for cowpea and 14 for the sabiá. Cowpea isolates presented variability in the morphological characteristics, medium pH, growth time, color and transparency of the colonies and elasticity, while sabiá isolates showed similarity to each other differing only in the form of the colonies. Mn did not affect the symbiotic process between rhizobia and cowpea, substrate soil native strains were equal to or greater than those isolated from Mn mining area, such as nodules dry matter, N content and accumulation. Mn significantly affected height, root dry matter and Mn content in the aerial part of the plants, increasing according to the levels of the metal in the soil. Regarding to sabiá, the Mn did not inhibit the symbiotic process with strains. The isolates from the mining area showed higher efficiency than the native strains in the production of SDMM, NN, NDM, N content and accumulation. Mn mining area isolates influenced the Mn content in the aerial part of the plants, decreasing its content according to Mn increments in soil. All rhizobial isolates from the degraded areas of manganese and substrate natives are tolerant to Mn and capable of inducing the formation of root nodules and fix nitrogen in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) and sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.). The native rhizobia of the substrate associated to the cowpea present intrinsic tolerance to Mn and are highly competitive. Isolates from the Mn mining degraded area, in symbiosis with sabiá, are able to increase this plants tolerance to soil Mn excess, through effective symbiosis and efficient N₂ fixation, promoting plant growth.

Keywords: Biological fixation of nitrogen. contamination. heavy metal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Descrição da área de estudo e pontos de coleta.....	26
Figura 2 - Fluxograma de atividades desenvolvidas durante o período de realização dos experimentos.....	29
Figura 3 - Altura das plantas (A) e Matéria seca da raiz (B) de feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.) submetidas a doses de manganês.....	41
Figura 4 - Matéria seca dos nódulos de feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.) submetidas a doses de manganês e tratamentos de inoculações com rizóbios.....	42
Figura 5 - Teor de nitrogênio na parte aérea de feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.) submetidas a doses de manganês e tratamentos de inoculações com rizóbios.....	44
Figura 6 -Teor de manganês na parte aérea de feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.) submetidas a doses de manganês.....	46
Figura 7 - Sintomas de toxidez em plantas de feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.) submetidas a doses de manganês.....	47
Figura 8 - Altura de planta de sabiá (<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.) submetidas a doses de manganês.....	48
Figura 9 - Matéria seca da raiz (MSR) de plantas de sabiá (<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.) submetidas a doses de manganês.....	49
Figura 10 - Matéria seca da parte aérea (MSPA) de plantas de sabiá (<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.) submetidas a doses de manganês e tratamentos de inoculação com rizóbios.....	50
Figura 11 - Teor de Manganês na parte aérea de plantas de sabiá (<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.) submetidas a doses de manganês e tratamentos de inoculação com rizóbios.....	55
Figura 12 - Sintomas de toxidez de Mn em plantas de sabiá (<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.) inoculadas por rizóbios nativos do solo (Controle) (A) e rizóbios isolados de área de mineração de Mn (B) submetidas a doses de manganês.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização química e física dos solos de área de mata (área 1), área degradada (área 2) e rejeito (área 3).....	27
Tabela 2 -Caracterização química, física e biológica do solo.....	31
Tabela 3 - Caracterização fenotípica da nodulação de Feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.) e Sabiá (<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.) por rizóbios isolados da área de mineração de manganês.....	34
Tabela 4 - Estirpes de rizóbios da área de mineração de manganês autenticadas em associação com feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) e sabiá (<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.).....	36
Tabela 5 - Caracterização cultural de estirpes de rizóbios da área de mineração de Mn ²⁺ em associação com feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) e sabiá (<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.).....	38
Tabela 6 - Resumo da análise de variância para altura de planta (ALTP), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), para os fatores de tratamento e suas interações em feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.).....	40
Tabela 7 - Resumo da análise de variância para teor de nitrogênio (N), acúmulo de nitrogênio (ANPA) e teor de manganês (Mn) na parte aérea para os fatores de tratamento e suas interações em feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.).....	43
Tabela 8 - Acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) das plantas de feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.) submetidas a doses de Mn e quatro tratamentos de inoculação com rizóbio.....	45
Tabela 9 - Resumo da análise de variância para altura de planta (ALTP), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos (MSN), para os fatores de tratamento e suas interações em sabiá (<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.).....	47
Tabela 10 -Altura das plantas de sabiá (<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth) submetidas a tratamentos de inoculação com rizóbios.....	49
Tabela 11 - Número de nódulos (NN) das plantas de sabiá (<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.) submetidas a doses de Mn e quatro tratamentos de inoculação com rizóbio.....	52
Tabela 12 - Matéria seca dos nódulos (MSN) das plantas de sabiá (<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.) submetidas a doses de Mn e quatro tratamentos de inoculação com	

rizóbio.....	52
Tabela 13 - Resumo da análise de variância para teor de nitrogênio (N), acúmulo de nitrogênio (ANPA) e teor de manganês (Mn) na parte aérea para os fatores de tratamento e suas interações em sabiá (<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.).....	54
Tabela 14 - Teores de Nitrogênio (N) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) em plantas de sabiá (<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth) submetidas a tratamentos de inoculação com rizóbios.....	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Mineração de manganês	16
2.2 Áreas degradadas por mineração	18
2.3 Importâncias do uso de leguminosas na revegetação de áreas degradadas por mineração	20
2.3.1 Importância e Caracterização do Sabiá (<i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.) para revegetação de áreas degradadas	21
2.3.2 Importância e Caracterização de Feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.) para revegetação de áreas degradadas.	23
2.4 Efeito do manganês (Mn²⁺) na simbiose leguminosa-rizóbio	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Localização e descrição das áreas	26
3.2 Amostragem dos solos nas áreas I; II; III	27
3.3 Instalação e Condução dos Experimentos	28
3.4 Experimento I: Isolamento, Autenticação e Caracterização cultural de estirpes nativas de BFNN de área de mineração de manganês.	29
3.5 Experimento II: Efeito do Manganês sobre o Crescimento e Nodulação de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp e <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Isolamento, autenticação e caracterização cultural de estirpes nativas de rizóbios de área de mineração de manganês	36
4.2 Efeito do Manganês sobre o Crescimento e Nodulação de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp e <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.	40
4.2.1 <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	40
4.2.1.1 Altura da planta (ALTP) e Matéria seca da raiz (MSR)	40
4.2.1.2 Matéria seca dos nódulos (MSN)	41
4.2.1.3 Teor de nitrogênio e manganês na parte aérea	43
4.2.2 <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> Benth.	47
4.2.2.1 Altura da planta (ALTP) e Matéria seca da raiz (MSR)	48
4.2.2.2 Massa da Matéria seca da parte aérea (MSPA)	50
4.2.2.3 Número (NN) e Matéria seca dos nódulos (MSN)	52
4.2.2.4 Teor de nitrogênio e manganês na parte aérea	54
5 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A contaminação do solo por metais pesados tem se tornado um grave problema no mundo todo, gerando riscos à saúde humana pela entrada desses elementos tóxicos na cadeia alimentar, bem como um grande risco para a segurança ambiental. As atividades de extração mineral, ou mineração, constituem-se numa das principais fontes de liberação de metais pesados no ambiente. Áreas degradadas por esta atividade, comparada a outras como desmatamento e pecuária, são consideradas relativamente pequenas, mas apresentam um grande potencial degradante ao ambiente, principalmente pela negligência com que são tratados os rejeitos gerados no processo de lavra, as reais fontes de contaminantes, como os metais pesados que são liberados no ambiente e que podem causar graves danos ecológicos, afetando a qualidade da água e dos organismos, bem como do solo e seus componentes microbianos, faunísticos e as próprias comunidades vegetais.

Deve-se buscar a recuperação destas áreas de forma que se alcance uma melhoria das condições do substrato, o que certamente facilitará os processos de sucessão. De acordo com Martins. (2014) áreas degradadas por mineração, onde geralmente toda a camada superficial do solo é retirada deixando-se somente a rocha exposta, a tendência natural é que ocorra lentamente um processo de sucessão primária, onde inicialmente haverá o desenvolvimento de espécies pioneiras (líquenes, musgos e plantas herbáceas) até que se possa chegar a um ecossistema em clímax. Dessa maneira, devem ser adotadas técnicas para a recuperação destas áreas que busquem reduzir esse longo processo, o qual pode levar até centenas de anos, e transformá-lo em um processo mais rápido, como o de sucessão secundária, que pode se desenvolver em poucas décadas. Baseados nesse princípio, Ferreira *et al.* (2012) relatam que a revegetação tem sido uma das principais práticas utilizadas na reabilitação dos solos visando a proteção contra os processos erosivos e evitando a poluição de cursos d'água, recompondo-se assim os componentes da biota edáfica do local.

A seleção de espécies para programas de revegetação de áreas degradadas por mineração é de grande importância para que se busque uma cobertura vegetal no ambiente autossustentável com espécies que sejam tolerantes a metais pesados (FERREIRA *et al.*, 2012; WONG. 2003). As espécies leguminosas oferecem inúmeras vantagens para a revegetação, sendo capazes de se associar simbioticamente a bactérias fixadoras de nitrogênio (N₂) atmosférico, incorporando material orgânico no ambiente com baixa relação C/N, uma grande via de incorporação de N ao solo. Assim, muitos estudos têm relatado o comportamento de leguminosas em solos contaminados por metais pesados (MENDES FILHO *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2016; TRANNIN *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2012), embora a relação entre estas plantas e seus

microsimbiontes (rizóbios) em ambientes contaminados deva ser ainda mais avaliada e explorada visando seu grande potencial para programas de reabilitação de áreas degradadas.

Nesta pesquisa, consideraram-se as hipóteses de que: a) Bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas (BFNN) nativas de uma área degradada por processo de mineração de manganês (Mn^{+2}) são capazes de crescer bem em solos mesmo sob elevadas concentrações de Mn^{+2} e b) que estas contribuirão, uma vez associadas às plantas, para uma melhor utilização do nitrogênio atmosférico, induzindo conseqüentemente um maior desenvolvimento das espécies leguminosas nesses solos. Assim delineada, a pesquisa teve como objetivo avaliar a tolerância e a efetividade de estirpes nativas de solos de áreas de mineração de Mn^{+2} em associação com espécies leguminosas cultivadas sob crescentes concentrações de Mn^{2+} .

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mineração de manganês

O manganês (Mn) é requerido em baixas concentrações pelas plantas, por isso, é considerado um micronutriente essencial importante para os requisitos celulares das plantas. É absorvido pelas plantas na forma iônica Mn^{2+} e desempenha papel importante nas reações das enzimas málico desidrogenase, oxalosuccinato descarboxilase, superóxido dismutase, sendo também necessário para a quebra das moléculas de água no fotossistema II.

Os teores de Mn em tecidos de plantas variam desde 5 a 1500 mg kg^{-1} de peso seco (MISRA e MANI 1991; NAGAJYOTI *et al.*, 2010). Além de ser utilizado na agricultura como fertilizante o Mn é explorado na indústria de mineração, sua utilização é fundamental no processo de produção do aço, sendo o quarto metal mais utilizado no mundo, após o Ferro, o Alumínio e o Cobre (DAS *et al.*, 2012). Assim, cerca de 90% de do Mn consumido anualmente vai para siderúrgicas como elemento de liga. O restante é utilizado na fabricação de pilhas e em outro mercado pouco conhecido, o de vitaminas, pois o Mn é essencial para todas as formas de vida, inclusive o ser humano, que precisa consumir de 1 mg a 5 mg por dia deste mineral (IBRAM, 2012; SANTANA, 2009).

No ano de 2014 a reserva mundial de Mn foi estimada em aproximadamente 625 Mt do minério, distribuída nos seguintes países: África do Sul, com produção de 150 Mt (23,7%); Ucrânia 140 Mt (22,1%); Brasil 116 Mt (18,3%); Austrália 97 Mt (15,3%); Índia 52 Mt (8,2%); China 44 Mt (6,95%) e Gabão com 24 Mt (3,8%). Esses países são responsáveis por deter 98,3% do total de reservas do mundo deste mineral (DNPM, 2015). O maior produtor continua sendo a África do Sul com 26,4 % da produção mundial, seguida pela China, que detém 18,0%, e, em terceiro lugar, a Austrália com 17,4%. Com a reavaliação de reservas brasileiras, principalmente aquelas que se localizam no estado do Pará, houve aumento nos valores em relação há anos anteriores, ocupando o Brasil a quinta posição, com 6,2 % da produção total (USGS, 2015).

A atividade de mineração produz consideráveis quantidades de rejeitos que podem causar grandes impactos ambientais nos ecossistemas aquáticos e terrestres. Em sua grande maioria, as atividades de mineração manuseiam tais rejeitos sem uma gestão adequada (GHOSH *et al.*, 2015; RASHED, 2010). Rashed (2010) relata que os solos que se encontram com elevadas concentrações de metais pesados, como manganês, a toxicidade causada pelo metal prejudica a diversidade de organismos do solo, assim como a decomposição da matéria orgânica e a mineralização de nitrogênio. Com isto a contaminação dos solos por esses metais tornou-se um problema ambiental para o mundo, se apresentando como uma ameaça significativa tanto

para a saúde humana, quanto para a segurança ecológica (WEI *et al.*, 2014).

A biodisponibilidade de metais no solo depende de algumas propriedades como o pH, o potencial redox e o teor de matéria orgânica (ZHANG *et al.*, 2014). Geralmente, em estudos sobre concentrações de metais pesados no solo, não ocorrem relatos sobre o elemento manganês, uma vez que não é considerado poluente (KABATA-PENDIAS, 2011; MICÓ *et al.*, 2006). Segundo Alloway (2012). No solo a concentração total desse elemento chega a 850 mg kg⁻¹. Já em plantas cultivadas em solos não poluídos têm sido encontrados teores de até 225 mg kg⁻¹ de Mn na parte aérea (ARORA *et al.*, 2008).

A remediação de metais pesados em áreas de mineração é uma pratica necessária para a proteção do ambiente de seus efeitos tóxicos e conservação dos ecossistemas para as gerações futuras (GLICK, 2010). Lei *et al.* (2016) relatam que na busca pela recuperação de áreas degradadas por mineração deve-se buscar não somente a minimização da poluição ambiental e revegetação da área, mas deve-se buscar a reconstrução do ecossistema e desenho da paisagem local.

Na tentativa de se promover a revegetação de áreas de mineração, hoje tem se buscado várias técnicas, sendo uma delas a fitorremediação, que é basicamente a utilização da associação entre plantas e micro-organismos do solo para reduzir os efeitos tóxicos de contaminantes no ambiente como metais pesados ou poluentes orgânicos (GREIPSSON, 2011; ALI; KHAN; SAJAD, 2013). É considerada uma técnica bastante eficaz e de baixo custo na remediação de solos poluídos (BAKER *et al.*, 2010).

Algumas plantas que são mais tolerantes ao excesso de manganês, apresentam a habilidade de acumular Mn²⁺ nas raízes e/ou precipitar MnO₂ dentro da epiderme. Geralmente para que as plantas sejam afetadas por esse elemento é necessário em torno de 500 mg kg⁻¹ de Mn²⁺ (KABATA-PENDIAS, 2011). Apesar de que algumas espécies vegetais resistentes acumulem acima de 1000 mg kg⁻¹, algumas hiperacumuladoras (como *Phytoacca americana* L.) chegam a acumular até 10.000 mg kg⁻¹ (PENG *et al.*, 2008).

Uma pratica utilizada atualmente no Brasil com sucesso para a rápida revegetação de áreas degradadas por mineração é o plantio de leguminosas inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares (BORGES *et al.*, 2016; GARCIA *et al.*, 2016). Essas interações biológicas contribuem para que as espécies vegetais utilizadas se desenvolvam em ambientes com elevadas concentrações de metais pesados no solo, como é o caso do manganês (BORGES *et al.*, 2016).

2.2 Áreas degradadas por mineração

O solo é um recurso vital no ecossistema, garantindo algumas funções ecológicas como produção vegetal, estabilização e armazenamento da matéria orgânica sendo, entretanto, muito sensível às ações antrópicas e de difícil recuperação quando degradado (DE JONG *et al.*, 2011). Segundo FAO (1980) área degradada é a redução ou perda total da capacidade da área para o fornecimento de serviços ambientais e produtos. Para a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2008) área degradada é aquela que sofreu, em algum grau, perturbações em sua integridade, sejam elas de natureza física, química ou biológica. O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA, 1990) considera que a degradação de uma área ocorre quando a vegetação nativa e a fauna forem destruídas, removidas ou expulsas; a camada fértil do solo for perdida, removida ou enterrada, e a qualidade e o regime de vazão do sistema hídrico forem alterados. Na degradação ambiental, além das alterações nas características físicas, químicas e biológicas do ambiente tem-se também inviabilizado o desenvolvimento sócio-econômico.

A mineração de metais é uma atividade de grande importância econômica mundial, gerando empregos e fornecendo matéria prima para desenvolvimento de produtos. O fato é que estas minas são exploradas por um tempo limitado, quando são então abandonadas e deixadas como depósitos de resíduos (VENKATESWARLU *et al.*, 2016). Segundo Kossoff *et al.*, (2016) a maioria das minas que se encontravam em atividade por volta do final do século XVI são as fontes abertas de poluentes hoje. Os resíduos deixados nessas áreas de mineração apresentam elevadas concentrações de metais pesados com potencial de migrar para outros ambientes e causar graves contaminações em áreas agrícolas adjacentes e nos organismos aquáticos, como também desastres geo-ambientais (BEANE *et al.* 2016; MA *et al.* 2016).

As atividades de mineração causam graves prejuízos sobre o ecossistema, afetando a qualidade do ar, da água, promovem o declínio na qualidade dos solos pela perda da fertilidade, acidez, diminuição do estoque de matéria orgânica (YADA *et al.*, 2015), contaminação por metais pesados, aumento da densidade e conseqüentemente a compactação e a perda de biodiversidade (LEI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2012).

Segundo Copeland (2007) os efeitos diretos da atividade de mineração compreendem a mudança da paisagem, perda de áreas agricultáveis, florestais e de pastagens cultivadas, conduzindo muitas vezes a uma perda total da capacidade produtiva da área. Os efeitos indiretos estão relacionados a erosão do solo, poluição do ar e da água, toxidade e perda de biodiversidade e da riqueza econômica (WONG 2003). Constantemente tem se buscado métodos para que se possa obter a restauração ecológica de áreas que se encontram degradada, tanto por atividades de mineração quanto por outras práticas.

No Brasil a lei prevê que as empresas responsáveis por atividades de mineração definam, a partir de estudos de impactos ambientais e de relatórios específicos, as práticas que deverão ser adotadas para a recuperação das áreas sob exploração, buscando o retorno do equilíbrio do ecossistema (DECRETO LEI 97.632/89). As práticas adotadas para a recuperação das áreas devem estar determinadas no Plano de Recuperação de Áreas Degradadas (PRAD), documento obrigatório exigido a todas as empresas de mineração pelos órgãos ambientais (ALMEIDA; SÁNCHEZ, 2005).

Atualmente, uma das técnicas mais promissoras para a recuperação de áreas poluídas por metais pesados é a fitorremediação, em que as plantas utilizadas são também capazes de formar simbioses com os micro-organismos do solo, rizóbios e fungos micorrizicos, os quais contribuem para a nutrição das plantas com os elementos mais limitantes nessas condições adversas como o nitrogênio (N) e o fósforo (P). Além desse benefício, as plantas em associação com os micro-organismos são eficazes em mitigar o estresse causado pelos metais pesados (MOREIRA *et al.*, 2015). Em estudo realizado por Garcia *et al* (2016) utilizando a espécie *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. inoculada com fungos micorrizicos arbusculares (FMA), observou-se que os mesmos favoreceram o desenvolvimento de mudas da espécie em substrato de mineração de manganês, atenuando os efeitos fitotóxicos deste metal.

Matias *et al* (2009), avaliando a dupla inoculação de rizóbio e fungos micorrizicos associados as espécies *Centrosema coriaceum* e *Tibouchina multiflora* em áreas de mineração de ferro no estado de Minas gerais, observaram um aumento de nitrogênio e fósforo na biomassa vegetal das plantas, melhorando a biodisponibilidade de nutrientes no solo, um aumento no índice de sobrevivência das espécies, bem como um incremento da matéria orgânica do solo e retenção de água.

A fitorremediação, diferente dos métodos de remediação tradicionais, se apresenta como uma técnica mais sustentável e economicamente mais viável para a remediação de metais pesados no solo e em águas poluídas, visto que é uma técnica favorável ao ambiente e de boa aceitação ao público (ALI *et al.*, 2013). Em estudo realizado por Padmavathiamma e Li (2007) os mesmos demonstram que a fitorremediação em termos econômicos tem um custo em cerca de US \$ 5 a 40 por tonelada de substrato poluído, apresentando uma diferença bem significativa em relação aos outros métodos de remediação convencionais de engenharia utilizados, como vitrificação (US \$ 75 a 425 por tonelada), tratamentos químicos (US \$ 100 a 500 por tonelada), ou Eletrocinética (US \$ 20 a 200 por tonelada).

Para a revegetação de áreas degradadas por mineração a escolha das plantas iniciais é um fator considerado crítico para se alcançar o sucesso. As plantas utilizadas devem ter a

capacidade de tolerar o ambiente de estresse com metais pesados e sobreviver às duras condições das áreas degradadas por mineração. Outro fator de grande importância é que as plantas utilizadas não devem ser consideradas exóticas ou invasivas. Para essas práticas as plantas nativas representam uma boa opção, visto que as mesmas podem ter adquirido capacidade de tolerar as condições de estresse das áreas de mineração e são adaptadas ao clima local (YOON *et al.* 2006).

Diante disto é de grande importância a pesquisa com plantas que sejam adequadas para a fitorremediação, obtendo-se informações necessárias sobre a vegetação que cresce nas áreas degradadas antes que as atividades de correção sejam iniciadas (LIU *et al.*, 2014).

2.3 Importâncias do uso de leguminosas na revegetação de áreas degradadas por mineração

As leguminosas compõem a terceira maior família em número de plantas, a família Leguminosae, que tem uma distribuição cosmopolita que inclui 727 gêneros e 19.327 espécies (QUEIROZ, 2009). Na revegetação de áreas degradadas por mineração tem se demonstrado o grande potencial no uso de leguminosas arbóreas inoculadas com micro-organismos (GARCIA *et al.*, 2016; MENDES FILHO *et al.*, 2010).

Um dos principais agravamentos nas áreas degradadas por mineração é a perda da camada fértil do solo. Pois ocorre um desbalanceamento nos ciclos biogeoquímicos, principalmente nos de carbono (C) e nitrogênio (N), elementos esses essenciais ao sistema solo-planta-atmosfera.

Desta forma as leguminosas se apresentam como um grande potencial na revegetação de áreas degradadas tanto por mineração como por outras atividades, pelo fato de que estas espécies tem a capacidade de formar associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio, denominadas rizóbios. Essas bactérias fixam o N₂ atmosférico e disponibilizam para as plantas, favorecendo o incremento de biomassa vegetal rica em nitrogênio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; CHAER *et al.*, 2011).

Chaer *et al.* (2011) relata um caso de sucesso na revegetação de áreas de mineração de hematita com a utilização de espécies leguminosas inoculadas com rizóbios no estado de Minas Gerais, os mesmos relatam tem se conseguido uma revegetação de aproximadamente 25 ha por ano. Segundo Souza *et al.* (2007) a recuperação de solos e reflorestamento com a utilização de espécies leguminosas deve ser estimulado, como também, precedido pela pesquisa para se avaliar o potencial de nodulação das espécies locais, assim abrindo caminhos para a prospecção de micro-organismos do solo com potencial para uso como inoculantes.

Estudos demonstram que o uso combinado entre espécies de leguminosas arbóreas, bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares simultaneamente são importantes em programas de revegetação de áreas degradadas, pois restabelece o processo de ciclagem de nutrientes e aumentando o estoque de carbono do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Algumas espécies de leguminosas são importantes na revegetação de áreas degradadas por mineração de metais, podendo crescer sobre solos com elevadas concentrações de metais pesados (PRASAD; FREITAS, 2003).

As Leguminosas são classificadas como não-hiperacumuladoras, onde uma quantidade pequena de metais são translocados para a parte aérea da planta, a grande parte dos metais são quelatizados por diferentes moléculas como: glutathione, fitoquelatinas, metalotioneínas, ácidos orgânicos, histidina, nicotinamida, etc (CALLAHAN *et al.*, 2006), e armazenados nos vacúolos celulares ou no apoplasto, longe do citoplasma onde a maioria das reações fisiológicas ocorrem (PILON-SMITS, 2005). Plantas hiperacumuladoras como *Phytoacca americana* L. chegam a acumular até 10.000 mg kg⁻¹ (PENG *et al.*, 2008).

Recentemente o interesse por pesquisas utilizando a interação entre leguminosas-rizóbios para a biorremediação de áreas contaminadas por metais pesados tem aumentado significativamente (CHAER *et al.*, 2011; GLICK, 2010; WEI *et al.*, 2014). Segundo Pajuelo *et al.* (2008) a biorremediação oferece várias vantagens, sendo estas: (I) a disponibilidade dos metais é afetada diretamente pelos micro-organismos, neste caso os rizóbios, que fazem uso de algumas estratégias para diminuir o efeito tóxico desses elementos; (II) o uso de leguminosas, que são capazes de se adaptar a diferentes ambientes; (III) a interação simbiótica entre leguminosas-rizóbios com sistema eficiente na fixação de nitrogênio acarreta na melhoria do sistema solo, por meio da deposição de biomassa vegetal que servira como fonte de carbono para as comunidades microbianas e posteriormente pela mineralização deste material, a liberação de P, S e N.

A combinação de duas abordagens, fitorremediação e bioaumentação, deram origem ao termo rizerremediação, onde os exsudados liberados pelas plantas podem ajudar a estimular a sobrevivência e a ação de bactérias resultando na degradação mais eficiente de poluentes e remediação de áreas com metais pesados (GANESAN, 2012; ZHUANG *et al.*, 2007).

2.3.1 Importância e Caracterização do Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) para revegetação de áreas degradadas

Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth) é uma espécie nativa da região nordeste do Brasil pertencente à família Mimosaceae. Nos estados do Ceará e Pernambuco é conhecida como sabiá, no Piauí como unha-de-gato e em Minas Gerais como angiquinho-sabiá, sabiá e

sansão-do-campo. Pode assumir em sua forma biológica de forma arbustiva a árvore perenifolia podendo chegar a atingir até aproximadamente 10 m de comprimento e 30 cm de DAP (diâmetro a altura do peito) (CARVALHO, 2007). É uma leguminosa pioneira ocorrendo tanto em formações primárias como em secundárias, sendo comum ou mais frequente nas áreas de capoeiras, apresenta rápido crescimento e tem boa adaptabilidade a ambientes adversos como o semiárido (MAIA, 2012).

A espécie vegetal Sabiá se desenvolve bem em solos profundos, principalmente sobre solos de textura arenosa, sendo também capaz de se desenvolver em solos de baixa fertilidade e com baixa umidade, estas características fazem com que esta espécie seja capaz de se crescer inclusive em áreas degradadas com perda da camada fértil do solo como em áreas sob mineração (CARVALHO, 2007; MARTINS *et al.*, 2015a).

O Sabiá é considerado entre as espécies nativas do Nordeste a mais recomendada e utilizada para programas de recuperação de áreas degradadas, por apresentar altas taxas de crescimento e de sobrevivência (LIMA *et al.*, 2003) por ser uma planta considerada pioneira tem alta tolerância a incidência direta de luz.

Plantas com estas características são de grande importância em programas de revegetação de áreas degradadas, auxiliando na sucessão ecológica, sendo responsável pelo processo de sucessão primária melhorando o ambiente local para o posterior desenvolvimento de espécies secundárias mais exigentes (MARTINS, 2014b).

O sabiá também apresenta a vantagem de ser uma leguminosa nodulífera, sendo capaz de formar simbiose com bactérias diazotróficas fixadoras de N₂. Esta característica é vantajosa em processos de revegetação de áreas degradadas, assim há uma diminuição de custos com adubação nitrogenada que é considerado um dos mais caros insumos agrícolas e também é importante no desenvolvimento desta espécie, assim o seu estabelecimento e desenvolvimento em áreas degradadas trazem benefícios como: aporte de material orgânico que através do processo de decomposição pode ajudar na agregação de partículas do solo, através do processo de mineralização fornece nutrientes para o desenvolvimento vegetal de plantas que venham a crescer no substrato e também melhorando as condições para o desenvolvimento dos microorganismos do solo e dos componentes faunísticos (LONGO *et al.*, 2011a). Sabiá é também uma planta micotrófica, podendo se associar a fungos micorrizicos arbusculares, onde através desta associação há uma maior eficiência na absorção de água e nutrientes, principalmente o fósforo, importante para o desenvolvimento vegetal, sendo também de grande importância na fixação de N₂ pela simbiose leguminosa-rizóbios (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; GARCIA *et al.*, 2016).

2.3.2 Importância e Caracterização de Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) para revegetação de áreas degradadas.

O feijão caupi ou feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) tem seu centro de origem na África e foi introduzido no Brasil através dos colonizadores portugueses no estado da Bahia (FREIRE FILHO, 1988). No Brasil esta espécie é conhecida por vários nomes populares, dependendo da região, como: feijão-macassa e feijão-de-corda, na região Nordeste; feijão-de-praia, feijão-da-colônia e feijão-de-estrada, na região Norte; feijão-miúdo, na região Sul (FREIRE FILHO *et al.*, 1983). Sua classificação mais aceita hoje em dia é que o feijão-de-corda é pertencente a ordem Fabales, família Fabaceae (Leguminosae) e espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (PADULOSI; NG, 1997).

O feijão-caupi é uma planta herbácea que exige temperaturas mínimas em torno de 18°C para que se desenvolva e complete todo seu ciclo de vida, mas sua temperatura de crescimento ideal é em torno de 28°C, sendo uma das principais culturas cultivadas na região nordeste, fornecendo alimentação proteica tanto para o homem, quanto para a pecuária na forma de forragem (CRAUFURD *et al.*, 1997). Apresenta hábito de crescimento ereto, semi-ereto e trepadeira (TIMKO; SINGH, 2008).

O feijão-caupi comparado a outras leguminosas apresenta alta tolerância a ambientes semiáridos, onde há predomínio de altas temperaturas e estresse hídrico. Devido a sua capacidade de formar simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio é capaz de se adaptar a ambientes de baixa fertilidade, esta interação faz com que esta planta satisfaça suas necessidades nutricionais deste elemento, diminuindo assim os custos de produção e aumento de produtividade (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Esta espécie também tem capacidade de tolerar uma ampla faixa de pH do solo, porém em condições de elevada acidez a interação desta leguminosa com os fixadores de nitrogênio pode ser comprometida, como relatado por Correa e Barneix (1997), as estirpes rizobianas podem diminuir a sua taxa de crescimento e em altas concentrações de $[H^+]$ e $[Al^{3+}]$ leva a uma queda significativa na densidade populacional e sobrevivência desses organismos, bem como a concentração de metais pesados no solo, como o manganês (Mn^{2+}) (FARIAS *et al.*, 2016). Porém da mesma forma como esta espécie se adaptou a ambientes ácidos, várias espécies e estirpes de fixadores de N_2 desenvolveram a capacidade de suportar esses ambientes (SOARES *et al.*, 2014).

Esta espécie também é muito utilizada em sistemas de rotação de culturas, melhorando assim a fertilidade do solo para o melhor desenvolvimento das culturas posteriores (TIMKO; SINGH, 2008), além de ser também utilizada para adubação verde, e como uma cultura

protetora do solo. Estas características são de grande importância para recuperação de áreas degradadas, principalmente por atividades mineradoras, onde há um grande potencial de erosão do solo.

Culturas com estas características são capazes de crescer nesses ambientes e rapidamente cobrir a superfície do solo, diminuindo os processos erosivos e também melhorando o substrato através da deposição de material orgânico, assim as melhorias proporcionadas por esta espécie ao substrato abrem caminhos para o desenvolvimento de novas espécies, acelerando assim o processo de sucessão.

2.4 Efeito do manganês (Mn^{2+}) na simbiose leguminosa-rizóbio

Os solos do mundo todo apresentam concentrações totais de manganês (Mn) que variam entre 411 a 550 mg kg⁻¹. Em solos brasileiros pode se encontrar de 0,1 a 100 mg kg⁻¹ de Mn^{2+} disponível na solução do solo (FAQUIN, 1997). A ocorrência de altas concentrações deste elemento é mais frequente em solos que se originaram de rochas máficas, solos ricos em Fe, matéria orgânica, e em solos de regiões áridas e semiáridas (KABATA-PENDIAS, 2011).

Segundo Foy (1983), nas plantas, altos níveis de Mn podem afetar a atividade de algumas enzimas e produção de alguns hormônios (Auxina e Giberelina), bem como na proporção de aminoácidos e no desenvolvimento radicular. As leguminosas parecem ser mais sensíveis a níveis elevados de Mn, uma vez que o excesso deste metal afeta o número de nódulos de rizóbios e conseqüentemente a eficiência da fixação biológica do N₂ (KABATA-PENDIAS, 2011; DOBEREINER, 1966; AMARA *et al.*, 1986).

O Mn^{2+} é um micronutriente importante para o desenvolvimento celular de todos os seres vivos, nas bactérias, apresenta função de defesa contra estresse oxidativo, regulação da virulência bacteriana e um importante cofator de enzimas (CUBILLAS *et al.*, 2014; ROSCH *et al.*, 2009). Hoje sabe-se que um dos meios que espécies de α -proteobactérias, incluindo a família rhizobiaceae apresentam para tolerar altas concentrações de Mn^{2+} é por meio de efluxos do excesso deste metal, por meio da expressão do gene RHE_CH3072, agora denominado EmfA, de *Rhizobium etli* que é capaz de codificar uma proteína facilitadora de difusão de cátions (CUBILLAS *et al.*, 2014).

Alguns efeitos da toxidez de Mn sobre BFNN segundo Hungria; Araújo (1994) são: mutação e efeito sobre a divisão celular das bactérias, assim diminuindo a sua efetividade. Dobereiner (1966) estudando o efeito da toxidez de Mn sobre a nodulação e fixação biológica de N₂ em feijão comum em solos ácidos, observou que a toxidez de Mn^{2+} reduziu altamente a fixação de N₂ por unidade de peso dos nódulos das estirpes estudadas. Os mesmos autores

concluíram que há diferença dos efeitos da toxidez de Mn^{2+} para o crescimento bacteriano e para o processo de fixação de N_2 nos nódulos, esses efeitos são dependentes também da estirpe de BFNN. Em casa de vegetação com a utilização de um solo que apresentava concentração de 1400 mg kg^{-1} de Mn, observou através de 5 estipes que a fixação biológica de N_2 foi praticamente inativada.

Em estudo realizado por Amara *et al* (1986) na tolerância de *Rizobio phaseoli* a acidez, alumínio e manganês, observaram que baixo pH e o estresse relacionados a Al e Mn, não afeta gravemente a sobrevivência de *Rizobio phaseoli*, porque entre as estipes ocorre uma grande variabilidade fornecendo condições para a sobrevivência adequada. Os autores também sugeriram que as falhas de nodulação em *Phaseolus vulgaris* L. nos solos estudados em condições de estresse (acidez, Al e Mn) podem ter ocorrido mais por condições de estresse iniciais a nodulação, onde a simbiose foi afetada principalmente pelo estresse causado a planta hospedeira e não ao microssimbionte.

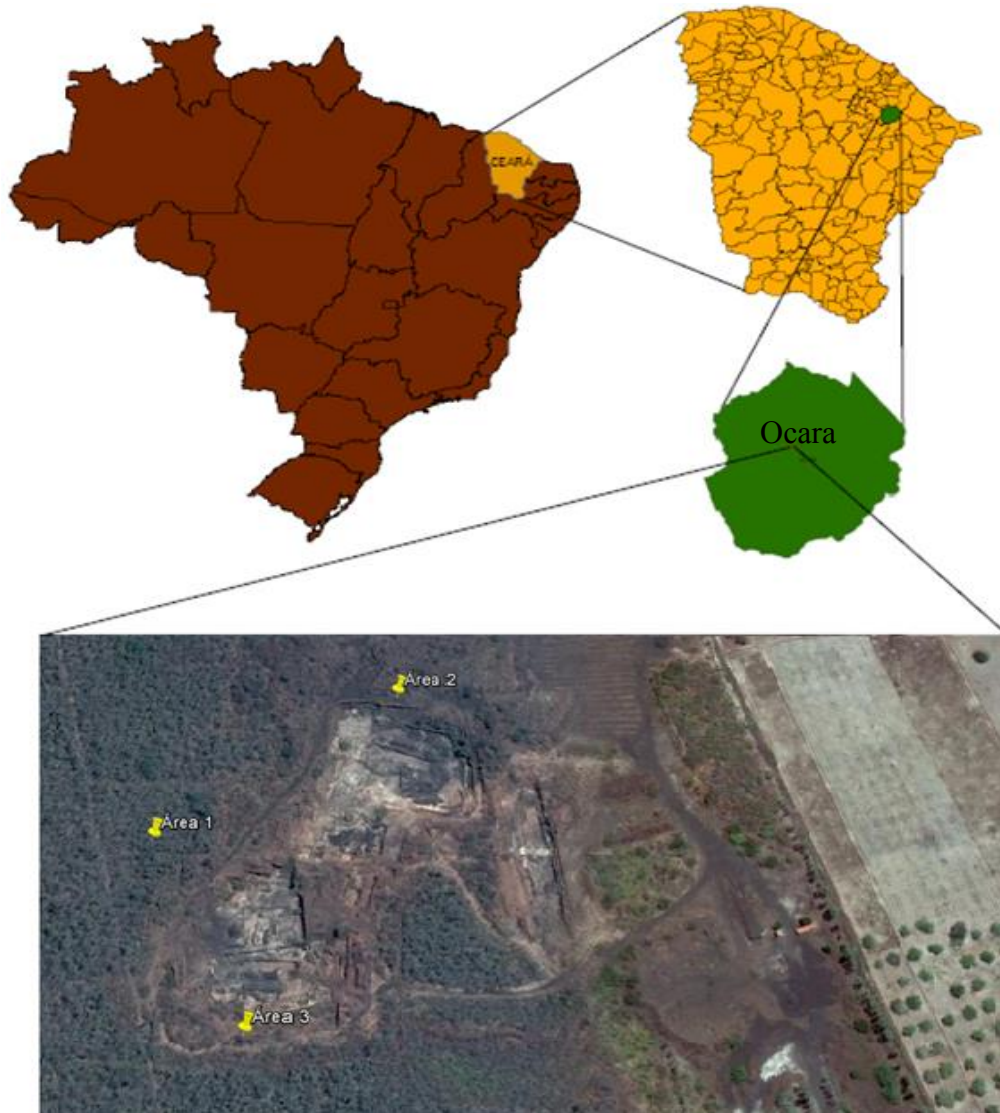
Segundo Franco; Dobereiner (1971) diante do efeito tóxico causado pelo Mn^{2+} , tanto ao macrossimbionte quanto ao microssimbionte, a formação de nódulos é um indicativo de que os mecanismos iniciais a nodulação não foram afetados completamente e pode ser indicada como tolerância da estirpe de BFNN a toxidez de Mn^{2+} . No mesmo experimento os autores demonstraram que valores entre 400 e 600 mg kg^{-1} de Mn^{2+} nas plantas eram suficientes para afetar a simbiose, mas concentrações maiores seriam necessárias para afetar o desenvolvimento vegetal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Localização e descrição das áreas

As amostras de solo foram coletadas em uma área de mineração de manganês, situada no município de Ocara – CE, localizando-se a 101 km de Fortaleza. Foram coletadas amostras de solo de três áreas distintas (Figura 1). Área 1 (Lat.:4°30'17.82''S; Long.: 38°31'22.89''O) considerada uma área de mata nativa preservada e adjacente à área de mineração; Área 2 (Lat.:4°30'14.05''S; Long.:38°31'17.65''O) área degradada pelo processo de extração mineral e Área 3 (Lat.:4°30'22.36''S; Long.:38°31'20.50''O) a amostra foi coletada diretamente do rejeito gerado pelo processo de extração mineral.

Figura 1- Área de estudo e pontos de coleta.



Fonte: Google Earth. (2017)

3.2 Amostragem dos solos nas áreas I; II; III.

Após a escolha e georeferenciamento dos pontos foram coletadas amostras de aproximadamente 30 kg de solo, a uma camada de 0 a 20 cm. Após a coleta o solo foi passado em peneira de 4 mm, sendo então acondicionado em sacos plásticos e armazenados em casa de vegetação do Departamento de Ciências do Solo (DCS), da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Amostras de solos de cada área foram destorroadas e peneiradas em peneira de abertura de malha de 2 mm para obtenção da TFSA (Terra Fina Seca ao Ar) e posteriormente utilizadas para realização de análises quanto às suas características químicas e físicas no Laboratório de Manejo do Solo (DCS/UFC) e no Laboratório de Física do Solo (DCS/UFC) de acordo com metodologias propostas por EMBRAPA (2017). O resultado das análises é apresentado na tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização química e física dos solos de área de mata (área 1), área degradada (área 2) e rejeito (área 3).

Propriedade	Mata Nativa	Área Degradada	Rejeito
pH(H ₂ O)	7,03	5,30	5,03
K (mg dm ⁻³)	12,22	7,04	6,06
P total (mg dm ⁻³)	132,57	24,68	5,80
Ca ²⁺ (Cmol _c dm ⁻³)	5,7	2	2,7
Mg ²⁺ (Cmol _c dm ⁻³)	2,08	1,48	1,42
Al ³⁺ (Cmol _c dm ⁻³)	0	0,1	0,1
H+Al (Cmol _c dm ⁻³)	0,9	3,3	2,2
SB (Cmol _c dm ⁻³)	7,8	3,5	4,1
t (Cmol _c dm ⁻³)	7,8	3,6	4,2
T (Cmol _c dm ⁻³)	8,7	6,8	6,3
V (%)	89,7	51,4	65,2
m (%)	0	2,8	2,4
CO (g kg ⁻¹)	39,5	24,6	15,2
N (g kg ⁻¹)	1,25	0,63	0,82
Zn (mg dm ⁻³)	5,23	1,67	1,17
Fe (mg dm ⁻³)	5,15	5,11	6,93
Mn (mg dm ⁻³)	332	421	516
Cu (mg dm ⁻³)	1,82	2,56	1,61
Areia (g kg ⁻¹)	808,2	227,6	669,2
Silte (g kg ⁻¹)	77,7	387,4	173,7
Argila (g kg ⁻¹)	113,9	385	157

Fonte: Autor (2018)

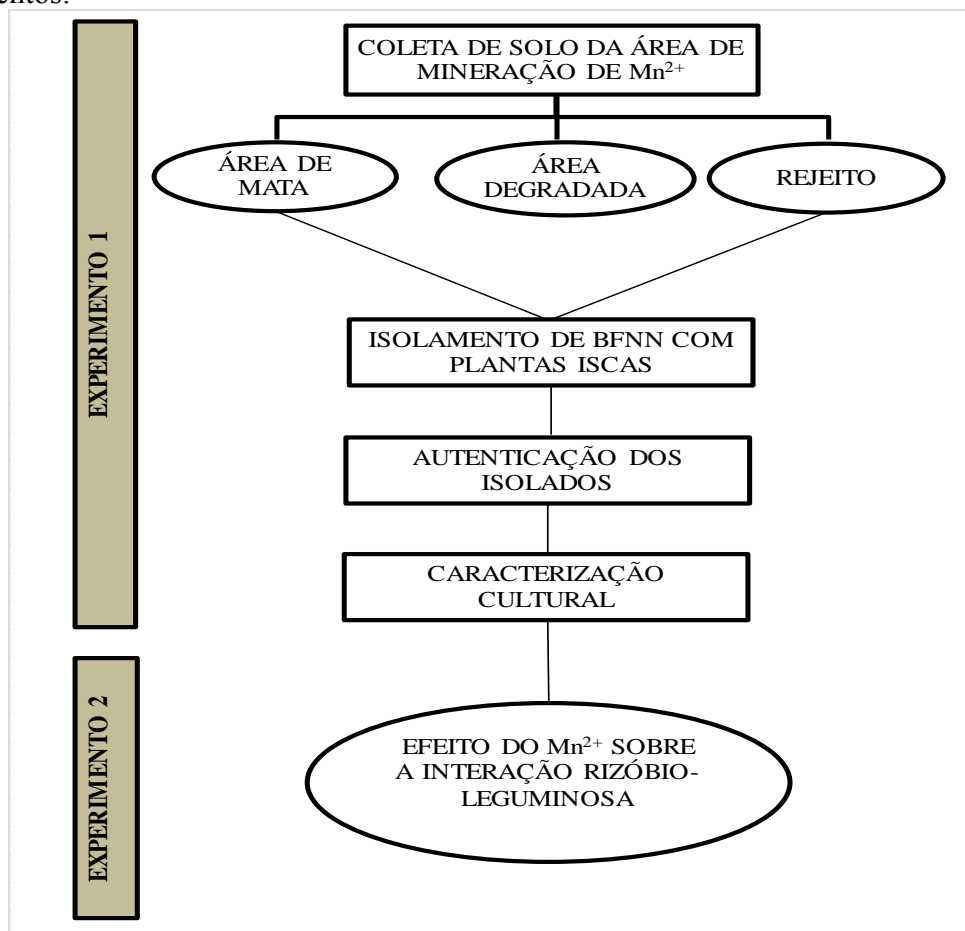
3.3 Instalação e Condução dos Experimentos

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e no Laboratório de Microbiologia do Solo, ambos pertencentes ao Departamento de Ciências do Solo (DCS) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus do Pici, em Fortaleza, Ceará. Segundo a classificação de Köppen o clima da região é caracterizado como sendo do tipo Aw' (Tropical quente) com temperatura e precipitação média anuais de 27 °C e 1600 mm respectivamente, situando-se nas seguintes coordenadas geográficas: latitude 3°45'47'S e 38°31'23'W, com altitude média de 47m.

As espécies *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Feijão-caupi) e *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. (Sabiá) foram utilizadas inicialmente como plantas isca para a captura de bactérias fixadoras de N₂ nodulíferas (BFNN) nativos existentes nos solos coletados da área de mineração de manganês. Em um segundo momento estas espécies foram testadas quanto à eficiência simbiótica com as estirpes de BFNN isoladas e selecionadas, em solo com crescentes doses de manganês, como demonstrado no fluxograma a seguir (Figura 2).

As sementes de feijão-caupi cultivar moita branco foram adquiridas da comunidade fazenda massapé no município de Monsenhor Tabosa - Ceará. As sementes de Sabiá foram adquiridas da empresa Biosementes, situada no Km. 24, Rodovia Ilhéus/Itabúna, BR 415.

Figura 2 - Fluxograma de atividades desenvolvidas durante o período de realização dos experimentos.



Fonte: Autor (2018)

3.4 Experimento I: Isolamento, Autenticação e Caracterização cultural de estirpes nativas de BFNN de área de mineração de manganês.

O isolamento de estirpes de BFNN nativas foi realizado em casa de vegetação, onde foram utilizados vasos plásticos de 500 mL contendo solo das três áreas avaliadas, semeados com quatro sementes, usando-se como planta-isca as espécies *Vigna unguiculata* (L.) Walp (Feijão-caupi) e *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. (Sabiá). As sementes utilizadas no plantio foram desinfetadas pela imersão em uma solução aquosa de etanol (95% durante 50 segundos), seguida por uma imersão em uma solução aquosa de hipoclorito de sódio (5% durante 5 minutos). Após a desinfecção as sementes foram lavadas por seis vezes em água destilada estéril para remoção de resíduos de hipoclorito.

As plantas foram irrigadas diariamente com água destilada e esterilizada por autoclavagem a 121°C e 1 atm de pressão por 2 horas. Semanalmente foi aplicado 150 mL da solução nutritiva de Hoagland; Arnon (1950) com omissão de N, de forma fracionada (três

vezes na semana) para que não ocorra a perda de nutrientes por lixiviação e a planta possa aproveitar os nutrientes disponibilizados na solução do solo.

As plantas de feijão caupi e sabia foram coletadas em 35 a 45 dias respectivamente após semeadura para a retirada de nódulos mais representativos da região radicular. Os nódulos coletados foram desinfetados superficialmente por imersão em solução de etanol a 95% durante dez segundos para quebra da tensão superficial e remoção de bolhas de ar do tecido, seguido de imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 10 % durante dez minutos para desinfecção superficial e, em seguida, lavados em água esterilizada para retirada do excesso de hipoclorito de sódio por 5 vezes (DIONÍSIO *et al.*, 2016).

Os nódulos desinfetados foram abertos sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar com o auxílio de um bisturi cirúrgico e, em seguida, com uma agulha estéril, foi extraída uma porção da massa de bacteroides do cerne nodular que apresentava a coloração avermelhada, caracterizado pela presença de leghemoglobina, cor típica de nódulos eficientes na fixação do N₂ (HUNGRIA; ARAUJO, 1994). O conteúdo da gota foi repicado para uma outra placa de Petri contendo meio de cultura sólido de Vincent (1970) – YMA, com pH ajustado a 6,8, acrescido com o pigmento vermelho congo a 1 % em solução aquosa com a finalidade inicial de evidenciar alguma contaminação.

As placas foram incubadas por um período de 12 dias na ausência de luz em estufa bacteriológica regulada a 28 °C até a formação de colônias visíveis de cor clara devido a não absorção do vermelho congo, indicação de que possivelmente trata-se de uma colônia de rizóbio sem contaminação. Após 12 dias, as colônias de coloração clara foram repicadas para uma nova placa de Petri contendo meio “YMA” de Vincent (1970) sólido, acrescido com o indicador azul de bromotimol e incubadas novamente sob as mesmas condições.

Para a realização da autenticação das estirpes isoladas, as mesmas foram inoculadas novamente em plantas de feijão-caupi e sabiá utilizando-se vasos plásticos de 500 mL contendo 400 g de areia lavada (para remoção dos sais) e autoclavada por 2 horas, a 1 atm de pressão e temperatura de 121 °C. Em cada vaso plástico foram semeadas três sementes de cada espécie leguminosa, desinfetadas superficialmente, com quatro repetições para cada isolado.

As estirpes inoculadas nas sementes foram multiplicadas em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura “YMB” de Vincent (1970), acrescido de azul de bromotimol e mantidos sob agitação até atingirem uma concentração de 10⁹ células por mL de caldo (quantificado em câmara de Neubauer). Posteriormente, foram aplicados assepticamente 3 mL do caldo rizobiano às sementes das espécies leguminosas por ocasião do plantio e, após cinco dias da germinação das sementes, foi realizada uma aplicação de reforço (3 mL) no colo de

cada plântula recém emergida. Após a observação da formação dos nódulos nas raízes das plantas, as estirpes provenientes dessa autenticação foram novamente isoladas e incubadas para posterior utilização nos experimentos seguintes.

Após o período de 12 dias essas colônias foram caracterizadas morfológicamente de acordo com Vincent (1970), quando foram analisadas as seguintes características: reação a técnica de Gram, pH do meio, tempo de crescimento-TC; cor das colônias-CC; transparência-TR; elevação-EL; formação de muco-FM; Elasticidade do muco-EM; forma da colônia-FC.

3.5 Experimento II: Efeito do Manganês sobre o Crescimento e Nodulação de *Vigna unguiculata* (L.) Walp e *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.

O experimento foi realizado em casa de vegetação, pertencente ao Departamento de Ciência do Solo, da Universidade Federal do Ceará (UFC). Foi utilizado como substrato um solo com baixo teor de matéria orgânica e baixa concentração de Mn, para que se pudesse avaliar o efeito de doses crescentes deste metal no desenvolvimento da simbiose entre bactérias fixadoras de N₂ nodulíferas (BFNN)-leguminosas.

O solo utilizado foi coletado a uma profundidade de 0 a 20 cm, na fazenda Lavoura Seca (Lat.: 5°003'734"S; Long.: 38°995'421"O), situada no município de Quixadá, Ceará, pertencente a Universidade Federal do Ceará-UFC. O solo classificado como PLANOSSOLO HÁPLICO Eutrófico Típico foi seco ao ar e destorroado, em seguida foi passado em peneira de abertura de 4 mm de malha e acondicionado em vasos de plástico com capacidade de 1 dm⁻³. Amostras foram preparadas e analisadas quanto as suas características físicas e químicas pelo Laboratório de Física do Solo e Laboratório de Manejo do Solo do Departamento de Ciências do Solo do Centro de Ciências Agrárias da UFC (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização química, física e biológica do solo.

pH	Ca	Mg	K	Na	SB	H + Al	Al	T	V	
(H ₂ O)	-----Cmol _c dm ⁻³ -----								%	
4	0,6	0,4	0,12	0,019	1,1	1,81	0,15	2,9	38,6	
P	CO	M.O.	N	Cu	Fe	Mn	Zn	Areia	Silte	Argila
-----g kg ⁻¹ -----			-----mg dm ⁻³ -----				-----g kg ⁻¹ -----			
0,002	5,54	9,55	0,00029	0,18	5,85	5,3	1,89	916,0	62,6	21,4
NMP						1,950 x 10 ⁵ células g ⁻¹ de solo				
Densidade de esporos FMAs							1883 esp. 100 g ⁻¹			

Fonte: Autor (2018)

Para a quantificação do número de células viáveis de rizóbios no solo foi adotada a

técnica do número mais provável (NMP), com infecção em plantas de Feijão-caupi. Foram utilizados vasos plásticos de 500 ml com substrato de areia lavada e esterilizada em autoclave, as sementes foram desinfetadas e semeadas três sementes por vaso, deixando após a emergência apenas uma planta por vaso.

A partir da amostra de solo obtida, os inóculos foram preparados de acordo com metodologia proposta por Hungria; Araújo (1994), sendo preparadas diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-5} , a partir de dez gramas de solo diluído em solução com NaCl 0,85 % esterilizada. Após o preparo das diluições foram tomadas alíquotas de 3 mL para a inoculação nas plântulas de Feijão-caupi logo após o desbaste. Foi aplicada solução nutritiva de Hoagland; Arnon (1950) com omissão de nitrogênio (N) a cada sete dias.

As plantas de feijão caupi e sabia foram coletadas em 35 e 45 dias respectivamente após o plantio e analisadas quanto à presença (positivo) e ausência (negativo) de nódulos radiculares. Para a estimativa do número de células bacterianas viáveis foi utilizada a tabela de número mais provável (ALEXANDDER, 1965) para a obtenção do fator NMP (Tabela 2).

Também foi realizado análise de densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) através da extração de 100 g de solo via peneiramento úmido, seguindo os procedimentos descritos por Gerdemann e Nicolson (1963) (Tabela 2).

De acordo com os resultados das análises químicas o substrato recebeu as devidas correções de fertilidade por meio da aplicação de 500 kg/há de calcário, mantendo o solo incubado por 30 dias. Após o período de incubamento foi realizada uma adubação básica consistindo da aplicação de 60 mg de P, e 75 mg de K aplicado como KH_2PO_4 , 50 mg de S ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.8 mg de B (H_3BO_3), 1.3 mg de Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 4.0 mg de Fe (Fe-EDTA), 2.0 mg de Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 0.1 mg de Mo (H_2MoO_4) por dm^3 de solo. Após a correção o substrato recebeu doses crescentes de manganês (Mn) disponibilizado na forma de Sulfato de Manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). As doses utilizadas foram: 0; 20; 40; 60 e 80 mg dm^{-3} definidas de acordo com resultado observado em trabalho de Dobereiner (1966), onde a autora demonstrou em seus resultados que 40 mg kg^{-1} de Mn^{2+} afetou consideravelmente a interação entre feijão comum e bactérias fixadoras de N_2 .

Foram estudadas duas espécies leguminosas, sendo uma arbórea, Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.), e uma herbácea, Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.), as duas com capacidade de estabelecer simbiose eficiente com BFNN. Foram semeadas no total de três sementes por vaso, mantendo-se uma planta após o desbaste.

A inoculação das sementes foi feita a partir da produção de um inoculante (MIX) contendo as três melhores estirpes isoladas e autenticadas de cada área como descrito

anteriormente na seção 3.4, produzidas sob agitação orbital de 105 rpm a 28°C até que as culturas atingissem a fase log (10^9 cel mL⁻¹). Inicialmente a inoculação foi realizada por meio da veiculação das células de BFNN em turfa utilizando uma solução de sacarose (10%) como solução adesiva, posteriormente a germinação das plântulas foi feita uma aplicação de reforço pela adição de 2,0 mL vaso⁻¹ de cultura em YMB (Vincent, 1970). Os isolados de BFNN de solo contaminado utilizadas foram selecionados de acordo com o resultado da avaliação fenotípica da nodulação (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização fenotípica da nodulação de Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) e Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) por rizóbios isolados da área de mineração de manganês.

Feijão-caupi							
Estirpes	Origem	Altura da planta (cm)	Coloração da parte aérea	Posição dos nódulos na raiz	Forma e superfície nodular	Frequência Nodular	Coloração do cerne nodular
FCI1	MATA	21.0	Verde intenso	Principal	Globoso/Rugoso	Muito numerosos	Intenso
FCI2	MATA	22.1	Verde intenso	Principal	Globoso/Rugoso	Muito numerosos	Intenso
FCI3	MATA	23.5	Verde intenso	Principal	Globoso/Rugoso	Muito numerosos	Intenso
FCI7	AD	24.5	Verde intenso	Principal	Globoso/Rugoso	Muito numerosos	Médio
FCI8	AD	20.6	Verde intenso	Principal	Globoso/Rugoso	Muito numerosos	Médio
FCI9	AD	17.9	Verde Claro	Ramificações	Globoso/Rugoso	Muito numerosos	Médio
FCI11	REJEITO	17.1	Verde intenso	Principal	Globoso/Rugoso	Muito numerosos	Médio
FCI14	REJEITO	19.4	Verde intenso	Principal	Globoso/Rugoso	Muito numerosos	Médio
FCI15	REJEITO	21.4	Verde intenso	Principal	Globoso/Rugoso	Muito numerosos	Médio
Sabiá							
SAI1	MATA	11.90	Verde Intenso	Principal	Digitiforme/Rugoso	Muito numerosos	Intenso
SAI2	MATA	8.47	Verde Claro	Principal	Digitiforme/Rugoso	Muito numerosos	Intenso
SAI5	MATA	9.77	Verde Claro	Ramificações	Digitiforme/Rugoso	Pouco numerosos	Intenso
SAI8	AD	13.83	Verde Intenso	Principal	Digitiforme/Rugoso	Muito numerosos	Intenso
SAI9	AD	11.73	Verde Intenso	Principal	Digitiforme/Rugoso	Muito numerosos	Intenso
SAI10	AD	10.13	Verde Claro	Ramificações	Digitiforme/Rugoso	Pouco numerosos	Médio
SAI11	REJEITO	9.67	Verde Claro	Principal	Digitiforme/Rugoso	Muito numerosos	Intenso
SAI13	REJEITO	10.00	Verde Intenso	Principal	Digitiforme/Rugoso	Muito numerosos	Intenso
SAI14	REJEITO	11.03	Verde Intenso	Principal	Digitiforme/Rugoso	Muito numerosos	Intenso

As plantas de feijão caupi e sabia foram colhidas em 45 e 60 dias respectivamente após a semeadura quando foram avaliadas as seguintes variáveis: número de nódulos (NN); massa de matéria seca de nódulos (MSN); massa de matéria seca da parte aérea (MSPA); teor de nitrogênio na parte aérea, determinado pelo método micro-Kjeldahl (TEDESCO *et al.*, 1995); teor de manganês na parte aérea das plantas, a partir do extrato obtido da digestão nitro-perclórica (SILVA, 2009), sendo determinados por espectrofotometria de absorção atômica; e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA). O N acumulado na parte aérea foi calculado por meio da multiplicação da massa da matéria seca da parte aérea pelo teor de N.

O delineamento experimental utilizado para cada um dos dois experimentos foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5 x 4, considerando-se: i) cinco doses de Mn (0; 20; 40; 60 e 80 mg dm⁻³); ii) quatro tratamentos de inoculação (controle – não inoculado; MIX área 1; MIX área 2 e MIX área 3), com quatro repetições, constituindo 80 parcelas experimentais para cada experimento.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. Mediante a constatação de diferença significativa, os dados qualitativos foram comparados pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) e os quantitativos (doses) foram submetidos à análise de regressão, utilizando o software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento, autenticação e caracterização cultural de estirpes nativas de rizóbios de área de mineração de manganês.

As espécies leguminosas utilizadas como plantas iscas, feijão-caupi e sabiá, demonstraram ser capazes de nodular com as estirpes nativas dos diferentes solos coletados da área de mineração de Mn^{2+} , o que demonstra compatibilidade entre macro e microsimbiontes nas três situações observadas (área de mata nativa, área degradada e rejeito de mineração). Após o processo de autenticação dos isolados selecionados, foram obtidas 13 isolados de estirpes de rizóbios para feijão-caupi, sendo 5 isolados obtidos de área de mata preservada, 5 da área degradada pelo processo de extração mineral e 3 obtidos do rejeito de mineração. Para o sabiá obteve-se 14 isolados de estirpes de rizóbios, sendo 5 isolados da área de mata preservada, 4 de área degradada pelo processo de extração mineral e 5 isolados obtidos a partir do rejeito de mineração (Tabela 4).

Tabela 4 – Rizóbios da área de mineração de manganês autenticadas em associação com feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.).

Estirpe	Hospedeiro	Origem
FCI1	Feijão-caupi	Área de mata
FCI2	Feijão-caupi	Área de mata
FCI3	Feijão-caupi	Área de mata
FCI4	Feijão-caupi	Área de mata
FCI5	Feijão-caupi	Área de mata
FCI6	Feijão-caupi	Área degradada
FCI7	Feijão-caupi	Área degradada
FCI8	Feijão-caupi	Área degradada
FCI9	Feijão-caupi	Área degradada
FCI10	Feijão-caupi	Área degradada
FCI11	Feijão-caupi	Rejeito
FCI14	Feijão-caupi	Rejeito
FCI15	Feijão-caupi	Rejeito
SAI1	Sabiá	Área de mata
SAI2	Sabiá	Área de mata
SAI3	Sabiá	Área de mata
SAI4	Sabiá	Área de mata
SAI5	Sabiá	Área de mata
SAI7	Sabiá	Área degradada
SAI8	Sabiá	Área degradada
SAI9	Sabiá	Área degradada
SAI10	Sabiá	Área degradada
SAI11	Sabiá	Rejeito
SAI12	Sabiá	Rejeito
SAI13	Sabiá	Rejeito
SAI14	Sabiá	Rejeito
SAI15	Sabiá	Rejeito

Fonte: Autor (2018)

Na realização do processo de autenticação observou-se que a maioria dos isolados de estirpes selecionado, no total de 15 para cada espécie de planta, 13 foram positivas e 2 negativas para feijão caupi e para o sabiá apenas 1 negativo, sendo as outras 14 restantes (Tabela 4) capazes de estabelecer uma relação simbiótica eficiente com seus hospedeiros, caracterizada pela coloração verde intensa das folhas e pela coloração vermelha intensa do cerne nodular, indicando alta concentração de leghemoglobina e, conseqüentemente, boa eficiência na fixação de N₂.

Solos contaminados por metais pesados geralmente apresentam condições de baixa fertilidade e se tornam ambientes altamente estressantes para a comunidade biológica (ABDU; ABDULLAHI; ABDULKADIR, 2017), tornando estudos envolvendo a obtenção de BFNN adaptadas a estas condições de grande importância para o sucesso de programas de revegetação de solos contaminados por metais. Vários autores têm relatado a capacidade de crescimento desses micro-organismos na presença de metais pesados (GRISON *et al.*, 2015; MATSUDA; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; RANGEL, *et al.*, 2016; TRANNIN; MOREIRA; SIQUEIRA, 2001; TRANNIN *et al.*, 2001), bem como isolamento de BFNN de áreas contaminadas por metais pesados (AAFI, *et al.*, 2015; CASTRO *et al.*, 2017; GRISON *et al.*, 2015; NONNOI, *et al.*, 2012).

Vale salientar que na área degradada pelo processo de mineração e no rejeito gerado não há presença de vegetação, de maneira que os rizóbios presentes nesses ambientes sobrevivem sem a influência direta desse componente ambiental, além de outras elevadas condições de estresse como uma baixa disponibilidade de matéria orgânica, P e K, pH levemente ácido e elevada concentração de Mn, o que pode indicar uma alta capacidade de sobrevivência e tolerância dessas bactérias, especialmente à presença de altas concentrações de manganês. Alguns mecanismos utilizados por esses micro-organismos na tolerância a metais pesados já foram identificados destacando-se a produção de exopolissacarídeos (NOCELLI, *et al.*, 2016), produção de sideróforos (SCHALK; HANNAUER; BRAUD, 2011) e efluxos do excesso de metais (CUBILLAS *et al.*, 2014).

A caracterização cultural e morfológica dos isolados das estirpes autenticadas e selecionadas para o ensaio sobre o efeito do manganês no crescimento e nodulação de feijão-caupi e sabiá (Tabela 3) estão listadas na tabela 5. Pode-se observar que todas os isolados isoladas apresentaram reação de Gram negativa, o que é característico do grupo das BFNN pertencente às proteobactérias (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005).

Tabela 5 - Caracterização cultural de estirpes de rizóbios da área de mineração de Mn²⁺ em associação com feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.).

Estirpe	Hospedeiro	Origem	Gram	pH do meio	Tempo de crescimento	Cor das colônias	Transparência	Elevação	Formação de muco	Elasticidade	Forma da colônia
FCI1	Feijão-caupi	Mata	Negativo	Ácido	Rápido	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Viscoso	Irregular
FCI2	Feijão-caupi	Mata	Negativo	Neutro	Rápido	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Viscoso	Irregular
FCI3	Feijão-caupi	Mata	Negativo	Neutro	Rápido	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Viscoso	Irregular
FCI7	Feijão-caupi	AD	Negativo	Neutro	Rápido	Amarela	Translúcida	Convexa	Presente	Gomosa	Irregular
FCI8	Feijão-caupi	AD	Negativo	Neutro	Rápido	Amarela	Translúcida	Convexa	Presente	Viscoso	Irregular
FCI9	Feijão-caupi	AD	Negativo	Alcalino	Lento	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Viscoso	Irregular
FCI11	Feijão-caupi	Rejeito	Negativo	Neutro	Rápido	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Gomosa	Irregular
FCI14	Feijão-caupi	Rejeito	Negativo	Neutro	Lento	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Viscoso	Irregular
FCI15	Feijão-caupi	Rejeito	Negativo	Neutro	Rápido	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Gomosa	Irregular
SAI1	Sabiá	Mata	Negativo	Àcido	Rápido	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Viscoso	Circular
SAI2	Sabiá	Mata	Negativo	Àcido	Rápido	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Viscoso	Puntiforme
SAI5	Sabiá	Mata	Negativo	Àcido	Rápido	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Viscoso	Irregular
SAI8	Sabiá	AD	Negativo	Àcido	Rápido	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Viscoso	Irregular
SAI9	Sabiá	AD	Negativo	Àcido	Rápido	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Viscoso	Irregular
SAI10	Sabiá	AD	Negativo	Àcido	Rápido	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Viscoso	Puntiforme
SAI11	Sabiá	Rejeito	Negativo	Àcido	Rápido	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Viscoso	Circular
SAI13	Sabiá	Rejeito	Negativo	Àcido	Rápido	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Viscoso	Circular
SAI14	Sabiá	Rejeito	Negativo	Àcido	Rápido	Branca	Opaca	Convexa	Presente	Viscoso	Circular

Fonte: Autor (2018)

Com relação à mudança de pH do meio de cultura, dos 9 isolados selecionados de feijão-caupi 7 (FCI2, FCI3, FCI7, FCI8, FCI11, FCI14, FCI15) apresentaram reação neutra em meio de cultura YMA, 1 (FCI1) apresentou capacidade de acidificar o meio e 1 (FCI9) isolado teve reação alcalina. Para o sabiá, dos nove isolados selecionados, todos apresentaram capacidade de acidificar o meio de cultura.

Em relação ao tempo de crescimento, apenas dois isolados selecionados de feijão-caupi (FCI9, FCI14) apresentaram crescimento lento (5 a 10 dias), todos os outros isolados, juntamente com aqueles selecionados para sabiá, apresentaram crescimento rápido (3 dias) em meio de cultura YMA acrescido de azul de bromotimol. Capacidade de crescimento rápido já é bem documentada e é característico de estirpes de climas áridos e semiáridos, onde a habilidade de fixar N₂ não é o mais importante para esses micro-organismos e sim a sua sobrevivência (SPRENT, 1994). Essa característica também lhes confere vantagens frente à competição com outros micro-organismos na rizosfera (MARTINS *et al.*, 1997).

Os isolados das estirpes selecionadas para o sabiá, como observado, apresentaram similaridades entre si, partilhando das mesmas características em vários parâmetros, apresentando diferenças apenas na forma da colônia. Todos os isolados apresentaram reação ácida em meio YMA, crescimento rápido, cor da colônia branca, transparência opaca, elevação convexa e presença de muco viscoso. Possivelmente esses isolados podem pertencer à mesma espécie, uma vez que apresentaram características similares, contudo não se pode afirmar com clareza já que não foram utilizadas técnicas moleculares para um definitivo posicionamento frente à taxonomia dessas bactérias.

Para o feijão-caupi obtiveram-se algumas diferenças entre os isolados das estirpes selecionadas sendo, em sua grande maioria similares, ou seja, apresentando reação neutra em meio YMA, crescimento rápido, coloração branca, transparência opaca, elevação convexa e presença de muco. Apenas na forma da colônia todos os isolados foram similares apresentando forma irregular. Houve diferenças em alguns isolados quanto à reação em meio YMA, tempo de crescimento (onde algumas apresentaram crescimento lento), cor predominante amarela, transparência translúcida e também quanto à elasticidade do muco, com algumas colônias apresentando muco viscoso e gomoso.

Caupi é considerado uma planta promiscua quanto à nodulação com BFNN podendo se associar a várias espécies de BFNN pertencentes tanto ao grupo α quanto β -proteobactérias e, por isso, é muito utilizado em estudos de diversidade (CASTRO *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2003; MARTINS; NEVES; RUMJANEK, 1997). Em espécies pertencentes à subfamília Mimosaceae (*Mimosa*) foi descoberto recentemente que estas podem ser noduladas

principalmente por espécies do grupo dos β -rizóbios (*Burkholderia*, *Cupriavidus*) (BONTEMPS, *et al.*, 2010; CHEN, *et al.*, 2003), fato semelhante ao que ocorre com o sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*) (CHEN, *et al.*, 2008; MARTINS, *et al.*, 2015).

Ressalta-se ainda a importância de futuros estudos moleculares para identificação e conhecimento da ecologia desses micro-organismos, uma vez que esses são adaptados às condições regionais de semiaridez bem como a condições de extremo estresse imposto pelas áreas degradadas por mineração, podendo serem usados, juntamente com seus hospedeiros, em futuros projetos de revegetação de áreas degradadas e contaminadas por excesso de metais, especialmente com o manganês.

4.2 Efeito do Manganês sobre o Crescimento e Nodulação de *Vigna unguiculata* (L.) Walp e *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.

4.2.1 *Vigna unguiculata* (L.) Walp

A análise de variância para as variáveis biométricas estudadas em *Vigna unguiculata* (L.) Walp está apresentada na tabela 6, observando se os valores de probabilidade de significância do teste F para o efeito principal dos fatores de tratamento e suas interações. As variáveis altura de planta (ALTP) e matéria seca da raiz (MSR) foram influenciadas significativamente apenas pelo fator dose de Mn^{2+} (DOSE). Na interação entre doses de Mn x tratamentos de inoculação com rizóbios apenas a variável matéria seca dos nódulos (MSN) apresentou efeito significativo.

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para altura de planta (ALTP), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), para os fatores de tratamento e suas interações em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.).

F.V.	G.L.	QUADRADO MÉDIO				
		ALTP	MSR	MSPA	NN	MSN
DOSE (A)	4	670,02*	0,4123**	0,5605 ^{ns}	245,45 ^{ns}	12393,70*
BFNN (B)	3	139,65 ^{ns}	0,1268 ^{ns}	0,625 ^{ns}	89,433 ^{ns}	9734,94 ^{ns}
Int. (A x B)	12	149,06 ^{ns}	0,1189 ^{ns}	0,6623 ^{ns}	351,516 ^{ns}	17356,93**
C. V. %		41,03	31,87	14,2	36,62	13,67

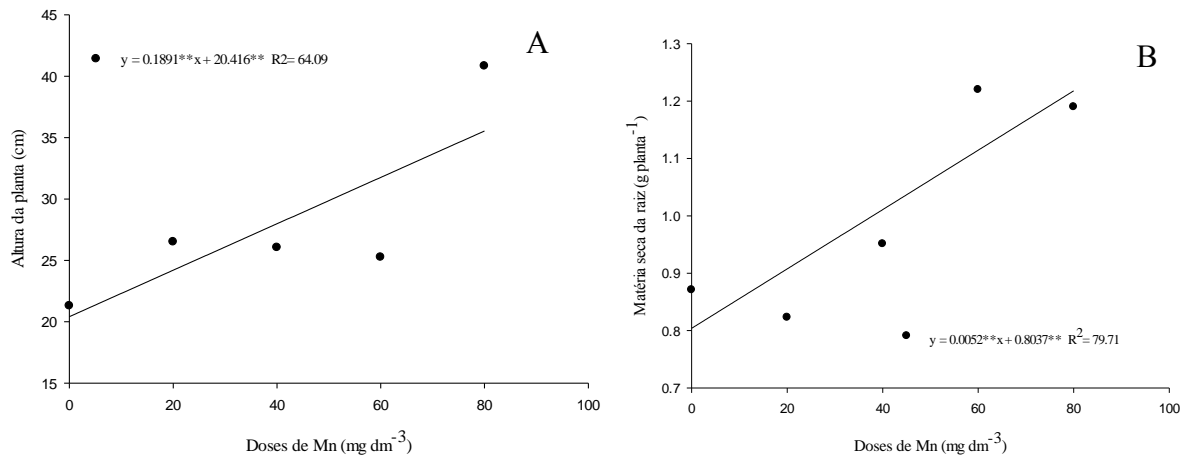
F.V. - Fontes de variação; G.L - grau de liberdade; (A) - doses de Mn; (B) - tratamentos de inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas; C.V. - coeficiente de variação; **, *, ns - significativo ao nível de 1%, 5% de significância e não significativo pelo teste F, respectivamente.

4.2.1.1 Altura da planta (ALTP) e Matéria seca da raiz (MSR)

A altura da planta de feijão-caupi submetidas a doses de manganês ajustou-se ao modelo linear crescente, no qual a dose de 80 mg dm⁻³ promoveu o valor máximo de altura de planta, que foi de 40,83 cm, acarretando num incremento de 91,8 % no crescimento das plantas (Figura

3A). A massa da matéria seca da raiz ajustou-se ao modelo linear crescente, havendo um aumento da produção de matéria seca das raízes com o aumento das doses de Mn, sendo a maior produção de matéria seca observada na dose de 60 mg dm^{-3} , correspondendo a um incremento de 40 % quando comparado ao tratamento sem aplicação de Mn (Figura 3B).

Figura 3 - Altura das plantas (A) e Matéria seca da raiz (B) de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.). submetidas a doses de manganês



Fonte: Autor (2018)

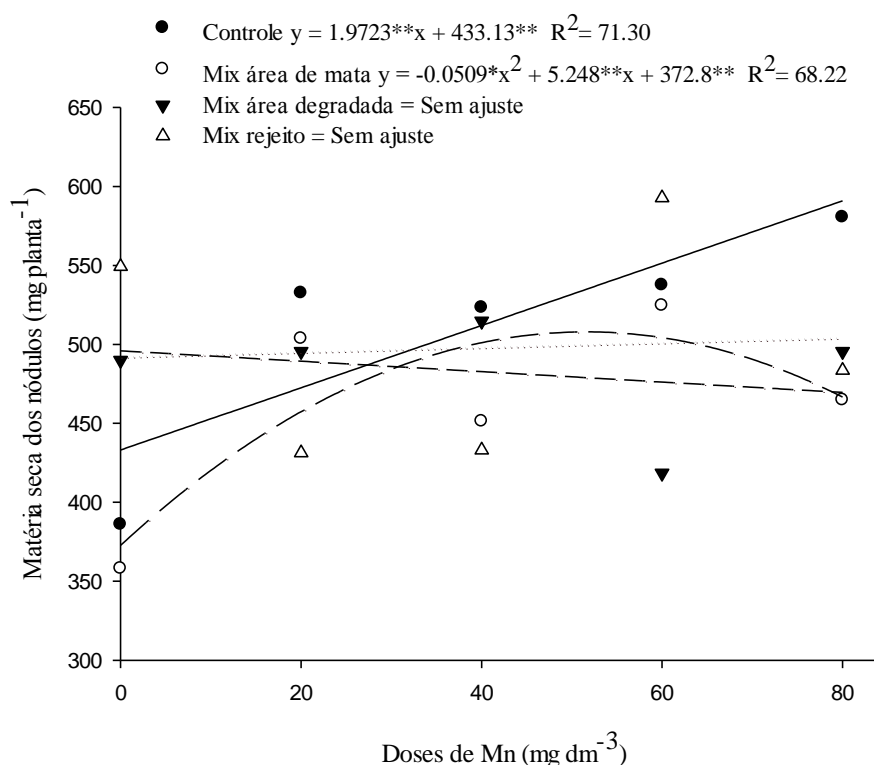
Esse estímulo no crescimento das plantas pelo aumento das doses de Mn pode ser explicado pela participação desse elemento em vários processos importantes para o desenvolvimento vegetal tais como metabolismo do nitrogênio, respiração, controle hormonal e fotossíntese (MALAVOLTA, 2006). Em estudos de recuperação de área contaminadas por metais, parâmetros de crescimento das plantas como esses devem ser considerados como pontos positivos, uma vez que são características desejadas em projetos de fitorremediação.

4.2.1.2 Matéria seca dos nódulos (MSN)

Analisando o desdobramento da interação doses x rizóbios para a variável massa da matéria seca dos nódulos, verificou-se significância para os tratamentos controle e mix área de mata, sendo que os tratamentos mix área degradada e mix rejeito não permitiram ajuste matemático (Figura 4).

O tratamento controle (estirpes de rizóbios nativos do solo) sob as doses de Mn ajustou-se ao modelo linear positivo, no qual a dose de 80 mg de Mn por dm^{-3} promoveu o maior valor de massa da matéria seca dos nódulos, que foi de $580,57 \text{ mg planta}^{-1}$. As estirpes do mix área de mata ajustaram-se ao modelo quadrático, obtendo-se o valor máximo de massa da matéria seca de nódulos de $524,67 \text{ mg planta}^{-1}$ na dose de 60 mg de Mn por dm^{-3} (Figura 4).

Figura 4 – Massa da matéria seca dos nódulos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.), submetidas a doses de manganês e tratamentos de inoculações com rizóbios



Fonte: Autor (2018)

Todas as plantas de feijão-caupi foram capazes de formar nódulos com os isolados das estirpes de rizóbios, tanto introduzidas (mix área de mata, mix área degradada e mix rejeito) quanto com os isolados das estirpes nativas do solo utilizado (controle), o qual apresentou uma elevada população de células viáveis de $1,950 \times 10^5$ células de rizóbio g^{-1} de solo (Tabela 2). Isso pode indicar tolerância desses isolados rizobianos frente a presença do Mn em elevadas concentrações. Vale salientar que as estirpes nativas do solo (tratamento controle) não são provenientes de solo contaminado e apresentaram, mesmo assim, uma tolerância intrínseca às variações de concentração de manganês presentes.

As estirpes nativas do solo apresentaram superioridade na produção de massa da matéria seca dos nódulos frente às doses de Mn quando se comparou com os isolados das estirpes introduzidas obtidos das áreas contaminadas. Isso pode ser explicado pelo que se pode chamar de “compensação”, uma vez que nesses últimos observou-se um aumento no tamanho dos nódulos produzidos. Esse comportamento também foi observado em trabalhos realizados por Dobereiner (1966), Castro *et al.*, (2017) e Rangel (2015). Referidos trabalhos demonstraram que o tamanho dos nódulos também pode ser utilizado como um bom indicador de eficiência simbiótica na seleção de estirpes para utilização em projetos de recuperação de áreas

contaminadas por metais.

O número e massa da matéria seca dos nódulos são considerados parâmetros de avaliação de eficiência de estirpes fixadoras de nitrogênio eficientes, uma vez que estão fortemente relacionados com a promoção do crescimento das plantas (DOBEREINER, 1966). O número e a massa da matéria seca dos nódulos correlacionaram-se positivamente com a massa da matéria seca da parte aérea ($r = 0.32$; $p \leq 0.01$; $r = 0.35$; $p \leq 0.01$), respectivamente. Entretanto, apenas a massa da matéria seca dos nódulos correlacionou-se positivamente com o acúmulo de nitrogênio na parte aérea ($r = 0.34$; $p \leq 0.01$). Dessa maneira, a massa da matéria seca dos nódulos constituiu-se num melhor parâmetro para seleção de isolados mais eficientes. Correlações positivas e significativas entre massa da matéria seca dos nódulos e massa da matéria seca da parte aérea também foram observadas em trabalhos realizados por Ferreira *et al.* (2012) e Dobereiner (1966), que também já relatavam correlação positiva entre massa da matéria seca dos nódulos e a quantidade de N fixado.

4.2.1.3 Teor de nitrogênio e manganês na parte aérea

A análise de variância para as variáveis N, ANPA e Mn (Tabela 7) evidencia efeito significativo do fator isolado DOSE para o teor de Mn e interação DOSE x RIZÓBIO, para teor de N e ANPA.

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para teor de nitrogênio (N), acúmulo de nitrogênio (ANPA) e teor de manganês (Mn) na parte aérea para os fatores de tratamento e suas interações em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.).

F.V.	G.L.	QUADRADO MÉDIO		
		N	ANPA	Mn
DOSE (A)	4	31,94 ^{ns}	2384,002**	19591,512**
BFNN (B)	3	35,22 ^{ns}	996,667 ^{ns}	825,666 ^{ns}
Int. (A x B)	12	61,56**	1147,982**	1166,062 ^{ns}
C. V. %		13,28	16,34	23,15

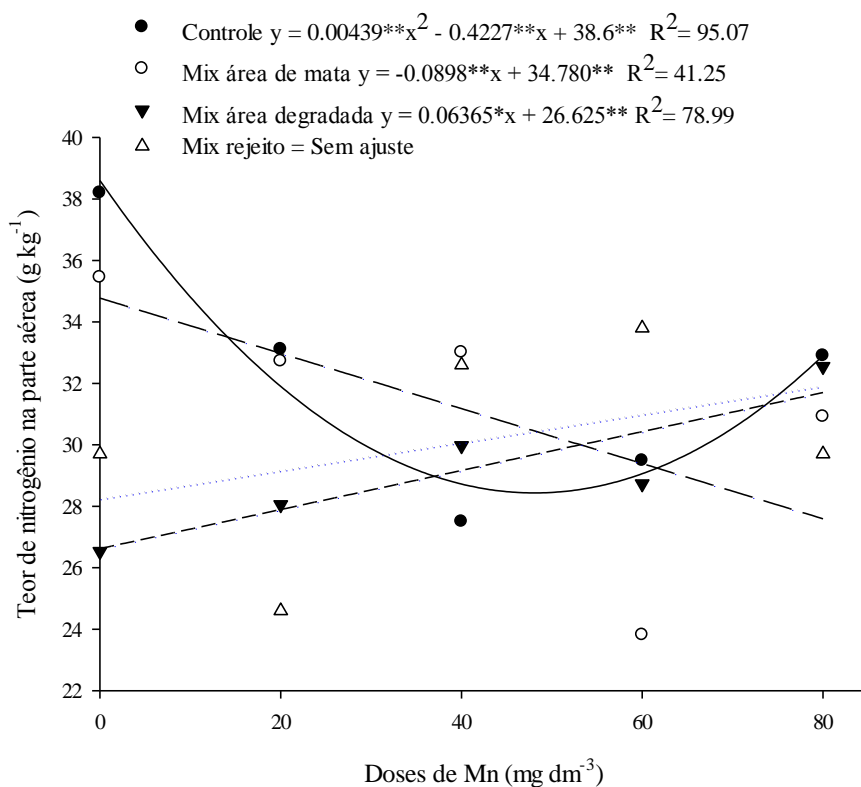
F.V. - Fontes de variação; G.L. – grau de liberdade; (A) – doses de Mn; (B) – tratamentos de inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas; C.V. – coeficiente de variação; **, *, ns – significativo ao nível de 1%, 5% de significância e não significativo pelo teste F, respectivamente.

Analisando o desdobramento da interação doses x rizóbios para a variável teor de nitrogênio na parte aérea, verificou-se significância para os tratamentos controle, mix área de mata e mix área degradada, enquanto que o tratamento mix rejeito não permitiu ajuste matemático (Figura 5).

A fixação biológica do N₂ pelas estirpes nativas do solo (controle) foi afetada significativamente pelas doses de Mn, onde o tratamento se ajustou ao modelo de regressão quadrático, apresentando valor máximo de 38,2 g kg⁻¹ de N na dose 0, e o mínimo de 27,5 g kg⁻¹

¹ de N na dose de 40 mg de Mn dm⁻³ havendo, portanto, um decréscimo de 28 % no teor de N nas plantas. Na dose máxima de 80 mg de Mn dm⁻³, o decréscimo observado foi de 13,8 % no teor de N na parte aérea das plantas (Figura 5). Os isolados das estirpes mix área de mata sofreram influência significativa das doses de Mn na fixação de N₂, ajustando-se ao modelo linear decrescente, observando-se um decréscimo no teor de N na parte aérea das plantas com o aumento das doses. O menor teor de N verificado foi de 23,81 g kg⁻¹, para a dose de 60 mg de Mn dm⁻³, representando um decréscimo de 32,8 % quando comparado ao teor de N observado na dose 0 (Figura 5). O mix área degradada se ajustou ao modelo de regressão linear crescente, havendo aumento do teor de N na parte aérea da planta com o aumento das doses de Mn, observando-se o maior teor, 32,55 g kg⁻¹, na dose de 80 mg dm⁻³, representando um incremento de 22,6 % de N na parte aérea da planta quando comparado a dose 0 (Figura 5).

Figura 5 - Teor de nitrogênio na parte aérea de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) submetidas a doses de manganês e tratamentos de inoculações com rizóbios



Fonte: Autor (2018)

O acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas variou em função da interação doses de Mn x rizóbios, porém não se verificou ajuste linear ou quadrático que o explicasse, apresentando-se aqui apenas os valores médios da interação.

Com base nesses valores médios da interação doses de Mn x rizóbios (Tabela 8), verifica-se que houve um maior acúmulo de N na parte aérea das plantas quando foram inoculadas com o mix de isolados rizobianos provenientes do rejeito (162,66 mg planta⁻¹) na

dose de 60 mg dm⁻³. Apesar da ocorrência de diferenças estatísticas tanto entre linha como nas colunas, pode-se observar que as estirpes tanto nativas do solo quanto os isolados rizobianos introduzidos foram eficientes em promover acúmulo de N com o aumento das doses de Mn, destacando-se as estirpes nativas do solo e aqueles isolados rizobianos que compunham o mix do rejeito (Tabela 8).

Tabela 8 - Acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) das plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) submetidas a doses de Mn e quatro tratamentos de inoculação com rizóbio.

Tratamentos de Inoculação	Doses de Mn (mg dm ⁻³)				
	0	20	40	60	80
	ANPA (mg planta ⁻¹)				
Controle	124,93bA	142,78aA	127,22aA	130,77aA	133,38aA
Mix área de mata	119,68bA	132,76aA	144,5aA	83,76bB	139,05aA
Mix área degradada	102,24bB	109,44bB	138,32aA	108,94aB	133,14aA
Mix rejeito	146,95aA	100,15bB	162,66aA	124,24aB	133,9aA

Médias seguidas por letra iguais maiúsculas na linha e minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de significância de 1%.

Também pode ser observado que todas as plantas se beneficiaram da fixação biológica de N₂, uma vez que não foi utilizada qualquer outra fonte de N durante a condução experimental e nem observada a presença de sintomas de deficiência desse elemento. Apesar de os isolados rizobianos do mix área de mata e as estirpes nativas do solo terem demonstrado sensibilidade a presença de Mn, os mesmos foram capazes de fixar e disponibilizar N para as plantas em quantidade suficiente para o seu desenvolvimento. Segundo Malavolta, Vitti e Oliveira (1997) teores adequados de N para feijões *Vigna* estariam entre a faixa de 18 a 22 g kg⁻¹, os valores aqui apresentados estão todos acima desta faixa, o que pode-se considerar uma alta eficiência das estirpes tanto obtidas das áreas de mineração quanto as nativas do solo na nutrição de N as plantas.

Dobereiner (1966) avaliando o efeito da dose de 40 mg kg⁻¹ de Mn sobre a fixação simbiótica do nitrogênio de *Phaseolus vulgaris* por estirpes de *Rhizobium phaseoli* observou teores de 19,6 g kg⁻¹ de N, pela associação com a estirpe 413, e 20,9 g kg⁻¹ de N pela associação com a estirpe 411. Apesar de não ter afetado o processo de nodulação, o Mn reduziu a fixação simbiótica do N₂ pelas leguminosas associadas às estirpes nativas e com o mix da área de mata, comportamento semelhante ao observado por Spencer (1950).

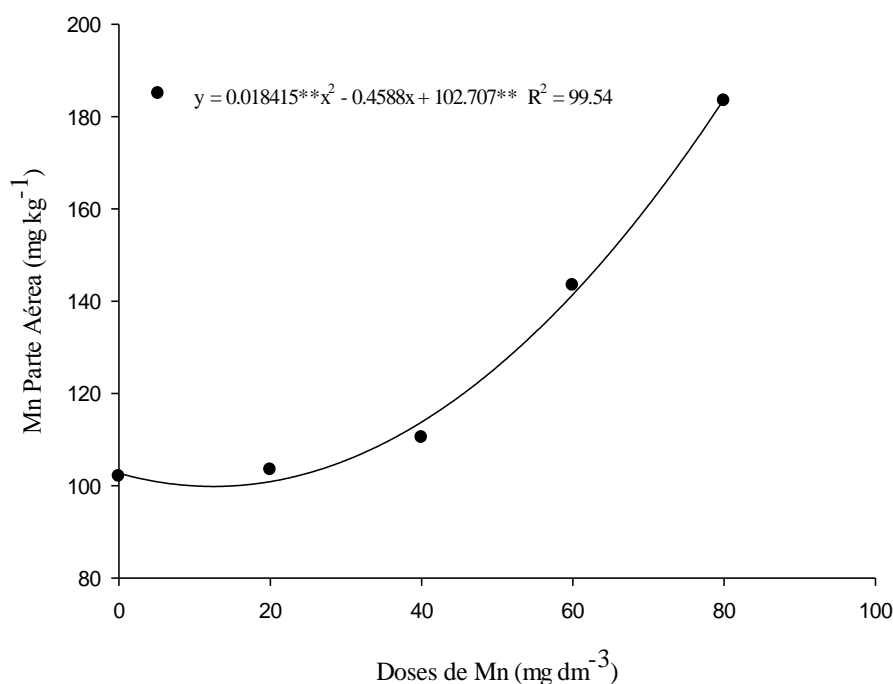
Para a obtenção de sucesso no processo de fitorremediação de áreas contaminadas por metais, a interação plantas-micro-organismos é imprescindível, principalmente associações como leguminosas-rizóbios que podem incorporar N ao sistema por meio da fixação biológica

nessas condições. Estirpes isoladas de áreas contaminadas por metais têm se mostrado eficientes em fixar N₂ associadas a espécies de leguminosas (FERREIRA *et al.*, 2012; RANGEL, 2015) o que, pela semelhança, reforça os resultados aqui obtidos com os isolados rizobianos das áreas estudadas.

O acúmulo de nitrogênio correlacionou-se positivamente com a massa da matéria seca da parte aérea ($r = 0.61$; $p \leq 0.01$), o que demonstra a eficiência das estirpes na promoção do crescimento das plantas.

Com relação ao teor de Mn na parte aérea das plantas, os dados se ajustaram ao modelo de regressão quadrático, observando-se um aumento do teor de Mn na parte aérea das plantas com o aumento dos níveis de Mn no solo e obtendo-se o valor máximo de 183,43 mg kg⁻¹ na dose de 80 mg dm⁻³ (Figura 6).

Figura 6 - Teor de manganês na parte aérea de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) submetidas a doses de manganês.



Fonte: Autor

Durante a realização do experimento observou-se que as doses de Mn aplicadas não chegaram a causar grande efeito sob o desenvolvimento das plantas de feijão-caupi, havendo o desenvolvimento de sintomas de toxidez a partir de 25 dias após o plantio, caracterizado pela presença de manchas marrom escuro nas folhas velhas que posteriormente levam a clorose e queda das folhas (HORST, 1988) mas com pouca intensidade (Figura 7). Malavolta, Vitti e Oliveira (1997) definem o teor ideal de Mn em *Vigna* na faixa de 400 a 425 mg kg⁻¹, valores superiores aos encontrados nas plantas.

Na busca por espécies vegetais que possam ser utilizadas em projetos de recuperação de áreas contaminadas por metais é necessário que as mesmas apresentem características de rápido crescimento, produção de biomassa, sistema radicular bem distribuído e ramificado, capacidade de acumular o contaminante, maior acúmulo na parte aérea, boa adaptação ao ambiente, além de facilidade no cultivo e na colheita (MILLALEO *et al.*, 2010). A cultura do feijão-caupi apresenta um grande potencial perante as características expostas como demonstrado pelos nossos resultados, onde a cultura apresentou bom crescimento tanto da parte aérea quanto da massa radicular frente as concentrações de Mn no solo, sendo capaz de acumular Mn, como já demonstrado por (HORST *et al.*, 1999), e preferencialmente na parte aérea da planta (MILLALEO *et al.*, 2010).

Figura 7 - Sintomas de toxidez em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) submetidas a doses de manganês.



Fonte: Autor

4.2.2 *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.

A análise de variância para as variáveis biométricas estudadas em *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. estão apresentadas na tabela 9, correspondendo aos valores de probabilidade e significância do teste F para o efeito principal dos fatores de tratamento e suas interações. A variável altura de planta (ALTP) apresentou efeito significativo para o fator dose e tratamentos com inoculação rizobiana isoladamente. Nota-se ainda que a massa da matéria seca da raiz (MSR) foi influenciada significativamente apenas pelo fator dose. A interação entre doses de Mn x tratamentos de inoculação com rizóbios foi significativa para as variáveis massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e massa da matéria seca dos nódulos (MSN).

Tabela 9 - Resumo da análise de variância para altura de planta (ALTP), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos (MSN), para os fatores de tratamento e suas interações em sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia Benth.*).

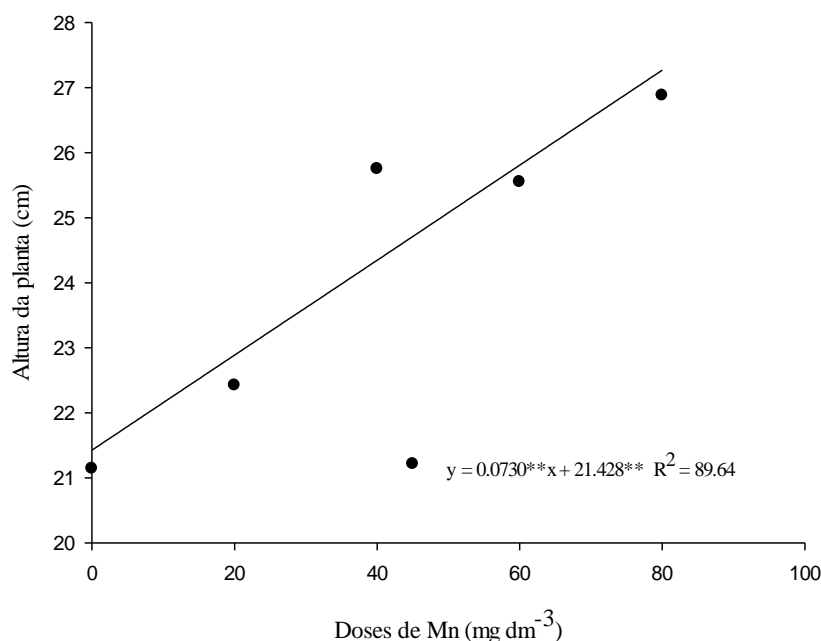
F.V.	G.L.	QUADRADO MÉDIO				
		ALTP	MSR	MSPA	NN	MSN
DOSE (A)	4	95,358**	0,0556**	0,3489**	146,637**	344,985**
BFNN (B)	3	94,835**	0,0118 ^{ns}	0,53**	2048,545**	1291,379**
Int. (A x B)	12	21,874 ^{ns}	0,0059 ^{ns}	0,3876**	166,17**	1048,36**
C. V. %		16,77	30,64	16,39	33,51	11,52

F.V. - Fontes de variação; G.L. – grau de liberdade; (A) – doses de Mn; (B) – tratamentos de inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas; C.V. – coeficiente de variação; **, *, ns – significativo ao nível de 1%, 5% de significância e não significativo pelo teste F, respectivamente.

4.2.2.1 Altura da planta (ALTP) e Matéria seca da raiz (MSR)

Valores de altura de planta do sabiá ajustaram-se ao modelo linear crescente, observando-se um acréscimo na altura das plantas com o aumento das doses de Mn. Como observado, o tratamento controle (dose 0 de Mn) apresentou menor crescimento, a partir da dose de 20 mg dm⁻³ de Mn verifica-se um incremento de 6% na altura das plantas quando comparado ao tratamento controle, chegando a 27,15 % na dose de 80 mg dm⁻³ de Mn (Figura 8).

Figura 8 - Altura de planta de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia Benth.*) submetidas a doses de manganês.



Em trabalho realizado por Marques, Moreira e Siqueira (2000) observando o crescimento de *Mimosa caesalpiniaefolia* em solo contaminado por metais pesados, os autores observaram um incremento em 50% no crescimento da planta na presença de 354 mg kg⁻¹ de Mn, além de outros metais. O manganês é essencial para o metabolismo e desenvolvimento das plantas, exercendo funções na proteção das células contra estresse oxidativo (HÄNSCH; MENDEL, 2009), fotossíntese, metabolismo do nitrogênio (HÄNSCH; MENDEL, 2009; MALAVOLTA, 2006), além de estar envolvido nas rotas de produção de fitormônios como o ácido indol acético (AIA), responsável pela alongação celular, o que pode explicar a maior taxa de crescimento das plantas frente ao aumento das doses de Mn.

Com relação ao efeito dos tratamentos de inoculação com rizóbios no crescimento das plantas de sabiá, verifica-se que as plantas pertencentes ao tratamento controle (comunidade nativa do solo) apresentaram o menor valor de altura de planta, diferindo dos demais tratamentos. Os isolados rizobianos da área de mineração de Mn apresentaram maior potencial na promoção do crescimento das plantas, promovendo um incremento em 23,6, 16,4 e 19 % na altura das plantas pelos isolados do mix de área de mata, mix área degradada e mix do rejeito, respectivamente, quando comparadas às estirpes nativas do solo (Controle) (Tabela 10).

Tabela - 10. Altura das plantas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth) submetidas a tratamentos de inoculação com rizóbios.

Tratamentos de inoculação	Altura da planta (cm)
Controle	21,22b
Mix Área de mata	26,23a
Mix Área degradada	24,71a
Mix Rejeito	25,24a

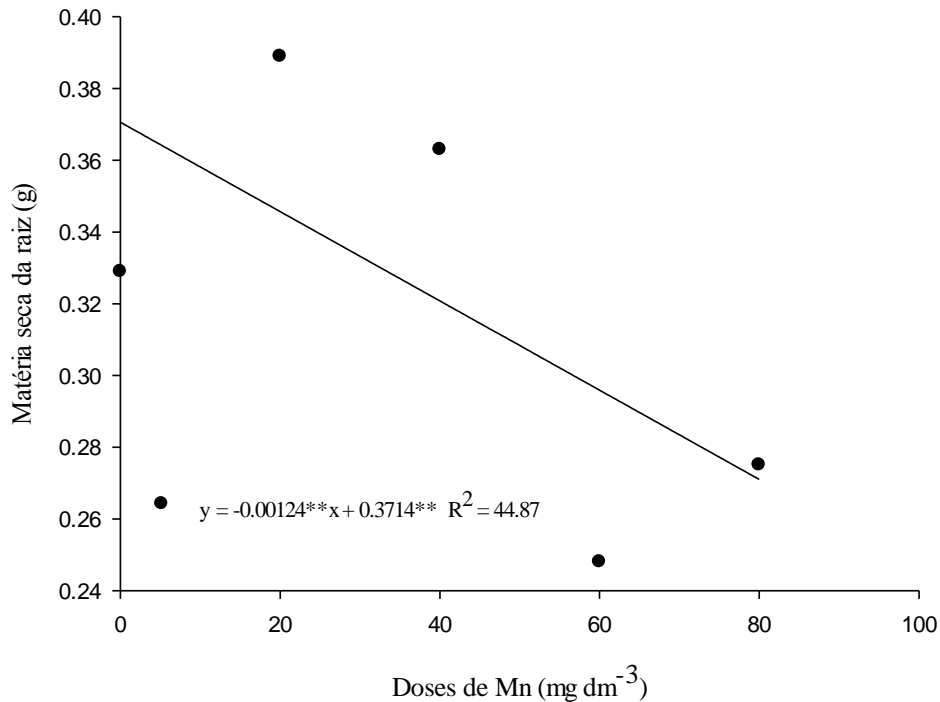
Médias seguidas por letra iguais, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de significância de 1%.

Essa capacidade de maior promoção do crescimento das plantas pelos isolados rizobianos da área de mineração frente à comunidade de rizóbios nativos do solo utilizado como substrato pode ser explicada pelo maior potencial desses isolados em fixar e disponibilizar nitrogênio para as plantas, melhorando assim a nutrição das plantas quanto ao nitrogênio, mesmo com a presença de maiores quantidades de manganês no solo. Deve-se ressaltar que o solo utilizado no experimento apresentou uma baixa capacidade das estirpes nativas de rizóbios em estabelecer simbiose com o sabiá.

A obtenção de estirpes com capacidade de formar simbiose eficiente com macrossimbiontes é muito importante para programas de recuperação de áreas degradadas ou contaminadas. Estirpes isoladas de áreas contaminadas por metais têm demonstrado maior eficiência na promoção de crescimento das plantas, tanto em condições normais quanto em

ambientes com a presença de metais contaminantes (MATSUDA; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; RANGEL *et al.*, 2017; TRANNIN; MOREIRA; SIQUEIRA, 2001).

Figura 9 - Matéria seca da raiz (MSR) de plantas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia Benth.*) submetidas a doses de manganês.



Fonte: Autor (2018)

A massa da matéria seca da raiz se ajustou ao modelo de regressão linear decrescente, demonstrando sensibilidade na produção de massa radicular das plantas em função do aumento das concentrações de Mn. As doses de 20 e 40 mg dm⁻³ de Mn apresentaram um estímulo à produção de massa da matéria seca da raiz das plantas quando comparado a dose 0, com incrementos de 18,2 % e 10,3 % respectivamente. A dose de 60 mg dm⁻³ demonstrou o maior efeito sobre a variável, provocando um decréscimo de 24,6 % quando comparada a dose 0 (Figura 9).

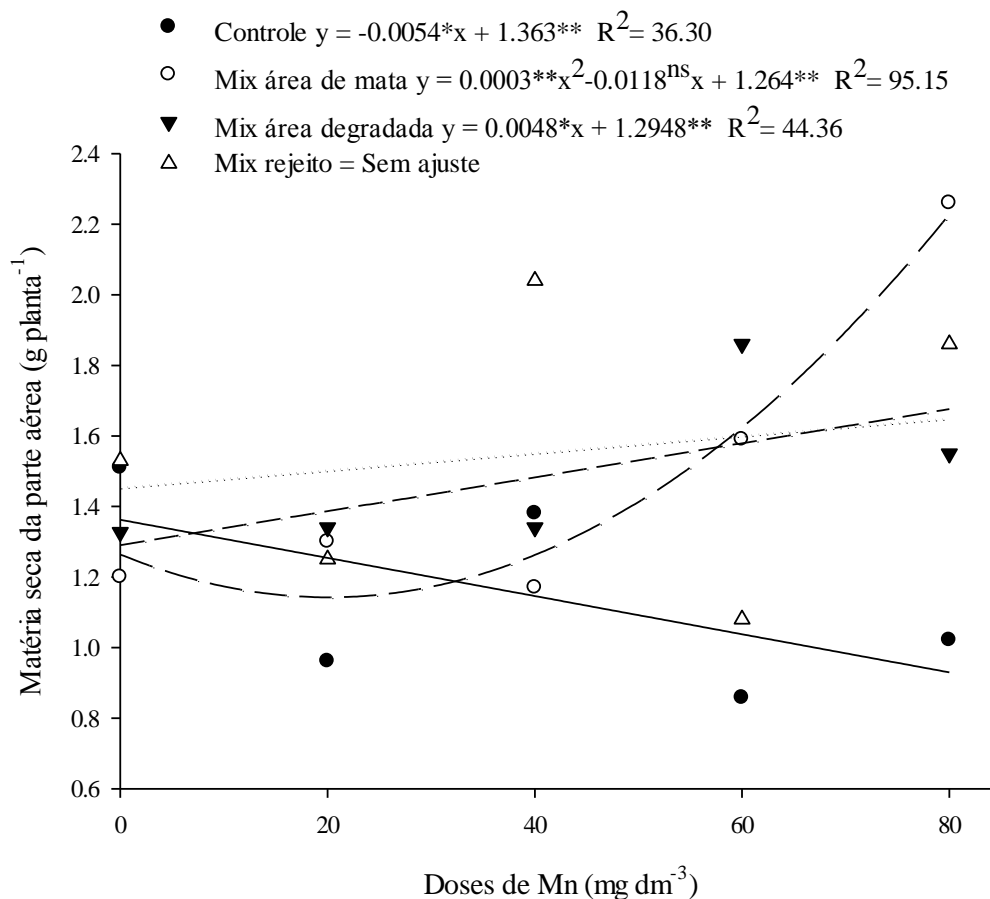
4.2.2.2 Massa da Matéria seca da parte aérea (MSPA)

Analisando o desdobramento da interação doses x rizóbios para a variável massa da matéria seca da parte aérea, verifica-se significância para os tratamentos controle, mix área de mata e mix área degradada, sendo que o tratamento de inoculação com mix do rejeito não apresentou ajuste matemático (Figura 10).

Os dados referentes a produção de massa da matéria seca da parte aérea promovida pelas estirpes nativas do solo (controle) se ajustaram ao modelo de regressão linear decrescente,

havendo decréscimo na produção de massa da matéria seca da parte aérea de acordo com o aumento das doses de Mn, chegando a 43,2% na dose de 60 mg dm⁻³ quando comparado a dose 0. O mix de área de mata se ajustou ao modelo de regressão quadrática, observando-se um aumento na produção de massa da matéria seca da parte aérea com o aumento das doses de Mn, alcançando 88,3 % de incremento na dose de 80 mg dm⁻³. Os dados do mix de área degradada se ajustaram ao modelo linear crescente, com um aumento na produção de massa da matéria seca da parte aérea com o aumento das doses de Mn, com o maior incremento observado na dose de 60 mg dm⁻³ de 40,2 % (Figura 10).

Figura 10 - Matéria seca da parte aérea (MSPA) de plantas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia Benth.*) submetidas a doses de manganês e tratamentos de inoculação com rizóbios.



Fonte: Autor (2018)

As estirpes nativas do solo demonstraram sensibilidade à presença de Mn em mais altas concentrações no solo, demonstrado pelo efeito negativo na produção de massa da matéria seca da parte aérea das plantas, enquanto que os isolados rizobianos da área de mineração de Mn demonstraram tolerância à presença do metal nas concentrações que foram testadas nesse estudo. Como mencionam Ferreira *et al.* (2012), a tolerância de bactérias fixadoras de N₂ a metais pesados pode estar relacionada com a procedência dos isolados, mesmo quando esses

pertencem ao mesmo gênero ou a mesma espécie. Como observado aqui, os isolados que compunham os mix foram obtidos de áreas com elevadas concentrações de Mn, ao contrário das estirpes nativas do solo utilizado como substrato (tratamento controle), diferente da área contaminada por Mn que, nessa condição experimental, se assemelham ao que foi mencionado pelos autores referidos, embora não se deva generalizar tal modelo de comportamento.

É sabido que um dos mecanismos pelo qual rizóbios podem melhorar o crescimento de leguminosas em condições de ambientes estressantes é por meio da produção de fitormônios como auxinas (ácido indolacético - AIA). Esse hormônio age diretamente sobre a divisão celular e na alongação das mesmas, melhorando assim o crescimento das plantas (BRÍGIDO; GLICK, 2015), podendo-se assim supor que os isolados rizobianos da área de mineração de manganês apresentavam uma maior capacidade de produzir fitormônios que promovem o crescimento das plantas em comparação com as estirpes nativas do solo natural utilizado no experimento.

O sabiá, de acordo com estudos realizados, apresenta especificidade na simbiose com rizóbios, demonstrando ser preferencialmente nodulado por estirpes do gênero *Burkholderia* (Chen, et al., 2008). Esse grupo de bactérias é bem caracterizado como promotor do crescimento de plantas por meio da solubilização de fosfatos, produção de fitormônios (auxinas, giberelinas e citoquininas) e também através da fixação simbiótica de N₂ (BONTEMPS, et al., 2010; CHEN, et al., 2003; MARTINS, et al., 2015), aspecto que merece ser mais investigado e que também pode fundamentar a idéia acima mencionada.

4.2.2.3 Número (NN) e Matéria seca dos nódulos (MSN)

As variáveis número de nódulos e massa da matéria seca dos nódulos variaram em função da interação doses de Mn x rizóbios, porém não se verificou ajuste linear ou quadrático que os explicasse, apresentando-se aqui os valores médios da interação.

Todos os tratamentos de inoculação foram capazes de formar simbiose efetiva e formar nódulos com o macrossimbionte, mesmo na presença de Mn. As estirpes do tratamento controle foram as que apresentaram o menor número de nódulos comparado aos isolados de área de mineração inoculados. O mix de área de mata apresentou os maiores números de nódulos com 39,00 e 31,75 nódulos planta⁻¹, nas doses de 20 e 80 mg dm⁻³ respectivamente. O mix de área degradada, apesar de não ter ocorrido diferença estatística significativa dentre as doses, diminuiu o número de nódulos com o aumento das doses de Mn, demonstrando sensibilidade à presença do metal. O mix rejeito demonstrou uma pequena sensibilidade à presença do Mn apenas na dose de 20 mg dm⁻³, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. As demais

doses não demonstraram efeito sobre os isolados na formação de nódulos com o macrossimbionte (Tabela 11).

Tabela 11 - Número de nódulos (NN) das plantas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) submetidas a doses de Mn e quatro tratamentos de inoculação com rizóbio.

Tratamentos de inoculação	Doses de Mn (mg dm ⁻³)				
	0	20	40	60	80
	NN (planta ⁻¹)				
Controle	1,75cA	3dA	1,75bA	2bA	1,5cA
Mix Área de mata	12bC	39aA	14aC	24,5aB	31,75aA
Mix Área degradada	21,25aA	24,5bA	18,25aA	15,25aA	17,75bA
Mix Rejeito	24,75aA	17,5cA	23,5aA	17,75aA	26aA

Médias seguidas por letra iguais maiúsculas na linha e minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de significância de 1%.

Quanto a massa da matéria seca dos nódulos, o tratamento controle na ausência do Mn apresentou a maior produção (51.15 mg planta⁻¹) diferindo apenas do mix área de mata. Com a presença do Mn apresentou redução da MSN, apesar de que nas doses de 40 e 60 mg dm⁻³ de Mn foram iguais ou superior aos isolados de área de mineração. O mix de área de mata apresentou os maiores valores de MSN na presença do Mn nas doses 20, 60 e 80 mg dm⁻³ diferindo dos demais tratamentos estatisticamente. Na ausência do Mn e na dose de 40 mg dm⁻³ apresentou menores valores de MSN, reflexo da menor produção de nódulos. Os isolados dos mix de área degradada e do rejeito demonstraram ser iguais estatisticamente na produção de matéria seca dos nódulos (Tabela 12).

Tabela 12 - Matéria seca dos nódulos (MSN) das plantas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) submetidas a doses de Mn e quatro tratamentos de inoculação com rizóbio.

Tratamentos de inoculação	Doses de Mn (mg dm ⁻³)				
	0	20	40	60	80
	MSN (mg planta ⁻¹)				
Controle	51,15aA	32,62cB	46,5cA	42,9bA	29,55cB
Mix Área de mata	32,6bB	80,67aA	35,15dB	76,95aA	71,8aA
Mix Área degradada	48,97aB	60,25bA	57,77bA	44,25bB	42,6bB
Mix Rejeito	47,42aB	54,22bB	77,02aA	44bB	50,85bB

Médias seguidas por letra iguais maiúsculas na linha e minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de significância de 1%.

Como podemos observar pelos resultados, as doses de Mn utilizadas nesse estudo não demonstraram grande efeito na relação simbiótica entre macro e microssimbiontes, especialmente na formação de nódulos e na produção de matéria seca. O menor número de nódulos formados no tratamento controle (comunidade nativa) pode ser explicado pelo fato de que há uma baixa comunidade de rizóbios presente no solo capaz de formar simbiose com o

sabiá, espécie vegetal mais seletiva que o feijão caupi por exemplo. Porém, mesmo com o menor número de nódulos, estas estirpes foram capazes de se igualar aos isolados de área de mineração na produção de MSN, demonstrando efeito de “compensação”, ou seja, um aumento no tamanho dos nódulos, comportamento também demonstrado por Dobereiner (1966), Castro *et al.*, (2017) e Rangel (2015).

Os isolados de área de mineração de Mn (mix área de mata, mix área degradada e mix rejeito) demonstraram tolerância à presença do metal no solo, o que também é confirmado por Franco e Döbereiner (1971), onde os autores afirmam que a formação de nódulos é um indicativo de que os mecanismos iniciais a nodulação não foram afetados completamente e pode ser indicador da tolerância da estirpe de rizóbio à presença de Mn em maiores concentrações.

A obtenção de estirpes de rizóbios tolerantes a metais pesados e capazes de formar simbiose eficiente com seus macrossimbiontes, mesmo na presença de concentrações elevadas de metais no solo, é relevante uma vez que essas podem ser recomendadas futuramente para utilização em projetos de revegetação. Os isolados de área de mineração de Mn obtidos no presente estudo apresentaram resultados promissores quanto a questão do funcionamento simbiótico com seu macrossimbionte, podendo futuramente ser recomendados para produção de inoculantes comerciais e utilizados em projetos de recuperação de áreas degradadas e contaminadas por manganês.

O número e a massa da matéria seca dos nódulos se correlacionaram positivamente com a massa da matéria seca da parte aérea das plantas ($r = 0,50$; $p \leq 0,01$; $r = 0,49$; $p \leq 0,01$) respectivamente. Também se correlacionaram positivamente com o teor de nitrogênio ($r = 0,76$; $p \leq 0,01$; $r = 0,55$; $p \leq 0,01$), respectivamente para número e massa da matéria seca dos nódulos, demonstrando elevado potencial na promoção do crescimento das plantas. Nesse caso o número de nódulos seria se constituiria num importante parâmetro para seleção de estirpes (DÖBEREINER, 1966).

4.2.2.4 Teor de nitrogênio e manganês na parte aérea

A análise de variância para as variáveis N, ANPA e Mn (Tabela 13) evidencia efeito significativo do fator isolado BFNN para o teor de N e ANPA, como também efeito da interação dose x rizóbio para teor de Mn da parte aérea.

Tabela 13 - Resumo da análise de variância para teor de nitrogênio (N), acúmulo de nitrogênio (ANPA) e teor de manganês (Mn) na parte aérea para os fatores de tratamento e suas interações em sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.).

F.V.	G.L.	QUADRADO MÉDIO		
		N	ANPA	Mn Parte Aérea
DOSE (A)	4	22,9705 ^{ns}	208,081 ^{ns}	52,603**
BFNN (B)	3	249,841**	1390,734**	65,218**
Int. (A x B)	12	13,297 ^{ns}	200,636 ^{ns}	103,808**
C. V. %		15,14	35,98	24,8

F.V. - Fontes de variação; G.L. – grau de liberdade; (A) – doses de Mn; (B) – tratamentos de inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas; C.V. – coeficiente de variação; **, *, ns – significativo ao nível de 1%, 5% de significância e não significativo pelo teste F, respectivamente.

Em relação ao teor de nitrogênio da parte aérea das plantas de sabiá, o tratamento controle diferiu estatisticamente dos demais, apresentando o menor teor de N. Os isolados de área de mineração foram estatisticamente similares, não apresentando diferenças entre si. O acúmulo de nitrogênio seguiu o mesmo comportamento do teor de N, havendo diferença entre os isolados de área de mineração e o tratamento controle, além de similaridade entre os diferentes mixes (Tabela 14).

Tabela 14 - Teores de Nitrogênio (N) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) em plantas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth) submetidas a tratamentos de inoculação com rizóbios.

Tratamentos de inoculação	N (g kg ⁻¹)	ANPA (mg planta ⁻¹)
Controle	15,31b	18,91b
Mix Área de mata	22a	35,31a
Mix Área degradada	22,49a	35,75a
Mix Rejeito	22,59a	35,68a

Médias seguidas por letra iguais, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de significância de 1%.

Todas as plantas se beneficiaram da fixação simbiótica do N₂ por seus microssimbiontes uma vez que até ao final de 60 dias não se apresentaram sintomas de deficiência desse elemento, já que nenhuma outra fonte foi utilizada. Os isolados rizobianos da área de mineração se mostraram mais eficientes na fixação e consequente disponibilização de N para as plantas. Comparando os isolados do mix rejeito a comunidade nativa do solo (controle), observa-se um incremento em torno de 47,0 % de N na parte aérea das plantas inoculadas. Apesar da inferioridade em teor e acúmulo de N nas plantas pela comunidade rizobianas nativa do solo, deve-se levar em consideração que mesmo com uma menor produção de nódulos (no máximo 3 nódulos por planta) (Tabela 11), essas estirpes nativas foram capazes de aportar uma considerável quantidade de N para as plantas.

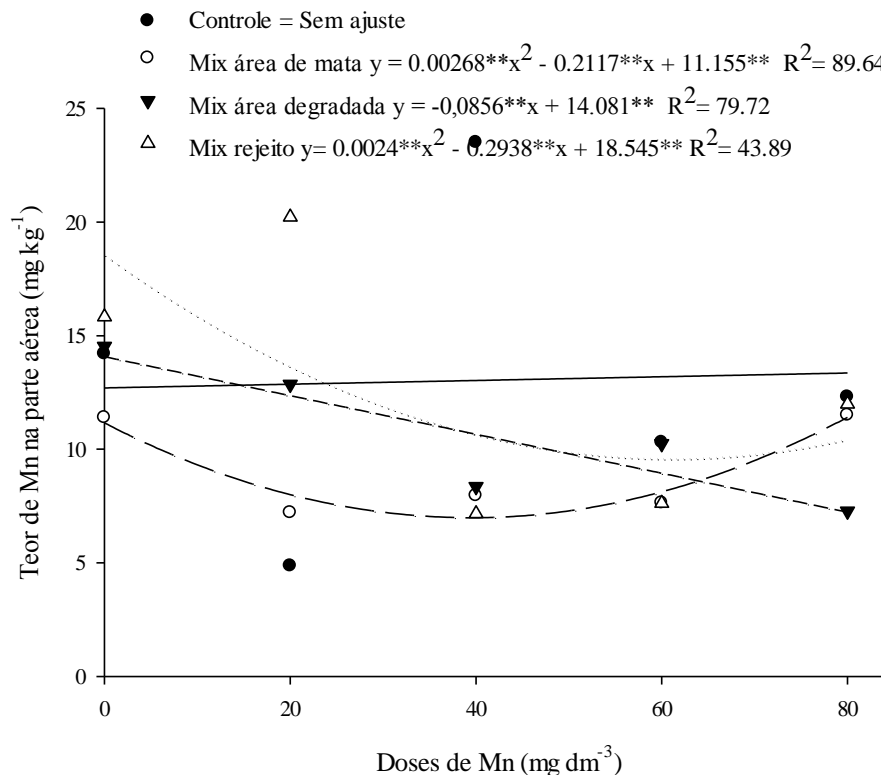
Malavolta; Vitti e Oliveira (1997) sugerem que os teores considerados adequados de N para espécies florestais se situem na faixa de 16 a 35 g kg⁻¹, valores encontrados em todas as

plantas desse experimento. Ferreira *et al.* (2013), avaliando o efeito de metais pesados sobre a simbiose de *Mimosa caesalpiniaefolia* e estirpes de *Cupriavidus necator* (uma bactéria do solo Gram-negativa da classe das betaproteobacterias), detectaram teores de N na parte aérea das plantas na faixa de 32 a 39 g kg⁻¹. Resultados semelhantes foram também obtidos por Ferreira *et al.* (2012), estudando a eficiência simbiótica da mesma associação, com teores na planta variando de 11,0 a 36,5 g kg⁻¹, sendo o valor máximo de acúmulo de nitrogênio na planta cerca de 6 mg planta⁻¹.

Analisando o desdobramento da interação doses x rizóbios para a variável teor de manganês na parte aérea, verificou-se diferença estatística significativa para os tratamentos de inoculação com mix área de mata, mix área degradada e mix rejeito. O tratamento controle não permitiu ajuste matemático (Figura 11).

Os dados do tratamento mix área de mata se ajustaram ao modelo de regressão quadrático no qual o teor mínimo de Mn (6,97 mg kg⁻¹) foi obtido na dose 39,4 mg dm⁻³. O mix área degradada se ajustou ao modelo de regressão linear decrescente, havendo diminuição no teor de Mn na parte aérea das plantas de acordo com o aumento dos níveis de Mn no solo. O mix rejeito se ajustou ao modelo de regressão quadrático no qual o teor mínimo de Mn (9,55 mg kg⁻¹) foi obtido na dose de 61,20 mg dm⁻³ de Mn (Figura 11).

Figura 11 - Teor de Manganês na parte aérea de plantas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) submetidas a doses de manganês e tratamentos de inoculação com rizóbios.

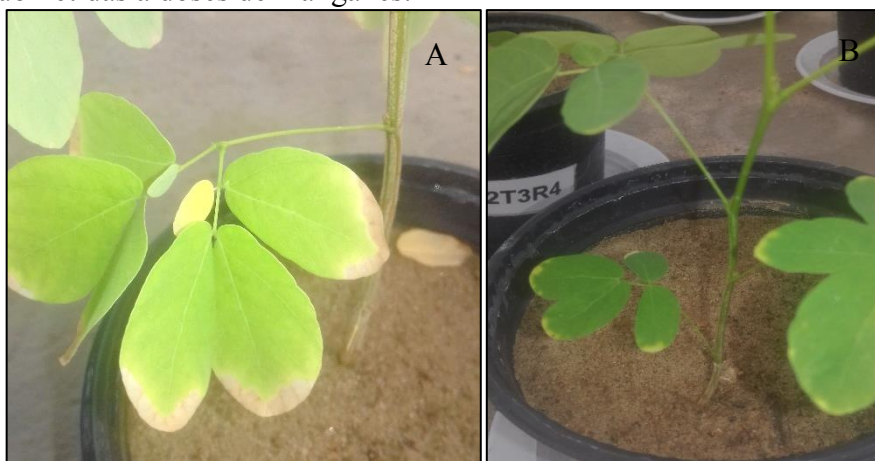


De uma maneira geral observa-se que os tratamentos de inoculação com os isolados rizobianos demonstraram influência no teor de manganês na parte aérea das plantas, havendo uma diminuição desse teor com o aumento dos níveis de Mn no solo. Chen *et al.* (2008) observaram um aumento na absorção de Pb, Cu e Cd em plantas de *Mimosa pudica* inoculadas com *Cupriavidus taiwanensis* quando comparadas às plantas não inoculadas. Já Wani e Khan (2013), estudando a associação da estirpe de *Rhizobium* RL9 com plantas de lentilha, observaram decréscimo na absorção de níquel comparada às plantas que não foram inoculadas.

Conforme Brígido e Glick (2015), um dos meios para a diminuição na absorção de metais pelas plantas inoculadas com rizóbios seria devido a acumulação dos metais nos nódulos radiculares pelas estirpes que nodulam seus hospedeiros, enquanto que as estirpes livres que permanecem na rizosfera fazem a detoxificação por diferentes mecanismos, como por exemplo a liberação de exopolissacarídeos que podem se ligar a vários metais, inclusive o Mn^{2+} , podendo assim serem utilizadas na fitoestabilização desses metais. Outra forma de explicar a diminuição do teor de Mn na parte aérea das plantas seria pela promoção do crescimento das plantas estimulado pelas bactérias, aumentando a produção de biomassa aérea e assim induzindo um efeito de diluição do elemento no tecido vegetal (ZANÃO JÚNIOR *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de sintomas de toxidez de Mn nas plantas do experimento iniciaram-se 30 dias após o plantio das sementes, caracterizados pelo aparecimento de manchas cloróticas na margem das folhas e que posteriormente evoluíam à necrose do tecido (HORST *et al.*, 1999). Visualmente as plantas inoculadas com os diversos isolados rizobianos da área de mineração de Mn apresentaram uma menor intensidade dos sintomas de toxidez quando comparadas àquelas do tratamento controle (Figura 12).

Figura 12 - Sintomas de toxidez de Mn em plantas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) inoculadas por rizóbios nativos do solo (Controle) (A) e rizóbios isolados de área de mineração de Mn (B) submetidas a doses de manganês.



Os relatos na literatura indicam que leguminosas podem ser utilizadas para remediação de áreas contaminadas por metais por duas formas: fitoestabilização e fitoextração. A principal contribuição dos rizóbios para esses processos parece ser a capacidade de promover um maior crescimento das plantas e assim diluindo o elemento no tecido vegetal (BRÍGIDO; GLICK, 2015; HAO *et al.*, 2014). Assim diante do que foi exposto, pode ser sugerido que o menor acúmulo de Mn na parte aérea das plantas foi influenciado pela presença de células dos isolados rizobianos na rizosfera dos tratamentos inoculados com os diversos mixes, o que pode reduzir a toxicidade de metais por processos de precipitação, quelação, imobilização e biossorção, por meio do acúmulo de metal nos nódulos e pela promoção do crescimento das plantas por esses isolados.

A associação entre macro e microsimbiontes observada aqui nesse estudo parece ser de maior utilidade para processos de fitoestabilização de manganês, onde é necessário nesta técnica uma maior acumulação do metal no sistema radicular, facilitando a imobilização e diminuindo a sua disponibilidade no sistema (HAO *et al.*, 2014; SANTIBÁÑEZ; VERDUGO; GINOCCHIO, 2008; ULLAH *et al.*, 2015).

Em projetos de recuperação de áreas degradadas incentiva-se sempre, entre outras recomendações, o uso de espécies leguminosas por serem essas plantas em sua maioria capazes de estabelecer relações simbióticas com organismos procariotos fixadores de nitrogênio, como é o caso do sabiá, *Mimosa caesalpiniaefolia* (Chen, et al., 2008). Esse incentivo, no entanto, deve ser precedido de mais pesquisas para a avaliação do potencial de nodulação dessas estirpes em condições locais específicas e identificação de microsimbiontes mais tolerantes a fatores edáficos adversos, como no caso da presença de grandes quantidades de Mn dessas áreas estudadas. Assim, os isolados obtidos nesse estudo apresentam potencial para futuramente serem usados como inoculantes recomendados para a revegetação desses solos.

5 CONCLUSÕES

Todos os isolados rizobianos das áreas degradadas pela mineração de manganês são capazes de induzir a formação de nódulos radiculares e fixar nitrogênio em feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) e sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.).

Tanto os isolados da área degradada pela mineração de Mn quanto as estirpes nativas do substrato utilizado são tolerantes à presença do Mn nas concentrações estudadas.

As estirpes rizobianas nativas do substrato utilizado, em simbiose com feijão caupi, apresentam tolerância intrínseca ao Mn nas concentrações estudadas e são altamente competitivas com os isolados rizobianos das diversas áreas degradadas pela mineração de Mn.

Os isolados da área degradada pela mineração de Mn, em simbiose com sabiá, são capazes de aumentar a tolerância desta espécie ao excesso de Mn no solo, por meio da simbiose efetiva e eficiente na fixação de N₂ promovendo o crescimento da planta.

Mais estudos devem ser realizados sobre esses isolados com intuito de conhecer melhor os mecanismos bioquímicos envolvidos no aumento da tolerância a concentrações mais elevadas de Mn no solo, bem como o potencial de emprego desses isolados na produção de inoculantes comerciais para revegetação desses solos degradados.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDDER, M. Most probable number method for microbial populations. In: BLACK, C. A.; **Methods of Soil analysis - Chemical and microbiological properties**. Madison, American Society of Agronomy, v.2, 1965, p.1467-1472.
- ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals - concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869–881, 2013.
- ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils: Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability**, Vol. 22, Springer Dordrecht Heidelberg New York London, 2012.
- ALMEIDA, R. O. P. O.; SANCHEZ, L. E. Revegetação de áreas de mineração: critérios de monitoramento e avaliação do desempenho. **Revista. Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 47-54, 2005.
- AMARA, D. S.; MOHJADI, W. A.; MILLER, R. H. Tolerance of *Rhizobium phaseoli* to acidity, aluminium and manganese. **Mircen Journal**, v. 2, p. 289-299, 1986.
- ANDRADE, A. G.; COSTA, G.S.; FARIA, S. M. Deposição e decomposição da serapilheira em povoamentos de *Mimosa caesalpinifolia*, *Acacia mangium* e *Acacia holosericea* com Quatro ano de Idade em Planossolo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.777-785, 2000.
- ARORA, M.; KIRAN, B.; RANI, S.; RANI, A.; KAUR, B.; MITTAL, N. Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. **Food Chemistry**, v. 111, p. 811–815, 2008.
- AZEVEDO, C. P.; LIMA, R. M. B.; NEVES, E. J. M. Seleção e Manejo de Espécies Florestais para Fins Energéticos na Região de Iranduba AM. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 1998. 6 p. (**Pesquisa em Andamento**, 41).
- BAKER, A. J. M.; ERNST, A. W. H. O.; VAN DER ENT, F. MALAISSE, A.R. GINOCCHIO. **Metallophytes: the unique biological resource, its ecology and conservational status in Europe, central Africa and Latin America**. L.C. Batty, K.B. Hallberg (Eds.), Ecology of Industrial Pollution, Cambridge University Press, Cambridge (2010), pp. 7–40.
- BEANE, S. J.; COMBER, S. D.; RIEUWERTS, J.; LONG, P. Abandoned metal mines and their impact on receiving waters: a case study from Southwest England. **Chemosphere**, v 153, p. 294–306, 2016.
- BORGESA, W. L.; PRINB, Y.; DUCOUSSOB, M.; ROUXB, C. L.; FARIA, DE S. M.; Rhizobial characterization in revegetated areas after bauxite mining. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 314–321, 2016.
- BRASIL. **Decreto nº 97.632**, de 10 de Abril de 1989. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/topicos/11926352/artigo-1-do-decreto-n-97632-de-10-de-abril-de-1989>>. Acesso em: 09 set. 2016.
- BRÍGIDO, C.; GLICK, B. R. Phytoremediation Using Rhizobia. In: ANSARI, A. A. *et al.* (Eds.). **Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants, Volume 2**. 1.

- ed. [s.l.] Springer International Publishing, 2015. p. 366.
- CALLAHAN, D. L.; BAKER, A. J. M.; KOLEV, S. D.; WEDD, A. G. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.11, p. 2–12, 2006.
- CARVALHO, P.E.R. **Sabiá *Mimosa caesalpiniiifolia***. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 10p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 135).
- CASTRO, J. L. DE *et al.* Diversity and efficiency of rhizobia communities from iron mining areas using cowpea as a trap plant. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 41, p. 1–20, 2017.
- CHAER, G. M.; RESENDE, A. S.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M.; BODDEY, R. M. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree Physiology**, v. 31, p. 139–149, 2011.
- COPELAND, C. **Mountain top mining: background on current controversies**. Congressional Research Service, Library of Congress, Washington. 2007.
- CORREA, O. S.; BARNEIX, A. J. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13(2), p. 153-157, 1997.
- CRAUFURD, P. Q.; SUMMERFIELD, R. J.; ELL, R. H.; ROBERTS, E. H. Photoperiod, temperature and the growth and development of cowpea (*Vigna unguiculata*). In: SINGH, B. B.; MOHAN, R. D. R.; DASHIELL, K. E.; JACKAI, L. E. N. (eds) **Advances in Cowpea Research**. Copublication Intl Inst Tropical Agric (IITA) and Japan Intl Res Center Agric Sci (JIRCAS). Sayce, Devon, UK, p. 75–86, 1997.
- CUBILLAS, C.; VINUESA, P.; TABCHE, M. L.; DÁVALOS, A.; VÁZQUEZ, A.; LUCAS, I. H.; Romeroa, D.; Santos, A. G. The cation diffusion facilitator protein EmfA of *Rhizobium etli* belongs to a novel subfamily of Mn²⁺/Fe²⁺ transporters conserved in α -proteobacteria. **Metallomics**, v. 6, p. 1808—1815, 2014.
- DAS, A. P.; SUKLA, L. B.; PRADHAN, N. Microbial recovery of manganese using *Staphylococcus epidermidis*. **International Journal Nonferrous Metall**. v. 1, p. 9–12, 2012.
- DE JONG, J. T.; SOGA, K.; BANWART, S. A.; WHALLEY, W. R.; GINN, T. R.; NELSON, D. C.; MORTENSEN, B. M.; MARTINEZ, B. C.; BARKOUKI, T. Soil engineering in vivo: harnessing natural biogeochemical systems for sustainable, multi-functional engineering solutions. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 8, p. 1–15, 2011.
- DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL – DNPM. **Sumário mineral. Brasília**, 2015. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/dnpm/sumarios/sumario-mineral-2015>. Acesso em: 21 de agosto de 2016.
- DIONÍSIO, J. A.; PIMENTEL, I. C.; SIGNOR, D.; PAULA, A. M.; MACEDA, A.; MATTANA, A. L. **Guia prático de Biologia do solo**. Paraná: Sociedade brasileira de ciências do solo. Paraná, 2016. 152 p.

DOBEREINER, J. Manganese toxicity effects on nodulation and nitrogen fixation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.), in acid soils. **Plant and Soil**. v. XXIV, no. I. p. 1966.

EMPRAPA - Empresa brasileira de agropecuária. **Manual de métodos de análise de solo / Centro Nacional de Pesquisa de Solos**. 3. Ed., 2017, 575p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Recuperação de Áreas Degradadas**. 2008. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/unidade/index.php3?id=229&func=unid>>. Acesso em: 31 de Agosto de 2016.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 230p.

FARIAS, T. P.; TROCHMANN, A.; SOARES, B. L.; MOREIRA, F. M. S. Rhizobia inoculation and liming increase cowpea productivity in Maranhão State. **Acta Scientiarum. Agronomy**. v. 38, n. 3, p. 387-395, 2016.

FAO. 1980. **Metodología provisional para evaluar la desertificación de los suelos**. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. FAO. Roma, Italia.

FAO. 2016. **Cajanus cajan (L.) Millsp.** FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/gbase/data/pf000150.htm>>. Acesso em: 02 de janeiro de 2017.

FERREIRA, P. A. A., BOMFETI, C. A., SILVA JÚNIOR, R. DA., SOARES, B. L., SOARES, C. R. F. S., MOREIRA, F. M. S. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v. 47, n. 1, p. 85-95, 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.

FERREIRA, P. A. A. *et al.* Leguminous plants nodulated by selected strains of *Cupriavidus necator* grow in heavy metal contaminated soils amended with calcium silicate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 11, p. 2055–2066, 2013.

FOY, C. D. Plant adaptation to mineral stress problem in soils, **Iowa State J. Res.** v. 57, p. 339. 1983.

FRANCO, A. A.; DOBEREINER, J. Toxidez De Manganês De Um Solo Ácido Na Simbiose Soja – *Rhizobium*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Sér. Agron., v. 6, p. 57-66. 1971.

FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: Araújo, J. P. P. de; Watt, E. E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília, DF: IITA: EMBRAPA, 1988. p. 26-46.

FREIRE FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J.; ARAÚJO, A. G. de. Caupi: nomenclatura científica e nomes vulgares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 18, n. 12, p. 1369-1372, 1983.

GALIANA, A.; CHAUMONT, J.; DIEM, H. G.; DOMMARGUES, Y. R. Nitrogen fixation potential of *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* seedlings inoculated with

Bradyrhizobium and *Rhizobium* spp. **Biology and Fertility of Soils**. v. 9, p. 261-267, 1990.

GALIANA A.; BALLE P.; N' GUESSAN KANGA A.; DOMENACH A. M. Nitrogen fixation estimated by the ¹⁵N natural abundance method in *Acacia mangium* Willd. Inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and grown in silvicultural conditions. **Soil Biology and Biochemist**. v. 34, p. 251–262, 2002.

GANESAN, V. Rhizoremediation: A pragmatic approach for remediation of heavy metal-contaminated soil. In: ZAIDI, A.; WANI, P.A.; KHAN, M. S. **Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation**. Springer-Verlag Wien. 147-161. 2012

GARCIA, K. G. V , GOMES, V. F. F. ALMEIDA, A. M. M. MENDES FILHO, P. F. Micorrizas arbusculares no crescimento de mudas de sabiá em um substrato proveniente da mineração de manganês. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, Nº 2, p. 15-20, 2016

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, n. 2, p. 235–244, 1963.

GLICK, B. R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. **Biotechnology Advances**. v. 28, p. 367-374, 2010.

GHOSH, S.; MOHANTY, S.; NAYAK, S.; SUKLA, L. B.; DAS, A. P. Molecular identification of indigenous manganese solubilising bacterial biodiversity from manganese mining deposits. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, p. 1–9, 2015.

GREIPSSON, S. **Phytoremediation**. Nat. Educ. Knowl. 2, 7, 2011.

HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R. **Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl)** **Current Opinion in Plant Biology**, 2009. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S1369526609000429/1-s2.0-S1369526609000429-main.pdf?_tid=6e1c63ac-0cce-11e8-bbe3-00000aab0f26&acdnat=1518094319_30371ce0449760b1e55a704f4f3494bb>. Acesso em: 8 fev. 2018

HAO, X. *et al.* Phytoremediation of Heavy and Transition Metals Aided by Legume-Rhizobia Symbiosis. **International Journal of Phytoremediation**, v. 16, n. 2, p. 179–202, 2014.

HORST, W. J. *et al.* Physiology of manganese toxicity and tolerance in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde**, v. 162, n. 3, p. 263–274, 1999.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I.; **The water culture method of growing plants without soil**, 32p, 1950.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S.; **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. EMBRAPA, 1994, 552.p.

IBAMA. **Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração: técnicas de revegetação**. Brasília, 96 p. 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. **Informações e Análises da Economia Mineral Brasileira**. 2012. Disponível em: <http://www.ibram.org.br/>. Acesso em: 17 de Agosto de 2016.

KABATA-PENDIAS. A. **Trace elements in soils and plants**. 4th ed. 534p, 2011

KOSSOFF, D.; HUDSON-EDWARDS, K. A.; HOWARD, A. J.; KNIGHT, D. Industrial mining heritage and the legacy of environmental pollution in the Derbyshire Derwent catchment: quantifying contamination at a regional scale and developing integrated strategies for management of the wider historic environment. **Journal of Archaeological Science: Reports**. v. 6, p. 190–199, 2016;

LEI, K.; PAN, H.; LIN, C. A landscape approach towards ecological restoration and sustainable development of mining áreas. **Ecological Engineering**. v. 90, p. 320–325. 2016

LIMA, P. C. F.; LIMA, A. Q.; DRUMOND, M. A. Choice of species for recovering a degraded mining area in the semiarid zone of Brasil. In LEMONS, J.; VICTOR, R.; SCHAFFER, D. **Conserving Biodiversity in Arid Regions: best practices in developing nations**. by Springer Science+Business Media New York. p 299-314, 2003.

LIU, J.; ZHANG, X. H.; LI, T. Y.; WU, Q. X.; JIN, Z. J. Soil characteristics and heavy metal accumulation by native plants in a Mn mining area of Guangxi, South China. **Environmental Monitoring Assessment**. v. 186, p. 2269–2279, 2014.

LONGO, R. M.; RIBEIRO, A. Í.; MELO, W. J. de. Uso da adubação verde na recuperação de solos degradados por mineração na floresta amazônica. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p.139-146, 2011b.

LONGO, R. M.; RIBEIRO, A. Í.; MELO, W. J. DE. Recuperação de solos degradados na exploração mineral de cassiterita: biomassa microbiana e atividade da desidrogenase. **Bragantia**, v. 70, n. 1, p.132-138, 2011a.

MATIAS, S. R.; PAGANO, M. C.; MUZZI, F. C.; OLIVEIRA, C. A.; CARNEIRO, A. A.; HORTA, S. N.; SCOTTI, M. R. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. **European Journal of Soil Biology**. v. 45, p. 259–266, 2009.

MA, Z.; CHEN, K.; LI, Z.; BI, J.; Huang, L. Heavy metals in soils and road dusts in the mining areas of Western Suzhou, China: a preliminary identification of contaminated sites. **Journal of Soils and Sediments**. v. 16, p. 204–214, 2016

MAIA, G. N. **Caatinga árvores e arbustos e suas utilidades**. 2.ed, 2012, p.333-341

MALAVOLTA, E. **Manual de Nutrição Mineral de Plantas**. 1. ed. São Paulo: Editora Agronomica Ceres Ltda, 2006.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. . **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Associação ed. Piracicaba: [s.n.].

MARQUES, T. C. L. L. D. S. E M.; MOREIRA, F. M. D. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com metais pesados. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 121–132, 2000.

MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. D. S.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 343–355, 2002.

MARTINS, P. G.S.; MARIO JUNIOR, A. L.; FRACETTO, G. G. M.; SILVA, M. L. R. B. da.; VINCENTIN, R. P.; LYRA, M. C. C. P. *Mimosa caesalpinifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**. v. 197, p. 459–469, 2015

MARTINS, S. V. **Recuperação de áreas degradadas: Ações em áreas de preservação permanente, voçorocas, taludes rodoviários e de mineração**. 3.ed. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2014b. 264p.

MENDES FILHO, P. F.; VASCONCELLOS, R. L. F.; PAULA, A. M. DE.; CARDOSO, E. J. B. N. Evaluating the Potential of Forest Species Under “Microbial Management” for the Restoration of Degraded Mining Areas. **Water Air Soil Pollution**. v. 208, p. 79–89, 2010

MICÓ, C.; RECATALÁ, L.; PERIS, M.; SÁNCHEZ, J. Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. **Chemosphere**. v. 65, p. 863–872, 2006.

MILLALEO, R. *et al.* Manganese As Essential and Toxic Element for Plants: Transport, Accumulation and Resistance Mechanisms. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 10, n. 4, p. 470–481, 2010.

MISRA, S. G.; MANI, D. **Soil pollution**. Ashish Publishing House, Punjabi Bagh, 1991.

MOREIRA, V. F.; PEREIRA, A. J.; GUERRA, J. G. M.; GUEDES, R. E.; COSTA, J. R. **Produção de biomassa de guandu em função de diferentes densidades e espaçamentos entre sulcos de plantio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 5 p. (Comunicado Técnico, 57).

MOREIRA, F. M. S.; FERREIRA, P. A. A.; VILELA, L. A. F.; CARNEIRO, M. A. C. Symbioses of Plants with Rhizobia and Mycorrhizal Fungi in Heavy Metal-Contaminated Tropical Soils. In SHERAMETI, I.; VARMA, A. **Heavy Metal Contamination of Soils: Monitoring and Remediation**. Springer International Publishing Switzerland 2015, p. 215-244.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*, 5. ed., Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

NAGAJYOTI, P. C.; LEE, K. D.; SREEKANTH, T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**. v. 8, p. 199–216. 2010

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Mangium and other fast-growing acacias for the humid tropics**. National Academy Press, Washington D.C. 1983. 62 p.

PADMAVATHIAMMA, P. K.; LI, L. Y. Phytoremediation technology: hyperaccumulation metals in plants. **Water, Air, and Soil Pollution**. v. 184(1-4), p. 105–126. 2007

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B.; MOHAN RAJ, D. R.; DASHIELL, K. E.; JACKAI, L. E. N. (Ed.).

Advances in cowpea research. Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture; Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, 1997. p. 1-12.

PAJUELO, E.; RODRIGUEZ-LLORENTE, I. D.; DARY, M.; PALOMARES, A. J. Toxic effects of arsenic on *Sinorhizobium e Medicago sativa* symbiotic interaction. **Environmental Pollution**. v.154, p. 203-211, 2008

PENG, K. J.; LUO, C. L.; YOU, W. X. LIAN, C.; LI, X.; SHEN, Z. Manganese uptake and interactions with cadmium in the hyperaccumulator—*Phytolacca Americana* L. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154(1), pp.674-681, 2008

PEOPLES, M.B.; HERRIDGE, D.F.; LADHA, J.K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of Nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant and Soil**, v. 174, p. 3–28. 1995

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Reviews Plant Biology**. v. 56, p. 15–39, 2005

PRASAD, M. N. V.; FREITAS, H. M. Metal hyperaccumulation in plants. Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 6, p. 287–321, 2003.

QUEIROZ, L. P. de. **Leguminosas da caatinga**. 2009, 914p.

RANGEL, W. M. *et al.* Native rhizobia from Zn mining soil promote the growth of *Leucaena leucocephala* on contaminated soil. **International Journal of Phytoremediation**, v. 19, n. 2, p. 142–156, 2017.

RASHED, M. N. Monitoring of contaminated toxic and heavy metals from mine tailing through age accumulation in soil and some wild plants at Southeast Egypt. **Journal Hazardous Materials**, v. 178, p. 739–746, 2010.

RATNAPARKHE, M. B.; GUPTA, V. S. Pigeonpea. In KOLE, C. **Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants**, Vol. 3, Pulses, Sugar and Tuber Crops. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007. p 321.

RAYOL, B. P.; ALVINO-RAYOL, F. de O. Uso de feijão guandú (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) para adubação verde e manejo agroecológico de plantas espontâneas em reflorestamento no estado do Pará. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 7(1), p. 104-110, 2012.

ROSSI, L. M.B.; AZEVEDO, C. P. DE.; SOUZA, C. R. de. **Acacia mangium**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2003. 32 p. (Documentos, 28).

ROSCH, J. W.; GAO, G.; RIDOUT, G.; WANG, Y. D.; TUOMANEN, E. I. Role of the manganese efflux system *mntE* for signalling and pathogenesis in *Streptococcus pneumoniae*. **Molecular Microbiology**, v. 72(1), p. 12–25, 2009.

SAMBA, R.T.; NEYRA, M.; LESUEUR, D. Natural nodulation of *Acacia mangium*–*Acacia auriculiformis* hybrids: distribution of the indigenous strains in the nodules. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1485–1488, 2007.

SANTANA, A. L. **Economia mineral do Brasil 2009 - Manganês**. Brasília: Departamento

Nacional de Produção Mineral/DNPM, 2009. 12p.

SANTIBÁÑEZ, C.; VERDUGO, C.; GINOCCHIO, R. Phytostabilization of copper mine tailings with biosolids: Implications for metal uptake and productivity of *Lolium perenne*. **Science of The Total Environment**, v. 395, n. 1, p. 1–10, 2008.

SCHIAVO, J. A.; BUSATO, J. G.; MARTINS, M. A.; CANELLAS, L. P. Recovery of degraded areas revegetated with *Acacia mangium* and *Eucalyptus* with special reference to organic matter humification. **Scientia Agricola**, v. 66, n.3, p.353-360, 2009.

SHARMA, S. K.; KUMAR, P.; RAO, R. V.; SUJATHA, M.; SHUKLA, S. R. . Rational utilization of plantation grown *Acacia mangium* willd. **Journal of the Indian Academy of Wood Science**, v. 8, p. 97–99, 2011.

SILVA, F. C. DA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

SOARES, B. L.; FERREIRA, P. A. A.; OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; MARRA, L. M.; RUFINI, M.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Cowpea sybiotic efficiency, pH and aluminium tolerance in nitrogen-fixing bacteria. **Scientia Agricola**, v. 71(3), p. 171-180, 2014.

SOUZA, L. A. G. DE.; BEZERRA NETO, E.; SANTOS, C. E. R. S.; Stamford, N. P. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.2, p.207-217, 2007.

SPRENT, J. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 161, p. 1-10, 1994.

SPENCER, D. The effects of calcium and soil pH in nodulation of *T. subterraneum* L., clover on yellow podsol. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 374–381, 1950.

TEDESCO, M. J.; BOHNEM, H.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2ª ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p. (Boletim Técnico, 5).

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre "in vitro". **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, vol. 25, núm. 2, 2001, pp. 305-316.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e nodulação de *Acacia mangium*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Sesbania virgata* em solo contaminado com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, n. 3, p. 743–753, 2001.

U.S. GEOLOGICAL SURVEY (USGS). 2015. **Mineral Commodity Summaries 2015**. Washington. U.S. Geological Survey. 196 p. 2015. Disponível em: <<http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2015/mcs2015.pdf>>. Acesso em: 21 de agosto de 2016.

ULLAH, A. *et al.* **Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review** **Environmental and Experimental Botany**, 2015. Disponível em:

<https://ac.els-cdn.com/S0098847215000842/1-s2.0-S0098847215000842-main.pdf?_tid=9c8529e6-0d1d-11e8-b697-00000aacb35d&acdnat=1518128327_8e9cfa30f58a03e2e4a33cc70caed6ac>. Acesso em: 8 fev. 2018

VENKATESWARLU, K.; NIROLA, R.; KUPPUSAMY, S.; THAVAMANI, P.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Abandoned metalliferous mines: ecological impacts and potential approaches for reclamation. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 15, p. 327–354, 2016.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford, BlackwellScientific, (InternationalBiologicalProgrammeHandbook), 1970, 164p

WEI, Y.; HOU, H.; SHANGGUAN, Y.; LI, J.; LI, F. Genetic diversity of endophytic bacteria of the manganese hyperaccumulating plant *Phytolacca americana* growing at a manganese mine. **European Journal of Soil Biology**, v. 62, p. 15-21, 2014.

WONG, M. H., Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. **Chemosphere**, v. 50, p. 775–780, 2003.

YOON, J.; CAO, X.; ZHOU, Q.; MA, L. Q. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. **Science of the Total Environment**, v. 368, p. 456–464, 2006.

YADA, M. M.; MINGOTTE, F. L. C.; MELO, W. J. DE.; MELO, G. P. DE.; MELO, V. P. DE.; LONGO, R. M.; RIBEIRO, A. Í. Atributos químicos e bioquímicos em solos degradados por mineração de estanho e em fase de recuperação em ecossistema Amazônico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39(3), p. 714-724, 2015.

ZANÃO JÚNIOR, L. A. *et al.* ABSORÇÃO DE CÁLCIO E FERRO POR ARROZ CULTIVADO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA COM DOSES DE SILÍCIO E MANGANÊS. **Scientia**, v. 11, n. 3, p. 263–269, 2010.

ZHANG, C.; YU, Z. G.; ZENG, G. M.; JIANG, M.; YANG, Z. Z.; CUI, F.; ZHU, M. I.; SHEN, L. Q.; HU, L. Effects of sediment geochemical properties on heavy metal bioavailability. **Environment International**, v. 73, p. 270–281, 2014.

ZHANG, X.; YANG, L.; LI, Y.; LI, H.; WANG, W.; YE, B. Impacts of lead/zinc mining and smelting on the environment and human health in China. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 184, p. 2261–2273, 2012.

ZHUANG, X., CHEN, J., SHIM, H., BAI, Z., New advances in plant growth promoting rhizobacteria for bioremediation. **Environmental International**, v. 33, p. 406-413, 2007.