

Tolerância e eficiência de rizóbios nativos de área de mineração de manganês no desenvolvimento de *Vigna unguiculata* L. (Walp.)

Tolerance and efficiency of native rhizobia from the manganese mining area in the development of *Vigna unguiculata* L. (Walp.)

DOI:10.34117/bjdv7n4-478

Recebimento dos originais: 07/03/2021

Aceitação para publicação: 19/04/2021

Marcos Giovane Pedroza de Abreu

Mestre em Ciências do Solo Pela Universidade Federal do Ceará (UFC)

Professor Auxiliar no Curso de Agronomia

Instituição: Centro Universitário São Lucas - Ji-Paraná/RO

Endereço: Av. Eng. Manfredo Barata Almeida da Fonseca, 542. Jd. Aurélio Bernardi |

Ji-Paraná | RO CEP 76907-524

E-mail: marcos.abreu@saolucasjiparana.edu.br

Paulo Furtado Mendes Filho

Doutor em Agronomia (Solos e Nutrição de Plantas) pela Universidade de São Paulo (ESALQ-USP)

Professor Titular Na Universidade Federal do Ceará, Departamento de Ciências do Solo

Instituição: Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus do Pici

Endereço: Av. Mister Hull, s/n - Campus do Pici - Bloco 807 - CEP 60440-900 - Fortaleza – CE

E-mail: mendes@ufc.br

Hugo Mota Ferreira Leite

Doutor em Agronomia - Agricultura pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

Professor Adjunto Na Universidade Federal do Acre, Campus Floresta

Instituição: Universidade Federal do Acre (UFAC), Campus Floresta

Endereço: Estrada do Canela Fina, Km 12, Gleba Formoso, Lote 245, Colônia São Francisco, CEP: 69980-00 – Cruzeiro do Sul – AC

E-mail: hugo.ufac@gmail.com

Marlon Lima de Araújo

Bacharel em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal do Acre (UFAC)

Instituição: Segurança Pública do Estado do Acre

Endereço: Avenida Joaquim Távora, 912, Bairro da baixa, Cruzeiro do Sul, Acre

E-mail: marlon-180@hotmail.com

Thiago Araújo dos Santos

Graduando em Engenharia Agrônômica Pela Universidade Federal do Acre (UFAC)

Instituição: Universidade Federal do Acre (UFAC), Campus Floresta

Endereço: Estrada do Canela Fina, Km 12, Gleba Formoso, Lote 245, Colônia São Francisco, CEP: 69980-00 – Cruzeiro do Sul – AC

E-mail: thiagosantosac96@outlook.com

Leonardo Barreto Tavella

Doutor em Fitotecnia pela Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA)
Professor Adjunto Na Universidade Federal do Acre, Campus Floresta
Instituição: Universidade Federal do Acre (UFAC), Campus Floresta
Endereço: Estrada do Canela Fina, Km 12, Gleba Formoso, Lote 245, Colônia São Francisco, CEP: 69980-00 – Cruzeiro do Sul – AC
E-mail: leo_tavella@hotmail.com

Gustavo Henrique da Silva Albuquerque

Doutor em Ciência do Solo pela Universidade Federal do Ceará (UFC)
Instituição: Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente do Rio Grande do Norte – IDEMA
Endereço: Rua Raimundo Cantídio, 11, Walfredo Gurgel, Mossoró – RN
E-mail: ghsa_rn@yahoo.com.br

James Maciel de Araújo

Doutorando em Produção Vegetal pela Universidade Federal do Acre (UFAC)
Instituição: Universidade Federal do Acre (UFAC)
Endereço: Rua regos Barros, 2017, Bairro Floresta, Cruzeiro do Sul, Acre
E-mail: jamesagro3@gmail.com

RESUMO

A atividade mineradora produz consideráveis quantidades de rejeitos que podem causar grandes impactos ambientais nos ecossistemas aquáticos e terrestres. O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias fixadoras de N₂ nodulíferas de área de mineração de Mn²⁺ e avaliar a tolerância e a efetividade destas estirpes nativas em associação com a espécie leguminosa cultivadas sob crescentes concentrações de Mn²⁺. A partir de solos proveniente de área de mineração de Mn, foram obtidos isolados de estirpes de rizóbio, autenticados e caracterizados morfológicamente. Posteriormente foi analisado o efeito de Mn²⁺ sobre o crescimento e nodulação de *Vigna unguiculata* L. (Walp.). Foram autenticados cinco isolados de BFNN para a área de mata, cinco isolados da área degradada e três isolados do rejeito da mineração, num total de quinze isolados submetidos a autenticação. Os isolados apresentaram em sua grande maioria similaridade com relação as características culturais. O Mn²⁺ não apresentou efeito sobre o processo simbiótico entre os isolados e a cultura, porém, os isolados da área de mineração e as estirpes nativas do solo se demonstraram tolerantes ao metal, nos níveis aqui testados.

Palavras-chave: Bactérias fixadoras de N₂ nodulíferas, Fitorremediação, Metais Pesados.

ABSTRACT

The mining activity produces considerable amounts of tailings that can cause major environmental impacts on aquatic and terrestrial ecosystems. The objective of this work was to isolate nodular N₂-fixing bacteria from the Mn²⁺ mining area and to evaluate the tolerance and effectiveness of these native strains in association with the leguminous species grown under increasing concentrations of Mn²⁺. From soils from the Mn mining area, authenticated and morphologically characterized strains of rhizobium strains were obtained. Subsequently, the effect of Mn²⁺ on the growth and nodulation of *Vigna unguiculata* L. (Walp.) Was analyzed. Five BFNN isolates were authenticated for the forest area, five isolates from the degraded area and three isolates from the mining waste,

in a total of fifteen isolates submitted to authentication. The isolates showed, for the most part, similarity in relation to cultural characteristics. Mn^{+2} had no effect on the symbiotic process between the isolates and the crop, however, the isolates from the mining area and the native strains of the soil proved to be tolerant to the metal, at the levels tested here.

Key words: Heavy metals, Nodule-fixing N_2 bacteria, Phytoremediation.

1 INTRODUÇÃO

A atividade mineradora produz consideráveis quantidades de rejeitos que podem causar grandes impactos ambientais nos ecossistemas aquáticos e terrestres. Em sua grande maioria, as atividades de mineração manuseiam tais rejeitos sem uma gestão adequada (Ghosh et al., 2016; Rashed, 2010). Em solos que se encontram com elevadas concentrações de metais pesados, como manganês, a toxicidade causada pelo metal prejudica a diversidade de organismos do solo, assim como a decomposição da matéria orgânica, mineralização de nitrogênio e o processo de fixação biológica de nitrogênio (Abreu et al., 2019; Rashed, 2010). Com isto a contaminação dos solos por metais pesados tornou-se um problema ambiental para o mundo, se apresentando como uma ameaça significativa tanto para a saúde humana, quanto para a segurança ecológica (Wei et al., 2014).

A remediação de metais pesados em áreas de mineração é uma prática necessária para a proteção do ambiente de seus efeitos tóxicos e conservação dos ecossistemas para as gerações futuras (Glick, 2010). Na tentativa de se promover a revegetação de áreas de mineração, hoje tem se buscado várias técnicas, sendo elas a fitorremediação e a biorremediação, que é basicamente a utilização da associação entre plantas e micro-organismos do solo para reduzir os efeitos tóxicos de contaminantes no ambiente como metais pesados ou poluentes orgânicos (Ali et al., 2013), sendo considerada uma técnica bastante eficaz e de baixo custo na remediação de solos poluídos (BAKER et al., 2010).

Recentemente o interesse por pesquisas utilizando a interação entre leguminosas-rizóbios para a biorremediação de áreas contaminadas por metais pesados tem aumentado significativamente (Chaer et al., 2011; Glick, 2010; Wei et al., 2014). Segundo Pajuelo et al. (2008) a biorremediação oferece várias vantagens, sendo estas: (I) a disponibilidade dos metais é afetada diretamente pelos micro-organismos, neste caso os rizóbios, que fazem uso de algumas estratégias para diminuir o efeito tóxico desses elementos; (II) o uso de leguminosas, que são capazes de se adaptar a diferentes ambientes; (III) a interação simbiótica entre leguminosas-rizóbios com sistema eficiente na fixação de nitrogênio

acarreta na melhoria do sistema solo, por meio da deposição de biomassa vegetal que servira como fonte de carbono para as comunidades microbianas e posteriormente pela mineralização deste material, a liberação de P, S e N.

O feijão caupi ou feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) tem seu centro de origem na África e foi introduzido no Brasil através dos colonizadores portugueses no estado da Bahia (FREIRE FILHO et al., 1983). Comparado a outras leguminosas apresenta alta tolerância a ambientes semiáridos, onde há predomínio de altas temperaturas e estresse hídrico. Devido a sua capacidade de formar simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio é capaz de se adaptar a ambientes de baixa fertilidade, esta interação faz com que esta planta satisfaça suas necessidades nutricionais deste elemento quase que por completo, diminuindo assim os custos de produção e aumento de produtividade (Melloni et al., 2006).

Culturas com estas características são desejáveis para programas de recuperação de áreas degradadas por serem capazes de se desenvolver em condições extremas e rapidamente cobrirem a superfície do solo, diminuindo os processos erosivos e também melhorando o substrato através da deposição de material orgânico, assim as melhorias proporcionadas por esta espécie ao substrato abrem caminhos para o desenvolvimento de novas espécies, acelerando assim o processo de sucessão. Assim, este trabalho teve como objetivo isolar bactérias fixadoras de N_2 nodulíferas de área de mineração de Mn^{2+} e avaliar a tolerância e a efetividade destas estirpes nativas em associação com a espécie leguminosa cultivadas sob crescentes concentrações de Mn^{2+} .

2 MATERIAIS E METODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO E COLETA DE SOLO

Amostras de solo foram coletadas em uma área de mineração de manganês, situada no município de Ocara – CE. Foram coletadas amostras de solo considerando a camada de 0-20 cm de três áreas distintas, sendo: Área 1 (Lat.:4°30'17.82''S; Long.:38°31'22.89''O) considerada uma área de mata nativa preservada e adjacente à área de mineração; Área 2 (Lat.:4°30'14.05''S; Long.:38°31'17.65''O) área degradada pelo processo de extração mineral e Área 3 (Lat.:4°30'22.36''S; Long.:38°31'20.50''O) a amostra foi coletada diretamente do rejeito gerado pelo processo de extração mineral.

Amostras de solos de cada área foram destorroadas e peneiradas em peneira de abertura de malha de 2 mm para obtenção da TFSA (Terra Fina Seca ao Ar) e posteriormente utilizadas para realização de análises quanto às suas características

químicas e físicas de acordo com metodologias propostas por Embrapa (2017). O resultado das análises é apresentado na tabela 1.

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

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

Nota. SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca de cátions; V (%): saturação por bases; m (%): saturação por alumínio.

Fonte: (Abreu et al., 2019)

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

Foi utilizada sementes da cultivar moita branco, adquiridas da comunidade fazenda massapé no município de Monsenhor Tabosa - Ceará.

2.2 ISOLAMENTO, AUTENTICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CULTURAL DE ESTIRPES NATIVAS DE BFNN DE ÁREA DE MINERAÇÃO DE MANGANÊS

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

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

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

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

As placas foram incubadas por um período de 12 dias na ausência de luz em estufa bacteriológica regulada a 28 °C até a formação de colônias visíveis de cor clara. Após 12 dias, as colônias de coloração clara foram repicadas para uma nova placa de Petri contendo meio “YMA” de Vincent (1970) sólido, acrescido com o indicador azul de bromotimol e incubadas novamente sob as mesmas condições.

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

As estirpes inoculadas nas sementes foram multiplicadas em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura “YMB” de Vincent (1970), acrescido de azul de bromotimol e mantidos sob agitação até atingirem uma concentração de 10^9 células por mL de caldo (quantificado em câmara de Neubauer). Posteriormente, foram aplicados asepticamente 3 mL do caldo rizobiano às sementes da espécie leguminosa por ocasião do plantio e, após cinco dias da germinação das sementes, foi realizada uma aplicação de reforço (3 mL) no colo de cada plântula recém emergida. Após a observação da formação dos nódulos nas raízes das plantas, as estirpes provenientes dessa autenticação foram novamente isoladas e incubadas para posterior utilização nos experimentos seguintes.

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

2.3 EFEITO DO MANGANÊS SOBRE O CRESCIMENTO E NODULAÇÃO DE *VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP

O experimento foi realizado em casa de vegetação, pertencente ao Departamento de Ciência do Solo, da Universidade Federal do Ceará (UFC). Foi utilizado como substrato um solo com baixo teor de matéria orgânica e baixa concentração de Mn.

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

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

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

Fonte: (Abreu et al., 2019)

Para a quantificação do número de células viáveis de rizóbios no solo foi adotada a técnica do número mais provável (NMP), com infecção em plantas de Feijão-caupi. Foram utilizados vasos plásticos de 500 ml com substrato de areia lavada e esterilizada em autoclave, as sementes foram desinfetadas e semeadas três sementes por vaso, deixando após a emergência apenas uma planta por vaso.

A partir da amostra de solo obtida, os inóculos foram preparados de acordo com metodologia proposta por Hungria; Araújo (1994), sendo preparadas diluições decimais de 10⁻¹ a 10⁻⁵, a partir de dez gramas de solo diluído em solução com NaCl 0,85 % esterilizada. Após o preparo das diluições foram tomadas alíquotas de 3 mL para a inoculação nas plântulas de Feijão-caupi logo após o desbaste. Foi aplicada solução nutritiva de Hoagland; Armon (1950) com omissão de nitrogênio (N) a cada sete dias. As plantas de feijão-caupi foram coletadas 35 dias após o plantio e analisadas quanto à presença (positivo) e ausência (negativo) de nódulos radiculares. Para a estimativa do número de células bacterianas viáveis foi utilizada a tabela de número mais provável (Alexander, 1965) para a obtenção do fator NMP (Tabela 2).

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

De acordo com os resultados das análises químicas o substrato recebeu as devidas correções de fertilidade por meio da aplicação de 500 kg/há de calcário, mantendo o solo incubado por 30 dias. Após o período de incubamento foi realizada uma adubação básica consistindo da aplicação de 60 mg de P, e 75 mg de K aplicado como KH₂PO₄, 50 mg de S (MgSO₄. 7H₂O), 0.8 mg de B (H₃BO₃), 1.3 mg de Cu (CuSO₄. 5H₂O), 4.0 mg de Fe (Fe-EDTA), 2.0 mg de Zn (ZnSO₄. 7H₂O) e 0.1 mg de Mo (H₂MoO₄) por dm⁻³ de solo. Após a correção o substrato recebeu doses crescentes de manganês (Mn) disponibilizado

na forma de Sulfato de Manganês ($MnSO_4 \cdot H_2O$). As doses utilizadas foram: 0; 20; 40; 60 e 80 $mg\ dm^{-3}$ definidas de acordo com resultado observado em trabalho de Dobereiner (1966), onde a autora demonstrou em seus resultados que $40\ mg\ kg^{-1}$ de Mn^{2+} afetou consideravelmente a interação entre feijão comum e bactérias fixadoras de N_2 .

Na ocasião do plantio foram semeadas no total de três sementes por vaso, mantendo-se uma planta após o desbaste. A inoculação das sementes foi feita a partir da produção de um inoculante (MIX) contendo as três melhores estirpes isoladas e autenticadas de cada área como descrito anteriormente na seção 2.2, produzidas sob agitação orbital de 105 rpm a $28^\circ C$ até que as culturas atingissem a fase log ($10^9\ cel\ mL^{-1}$). Inicialmente a inoculação foi realizada por meio da veiculação das células de BFNN em turfa utilizando uma solução de sacarose (10%) como solução adesiva, posteriormente a germinação das plântulas foi feita uma aplicação de reforço pela adição de $2,0\ mL\ vaso^{-1}$ de cultura em YMB (Vincent, 1970). Os isolados de BFNN de solo contaminado utilizadas foram selecionados de acordo com o resultado da avaliação fenotípica da nodulação (Tabela 3).

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

Feijão-caupi							
Estirpes	Origem	Altura da planta (cm)	Coloração da parte aérea	Posição dos nódulos na raiz	Forma e superfície nodular	Frequência Nodular	Coloração do cerne nodular
FCI1	MATA	21.0	VI	Principal	G/R	MN	Intenso
FCI2	MATA	22.1	VI	Principal	G/R	MN	Intenso
FCI3	MATA	23.5	VI	Principal	G/R	MN	Intenso
FCI7	AD	24.5	VI	Principal	G/R	MN	Médio
FCI8	AD	20.6	VI	Principal	G/R	MN	Médio
FCI9	AD	17.9	VC	Ramificações	G/R	MN	Médio
FCI11	REJEITO	17.1	VI	Principal	G/R	MN	Médio
FCI14	REJEITO	19.4	VI	Principal	G/R	MN	Médio
FCI15	REJEITO	21.4	VI	Principal	G/R	MN	Médio

Nota. AD: área degradada; V.I: verde intenso; V.C: verde claro; G/R: globoso e rugoso; M.N: muito numerosos.

As plantas de feijão-caupi foram colhidas 45 dias após a semeadura quando foram avaliadas as seguintes variáveis: número de nódulos (NN); massa de matéria seca de nódulos (MSN); massa de matéria seca da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR); teor de nitrogênio na parte aérea, determinado pelo método micro-Kjeldahl (TEDESCO et al.,

1995); teor de manganês na parte aérea das plantas, a partir do extrato obtido da digestão nitro-perclórica (Silva, 2009), sendo determinados por espectrofotometria de absorção atômica; e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA). O N acumulado na parte aérea foi calculado por meio da multiplicação da massa da matéria seca da parte aérea pelo teor de N.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5 x 4, considerando-se: i) cinco doses de Mn (0; 20; 40; 60 e 80 mg dm⁻³); ii) quatro tratamentos de inoculação (controle – não inoculado; MIX área 1; MIX área 2 e MIX área 3), com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. Mediante a constatação de diferença significativa, os dados qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey (p<0,05) e os quantitativos (doses) foram submetidos à análise de regressão, utilizando o software estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

3 RESULTADOS

3.1 ISOLAMENTO, AUTENTICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CULTURAL DE ESTIRPES NATIVAS DE BFNN DE ÁREA DE MINERAÇÃO DE MANGANÊS

A espécie *Vigna unguiculata* utilizada como planta isca para captura de BFNN foi capaz de realizar simbiose efetiva com estirpes nativas da área de mineração de manganês nas diferentes áreas amostradas. Foram autenticados cinco isolados de BFNN para a área de mata, cinco isolados da área degradada e três isolados do rejeito da mineração, num total de quinze isolados submetidos a autenticação (Tabela 4).

Tabela 4 – Isolados de bactérias fixadoras de N₂ nodulíferas (BFNN) da área de mineração de manganês autenticadas em associação com feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Isolados	Hospedeiro	Origem
FCI1	Feijão-caupi	Área de mata
FCI2	Feijão-caupi	Área de mata
FCI3	Feijão-caupi	Área de mata
FCI4	Feijão-caupi	Área de mata
FCI5	Feijão-caupi	Área de mata
FCI6	Feijão-caupi	Área degradada
FCI7	Feijão-caupi	Área degradada
FCI8	Feijão-caupi	Área degradada
FCI9	Feijão-caupi	Área degradada
FCI10	Feijão-caupi	Área degradada
FCI11	Feijão-caupi	Rejeito
FCI14	Feijão-caupi	Rejeito
FCI15	Feijão-caupi	Rejeito

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

Tabela 5 - Caracterização cultural de isolados de BFNN da área de mineração de Mn em associação com feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Estirpe	Origem	Gram	pH do meio	TC	CC	TR	EL	FM	EM	FC
FCI1	Mata	-	A	R	B	O	C	P	V	Irregular
FCI2	Mata	-	N	R	B	O	C	P	V	Irregular
FCI3	Mata	-	N	R	B	O	C	P	V	Irregular
FCI7	AD	-	N	R	AM	T	C	P	G	Irregular
FCI8	AD	-	N	R	AM	T	C	P	V	Irregular
FCI9	AD	-	AL	L	B	O	C	P	V	Irregular
FCI11	Rejeito	-	N	R	B	O	C	P	G	Irregular
FCI14	Rejeito	-	N	L	B	O	C	P	V	Irregular
FCI15	Rejeito	-	N	R	B	O	C	P	G	Irregular

Nota. AD: área degradada; - : negativo; A: ácido; AL: alcalino; N: neutro TC: tempo de crescimento; R: rápido; L: lento; CC: cor das colônias; A: amarela; B: branca; TR: transparência; O: opaca; T: translúcida; EL: elevação do muco; C: convexa; FM: formação de muco; P: presente; EM: elasticidade do muco; G: gomosa V: viscoso; FC: forma da colônia.

Com relação à mudança de pH do meio de cultura, dos nove isolados selecionados de feijão-caupi, sete (FCI2, FCI3, FCI7, FCI8, FCI11, FCI14, FCI15) apresentaram reação neutra em meio de cultura YMA, um (FCI1) apresentou capacidade de acidificar o meio e um (FCI9) isolado teve reação alcalina. Em relação ao tempo de crescimento, apenas dois isolados selecionados de feijão-caupi (FCI9, FCI14) apresentaram crescimento lento (5 a 10 dias), todos os outros isolados, apresentaram crescimento rápido (3 dias) em meio de cultura YMA acrescido de azul de bromotimol.

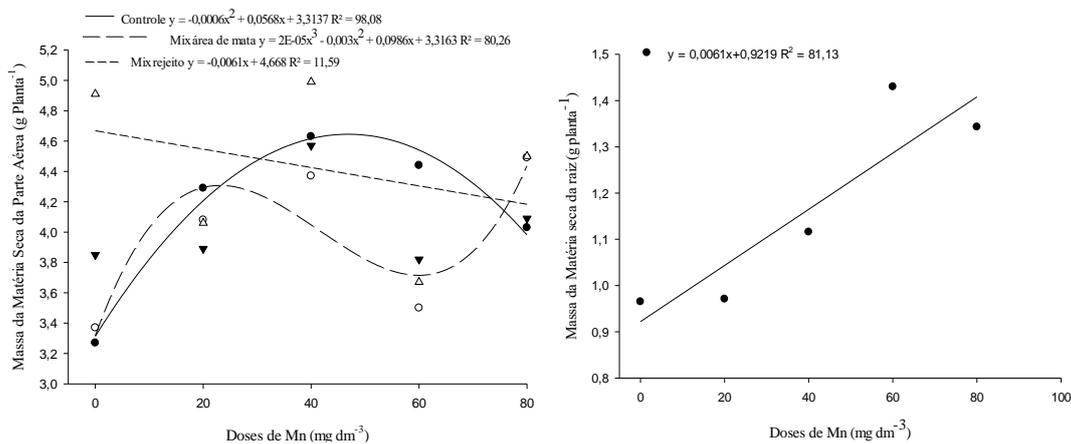
Obtiveram-se algumas diferenças entre os isolados selecionados sendo, em sua grande maioria similares, ou seja, apresentando reação neutra em meio YMA, crescimento rápido, coloração branca, transparência opaca, elevação convexa e presença de muco. Apenas na forma da colônia todos os isolados foram similares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

3.2 EFEITO DO MANGANÊS SOBRE O CRESCIMENTO E NODULAÇÃO DE *VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP.

A massa da matéria seca da parte aérea foi influenciada significativamente ($p < 0,01$) pela interação entre os fatores (doses de Mn x BFNN). O tratamento controle se ajustou ao modelo de regressão quadrático demonstrando um ganho na matéria seca da parte aérea com as crescentes doses de Mn, exceto nas doses de 60 e 80 mg dm^{-3} . O valor máximo para o tratamento foi obtido na dose de 47,33 mg dm^{-3} apresentando 4,65 gramas de matéria seca por planta. Para o mix área de mata os dados se ajustaram ao modelo de regressão cúbica, obtendo valor máximo de 4,24 gramas por planta de matéria seca na dose de 20,73 mg dm^{-3} de Mn e um valor mínimo de 2,24 gramas por planta de matéria seca na dose de 79,26 mg dm^{-3} de Mn. O mix rejeito se ajustou ao modelo de regressão linear decrescente apresentando redução na matéria seca da parte aérea das plantas de acordo com o aumento das doses (Figura 1).

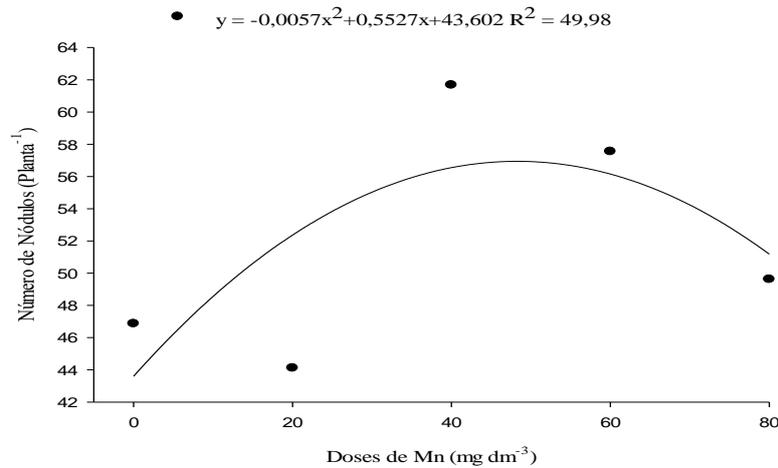
A massa da matéria seca da raiz foi influenciada significativamente ($p < 0,01$) pelas doses de manganês (Figura 1). Os dados se ajustaram ao modelo de regressão linear crescente demonstrando incremento na massa da matéria seca de raiz com o aumento das doses de manganês, onde o maior incremento foi observado na dose de 60 mg dm^{-3} .

Figura 1. Massa da matéria seca da parte aérea e raiz de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) submetido a doses de manganês e tratamentos de inoculações com BFNN.



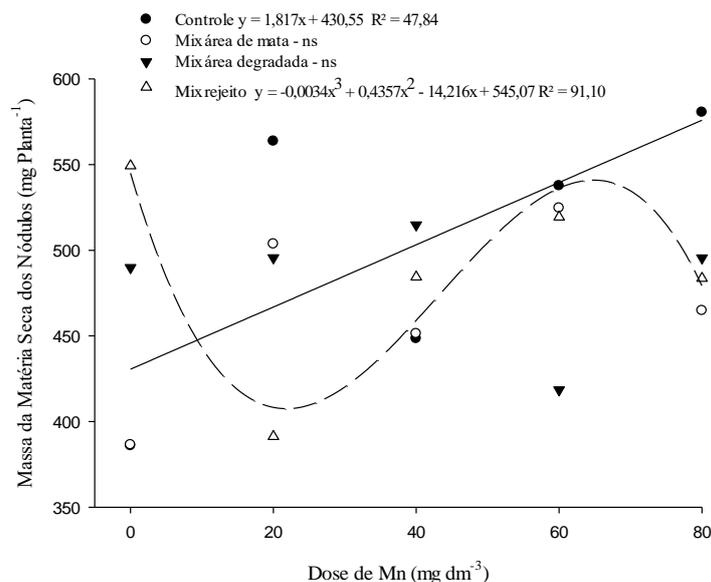
O número de nódulos em feijão-caupí foi influenciado significativamente ($p < 0,05$) pelas doses de manganês. Os dados se ajustaram ao modelo de regressão quadrático demonstrando tendência de incremento no número de nódulos, exceto nas doses de 60 e 80 mg dm^{-3} de Mn (Figura 2). A maior quantidade de nódulos por plantas é observada na dose de 48,48 mg dm^{-3} de Mn com um total de 57 nódulos formados.

Figura 2. Número de nódulos em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.). submetido a doses de manganês.



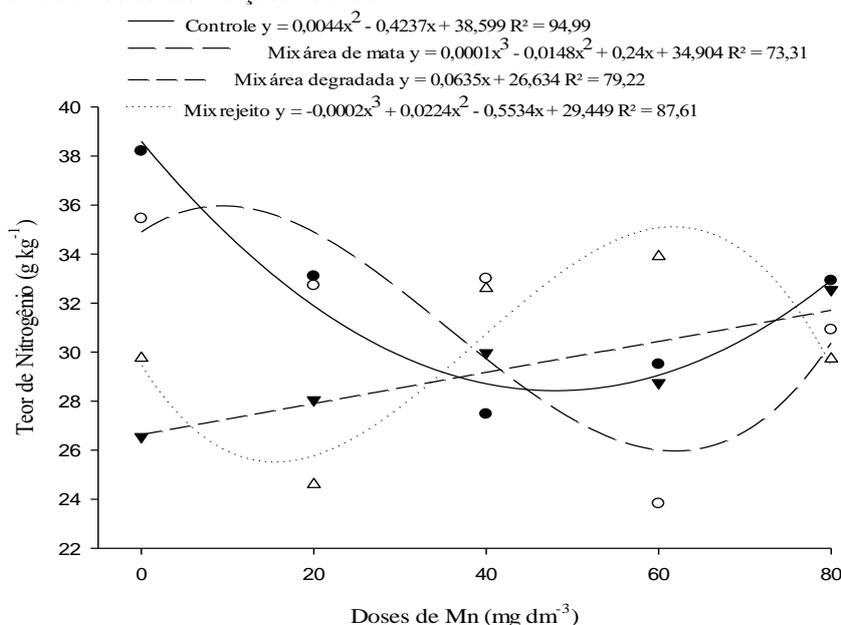
A massa da matéria seca dos nódulos foi influenciada significativamente ($p < 0,05$) pela interação entre os fatores (doses de Mn x BFNN). O tratamento controle apresentou ajuste ao modelo de regressão linear crescente apresentando incremento na massa da matéria seca dos nódulos de acordo com o aumento das doses de Mn, obtendo valor máximo na dose de 80 mg dm⁻³ (Figura 3). O tratamento de inoculação mix rejeito demonstrou ajuste ao modelo de regressão cúbica onde, as menores doses afetaram significativamente a massa da matéria seca dos nódulos, o valor mínimo de 406,99 mg planta⁻¹ foi observado na dose de 21,95 mg dm⁻³ e o valor máximo observado foi de 528,64 mg planta⁻¹ na dose de 63,47 mg dm⁻³.

Figura 3. Massa da matéria seca de nódulos em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.). submetido a doses de manganês e tratamentos de inoculações com BFNN.



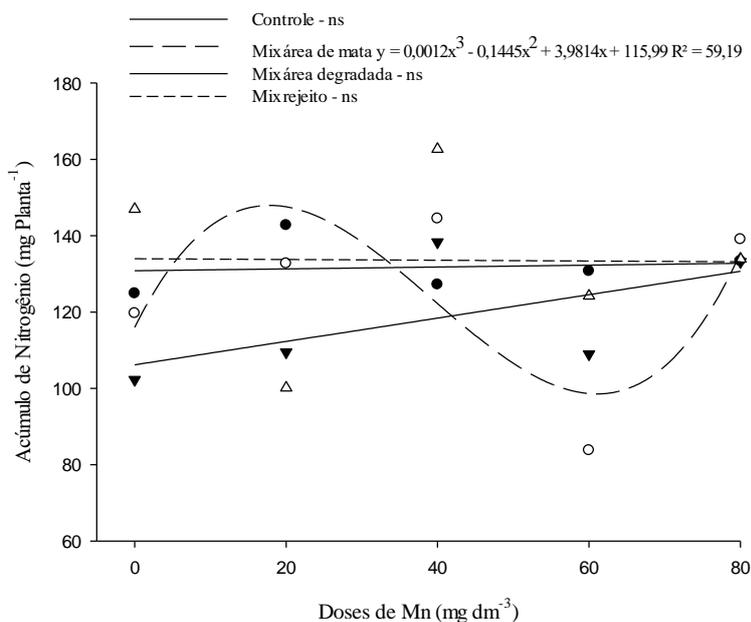
O teor de nitrogênio nas plantas de feijão-caupí foi afetado significativamente ($p < 0,01$) pela interação entre os fatores (doses de Mn x BFNN). O tratamento controle ajustou-se ao modelo de regressão quadrático obtendo valor mínimo de $28,39 \text{ g kg}^{-1}$ de nitrogênio na dose de $48,14 \text{ mg dm}^{-3}$ de Mn. O tratamento mix área de mata ajustou-se ao modelo de regressão cúbica obtendo o valor máximo de $35,93 \text{ g kg}^{-1}$ de nitrogênio na dose de $8,91 \text{ mg dm}^{-3}$ de Mn. O mix área degradada ajustou-se ao modelo de regressão linear crescente, demonstrando incremento de nitrogênio nas plantas de acordo com o aumento das doses de Mn, obtendo valor máximo na dose de 80 mg dm^{-3} . O mix rejeito ajustou-se ao modelo de regressão cúbica demonstrando menor teor de nitrogênio de $25,50 \text{ g kg}^{-1}$ na dose de $15,62 \text{ mg dm}^{-3}$ e o máximo de $33,69 \text{ g kg}^{-1}$ na dose de $59,04 \text{ mg dm}^{-3}$ de Mn (Figura 4).

Figura 4. Teor de nitrogênio em feijão-caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.). submetido a doses de manganês e tratamentos de inoculações com BFNN.



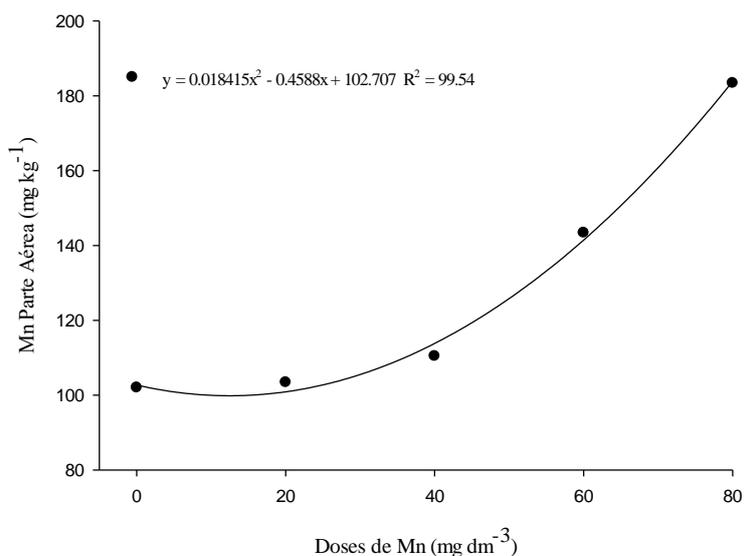
O acúmulo de nitrogênio nas plantas de feijão-caupí foi afetado significativamente ($p < 0,01$) pela interação entre os fatores (doses de Mn x BFNN). O tratamento mix área de mata se ajustou ao modelo de regressão cúbica (Figura 5). Houve maior acúmulo de nitrogênio nas plantas na dose de $17,66 \text{ mg dm}^{-3}$ de Mn apresentando o valor de $147,84 \text{ mg planta}^{-1}$. O valor mínimo de acúmulo de nitrogênio foi observado na dose de $62,61 \text{ mg dm}^{-3}$ de Mn correspondente a $93,34 \text{ mg planta}^{-1}$.

Figura 5. Acúmulo de nitrogênio em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.). submetido a doses de manganês e tratamentos de inoculações com BFNN.



O teor de manganês na parte aérea das plantas de feijão-caupí foi afetado significativamente ($p < 0,01$) pelas doses de Mn (Figura 6). Os dados se ajustaram ao modelo de regressão quadrático apresentando um valor mínimo de teor de Mn na dose de $12,45 \text{ mg dm}^{-3}$ correspondendo a $99,84 \text{ mg kg}^{-1}$, nas doses superiores houve incremento no teor de Mn na parte aérea das plantas.

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



4 DISCUSSÃO

No processo de autenticação os 13 isolados autenticados demonstraram eficiência no processo de fixação biológica de nitrogênio, demonstrado pela coloração verde intensa das folhas das plantas. Estes isolados também demonstraram características de eficiência no processo de nodulação da espécie, uma vez que a nodulação ocorreu predominantemente na raiz principal da planta e com uma frequência nodular muito intensa (Tabela 3).

Os isolados obtidos neste estudo demonstraram grande capacidade de sobrevivência em condições de estresse, principalmente devido a presença de Mn em níveis elevados, condições de baixa fertilidade e estresse hídrico (Tabela 1). Alguns mecanismos utilizados por micro-organismos para sobreviverem a condições de estresse como por exemplo, o excesso de metais no solo já foram identificados, dentre eles, um mecanismo é caracterizado pela produção de exopolissacarídeos (Nocelli et al., 2016), este mecanismo também é utilizado por organismos que sobrevivem em regiões de estresse hídrico, favorecendo a sua sobrevivência nestas condições, o que foi observado nos isolados obtidos neste estudo que apresentaram a característica de produção de exopolissacarídeos ou como destacado na tabela 5, produção de muco presente. Abreu et al. (2019) observou as mesmas características em isolados de BFNN associados a *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.

A presença das concentrações de Mn^{2+} afetou a massa da matéria seca da parte aérea em todos os tratamentos, porém pode-se observar que mesmo na presença do elemento tóxico no solo as plantas inoculadas com as BFNN conseguiram acumular uma maior massa da matéria seca na parte aérea quando comparado a dose 0 de Mn^{2+} . Como demonstrado por Horst et al. (1999), este comportamento pode ser atribuído a capacidade de tolerância da espécie *V. unguiculata* a presença de elevadas concentrações de Mn^{2+} no solo, uma vez que há evidências que o elemento uma vez no interior da planta é sequestrado por ácidos orgânicos, como citrato, que complexam o metal e posteriormente é acumulado nos vacúolos celulares.

Com relação a massa da matéria seca da raiz, esse estímulo no crescimento das plantas pelo aumento das doses de Mn pode ser explicado pela participação desse elemento em vários processos importantes para o desenvolvimento vegetal tais como, metabolismo do nitrogênio, respiração, controle hormonal e fotossíntese (Malavolta, 2006). Em estudos de recuperação de área contaminadas por metais, parâmetros de crescimento das plantas

como estes devem ser considerados como pontos positivos, uma vez que são características desejadas em projetos de fitorremediação.

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

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

O número e massa da matéria seca dos nódulos são considerados parâmetros de avaliação de eficiência de estirpes fixadoras de nitrogênio eficientes, uma vez que estão fortemente relacionados com a promoção do crescimento das plantas (Dobereiner, 1966). O número e a massa da matéria seca dos nódulos correlacionaram-se positivamente com a massa da matéria seca da parte aérea ($r = 0.32$; $p \leq 0.01$; $r = 0.35$; $p \leq 0.01$), respectivamente. Entretanto, apenas a massa da matéria seca dos nódulos correlacionou-se positivamente com o acúmulo de nitrogênio na parte aérea ($r = 0.34$; $p \leq 0.01$). Dessa maneira, a massa da matéria seca dos nódulos constituiu-se num melhor parâmetro para seleção de isolados mais eficientes. Correlações positivas e significativas entre massa da matéria seca dos nódulos e massa da matéria seca da parte aérea também foram observadas em trabalhos realizados por Ferreira et al. (2012) e Dobereiner (1966), que também já relatavam correlação positiva entre massa da matéria seca dos nódulos e a quantidade de N_2 fixado.

No que se refere ao acúmulo de nitrogênio pode-se observar que as estirpes tanto nativas do solo quanto os isolados rizobianos introduzidos foram eficientes em promover

acúmulo de N_2 com o aumento das doses de Mn, destacando-se as estirpes que compunham o mix do rejeito.

Também pode ser observado que todas as plantas se beneficiaram da fixação biológica de N_2 , uma vez que não foi utilizada qualquer outra fonte de N_2 durante a condução experimental e nem observada a presença de sintomas de deficiência desse elemento. Apesar de os isolados rizobianos do mix área de mata e as estirpes nativas do solo terem demonstrado sensibilidade a presença de Mn, os mesmos foram capazes de fixar e disponibilizar N_2 para as plantas em quantidade suficiente para o seu desenvolvimento. Segundo Malavolta et al. (1997) teores adequados de N_2 para feijões *Vigna* estariam entre a faixa de 18 a 22 g kg^{-1} , os valores aqui apresentados estão todos acima desta faixa, o que pode-se considerar uma alta eficiência das estirpes tanto obtidas das áreas de mineração quanto as nativas do solo na nutrição de N_2 as plantas.

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

Dobereiner (1966) avaliando o efeito da dose de 40 mg kg^{-1} de Mn sobre a fixação simbiótica do nitrogênio de *Phaseolus vulgaris* por estirpes de *Rhizobium phaseoli* observou teores de 19,6 g kg^{-1} de N_2 , pela associação com a estirpe 413, e 20,9 g kg^{-1} de N_2 pela associação com a estirpe 411. Apesar de não ter afetado o processo de nodulação, o Mn reduziu a fixação simbiótica do N_2 pelas leguminosas associadas às estirpes nativas e com o mix da área de mata, comportamento semelhante ao observado por Spencer (1950).

Para a obtenção de sucesso no processo de fitorremediação de áreas contaminadas por metais, a interação plantas-micro-organismos é imprescindível, principalmente associações como leguminosas-rizóbios que podem incorporar N_2 ao sistema por meio da fixação biológica nessas condições. Estirpes isoladas de áreas contaminadas por metais têm se mostrado eficientes em fixar N_2 associadas a espécies de leguminosas (Ferreira et al., 2012; Rangel et al., 2017) o que, pela semelhança, reforça os resultados aqui obtidos com os isolados rizobianos das áreas estudadas.

Durante a realização do experimento observou-se que as doses de Mn aplicadas não chegaram a causar grande efeito sob o desenvolvimento das plantas de feijão-caupi, havendo o desenvolvimento de sintomas de toxidez a partir de 25 dias após o plantio, caracterizado pela presença de manchas marrom escuro nas folhas velhas que posteriormente levam a

clorose e queda das folhas (Horst, 1988) mas com pouca intensidade. Malavolta et al. (1997) definem o teor ideal de Mn em *Vigna* na faixa de 400 a 425 mg kg⁻¹, valores superiores aos encontrados nas plantas.

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

5 CONCLUSÃO

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

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

REFERÊNCIAS

- Abreu, M.G.P. de, Filho, P.F.M., Garcia, K.G. V., Silva Junior, J.M.T. da, Albuquerque, G.H. da S., Araujo, J.M., Tavella, L.B., 2019. Effect of Manganese on Growth and Nodulation of *Mimosa caesalpiniaefolia* (Benth.). *J. Agric. Sci.* 11, 339. <https://doi.org/10.5539/jas.v11n2p339>
- Alexander, M., 1965. Most-Probable-Number Method for Microbial Populations, in: BLACK, A., C. (Eds.), *Methods of Soil Analysis - Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Madison, pp. 1467–1472. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.c49>
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere* 91, 869–881. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2013.01.075>
- BAKER, A.J.M., ERNST, W.H.O., ENT, A. VAN DER, MALAISSE, F., GINOCCHIO, R., 2010. Metallophytes: the unique biological resource, its ecology and conservational status in Europe, central Africa and Latin America, in: Batty, L.C., Hallberg, K.B. (Eds.), *Ecology of Industrial Pollution*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 7–40. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511805561>
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., 2005. Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology: The Proteobacteria*, 2nd ed. Springer, East Lansing.
- Castro, J.L. de, Souza, M.G., Rufini, M., Guimarães, A.A., Rodrigues, T.L., Moreira, F.M. de S., 2017. Diversity and efficiency of rhizobia communities from iron mining areas using cowpea as a trap plant. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* 41, 1–20. <https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20160525>
- Chaer, G.M., Resende, A.S., Campello, E.F.C., De Faria, S.M., Boddey, R.M., Schmidt, S., 2011. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. *Tree Physiol.* <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq116>
- DIONÍSIO, J.A., PIMENTEL, I.C., SIGNOR, D., PAULA, A.M., MACEDA, A., MATTANA, A.L., 2016. *Guia prático de Biologia do solo*, 1st ed. Sociedade brasileira de ciências do solo, Paraná.
- Dobereiner, J., 1966. MANGANESE TOXICITY EFFECTS ON NODULATION AND NITROGEN FIXATION OF BEANS (*PHASEOLUS VULGARIS* L.), IN ACID SOILS. *Plant Soil* 24, 153–166.
- EMBRAPA, E.B. de P.A., 2017. *Manual de métodos de análises de solos*, 3rd ed. Embrapa Solos, Rio de Janeiro.
- Ferreira, D.F., 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Cienc. e Agrotecnologia* 35, 1039–1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- Ferreira, P.A.A., Bomfeti, C.A., Silva Júnior, R. da, Soares, B.L., Soares, C.R.F.S., Moreira, F.M. de S., 2012. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 47, 85–95.
- FREIRE FILHO, F.R., CARDOSO, M.J., ARAÚJO, A.G. DE, 1983. *Caupi*:

- nomenclatura científica e nomes vulgares. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 18, :1369-1372.
- Gerdemann, J.W., Nicolson, T.H., 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46, 235–244. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)
- Ghosh, S., Mohanty, S., Nayak, S., Sukla, L.B., Das, A.P., 2016. Molecular identification of indigenous manganese solubilising bacterial biodiversity from manganese mining deposits. *J. Basic Microbiol.* 56, 254–262. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500477>
- Glick, B.R., 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 28, 367–374. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2010.02.001>
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil, California Agricultural Experiment Station Circular. California. <https://doi.org/citeulike-article-id:9455435>
- HORST, W.J., 1988. The Physiology of Manganese Toxicity, in: Graham, R., Hannam, R., Uren, N. (Eds.), *Manganese in Soils and Plants*. KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, p. 346.
- Horst, W.J., Fecht, M., Naumann, A., Wissemeier, A.H., Maier, P., 1999. Physiology of manganese toxicity and tolerance in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkd.* 162, 263–274. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2624\(199906\)162:33.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2624(199906)162:33.0.CO;2-A)
- HUNGRIA, M., ARAUJO, R.S., 1994. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*, 1st ed. Embrapa, Brasília, DF.
- Malavolta, E., 2006. *Manual de Nutrição Mineral de Plantas*, 1st ed. Editora Agronomica Ceres Ltda, São Paulo.
- Malavolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S., 1997. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*, 2nd ed. POTAFOS, Piracicaba.
- Melloni, R., De Sousa Moreira, F.M., Nóbrega, R.S.A., De Siqueira, J.O., 2006. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* 30, 235–246. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832006000200005>
- Millaleo, R., Reyes- Diaz, M., Ivanov, A., Mora, M., Alberdi, M., 2010. Manganese As Essential and Toxic Element for Plants: Transport, Accumulation and Resistance Mechanisms. *J. soil Sci. plant Nutr.* 10, 470–481. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000200008>
- Nocelli, N., Bogino, P.C., Banchio, E., Giordano, W., 2016. Roles of extracellular polysaccharides and biofilm formation in heavy metal resistance of rhizobia. *Materials (Basel)*. 9, 1–19. <https://doi.org/10.3390/ma9060418>
- Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I.D., Dary, M., Palomares, A.J., 2008. Toxic effects of arsenic on *Sinorhizobium-Medicago sativa* symbiotic interaction. *Environ. Pollut.* 154, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.10.015>

Rangel, W.M., Thijs, S., Janssen, J., Longatti, S.M.O., Bonaldi, D.S., Ribeiro, P.R.A., Jambon, I., Eevers, N., Weyens, N., Vangronsveld, J., Moreira, F.M.S., 2017. Native rhizobia from Zn mining soil promote the growth of *Leucaena leucocephala* on contaminated soil. *Int. J. Phytoremediation* 19, 142–156. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207600>

Rashed, M.N., 2010. Monitoring of contaminated toxic and heavy metals, from mine tailings through age accumulation, in soil and some wild plants at Southeast Egypt. *J. Hazard. Mater.* 178, 739–746. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2010.01.147>

Silva, F.C. da, 2009. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes, 2nd ed. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF.

Spencer, D., 1950. The effects of calcium and soil pH in nodulation of *T. subterraneum* L., clover on yellow podsol. *Aust. J. agric. Res* 1, 374–381.

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

VINCENT, J.M., 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria, 1st ed. Blackwell Scientific Publications, (International Biological Programme Handbook), Londres.

Wei, Y., Hou, H., ShangGuan, Y., Li, J., Li, F., 2014. Genetic diversity of endophytic bacteria of the manganese-hyperaccumulating plant *Phytolacca americana* growing at a manganese mine. *Eur. J. Soil Biol.* 62, 15–21. <https://doi.org/10.1016/J.EJSOBI.2014.02.011>