



**ELZANE FREITAS LEITE SILVA**

**SOIL, PLANTS AND MICROORGANISMS IN AREAS OF Mn  
MINING TAILINGS 12 YEARS AFTER REVEGETATION BY  
DIFFERENT TECHNIQUES**

**LAVRAS-MG**

**2019**

**ELZANE FREITAS LEITE SILVA**

**SOIL, PLANTS AND MICROORGANISMS IN AREAS OF Mn MINING TAILINGS  
12 YEARS AFTER REVEGETATION BY DIFFERENT TECHNIQUES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência do Solo, área de  
concentração em Biologia, Microbiologia e  
processos biológicos do solo, para a obtenção do  
título de Doutora.

Prof. Dr. José Oswaldo Siqueira  
Orientador

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira  
Coorientadora

**LAVRAS-MG**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Elzane Freitas Leite.

Soil, plants and microorganisms in areas of mn mining tailings  
12 years after revegetation by different techniques / Elzane Freitas  
Leite Silva. - 2019.

93 p. : il.

Orientador(a): José Oswaldo Siqueira.

Coorientador(a): Fatima Maria de Souza Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Barragem de rejeitos. 2. Formas de Mn.. 3. Colonização  
micorrízica. 4. Bactérias redutoras de Mn.. 5. Rizosfera Diversidade  
de FMA.. I. Siqueira, José Oswaldo. II. Moreira, Fatima Maria de  
Souza. III. Título.

**ELZANE FREITAS LEITE SILVA**

**SOIL, PLANTS AND MICROORGANISMS IN AREAS OF Mn MINING TAILINGS  
12 YEARS AFTER REVEGETATION BY DIFFERENT TECHNIQUES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência do Solo, área de  
concentração em Biologia, Microbiologia e  
processos biológicos do solo, para a obtenção do  
título de Doutora.

APROVADA em 24 de abril de 2019.

Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro	UFLA
Prof. Dr. Teotonio Soares de Carvalho	UFLA
Dr. Marco Antonio Nogueira	EMBRAPA Soja
Dr. Sílvio Junio Ramos	ITV

Prof. Dr. José Oswaldo Siqueira  
Orientador

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira  
Coorientadora

**LAVRAS-MG**

**2019**

Às famílias da qual faço parte: à originária, à incorporada e à constituída. E também, aos futuros e atuais pesquisadores da área, esta pesquisa realizada com muito esforço e dedicação em colaboração aos estudos em ciência do solo.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo  
à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG.  
Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq.*

A Deus por Sua presença viva em todos os momentos desta jornada.

Aos membros do comitê de orientação Jose Oswaldo Siqueira e Fatima Maria de Souza Moreira pelo aprimoramento na redação científica.

Aos funcionários da Vale S.A.: Rafael Almeida, Marlene Costa e Delmo Fonseca pelo subsídio logístico e auxílio nas coletas de solo e planta.

Aos pesquisadores da Embrapa Soja: Dra. Biana Kuwano e Dr. Marco Antonio Nogueira pela recepção e pelo treinamento no isolamento de bactérias oxidantes e redutoras de Mn.

Aos funcionários do departamento de Ciência do Solo: Manoel Aparecido, Marlene Aparecida, Geila Carvalho, Roberto Lelis, Dirce de Cássia, José Roberto (Pezão) pela viabilização do trabalho.

À Paula Almeida pelo auxílio e à Amanda Azarias pelo treinamento em análises moleculares. À Wesley Rangel pela revisão dos textos. Ao prof. Dr. Teotonio Soares pela realização da análise estatística.

À acadêmica Júlia Fonseca pelo empenho na finalização das atividades.

Aos colegas de profissão do laboratório de Microbiologia do Solo em especial Franciane Cogo, Jacqueline Savana, Tainara Rodrigues, Fabrício Salgado e Thiago Palhares que acompanharam o desenvolvimento do trabalho e foram um grande apoio em muitos momentos.

Aos meus pais, Sra. Elza e Sr. Antonio, gratidão eterna e indescritível pelo amor incondicional.

À minha avó Luiza, aos meus irmãos, Elisrejane e Eduardo, aos meus sogros, Sra. Maria Guiomar e Sr. Antonio Jorge e aos meus cunhados, Jakelinne e Leandro, pela torcida e apoio.

Ao meu esposo João Marcos, grande e eterno amor, foi responsável, em grande parte, pela concretização deste trabalho. Aos nossos filhos, João Miguel e Samuel, a chegada de vocês tornou a finalização desta jornada muito mais alegre e estimulante.

**OBRIGADA!**

“O bom Deus não poderia inspirar desejos irrealizáveis”.

(Santa Teresinha do Menino Jesus, 1873-1897)

## RESUMO

Embora o Mn seja um elemento essencial para as plantas, em quantidades excessivas no solo pode atingir níveis tóxicos para o crescimento vegetal. Para o sucesso da revegetação de áreas com rejeitos de mineração de Mn deve-se considerar além da melhor técnica, a escolha de espécies vegetais adaptadas a esta condição. Além disso, a avaliação da comunidade microbiana do solo e àquela associada a vegetação pode indicar o progresso da recuperação. O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de espécies vegetais em crescimento no sub-bosque, teores de Mn na planta e no solo, colonização micorrízica, comunidades de bactérias redutoras e oxidantes de Mn e de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), após a revegetação por plantio de mudas e aplicação de topsoil em área de deposição de rejeito do beneficiamento de Mn, comparativamente a uma área com floresta nativa e um local não revegetado. Amostras de plantas (três indivíduos/espécie), de solo rizosférico e de solo não rizosférico foram coletadas dos locais revegetados e da floresta. O uso de topsoil promoveu maior diversidade de plantas que o plantio de mudas. Os elevados teores de Mn dos substratos não influenciaram a ocorrência da vegetação no sub-bosque e a colonização micorrízica. As espécies vegetais estabelecidas nas áreas diferiram quanto ao teor de Mn (471–27842 mg kg<sup>-1</sup> nas folhas), fator de translocação (0,2–125,3) e colonização micorrízica (1–35%). Foram identificadas quatro espécies vegetais potencialmente hiperacumuladoras de Mn: *Aparisthium cordatum*, *Clidemia hirta*, *Socratea exorrhiza* e *Vismia latifolia*. No solo não rizosférico detectaram-se bactérias redutoras de Mn (0,2 a 23 x 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> de solo), bactérias oxidantes de Mn (0,02 a 1,3 x 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> de solo) e esporos de FMA (2 a 168). No solo rizosférico não foram detectadas bactérias oxidantes de Mn e a densidade de bactérias redutoras de Mn variou muito entre as espécies vegetais amostradas (0 a 40 x 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> de solo). Os isolados de bactérias redutoras de Mn da rizosfera nas áreas revegetadas são pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Cellulomonas* e *Paenibacillus*. Nove espécies de FMA foram encontradas nas áreas estudadas, sendo *Glomus* o gênero predominante. Os grupos de micro-organismos estudados mostraram alta resiliência com relação às modificações edáficas devidas à mineração de Mn e às estratégias de recuperação dessas áreas.

**Palavras-chave:** Barragem de rejeitos. Formas de Mn. Colonização micorrízica. Bactérias redutoras de Mn. Rizosfera. Diversidade de FMA.

## ABSTRACT

Although Mn is an essential element for plants, in excessive amounts in the soil it may reach toxic levels. For the success of the revegetation of areas with Mn mining tailings, it is necessary to consider, besides the best technique, the selection of plant species adapted to this condition. In addition, the evaluation of the microbial community of the soil and that associated with vegetation may indicate the progress of recovery. The objective of this study was to verify the occurrence of plant species growing at understory, plant and soil Mn concentrations, mycorrhizal colonization, communities of Mn-reducing and Mn-oxidizing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), after revegetation by planting of seedlings and application of topsoil in the tailings deposition area, compared with an area under native forest and an unvegetated site. Plant samples (at least three individuals/species), of bulk and rhizosphere soil were collected from the understory at revegetated locations and forest. The use of topsoil led to greater plant diversity. The high concentrations of Mn in the substrates did not affect the occurrence of vegetation in the understory and mycorrhizal colonization. The plant species established in the revegetated areas differed in relation to Mn concentration (471–27,842 mg kg<sup>-1</sup> in leaves), Mn translocation factor (0.2–125.3) and mycorrhizal colonization rates (1–35%). Four potential Mn, hyperaccumulator species were identified: *Aparisthmium cordatum*, *Clidemia hirta*, *Socratea exorrhiza*, and *Vismia latifolia*. In bulk soil Mn-reducing bacteria (0.2–23 x 10<sup>4</sup> CFU g<sup>-1</sup> soil), Mn-oxidizing bacteria (0.02–1.3 x 10<sup>4</sup> CFU g<sup>-1</sup> soil) and AMF spores (2–168) were detected. In the rhizospheric soil, no Mn-oxidizing bacteria were detected and the density of Mn-reducing bacteria varied greatly among the sampled plant species (0–40 x 10<sup>4</sup> CFU g<sup>-1</sup> of soil). Isolates of rhizosphere Mn-reducing bacteria in the revegetated areas belong to the genera *Bacillus*, *Cellulomonas* and *Paenibacillus*. Nine AMF species were found in the studied areas, and *Glomus* was the predominant genus. All the microbial functional groups presented high resilience in relation to environmental modifications due to Mn mining and revegetation processes.

**Keywords:** Tailings dam. Mn species. Mycorrhizal colonization. Mn-reducing bacteria. Rhizosphere. Diversity of AMF.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>10</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>A mineração de Mn na Floresta Nacional de Carajás.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Revegetação em áreas afetadas pela mineração.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3</b>	<b>O papel do Mn no sistema solo – planta – micro-organismo.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Mn no solo.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Mn na planta.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Mn e FMAs.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Mn e bactérias redutoras e oxidantes.....</b>	<b>22</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>25</b>
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....</b>	<b>34</b>
	<b>ARTIGO 1 - MN CONCENTRATION AND MYCORRHIZAL COLONIZATION IN UNDERSTORY NATIVE SPECIES GROWN AT AREAS OF MANGANESE MINE TAILINGS DISPOSAL.....</b>	<b>35</b>
	<b>ARTIGO 2 - BACTÉRIAS OXIDANTES E REDUTORAS DE MN E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM ÁREAS REVEGETADAS APÓS DEPOSIÇÃO DE REJEITO DA MINERAÇÃO DE MN.....</b>	<b>66</b>

**PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO

O manganês (Mn) é um dos metais de maior importância para a indústria. Participa do processo de produção do aço, desempenhando um papel fundamental na eliminação do oxigênio e enxofre, dessa forma, aumentando a resistência, a rigidez e a durabilidade do produto. Além disso, o Mn é utilizado na produção de pilhas e baterias, vidro, tintas e vernizes, produtos químicos, cerâmicas e fertilizantes.

De acordo com dados compilados pelo International Manganese Institute (IMnI, 2018), a produção mundial de minério de Mn em 2017 atingiu 18,6 milhões de toneladas, um acréscimo de aproximadamente 23% em relação a 2016. Enquanto a demanda mundial por Mn aumenta, observa-se simultaneamente o aumento da produção de rejeitos da mineração de Mn que impactam diretamente o solo, as plantas e os micro-organismos. A revegetação dessas áreas é prevista em lei e assim, a indústria de mineração é cada vez mais confrontada quanto a necessidade de recuperação de áreas afetadas pela mineração, necessitando de planejamento e métodos adaptados à região que permitam a manutenção de processos naturais. Dessa forma, torna-se imprescindível a investigação de técnicas adequadas à condição vigente dessas áreas.

A presença da vegetação em área de mineração do Mn pode levar a mudanças na sua forma, ao promover a sua solubilização que pode ser causada por ácidos orgânicos ou micro-organismos. O Mn ocorre no solo principalmente em três estados de oxidação: Mn(II), Mn(III) e Mn(IV), dos quais apenas Mn(II) é solúvel e disponível para absorção de plantas. Embora o Mn seja um elemento essencial para as plantas, quantidades excessivas da forma reduzida no solo podem ser tóxicas à planta. Portanto é interessante averiguar se espécies estabelecidas nestas áreas apresentam tolerância a esse elemento, se existem interações microbianas no sistema planta-solo ou se está indisponível às mesmas.

Além das plantas, grupos de micro-organismos podem apresentar alterações frente às modificações ambientais decorrentes da mineração de Mn. As pesquisas disponíveis sobre bactérias redutoras do Mn da rizosfera geralmente envolvem plantas cultivadas, tais como soja, milho, trigo e trevo vermelho. Por outro lado, pesquisas recentes vêm destacando o estudo de plantas nativas na absorção e ciclagem do Mn, bem como abordando sua importância para revegetação de áreas degradadas pela mineração.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são de ocorrência generalizada e dependendo da situação, os FMAs podem aumentar ou diminuir a absorção dos minerais pelas raízes afetando o crescimento das plantas e em determinadas condições do ambiente onde elas crescem.

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de espécies vegetais em crescimento no sub-bosque, teores de Mn na planta e no solo, colonização micorrízica, comunidades de bactérias redutoras e oxidantes de Mn e de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), após a revegetação por plantio de mudas e aplicação de topsoil em área de deposição de rejeito do beneficiamento de Mn, comparativamente a uma área com floresta nativa e uma área não revegetada.

Os resultados deste estudo são aqui apresentados em artigos. No primeiro artigo são apresentados os resultados relativos ao solo e às espécies vegetais, onde nestas analisaram-se sua ocorrência no sub-bosque, seus teores de Mn e simbiose com fungos micorrízicos arbusculares, com o objetivo de verificar diferenças entre as técnicas de revegetação e áreas de referência. No segundo artigo estão os resultados correspondentes à análise dos grupos funcionais de micro-organismos, realizada através da avaliação da ocorrência de esporos de FMA no solo e isolamento de bactérias redutoras e oxidantes de Mn em amostras de solo rizosférico e não rizosférico.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A mineração de Mn na Floresta Nacional de Carajás

O minério em Carajás que contém o Mn é um recurso natural finito e essencial na produção de ferroligas e aço. Essa atividade representa 85% da demanda por esse elemento (OLSEN et al., 2007). O Mn também é utilizado pela indústria na produção de pilhas e baterias, vidro, tintas e vernizes, produtos químicos, cerâmicas e fertilizantes (GONÇALVES e SERFATY, 1976). No Brasil, as principais reservas do minério de Mn estão localizadas em Conselheiro Lafaiete (MG), Dom Silvério (MG), Corumbá (MS), Espigão D'Oeste (RO), Parauapebas (PA) e Marabá (PA) (DNPM, 2017).

A Floresta Nacional de Carajás (Flona Carajás) é administrada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, em parceria com a Vale S.A. A Flona Carajás, inserida no bioma amazônico, inclui uma área de 411.948 ha (5°54' - 6°33' Sul e 49°53' - 50°34' Oeste) e abrange os municípios de Canaã dos Carajás, Parauapebas e Água Azul do Norte no sudeste do Pará (CNUC, 2014).

A mina de Manganês do Azul está localizada na microbacia do igarapé Azul no interior da Flona Carajás, município de Parauapebas. Foi descoberta em 1971, pela DOCEGEO (Rio Doce Geologia e Mineração Ltda - responsável pela pesquisa mineral de Carajás), durante os trabalhos de complementação de pesquisa geológica para as jazidas de minério de ferro na província mineral de Carajás, iniciando em 1985, as operações de beneficiamento (IBAMA, 2003).

As atividades envolvem extração, beneficiamento e transporte de Mn, com capacidade nominal de processamento de 2,2 a 3,0 milhões de toneladas por ano. A lavra do minério de Mn é realizada a céu aberto, e o minério extraído é preparado em usina de beneficiamento, utilizando operações de britagem, peneiramento, classificação e lavagem para remoção da fração fina (0,15 mm), gerando os seguintes produtos com diferentes granulometrias: minério granulado, minério médio granulado e minério “sinterfeed” de Mn (SAMPAIO e PENNA, 2001; ICMBIO, 2016). Os rejeitos gerados do beneficiamento, sob forma de polpa, são dispostos em barragem (SAMPAIO e PENNA, 2001).

A barragem do Kalunga começou a operar em 1998 com a finalidade de contenção de rejeitos, amortecimento de cheias e fornecimento de água industrial. O reservatório inicial apresentava um volume de  $6.9 \times 10^3 \text{ m}^3$  e área superficial de 104 ha. O projeto definiu o

alteamento da estrutura em três etapas pelo método de jusante (ANDRADE e GAMA-JÚNIOR, 2013). A capacidade inicialmente prevista para a contenção de rejeitos foi totalmente esgotada em 2000 e um dos diques (dique 3) da barragem foi disponibilizado para a execução de trabalhos envolvendo a reabilitação de áreas impactadas (RIBEIRO et al., 2018).

Souza et al. (2016) encontraram a seguinte composição química de um rejeito oriundo da mina de Mn do Azul (%): 7,1 de Mn; 34,2 de sílica; 29,7 de alumina e 7,3 de Fe, e constituição mineralógica (em massa): caulinita (71%), criptomelana-holandita (17%), goethita (3,7%), bixbyita (3,1%) e quartzo (0,7%). Na mesma região, Azevedo et al. (2016) avaliaram rejeitos de Mn da barragem do Kalunga e observaram a composição mineralógica formada principalmente por caulinita, gibbsita, goethita, birnessita, todoroquita e quartzo.

## **2.2 Revegetação em áreas afetadas pela mineração**

Apesar da sua importância para a sociedade, todas essas etapas da mineração produzem impactos ambientais de diferentes intensidades. A recuperação de áreas de deposição de rejeito é uma tarefa complexa. As condições químicas, físicas e biológicas dos substratos encontrados nestes depósitos criam um ambiente com limitações hídricas e de fertilidade para as plantas (DIAS et al., 2007). No entanto, no Brasil, a mineração está submetida a um conjunto de regulamentações, que exige a recuperação do ambiente degradado após a retirada do minério. Silva et al. (2012) apresentam uma compilação da legislação relacionada ao setor. Dentre as leis, destacam-se, a Constituição Federal de 1988, artigo 225, que estabelece a obrigatoriedade da recuperação das áreas degradadas pela atividade minerária; o decreto nº 97.632/89, sobre a obrigatoriedade da apresentação do Plano de Recuperação de Áreas Degradadas (PRAD); a resolução do CONAMA nº 237/97, que regulamenta os aspectos de licenciamento ambiental; a lei nº 12.305/10, que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos e a lei nº 12.334/10 que estabelece a Política Nacional de Segurança de Barragens aplicada tanto às barragens destinadas à acumulação de água quanto para a disposição final ou temporária de rejeitos.

Nesse contexto, o restabelecimento da vegetação pode ser realizado por várias técnicas. Destaca-se entre estas técnicas, a nucleação, que se baseia no estabelecimento de pequenos núcleos ou ilhas de vegetação. Uma forma de implantação dos núcleos é a transposição do banco de sementes (*topsoil*), composto pela camada superficial do solo e pela camada de serapilheira, de áreas previamente florestadas (REIS et al., 2003). É importante o manejo do *topsoil* (camada superficial do solo), uma vez que a remoção da camada superficial é necessária para a extração de minério (MORENO-de las HERAS et al., 2008; RIBEIRO et al., 2011;

RIBEIRO et al., 2018; LEAL FILHO et al., 2013) e pode ser reutilizado no processo de revegetação. Além de ser um banco de sementes, o *topsoil* adiciona matéria orgânica ao sistema, melhorando as propriedades do solo, e repõe a macro e microbiota, que têm papel fundamental na formação do solo e promoção do crescimento das plantas (desde que não seja estocado por longo período) (SOUZA et al., 2006; MORENO-de las HERAS et al., 2008). Segundo o IBAMA (1990), a espessura da camada superficial do solo, que pode variar de 10 a 30 cm, é influenciada pelas características do substrato a ser revegetado e com a disponibilidade do material. A principal vantagem desta técnica é a introdução de uma elevada densidade de sementes viáveis de várias espécies nativas (RODRIGUES et al., 2010). No entanto, o sucesso da técnica depende da capacidade de germinação das espécies preexistentes no banco de sementes. A adição da camada superficial de solo como veículo de sementes e de micro-organismos tem sido adotada, face a sua importância para o estabelecimento da vegetação em áreas mineradas (TRINDADE et al., 2000).

Outra técnica bastante empregada no processo de revegetação, é o plantio de mudas de espécies arbóreas nativas. A escolha das espécies vegetais a serem utilizadas é importante, pois cada uma possui características específicas que determinam sua contribuição na estabilização do ambiente (SINGH et al., 2004). No entanto, o comportamento das espécies é fortemente influenciado pelas condições de manejo, substrato e clima local (DIAS et al., 2007). As espécies são selecionadas com base na sua ocorrência regional, atratividade à fauna, adaptação à condição de umidade do solo e origem das sementes (MARTINS, 2013). Além disso, é importante a presença de genótipos que se estabeleçam em substrato metalífero sob condições de elevados teores do metal, baixo teor de P e baixa concentração de matéria orgânica.

Em estudo desenvolvido em uma mina de carvão, Moreno-de las Heras et al. (2008) utilizaram duas técnicas de recuperação em encostas de diferentes idades mostrando que após 15 anos, as comunidades vegetais em áreas revegetadas com *topsoil* apresentaram maior diversidade e cobertura vegetal do que aquelas observadas em áreas revegetadas pelo plantio de mudas. No estudo de Ribeiro et al. (2018), a revegetação de área com rejeito de Mn foi avaliada pela riqueza de espécies, pelo o índice de diversidade de Shannon e pela diversidade filogenética, indicando que com o *topsoil* a recomposição da biodiversidade foi mais rápida do que com o plantio de mudas.

No estudo de Ribeiro et al. (2018), as variáveis riqueza de espécies, índice de diversidade de Shannon e diversidade filogenética, que avaliaram a vegetação estabelecida sobre o rejeito de Mn, indicaram que com o *topsoil* a recomposição da biodiversidade se deu de forma mais rápida do que com o plantio de mudas.

Também, foi observado por Ribeiro et al. (2011), em área afetada pela mineração de estanho, que a revegetação com *topsoil* promoveu alterações no substrato em relação aos teores de matéria orgânica, potássio, soma e saturação por bases, o que favoreceu o estabelecimento da vegetação.

Em área de mineração de Mn na Índia, Juwarkar et al. (2009) observaram que o *topsoil* propiciou a diminuição dos teores de Mn disponível ao longo do tempo, havendo um declínio durante os primeiros 6 anos e, a partir daí, um declínio gradual.

## **2.3 O papel do Mn no sistema solo – planta – micro-organismo**

### **2.3.1 Mn no solo**

O manganês (Mn) é um metal que na natureza não é encontrado em estado elementar, sendo encontrado principalmente na forma de óxidos, hidróxidos, silicatos e carbonatos (MAYNARD, 2004).

O manganês existe no solo na forma solúvel (divalente), bem como na forma de óxidos em diferentes valências e graus de reatividade. A concentração total do Mn no solo pode variar de 20 a 3000 mg kg<sup>-1</sup> (BORKERT et al., 2001). De uma forma um pouco mais ampla, este valor pode ser de 10 a 4000 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto a quantidade disponível para as plantas encontra-se entre 0,1 e 100 mg kg<sup>-1</sup> (MALAVOLTA, 1980). Estas formas de Mn estão em equilíbrio e a direção para a qual o equilíbrio muda depende do potencial redox dos solos (HEINTZE e MANN, 1949; MISRA e MISHRA, 1969). Além desse, outros fatores afetam a disponibilidade do Mn no solo como o pH, a profundidade do perfil do solo, flutuações na temperatura e umidade e teores de matéria orgânica (BORKERT et al., 2001). O fator mais influente é o pH; quanto maior a acidez, mais Mn estará disponível, podendo até se tornar tóxico. Normalmente, os níveis de Mn que levam à toxicidade ocorrem em pH abaixo de 5,5 (LEEPER, 1947; FUJIMOTO e SHERMAN, 1948). A elevação da temperatura, é responsável por acelerar a redução do Mn, levando a variações nos seus teores e, assim, no crescimento das plantas (LEEPER, 1947). Ciclos de umedecimento e secagem também resultam em um aumento no Mn reduzido, ocorrendo liberação excessiva de Mn durante os períodos úmidos e/ou a reoxidação, normalmente lenta, após secagem (FUJIMOTO e SHERMAN, 1946).

Os procedimentos de extração sequencial são realizados com o objetivo de medir a distribuição dos metais no ambiente, sendo úteis para investigar formas naturais de micronutrientes, fixação e mobilidade nos solos (SHUMAN, 1985).

As frações e reagentes utilizados na extração sequencial variam entre os estudos, de forma que os procedimentos são adaptados às condições específicas. Vários trabalhos de fracionamento de Mn no solo, dentre eles, os de Warden & Reisenauer (1991), Li et al. (2001), Nascimento et al. (2002), Agbenin (2003), Borges & Coutinho (2004) e Oliveira & Nascimento (2006), têm utilizado o método desenvolvido por Shuman (1985). Esse fracionamento separa o Mn nas frações: trocável, ligada à matéria orgânica, óxido de manganês, óxido de ferro amorfo, óxido de ferro cristalino e residual.

A fração trocável é a forma de Mn disponível mais importante no solo para as plantas. Shuman (1985) destaca que, além da fração trocável, o Mn ligado à matéria orgânica também é responsável pelo fornecimento do micronutriente às plantas. McBride (1994) afirma que os complexos orgânicos formados com o Mn são de pouca estabilidade, o que evidencia a pronta disponibilidade do elemento para a planta. Por outro lado, em ecossistemas florestais, nos estágios iniciais de decomposição de componentes senescentes das plantas, principalmente folhas, o Mn proveniente deste material é transformado em Mn disponível, e posteriormente, com o aumento da oxidação o Mn se transforma em formas menos disponíveis (BLANCHETTE, 1984).

Os metais na fração residual estão ligados aos silicatos, óxidos de ferro cristalinos e outros minerais que não foram solubilizados nas extrações anteriores. No solo, isso pode ser atribuído às formas de Mn que ocorrem participando da estrutura dos minerais, e nos rejeitos, atribui-se à composição química, Kossoff et al. (2014) destacam que a presença de sílica e Fe é quase universal e, geralmente são os elementos mais abundantes em rejeitos, além de Al, Ca, K, Mg, Mn, Na, P, Ti e S. Wang et al. (2008) e Juárez-Santillán et al. (2010) em estudos em área afetada pela mineração do Mn, verificaram que a maior parte do Mn está associado à fração residual.

### **2.3.2 Mn na planta**

Nas plantas, o Mn atua como cofator, ativando cerca de 35 enzimas diferentes, a maioria das quais catalisam reações de oxidação-redução, descarboxilação e hidrólise. Além disso, o Mn é componente estrutural de sistemas enzimáticos como, por exemplo, da superóxido dismutase (BURNELL, 1988). Assim, o Mn tem uma influência profunda em três funções

metabólicas essenciais: fotossíntese, metabolismo de N (especialmente a redução de nitrato) e biossíntese de compostos de anel aromático. Embora o Mn seja um elemento essencial para as plantas, em quantidades excessivas pode atingir níveis tóxicos. A toxidez de Mn é favorecida em condições de acidez, o que contribui para a predominância de Mn(II), a forma mais solúvel e absorvida pelas raízes (FOY et al., 1978). Conforme discutido anteriormente, valores disponíveis de Mn no solo, encontram-se entre 0,1 e 100 mg kg<sup>-1</sup> (MALAVOLTA, 1980).

Plantas que vivem em solos explorados pela mineração de Mn podem exibir comportamentos distintos. Em ambientes com elevadas concentrações de Mn, o elemento tende a ficar retido nas raízes (WANG et al., 2008). Por outro lado, alguns estudos demonstram que o Mn tende a ser translocado para a parte aérea, sendo as maiores concentrações encontradas nas folhas (LI et al., 2007; BOOJAR e GOODARZI, 2008; BECH et al., 2012; LIU et al., 2014a; LIU et al., 2014b).

Os teores foliares de Mn observados na literatura em vegetação estabelecida em áreas de mineração de Mn ao redor do mundo são variados. Na China, estes teores variaram de 89 a 3.280 mg kg<sup>-1</sup> (LI et al., 2007), na Índia os teores de Mn variaram de 168 a 1.744 mg kg<sup>-1</sup> (RAJU et al., 2008), na Espanha a variação foi de 182 a 1.507 mg kg<sup>-1</sup> (JUÁREZ-SANTILLÁN et al., 2010) e no Irã essa variação foi de 324 a 3.251 mg kg<sup>-1</sup> (BOOJAR e GOODARZI, 2008).

Algumas plantas que crescem em solos contaminados com metais podem adaptar-se, e para sobrevivência, acumular maiores teores de metais pesados nos seus tecidos do que outras espécies de plantas (LONG et al., 2002). Em áreas afetadas pela mineração de Mn, estudos desenvolvidos na Ásia (LI et al., 2007; BOOJAR e GOODARZI, 2008) indicam que houve translocação de Mn para a parte aérea da planta após longo período de restauração. Esse efeito foi atribuído à acumulação de Mn nos vacúolos das células das folhas, o que aumenta sua tolerância ao excesso de Mn (BOOJAR e GOODARZI, 2008). Da mesma forma, no estudo de Bech et al. (2012), as plantas que cresceram nos locais contaminados conseguiram acumular significativamente mais Mn na parte aérea do que nas suas raízes.

Li et al. (2007) encontraram, em uma mina de Mn restaurada por mais de 20 anos, 36 espécies de plantas de 22 famílias colonizando a área e, medições de teores de metais mostraram que houve translocação do Mn para a parte aérea das plantas. Raju et al. (2008) investigaram o acúmulo e distribuição do Mn em espécies de árvores identificadas em depósito de mina de Mn: *Cassia siamea* (Cassia), *Azadirachta indica* (Neem) e *Holoptelia integrifolia* (Holoptelia). Os dados foram comparados com amostras coletadas de árvores sob vegetação natural livre de contaminação. Observou-se que *Holoptelia* tem uma habilidade especial para acumular grandes

quantidades de Mn (168 a 1.744 mg kg<sup>-1</sup>) sob condição de estresse, o que sugere um mecanismo de sequestro de Mn maior que das outras duas árvores que crescem no mesmo solo.

Em geral, as concentrações de Mn nas diferentes partes das plantas diferem entre as espécies, o que indica diferentes estratégias no acúmulo desse metal. De acordo com Baker (1981), para a resposta da absorção de metal(óides) nas folhas, plantas ‘normais’ podem tolerar apenas baixas concentrações biodisponíveis de metal(óides) no solo, antes de morrerem devido à elevada fitotoxidez. Já plantas exclusoras podem crescer sob uma faixa maior de concentrações disponíveis de metal(óides) até que os mecanismos fisiológicos não possam mais controlar a absorção, causando a morte das plantas. Plantas bioindicadoras absorvem metal(óides) sobre uma faixa mais ampla do que plantas ‘normais’ e as concentrações nas folhas refletem a concentração dos metal(óides) no solo, até que a fitotoxidez impeça o crescimento e provoque a morte da planta. Algumas plantas são capazes de acumular teores extremamente altos de Mn na parte aérea. Para estas espécies, chamadas hiperacumuladoras, além de apresentar fatores de translocação e de bioacumulação maiores do que 1, é definida uma concentração de Mn superior a 10.000 mg kg<sup>-1</sup> (BAKER e BROOKS, 1989).

Plantas metalófitas, as quais colonizam solo/substrato enriquecido com metal(óides), podem ser classificadas em: i) Metalófitas a) obrigatórias – espécies que apresentam tolerância excepcional, na maioria das vezes, dependentes da ocorrência dos metal(óides) no solo (algumas hiperacumuladoras) –, e b) facultativas – genótipos ou ecótipos/subespécies de espécies comuns com tolerância específica a metal(óides) –, e ii) Espécies Associadas a) tolerantes a metal(óides) – espécies moderadamente tolerantes a metal(óides), porém não são dependentes da ocorrência destes elementos no solo (também conhecidas como ‘pseudo-metalófitas’ ou ‘espécies acompanhantes’) –, e b) não tolerantes a metal(óides) – espécies com baixa tolerância ou não tolerantes à metal(óides), usualmente são plantas daninhas, anuais, que não demonstram vigor nem persistência em solos metalíferos (conhecidas como espécies ‘indiferentes’ ou ‘ocasionais’) – (LAMBINON e AUQUIER, 1963; BAKER et al., 2010).

Embora as plantas hiperacumuladoras sejam capazes de suportar concentrações de metal(óides) biodisponíveis muito superiores às plantas ‘normais’, bioindicadoras e exclusoras, a maioria das espécies hiperacumuladoras não ocorre em solos não enriquecidos com metal(óides), devido às desvantagens competitivas. Muitos estudos com várias espécies de metais, plantas e patógenos mostraram que o fenótipo de hiperacumulação serve naturalmente como uma defesa contra patógenos e herbívoros (revisões de BOYD e MARTENS, 1998; BOYD, 2004, 2007; POSCHENRIEDER et al., 2006). Essa proteção pode ser favorecida sob determinadas condições, tais como: quando o metal é mais tóxico para o patógeno ou herbívoro

do que para a planta; quando o metal dificulta a virulência do patógeno ou herbívoro; e quando o metal aumenta a resistência da planta ao fator de estresse biótico (POSCHENRIEDER et al., 2006). A hiperacumulação é um mecanismo que permite o sequestro de metais nos tecidos, o que caracteriza a tolerância (LEITENMAIER e KÜPPER, 2013). Dou et al. (2009) explicam que a alta tolerância ao Mn em espécies hiperacumuladoras é devida à associação do metal com o oxalato. Fernando et al. (2010), no entanto, destacam que esse papel cabe aos ácidos carboxílicos, malato ou citrato.

Os genótipos de plantas de culturas diferem na sensibilidade ao Mn, e micro-organismos da rizosfera podem desempenhar um papel importante nessas diferenças genótípicas (RENGEL, 1997). Os organismos associados a raízes afetam substancialmente o crescimento da planta, e conseqüentemente, a composição da comunidade vegetal durante a sucessão (PÜSCHEL et al., 2007) bem como as concentrações do elemento na planta. Neste sentido, o teor de Mn e sua absorção são geralmente menores em plantas micorrizadas devido à proteção contra o excesso de Mn. Entretanto, um dos impactos que a mineração de Mn pode trazer é a ausência de propágulos infectivos como esporos, raízes colonizadas e hifas (RIVERA-BECERRIL et al., 2013). Segundo Matias et al. (2009), o sucesso da restauração de solos minerados pode ser alcançado pelo uso de espécies nativas que realizam interações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares.

O conhecimento sobre a fisiologia de plantas hiperacumuladoras ainda é escasso, principalmente quando se trata de hiperacumuladoras que estabelecem simbiose com fungos micorrízicos (SMITH e READ, 2008; VERBRUGGEN et al., 2009; van der ENT et al., 2013; LAMBERS et al., 2015; GOOLSBY e MASON, 2015). Embora os mecanismos de absorção de Mn por plantas micorrizadas ainda estejam sendo elucidados, especula-se que mecanismos de hiperacumulação utilizados por espécies de *Alyxia* – Apocynaceae – (Nova Caledonia) e *Cupania* – Sapindaceae – (Brasil) sejam semelhantes aos mecanismos utilizados por plantas que não estabelecem simbiose com fungos micorrízicos. Neste caso, há dois grupos de plantas: i) plantas formadoras de estruturas semelhantes à escova de garrafa nas raízes, que são um aglomerado de pêlos radiculares (*cluster roots*), através dos quais a planta exsuda ácidos orgânicos (por exemplo, oxalato, malato, citrato dentre outros) para solubilizar fósforo, e conseqüentemente, torna solúvel também o Mn (GARDNER et al., 1982; SHANE e LAMBERS, 2005), e ii) plantas não formadoras de aglomerado de pêlos radiculares, como espécies das famílias Phytolaccaceae e Polygonaceae. Ainda não há informação sobre a química da rizosfera de espécies de *Phytolacca*. Portanto não se sabe se o acúmulo de Mn é devido à

liberação de ácidos orgânicos, prótons ou ambos (XUE et al., 2005; XU et al., 2006; MIN et al., 2007; LIU et al., 2010).

### 2.3.3 Mn e FMAs

Os estudos sobre a colonização micorrízica, tanto em áreas de vegetação primária da Amazônia (BONETTI et al., 1984; OLIVEIRA et al., 1999) como naquelas afetadas pela mineração, têm demonstrado grande variação. No primeiro caso, as espécies nativas podem apresentar grandes diferenças quanto à responsividade, dependência micorrízica e eficiência na absorção de fósforo (SIQUEIRA e SAGGIN-JÚNIOR, 2001). Já em áreas impactadas pela mineração, as plantas locais podem mostrar baixa colonização micorrízica (RAMAN et al., 1993; PAWLOWSKA et al., 1996; MEHROTRA, 1998; MELLONI et al., 2003) ou mesmo ausência dela (GOULD et al., 1996; RIVERA-BECERRIL et al., 2013).

Cardoso et al. (2002) relatam que o excesso de metais, entre eles o Mn, pode diminuir ou inibir o desenvolvimento inicial de hifas fúngicas e dessa forma retardar ou suprimir a formação da simbiose micorrízica. Em áreas de mineração revegetadas, Pawlowska et al. (1996) verificaram que a disponibilidade de Mn não afetou a intensidade de colonização micorrízica e, ainda, que esta não evitou que as plantas acumulassem o metal na parte aérea. Portanto, em áreas com níveis tóxicos do elemento, os fungos micorrízicos arbusculares podem unicamente atuar na sobrevivência das plantas (LEUNG et al., 2007).

De acordo com Lambers et al. (2015) a hiperacumulação de Mn nas espécies micorrízicas não reflete o teor de Mn disponível no solo, estando associada a processos altamente dinâmicos de mobilização do Mn na rizosfera, provavelmente devido à liberação de prótons e acidificação subsequente da rizosfera. Os carboxilatos gerados para produzir os prótons lançados na rizosfera são utilizados internamente para ligar o Mn dentro dos tecidos das plantas, reduzindo assim os efeitos tóxicos da hiperacumulação do Mn.

O efeito micorrizosférico, capaz de aumentar populações microbianas selecionadas, nas proximidades das hifas, foi postulado por Linderman (1988), demonstrando o efeito significativo das hifas extrarradiculares de FMA, sobre a microbiota do solo. Além de maior atividade microbiana, a rizosfera de plantas micorrizadas é bioquimicamente mais ativa, em comparação às plantas não micorrizadas, devido à maior deposição de carboidratos no solo, proporcionada pelas hifas extrarradiculares.

Vários mecanismos de desintoxicação de elementos tóxicos em plantas e micorrizas têm sido sugeridos, tais como: (1) efeito de diluição nos tecidos vegetais devido ao crescimento das

plantas; (2) exclusão da absorção através de precipitação ou quelação na rizosfera; (3) redução da absorção em decorrência da retenção e imobilização em estruturas fúngicas; (4) a membrana plasmática funcionando como uma barreira seletiva em plantas e fungos; (5) ação de transportadores específicos ou não-específicos e dos poros na membrana plasmática em plantas e fungos (importação passiva e ativa); (6) quelação no citosol, incluindo o uso de metalotioneínas (plantas e fungos), ácidos orgânicos, aminoácidos e chaperonas metal-específicas; (7) sequestro nos vacúolos das células vegetais e fúngicas; (8) transporte através das hifas de fungos; (9) exportação pelo fungo e importação em células vegetais, envolvendo transporte ativo e passivo para as micorrizas (CABRAL et al., 2015).

A ocorrência do maior número de gêneros de *Glomus* ou *Acaulospora* tem sido encontrada em locais sob influência da mineração/degradados (CAPRONI et al., 2005; SILVA et al., 2005; HOLSTE et al., 2016). Além disso, espécies de *Glomus* ou *Acaulospora* tendem a ser encontrados em solos com pH menor que 6,5 e/ou com baixo teor de fósforo (MAIA e TRUFEM, 1990; SOUZA et al., 2003). Wei et al. (2014) investigaram a diversidade molecular de fungos micorrízicos arbusculares associados a uma planta hiperacumuladora de Mn em área de mineração de Mn e observaram que *Glomus* foi o gênero dominante nesta comunidade FMA. Em área estéril revegetada com *Acacia mangium*, após mineração de bauxita, Caproni et al. (2005) identificaram 18 espécies de FMAs pertencentes a seis gêneros. O maior número de espécies pertenceu ao gênero *Glomus*, seguido do gênero *Acaulospora*. Da mesma forma, em área afetada pela mineração de cobre, Silva et al. (2005) detectaram maior representatividade do gênero *Glomus*. Na Costa Rica, Holste et al. (2016) observaram em seu estudo de restauração em área de floresta tropical que a maioria das espécies de fungos pertenceu ao gênero *Glomus* e ao gênero *Acaulospora*, e representaram mais de 95% da densidade de esporos em todas as áreas do estudo restauradas.

#### **2.3.4 Mn e bactérias redutoras e oxidantes**

A biodisponibilidade de Mn é intensamente influenciada pelos fatores que determinam o seu estado de oxidação (SPARROW e UREN, 1987; SPOSITO, 1989; COUTURE et al., 2015). Mn(II) normalmente é solúvel ou complexado a ligantes orgânicos ou inorgânicos. Mn(III), a menos que esteja complexado a ligantes ou incorporado em enzimas, é instável em ambientes aquosos e prontamente convertido em Mn(II) e Mn(IV). Mn(IV) forma óxidos e óxido-hidróxidos altamente insolúveis. Em sistemas naturais, a oxidação de Mn(II) é termodinamicamente favorável, no entanto, ela ocorre em taxas muito baixas (DIEM e

STUMM, 1984; NEALSON et al., 1988; BROUWERS et al., 2000). A oxidação abiótica de Mn(II) pode ser catalisada por condições ambientais extremas (por exemplo, pH elevado e alta pressão de O<sub>2</sub>) e por adsorção de íons nas superfícies de minerais tais como óxidos de Fe e silicatos (MORGAN e STUMM, 1964; SUNG e MORGAN, 1981; HEM e LIND, 1983; MURRAY et al., 1985; DAVIES e MORGAN, 1989; BROUWERS et al., 2000).

Comparada com a oxidação abiótica de Mn(II), os micro-organismos podem acelerar a oxidação em até cinco vezes (NEALSON et al., 1988; TEBO, 1991; WEHRLI, 1990; BROUWERS et al., 2000). A oxidação microbiana de Mn(II) ocorre através de mecanismos indiretos e diretos. Os mecanismos indiretos incluem a produção de O<sub>2</sub>, na fotossíntese, e de metabólitos alcalinos ou oxidantes. Já mecanismos diretos de oxidação de Mn(II) envolvem a produção microbiana de macromoléculas específicas acelerando o processo, envolvendo a produção e excreção de ácidos orgânicos (BROUWERS et al. 2000). Estirpes bacterianas na maioria das vezes solubilizam Mn por mecanismo direto e enzimático, envolvendo o contato direto com a superfície do mineral. Bactérias solubilizadoras de Mn possuem várias enzimas solubilizadoras de metais (por exemplo, oxidase multi-cobre e redutase de manganês).

A redução de Mn(IV) é favorecida pela presença de agentes redutores sob condições anaeróbicas, baixo pH ou na presença de agentes complexantes de Mn(II). As conversões de Mn entre os estados de oxidação podem ser catalisadas por organismos vivos, principalmente micro-organismos. Muitas espécies de bactérias anaeróbicas são capazes de reduzir óxidos de Mn, tanto pela produção de ácidos orgânicos ou substâncias redutoras (por exemplo, sulfetos) quanto pelo uso de metal oxidado como acceptor final de elétrons na respiração anaeróbica (LOVLEY, 1991; NEALSON e MYERS, 1992; NEALSON e LITTLE, 1997; BROUWERS et al., 2000). Em ambientes aeróbicos uma grande variedade de micro-organismos catalisa a oxidação de Mn(II) (EHRlich, 1984; GHIORSE, 1984; BROUWERS et al., 2000). Em ambientes estratificados, espécies microbianas redutoras e oxidantes podem promover uma ciclagem rápida de Mn em torno do limite óxico/anóxico. Nestes ambientes, o Mn pode atuar como um transporatdor na oxidação e potencial redução de compostos orgânicos (NEALSON e MYERS, 1992; BROUWERS et al., 2000).

Diversas bactérias pertencentes aos grupos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* têm sido descritas como capazes de solubilizar Mn. Em estudo recente, utilizando abordagem metagenômica, Ghosh & Das (2018) verificaram que o filo *Proteobacteria* mostrou-se mais abundante (42,47%), seguido por *Actinobacteria* (23,99%), em rejeitos de mineração de Mn na Índia. Os dois grupos foram encontrados na maioria das amostras de solo. Em termos de diversidade, os autores demonstraram o alto índice de Shannon (5,2) indicando a riqueza. Em

estudos anteriores, verificando bactérias cultiváveis solubilizadoras de Mn, os pesquisadores relataram a presença de *Acinetobacter* sp. e *Enterobacter* sp. (*Proteobacteria*) e *Lysinibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus nealsonii* e *Staphylococcus hominis* (*Firmicutes*). Ghosh et al. (2016a) demonstraram ainda a presença de várias estirpes não cultiváveis pertencentes aos filos *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* e *Gemmatimonadetes*, as quais ainda não haviam sido relatadas.

Charney et al. (1951) demonstraram que o Mn estimula a esporulação de várias espécies de *Bacillus* (*B. subtilis* 6633, *B. subtilis* 90, *B. subtilis* Tracy, *B. megaterium* B938, *B. betanigrificans* 7048, *B. polymyxa* 2823, *B. alvei* 8240 e *B. brevis* 2785). Além destas espécies, os autores verificaram que embora a esporulação não tenha sido estimulada na espécie *B. pumilus* 7061, o crescimento desta espécie foi estimulado pelo fornecimento de Mn. Em 1949, Gale já havia demonstrado a importância do Mn na assimilação de glutamato pela espécie *B. subtilis*, uma vez que as células crescidas em meio deficiente em Mn(II) reduziram a capacidade de acumular o aminoácido.

Um dos primeiros registros do gênero *Bacillus*, como bactérias redutoras de Mn foi observado por Ehrlich (1963), que isolou estas bactérias de substrato oceânico. Outros estudos obtiveram este gênero da rizosfera de culturas agrícolas (POSTA et al., 1994; NOGUEIRA et al., 2007), minérios de Mn (RUSIN et al., 1991; GHOSH et al., 2016b) e rejeitos da mineração de Mn (SANKET et al., 2017; GHOSH e DAS, 2018). Dixit et al. (2018) encontraram isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. em mina de Mn na Índia, onde estas bactérias atuam como oxidantes de ferro e enxofre, com capacidade de crescer em baixo pH, o que favorece a solubilização de Mn.

## REFERÊNCIAS

- AGBENIN, J. O. The distribution and transformation of iron and manganese in soil fractions in a savanna Alfisol under continuous cultivation. **Nutrient cycling in agroecosystems**, v. 66, n. 3, p. 259-270, 2003.
- ANDRADE, J. E. A.; GAMA JÚNIOR, N. A. Cadastramento técnico das barragens da mina de manganês do azul, região de Carajás, com a utilização de imagens de satélite. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 16, 2013, Foz do Iguaçu, PR. **Anais...** Foz do Iguaçu: INPE, 2013. p. 4488-4495.
- AZEVEDO, T. et al. Estudo dos eventos termais de rejeitos de Mn da barragem do Kalunga (Província Mineral de Carajás, PA). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 56, 2016, Belém, PA. **Anais...** Belém: ABQ, 2016. p.1-3.
- BAKER, A. J. M. Accumulators and excluders—strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal of Plant Nutrition**, v. 3, p. 643-654, 1981.
- BAKER, A. J. M.; BROOKS, R. R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, v. 1, p. 81-126, 1989.
- BAKER, A. J. M. et al. Metallophytes: the unique biological resource, its ecology and conservational status in Europe, central Africa and Latin America. In: BATTY, L. C.; HALLBERG, K. B. (Ed.), **Ecology of Industrial Pollution**. Cambridge University Press, p. 7-40, 2010.
- BECH, J. et al. Shoot accumulation of several trace elements in native plant species from contaminated soils in the Peruvian Andes. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 113, p. 106-111, 2012.
- BLANCHETTE, R. A. Manganese accumulation in wood decayed by white rot fungi. **Phytopathology**, v. 74, 725–730, 1984.
- BONETTI, R.; OLIVEIRA, L. A.; MAGALHÃES, F. M. M. População de *Rhizobium* spp. e ocorrência de micorriza V.A. em cultivos de essências florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 19, p. 137-142, 1984.
- BOOJAR, M. M. A.; GOODARZI, F. Comparative evaluation of oxidative stress status and manganese availability in plants growing on manganese mine. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 692-699, 2008.
- BORGES, M. R.; COUTINHO, E. L. M. Metais pesados do solo após aplicação de biossólido: I-Fracionamento. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 1, p. 543-555, 2004.
- BORKERT, C. M.; PAVAN, M. A.; BATAGLIA, O. C. Disponibilidade e avaliação de elementos catiônicos: ferro e manganês. In: FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P.; RAIJ, B. V.; ABREU, C. A. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: CNPq/FAPESP/ POTAFOS, 2001. 600p.

BOYD, R. S. Ecology of metal hyperaccumulation. **New Phytologist**, v. 162, n. 3, p. 563-567, 2004.

BOYD, R. S. The defense hypothesis of elemental hyperaccumulation: status, challenges and new directions. **Plant and Soil**, v. 293, p. 153–176, 2007.

BOYD, R. S.; MARTENS, S. N. The significance of metal hyperaccumulation for biotic interactions. **Chemoecology**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 1998.

BROUWERS, G. J. et al. W. Bacterial  $Mn^{2+}$  oxidizing systems and multicopper oxidases: an overview of mechanisms and functions. **Geomicrobiology Journal**, v. 17, p. 1-24, 2000.

BURNELL, J. N. The biochemistry of manganese in plants. In: GRAHAM, R. D.; HANNAM, R. J.; UREN, N. C. (Ed.). **Manganese in soils and plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 125-137.

CABRAL, L. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of contaminated areas by trace elements: mechanisms and major benefits of their applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 11, p. 1655-1664, 2015.

CAPRONI, A. L. et al. Fungos micorrízicos arbusculares em estéril revegetado com *Acacia mangium*, após mineração de bauxita. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 373-381, 2005.

CARDOSO, E. J. B. N.; NAVARRO, R. B.; NOGUEIRA, M. A. Manganês e germinação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 795-799, 2002.

CHARNEY, J.; FISHER, W. P.; HEGARTY, C. P. Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. **Journal of Bacteriology**, v. 62, n. 2, p. 145-148, 1951.

CNUC. Cadastro Nacional de Unidades de Conservação. **Floresta Nacional de Carajás**. 2014. Disponível em: <<http://sistemas.mma.gov.br/cnuc>>. Acesso em: 25 de jun. de 2014.

COUTURE, R. M. et al. On-off mobilization of contaminants in soils during redox oscillations. **Environmental, Science and Technology**, v. 49, n. 5, p. 3015-3023, 2015.

DAVIES, S. H. R.; MORGAN, J. J. Manganese oxidation kinetics on metal oxide surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 129, n. 63-77, 1989.

DIAS, L. E.; FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C. Fertilidade do solo e seu manejo em áreas degradadas. In: NOVAIS, R. F. et al. (Ed.) **Fertilidade do Solo**. Viçosa: SBCS. p. 955-990, 2007.

DIEM, D.; STUMM, W. Is dissolved  $Mn^{2+}$  being oxidized by  $O_2$  in absence of Mn-bacteria or surface catalysts? **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 48, p. 1571-1573, 1984.

DIXIT, S. J.; KUTTAN, A. K.; SHRIVASTAVA, R. M. Genetic characterization of sulphur and iron oxidizing bacteria in manganese mining area of Balaghat and Chhindwara, Madhya Pradesh, India. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 595-601, 2018.

DNPM. Departamento Nacional de Produção Mineral. 2017. In: PINHEIRO, W. F.; FERREIRA FILHO, O. B.; NEVES, C. A. R. (Coord.) **Brazilian Mineral Yearbook**: main metallic commodities. Brasília, 33 p. [http://www.dnpm.gov.br/dnpm/paginas/anuario-mineral-estadual/dnpm\\_amb\\_2017\\_metalicos](http://www.dnpm.gov.br/dnpm/paginas/anuario-mineral-estadual/dnpm_amb_2017_metalicos)>. Acesso em: 23 de jun. de 2018.

DOU, C. et al. Accumulation and interaction of calcium and manganese in *Phytolacca americana*. **Plant Science**, v. 177, p. 601-606, 2009.

EHRlich, H. L. Bacteriology of manganese nodules I. Bacterial action on manganese in nodule enrichments. **Applied Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 15-19, 1963.

EHRlich, H. L. Different forms of bacterial manganese oxidation. In: STROHL, W. R.; TUOVINEN, H. (Ed.). **Microbial chemoautotrophy**. Ohio State Univ Colloq 8. Columbus, OH: Ohio State University Press, p. 47-56, 1984.

van der ENT, A. et al. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. **Plant and Soil**, v. 362, p. 319-334, 2013.

FERNANDO, D. R. et al. Characterization of foliar manganese (Mn) in Mn (hyper) accumulators using X-ray absorption spectroscopy. **New Phytologist**, v. 188, p. 1014-1027, 2010.

FOY, C. D.; CHANEY, R. T.; WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 29, p. 511-566, 1978.

FUJIMOTO, C. K.; SHERMAN, G. D. The effect of drying, heating, and wetting on the level of exchangeable manganese in Hawaiian soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 10, p. 107-112, 1946.

FUJIMOTO, C. K.; SHERMAN, G. D. Behavior of manganese in the soil and the manganese cycle. **Soil Science**, v. 66, n. 2, p. 131-146, 1948.

GALE, E. F. The assimilation of amino acids by bacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 3, p. 369, 1949.

GARDNER, W. K.; PARBERY, D. G.; BARBER, D. A. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. I. Some characteristics of the soil/root interface. **Plant and Soil**, v. 68, p. 19-32, 1982.

GHIORSE, W. C. Biology of iron- and manganese-depositing bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 38, p. 515-550, 1984.

GHOSH, S.; DAS, A. P. Metagenomic insights into the microbial diversity in manganese-contaminated mine tailings and their role in biogeochemical cycling of manganese. **Scientific Reports**, v. 8, n. 8257, p. 1-11, 2018.

GHOSH, S. et al. A greener approach for resource recycling: Manganese bioleaching. **Chemosphere**, v. 154, p. 628-639, 2016a.

GHOSH, S. et al. Molecular identification of indigenous manganese solubilising bacterial biodiversity from manganese mining deposits. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 254-262, 2016b.

GONÇALVES, E.; SERFATY, A. **Perfil Analítico do Manganês**. Boletim nº 37. Ministério das Minas e Energia. Departamento Nacional da Economia Mineral. Brasília. 1976. 149 p.

GOOLSBY, E. W.; MASON, C. M. Toward a more physiologically and evolutionarily relevant definition of metal hyperaccumulation in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 33, 2015.

GOULD, A. B.; HENDRIX, J. W.; FERRISS, R. S. Relationship of mycorrhizal activity to time following reclamation of surface mine land in western Kentucky - 1: Propagule and spore population densities. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, p. 247-261, 1996.

HEINTZE, S. G.; MANN, P. J. G. Studies on soil manganese. **The Journal of Agricultural Science**, v. 39, n. 1, p. 80-95, 1949.

HEM, J. D.; LIND, C. J. Nonequilibrium models for predicting forms of precipitated manganese oxides. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 47, p. 2037-2046, 1983.

HOLSTE, E. K. et al. Reduced aboveground tree growth associated with higher arbuscular mycorrhizal fungal diversity in tropical forest restoration. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 20, p. 7253-7262, 2016.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração: técnicas de revegetação**. Brasília, DF: IBAMA, 1990. 96 p.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2003. **Plano de manejo para uso múltiplo da Floresta Nacional de Carajás**. Companhia Vale do Rio Doce e STCP Engenharia de Projetos LTDA.

ICMBIO. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Plano de manejo da Floresta Nacional de Carajás: diagnóstico**. Belém, PA: ICMBIO, 2016. 202 p.

IMnI, International Manganese Institute. **Annual Statistics Booklet**. 2018. 21 p. Disponível em: <[http://www.manganese.org/images/uploads/market-research-docs/IMNI\\_statistics\\_Booklet\\_2018.pdf](http://www.manganese.org/images/uploads/market-research-docs/IMNI_statistics_Booklet_2018.pdf)>.08 de abr. de 2019.

JUÁREZ-SANTILLÁN, L. F. et al. Manganese accumulation in plants of the mining zone of Hidalgo, Mexico. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 5836-5841, 2010.

JUWARKAR, A. A. et al. Developmental strategies for sustainable ecosystem on mine spoil dumps: a case of study. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 157, p. 471-481, 2009.

KOSSOFF, D. et al. Mine tailings dams: characteristics, failure, environmental impacts, and remediation. **Applied Geochemistry**, v. 51, p. 229-245, 2014.

LAMBERS, H. et al. Leaf manganese accumulation and phosphorus-acquisition efficiency. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 2, p. 83-90, 2015.

LAMBINON, J.; AUQUIER, P. Flora and vegetation of calaminarian soils in the northern Walloon region and the western Rhineland. Chorological types and ecological groups (in French). **Natura Mosana**, v. 16, p. 113–130, 1963.

LEAL FILHO, N.; SANTOS, G. R.; FERREIRA, R. L. Comparando técnicas de nucleação utilizadas na restauração de áreas degradadas na Amazônia brasileira. **Revista Árvore**, v. 37, p. 587-597, 2013.

LEEPER, G. W. The forms and reactions of manganese in the soil. **Soil Science**, v. 63, n. 2, p. 79-94, 1947.

LEITENMAIER, B.; KÜPPER, H. Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 374, p. 1-13, 2013.

LEUNG, H. M.; YE, Z. H.; WONG, M. H. Survival strategies of plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi on toxic mine tailings. **Chemosphere**, v. 66, p. 905-915, 2007.

LI, M. S.; LUO, Y. P.; SU, Z. Y. Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mineland in Guangxi, South China. **Environmental Pollution**, v. 147, p. 168-175, 2007.

LI, Z.; McLAREN, R. G.; METHERELL, A. K. Fractionation of cobalt and manganese in New Zealand soils. **Soil Research**, v. 39, n. 5, p. 951-967, 2001.

LINDERMAN, R. G. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. **Phytopathology**, v. 78, p. 366-371, 1988.

LIU, J. et al. Soil characteristics and heavy metal accumulation by native plants in a Mn mining area of Guangxi, South China. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 2269-2279, 2014a.

LIU, J. et. al. Mn accumulation and tolerance in *Celosia argentea* Linn.: a new Mn-hyperaccumulating plant species. **Journal of Hazardous Materials**, v. 267, p. 136-141, 2014b.

LIU, P. et. al. Manganese tolerance and accumulation in six Mn hyperaccumulators or accumulators. **Plant and Soil**, v. 335, p. 385-395, 2010.

LONG, X. X. et al. Difference of uptake and accumulation of zinc in four species of *Sedum*. **Acta Botanica Sinica**, v. 44, p. 152-157, 2002.

LOVLEY, D. R. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 55, n. 2, p. 259-287, 1991.

MAIA, L. C.; TRUFEM, S. F. B. Fungos micorrízicos arbusculares em solos cultivados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 13, p. 89-95, 1990.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 254p.

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. 2013. 264 p.

MATIAS, S. R. et al. 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.

MAYNARD, J. B. Manganiferous sediments, rocks, and ores. **Treatise on Geochemistry**. v. 7, p. 289-308, 2004.

McBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils**. 1ed. New York: Oxford University Press, 1994. 416p.

MEHROTRA, V. S. Arbuscular mycorrhizal associations of plants colonizing coal mine spoil in Índia. **The Journal of Agricultural Science**, v. 130, p. 125-133, 1998.

MELLONI, R.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área de mineração de bauxita em reabilitação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 267-276, 2003.

MIN, Y. et al. Accumulation and uptake of manganese in a hyperaccumulator *Phytolacca americana*. **Minerals Engineering**, v. 20, p. 188-190, 2007.

MISRA, S. G.; MISHRA, P. C. Forms of manganese as influenced by organic matter and iron oxide. **Plant and Soil**, v. 30, n. 1, p. 62-70, 1969.

MORENO-de las HERAS, M.; NICOLAU, J. M.; ESPIGARES, T. Vegetation succession in reclaimed coal-mining slopes in a Mediterranean-dry environment. **Ecological Engineering**, v. 34, n. 2, p. 168-178, 2008.

MORGAN, J. J.; STUMM, W. Colloid-chemical properties of manganese dioxide. **Journal of Colloid Science**, v. 19, p. 347-359, 1964.

MURRAY, J. W. et al. Oxidation of Mn(II): initial mineralogy, oxidation state and aging. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 49, p. 463-470, 1985.

NASCIMENTO, C. W. A.; FONTES, R. L. F.; NEVES, J. C. L. Dessorção, extração e fracionamento de manganês em Latossolos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 589-597, 2002.

NEALSON, K. H.; LITTLE, B. Breathing manganese and iron: solid-state respiration. **Advances in Applied Microbiology**, v. 45, p. 213-239, 1997.

NEALSON, K. H.; MYERS, C. R. Microbial reduction of manganese and iron: new approaches to carbon cycling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 439-443, 1992.

- NEALSON, K. H.; TEBO, B. M.; ROSSON, R. A. Occurrence and mechanisms of microbial oxidation of manganese. **Advances in Applied Microbiology**, v. 33, p. 299-318, 1988.
- NOGUEIRA, M. A. et al. Mycorrhiza and soil bacteria influence extractable iron and manganese in soil and uptake by soybean. **Plant and Soil**, v. 298, n. 1-2, p. 273-284, 2007.
- OLIVEIRA, A. B.; NASCIMENTO, C. W. A. Formas de manganês e ferro em solos de referência de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 1, p. 99-110, 2006.
- OLIVEIRA, L. A.; GUITTON, T. L.; MOREIRA, F. W. Relações entre as colonizações por fungos micorrízicos arbusculares e teores de nutrientes foliares em oito espécies florestais da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 29, p. 183-193, 1999.
- OLSEN, S. E.; TANGSTAD, M.; LINDSTAND, T. **Production of Manganese Ferroalloys**. Trondheim: Tapir Academic Press, 2007. 247 p.
- PAWLOWSKA, T. E.; BŁASZKOWSKI, J.; RÜHLING, Å. The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland. **Mycorrhiza**, v. 6, p. 499-505, 1996.
- POSTA, K.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. Manganese reduction in the rhizosphere of mycorrhizal and nonmycorrhizal maize. **Mycorrhiza**, v. 5, n. 2, p. 119-124, 1994.
- POSCHENRIEDER, C.; TOLRÀ, R.; BARCELÓ, J. Can metals defend plants against biotic stress? **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 6, p. 288-295, 2006.
- PÜSCHEL, D.; RYDLOVÁ, J.; VOSÁTKA, M. Mycorrhiza influences plant community structure in succession on spoil banks. **Basic and Applied Ecology**, v. 8, p. 510-520, 2007.
- RAJU, D.; KUMAR, S.; MEHTA, U. J. Differential accumulation of manganese in three mature tree species (*Holoptelia*, *Cassia*, *Neem*) growing on a mine dump. **Current Science**, v. 94, n. 5, p. 639-644, 2008.
- RAMAN, N. et al. Mycorrhizal status of plant species colonizing a magnesite mine spoil in India. **Biology and Fertility of Soils**, v. 16, p. 76-78, 1993.
- REIS, A. et al. Restauração de áreas degradadas: a nucleação como base para incrementar os processos sucessionais. **Natureza e Conservação**, v. 1, p. 28-36, 2003.
- RENGEL, Z. Root exudation and microflora populations in rhizosphere of crop genotypes differing in tolerance to micronutrient deficiency. **Plant and Soil**, v. 196, p. 255-260, 1997.
- RIBEIRO, A. I. et al. Recovery of degraded areas using topsoil in the Amazon rainforest. **WIT Transactions on Ecology and the Environment**, v. 167, p. 481-485, 2011.
- RIBEIRO, R. A. et al. Topsoil application during the rehabilitation of manganese tailing dam increases plant taxonomic, phylogenetic and functional diversity. **Journal of Environmental Management**, v. 227, p. 386-394, 2018.

RIVERA-BECERRIL, F. et al. Impacts of manganese mining activity on the environment: interactions among soil, plants, and arbuscular mycorrhiza. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, n. 2, p. 219-227, 2013.

RODRIGUES, B. D.; MARTINS, S. V.; LEITE, H. G. Avaliação do potencial da transposição da serapilheira e do banco de sementes do solo para restauração florestal em áreas degradadas. **Revista Árvore**, v. 34, p. 65-73, 2010.

RUSIN, P. A. et al. Physiology and kinetics of manganese-reducing *Bacillus polymyxa* strain D1 isolated from manganiferous silver ore. **Geomicrobiology Journal**, v. 9, n. 1, p. 13-25, 1991.

SAMPAIO, J. A.; PENNA, M. T. M. Manganês: CVRD/Mina do Azul. In: SAMPAIO, J. A.; LUZ, A. B.; LINS, F. F. (Org.). **Usinas de beneficiamento de minérios do Brasil**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2001. 147 p.

SANKET, A. S. et al. Molecular identification of acidophilic manganese (Mn)-solubilizing bacteria from mining effluents and their application in mineral beneficiation. **Geomicrobiology Journal**, v. 34, n. 1, p. 71-80, 2017.

SHANE, M. W.; LAMBERS, H. Cluster roots: a curiosity in context. **Plant and Soil**, v. 274, p. 101-125, 2005.

SHUMAN, L. M. Fractionation method for soil microelements. **Soil Science**, v. 140, p. 11-22, 1985.

SILVA, A. P. M.; VIANA, J. P.; CAVALCANTE, A. L. B. **Diagnóstico dos resíduos sólidos da atividade de mineração de substâncias não energéticas**: relatório de pesquisa. Brasília: IPEA, 2012. 46 p.

SILVA, G. A. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid copper mining area in Brazil. **Mycorrhiza**, v. 15, n. 1, p. 47-53, 2005.

SINGH, A. N.; RAGHUBANSHI, A. S.; SINGH, J. S. Impact of native tree plantations on mine spoil in a dry tropical environment. **Forest Ecology and Management**, v. 187, p. 49-60, 2004.

SIQUEIRA, J. O.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J. Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some brazilian native woody species. **Mycorrhiza**, v. 11, p. 245-255, 2001.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3rd. New York: Academic Press, 2008. 605 p.

SOUZA, H. S. et al. Concentration of manganese tailings via reverse flotation in an acid medium. **Revista Escola de Minas**, v. 69, p. 85-90, 2016.

SOUZA, P. A. et al. Avaliação do banco de sementes contido na serapilheira de um fragmento florestal visando recuperação de áreas degradadas. **Cerne**, v. 12, p. 56-67, 2006.

SOUZA, R. G. et al. Diversidade e potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em área de caatinga, na Região de Xingó, Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 49-60, 2003.

SPARROW, L. A.; UREN, N. C. Oxidation and reduction of Mn in acidic soils: effect of temperature and soil pH. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 18, p. 143-48, 1987.

SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 1989. 277 p.

SUNG, W.; MORGAN, J. J. Oxidative removal of Mn(II) from solution catalysed by the  $\gamma$ -FeOOH (lepidocrocite) surface. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 45, p. 2377-2383, 1981.

TEBO, B. M. Manganese(II) oxidation in the suboxic zone of the Black Sea. **Deep-Sea Research**, v. 38, n. S883-S905, 1991.

TRINDADE, A.; GRAZZIOTTI, P.; TÓTOLA, M. Utilização de características microbiológicas na avaliação da degradação ou recuperação de uma área sob mineração de ferro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 3, p. 683-688, 2000.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. **New Phytologist**, v. 181, p. 759-776, 2009.

WANG, X. et al. Pedological characteristics of Mn mine tailings and metal accumulation by native plants. **Chemosphere**, v. 72, n. 9, p. 1260-1266, 2008.

WARDEN, B. T.; REISENAUER, H. M. Fractionation of soil manganese forms important to plant availability. **Soil Science Society of America Journal**, v. 55, n. 2, p. 345-349, 1991.

WEHRLI, B. Redox reactions of metal ions at mineral surfaces. In: STUMM, W. (Ed.). **Aquatic Chemical Kinetics**. New York: John Wiley & Sons, p. 311-336, 1990.

WEI, Y. et al. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with an Mn hyperaccumulator—*Phytolacca americana*, in Mn mining area. **Applied Soil Ecology**, v. 82, p. 11-17, 2014.

XU, X. et al. Distribution and mobility of manganese in the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). **Plant and Soil**, v. 285, p. 323-331, 2006.

XUE, S. G. et al. Manganese uptake and accumulation by two populations of *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 160, p. 3-14, 2005.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

**ARTIGO 1****MN CONCENTRATION AND MYCORRHIZAL COLONIZATION IN  
UNDERSTORY NATIVE SPECIES GROWN AT AREAS OF MANGANESE MINE  
TAILINGS DISPOSAL**

Artigo publicado na revista “International Journal of Phytoremediation” DOI:  
<https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1540542>

Elzane Freitas Leite Silva<sup>1</sup>, Fatima Maria de Souza Moreira<sup>2\*</sup>, Jose Oswaldo Siqueira<sup>3</sup>

<sup>1,2</sup> Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Câmpus Universitário,  
Caixa Postal 3037, 37200-000, Lavras-MG, Brazil, elzanesilva@bol.com.br;  
fmoreira@dcs.ufla.br

<sup>3</sup> Instituto Tecnológico Vale, Rua Boaventura da Silva, 955, Nazaré, 66055-090, Belém-PA,  
Brazil, jose.oswaldo.siqueira@itv.org

\*Corresponding author. E-mail: fmoreira@dcs.ufla.br

**ABSTRACT**

Revegetation of areas with mine tailings should consider not only the best technique but also the choice of species adapted to this condition. This study aimed to analyze the occurrence of plant species, their Mn concentrations, and mycorrhizal colonization after implementation of two revegetation techniques (replacement of topsoil with natural seed bank and planting of seedlings) in an area of disposal of tailings from Mn processing compared to a native forest area as well as to a place that was not revegetated. Plant samples (at least three individuals/species) were collected from the understory at revegetated locations and forest. The established plant species and their Mn concentrations, mycorrhizal colonization, and forms of Mn in the soil were analyzed. The use of topsoil led to greater plant diversity. The high concentrations of Mn in the substrates did not affect the occurrence of vegetation in the understory and mycorrhizal colonization. The plant species established in the revegetated areas differed in relation to Mn concentration (471–27,842 mg kg<sup>-1</sup> in leaves), Mn translocation factor (0.2–125.3) and mycorrhizal colonization rates (1–35%). Four potential Mn hyperaccumulators species were identified: *Aparisthmium cordatum*, *Clidemia hirta*, *Socratea exorrhiza*, and *Vismia latifolia*.

**KEYWORDS**

Tailings dam; forms of Mn; mycorrhizal colonization

## Introduction

Manganese (Mn) is a metal that is not found in its elemental state in nature; its minerals occur in formations mainly of oxides, but also hydroxides, silicates, and carbonates (Maynard 2004). Mn ore is a natural resource essential in production of iron alloys and steel, which represent 85% of the demand for this element (Olsen et al. 2007). Mn is also used by industry in production of batteries, glass, paints and varnishes, chemical products, ceramics, and fertilizers (Gonçalves and Serfaty 1976).

South Africa, China, Australia, Gabon, and Brazil are responsible for 80.5% of world Mn Production (USGS 2016). According to the Brazilian Annual Mineral Production Report (Anuário Mineral Brasileiro), the main Brazilian reserves of Mn ore are in the states of Pará with 69.84%, Mato Grosso do Sul with 26.08%, Minas Gerais with 3.38%, and Rondônia with 0.7%. Brazilian production of processed Mn ore was 2.82 million tons (DNPM 2016). Mn ore is surface mined, and the extracted ore is prepared in a processing plant. Crushing, screening, and classification operations are used, producing products of different particle sizes. Processing of ore generates tailings that are disposed of in a dam reservoir (Quaresma 2009). The entire extraction and processing operation is regulated by Brazilian legislation, which defines criteria for the process of environmental licensing, aiming to minimize environmental impacts, as established in the National Environmental Council (Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA) Resolution no. 237 of 1997 (BRASIL 1997).

Reclamation of areas impacted by mining normally involves reestablishment of vegetation (Almeida and Sánchez 2005), which can be achieved by various techniques. Prominent among these techniques is nucleation, which is based on establishment of small nuclei or islands of vegetation. One way of implementing the nuclei is transposition of the seed bank through the use of topsoil, including litter, from previously forested areas, composed of the soil surface layer and of plant litter (Reis et al. 2003). The main advantage of this technique is introduction of a high density of viable seeds from various native species (Rodrigues et al. 2010). Nevertheless, success of this technique depends on the germination capacity of the species that are in the seed bank. Another technique often used in the revegetation process is planting of seedlings. In this case, species are selected based on their regional occurrence, attractiveness to fauna, and adaptation to soil moisture conditions, among other characteristics (Martins 2013). The success of this technique depends on the establishment of seedlings in the areas to be revegetated (Souza et al. 2006). Revegetation of areas exploited for Mn mining is not very common and, in fact, few areas in this situation have been registered (Li et al. 2007; Juwarkar et al. 2009; Nair et al. 2011). In Brazil, there are records of this activity in the Navio

Range in PA (Drummond 2000) and in Mount Urucum, MS (Veríssimo and Valcarcel 1992), however, with few details.

Although Mn is an essential mineral for plants, in excessive amounts, it can be toxic. Mn toxicity is favored under acid pH conditions, which contributes to predominance of  $Mn^{2+}$ , the most soluble form taken up by the roots (Foy et al. 1978). Plants that live in soils exploited by Mn mining may exhibit different responses. In environments with high concentrations of Mn, the element tends to be retained in the roots (Wang et al. 2008). In contrast, some studies show that Mn tends to be translocated to the plant shoots, and the highest concentrations are found in the leaves (Li et al. 2007; Boojar and Goodarzi 2008; Bech et al. 2012; Liu et al. 2014a, 2014b).

Organisms associated with roots substantially affect plant growth and, consequently, the composition of the plant community during succession (Püschel et al. 2007), as well as the concentrations of the element in the plant. In this respect, Mn concentration and its uptake are generally lower in plants with mycorrhizal fungi, due to protection against excess Mn in the soil. However, one of the effects that Mn mining may bring about is the absence of mycorrhizal colonization (Rivera-Becerril et al. 2013). According to Matias et al. (2009), success in reclamation of mined soils can be achieved through the use of native symbiont species of rhizobia or mycorrhizal fungi.

The aim of this study was to analyze native plant species, their Mn concentrations, and mycorrhizal colonization after implementation of two revegetation techniques in an area of disposal of tailings from Mn processing compared to an area with native forest.

## **Materials and methods**

### ***Study area and sampling***

This study was carried out at four locations of an area revegetated 12 years ago in the former area of the Kalunga tailings dam at the Azul Mn mine in the municipality of Parauapebas, in the southeast of the state of Pará, Brazil.

Climate in the region is tropical hot and humid (Aw), according to the Köppen classification, with mean annual temperature of 26 °C and mean annual rainfall of 2000 mm. As in the other parts of the Amazon, there are two seasons, according to annual distribution of rainfall. The rainy season, also known as the Amazon winter, due to the greater volume of rainfall, extends from November to May, whereas the season with little rain, known as the summer or dry season, is the other months (IBAMA 2003; Costa et al. 2005).

Plants from the understory and soil samples were collected after the end of the rainy season (June 2014). Four locations were evaluated: (i) Topsoil (T) – location of the tailings dam

(six plots of 2500 m<sup>2</sup> – 50 m x 50 m) revegetated by transposition of the surface soil layer and plant litter (30 cm of organic soil) originating from a nearby area of native vegetation suppressed for Mn mining; (ii) Planting of seedlings (PS) – location of the dam revegetated by planting of seedlings [nine plant species: (a) *Euterpe oleracea* Mart., (b) *Dinizia excelsa* Ducke, (c) *Chorisia speciosa* St. Hil., (d) *Stryphnodendron* sp., (e) *Cassia ferruginea* (Schrad.), (f) *Parkia nitida* Miq., (g) *Inga laurina* (Sw.) Willd., (h) *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sanwith, and (i) *Byrsonima stipulacea* A. Juss.], which was performed directly over the tailings after adding 300 g of dolomitic limestone mixed with 0.03m<sup>3</sup> of organic soil (20 days before planting) in plant holes with dimensions of 0.4 x 0.4 x 0.4 m, and spacing of 3.0 x 3.0 m; (iii) Tailings (TL) – location of the dam that was not revegetated; and (iv) Native Forest (NF) – area of primary vegetation adjacent to the Mn tailings dam (Figure 1).

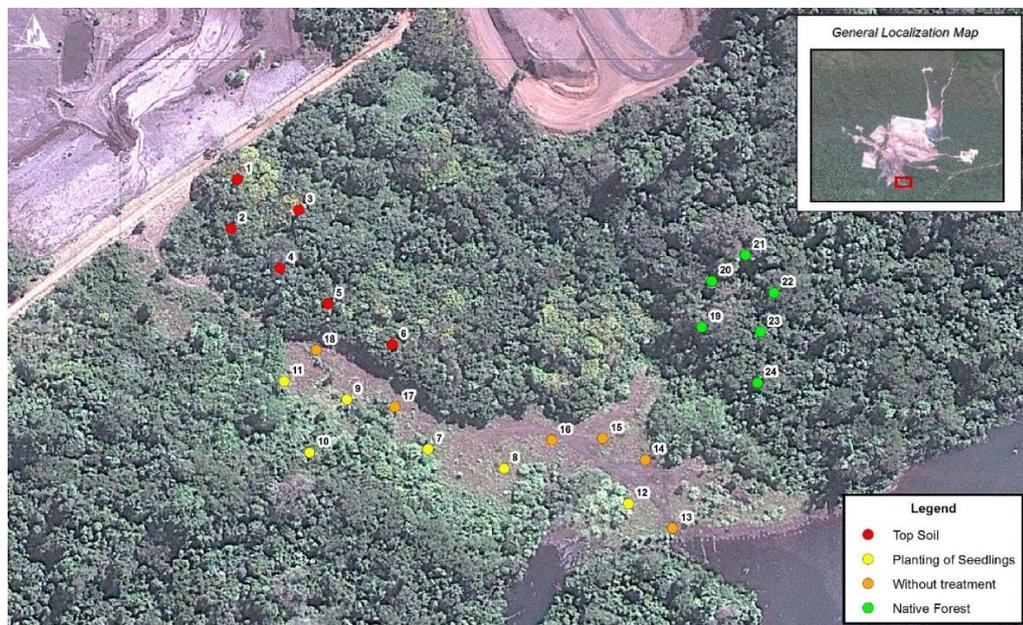


Figure 1. Aerial view of the former Mn tailings dam area, with the respective sampling points at the four locations studied. Image: courtesy of Rafael Ribeiro Almeida.

At each study location, six sampling points, distant from each other about 30 m, were selected at random for plant and soil collection. Within a circle with a radius of 2 m around each sampling point, composite soil samples (one sample = five simple subsamples) were collected from the 0 to 20 cm layer (Ribeiro et al. 2018). In the two revegetated locations and also in the native forest area, the vegetation of the understory/lower stratum was sampled in area within the circle with a radius of 2 m around each sampling point. The criterion for inclusion in the plant sample was established as all complete (leaf, stem, and roots) for each species with at least three individuals in the sampling point area. Three individuals were put

together to form a composited sample per species. One gram of fine roots from the sample of each species was separated for mycorrhizal colonization analysis. Some plant species were collected in more than one sampling point (Tables S1–S3).

### *Soil analysis*

Mn was extracted from the substrate in a sequential manner according to the methodology of Shuman (1979, 1985): (i) fraction 1 (exchangeable) was extracted with 20 mL of 1.0 M  $Mg(NO_3)_2$  at pH 7.0; (ii) fraction 2 (bound to organic matter) was obtained using 10 mL of 0.7 M NaOCl at pH 8.5; (iii) fraction 3 (bound to Mn oxide) was determined with the use of 0.1 M hydroxylamine hydrochloride, pH 2.0; (iv) fraction 4 (bound to amorphous iron oxide) was defined with the modifications suggested by Chao and Zhou (1983) after extraction with 0.25 M hydroxylamine hydrochloride + 0.25 M hydrochloric acid; (v) fraction 5 (bound to crystalline iron oxide) was extracted with 0.2 M ammonium oxalate + 0.2 M oxalic acid + 0.1 M ascorbic acid, adjusted to pH 3; and (vi) fraction 6 (residual) was defined by the difference between total Mn and the sum of the fractions.

Total Mn was obtained by method 3052 of the USEPA by digestion in a microwave oven with  $HNO_3$  + HF (USEPA 1996). The Mn concentration was determined by atomic absorption spectrophotometry.

The attributes of the substrates of the study locations are shown in Table 1. More details can be obtained from Ribeiro et al. (2018).

Table 1. Attributes of substrates from three locations of a former Mn mine tailings dam area and from a native forest location.

Locations	pH	OM	V	t	Ca	Mg	Al	P	K	Mn	Sand	Silt	Clay
	H <sub>2</sub> O(1:2.5)	(dag kg <sup>-1</sup> )	(%)		(cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )			(mg dm <sup>-3</sup> )			(dag kg <sup>-1</sup> )		
T	4.9	1.5	16.3	1.1	0.5	0.2	0.4	1.2	38	370	28	26	46
OS	5.5	0.5	10.6	0.5	0.2	0.1	0.1	1.4	34	532	35	55	10
TL	5.6	0.4	7.2	0.4	0.1	0.1	0.1	1.3	33	562	64	23	13
NF	5.2	2.4	33.6	2.1	1.4	0.5	0.1	1.0	51	212	21	9	70

Notes: T: topsoil; PS: planting of seedlings; TL: tailings; NF: native forest. OM ( $Na_2Cr_2O_7$  4N+ $H_2SO_4$  10 N) (Walkley and Black, 1934); V = base saturation; t = effective cation exchange capacity; Exchangeable Ca, Mg, and Al (1 mol/L KCl) (McLean et al., 1958); Available P, K, and Mn (Mehlich-1-Mehlich, 1953). Particle size analysis performed by the Bouyoucos hydrometer method (Bouyoucos, 1951).

### *Identification of plant species and Mn concentration in plant parts*

The plant species found in the two revegetated locations (T and PS) and in the native forest area were identified locally by a specialist and classified at the level of family, genus,

and species. The names of the species were updated and standardized based on data from the Missouri Botanical Garden ([www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)). Arboreal, shrub, sub-shrub, herbaceous, and liana species were identified in classification, according to growth habit, using the database of the Species List of Brazilian Flora (Reflora 2016).

The plant parts (leaf, stem, and roots) were washed in running water, neutral detergent ( $1\text{mL L}^{-1}$ ), and distilled water (Carmo et al. 2000). The plant material was dried in a forced air circulation oven at  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After constant weight, the material was ground in a Wiley type mill and passed through a 1.0 mm mesh sieve.

The ground samples (around 0.5 g) were digested in an  $\text{HNO}_3$  and  $\text{HClO}_4$  (2:1, v/v) solution in a block digester (Malavolta et al. 1997). The Mn concentration was determined by atomic absorption spectrophotometry. To ensure the quality of metal analysis, a standard reference material was included in each battery (Tomato Leaves 1573a) certified by the American National Institute of Standards and Technology (NIST), as well as a blank sample, obtaining a mean recovery rate of 92 %.

The following were evaluated: (i) the translocation factor (TF) (leaf/root concentration) and (ii) bioaccumulation factor (BF) of Mn (leaf/soil concentration) (Li et al. 2007).

### ***Mycorrhizal colonization***

For the estimate of mycorrhizal colonization, one gram of fine roots from each species were clarified with 5 % KOH and 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ , acidified with 1 % HCl, and stained in 0.01 % trypan blue (Koske and Gemma 1989). For calculation of the percentage of mycorrhizal colonization, the quadrant intersection method was used (Giovannetti and Mosse 1980).

### ***Statistical analysis***

In order to compare the plant Mn contents, as well as the bioaccumulation factor and the translocation factor, among the three study locations (topsoil, native forest, and planting of seedlings), the data from all plants analyzed at each sampling point was combined by calculating their geometric mean, yielding a single data point for each sampling point. The resulting variables were then log-transformed and submitted to a one-way analysis of variance (ANOVA), with the three study locations as explanatory variable. These ANOVA models were fitted using generalized least squares due to the observed heterogeneity of residual variance (Zuur et al 2010; Cleasby and Nakagawa 2011). Comparisons among study locations were performed using Tukey's honest significance difference (HSD) test at  $p = .05$ . All analyses were performed in R 3.4.3 (R Development Core Team 2017). For comparing soil Mn content among study locations, the same procedure as above was applied for each. Pearson correlation coefficients were used to identify associations between the plant and soil variables.

## Results and discussion

### *Forms of Mn in the substrates of the diferente study locations*

The total Mn contents at PS location were higher than T and FN and similar to TL (Table 2). The high Mn contents in these substrates can be related to the processing of Mn ore, which can generate a residue with about 63% of the metal, which allows its recovery (Lima et al. 2008). Souza et al. (2016) found the following chemical composition of tailings coming from the Azul Mn mine (%): 7.1 Mn; 34.2 silica; 29.7 alumina, and 7.3 Fe, and mineralogical constitution (in weight): kaolinite (71%), cryptomelane-hollandite (17%), goethite (3.7%), bixbyite (3.1%), and quartz (0.7%). In the same region, Azevedo et al. (2016) evaluated Mn tailings from the Kalunga dam and observed mineralogical composition mainly formed by kaolinite, gibbsite, goethite, birnessite, todorokite, and quartz.

In locations with tailings (T, PS, and TL) the high Mn total contents can be considered phytotoxic, since they exceed the 5000 mg/kg (Alloway 1995). Absence of plants in TL and their very low occurrence in PS indicated the high level of toxicity in these locations (Table 3). Although T location also had total contents above 5000 mg/kg, the organic matter layer (top soil from forest) just above the tailings increase OM in the substrate (Table 1) and may have been involved in reducing the availability of manganese to the plants, probably by immobilization and thus decreasing its toxicity to plants (Juwarkar et al. 2009). The total content of Mn in the forest soil (1778 mg Mn/kg) can be considered high when compared to the total soil content of the state of Pará, Brazil, under natural conditions, 180 mg Mn/kg – method 3051, USEPA (Fernandes et al. 2018).

Table 2. Manganese concentrations (mg/kg) in the different chemical fractions of this element in the substrate and relative percentage in each fraction in relation to total Mn, in the study locations, at the depth of 0 to 20 cm

Locations	Ex	SE	%	OM	SE	%	OxMn	SE	%	OxFeA	SE	%	OxFeC	SE	%	R	SE	%	Total	SE
T	9.1 a	3.0	0	0.2 b	0.0	0	1260 b	487	7	1435 b	944	8	226 b	110	1	16,067 c	5941	84	18,997 bc	7151
PS	0.3 b	0.1	0	0.1 b	0.0	0	2777 a	32	6	5681 a	1039	12	700 a	119	2	37,389 a	4706	80	46,547 a	4443
TL	0.2 b	0.0	0	0.2 b	0.1	0	2783 a	22	8	8786 a	525	24	760 a	23	2	24,123 bc	3604	66	36,452 ab	4059
NF	16.0 a	2.5	1	34.9 a	4.45	2	424 c	102	24	249 b	23	14	10 b	0.4	1	1044 c	160	58	1,778 c	171

Notes: T: topsoil; PS: planting of seedlings; TL: tailings not revegetated; NF: native forest. Fractions: Ex: exchangeable; OM: bound to organic matter; OxMn: bound to manganese oxide; OxFeA: bound to amorphous iron oxide; OxFeC: bound to crystalline iron oxide; and R: residual. SE: standard error. Means followed by the same letter in the column do not differ among themselves by Tukey's test,  $p < .05$ .

However, this high content can be attributed to the source material of the region, associated to the sediments of the Águas Claras Formation, which is composed of manganese pellets (20–30% Mn) and manganese dioxides (medium content 46% Mn) in the form of nsutite, pisolitic (14–18% Mn) and detritic (about 45% Mn) materials, with cryptomelane as the main mineral (Dardenne and Schobbenhaus 2003; Costa et al. 2005).

The different Mn fractions in the soil samples collected at the different locations are shown in Table 2. The Native Forest soil exhibited the highest concentrations of exchangeable Mn (also Topsoil) and Mn bound to organic matter. In contrast, the Mn bound to oxidic fractions is predominant in PS and TL locations (Table 2).

The differences in the Mn concentrations in the soil fractions of each location may be related to their mineral composition. The soil of the NF area has a higher constitution of fine particles with a clayey texture, which explains its lower reserve of residual Mn and higher concentrations of exchangeable Mn and Mn bound to organic matter. However, in the substrates of the T, PS, and TL locations with lower clay contents, Mn remains in less soluble forms (Table 2). In addition, in forest ecosystems, the dropping of senescent components of the plants, especially leaves, returns significant amounts of nutrients to the soil, enriching it as decomposition occurs (Luizão 1989). In the case of Mn, in the initial stages of decomposition, the Mn coming from plant matter is transformed into available Mn, and later, with an increase in oxidation, the Mn is transformed into less available forms (Blanchette 1984). The exchangeable fraction is the most important form of available Mn in the soil for the plants, and, with the addition of organic matter, the organic fraction comes to be most responsible for this low availability (Shuman 1988). Nevertheless, most of the Mn appears bound to the Mn oxide fractions, Fe oxide fractions, and the residual. The residual fraction has the highest percentage (higher than 50 %) of the Mn present in the soil/substrate, indicating its low mobility in the soil (Table 2), as also found by Wang et al. (2008). The metals in the residual fraction are bound to the silicates, crystalline iron oxides, and other minerals that were not solubilized in the previous extractions. In the soil, this can be attributed to the forms of Mn that occur and participate in the structure of the primary minerals; and, in the tailings, it is attributed to the chemical composition. Kossoff et al. (2014) highlight that the presence of silica and Fe is nearly universal and, generally, they are the most abundant elements in tailings, along with Al, Ca, K, Mg, Mn, Na, P, Ti, and S.

#### ***Native species in different locations in the area of the tailings dam***

Of the 36 plant species registered, 28 were identified, and they belonged to 24 genera and 16 families (Table 3). The occurrence of specific plants in metalliferous soils (soils

naturally or anthropogenically enriched with metal(loid)s has been recognized for more than 400 years (Thalius 1588).

Table 3. Plant species growing in the understory at different locations of a former Mn tailings dam.

Family	Species	Growth habit	T	PS	NF
1. Annonaceae	<i>Anaxagorea brevipes</i> Benth.	arboreal			X
2. Apiaceae	<i>Echinophora</i> sp.	herbaceous			X
3. Arecaceae	<i>Socratea exorrhiza</i> (Mart.) H. Wendl.	arboreal	X		
4. Asteraceae	<i>Eupatorium</i> sp.	sub-shrub	X		
5. Euphorbiaceae	<i>Aparisthium cordatum</i> (A. Juss.) Baill.	shrub	X		
6. Fabaceae	<i>Senna latifolia</i> (G. Mey.) H.S. Irwin & Barneby	shrub	X		
	<i>Senna silvestris</i> (Vell.) H.S. Irwin & Barneby	arboreal	X		
	<i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd.	arboreal	X		
	<i>Piptadenia suaveolens</i> Miq.	arboreal	X		X
	<i>Senegalia pennata</i> (L.) Maslin	shrub	X	X	
	<i>Inga edulis</i> Mart.	arboreal			X
	<i>Inga capitata</i> Desv.	arboreal			X
	<i>Hymenobium excelsum</i> Ducke	arboreal			X
7. Hypericaceae	<i>Vismia latifolia</i> (Aubl.) Choisy	arboreal	X	X	
8. Malpighiaceae	<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth	arboreal		X	
9. Melastomataceae	<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don	shrub	X	X	
10. Phyllanthaceae	<i>Phyllanthus niruri</i> L.	herbaceous	X		
11. Piperaceae	<i>Piper arboreum</i> Aubl.	shrub	X	X	
	<i>Piper</i> sp.	shrub			X
12. Poaceae	<i>Paspalum</i> sp.	herbaceous		X	
	<i>Olyra micrantha</i> Kunth	herbaceous			X
13. Rubiaceae	<i>Borreria</i> sp.	shrub	X		
	<i>Spermacoce latifolia</i> Aubl.	herbaceous		X	
14. Sapindaceae	<i>Serjania membranacea</i> Splitg.	liana	X		
	<i>Vouarana guianensis</i> Aubl.	arboreal			X
	<i>Cupania</i> sp.	arboreal			X
15. Selaginellaceae	<i>Selaginella</i> sp.	herbaceous		X	
16. Urticaceae	<i>Cecropia distachya</i> Huber	arboreal	X		
Morphospecies 1	Morphospecies 1	unknown	X		
Morphospecies 2	Morphospecies 2	unknown	X		
Morphospecies 3	Morphospecies 3	unknown	X		
Morphospecies 4	Morphospecies 4	unknown	X		
Morphospecies 5	Morphospecies 5	unknown	X		
Morphospecies 6	Morphospecies 6	unknown		X	
Morphospecies 7	Morphospecies 7	unknown			X
Morphospecies 8	Morphospecies 8	unknown			X
16 families	24 genera and 28 species		20	9	12

Note: T: topsoil; PS: planting of seedlings; NF: native forest.

The Fabaceae family represented 22% of the species registered and was predominant in the location revegetated through the use of Topsoil from forest (Table 3). The higher representation of the Fabaceae family can be explained by it having more resilient species, which allow them to live in adverse environments (Araújo et al. 2006). In addition, it is the

family with the greatest diversity of species in the Amazon ecosystems (Moreira et al. 1992). Considering the known growth habit of each plant species collected in the areas studied, there was predominance of trees, with 13 species (46 %), followed by 7 shrub species (25 %), 6 herbaceous species (21 %), and one sub-shrub (4 %) and liana (4 %) species.

Compared to the location revegetated by Planting of Seedlings (PS) and to Native Forest (NF), the location revegetated through the use of Topsoil (T) exhibited greater diversity of plant species after 12 years. This result shows the importance of topsoil (surface soil layer) management for revegetation of mined areas, since removal of the surface layer is necessary for ore extraction (Moreno-de las Heras et al. 2008; Ribeiro et al. 2011; Leal Filho et al. 2013), but it can be reused to advantage in revegetation. Topsoil is not only a seed bank but also adds organic matter to the system, improving many soil properties, and it restores macro- and microbiota, which have a fundamental role in soil formation and promotion of plant growth (Souza et al. 2006; Moreno de las Heras et al. 2008). In a study developed in a coal mine, Moreno-de las Heras et al. (2008) used two recovery techniques on hillsides with different ages of vegetation, showing that after 15 years, the plant communities in areas revegetated with topsoil had greater diversity and plant cover than the diversity and cover observed in areas revegetated through planting of seedlings.

In this study, the species initially planted in the location revegetated by Planting of Seedlings were absent although suitable management techniques such as fertilization were carried out; in this location, herbaceous and shrub plants predominated (Table 3). In respect to absence of species, the genotypes planted initially likely did not have characteristics that allowed them to establish in the metalliferous substrate (secondary environment). In this case, in addition to tolerance to metal(loid)s, plants must be able to survive with low P concentration and low organic matter in the soil; moreover, they need to be drought resistant and able to grow in friable (loose) soils. This result shows the need for studies in respect to which genotypes should be given priority in selection of species to make up the list of plants to be introduced through planting of seedlings, when this is the revegetation alternative most appropriate for the location.

In regard to the presence of herbaceous species in the location, this may be related to the absence of forest canopy and to the short life cycle and high reproductive ability of herbaceous species; this facilitates entry of the seeds of these species and their incorporation in the substrate. In addition, herbaceous species are hardy, not very demanding concerning edaphic conditions, heliophytes, and drought resistant (Souza et al. 2006).

The species that the locations revegetated by the T and PS had in common were *Senegalia pennata*, *Vismia latifolia*, *Clidemia hirta*, and *Piper arboreum*, plants with shrub and arboreal growth habit, which may indicate recovery of mining areas by these plants bearing up under the conditions of the substrates, even under different recovery techniques. As the succession process advances, there is a reduction in the density of herbaceous species and an increase in the density of shrub and arboreal species (Baider et al. 2001), and this, in fact, is observed in the NF area. Nevertheless, the smaller number of herbaceous species in the understory of the NF is related to the presence of a closed canopy, which reduces the incidence of solar radiation, limiting the growth of herbaceous species (which require more light). The canopy influences luminosity and spectral composition, as well as the temperature of the air and soil, relative humidity, and soil moisture (Rincon and Huante 1993).

#### ***Mn concentrations in the different parts of the plants***

In general, the Mn concentrations in the different parts of the plants differ among the species, which indicates different plant strategies of metal accumulation (Table 4) according the different revegetation techniques (Table 5).

Table 4. Mn concentration, translocation factor, and bioaccumulation factor in plant species growing in the understory at different locations of a former Mn tailings dam.

Plant species	Mn concentration (mg kg <sup>-1</sup> )			Translocation factor <sup>a</sup>	Bioaccumulation factor <sup>b</sup>
	Leaves	Stems	Roots		
			Topsoil		
<i>Senna latifolia</i> (G. Mey.) H.S. Irwin & Barneby	1574	189	355	4.4	0.08
<i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd.	777	460	170	4.6	0.04
<i>Senna silvestris</i> (Vell.) H.S. Irwin & Barneby	815	429	303	2.7	0.04
<i>Serjania membranacea</i> Splitg.	788	718	532	1.5	0.04
<i>Aparisthmium cordatum</i> (A. Juss.) Baill.	23,920	834	422	56.7	1.26
<i>Borreria</i> sp.	2599	528	111	23.3	0.14
<i>Phyllanthus niruri</i> L.	-	2566	631	-	-
<i>Cecropia distachya</i> Huber	1764	720	-	-	0.09
<i>Piptadenia suaveolens</i> Miq.	814	673	171	4.8	0.04
<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don	25,852	16,883	670	38.6	1.36
<i>Senegalia pennata</i> (L.) Maslin	1363	206	113	12.1	0.07
<i>Piper arboreum</i> Aubl.	2516	178	147	17.1	0.13
<i>Eupatorium</i> sp.	2668	645	1550	1.7	0.14
<i>Socratea exorrhiza</i> (Mart.) H. Wendl.	27,842	-	744	37.4	1.47
<i>Vismia latifolia</i> (Aubl.) Choisy	26,708	861	1123	23.8	1.41
Morphoespecies 1	551	288	156	3.5	0.03
Morphoespecies 2	1590	740	913	1.7	0.08
Morphoespecies 3	2501	1426	824	3.0	0.13
Morphoespecies 4	19,547	1333	156	125.3	1.03
Morphoespecies 5	1419	278	167	8.5	0.07

	Planting of seedlings				
<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don	26,526	15,150	2280	11.6	0.57
<i>Spermacoce latifolia</i> Aubl.	1546	4832	2003	0.8	0.03
<i>Selaginella</i> P. Beauv.	1336	-	1938	0.7	0.03
<i>Paspalum</i> sp.	1701	-	2060	0.8	0.04
<i>Vismia latifolia</i> (Aubl.) Choisy	19,850	1599	2302	8.6	0.43
<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth	471	494	2206	0.2	0.01
<i>Piper arboreum</i> Aubl.	1049	445	360	2.9	0.02
<i>Senegalia pennata</i> (L.) Maslin	3252	551	1341	2.4	0.07
Morphoespecies 6	1401	-	2473	0.6	0.03
	Native forest				
<i>Hymenolobium excelsum</i> Ducke	901	557	341	2.6	0.51
<i>Inga edulis</i> Mart.	627	485	114	5.5	0.35
<i>Piptadenia suaveolens</i> Miq.	1508	1047	420	3.6	0.85
<i>Piper</i> sp.	1022	532	314	3.3	0.57
<i>Anaxagorea brevipes</i> Benth.	3362	844	215	15.6	1.89
<i>Inga capitata</i> Desv.	448	185	62	7,2	0,25
<i>Echinophora</i> sp.	1244	-	1626	0.8	0.70
<i>Vouarana guianensis</i> Aubl.	540	127	31	17.5	0.30
<i>Cupania</i> sp.	289	84	51	5.7	0.16
<i>Olyra micrantha</i> Kunth	1417	332	1496	0.9	0.80
Morphoespecies 7	1375	471	853	1.6	0.77
Morphoespecies 8	170	277	420	0.4	0.10

<sup>a</sup>The translocation factor (TF) was calculated based on the Mn concentration in the leaf divided by the Mn concentration in the roots.

<sup>b</sup>The bioaccumulation factor (BF) was calculated by the Mn concentration in the leaf divided by the total concentration of Mn in the soil.

Table 5. Geometric mean (GM), standard error (SE), confidence interval (lower; upper), of Mn concentrations (mg kg<sup>-1</sup>) in the leaves, stems, and roots of the different plant species growing in the understory at different locations of a former Mn tailings dam. Translocation Factor (TF) and Standard error (SE), Bioaccumulation Factor (BF) and Standard error (SE).

	GM	Standard error	Lower	Upper	TF	SE	BF	SE
Topsoil								
Leaves	2895 a	1327	1090	7868				
Stems	676 b	132	446	1025				
Roots	323 b	80	191	547	7.59 a	2.2	0.12 ab	0.06
Planting of seedlings								
Leaves	2590 a	318	1994	3363				
Stems	3222 a	1786	989	10,504				
Roots	1660 a	309	1116	2469	1.6 b	0.18	0.06 b	0.01
Native forest								
Leaves	763 b	164	483	1206				
Stems	398 b	92	243	650				
Roots	194 b	37	131	291	3.9 a	0.45	0.44 a	0.09

Notes: Means followed by the same letter in the column for the same plant part among different locations do not differ among themselves by Tukey's test,  $p < .05$ . Means followed by the same letter in the column for TF and BC do not differ among themselves by Tukey's test,  $p < .05$ .

According to the conceptual diagram proposed by Baker (1981), and later modified by McGrath et al. (1999), for the metal(loid) uptake response in leaves, “normal” plants can tolerate only low bioavailable concentrations of metal(loid)s in the soil before dying due to high phytotoxicity. Excluder plants, for their part, can grow within a wider range of metal(loid) concentrations available, up to the point that the physiological mechanisms can no longer control the uptake, causing death of the plants. Bioindicator plants take up metal(loid)s over a wider range than “normal” plants and the concentrations in the leaves reflect the concentration of the metal(loid)s in the soil, up to the point that phytotoxicity impedes growth and leads to death of the plant. While hyperaccumulator plants are able to bear up under bioavailable metal(loid) concentrations much higher than “common”, bioindicator, and excluder plants, most hyperaccumulator species do not occur in soils not enriched with metal(loid)s, due to the competitive disadvantages and greater sensitivity to infections caused by fungi and other pathogens. The standard threshold value established for Mn concentration in the shoots of hyperaccumulator plants is 10,000 mg Mn kg<sup>-1</sup> of dry matter.

The species *Spermacoce latifolia*, *Selaginella* sp., *Paspalum* sp., *Byrsonima crassifolia*, and Morphospecies 6, *Echinophora* sp., *Olyra micranta*, and Morphospecies 8 exhibited greater Mn concentrations in the roots than in the leaves. According to the translocation factor (TF) and the bioaccumulation factor (BF) lower than 1, these species are inefficient in translocating Mn from the roots to the shoots and in extracting the metal from the soil (Table 4). This inefficiency is defined as an exclusion strategy. In contrast, most of the species analyzed exhibited higher leaf Mn concentrations. According to the TF values, which were higher than 1 (Table 4), these species have high Mn translocation ability, and are thus considered accumulators.

Some plants are able to accumulate extremely high Mn concentrations in the shoots. For these species, called hyperaccumulators, in addition to exhibiting TF and BF higher than 1, an Mn concentration higher than 10,000 mg kg<sup>-1</sup> is defined (Baker and Brooks 1989). Thus, the following species meet these criteria: *Aparisthmium cordatum* (23,919 mg kg<sup>-1</sup>), *Socratea exorrhiza* (27,842 mg kg<sup>-1</sup>), and Morphospecies 4 (19,547 mg kg<sup>-1</sup>), which are exclusive to the location revegetated by the use of topsoil; and *C. hirta* (25,852 mg kg<sup>-1</sup>) and *V. latifolia* (26,708 mg kg<sup>-1</sup>), which the T and PS locations have in common (Table 4). The species *C. hirta* and *V. latifolia* did not reproduce the BF higher than 1 in the PS location. However, this was due to the lower Mn concentration in the topsoil layer where the soil was sampled. Considering that the roots of these species reach the lower layer with Mn concentration similar to PS, we can consider these species as hyperaccumulators. Interesting to notice that the different individuals

of these two species behaved similar regarding the Mn concentration in all plant parts, both in T and PS (Figure 2).

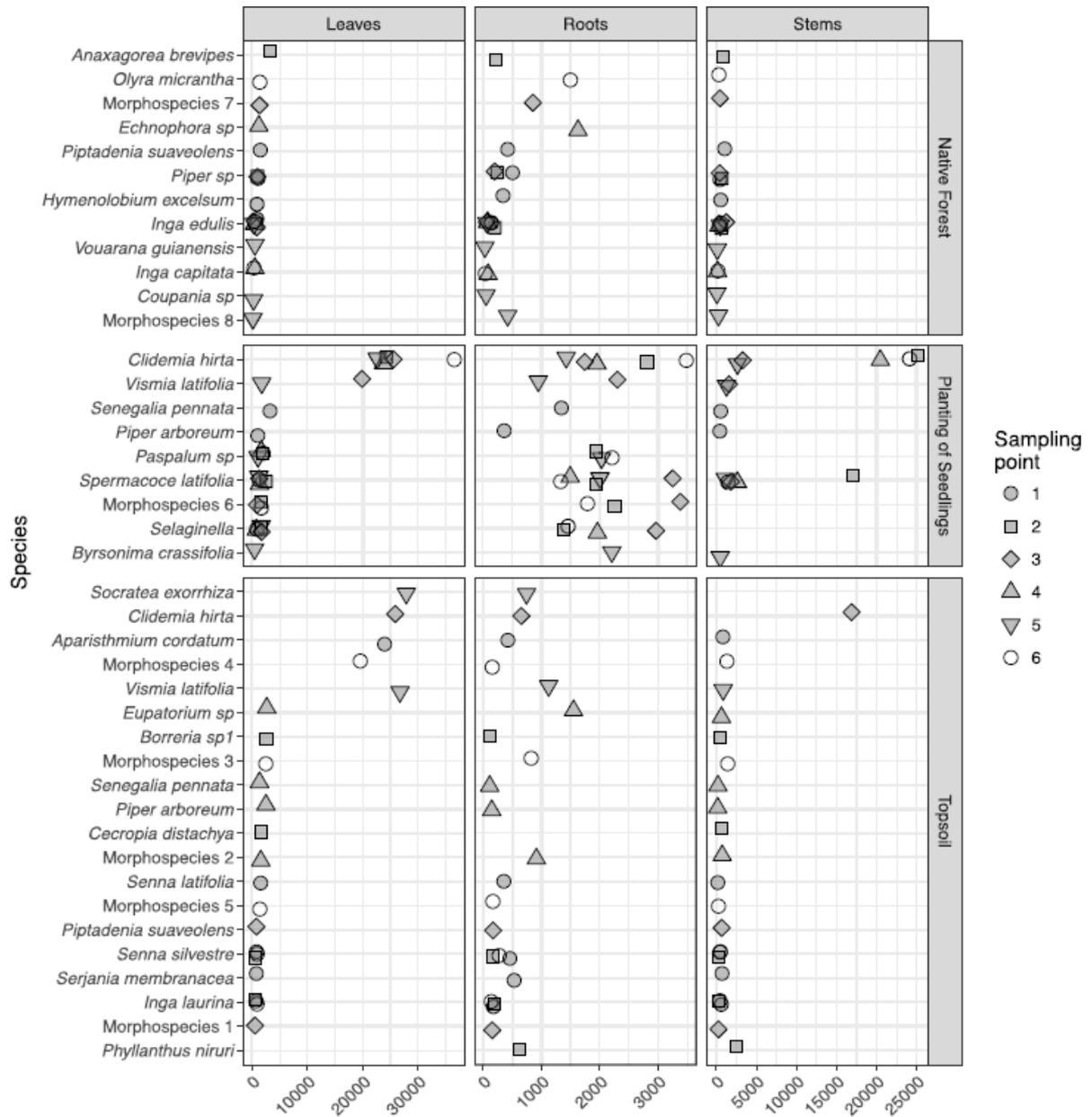


Figure 2. Raw data of Mn concentration ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) distribution by different parts of plant species, sampling points and location.

Among those considered hyperaccumulators, *S. exorrhiza* and *V. latifolia* are typically Amazon species, whereas *A. cordatum* and *C. hirta* are distributed in Brazil in different phytogeographic domains (Reflora 2016). *S. exorrhiza* is a palm called “paxiúba” commonly used for rural construction and ornamentation (Rocha and Silva 2005). *V. latifolia* is a tree known as “lacre”; it stands out in studies regarding xanthones, which are chemical compounds found in its leaves (Doriguetto et al. 2001) and roots (Santos et al. 2000) with pharmaceutical

application. *A. cordatum* is a shrub with the popular name “ariquena queimosa”; a secondary metabolite is extracted from its bark (Muller et al. 1987; Hiruma-Lima et al. 2000), which has pharmacological properties. *C. hirta* is a shrub species known as “pixirica”; it is a colonizing plant and is important in meliponiculture (Ferreira et al. 1994).

Over time, Mn can accumulate in vegetation, and this accumulation differs among plants. In areas affected by Mn mining, studies developed in Asia (Li et al. 2007; Boojar and Goodarzi 2008) indicate that there was translocation of Mn to the shoots of the plant after a long period of reclamation. This effect was attributed to Mn accumulation in the leaf vacuoles, which increases its tolerance to excess of Mn (Boojar and Goodarzi 2008). Likewise, in the study of Bech et al. (2012), plants that grew in contaminated locations were able to accumulate significantly more Mn in the shoots than in their roots. Dou et al. (2009) explain that the high tolerance to Mn in hyperaccumulator species is due to the association of the metal with oxalate. Fernando et al. (2010), however, highlight that this role belongs to carboxylic, malic, or citric acids.

The Mn concentrations showed wide variation in the parts of the plants in the Topsoil area. The concentrations of Mn in the leaf, stem, and roots ranged from 551 to 27,842, from 178 to 16,883, and from 111 to 1550 mg kg<sup>-1</sup>, respectively, and the mean concentration was 7664, 1577, and 487 mg kg<sup>-1</sup>, respectively (Table 4).

In the location revegetated by PS there was likewise wide variation. The Mn concentrations in the leaf ranged from 470 to 26,526; in the stem, from 444 to 15,150; and in the roots, from 360 to 2473 mg kg<sup>-1</sup>, with mean concentration (mg kg<sup>-1</sup>) of 6348 (leaf), 3845 (stem), and 1885 (roots) (Table 4). In the Native Forest area, the Mn concentrations in the leaf ranged from 169 to 3362, in the stem, from 84 to 1047, and in the roots, from 30 to 1626 mg kg<sup>-1</sup>, with mean concentration (mg kg<sup>-1</sup>) of 1075 (leaf), 449 (stem), and 495 (roots) (Table 4).

In spite of wide variation, in the revegetated locations, the mean values of the Mn concentrations in the plant followed in general an increasing order: roots<stem<leaf. This is partially explained by the natural translocation of Mn to leaf tissues (Horst 1988), since it is a micronutriente essential to photosynthesis and activation of different enzymes.

The Mn leaf concentrations observed in this study are considered high compared to the values found in the literature for different Mn mining areas around the world. The leaf concentrations in vegetation found in China ranged from 89 to 3280 mg kg<sup>-1</sup> (Li et al. 2007); in India, the Mn concentrations ranged from 168 to 1744 mg kg<sup>-1</sup> (Raju et al. 2008); in Spain, the variation was from 182 to 1507 mg kg<sup>-1</sup> (Juárez-Santillán et al. 2010); and in Iran, the variation was from 324 to 3251 mg kg<sup>-1</sup> (Boojar and Goodarzi 2008). Considering the shoots, the

variations found were 211 to 1053 mg kg<sup>-1</sup> (Wang et al. 2008), 591 to 12,528 mg kg<sup>-1</sup> (Liu et al. 2014), and 94 to 8044 mg kg<sup>-1</sup> (Yang et al. 2014).

As for the area with native forest, Magalhães and Blum (1999) analyzed the nutrient concentrations in leaves considering the position in the canopy, physiological age, and season of collection and found different bands of concentration for Mn among the species, ranging from 2 to 189 mg kg<sup>-1</sup>.

In addition to the median value, geometric means were calculated due the asymmetric distribution of plants and TF and BF (Figure 2) calculated for each location (Table 5). The results presented in Table 5 show greater Mn concentration in the parts of the plants from the revegetated areas in relation to those of the forest. Some plants that grow in soils contaminated with metals can adapt and, to survive, they accumulate a higher concentration of heavy metals in their tissues than other plant species do (Long et al. 2002). However, translocation and bioaccumulation factors were higher in Topsoil and Native forest than in Planting of seedlings. Thus, they corroborate the role of OM at these locations, as well as, of the propagules of diverse forms of life extant in native forest soil and Topsoil substrate, being the latter also from forest origin.

### ***Mycorrhizal colonization***

All the species exhibited colonization by arbuscular mycorrhizal fungi, but they differed in regard to colonization rates (Figure 3). Mycorrhizal colonization ranged from 1% to 35%, and the plant species of the locations revegetated by T and PS showed mean colonization similar to that of the NF area (Table 7). The values of root colonization in the plants evaluated in this study were similar to those observed in Amazon species growing in degraded areas, 2.4–34.8 % (Moreira 2006), and in fruit-bearing species, 16–25 % (Oliveira and Oliveira 2003). However, the colonization was less than that observed in native forest species, 19–86 % (Bonetti et al. 1984) and in logging areas, 25–61 % (Oliveira et al. 1999).

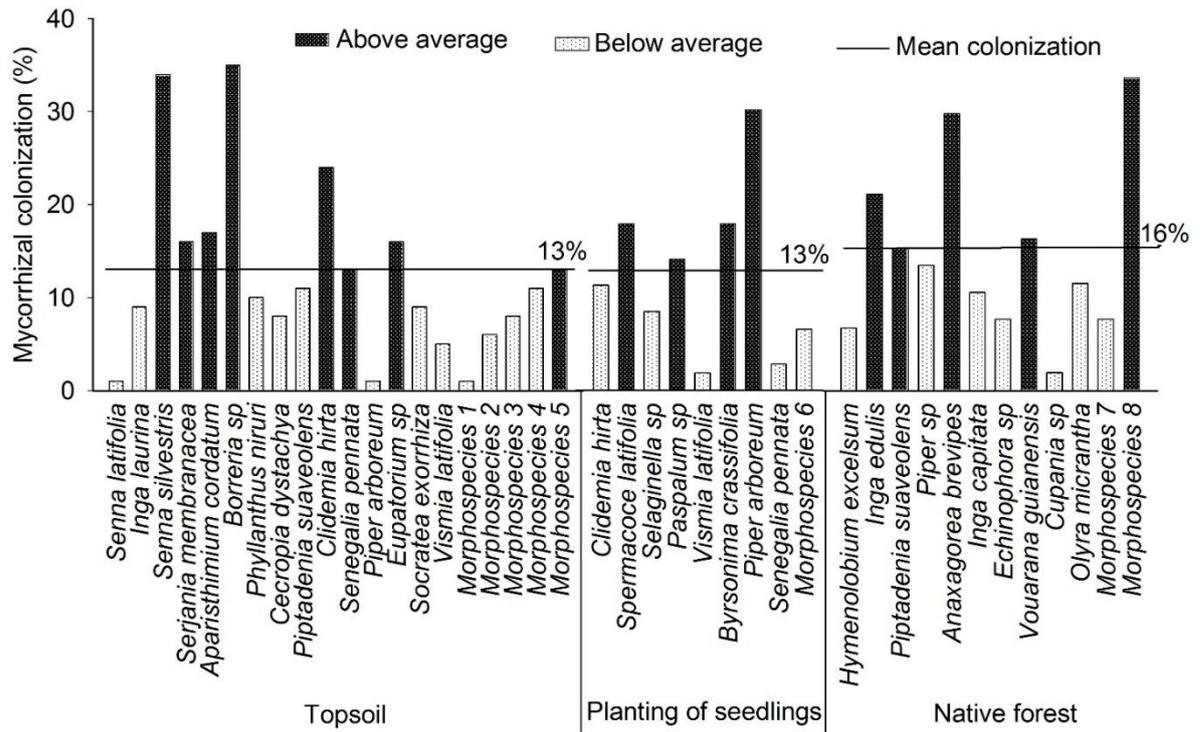


Figure 3. Mycorrhizal colonization in plant species growing in the understory at different locations of a former Mn tailings dam.

Table 7. Mean of mycorrhizal colonization among different species (MC), standard error (SE), confidence interval (lower; upper) at different locations: topsoil (T), planting of seedlings (PS) and native forest (NF) of a former Mn tailings dam.

Location	MC	Standard error	Lower	Upper
T	12.91 a	2.464	7.57	18.08
PS	12.82 a	2.464	7.66	18.16
NF	15.80 a	2.464	10.54	21.05

Note: Means followed by the same letter in the column do not differ among themselves by Tukey's test,  $p < .05$ .

The species *C. hirta*, present in the two revegetated areas (T and PS), had mycorrhizal colonization above the mean in the location revegetated by T, whereas in the location revegetated by PS, colonization was below the mean (Figure 3), suggesting variability by environmental influence. Knowledge of the physiology of hyperaccumulator plants is still limited, especially in regard to hyperaccumulators that establish symbiosis with mycorrhizal fungi (Smith and Read 2008; Verbruggen et al. 2009; van der Ent et al. 2013; Lambers et al. 2015; Goolsby and Mason 2015). Although the mechanisms of uptake of Mn by plants with mycorrhizal fungi is still being clarified, speculation is that hyperaccumulation mechanisms

used by species of *Alyxia* – Apocynaceae – (Nova Caledonia) and *Cupania* – Sapindaceae – (Brasil) are similar to the mechanisms used by plants that do not establish symbiosis with mycorrhizal fungi. In this case, there are two groups of plants: (i) plants forming structures similar to the bottlebrush plant in the roots, which are an agglomeration of cluster roots, through which the plant exudes organic acids (e.g., oxalate, malate, and citrate, among others) to solubilize phosphorus and, consequently, make the Mn soluble too (Gardner et al. 1982; Shane and Lambers 2005) and (ii) plants not forming an agglomeration of cluster roots, such as species of the families Phytolaccaceae and Polygonaceae. There is still no information regarding the chemistry of the rhizosphere of Phytolacca species. Therefore, it is not known if the Mn accumulation is due to the release of organic acids, protons, or both (Xue et al. 2005; Xu et al. 2006; Min et al. 2007; Liu et al. 2010).

Mycorrhizal association can reduce Mn concentration in the shoots of plants under excess of Mn by retaining a large part of Mn in the roots (Cardoso and Kuyper 2006). However, this effect was not shown in this study because, although the species *S. latifolia* (Rubiaceae), *Selaginella* sp. (Selaginellaceae), *Paspalum* sp. (Poaceae), *B. crassifolia* (Malpighiaceae) and Morphospecies 6, *Echinophora* sp. (Apiaceae), *O. micranta* (Poaceae), and Morphospecies 8 exhibited low ability of Mn translocation, colonization appears not to have affected this response, since there was no correlation between the Mn concentrations in the plant and mycorrhizal colonization (Table 6). Moreover, the colonization values were very different among these species.

Studies on mycorrhizal colonization, both in areas of primary vegetation of the Amazon (Bonetti et al. 1984; Oliveira et al. 1999) and in areas affected by mining, have shown wide variation. In the first case, native species can exhibit large differences in regard to responsiveness, mycorrhizal dependence, and efficiency in phosphorus uptake (Siqueira and Saggin-Júnior 2001). As for areas affected by mining, local plants may show low colonization (Raman et al. 1993; Pawlowska et al. 1996; Mehrotra 1998; Melloni et al. 2003) or even absence of it (Gould et al. 1996; Rivera-Becerril et al. 2013).

Cardoso et al. (2002) report that excess of metals, including Mn, can reduce or inhibit the initial development of fungal hyphae, and thus retard or suppress the formation of mycorrhizal symbiosis. In revegetated mining areas, Pawlowska et al. (1996) found that the availability of Mn did not affect the intensity of colonization and, furthermore, that colonization did not prevent the plants from accumulating the metal in the shoots. Therefore, in areas with toxic levels of the element, arbuscular mycorrhizal fungi can promote survival of plants (Leung et al. 2007).

The results of correlation analysis indicate that there is no linear correlation between the Mn concentrations in the plant, mycorrhizal colonization, and the available and total contents of Mn in the soil for any of the areas, except for the Mn concentration in the stem in the Native Forest area, where the correlation had a significance level of 5% (Table 6). However, no significant differences were found amount colonization rate means among areas (Table 7). Similar results were found by Ekosse et al. (2006) and Yang et al. (2014) in areas affected by Mn mining.

Table 6. Values of the Pearson correlation coefficient between mycorrhizal colonization, available Mn of the substrate, and total Mn of the substrate, and the Mn concentrations in the parts of plants at different locations of a former Mn tailings dam.

	Topsoil			Planting of seedlings			Native forest		
	Leaves	Stems	Roots	Leaves	Stems	Roots	Leaves	Stems	Roots
Mycorrh. Col.	0.05	0.28	-0.07	-0.36	0.00	-0.59	0.27	0.34	-0.24
Avail. Mn	-0.44	-0.17	-0.22	0.29	0.01	0.66	0.10	0.67*	-0.27
Total Mn	-0.26	-0.23	-0.31	-0.20	-0.07	0.40	0.06	0.64*	-0.15

\*Significant at the level of 5% probability by the t test.

The absence of correlation found in the present study is probably due to high variations in metal extraction capacity by plants, which reflects the diversity of plant species and of ecophysiological strategies (Schettini et al. 2018).

In addition, according to Lambers et al. (2014), hyperaccumulation of Mn in the mycorrhizal species does not reflect soil Mn, which is associated with highly dynamic processes of Mn mobilization in the rhizosphere, probably due to release of protons and subsequent acidification of the rhizosphere. The carboxylates generated to produce the protons introduced in the rhizosphere are used internally to bond the Mn within the plant tissues, thus reducing the toxic effects of hyperaccumulation of Mn.

## Conclusions

The use of topsoil promoted greater diversity of plants in the understory than the planting of seedlings 12 years after initial establishment of the revegetation process.

The high Mn concentrations in the soil did not affect the occurrence of vegetation in the understory and the mycorrhizal colonization of the plants, which showed enormous variability in natural colonization.

The plant species established in the areas differed significantly in relation to concentration of Mn and also its translocation in the plant.

Four potential Mn hyperaccumulator species were identified – *A. cordatum* (Euphorbiaceae), *C. hirta* (Melastomataceae), *S. exorrhiza* (Arecaceae), *V. latifolia* (Hypericaceae), as well as Morphospecies 4.

### **Acknowledgments**

Our thanks to the Vale company and to Rafael de Almeida Ribeiro for logistical support in accessing the studied areas and to Teotonio Soares Carvalho for statistical analysis support. Our thanks also to Mr Delmo Fonseca for collaboration in collection and identification of plants.

### **Funding**

To FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) for granting scholarships; to the CNPq for productivity in research scholarships for authors 2 [304527/2016-5] and 3; and to Capes/PROEX [590-2014] for partial financing.

### **References**

- Alloway BJ. 1995. Heavy metals in soils. London: Blackie Academic and Professional.
- Almeida ROPO, Sánchez LE. 2005. Revegetação de áreas de mineração: critérios de monitoramento e avaliação de desempenho. *Rev Árvore*. 29(1):47–54.
- Araújo FSD, Martins SV, Meira Neto JAA, Lani JL, Pires, IE. 2006. Florística da vegetação arbustivo-arbórea colonizadora de uma área degradada por mineração de caulim, em Brás Pires, MG. *Rev Árvore*. 30(1):107–116.
- Azevedo T, Mar IC, Figueira BAM, Branco AS. 2016. Estudo dos eventos termais de rejeitos de Mn da barragem do Kalunga (Província Mineral de Carajás, PA). Resumos. Anais do 56º Congresso Brasileiro de Química, Belém, Pará, 1–3.
- Baider C, Tabarelli M, Mantovani W. 2001. The soil seed bank during Atlantic forest regeneration in southeast Brazil. *Rev Bras Biol*. 61(1):35–44.
- Baker AJM. 1981. Accumulators and excluders—strategies in the response of plants to heavy metals. *J Plant Nutr*. 3(1–4):643–654.
- Baker AJM, Brooks RR. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1:81–126.
- Bech J, Duran P, Roca N, Poma W, Sánchez I, Barceló J, Boluda R, Roca-Pérez L, Poschenrieder C. 2012. Shoot accumulation of several trace elements in native plant species from contaminated soils in the Peruvian Andes. *J Geochem Explore*. 113:106–111.
- Blanchette RA. 1984. Manganese accumulation in wood decayed by white rot fungi. *Phytopathol*. 74(6):725–730.
- Bonetti R, Oliveira LA, Magalhães FMM. 1984. População de *Rhizobium* spp. e ocorrência de micorriza V.A. em cultivos de essências florestais. *Pesqui Agropec Bras*. 19:137–142.

- Boojar MMA, Goodarzi F. 2008. Comparative evaluation of oxidative stress status and manganese availability in plants growing on manganese mine. *Ecotoxicol Environ Safe*. 71(3):692–699.
- Bouyoucos GJ. 1951. A recalibration of the hydrometer method for making mechanical analysis of soil. *Soil Sci Soc Am J*. 43(9):434–437.
- BRASIL. 1997. Conselho Nacional do Meio Ambiente/CONAMA. Resolução n. 237 [accessed 2016 Sep 28]. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res97/res23797.html>.
- Cardoso EJB, Navarro RB, Nogueira MA. 2002. Manganês e germinação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. *Rev Bras Ciênc Solo*. 26(3):795–799.
- Cardoso IM, Kuyper TW. 2006. Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agric Ecosyst Environ*. 116(1–2):72–84.
- Carmo CAFS, Araujo WS, Bernardi ACC, Saldanha MFC. 2000. Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. Rio De Janeiro: Embrapa Solos-Circular Técnica 6. 41 p.
- Chao TT, Zhou L. 1983. Extraction techniques for selective dissolution of amorphous iron oxides from soils and sediments. *Soil Sci Soc Am J*. 47:225–232.
- Cleasby IR, Nakagawa S. 2011. Neglected biological patterns in the residuals. *Behav Ecol Sociobiol*. 65:2361–2372.
- Costa ML, Fernandez OJC, Requelme MER. 2005. O depósito de manganês do Azul, Carajás: Estratigrafia, mineralogia, geoquímica e evolução geológica. In: Marini OJ, Queiroz ET, Ramos BW, editors. Caracterização de depósitos minerais em distritos mineiros da Amazônia. Brasília: DNPM-CT/Mineral- ADI MB. p. 227–334.
- Dardenne MA, Schobbenhaus C, 2003. Depósitos Minerais no Tempo Geológico e Épocas Metalogenéticas. In: Bizzi LA, Schobbenhaus C, Vidotti RM, Gonçalves JH. (org.). Geologia, tectônica e recursos minerais do Brasil: texto, mapas e SIG. Brasília (DF): CPRM-Serviço Geológico do Brasil. p. 365–448.
- DNPM – Departamento Nacional de Produção Mineral. 2016. Brazilian mineral yearbook: main metallic commodities. Brasília: DNPM. 31 p [accessed 2016 Oct 18]. [http://www.dnpm.gov.br/dnpm/paginas/anuario-mineral-estadual/dnpm\\_amb\\_2016\\_metalicos](http://www.dnpm.gov.br/dnpm/paginas/anuario-mineral-estadual/dnpm_amb_2016_metalicos).
- Doriguetto AC, Santos MH, Ellena JA, Nagem TJ. 2001. 6-Deoxyjacareubin. *Acta Crystallogr C Cryst Struct Commun*. 57(9):1095–1097.
- Dou C, Fu X, Chen X, Shi J, Chen Y. 2009. Accumulation and interaction of calcium and manganese in *Phytolacca americana*. *Plant Sci*. 177(6):601–606.

- Drummond JA. 2000. Investimentos privados, impactos ambientais e qualidade de vida num empreendimento mineral amazônico – o caso da mina de manganês de Serra do Navio (Amapá). *Hist Cienc Saude-Manguinhos*. 6(Suppl.):753–793.
- Ekosse GIE, Fouche PS, Mashatola B. 2006. Total organic carbon in soils and its relation with manganese concentrations in soils and vegetation close to an abandoned manganese mine. *Int J Environ Sci Technol*. 3(1):15–24.
- van der Ent A, Baker AJ, Reeves RD, Pollard AJ, Schat H. 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant Soil*. 362(1–2):319–334.
- Fernandes AR, Santos ES, Braz AMS, Birani SM, Alleoni LRF. 2018. Quality reference values and background concentrations of potentially toxic elements in soils from the Eastern Amazon, Brazil. *J Geochem Exploration*. 190:453–463.
- Fernando DR, Mizuno T, Woodrow IE, Baker AJM, Collins RN. 2010. Characterization of foliar manganese (Mn) in Mn (hyper) accumulators using X-ray absorption spectroscopy. *New Phytol*. 188(4):1014–1027.
- Ferreira SAN, Antonio IC, Jansen MRA. 1994. Biologia reprodutiva de *Clidemia hirta* (L.) D. Don (Melastomataceae). *Acta Amaz*. 24(3–4):183–188.
- Foy CD, Chaney RT, White MC. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Annu Rev Plant Physiol*. 29(1):511–566.
- Gardner WK, Parbery DG, Barber DA. 1982. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. I. Some characteristics of the soil/root interface. *Plant Soil*. 68(1):19–32.
- Giovannetti M, Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol*. 84(3):489–500.
- Gonçalves E, Serfaty A. 1976. Perfil Analítico do Manganês. Boletim n° 37. Ministério das Minas e Energias. Brasília: Departamento Nacional da Economia Mineral. 149 p.
- Goolsby EW, Mason CM. 2015. Toward a more physiologically and evolutionarily relevant definition of metal hyperaccumulation in plants. *Front Plant Sci*. 6:33.
- Gould AB, Hendrix JW, Ferriss RS. 1996. Relationship of mycorrhizal activity to time following reclamation of surface mine land in western Kentucky – 1: propagule and spore population densities. *Can J Bot*. 74:247–261.
- Hiruma-Lima CA, Gracioso JS, Toma W, Paula ACB, Almeida ABA, Brasil DSB, Muller AH, Brito ARMS. 2000. Evaluation of the gastroprotective activity of cordatin, a diterpene isolated from *Aparisthmium cordatum* (Euphorbiaceae). *Biol Pharm Bull*. 23:1465–1469.
- Horst WJ. 1988. The physiology of manganese toxicity. In: Graham RD, Hannam RJ, Uren NC, editors. *Manganese in soils and plants*. Dordrecht: Kluwer Academic. p. 175–188.

- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2003. Plano de manejo para uso múltiplo da Floresta Nacional de Carajás. Brasília, DF, Brasil.
- Juárez-Santillán LF, Lucho-Constantino CA, Vázquez-Rodríguez GA, Cerón-Ubilla NM, Beltrán-Hernandez RI. 2010. Manganese accumulation in plants of the mining zone of Hidalgo, Mexico. *Bioresource Technol.* 101(15):5836–5841.
- Juwarkar AA, Yadav SK, Thawale PR, Kumar P, Singh SK, Chakrabarti T. 2009. Developmental strategies for sustainable ecosystem on mine spoil dumps: a case of study. *Environ Monit Assess.* 157(1–4):471–481.
- Koske RE, Gemma JN. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol Res.* 92(4):486–505.
- Kossoff D, Dubbin WE, Alfredsson M, Edwards SJ, Macklin MG, Hudson-Edwards KA. 2014. Mine tailings dams: characteristics, failure, environmental impacts, and remediation. *Appl Geochem.* 51:229–245.
- Lambers H, Hayes PE, Laliberte E, Oliveira RS, Turner BL. 2014. Leaf manganese accumulation and phosphorus-acquisition efficiency. *Trends Plant Sci.* xx:1–8.
- Leal Filho N, Santos GR, Ferreira RL. 2013. Comparando técnicas de nucleação utilizadas na restauração de áreas degradadas na Amazônia brasileira. *Rev Árvore.* 37:587–597.
- Leung HM, Ye ZH, Wong MH. 2007. Survival strategies of plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi on toxic mine tailings. *Chemosphere.* 66(5):905–915.
- Li MS, Luo YP, Su ZY. 2007. Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mineland in Guangxi, South China. *Environ Pollut.* 147(1):168–175.
- Lima RMF, Vasconcelos JA, Silva GR. 2008. Flotação aniônica de rejeito de minério de manganês. *Rev Esc Minas.* 61(3):337–342.
- Liu J, Shang W, Zhang X, Zhu Y, Yu K. 2014. Mn accumulation and tolerance in *Celosia argentea* Linn.: a new Mn-hyperaccumulating plant species. *J Hazardous Mater.* 267:136–141.
- Liu J, Zhang X-H, Tian-Yu Li T-Y, Wu Q-X, Jin Z-J. 2014. Soil characteristics and heavy metal accumulation by native plants in a Mn mining area of Guangxi, South China. *Environ Monit Assess.* 186(4):2269–2279.
- Liu P, Tang X, Gong C, Xu G. 2010. Manganese tolerance and accumulation in six Mn hyperaccumulators or accumulators. *Plant Soil.* 335(1–2):385–395.
- Long XX, Yang XE, Ye ZQ, Ni WZ, Shi WY. 2002. Difference of uptake and accumulation of zinc in four species of *Sedum*. *Acta Bot. Sin.* 44:152–157.
- Luizão FJ. 1989. Litter production and mineral element input to the forest floor in a central Amazonian forest. *GeoJournal.* 19:407–417.

- Magalhães LMS, Blum WEH. 1999. Concentração e distribuição de nutrientes nas folhas de espécies florestais, na Amazônia Ocidental. *Floresta Ambiente*. 6:127–137.
- McLean EO, Heddleson MR, Bartlett RJ, Holowaychuk N. 1958. Aluminum in soils: I. Extraction methods and magnitudes in Ohio clays and soils 1. *Soil Sci Soc Am J*. 22(5):382.
- Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2nd ed. Rev. Atual. Piracicaba: POTAFOS. 319 p.
- Martins SV. 2013. Recuperação de áreas degradadas: ações em áreas de preservação permanente, voçorocas, taludes rodoviários e de mineração. 3rd ed. Viçosa (MG): Aprenda Fácil. 264 p.
- Matias SR, Pagano MC, Muzzi FC, Oliveira CA, Carneiro AA, Horta SN, Scotti MR. 2009. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. *Eur J Soil Biol*. 45(3):259–266.
- Maynard JB. 2004. Manganiferous sediments, rocks, and ores. In: Mackenzie FT, Holland HD, editors. *Treatise on geochemistry: sediments, diagenesis and sedimentary rocks*. Vol. 7. Amsterdam: Elsevier. p. 289–308.
- McGrath SP, Zhao FJ, Dunham SJ. 1999. Constraints to the growth and metal uptake by hyperaccumulator plants. Extended Abstracts, Proceedings of the 5th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, Vienna, Austria. p. 10–11.
- Mehlich A. 1953. Determination of P, Ca, Mg, K, Na and NH<sub>4</sub>. Raleigh: North Carolina Soil Testing Division. 195 p.
- Mehrotra VS. 1998. Arbuscular mycorrhizal associations of plants colonizing coal mine spoil in Índia. *J Agric Sci*. 130(2):125–133.
- Melloni R, Siqueira JO, Moreira FMS. 2003. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área de mineração de bauxita em reabilitação. *Pesqui Agropec Bras*. 38(2):267–276.
- Min Y, Boqing T, Meizhen T, Aoyama I. 2007. Accumulation and uptake of manganese in a hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *Miner Eng*. 20(2):188–190.
- Moreira FMS, Silva MF, Faria SM. 1992. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. *New Phytol*. 121(4):563–570.
- Moreira FW. 2006. Características químicas dos solos e colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares em plantas introduzidas em clareiras de Província Petrolífera de Urucu, Amazonas. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Florestas Tropicais) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

- Moreno-de las Heras M, Nicolau JM, Espigares T. 2008. Vegetation succession in reclaimed coal-mining slopes in a Mediterranean-dry environment. *Ecol Eng.* 34(2):168–178.
- Muller AH, Cesario M, Guilhem J, Pascard C, Dadoun H. 1987. Cordatin, a new diterpene from *Aparisthium cordatum*. *Phytochemistry.* 26(7):2108–2110.
- Nair R, Juwarkar AA, Wanjari T, Singh SK, Chakrabarti T. 2011. Study of terrestrial carbon flux by eddy covariance method in revegetated manganese mine spoil dump at Gumgaon, India. *Climatic Change.* 106(4):609–619.
- Oliveira AN, Oliveira LA. 2003. Sazonalidade, colonização radicular e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares em plantas de cupuaçuzeiro e de pupunheira na Amazônia Central. *Rev Bras Ciênc Agrárias.* 40:145–154.
- Oliveira LA, Guitton TL, Moreira FW. 1999. Relações entre as colonizações por fungos micorrízicos arbusculares e teores de nutrientes foliares em oito espécies florestais da Amazônia. *Acta Amaz.* 29(2):183–193.
- Olsen SE, Tangstad M, Lindstand T. 2007. Production of manganese ferroalloys. Trondheim: Tapir Academic Press. 247 p.
- Pawlowska TE, Błaszczkowski J, Rühling Å. 1996. The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland. *Mycorrhiza.* 6(6):499–505.
- Püschel D, Rydlová J, Vosátka M. 2007. Mycorrhiza influences plant community structure in succession on spoil banks. *Basic Appl Ecol.* 8(6):510–520.
- Quaresma LF. 2009. Relatório Técnico 19: perfil da mineração de manganês. Consultoria J Mendo e Ministério de Minas e Energia. 40:15.
- Raju D, Kumar S, Mehta UJ. 2008. Differential accumulation of manganese in three mature tree species (*Holoptelia*, *Cassia*, *Neem*) growing on a mine dump. *Curr Sci.* 94:639–644.
- Raman N, Nagarajan N, Gopinathan S, Sambandan K. 1993. Mycorrhizal status of plant species colonizing a magnesite mine spoil in India. *Biol Fertil Soils.* 16(1):76–78.
- R Development Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing [accessed 2018 Sep 15]. <https://www.R-project.org/>.
- Reflora. 2016. Lista de Espécies da Flora do Brasil [accessed 2016 Nov 12]. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>.
- Reis A, Bechara FC, Espíndola MB, Vieira NK, Souza LL. 2003. Restauração de áreas degradadas: a nucleação como base para incrementar os processos sucessionais. *Nat. Conservação.* 1:28–36.

- Ribeiro AI, Longo RM, Melo WJ, Lourençoo RW, Maciel AJS, Rosa AH, Fraceto LF. 2011. Recovery of degraded areas using topsoil in the Amazon rainforest. *WIT Trans Ecol Environ.* 167:481–485.
- Ribeiro RA, Giannini TC, Gastauer M, Awade M, Siqueira JO. 2018. Topsoil application during the rehabilitation of manganese tailing dam increases plant taxonomic, phylogenetic and functional diversity. *J Environ Manage.* 227:386–394.
- Rincon E, Huante P. 1993. Growth responses of tropical deciduous tree seedlings to contrasting light conditions. *Trees-Struct Funct.* 7: 202–207.
- Rivera-Becerril F, Juárez-Vázquez LV, Hernández-Cervantes SC, Acevedo-Sandoval OA, Vela-Correa G, Cruz-Chávez E, Moreno-Espíndola IP, Esquivel-Herrera A, León-González F. 2013. Impacts of manganese mining activity on the environment: interactions among soil, plants, and arbuscular mycorrhiza. *Arch Environ Contam Toxicol.* 64(2):219–227.
- Rocha AD, Silva MD. 2005. Aspectos fitossociológicos, florísticos e etnobotânicos das palmeiras (Arecaceae) de floresta secundária no município de Bragança, PA, Brasil. *Acta Bot Bras.* 19(3):657–667.
- Rodrigues BD, Martins SV, Leite HG. 2010. Avaliação do potencial da transposição da serapilheira e do banco de sementes do solo para restauração florestal em áreas degradadas. *Rev Árvore.* 34(1):65–73.
- Santos MHD, Nagem TJ, Silva MCD, Silva LG. 2000. Xanthones from *Vismia latifolia*. *J Braz Chem Soc.* 11(5):537–539.
- Schettini AT, Leite MG, Messias MCT, Gauthier A, Li H, Kozovits AR. 2018. Exploring Al, Mn and Fe phytoextraction in 27 ferruginous rocky outcrops plant species. *Flora.* 238:175–182.
- Shane MW, Lambers H. 2005. Cluster roots: a curiosity in context. *Plant Soil.* 274(1–2):101–125.
- Shuman LM. 1979. Zinc, manganese and copper in soil fractions. *Soil Sci.* 127(1):10–17.
- Shuman LM. 1985. Fractionation method for soil microelements. *Soil Sci.* 140(1):11–22.
- Shuman LM. 1988. Effect of organic matter on the distribution of manganese, copper, iron, and zinc in soil fractions. *Soil Sci.* 146(3):192–198.
- Siqueira JO, Saggin-Júnior OJ. 2001. Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species. *Mycorrhiza.* 11(5):245–255.
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd ed. New York: Academic Press. ISBN 440026354, 605 p.
- Souza HS, Braga AS, Oliveira AH, Leal Filho LS. 2016. Concentration of manganese tailings via reverse flotation in an acid medium. *Rem: Rev Esc Minas.* 69(1):85–90.

- Souza PA, Venturin N, Griffith J, Martins SV. 2006. Avaliação do banco de sementes contido na serapilheira de um fragmento florestal visando recuperação de áreas degradadas. *Cerne*. 12:56–67.
- Thalius J. 1588. Flora of the Harz Mountains, or an enumeration of indigenous plant species in the mountains and their surroundings (in Latin). Frankfurt a.M.
- USEPA - United States Environmental Protection Agency. 1996. Method 3052: microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. Washington: Environmental Protection Agency, Compact disc.
- USGS, United States Geological Survey: Mineral commodity summaries – Manganese, 2016. 202 p. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3133/70140094>>.
- Verbruggen N, Hermans C, Schat H. 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol.* 181(4):759–776.
- Veríssimo EW, Valcarcel R. 1992. Recuperação de áreas degradadas por mineração de manganês no morro do Urucum, MS. Resumos. In: Anais do I Simpósio Nacional de Recuperação de Áreas Degradadas. Curitiba (Paraná): UFPR. p. 264–327.
- Walkley A, Black IA. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37(1):29–38.
- Wang X, Liu Y, Zeng G, Chai L, Xiao X, Song X, Min Z. 2008. Pedological characteristics of Mn mine tailings and metal accumulation by native plants. *Chemosphere.* 72(9):1260–1266.
- Xu X, Shi J, Chen Y, Chen X, Wang H, Perera A. 2006. Distribution and mobility of manganese in the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). *Plant Soil.* 285(1–2):323–331.
- Xue SG, Chen YX, Baker AJM, Reeves RD, Xu XH, Lin Q. 2005. Manganese uptake and accumulation by two populations of *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). *Water Air Soil Pollut.* 160(1–4):3–14.
- Yang S, Liang S, Yi L, Xu B, Cao J, Guo Y, Zhou Y. 2014. Heavy metal accumulation and phytostabilization potential of dominant plant species growing on manganese mine tailings. *Front Environ Sci Eng.* 8(3):394–404.
- Zuur AF, Ieno EN, Elphick CS. 2010. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods Ecol Evol.* 1(1):3–14.

### Supplemental material

Table S1. Plant samples (3 individuals) collected in the area within the circle with a radius of 2 m around each sampling point by plant species at Topsoil location

Plant species	Sampling point					
	1	2	3	4	5	6
<i>Senna latifolia</i> (G. Mey.) H.S. Irwin & Barneby	X					
<i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd.	X	X				X
<i>Senna silvestris</i> (Vell.) H.S. Irwin & Barneby	X	X				X
<i>Serjania membranacea</i> Splitg.	X					
<i>Aparisthium cordatum</i> (A. Juss.) Baill.	X					
<i>Borreria</i> sp.		X				
<i>Phyllanthus niruri</i> L.		X				
<i>Cecropia distachya</i> Huber		X				
<i>Piptadenia suaveolens</i> Miq.			X			
<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don			X			
<i>Senegalia pennata</i> (L.) Maslin				X		
<i>Piper arboreum</i> Aubl.				X		
<i>Eupatorium</i> sp.				X		
<i>Socratea exorrhiza</i> (Mart.) H. Wendl.					X	
<i>Vismia latifolia</i> (Aubl.) Choisy					X	
Morphoespecies 1			X			
Morphoespecies 2				X		
Morphoespecies 3						X
Morphoespecies 4						X
Morphoespecies 5						X

Table S2. Plant samples (3 individuals) collected in the area within the circle with a radius of 2 m around each sampling point by plant species at Planting of seedlings location

Plant species	Sampling point					
	1	2	3	4	5	6
<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don	X	X	X		X	X
<i>Spermacoce latifolia</i> Aubl.	X	X	X		X	X
<i>Selaginella</i> P. Beauv.	X	X	X		X	X
<i>Paspalum</i> sp.	X	X	X		X	
<i>Vismia latifolia</i> (Aubl.) Choisy		X				X
<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth		X				
<i>Piper arboreum</i> Aubl.				X		
<i>Senegalia pennata</i> (L.) Maslin				X		
Morphoespecies 6			X		X	X

Table S3. Plant samples (3 individuals) collected in the area within the circle with a radius of 2 m around each sampling point by plant species at Native forest location

Plant species	Sampling point					
	1	2	3	4	5	6
<i>Hymenolobium excelsum</i> Ducke	X					
<i>Inga edulis</i> Mart.	X	X	X	X	X	X
<i>Piptadenia suaveolens</i> Miq.	X					
<i>Piper</i> sp.	X	X	X			
<i>Anaxagorea brevipes</i> Benth.		X				
<i>Inga capitata</i> Desv.				X		X
<i>Echinophora</i> sp.				X		
<i>Vouarana guianensis</i> Aubl.					X	
<i>Cupania</i> sp.					X	
<i>Olyra micranta</i> Kunth						X
Morphoespecies 7			X			
Morphoespecies 8					X	

**ARTIGO 2****BACTÉRIAS OXIDANTES E REDUTORAS DE MN E FUNGOS MICORRÍZICOS  
ARBUSCULARES EM ÁREAS REVEGETADAS APÓS DEPOSIÇÃO DE REJEITO  
DA MINERAÇÃO DE MN**

Artigo preparado de acordo com as normas da revista Archives of Microbiology

Elzane Freitas Leite Silva<sup>a</sup>, Amanda Azarias Guimarães<sup>a</sup>, Teotonio Soares de Carvalho<sup>a</sup>,  
Fatima Maria de Souza Moreira<sup>a,\*</sup>, Jose Oswaldo Siqueira<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário,  
Caixa Postal 3037, 37200-000, Lavras-MG, Brazil.

<sup>b</sup> Instituto Tecnológico Vale, Rua Boaventura da Silva, 955, Nazaré, 66055-090, Belém-PA,  
Brazil.

\*Corresponding author. E-mail: fmoreira@dcs.ufla.br

## Resumo

A crescente preocupação com a eficácia de técnicas de revegetação de solos impactados tem motivado a avaliação de parâmetros que indiquem o sucesso da recuperação. Neste cenário, a caracterização da comunidade microbiana do solo e de micro-organismos associados às espécies vegetais se destacam como possíveis indicadores da recuperação. Neste trabalho, foram estudadas comunidades de bactérias redutoras e oxidantes de Mn e de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em rejeito do beneficiamento de Mn em processo de reabilitação, localizada em Parauapebas, PA. O estudo avaliou duas áreas revegetadas (uma pelo uso de *topsoil* e outra com plantio de mudas em covas), uma área de rejeito (não revegetada) e outra sob floresta nativa adjacente, utilizada como referência. Foram coletadas amostras de solo não rizosférico e rizosférico para isolamento de bactérias e a ocorrência de esporos de FMA. No solo não rizosférico, a área Floresta Nativa apresentou a maior densidade de bactérias redutoras de Mn ( $23 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> de solo) e não houve diferença significativa entre as áreas para bactérias oxidantes de Mn (0,02 a  $1,3 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> de solo). No solo rizosférico, não houve diferença significativa na densidade de bactérias redutoras de Mn (0 a  $40 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> de solo) e não foram detectadas bactérias oxidantes de Mn. Os isolados de bactérias redutoras de Mn da rizosfera nas áreas revegetadas são pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Cellulomonas* e *Paenibacillus*. Os esporos de FMA (2 a 168) são pertencentes a nove espécies, sendo o *Glomus* o gênero predominante. A abundância de esporos (21 a 63) variou muito entre as áreas, sendo maior na área não revegetada.

Palavras-chave: barragem de rejeito, diversidade de FMA, oxidação e redução do Mn, revegetação, substrato. Redução de Mn(IV).

## Abstract

The growing concern about the effectiveness of impacted soil revegetation techniques has motivated the evaluation of parameters that indicate the success of recovery. In this scenario, the characterization of soil microbial community and microorganisms associated with plant species stand out as possible recovery indicators. In this study, communities of Mn-reducing and oxidizing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) were studied in Mn tailings in recovery process, in Parauapebas, PA. The study evaluated two revegetated areas (one using topsoil and another with planting of seedlings in pits), one tailings area (not revegetated) and another under adjacent native forest, used as a reference. Non-rhizosphere and rhizosphere soil samples were collected for bacterial isolation and AMF spore occurrence. In non-rhizosphere soil, the Native Forest area had the highest density of Mn-reducing bacteria ( $23 \times 10^4$  CFU  $g^{-1}$  soil) and there was no significant difference between areas for Mn-oxidizing bacteria (0.02 to  $1.3 \times 10^4$  CFU  $g^{-1}$  soil). In the rhizosphere soil, there was no significant difference in the density of Mn-reducing bacteria (0 to  $40 \times 10^4$  CFU  $g^{-1}$  soil) and no Mn-oxidizing bacteria were detected. Rhizosphere Mn-reducing bacteria isolates in revegetated areas belong to the genera *Bacillus*, *Cellulomonas* and *Paenibacillus*. AMF spores (2 to 168) belong to nine species, and *Glomus* was the predominant genus. Spore abundance (21 to 63) varied widely between areas, being higher in the non-revegetated area.

Keywords: Tailings dam, diversity of AMF, Mn oxidation and reduction, revegetation, substrate. Mn(IV) reduction.

## 1. Introdução

O minério de manganês (Mn) é um recurso natural essencial na produção de ferroligas e aço, que representam 85% da demanda mundial desse minério (Olsen et al., 2007). O Mn também é utilizado na produção de pilhas e baterias, vidro, tintas e vernizes, produtos químicos, cerâmicas e fertilizantes (Gonçalves e Serfaty, 1976). Em 2016, a produção beneficiada de minério de Mn no Brasil foi de 2,88 milhões de toneladas, distribuída, especialmente, entre os estados do Pará (71,16 %) e Mato Grosso do Sul (22,62 %) (DNPM, 2017). Os maiores fornecedores de Mn para o mercado - África do Sul, China, Austrália, Gabão e Brasil - são responsáveis por 80% do mercado mundial, sendo que o Brasil contribui com 7,5% (USGS, 2018).

O beneficiamento do minério de Mn gera efluentes que contêm metais pesados, resíduos orgânicos, como espumantes, surfactantes e óleos (Rubio et al., 2010), que são depositados em barragens de rejeitos. Estas barragens quando atingem a capacidade máxima de contenção são inativadas, descomissionadas e revegetadas, visando a estabilização e recuperação ambiental da área (Almeida e Sánchez, 2005).

O sucesso do estabelecimento de uma comunidade vegetal em substratos formados a partir de rejeitos da mineração, se relaciona com o aporte de matéria orgânica no substrato, que por sua vez pode influenciar a abundância e composição da microbiota do solo (Moynahan et al., 2002; Huang et al., 2012). A presença da matéria orgânica favorece a microbiota do solo (Moynahan et al., 2002) e o Mn pode ser complexado (Heintze e Mann, 1949; Cotter e Mishra, 1968; Pavanadasivam, 1973) tornando-o disponível à medida que a planta necessita, já que os complexos orgânicos formados com o Mn são de pouca estabilidade (McBride, 1994).

As características químicas do Mn determinam seu comportamento no ambiente (Nádaská et al., 2010). Existem três possíveis estados de oxidação do Mn no solo: Mn(II), Mn(III) e Mn(IV). O íon bivalente é a única forma que é estável na solução do solo, enquanto Mn(III) e Mn(IV) são estáveis apenas na fase sólida do solo (McBride, 1994). Processos de oxidação do Mn no solo ocorrem sob influência biológica (Mann e Quastel, 1946), enquanto os processos de redução podem ter influência tanto biológica quanto química (Marschner et al., 2003).

A presença de raízes em ambiente contaminado pode provocar alterações na solubilidade de metais. Bactérias endofíticas da raiz, produtoras de sideróforos, aumentam a dessorção de Mn na rizosfera e, conseqüentemente, sua absorção pela planta (Yamaji et al., 2016). Na rizosfera de plantas cultivadas em rejeito de Mn na China, bactérias resistentes ao Mn foram detectadas atuando como promotoras do crescimento de plantas, aumentando a

absorção de Mn e a produção de biomassa (Xue et al., 2011). Em trabalhos realizados com plantas cultivadas, vários pesquisadores relataram que a ocorre diminuição na densidade de bactérias redutoras de Mn no ambiente rizosférico na presença de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Nogueira et al., 2007; Kothari et al., 1991; Posta et al. 1994). Cardoso et al. (2002) concluíram que a germinação *in vitro* de esporos de seis espécies de FMA pode ser reduzida dependendo da espécie e da quantidade de Mn disponível no solo. Embora vários estudos em áreas mineradas, em processo de revegetação, tenham avaliado a ocorrência de FMAs (Klauber-Filho et al., 2002; Moynahan et al., 2002; Caproni et al., 2003; Melloni et al., 2003; Zhang e Chu, 2011; Zhan e Sun, 2014; Holste et al., 2016; Teixeira et al., 2017), e também a presença de bactérias redutoras de Mn tenha sido constatada em diversos habitats, tais como: sedimentos lacustres (Myers e Nealson, 1988), sedimentos fluviais (Tipping et al., 1985), sedimentos oceânicos (Ehrlich, 1963; Venkateswaran et al. 1998), minérios manganésíferos (Rusin et al., 1991) e solo (Mann e Quastel, 1946; Bromfield e Skerman, 1950; Bromfield, 1956; Sparrow e Uren, 1987), não foram encontrados relatos sobre esta ocorrência em barragens de rejeitos do beneficiamento do minério de Mn. Portanto, FMA e bactérias redutoras e oxidantes de Mn podem influenciar o desenvolvimento das plantas em áreas de rejeito de Mn e/ou serem influenciadas nessas áreas e por isso, precisam ser estudados nesta situação.

Este estudo objetivou caracterizar as comunidades de bactérias redutoras e oxidantes de Mn e de fungos micorrízicos arbusculares em substratos de área de deposição de rejeito do beneficiamento de Mn revegetada por duas técnicas distintas e em área com vegetação nativa, usada como referência e área de rejeito sem revegetação.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Área de estudo e amostragens**

Este estudo foi realizado em uma barragem de rejeito revegetada há 12 anos, denominada Kalunga, situada na mina de Mn do Azul, no município de Parauapebas, sudeste do estado do Pará, Brasil (6°7' Sul e 50°18' Oeste).

O clima da região é tropical quente e úmido (Aw), segundo Köppen, com temperatura média anual de 26 °C, e precipitação pluviométrica média anual de 2000 mm. Como nas demais partes da Amazônia, há duas estações, conforme a distribuição anual das precipitações pluviométricas. A estação chuvosa, também conhecida como inverno amazônico, devido ao maior volume das precipitações, estende-se de novembro a maio, enquanto a estação não chuvosa, conhecida como verão ou época de estiagem, se estende nos demais meses (IBAMA, 2003; Costa et al., 2005).

A coleta de plantas do sub-bosque e das amostras de solo foram realizadas após o final da estação chuvosa (junho de 2014). Quatro áreas foram amostradas: i) *Topsoil* (T) - área da barragem de rejeito (seis parcelas de 2500 m<sup>2</sup> - 50 m x 50 m), onde na revegetação realizou-se a transposição da camada superficial do solo (30 cm) e serrapilheira oriunda de uma área de vegetação nativa próxima, que foi suprimida para a mineração de Mn; ii) Plantio de Mudas (PM) - área da barragem revegetada pelo plantio de mudas de nove espécies vegetais listadas a seguir: a) *Euterpe oleracea* Mart., b) *Dinizia excelsa* Ducke, c) *Chorisia speciosa* St. Hil., d) *Stryphnodendron* sp, e) *Cassia ferruginea* (Schrad.), f) *Parkia nitida* Miq., g) *Inga laurina* (Sw.) Willd, h) *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sanwith, e i) *Byrsonima stipulacea* A. Juss. As mudas foram plantadas em covas diretamente sobre o rejeito da barragem após a adição de 300 g de calcário dolomítico misturado com 0,03 m<sup>3</sup> do solo da floresta nativa (20 dias antes do plantio), as covas tinham dimensões de 0,4 x 0,4 x 0,4 m, e espaçamento de 3,0 x 3,0 m, sendo plantada uma muda por cova; iii) Rejeito (R) - área da barragem não revegetada e mantida sob regeneração natural, com presença de vegetação rala, principalmente gramíneas; e iv) Floresta Nativa (FN) - área de vegetação primária adjacente à barragem de rejeito de Mn. A cobertura vegetal é caracterizada pela Floresta Ombrófila Aberta Montana associada a cambissolos originados de litologias pelíticas da Formação Águas Claras. Além disso, insere-se na unidade geomorfológica B4, a qual apresenta relevo suave ondulado e estende-se próximo à cota de 500 metros (IBAMA, 2003).

Em cada área de estudo, foram selecionados aleatoriamente seis pontos amostrais, distantes entre si cerca de 30 m, para coleta de solo não rizosférico e rizosférico. Em um raio de 2 m em volta do ponto amostral, cinco amostras simples de solo não rizosférico foram coletadas na camada de 0 a 20 cm para formar uma amostra composta por ponto, conforme adotado por Ribeiro et al. (2018).

Nas duas áreas revegetadas e na área de floresta nativa, foi amostrado o solo rizosférico da vegetação do sub-bosque/estrato inferior, constituído pelo solo aderido às raízes das plantas. O critério de inclusão estabelecido na amostragem das raízes correspondeu às espécies vegetais que apresentassem três ou mais indivíduos, que reunidos formaram a amostra composta de solo rizosférico por espécie.

No solo rizosférico da vegetação amostrada foi avaliada a densidade de bactérias redutoras e oxidantes de Mn e identificados os isolados obtidos. Nas amostras de solo não rizosférico, além das bactérias mencionadas, também foi avaliada a densidade de esporos e a diversidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

Os atributos químicos e granulométricos dos substratos das áreas do estudo são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características químicas e granulométricas dos substratos (0 a 20 cm) de três áreas de uma barragem de rejeito de Mn desativada e do solo, referência sob floresta nativa.

Áreas	pH	MO	V	t	Ca	Mg	Al	P	K	Mn	Areia	Silte	Argila
	H <sub>2</sub> O	dag kg <sup>-1</sup>	%		-- cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ---		---	----- mg dm <sup>-3</sup> ---	---	----- dag kg <sup>-1</sup> -----	-----	----	-----
T	4,9	1,5	16,3	1,1	0,5	0,2	0,4	1,2	38	370	28	26	46
PM	5,5	0,5	10,6	0,5	0,2	0,1	0,1	1,4	34	532	35	55	10
R	5,6	0,4	7,2	0,4	0,1	0,1	0,1	1,3	33	562	64	23	13
FN	5,2	2,4	33,6	2,1	1,4	0,5	0,1	1,0	51	212	21	9	70

T = *Topsoil*; PM = Plantio de Mudas; R = Rejeito; FN = Floresta Nativa. M.O. (Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 4N + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 N) (Walkley and Black, 1934); V = saturação por bases; t = capacidade de troca catiônica efetiva; Ca, Mg e Al trocáveis (KCl 1 mol/L) (McLean et al., 1958); P, K e Mn disponíveis (Mehlich-1) (Mehlich, 1953). Análise granulométrica realizada pelo método do densímetro de Bouyoucos (Bouyoucos, 1951).

## 2.2. Avaliação da densidade e isolamento de bactérias redutoras e oxidantes de Mn

Para o isolamento de bactérias redutoras de Mn (BRM), utilizou-se o meio de cultura Ridge e Rovira (1971), modificado por Marschner et al. (1991), no qual foi adicionado Mn na forma oxidada através da adição de permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub> 3 mM). Já para avaliação da densidade e isolamento de bactérias oxidantes de Mn (BOM) utilizou-se o meio de cultura Gerretsen (Huber e Graham, 1992) que recebeu Mn na forma reduzida pela adição de sulfato de manganês (MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 4,7 mM). O pH dos meios de cultura foi ajustado a 7,0, utilizando-se NaOH 1M ou HCl 1M. As soluções KMnO<sub>4</sub> e MnSO<sub>4</sub> foram autoclavadas previamente e adicionadas aos respectivos meios de cultura, também autoclavados, ambos em temperatura de aproximadamente 50 °C.

Diluições seriadas foram realizadas na proporção de 1:10 (substrato/solução de cloreto de sódio 0,9 %). Alíquotas de 50 µl de cada diluição (10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup> para solo rizosférico e de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> para solo não rizosférico) foram plaqueadas nos respectivos meios de cultura, em duplicata, e as placas foram incubadas em estufa a 28 °C. As contagens de unidades formadoras de colônias (UFC g<sup>-1</sup>) para obtenção da densidade de BRM e BOM foram realizadas até três e sete dias de incubação, respectivamente. Colônias que formassem um halo ao seu redor eram consideradas redutoras de Mn. Colônias que se apresentassem de coloração marrom eram consideradas oxidantes de Mn.

Isolados obtidos nas diluições maiores com crescimento positivo do solo rizosférico foram purificados e caracterizados morfológicamente no mesmo meio de cultura utilizado para

o isolamento. Posteriormente, foram armazenados das seguintes formas: 1) em água destilada estéril, à temperatura ambiente; 2) em glicerol 20%, à temperatura -80 °C e 3) liofilizados.

### 2.3. Identificação dos isolados bacterianos da rizosfera

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de culturas puras pelo método de lise alcalina (Niemann et al., 1997). Os isolados foram identificados com base no sequenciamento parcial da região 16S do rDNA. Os oligonucleotídeos iniciadores universais utilizados em PCR para amplificação foram 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG TCC AG 3') e 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (Lane, 1991).

A amplificação por PCR foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler®. A mistura da reação de PCR continha 1X PCR buffer ( $Mg^{2+}$  free), 2,0 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM de dNTP, 0,2 mM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2U Taq DNA polymerase, 3  $\mu$ L de DNA genômico e água ultrapura estéril para completar o volume da reação a 50  $\mu$ L. As condições de amplificação utilizadas para a PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos subsequentes de desnaturação a 94 °C por 40 segundos, anelamento a 55 °C por 40 segundos e extensão a 72 °C por um minuto e meio, e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1 % em tampão TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1mM) e corado com SYBR® Safe para visualização sob luz ultravioleta. Os produtos de PCR foram enviados ao laboratório da Macrogen Inc. (Macrogen Inc., Coreia) para purificação e sequenciamento. A qualidade das sequências foi analisada por meio do programa BioNumerics, versão 7.6 (Applied Maths, Austin, TX, EUA). Posteriormente, foi realizada a identificação de cada isolado seguindo o método de classificação taxonômica Bayesiano baseado em LCA (BLCA) (Gao et al., 2017).

As sequências determinadas neste trabalho foram depositadas no banco de dados Genbank sob os números de acesso apresentados na tabela 4.

### 2.4. Extração, contagem e identificação de esporos de FMA

Os esporos dos fungos micorrízicos arbusculares foram extraídos do solo por peneiramento úmido (Gerdemann e Nicolson, 1963) e centrifugados em água e em solução de sacarose 50% (Jenkins, 1964). Os esporos foram contados e identificados de acordo com a sua morfologia descrita no International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhiza Fungi (INVAM, 2017). Foram calculados o índice de diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ ) (Magurran, 1988) e a equitabilidade ( $J'$ ) (Pielou, 1975).

## 2.5. Análise estatística

Os dados de densidade de BRM e BOM nas amostras de solo rizosférico e não rizosférico foram transformados para a escala logarítmica e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A partir dos dados de abundância de esporos de cada espécie de FMA, foram calculadas as seguintes variáveis por ponto amostral: abundância total de esporos, riqueza específica, índice de Shannon e equitabilidade de Pielou. Essas variáveis foram submetidas à ANOVA e as comparações entre áreas foi feita a partir do teste de Tukey a 5% de significância. Todas as análises foram realizadas no R 3.5.3 (R Development Core Team, 2019).

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Densidade de bactérias

A presença de BRM ocorreu tanto no solo quanto na rizosfera, os maiores valores de densidade de BRM encontrados no solo não rizosférico foram nas áreas FN e T, enquanto no solo rizosférico não houve diferença significativa. Por sua vez, BOM só foram encontradas no solo não rizosférico de todas as áreas, não havendo diferença estatística (Tabela 2).

**Tabela 2.** Densidade de bactérias redutoras (BRM) e oxidantes de Mn (BOM) em amostras de solo não rizosférico (SNR) e rizosférico (SR) em diferentes áreas de uma barragem de rejeito de Mn desativada e em floresta nativa.

Áreas	BRM		BOM	
	SNR <sup>1</sup>	SR <sup>2</sup>	SNR <sup>1</sup>	SR <sup>2</sup>
	(x 10 <sup>4</sup> UFC g <sup>-1</sup> de solo)			
Topsoil (T)	6,7 ab	10,8 a	1,0 a	0
Plantio de Mudanças (PM)	0,7 b	2,4 a	0,02 a	0
Rejeito (R)	0,2 b	nd <sup>3</sup>	0,5 a	0
Floresta Nativa (FN)	23,0 a	7,0 a	1,3 a	0

<sup>1</sup>média de seis repetições; <sup>2</sup>média de 12, 5 e 11 espécies vegetais, em T, PM e FN (ver tabela 3), respectivamente; <sup>3</sup>nd = não determinado. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si, a 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

As maiores densidades de BRM nas áreas FN e T e as menores nas áreas PM e R (Tabela 2), seguem o padrão de alguns dos atributos químicos do solo (Tabela 1), onde, matéria orgânica, saturação por bases, capacidade de troca catiônica, Ca, Mg e K apresentaram os maiores valores nas áreas FN e T e o inverso nas áreas PM e R, isso evidencia as condições positivas proporcionadas pelo *topsoil*. A principal vantagem desta técnica em áreas mineradas é a introdução de uma elevada densidade de sementes viáveis de várias espécies nativas (Rodrigues et al., 2010) e de micro-organismos (Trindade et al., 2000). Pelos benefícios citados,

a aplicação do *topsoil* pode ter superestimado os resultados obtidos, pois os atributos foram analisados dentro da espessura de aplicação do *topsoil*, não alcançando a camada logo abaixo, composta pelo rejeito.

A solubilidade do Mn é altamente sensível às condições redox, sendo que condições redutoras aumentam a disponibilidade do Mn (Sparrow e Uren, 1987; Sposito, 1989; Couture et al., 2015). As conversões de Mn entre os estados de oxidação podem ser catalisadas por organismos vivos, principalmente micro-organismos, além disso, a dinâmica do Mn no solo depende do balanço entre micro-organismos oxidantes e redutores do metal. Bactérias redutoras de Mn incluem micro-organismos aeróbios e anaeróbios facultativos e o manganês pode ser reduzido para satisfazer uma necessidade nutricional dos seres vivos por Mn solúvel (Das et al., 2011). Sob condições aeróbicas uma grande variedade de micro-organismos catalisa a oxidação de Mn(II) (Ehrlich, 1984; Ghiorse, 1984; Brouwers et al., 2000), que pode ser acelerada em até cinco vezes em relação à oxidação abiótica de Mn(II) (Nealson et al., 1988; Tebo, 1991; Wehrli, 1990; Brouwers et al., 2000). Já sob condições anaeróbicas, muitas espécies de bactérias anaeróbicas são capazes de reduzir óxidos de Mn, tanto pela produção de ácidos orgânicos ou substâncias redutoras quanto pelo uso de metal oxidado como acceptor final de elétrons na respiração anaeróbica (Lovley, 1991; Nealson e Myers, 1992; Rusin e Ehrlich, 1995; Nealson e Little, 1997; Brouwers et al., 2000).

No caso da área do estudo, pode haver ambientes microaerofílicos e dessa forma alternância de ciclos redox. Isso pode ser atribuído à natureza estratificada da deposição de rejeitos em camadas, com variações de cor, espessura e compacidades bem diferenciadas, e ainda, à flutuação sazonal da umidade características da área do estudo, que é de baixada. A alternância de ciclos redox pode desempenhar um papel mais relevante do que quando se observa isoladamente oxidação e/ou redução, ao influenciar na liberação, lixiviação e redistribuição de elementos metálicos de solos contaminados (Balint et al., 2014; Couture et al., 2015). Já que, nestes ambientes, em torno do limite óxico/anóxico, espécies microbianas redutoras e oxidantes podem promover uma rápida ciclagem de Mn (Nealson e Myers, 1992).

Os valores de densidade de BRM encontrados no presente estudo são inferiores àqueles observados em plantas cultivadas e colonizadas por FMAs em casa-de-vegetação por Kothari et al. (1991). Na FN os valores de densidade foram próximos ao encontrado no estudo de Kothari et al. (1991). Esses autores avaliaram a densidade de BRM em diferentes distâncias (0-5, 5-15 e 15-25 mm) da superfície da raiz de milho, e observaram valores de até  $38 \times 10^4$  redutoras de Mn  $g^{-1}$  de solo (5-15 mm). Em estudo semelhante, Posta et al. (1994) encontraram valores de densidade de BRM de 191,7 e  $59,3 \times 10^4$  redutoras de Mn  $g^{-1}$  de solo, no solo

rizosférico e não rizosférico do milho, respectivamente. No presente trabalho, a baixa densidade de BRM observada pode estar relacionada ao alto teor de Mn no solo, à baixa fertilidade do solo, baixo teor de matéria orgânica, entre outros (Tabela 1), ao que se destaca os baixos teores de Mn nos solos estudados por Kothari et al. (1991) [Mn = 10,5 mg kg<sup>-1</sup>] e Posta et al. (1994) [Mn = 9,1 mg kg<sup>-1</sup>], onde foram encontradas densidades maiores de BRM.

Nogueira et al. (2007) avaliaram em Nitossolo a toxicidade do Mn e a ocorrência de BRM e BOM na rizosfera de soja, inoculadas e não-inoculadas com FMA. Foi demonstrado que a micorriza estimulou a ocorrência de BRM na rizosfera das plantas em até 45 vezes, em relação ao controle não inoculado com FMA. A densidade de BRM chegou até aproximadamente 10.000 x 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> de solo. Por sua vez, a densidade de BOM sofreu redução de 45% na rizosfera de plantas micorrizadas em comparação às plantas não inoculadas. Os autores encontraram ainda correlação positiva entre o teor de Mn(II) e a densidade de BRM, e correlação negativa entre a densidade de BOM e o teor de Mn(II). Portanto, o aumento de BRM e a redução de BOM demonstram estar relacionados ao alto teor de Mn extraível no solo com plantas micorrizadas. No entanto, Kothari et al. (1991) e Posta et al. (1994) observaram que a micorriza estimulou BOM em solo calcárico levemente alcalino, com baixo teor de Mn disponível. Nogueira et al. (2004) também observaram que BOM foram estimuladas na micorrizosfera de plantas cultivadas em solo arenoso ácido (pH 5). Nestes casos, o aumento de BOM no solo esteve associado com a baixa disponibilidade de Mn ou absorção pelas plantas. Por isso, diferenças nas propriedades do solo, inóculo de FMA e plantas hospedeiras podem ser responsáveis por comportamentos opostos em diferentes trabalhos.

Apesar da contribuição microbiana para a dinâmica do Mn ser maior na rizosfera do que no solo não rizosférico (Marschner, 1988), no presente trabalho, isso não foi observado quanto às bactérias oxidantes, não sendo detectadas no solo rizosférico e ocorrendo em baixas densidades no solo não rizosférico (0,02 a 1,3 x 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> de solo) (Tabela 2). Nogueira et al. (2007) encontraram densidade de BOM na rizosfera de soja, em torno de 500 x 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> de solo, que foram correlacionados negativamente com Mn extraível do solo.

### 3.2. Densidade de bactérias redutoras de Mn no solo rizosférico por espécie vegetal

A densidade de bactérias redutoras de Mn por espécie vegetal, coletadas das áreas em reabilitação, variou de 0 a 40 x 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> de solo na área T, sendo obtidos um total de 29 isolados, e na área PM, a variação foi de 0 a 6 x 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> de solo, obtendo-se 11 isolados. Já na área FN, os valores variaram de 0 a 17 x 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> de solo, obtendo-se 49 isolados (Tabela 3). É interessante observar que na área T, 60% das plantas amostradas (Total de 20)

apresentaram BRM na sua rizosfera, na área PM a porcentagem foi de cerca de 55% (Total de 9), e na área FN cerca de 91% das plantas (Total de 12) apresentaram BRM na rizosfera.

**Tabela 3.** Densidade de bactérias redutoras de Mn (BRM) e número de isolados obtidos da rizosfera das espécies vegetais amostradas, em áreas revegetadas de uma barragem de rejeito de Mn desativada e em floresta nativa.

Espécie vegetal	Densidade de BRM (x 10 <sup>4</sup> UFC g <sup>-1</sup> de solo)	Nº de isolados obtidos
<i>Topsoil (T)</i>		
<i>Senna latifolia</i> (G. Mey.) H.S. Irwin & Barneby	20,0	1
<i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd.	10,0	1
<i>Senna silvestris</i> (Vell.) H.S. Irwin & Barneby	1,0	2
<i>Serjania membranacea</i> Splitg.	9,0	7
<i>Aparisthium cordatum</i> (A. Juss.) Baill.	-	-
<i>Borreria</i> sp.	10,0	4
<i>Phyllanthus niruri</i> L.	6,0	4
<i>Cecropia distachya</i> Huber	0	0
<i>Piptadenia suaveolens</i> Miq.	5,0	1
<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don	4,0	1
<i>Senegalia pennata</i> (L.) Maslin	16,0	4
<i>Piper arboreum</i> Aubl.	4,0	1
<i>Eupatorium</i> sp.	0	0
<i>Socratea exorrhiza</i> (Mart.) H. Wendl.	0	0
<i>Vismia latifolia</i> (Aubl.) Choisy	40,0	1
Morfoespécie 1	0	0
Morfoespécie 2	-	-
Morfoespécie 3	-	-
Morfoespécie 4	0	0
Morfoespécie 5	4,0	2
<i>Plantio de Mudas (PM)</i>		
<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don	6,0	4
<i>Spermacoce latifolia</i> Aubl.	2,6	2
<i>Selaginella</i> P. Beauv.	2,2	2
<i>Paspalum</i> sp.	0,3	1
<i>Vismia latifolia</i> (Aubl.) Choisy	1,0	2
<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth	0	0
<i>Piper arboreum</i> Aubl.	-	-
<i>Senegalia pennata</i> (L.) Maslin	-	-
Morfoespécie 6	0	0
<i>Floresta Nativa (FN)</i>		
<i>Hymenolobium excelsum</i> Ducke	10,0	1
<i>Inga edulis</i> Mart.	6,6	13
<i>Piptadenia suaveolens</i> Miq.	16,0	4
<i>Piper</i> sp.	5,7	5
<i>Anaxagorea brevipes</i> Benth.	10,0	1
<i>Inga capitata</i> Desv.	1,5	5
<i>Echinophora</i> sp.	2,0	5

<i>Vouarana guianensis</i> Aubl.	17,0	6
<i>Cupania</i> sp.	3,0	3
<i>Olyra micranta</i> Kunth	0	0
Morfoespécie 7	2,0	3
Morfoespécie 8	3,0	3

- = quantidade de solo rizosférico insuficiente para isolamento

A presença de raízes em ambiente contaminado pode provocar alterações na solubilidade de metais devido à produção de ácidos orgânicos. A liberação de ácidos orgânicos na rizosfera causa redução do pH, o que promove a solubilização de micronutrientes metálicos, os quais têm sua solubilidade aumentada à medida que o pH decresce. Jauregui e Reisenauer (1982) observaram que óxidos de ferro e óxidos de manganês tornaram-se solúveis na presença dos exsudatos radiculares, piruvato e tartronato. Em áreas afetadas pela mineração, a rizosfera pode ser reconstruída através do estabelecimento de comunidades vegetais que suportem condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento.

Na área PM, observou-se menor diversidade de plantas como resultado da técnica de revegetação (Ribeiro et al., 2018) onde, após 12 anos da reabilitação, verificou-se ausência das espécies vegetais implantadas inicialmente, predominando espécies de hábito herbáceo e arbustivo (Silva et al., 2019). Apesar de o histórico da revegetação de áreas degradadas pela mineração concentrar-se no uso de espécies de plantas nativas ou exóticas (Bell et al., 1993; Almeida e Sánchez, 2005; Dias et al., 2008), atualmente em Carajás, realiza-se o plantio de espécies comerciais ou exóticas menos agressivas, enquanto espécies nativas são utilizadas aquelas com disponibilidade de sementes. Neste sentido, espécies exóticas são utilizadas com maior frequência quando se objetiva a rápida cobertura do solo em locais com alterações ambientais severas ao ponto de limitar o estabelecimento da vegetação nativa, como é o caso de áreas mineradas (Parrota e Knowles, 1999; Prach et al., 2007). Algumas espécies exóticas podem favorecer ecossistemas ao atuarem como facilitadoras no estabelecimento de outras espécies ou na estruturação das comunidades (D'Antonio e Meyerson, 2002; Schlaepfer et al., 2011).

### 3.3. Identificação de bactérias redutoras de Mn por análise molecular

Das 89 estirpes redutoras de Mn isoladas do solo rizosférico das espécies vegetais nativas (Tabela 3), foram identificadas doze, quatro e seis estirpes nas áreas T, PM e FN, respectivamente, totalizando 22 estirpes distribuídas entre os gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus* (*Firmicutes*) e *Cellulomonas* (*Actinobacteria*) (Tabela 4).

Diversas bactérias pertencentes aos grupos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* têm sido descritas como capazes de solubilizar Mn. Em estudo recente, utilizando abordagem metagenômica, Ghosh e Das (2018) verificaram que o filo *Proteobacteria* foi mais abundante (42,47%), seguido por *Actinobacteria* (23,99%), em rejeitos de mineração de Mn na Índia. Os dois grupos foram encontrados na maioria das amostras de rejeito. Em termos de diversidade, os autores demonstraram o alto índice de Shannon (5,2) indicando a riqueza. Em estudos anteriores, verificando bactérias cultiváveis solubilizadoras de Mn, os pesquisadores relataram a presença de *Acinetobacter* sp. e *Enterobacter* sp. (*Proteobacteria*) e *Lysinibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus nealsonii* e *Staphylococcus hominis* (*Firmicutes*). Em outro estudo, Ghosh et al. (2016a) demonstraram a presença de várias estirpes não cultiváveis pertencentes aos filios *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* e *Gemmatimonadetes*, as quais ainda não haviam sido relatadas.

**Tabela 4.** Identificação dos isolados de bactérias redutoras de Mn, obtidas do solo rizosférico, em diferentes áreas de uma barragem de rejeito de Mn desativada e de floresta nativa.

Áreas	Isolado	Planta associada	NPB*	Espécie	Filo	Número de acesso (Genbank)	
Topsoil (T)	UFLA 194	<i>Inga laurina</i>	391	<i>Cellulomonas denverensis</i>	Actinobacteria	MK615108	
	UFLA 131	<i>Serjania membranacea</i>	367	<i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	Firmicutes	MK615093	
	UFLA 178	<i>Borreria</i> sp1	843	<i>Bacillus cytotoxicu</i>	Firmicutes	MK615101	
	UFLA 179	<i>Borreria</i> sp1	1293	<i>Paenibacillus catalpae</i>	Firmicutes	MK617949	
	UFLA 128	<i>Phyllanthus niruri</i>	419	<i>Bacillus</i> sp.	Firmicutes	MK615091	
	UFLA 129	<i>Phyllanthus niruri</i>	396	<i>Bacillus</i> sp	Firmicutes	MK615092	
	UFLA 185	<i>Phyllanthus niruri</i>	399	<i>Bacillus</i> sp.	Firmicutes	MK615106	
	UFLA 134	<i>Clidemia hirta</i>	322	<i>Paenibacillus jamilae</i>	Firmicutes	MK615094	
	UFLA 197	<i>Senegalia pennata</i>	578	<i>Bacillus acidiceler</i>	Firmicutes	MK615109	
	UFLA 180	<i>Vismia latifolia</i>	656	<i>Bacillus</i> sp	Firmicutes	MK615102	
	UFLA 181	Morfoespécie 5	663	<i>Bacillus</i> sp.	Firmicutes	MK615103	
	UFLA 186	Morfoespécie 5	645	<i>Paenibacillus catalpae</i>	Firmicutes	MK615107	
	Plantio de Mudás (PM)	UFLA 120	<i>Clidemia hirta</i>	359	<i>Paenibacillus</i> sp.	Firmicutes	MK615089
		UFLA 182	<i>Clidemia hirta</i>	458	<i>Bacillus</i> sp.	Firmicutes	MK615104
UFLA 122		<i>Selaginella</i>	407	<i>Bacillus</i> sp.	Firmicutes	MK615090	
UFLA 183		<i>Selaginella</i>	812	<i>Paenibacillus pinisoli</i>	Firmicutes	MK615105	

Floresta Nativa (FN)	UFLA 173	<i>Inga edulis</i>	814	<i>Bacillus</i> sp.	Firmicutes	MK615100
	UFLA 150	<i>Piper</i> sp	486	<i>Bacillus mobilis</i>	Firmicutes	MK615095
	UFLA 170	<i>Inga capitata</i>	637	<i>Bacillus mobilis</i>	Firmicutes	MK615099
	UFLA 162	<i>Echinophora</i> sp	516	<i>Bacillus acidiceler</i>	Firmicutes	MK615096
	UFLA 164	<i>Vouarana guianensis</i>	533	<i>Bacillus mobilis</i>	Firmicutes	MK615097
	UFLA 167	<i>Vouarana guianensis</i>	671	<i>Bacillus</i> sp.	Firmicutes	MK615098

NPB = número de pares de base

Nas áreas T e PM, espécies dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* foram identificadas no solo rizosférico dos diversos hospedeiros. Por sua vez, na área FN, apenas espécies do gênero *Bacillus* foram identificadas.

De acordo com Garbeva et al. (2008), as espécies vegetais e as características do substrato afetam fortemente a estrutura da comunidade bacteriana total incluindo, de *Bacillus*. O gênero *Bacillus* foi proposto por Cohn (1872) e o gênero *Paenibacillus* por Ash et al. (1993), este com base na análise da sequência do gene 16S rRNA. Os membros do gênero *Paenibacillus* exibem características compartilhadas do gênero *Bacillus*, tais como produção de células em forma de bastonete, formação de endósporos, motilidade por flagelos e crescimento aeróbico ou anaeróbico facultativo (Ash et al., 1993; Grady et al., 2016). É interessante destacar que uma espécie do gênero *Bacillus* (*Bacillus* sp. SG-1), juntamente com as espécies *Leptothrix discophora* e *Pseudomonas putida*, são as três espécies bacterianas oxidantes de Mn(II), estudadas detalhadamente em vários laboratórios (Brouwers et al., 2000). Curiosamente, as três espécies utilizam enzimas dependentes de cobre na oxidação de Mn(II), conforme sequenciamento de vários genes envolvidos na oxidação. O gênero *Bacillus* inclui espécies capazes de formar endósporos sob condições ambientais limitantes. As células germinativas dos esporos são envoltas por uma camada de peptidoglicano coberta por proteínas de revestimento. A camada mais externa do esporo (exósporo) é uma estrutura membranosa diferente da composição da cobertura do esporo. Em 1982, Rosson e Nealson demonstraram que o esporo é capaz de catalisar a oxidação de Mn(II), e Francis et al. (1997) demonstraram que a atividade oxidante estava localizada no exósporo (Rosson e Nealson, 1982; de Vrind et al., 1986a). Uma vez que os esporos são metabolicamente inativos, a sua capacidade de oxidar Mn(II) não está diretamente relacionada à função metabólica. Por outro lado, a redução de Mn aparenta estar acoplada à oxidação de citocromos do tipo *b* e *c* (de Vrind et al., 1986b).

Charney et al. (1951) demonstraram que o Mn estimula a esporulação de várias espécies de *Bacillus* (*B. subtilis* 6633, *B. subtilis* 90, *B. subtilis* Tracy, *B. megaterium* B938, *B. betanigrificans* 7048, *B. polymyxa* 2823, *B. alvei* 8240 e *B. brevis* 2785). Além destas espécies, os autores verificaram que embora a esporulação não tenha sido estimulada na espécie *B. pumilus* 7061, o crescimento desta espécie foi estimulado pelo fornecimento de Mn. Em 1949, Gale já havia demonstrado a importância do Mn na assimilação de glutamato pela espécie *B. subtilis*, uma vez que as células crescidas em meio deficiente em Mn(II) tinham menor capacidade de acumular o aminoácido.

Um dos primeiros registros do gênero *Bacillus*, como bactérias redutoras de Mn foi observado por Ehrlich (1963), que obteve isolados de substrato oceânico. Outros estudos obtiveram este gênero da rizosfera de culturas agrícolas (Posta et al., 1994; Nogueira et al., 2007), minérios de Mn (Rusin et al., 1991; Ghosh et al., 2016b) e rejeitos da mineração de Mn (Sanket et al., 2017; Ghosh e Das, 2018). Dixit et al. (2018) encontraram isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* em mina de Mn na Índia, onde estas bactérias atuam como oxidantes de ferro

Das 22 espécies bacterianas redutoras de Mn identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, apenas uma pertence ao filo *Actinobacteria*, sendo o seu representante da espécie *Cellulomonas denverensis* (UFLA 194), isolado da rizosfera de *Inga laurina* (Tabela 4). O gênero *Cellulomonas*, de acordo com a List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, hospeda 28 espécies (incluindo sinônimos), sendo *Cellulomonas flavigena* a espécie tipo do gênero, primeira espécie descrita em 1912 por Kellermann and McBeth, isolada do solo. Membros do gênero *Cellulomonas* possuem atividade celulolítica, sendo encontrados preferencialmente em habitats enriquecidos com celulose tais como solo, madeira e canaviais, mas sendo isolados também do rúmen e lodo de esgoto (Abt et al., 2010).

É interessante destacar que ambos os gêneros *Bacillus* e *Cellulomonas* hospedam espécies bacterianas capazes de produzir celulases, enzimas que são induzidas por Mn (Saratale et al., 2008, 2010).

#### 3.4. Composição da comunidade de FMA

O efeito micorrizosférico, capaz de aumentar populações microbianas selecionadas, nas proximidades das hifas no solo, foi postulado por Linderman (1988), demonstrando o efeito das hifas extrarradiculares de FMA, sobre a microbiota do solo. Além de maior atividade microbiana, a rizosfera de plantas micorrizadas é bioquimicamente mais ativa, em comparação

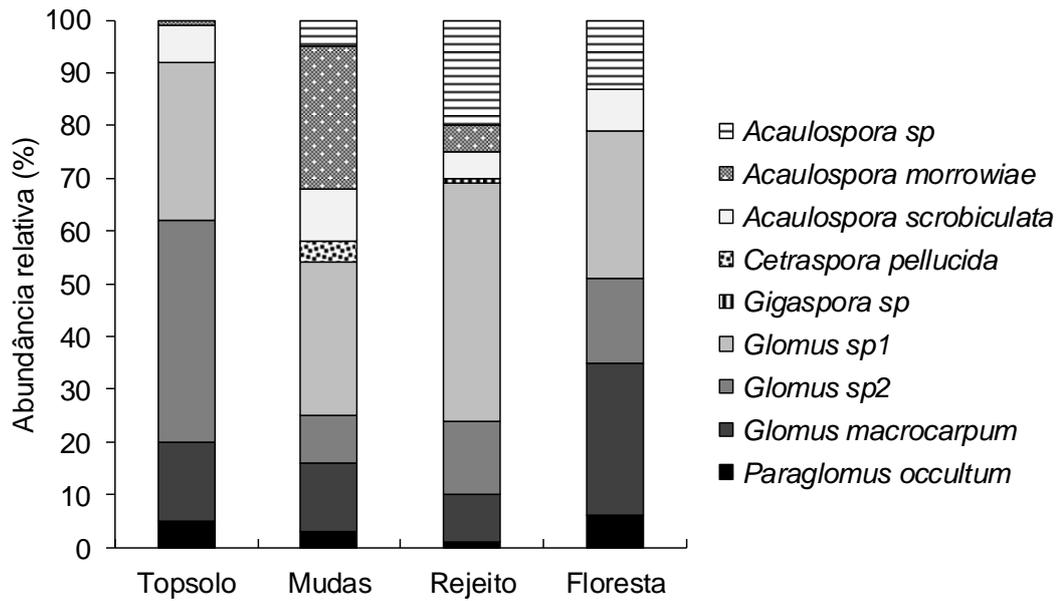
às plantas não micorrizadas, devido à maior deposição de carboidratos e outros fatores nutricionais no solo, proporcionada pelas hifas extrarradiculares.

A área R apresentou o maior valor para abundância (Tabela 5). Isso pode ser atribuído à presença de gramíneas na área, às quais são eficientes na multiplicação de FMAs, contribuindo para a grande quantidade de esporos na área em relação às demais. Segundo Sieverding et al. (1991), o aumento da esporulação das espécies, ocorre em resposta à instabilidade e aos estresses ambientais. Isso pode aumentar a abundância de algumas espécies mais adaptadas a estas condições, conforme verificado no presente estudo (Figura 1). O número de esporos pode ser influenciado por fatores do solo, fenologia das plantas hospedeiras e pelo efeito do Mn na germinação dos esporos de FMA (Cardoso et al., 2002).

**Tabela 5.** Número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) por espécie, valores  $\pm$  erro padrão da abundância de esporos, riqueza de espécies, índice de Shannon (H') e equitabilidade de Pielou (J') em diferentes áreas de uma barragem de rejeito de Mn desativada e de floresta nativa, na profundidade de 0 a 20 cm (6 pontos amostrais)

Espécies de FMAs	Número de esporos			
	Topsoil (T)	Plantio de Mudanças (PM)	Rejeito (R)	Floresta Nativa (FN)
<i>Acaulospora</i> sp	-	9	76	16
<i>Acaulospora morrowiae</i>	2	48	17	-
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	18	18	18	10
<i>Cetranspora pellucida</i>	-	8	-	-
<i>Gigaspora</i> sp	-	-	4	-
<i>Glomus</i> sp1	73	52	168	35
<i>Glomus</i> sp2	102	17	52	20
<i>Glomus macrocarpum</i>	37	23	35	37
<i>Paraglomus occultum</i>	13	5	5	8
Abundância	41 $\pm$ 9,5	30 $\pm$ 3,1	63 $\pm$ 19,6	21 $\pm$ 2,7
Riqueza	2,67 $\pm$ 0,33	3,5 $\pm$ 0,56	3,5 $\pm$ 0,56	2,83 $\pm$ 0,31
H'	0,81 $\pm$ 0,13	1,04 $\pm$ 0,17	0,93 $\pm$ 0,21	0,86 $\pm$ 0,13
J'	0,85 $\pm$ 0,08	0,88 $\pm$ 0,04	0,81 $\pm$ 0,05	0,84 $\pm$ 0,05

-: ausência de esporo da espécie.



**Figura 1.** Abundância relativa de esporos de espécies de FMA em diferentes áreas de uma barragem de rejeito de Mn desativada e em floresta nativa, na profundidade de 0 a 20 cm.

Em trabalho anterior, Silva et al. (2019) demonstraram que todas as espécies avaliadas nas áreas FN, T e PM exibiram colonização por fungos micorrízicos arbusculares (de 1 a 35%), e concluíram que os elevados teores de Mn no solo não afetaram a colonização pelos FMA. Os autores também constataram o estabelecimento predominante de plantas herbáceas e arbustivas na área PM e presença predominante de arbóreas no sub-bosque na área FN. Esta observação pode explicar a menor quantidade de esporos na área FN (Tabela 5), pois reflete o maior investimento na simbiose micorrízica nas espécies da área PM em comparação com espécies da área FN, ao que se atribui uma condição de maior equilíbrio e menor perturbação, uma vez que as plantas são menos dependentes da simbiose.

As áreas apresentaram um total de 9 espécies de FMA, pertencentes a cinco gêneros. Os gêneros *Acaulospora*, *Glomus* e *Paraglomus* foram comuns a todas as áreas. O gênero *Cetraspora* foi observado apenas em PM, enquanto o gênero *Gigaspora* foi encontrado apenas em R (Tabela 5). A riqueza de espécies, o índice de Shannon ( $H'$ ) e a equitabilidade de Pielou ( $J'$ ) apresentaram pequena variação entre as diferentes áreas estudadas (Tabela 5).

A ocorrência do maior número de gêneros de *Glomus* ou *Acaulospora* corrobora resultados de outros trabalhos realizados em locais sob influência da mineração/degradados (Caproni et al., 2005; Silva et al., 2005; Holste et al., 2016). Alguns autores demonstraram que espécies de *Glomus* e *Acaulospora* tendem a ser encontrados em solos com pH menor que 6,5 e/ou com baixo teor de fósforo (Maia e Trufem, 1990; Souza et al., 2003) como é o caso dos

substratos deste estudo (Tabela 1). Wei et al. (2014) investigaram a diversidade molecular de FMAs associados a uma planta hiperacumuladora de Mn em área de mineração de Mn e observaram que *Glomus* foi o gênero dominante nesta comunidade FMA. Em área estéril revegetada com *Acacia mangium*, após mineração de bauxita, Caproni et al. (2005) identificaram 18 espécies de FMAs pertencentes a 6 gêneros. O maior número de espécies pertenceu ao gênero *Glomus*, seguido do gênero *Acaulospora*. Da mesma forma, em área afetada pela mineração de cobre, Silva et al. (2005) detectaram maior representatividade do gênero *Glomus*. Na Costa Rica, Holste et al. (2016) observaram em seu estudo de restauração em área de floresta tropical que a maioria das espécies de fungos pertenceu ao gênero *Glomus* e ao gênero *Acaulospora*, os quais representaram mais de 95% da densidade de esporos em todas as áreas do estudo restauradas.

#### 4. Conclusões

As bactérias redutoras de Mn apresentaram densidades elevadas no solo não rizosférico da Floresta Nativa e, apesar de não haver diferença estatística para o solo rizosférico, foi nesta área onde obteve-se o maior número de isolados. Os isolados de bactérias redutoras de Mn da rizosfera nas áreas revegetadas são pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Cellulomonas* e *Paenibacillus*. A densidade de bactérias oxidantes de Mn no solo não rizosférico não apresentou diferença significativa entre as áreas, e não foram detectadas no solo rizosférico.

Nove espécies de FMA foram encontradas nas áreas estudadas, sendo o *Glomus* o gênero predominante. A abundância de esporos variou muito entre as áreas, sendo maior na área não revegetada.

#### Agradecimentos

À Empresa Vale e ao Rafael de Almeida Ribeiro pelo suporte logístico e acesso às áreas do estudo; à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pela concessão de bolsa de estudos; ao CNPq pelas bolsas de produtividade em pesquisa dos autores 3 e 4; à Capes/PROEX pelo financiamento parcial. Ao sr. Delmo Fonseca pela colaboração na coleta do solo rizosférico e identificação das plantas.

#### Referências

Abt B, Foster B, Lapidus A, Clum A, Sun H, Pukall R, Lucas S, Del Rio TG, Nolan M, Tice H, Cheng J-F, Pitluck S., Liolios K., Ivanova N., Mavromatis K., Ovchinnikova G., Pati A., Goodwin L., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Chang Y-J, Jeffries C.D., Rohde

- M., Göker M., Woyke T., Bristow J., Eisen JA, Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N.C., Klenk H-P (2010) Complete genome sequence of *Cellulomonas flavigena* type strain (134T). *Stand Genomic Sci* 3(1):15–25
- Almeida ROPO, Sánchez LE (2005) Revegetação de áreas de mineração: critérios de monitoramento e avaliação de desempenho. *Rev Árvore* 29:47-54
- Ash C, Priest FG, Collins MD (1993) Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64:253-260
- Baker AJM, Ernst WHO, van Der Ent A, Malaisse F, Goñocchio R (2010) Metallophytes: the unique biological resources, its ecology and conservation status in Europe, central Africa and Latin America. In: Batty LC, Hallberg KB. eds. *Ecology of Industrial Pollution*. Cambridge: Cambridge University Press, 7–40
- Balint R, Nechifor G, Ajmone-Marsan F (2014) Leaching potential of metallic elements from contaminated soils under anoxia. *Environ Sci Proc Imp* 16(2):211-219
- Bell DT, Wilkins CF, Moezel PG, Ward SC (1993) Alkalinity tolerance of woody species used in bauxite waste rehabilitation, Western Australia. *Restor Ecol* 1:51–58
- Bouyoucos G (1951) A recalibration of the hydrometer method for making mechanical analysis of soil. *Soil Sci Soc Am J* 43(9): 434–437
- Bromfield SM, Skerman VBD (1950) Biological oxidation of manganese in soils. *Soil Sci* 69(5):337-348
- Bromfield SM (1956) Oxidation of manganese in soil by microorganisms. *Aust J Biol Sci* 9(2):238-252
- Brouwers GJ, Vijgenboom E, Corstjens PLAM, De Vrind JPM, De Vrind-De Jong EW (2000) Bacterial Mn<sup>2+</sup> Oxidizing Systems and Multicopper Oxidases: An Overview of Mechanisms and Functions. *Geomicrobiol J* 17:1–24
- Caproni AL, Franco AA, Berbara RLL, Granha JRDO, Marinho NF (2005) Fungos micorrízicos arbusculares em estéril revegetado com *Acacia mangium*, após mineração de bauxita. *Rev Árvore* 29(3):373-381
- Caproni AL, Franco AA, Berbara RLL, Trufem SB, Granha JRDO, Monteiro AB (2003) Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em áreas revegetadas após mineração de bauxita em Porto Trombetas, Pará. *Pesq Agropec Bras* 38(12):1409-1418
- Cardoso EJBN, Navarro RB, Nogueira MA (2002) Manganês e germinação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. *Rev Bras Cienc Solo* 26(3):795-799

- Charney J, Fisher WP, Hegarty CP (1951) Manganese as an essential element for sporulation in the Genus *Bacillus*. *J Bacteriol* 62(2): 145–148
- Cohn F (1872) Untersuchungen über Bakterien. *Beitrage zur Biologie der Pflanzen Heft 1*:127-224
- Costa ML, Fernandez OJC, Requelme MER (2005) O depósito de manganês do Azul, Carajás: Estratigrafia, mineralogia, geoquímica e evolução geológica. In: Marini OJ, Queiroz ET, Ramos BW (eds.) *Caracterização de depósitos minerais em distritos mineiros da Amazônia*. DNPM-CT/Mineral- ADI MB, Brasília. p. 227-334
- Cotter DJ, Mishra UM (1968) The role of organic matter in soil manganese equilibrium. *Plant Soil* 29(3):439-448
- Couture RM, Charlet L, Markelova E, Madé B, Parsons CT (2015) On–off mobilization of contaminants in soils during redox oscillations. *Environ Sci Technol* 49(5):3015-3023
- D’Antonio CM, Meyerson LA (2002) Exotic plant species as problems and solutions in ecological restoration: a synthesis. *Restor Ecol* 10(4):703-713
- Das AP, Sukla LB, Pradhan N, Nayak S (2011) Manganese biomining: a review. *Bioresource Technol* 102(16), 7381-7387
- de Vrind JPM, de Vrind-de Jong EW, de Voogt J-WH, Westbroek P, Boogert FC, Rosson RA (1986a) Manganese oxidation by spores and the spore coats of a marine *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 52:1096–1100
- de Vrind JPM, Boogert FC, de Vrind-de Jong EW (1986b) Manganese reduction by a marine *Bacillus* species. *J Bacteriol* 167:30–34
- Dias LE, Franco AA, Campello EFC, Faria SM, Castilho A, Henriques JC, Daniels WL (2008) A two-phase Process for Revegetation of Acidic Bauxite Tailings in the Amazon Region, Brazil. *Proceedings America Society of Mining and Reclamation*, pp. 316-327
- Dixit SJ, Kuttan AK, Shrivastava RM (2018) Genetic characterization of sulphur and iron oxidizing bacteria in manganese mining area of Balaghat and Chhindwara, Madhya Pradesh, India. *Indian J Biotechnol* 17:595-601
- DNPM - Departamento Nacional de Produção Mineral 2017. *Brazilian Mineral Yearbook: main metallic commodities*. Pinheiro WF, Ferreira Filho OB, Neves CAR. (Coord.) Brasília, 33 p. [http://www.dnpm.gov.br/dnpm/paginas/anuario-mineral-estadual/dnpm\\_amb\\_2017\\_metalicos](http://www.dnpm.gov.br/dnpm/paginas/anuario-mineral-estadual/dnpm_amb_2017_metalicos). (acessado em 23 de junho de 2018)
- Ehrlich HL (1984) Different forms of bacterial manganese oxidation. In: WR Strohl, H Tuovinen, editors. *Microbial chemoautotrophy*. Ohio State Univ Colloq 8. Columbus, OH: Ohio State University Press, p 47–56

- Ehrlich HL (1963) Bacteriology of manganese nodules I. Bacterial action on manganese in nodule enrichments. *Appl Microbiol* 11(1):15-19
- Francis CA, Casciotti KL, Tebo BM (1997) Manganese oxidizing activity localized to the exosporium of the spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. In: *Ann Mtg Am Soc Microbiol Miami, FL, May 1997*. Washington, DC: American Society of Microbiology
- Gale EF (1949) The assimilation of amino acids by bacteria. *J Gen Microbiol* 3:369
- Gao X, Lin H, Revanna K, Dong Q (2017) A Bayesian Taxonomic Classification Method for 16S rRNA Gene Sequences with Improved Species-level Accuracy. *BMC Bioinformatics* 18(1):247
- Garbeva P, van Elsas JD, van Veen JA (2008) Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant Soil* 302(1-2):19-32
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Brit Mycol Soc* 46(2):235-244
- Ghiorse WC (1984) Biology of iron- and manganese-depositing bacteria. *Annu Rev Microbiol* 38:515– 550
- Ghosh S, Das AP (2018) Metagenomic insights into the microbial diversity in manganese-contaminated mine tailings and their role in biogeochemical cycling of manganese. *Sci Rep* 8(1):8257
- Ghosh S, Mohanty S, Akcil A, Sukla LB, Das AP (2016a) A greener approach for resource recycling: Manganese bioleaching. *Chemosphere* 154:628–639
- Ghosh S, Mohanty S, Nayak S, Sukla LB, Das AP. 2016b. Molecular identification of indigenous manganese solubilising bacterial biodiversity from manganese mining deposits. *J Basic Microbiol* 56(3):254-262
- Gonçalves E, Serfaty A (1976) Perfil Analítico do Manganês. Boletim nº 37. Ministério das Minas e Energias. Departamento Nacional da Economia Mineral. Brasília. 149 p
- Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A, Yuan Z-C (2016) Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb Cell Fact* 15:203
- Heintze SG, Mann PJG (1949) Studies on soil manganese. *J Agr Sci* 39(1):80-95
- Holste EK, Holl KD, Zahawi RA, Kobe RK (2016) Reduced aboveground tree growth associated with higher arbuscular mycorrhizal fungal diversity in tropical forest restoration. *Ecol Evol* 6(20):7253-7262
- Huang L, Baumgartl T, Mulligan D (2012) Is rhizosphere remediation sufficient for sustainable revegetation of mine tailings? *Ann Bot* 110(2):223-238

- Huber DM, Graham RD (1992) Techniques for studying nutrient–disease interactions. In: Singleton LL, Mihail JD, Rush CM (Eds.) Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. Saint Paul: APS Press, p. 204-214
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (2003) Plano de manejo para uso múltiplo da Floresta Nacional de Carajás. Companhia Vale do Rio Doce e STCP Engenharia de Projetos LTDA.
- INVAM - International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (2017) West Virginia University. Disponível em: <<http://invam.wvu.edu/>>. (acessado em 18 de outubro de 2017)
- Jauregui MA, Reisenauer HM (1982) Dissolution of oxides of manganese and iron by root exudate components. Soil Sci Soc Am J 46:314–317
- Jenkins WR (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Dis Rep 48(9):692
- Kellermann FK, McBeth FM (1912) The fermentation of cellulose. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 2. 39:502-552
- Klauber-Filho O, Siqueira JO, Moreira FMS (2002) Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área poluída com metais pesados. Rev Bras Cienc Solo 26(1):125-134
- Kothari SK, Marschner H, Römheld V (1991) Effect of a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus and rhizosphere micro-organisms on manganese reduction in the rhizosphere and manganese concentrations in maize (*Zea mays* L.). New Phytol 117(4):649-655
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Goodfellow, M.; Stackebrandt, E. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley: New Jersey
- Linderman RG (1988) Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. Phytopathology 78:366–371
- Lovley DR (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. Microbiol Rev 55:259–287
- Magurran AE (1988) Ecological diversity and its measurement. Princeton: Princeton University Press. 179 p
- Maia LC, Trufem SFB (1990) Fungos micorrízicos arbusculares em solos cultivados no Estado de Pernambuco, Brasil. Rev Bras Bot 13:89-95
- Mann PJD, Quastel JH (1946) Manganese metabolism in soils. Nature 158:154-156.
- Marschner H (1988) Mechanisms of manganese acquisition by roots from soils. In: Manganese in soils and plants. Springer, Dordrecht, p. 191-204

- Marschner P, Ascher JS, Graham RD (1991) Effect of manganese-reducing rhizosphere bacteria on the growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and on manganese uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biol Fert Soils* 12(1):33-38
- Marschner P, Fu Q, Rengel Z (2003) Manganese availability and microbial populations in the rhizosphere of wheat genotypes differing in tolerance to Mn deficiency. *J Plant Nutr Soil Sci* 166(6):712–718
- McBride MB (1994) *Environmental chemistry of soils*. 1 ed. Oxford University Press. 416 p
- McLean EO, Heddleson MR, Bartlett RJ, Holowaychuk N (1958) Aluminum in soils: I. Extraction methods and magnitudes in Ohio clays and soils. *Soil Sci Soc Am J.* 22(5):382
- Mehlich A (1953) Determination of P, Ca, Mg, K, Na and NH<sub>4</sub>. Raleigh: North Carolina Soil Testing Division. 195 p
- Melloni R, Siqueira JO, Moreira, FMS (2003) Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área de mineração de bauxita em reabilitação. *Pesq Agropec Bras* 38(2):267-276
- Mizuno T, Hirano K, Hosono A, Kato S, Obata H (2006) Continual pH lowering and manganese dioxide solubilization in the rhizosphere of the Mn-hyperaccumulator plant *Chengioplanax sciadophylloides*. *Soil Sci Plant Nutr* 52(6):726-733
- Moynahan OS, Zabinski CA, Gannon JE (2002) Microbial community structure and carbon-utilization diversity in a mine tailings revegetation study. *Restor Ecol* 10(1):77-87
- Myers CR, Nealson KH (1988) Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science* 240(4857):1319-1321
- Nádaská G, Lesny J, Michalik I (2010) Environmental aspect of manganese chemistry. *Hung J Sci* 100702:1-16
- Nealson KH, Little B (1997) Breathing manganese and iron: solid-state respiration. *Adv Appl Microbiol* 45:213–239
- Nealson KH, Myers CR (1992) Microbial reduction of manganese and iron: new approaches to carbon cycling. *App Environ Microbiol* 58(2):439
- Nealson KH, Tebo BM, Rosson RA (1988) Occurrence and mechanisms of microbial oxidation of manganese. *Adv Appl Microbiol* 33:299–318
- Niemann S, Pühler A, Tichy HV, Simon R, Selbitschka W (1997) Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *J App Microbiol* 82(4):477-484
- Nogueira MA, Nehls U, Hampp R, Poralla K, Cardoso EJBN (2007) Mycorrhiza and soil bacteria influence extractable iron and manganese in soil and uptake by soybean. *Plant Soil* 298(1-2):273-284

- Nogueira MA, Magalhães GC, Cardoso EJ (2004) Manganese toxicity in mycorrhizal and phosphorus-fertilized soybean plants. *J Plant Nutr* 27(1):141-156
- Olsen SE, Tangstad M, Lindstand T (2007) Production of Manganese Ferroalloys. Tapir Academic Press. Trondheim, Norway, 247 p
- Parrotta JA, Knowles OH (1999) Restoration of tropical moist forests on bauxite-mined lands in the Brazilian Amazon. *Restor Ecol* 7:103-116
- Pavanasivam V (1973) Manganese studies in some soils with a high organic matter content. *Plant Soil* 38(2):245-255
- Pielou EC (1975) Ecological diversity. New York: John Wiley & Sons. 165 p
- Posta K, Marschner H, Römheld V (1994) Manganese reduction in the rhizosphere of mycorrhizal and nonmycorrhizal maize. *Mycorrhiza* 5(2):119-124
- Prach K, Marrs R, Pyšek P, van Diggelen R (2007) Manipulation of succession. In: Walker LR, Walker J, Hobbs RJ (Eds) Linking restoration and ecological succession. New York: Springer, p.121-149
- R Development Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing [accessed 2019 Apr 10]. <https://www.R-project.org/>.
- Ribeiro RA, Giannini TC, Gastauer M, Awade M, Siqueira JO (2018) Topsoil application during the rehabilitation of manganese tailing dam increases plant taxonomic, phylogenetic and functional diversity. *J Environ Manage* 227:386-394
- Ridge EH, Rovira AD (1971) Phosphatase activity of intact young wheat roots under sterile and nonsterile conditions. *New Phytol* 70(6):1017-1026
- Rodrigues BD, Martins SV, Leite HG (2010) Avaliação do potencial da transposição da serapilheira e do banco de sementes do solo para restauração florestal em áreas degradadas. *Rev Árvore* 34(1):65–73
- Rosson RA, Nealson KH (1982) Manganese binding and oxidation by spores of a marine *Bacillus*. *J Bacteriol* 151:1027–1034
- Rubio J, Oliveira C, Silva R (2010) Aspectos ambientais nos setores mineiro e metalúrgico. In: Tratamento de Minérios. 5 ed. Luz AB, Sampaio JA, França SCA. (Ed.). Rio de Janeiro: CETEM/MCT. 965 p
- Rusin P, Ehrlich H (1995) Developments in microbial leaching—Mechanisms of manganese solubilization. In: Microbial and Enzymatic Bioproducts. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 1-26

- Rusin PA, Quintana L, Sinclair NA, Arnold RG, Oden KL (1991) Physiology and kinetics of manganese-reducing *Bacillus polymyxa* strain D1 isolated from manganiferous silver ore. *Geomicrobiol J* 9(1):13-25
- Sanket AS, Ghosh S, Sahoo R, Nayak S, Das AP (2017) Molecular identification of acidophilic manganese (Mn)-solubilizing bacteria from mining effluents and their application in mineral beneficiation. *Geomicrobiol J* 34(1):71-80
- Saratale GD, Chen SD, Lo YC, Saratale RG, Chang JS (2008) Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation—a review. *J Sci Ind Res.* 67:962–979
- Saratale GD, Saratale RG, Lo YC, Chang JS (2010) Multicomponent Cellulase Production by *Cellulomonas biazotea* NCIM-2550 and Its Applications for Cellulosic Biohydrogen Production. *Biotechnol Prog* 26(2):406-16
- Schlaepfer MA, Sax DF, Olden JD (2011) The potential conservation value of non-native species. *Conserv Biol* 25:428-437
- Sieverding, E., Friedrichsen, J., Suden, W (1991) Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Eschborn: Sonderpublikation der GTZ. 371 p.
- Silva EFL, Moreira FMS, Siqueira JO (2019) Mn concentration and mycorrhizal colonization in understory native species grown at areas of manganese mine tailings disposal. *Int J Phytoremediat* 21(6):564-576
- Silva GA, Trufem SFB, Saggin Júnior OJ, Maia LC (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid copper mining area in Brazil. *Mycorrhiza* 15(1):47-53
- Souza RG, Maia LC, Sales MF, Trufem SF (2003) Diversidade e potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em área de caatinga, na Região de Xingó, Estado de Alagoas, Brasil. *Rev Bras Bot* 26(1):49-60
- Sparrow LA, Uren NC (1987) Oxidation and reduction of Mn in acidic soils: effect of temperature and soil pH. *Soil Biol Biochem* 18(2):143-148
- Sposito G (1989) *The chemistry of soils*. New York, Oxford University Press. 277 p
- Tebo BM (1991) Manganese(II) oxidation in the suboxic zone of the Black Sea. *Deep Sea Res* 38:S883–S905
- Teixeira AFDS, Kimmelmeier K, Marascalchi MN, Stürmer SL, Carneiro MAC, Moreira FMDS (2017) Arbuscular mycorrhizal fungal communities in an iron mining area and its surroundings: Inoculum potential, density, and diversity of spores related to soil properties. *Cienc Agrotec* 41(5):511-525

- Tipping E, Jones JG, Woof C (1985) Lacustrine manganese oxides: Mn oxidation states and relationship to "Mn depositing bacteria". *Arch Hydrobiol* 105:161-175
- Trindade A, Graziotti P, Tótola M (2000) Utilização de características microbiológicas na avaliação da degradação ou recuperação de uma área sob mineração de ferro. *Rev Bras Cienc Solo* 24(3):683-688
- USGS, United States Geological Survey: Mineral commodity summaries – Manganese (2018) 200 p. Disponível em:<<https://doi.org/10.3133/70194932>>.
- Venkateswaran K., Dollhopf ME, Aller R, Stackebrandt E, Nealson KH (1998) *Shewanella amazonensis* sp. nov., a novel metal-reducing facultative anaerobe from Amazonian shelf muds. *Int J Syst Bacteriol* 48:965-972
- Walkley A, Black IA (1934) An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci* 37(1):29–38
- Wehrli B (1990) Redox reactions of metal ions at mineral surfaces. In: W Stumm (Ed.) *Aquatic chemical kinetics*. New York: John Wiley & Sons, p. 311–336
- Wei Y, Hou H, Li J, Shang Guan Y, Xu Y, Zhang J, Zhao L, Wang W (2014) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with a Mn hyperaccumulator—*Phytolacca americana*, in Mn mining area. *App Soil Ecol* 82:11-17
- Xue S, Zhou X, Huang Y, Zhou X (2011) Initial identification of a manganese resistant microorganism. In: *Computer Distributed Control and Intelligent Environmental Monitoring (CDCIEM), 2011 International Conference on* (pp. 2122-2125). IEEE.
- Yamaji K, Nagata S, Haruma T, Ohnuki T, Kozaki T, Watanabe N, Nanba K (2016) Root endophytic bacteria of a <sup>137</sup>Cs and Mn accumulator plant, *Eleutherococcus sciadophylloides*, increase <sup>137</sup>Cs and Mn desorption in the soil. *J Environ Radioactiv* 153:112-119
- Zhan J, Sun QY (2014) Development of microbial properties and enzyme activities in copper mine wasteland during natural restoration. *Catena* 116:86-94
- Zhang H, Chu LM (2011) Plant community structure, soil properties and microbial characteristics in revegetated quarries. *Ecol Eng* 37(8):1104-1111

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

De uma forma geral, as diferentes variáveis indicam a reabilitação de uma área impactada pela mineração do Mn. Para ilustrar este cenário, dentre as espécies vegetais estabelecidas, destacam-se a *Clidemia hirta* e *Vismia latifolia*, espécies de hábitos diferentes, comuns às áreas revegetadas, colonizadas, potenciais hiperacumuladoras de Mn e associadas a pelo menos um isolado bacteriano redutor de Mn.

Após 12 anos, as nove espécies arbóreas que compuseram o plantio de mudas para a revegetação da barragem de rejeitos de Mn deram lugar a espécies arbustivas e herbáceas, o que demonstra a necessidade de estudos a respeito de quais genótipos devem ser priorizados na composição da lista de plantas a serem introduzidas por esta técnica, caso essa seja a mais apropriada para outros locais. No entanto, o estabelecimento de espécies herbáceas e arbustivas pode indicar avanço na sustentabilidade ambiental.

A avaliação das técnicas de revegetação se mostraram de grande importância para o entendimento do processo de recuperação da área degradada pela mineração de Mn, sendo que a aplicação do *topsoil* apresentou atributos indicadores próximos aos observados na área de mata nativa, possibilitando a recomposição em termos de biodiversidade vegetal e revelando uma microbiota com alta resiliência, o que demonstra ser esta técnica como assertiva neste cenário.