



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**WATILLA PEREIRA COVRE**

**CARACTERIZAÇÃO, IMPACTOS E RECUPERAÇÃO DE RESÍDUOS DE**  
**MINERAÇÃO DE COBRE NA AMAZÔNIA ORIENTAL**

**BELÉM**

**2021**

**WATILLA PEREIRA COVRE**

**CARACTERIZAÇÃO, IMPACTOS E RECUPERAÇÃO DE RESÍDUOS DE  
MINERAÇÃO DE COBRE NA AMAZÔNIA ORIENTAL**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da  
Amazônia, como parte das exigências do curso de  
Doutorado em Agronomia, área de concentração:  
Agronomia, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Rodrigues Fernandes

**BELÉM**

**2021**

**WATILLA PEREIRA COVRE**

**CARACTERIZAÇÃO, IMPACTOS E RECUPERAÇÃO DE RESÍDUOS DE  
MINERAÇÃO DE COBRE NA AMAZÔNIA ORIENTAL**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração: Agronomia, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Antonio Rodrigues Fernandes

**29 de junho de 2021.**

**Data da aprovação**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Dr. Antonio Rodrigues Fernandes - Orientador**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA**

---

**Dra. Edna Santos de Souza – 1ª Examinadora**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ - UNIFESSPA**

---

**Dr. Renato Alves Teixeira – 2º Examinador**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ - UNIFESSPA**

---

**Dr. Sílvio Junio Ramos – 3º Examinador**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE – ITV**

---

**Dr. Gabriel Caixeta Martins – 4º Examinador**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE – ITV**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me manter de pé e não desistir quando tudo ficou difícil;

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pela formação e suporte proporcionados em 11 anos de ensino;

Ao Programa de Pós Graduação em Agronomia (PGAGRO), pela oportunidade de me tornar mestre e doutora na Amazônia;

À Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA) pelo financiamento desta pesquisa e concessão da minha bolsa de estudos;

Ao meu orientador, professor Antonio Rodrigues Fernandes, por todo o aprendizado acadêmico e de vida, as ideias e sugestões compartilhadas, as broncas, a paciência e sobretudo, a compreensão ao longo desses quase 10 anos de orientação;

À professora Gisele Barata, responsável pelo Laboratório de Proteção de Plantas (LPP – UFRA), por dar suporte ao desenvolvimento de parte importante desta pesquisa;

Ao doutor Sílvio Júnio Ramos do Instituto Tecnológico Vale (ITV), por contribuir de maneira significativa com o desenvolvimento desta pesquisa;

À minha mãe, Sirlândia Covre por todo amor e apoio durante essa longa jornada, e por ser uma importante facilitadora para a realização desta pesquisa;

Às minhas irmãs Ilana e Louise, que mesmo longe sempre foram carinhosas e apoiaram a minha formação;

À minha sobrinha Laura, que chegou no início desta pesquisa e foi a leveza necessária para chegar a esta reta final;

À Lorena Correa, pelo companheirismo, suporte e paciência em todos os momentos, meu porto seguro;

À Nauzilene, Ivanildo, Camila, Tayná e Juliana, minha família do coração que me formou e me acolheu em Belém;

À minha amiga Deborah Pires por compartilhar e suportar essa jornada sempre juntas;

A Edna Souza e ao Renato Teixeira por compartilhar alguns poucos, mas bons anos de aprendizado e companheirismo;

Ao Wendel Valter pela amizade e tão importante parceria para a conclusão dos nossos trabalhos;

Aos sempre prestativos colegas de LETAM, Yan Nunes, Marcela Vieira, Adrielle Laena e Deimid por contribuir com a execução desta pesquisa;

Aos colegas do LPP, Josué Valente, Aline, Fernando, Gleice, Alessandra, João Paulo, Alice e Matheus por contribuir com a execução desta pesquisa;

Aos funcionários da UFRA, Nena, Ilma, seu Nelson e seu Doquinho (em memória) que se tornaram grandes companheiros.

## RESUMO

Os resíduos da mineração de cobre (Cu) na Província Mineral de Carajás podem ser perigosos devido à presença de elementos potencialmente tóxicos (EPTs) e propriedades desfavoráveis que regulam a liberação dos EPTs no ambiente. Microrganismos e compostos orgânicos vem sendo utilizados para favorecer o estabelecimento de plantas usadas para a fitorremediação de locais contaminados por EPTs. O objetivo do trabalho foi caracterizar e avaliar os riscos de resíduos de mineração de Cu, e identificar alternativas para a recuperação desses materiais. O estudo foi realizado em duas áreas de mineração de Cu no município de Canaã dos Carajás-Pará. Na mina artesanal foram coletados plantas, solo, resíduos de sobrecarga e de rochas, e na mina industrial, rejeito. Primeiramente foram determinados atributos químicos e granulométricos, e os indicadores ambientais no solo e resíduos de mineração. E posteriormente o rejeito da mineração industrial foi tratado com solo e composto orgânico de caroço de açaí em diferentes proporções, e semeado com sementes de *Cenostigma tocaninum* sem e com inoculação de cepa bacteriana promotora de crescimento, isolada das raízes de *Solanum torvum*. Após 100 dias de cultivo em casa de vegetação, as plantas foram avaliadas quanto a germinação, crescimento e absorção de Cu, e os substratos foram analisados quanto ao pH, matéria orgânica (MO) e concentração de Cu. Para a caracterização dos resíduos foi realizada estatística descritiva, e o teste de Scott-Knott foi utilizado para comparar as médias após o experimento. O pH variou de 6,2 a 8,0 e as concentrações pseudo-totais de Cu foram elevadas em todos os resíduos, chegando a 19034 mg kg<sup>-1</sup> no resíduo de rocha artesanal. Os índices de poluição indicaram que os resíduos são altamente contaminados por Cu e moderadamente contaminados por cromo (Cr) e níquel (Ni). Foi detectado risco cancerígeno à saúde humana pela exposição ao Cr nos resíduos de mineração artesanal. Com a adição dos tratamentos, a disponibilidade de Cu foi aumentada em até 240%. A inoculação bacteriana favoreceu a germinação de sementes de *C. tocaninum* no rejeito não tratado. Plantas cultivadas no rejeito com o composto apresentaram crescimento superior e maior índice de tolerância. A absorção de Cu pelas plantas foi influenciada pela bactéria, com concentrações na raiz de 905 e 800 mg kg<sup>-1</sup> no rejeito não tratado e tratado com solo.

**Palavras-chave:** Avaliação de risco, poluição ambiental; resíduo de açaí; Bacillus; pau-preto

## ABSTRACT

Copper mining (Cu) residues in the Mineral Province of Carajás can be hazardous due to the presence of potentially toxic elements (EPTs) and unfavorable properties that regulate the release of EPTs into the environment. Microorganisms and organic compounds have been used to favor the establishment of plants used for phytoremediation of sites contaminated by EPTs. The aim of this study was to characterize and evaluate the risks of Cu mining residues, and to identify alternatives for the recovery of these materials. The study was carried out in two mining areas of Cu in the city of Canaã dos Carajás-Pará. Plants, soil, overburden and rock waste were collected in the artisanal mine, and in the industrial mine, tailings. Firstly, chemical and granulometric attributes and environmental indicators in soil and mining waste were determined. Posteriorly, the tailings of industrial mining were treated with soil and organic compound of açai kernel in different proportions, and sown with seeds of *Cenostigma tocaninum* without and with inoculation of bacterial growth-promoting strain, isolated from the roots of *Solanum torvum*. After 100 days of cultivation in greenhouse, the plants were evaluated for germination, growth and Cu absorption, and the substrates were analyzed for pH, organic matter (MO) and Cu concentration. Descriptive statistics were performed to characterize the residues, and the Scott-Knott test was used to compare the means after the experiment. The pH ranged from 6.2 to 8.0 and the pseudo-total Cu concentrations were high in all residues, reaching 19034 mg kg<sup>-1</sup> in artisanal rock residue. The pollution indexes indicated that the residues are highly contaminated by Cu and moderately contaminated by chrome (Cr) and nickel (Ni). Carcinogenic risk to human health was detected by exposure to Cr in artisanal mining residues. With the addition of treatments, Cu availability was increased by up to 240%. Bacterial inoculation favored the germination of *C. tocaninum* seeds in untreated tailings. Plants cultivated in the tailings with the organic compound showed higher growth and higher tolerance index. Cu absorption by plants was influenced by bacteria, with root concentrations of 905 and 800 mg kg<sup>-1</sup> in tailings treated with soil and untreated.

**Keywords:** Risk assessment, environmental pollution; açai residue; Bacillus; pau-preto

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Fig. 1.</b> Location map of sampling points in the eastern Amazon - Brazil.....	24
<b>Fig. 2.</b> X-ray diffractograms of samples from forest soil (A), artisanal overburden (B), industrial tailing (C), and artisanal rock waste (D) collected in the eastern Amazon - Brazil.....	30
<b>Fig. 3.</b> Chemical fractionation of Cu in forest soil and copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.....	37
<b>Fig. 4.</b> Bioavailable concentration of copper in forest soil and copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.....	39
<b>Fig. 5.</b> Principal component analysis between potentially toxic elements and properties of forest soil and copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.....	42
<b>Figura 1.</b> Matéria seca da raiz e parte aérea de plantas de arroz inoculadas com a cepa bacteriana B23.....	72
<b>Figura 2.</b> Matéria seca de raiz - MSR (A) e matéria seca de parte aérea - MSPA (B) de plantas de <i>C. tocaninum</i> após experimento.....	74
<b>Figura 3.</b> pH (A) e conteúdo de carbono orgânico (B) nos substratos após o experimento.....	76
<b>Figura 4.</b> Concentração pseudo-total (A) e disponível (B) de Cu após o experimento.....	77
<b>Figura 5.</b> Concentração de Cu na raiz (A) e parte aérea (B) de <i>C. tocaninum</i> após o experimento.....	77

## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1.</b> Chemical properties and granulometry of forest soil and copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.....	32
<b>Table 2.</b> Pseudototal concentration of potentially toxic elements in forest soil and copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.....	35
<b>Table 3.</b> Enrichment factor (EF) and contamination factor (CF) of potentially toxic elements in copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.....	41
<b>Table 4.</b> Potential ecological risk factors (PERF) and potential ecological risk index (PERI) of potentially toxic elements in copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.....	45
<b>Table 5.</b> Non-carcinogenic and carcinogenic hazard indices (HI) of potentially toxic elements in copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.....	45
<b>Tabela 1.</b> Tratamentos identificados com as respectivas misturas e proporções.....	68
<b>Tabela 2.</b> Propriedades químicas do composto orgânico, solo de floresta e rejeito de mineração de Cu.....	70
<b>Tabela 3.</b> Coloração Gram e características de promoção de crescimento de plantas da cepa bacteriana selecionada.....	72
<b>Tabela 4.</b> Porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), índice de vigor de plântulas (IVP), comprimento radicular (CR) e matéria seca total (MST) de <i>C. tocaninum</i> aos 25 dias após o semeio.....	73
<b>Tabela 5.</b> Altura, diâmetro de caule (DC), área foliar (AF), número de folíolos (NF), conteúdo relativo de clorofila, índice de qualidade de Dickson (IQD) e índice de tolerância (IT) de <i>C. tocaninum</i> após o experimento.....	75
<b>Tabela 6.</b> Fatores de translocação (FT), bioconcentração (FBC) e biotransferência (FBT) de <i>C. tocaninum</i> após o experimento.....	78



## SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>13</b>
<b>2. IMPACT OF COPPER MINING WASTES IN THE AMAZON: PROPERTIES AND RISKS TO ENVIRONMENT AND HUMAN HEALTH.....</b>	<b>17</b>
ABSTRACT.....	18
GRAPHICAL ABSTRACT.....	19
Highlights.....	20
2.1. INTRODUCTION.....	21
2.2. MATERIAL AND METHODS.....	22
2.2.1 Study site.....	22
2.2.2 Sampling of soils and mining wastes.....	24
2.2.3 Mineralogical, chemical, and granulometric characterization.....	24
2.2.4 Quantification of PTE concentrations.....	25
2.2.5 Pollution indices.....	26
2.2.6 Assessment of environmental and human health risks.....	27
2.2.7 Statistical analyzes.....	28
2.3. RESULTS AND DISCUSSION.....	29
2.3.1 Sample characterization.....	29
2.3.2 Pseudo-total concentrations of PTEs.....	33
2.3.3 Chemical fractionation, bioavailability, and mobility of copper.....	35
2.3.4 Pollution índices.....	39
2.3.5 Principal component analysis.....	41
2.3.6 Risks to environment and human health.....	43
2.4. CONCLUSIONS.....	46
REFERENCES.....	46
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	56

<b>3. BACTÉRIA E ADUBAÇÃO ORGÂNICA COMO CONDICIONANTES PARA A FITORREMEDIAÇÃO COM <i>Cenostigma tocantinum</i> EM REJEITO DE MINERAÇÃO DE COBRE</b> .....	62
RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	63
<b>3.1. Introdução</b> .....	64
<b>3.2. Material e Métodos</b> .....	65
3.2. 1. Produção de composto orgânico.....	65
3.2. 2. Coleta dos materiais.....	66
3.2. 3. Isolamento da cepa bacteriana.....	66
3.2. 4. Caracterização da cepa bacteriana.....	67
3.2. 5. Identificação genética da bactéria.....	67
3.2. 6. Teste de promoção de crescimento.....	68
3.2. 7. Desenho experimental e condições de crescimento.....	68
3.2. 8. Análises químicas.....	70
3.2. 9. Parâmetros de eficiência de fitorremediação.....	71
3.2. 10. Análises estatísticas.....	71
<b>3.3. Resultados</b> .....	72
3.3.1. Caracterização da cepa bacteriana.....	72
3.3.2. Germinação e crescimento inicial.....	73
3.3.3. Crescimento e tolerância das mudas.....	73
3.3.4. pH, CO e concentração de Cu após o experimento.....	75
3.3.5. Cu nas plantas.....	77
<b>3.4. Discussão</b> .....	79
3.4.1. Efeito dos tratamentos no rejeito.....	79
3.4.2. Efeito dos tratamentos nas plantas.....	79
3.4.3. Aplicações de fitorremediação.....	82
<b>3.5. Conclusão</b> .....	83
<b>Referências</b> .....	84

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O aumento na demanda por insumos minerais resultou no crescimento das atividades de mineração colocou o Brasil em posição de destaque pela detenção e produção mundial de bens minerais (DNPM, 2016). Cerca de 1,5% das reservas mundiais de cobre (Cu) (690 Mt de Cu contido) são brasileiras e o estado do Pará contém mais de 85% das reservas do país, com destaque para a Província Mineral de Carajás e adjacências (CRAVEIRO et al., 2019). As minas de Salobo e Sossego totalizam reservas de 1.491,40 Mt com 0,9% de Cu, enquanto os recursos dos demais depósitos cupríferos conhecidos na província (Igarapé Bahia–Alemão, Cristalino, Alvo 118, Furnas, Paulo Afonso, entre outros) superam 2.500 Mt com 0,7% de Cu (JULIANI et al., 2016).

A mina de Sossego, localizada no município de Canaã dos Carajás entrou em operação no ano de 2004, e é o segundo maior depósito de do Brasil e o primeiro de várias minas do tipo IOCG (óxido de ferro-cobre-ouro) nesta província a (MATLABA et al., 2017; SHIMIZU et al., 2012). A mina do Sossego apresenta produção estável de 140 mil t/ano de Cu concentrado, com previsão de vida útil até 2024 (JULIANI et al., 2016). A esta se soma as mais de 3 mil minas em atividade no país, as quais se incluem ainda algumas centenas de milhares de garimpos e pequenos empreendimentos informais e ilegais de minerais para uso imediato na construção, aleatoriamente localizados no território brasileiro (BERMANN, 2016), uma realidade presente também nas proximidades dessa região.

A mineração artesanal, comumente conhecida como garimpo, refere-se a prática de mineração que faz uso de tecnologia rudimentar por indivíduos, grupos ou comunidades, encontrada principalmente em países em desenvolvimento da América do Sul, Ásia e África (LOBO et al., 2016). Por se tratar de uma atividade muitas vezes exercida ilegalmente, poucas informações são obtidas a seu respeito. Há vários relatos sobre as atividades de mineração artesanal de ouro na Amazônia brasileira nos últimos 40 anos, incluindo os processos de extração, geração de resíduos e os impactos atribuídos a atividade (LOBO et al., 2017; CASTILHOS et al., 2015; BALZINO et al., 2015). Contudo, da mineração artesanal de Cu, e neste caso as desenvolvidas nas proximidades da mina do Sossego, ainda são pouco conhecidas.

A mineração é um importante setor da economia primária exportadora brasileira. Contudo, está entre as atividades antrópicas que mais causam impactos ambientais adversos, afetando muitas vezes de forma irreversível (BERMANN, 2016). Os impactos ambientais negativos da extração mineral (mineração e lavra garimpeira) estão associados às diversas fases de exploração dos bens minerais, desde a lavra até o transporte e beneficiamento do minério,

podendo estender-se após o fechamento da mina ou o encerramento das atividades, e tem como um dos seus grandes problemas a geração de resíduos (BERMANN, 2016).

Em consequência ao aumento das atividades de mineração, a geração de resíduos foi igualmente crescente e estes se diferenciam dos produzidos em outros setores por haver resíduos sólidos da extração (estéril) e do beneficiamento (rejeitos) (IBRAM, 2016). Segundo o relatório de diagnóstico dos resíduos sólidos da atividade de mineração de substâncias não energéticas do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - IPEA, entre os anos de 1996 e 2005, foram gerados mais de 53 milhões de toneladas de rejeitos da mineração de Cu e estima-se que aproximadamente 819 milhões de toneladas sejam gerados até o final de 2030 (SILVA et al., 2012). A disposição final e o gerenciamento desses materiais são temas cada vez mais importantes na sociedade devido as exigências por sustentabilidade ambiental da atividade (AZNAR-SÁNCHEZ et al., 2018).

Os resíduos de mineração, dependendo da sua composição, podem ser considerados perigosos e causar efeitos negativos no solo, nas águas subterrâneas e superficiais, na vegetação e até na fauna e na população local. Isto por, na maioria das vezes, ainda conterem altas concentrações de elementos potencialmente tóxicos (EPT) residuais, poluentes persistentes que podem se bioacumular em organismos e representar toxicidade significativa para os consumidores no topo das cadeias alimentares, se presentes em concentrações excessivas (LOOI et al., 2018). A mina de Cu Pedra Verde no nordeste do Brasil, por exemplo, cessou suas atividades em 1987, deixando várias toneladas de rochas residuais, e mesmo após 25 anos de abandono, a concentração total de Cu nos solos excedeu os valores de referência para a qualidade dos solos brasileiros em 185, 78 e 18 vezes nas áreas de processamento de minério, rocha residual e fronteira, respectivamente (PERLATTI et al., 2015). Mas além dos efeitos deletérios dos EPTs, os resíduos de mineração podem apresentar pH extremamente ácido, baixo fertilidade, baixo conteúdo de matéria orgânica, retenção mínima de água e substrato desestruturado, características que além de influenciar diretamente a biodisponibilidade dos elementos, tornam esses materiais inóspitos para a maioria das plantas e organismos (CHILESHE et al., 2019).

Os resíduos de mineração devem ser tratados e gerenciados estrategicamente para combinar eficiência econômica com demandas de sustentabilidade ambiental. Neste contexto que projetos de recuperação de áreas degradadas pela mineração são executados através de processos de revegetação, como a fitorremediação, tornando-se de grande importância a caracterização química, física e mineralógica dos materiais que serão utilizados como substrato

para o crescimento e desenvolvimento das plantas, a fim de identificar previamente as características benéficas ou aquelas adversas para essas plantas (SILVA et al., 2006).

A fitorremediação é uma forma biológica de remediar áreas poluídas, através do uso de meios metabólicos naturais como as plantas e microrganismos associados, para remover os poluentes ou reduzir a sua toxicidade (ALI et al., 2013). Recriar comunidades de plantas que refletem a diversidade e composição natural circundante as áreas de mineração devem ser o objetivo principal dos projetos de revegetação empregados na fitorremediação (PÁRRAGA-AGUADO et al., 2013). Espécies nativas que crescem em ambientes adversos, como os contaminados por EPTs, possuem capacidade de adaptação e rusticidade, o que pode apresentar alto potencial de uso para a fitorremediação (SILVA et al., 2015). Assim, identificar espécies de plantas que crescem naturalmente em áreas contaminadas por EPTs para serem testadas quanto ao seu potencial fitorremediador é um passo importante na revegetação de resíduos de mineração.

*Cenostigma tocantinum* Ducke é uma espécie arbórea pioneira pertencente à família Fabaceae que ocorre naturalmente em toda região amazônica podendo se desenvolver em locais adversos com bom crescimento (CRUZ, 2017; LIMA JÚNIOR, 2017). Características que tornam a *C. tocantinum* de interesse para a revegetação de ambientes contaminados por metais pesados como as áreas de mineração da região.

Recentemente, tem-se associado à utilização de plantas para remediar áreas contaminadas por EPTs, agentes imobilizadores que atuam na amenização da toxicidade, contribuindo para promover o estabelecimento da vegetação e aumentar a eficiência da fitorremediação (MARTINS et al., 2018). Materiais biossorbitivos alternativos como resíduos vegetais e agroindustriais vêm sendo empregados como adsorventes naturais para imobilização de íons metálicos no solo. Estes materiais vêm se tornando atraentes devido à abundância, facilidade de obtenção e custo reduzido (GONÇALVES JÚNIOR, 2013) e que na maioria das vezes quando dispostos em locais inadequados podem causar poluição. Por exemplo, na cidade de Belém – PA, aproximadamente 100.000 a 120.000 toneladas de frutos de açaí são processados anualmente para consumo doméstico e exportação, gerando 300 toneladas de resíduos orgânicos das sementes a cada dia (WYCOFF et al., 2015).

No caso de áreas degradadas, devido elevada contaminação, a integração de biotecnologias é recomendada para reforçar os efeitos dos tratamentos orgânicos e acelerar a recuperação dos solos e o crescimento da vegetação (SEVILLA-PEREA; MINGORANCE, 2015). A adubação orgânica é sugerida como promotor da atividade dos microrganismos no solo e na planta para favorecer a fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos inorgânicos,

degradação da matéria orgânica e estímulo no crescimento das plantas (HIEN et al., 2014). Além da interação na rizosfera, as plantas são internamente colonizadas pelos microrganismos endofíticos, principalmente fungos e bactérias, que através de vários mecanismos induzem resistência a estresses abióticos e promovem o crescimento das plantas (SEVILLA-PEREA; MINGORANCE, 2015). Logo, a associação destes microrganismos às plantas que crescem em áreas poluídas torna-se uma alternativa para a bioestabilização e fitorremediação de ambientes como os das áreas de mineração (BURGES et al., 2017). Estas técnicas tem se tornado cada vez mais aplicáveis em ambientes contaminados por EPTs como o Cu (JU et al., 2019) e podem ser adaptadas para o tratamento dos resíduos de mineração de Cu da região da Província Mineral de Carajás, bem como para recuperação das áreas alteradas em cenários futuros.

O primeiro capítulo intitulado “Impacto dos resíduos de mineração de cobre na Amazônia: propriedades e riscos ao meio ambiente e a saúde humana” tem como hipótese que os resíduos de mineração de Cu da região possuem características que oferecem risco de contaminação ambiental eminente e são desfavoráveis a revegetação. Por isso, o objetivo foi caracterizar química, física e mineralogicamente diferentes resíduos da mineração artesanal e industrial de Cu, bem como avaliar os riscos da deposição desses materiais no solo através de indicadores ambientais e a saúde humana.

No segundo capítulo, cujo título é “Bactéria e adubação orgânica como condicionantes para a fitorremediação com *Cenostigma tocaninum* em rejeito de mineração de cobre”, a hipótese é que a inoculação com bactéria isolada de planta crescida em área de mineração consorciada a adubação orgânica com composto de caroço de açaí promove o crescimento de planta nativa em rejeito de mineração de Cu, induzindo resistência aos estresses provocados por EPTs e aumentando a eficiência de fitorremediação. Assim, o objetivo foi avaliar o desenvolvimento de *Cenostigma tocaninum* sob inoculação bacteriana em rejeito de mineração Cu tratado com composto orgânico para fins de fitorremediação.

## REFERÊNCIAS

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M.A. Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, p. 869-881, 2013.

AZNAR-SÁNCHEZ, J.A. GARCÍA-GÓMEZ, J.J.; VELASCO-MUÑOZ, J.F.; CARRETERO-GÓMEZ, A. Mining waste and its sustainable management: advances in worldwide research. **Minerals**, v. 8, p.284, 2018.

BALZINO, M.; SECCATORE, J.; MARIN, T.; DE TOMI, G.; VEIGA, M.M. Gold losses and mercury recovery in artisanal gold mining on the Madeira River, Brazil. **Journal of Cleaner Production**, v. 102, p. 370-377, 2015.

BERMANN, C. Desafios sociais e ambientais da mineração no Brasil e a sustentabilidade. *In*: MELFI, A.J.; MISI, A.; CAMPOS, D.A.; CORDANI, U.G. Recursos Minerais no Brasil: problemas e desafios. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2016. p. 364-375

BURGES, A.; EPELDE, L.; BLANCO, F.; BECERRIL, J. M.; GARBISU, C. Ecosystem services and plant physiological status during endophyte-assisted phytoremediation of metal contaminated soil. **Science of the Total Environment**, v. 584–585, p. 329–338, 2017.

CASTILHOS, Z. et al. Human exposure and risk assessment associated with mercury contamination in artisanal gold mining áreas in the Brazilian Amazon. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 11255–11264, 2015.

CHILESHE, M.N.; SYAMPUNGANI, S.; FESTIN, E.S.; TIGABU, M.; DANESHVAR, A.; ODÉN, P.C. Physico-chemical characteristics and heavy metal concentrations of copper mine wastes in Zambia: implications for pollution risk and restoration. **Journal of Forestry Research**, p. 1-11, 2019.

CRAVEIRO, G.S.; XAVIER, R.P.; VILLAS, R.N.N. The Cristalino IOCG deposit: an example of multi stage events of hydrothermal alteration and copper mineralization. **Brazilian Journal of Geology**, v. 49, p. 1-18, 2019.

CRUZ, E.D. Germinação de sementes de espécies amazônicas: pau-preto (*Cenostigma tocaninum* Ducke). Comunicado técnico 290, EMBRAPA, 2017.

DNPM - Departamento Nacional de Produção Mineral. Sumário Mineral / Coordenadores Thiers Muniz Lima, Carlos Augusto Ramos Neves. Brasília: DNPM, 2016.

GONÇALVES JÚNIOR, A.C. Descontaminação e monitoramento de águas e solos na região amazônica utilizando materiais adsorventes alternativos, visando a remoção de metais pesados tóxicos e pesticidas. **Inclusão Social**, v.6, n.2, p.105-113, 2013.

HIEN, N.T.; TOAN, P.V.; CHOUDHURY, A.T.M.A.; ROSE, M.T.; ROUGHLEY, R.J.; KENNEDY, I.R. Field application strategies for the inoculant biofertilizer biogro supplementing fertilizer nitrogen application in rice production. **Journal of Plant Nutrition**, v. 37, p. 1837–1858, 2014.

JU, W.; LIU, L.; FANG, L.; CUI, Y.; DUAN, C.; WU, H. Impact of co-inoculation with plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on the biochemical responses of alfalfa-soil system in copper contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, p. 218–226, 2019.

JULIANI, C.; MONTEIRO, L.V.S.; FERNANDES, C.M.D. Potencial mineral: cobre. *In*: MELFI, A.J.; MISI, A.; CAMPOS, D.A.; CORDANI, U.G. Recursos Minerais no Brasil: problemas e desafios. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2016. p. 134-155

LIMA JUNIOR, M.J.V.; MENDES, A.M.S.; ARRUDA, Y.M.B.C. *Cenostigma tocantinum* Ducke Pau-pretinho. Nota Técnica 05, Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 2017.

LOBO, F.L.; COSTA, M.; MORAES NOVO, E.M.L.; TELMER, K. Distribution of artisanal and small-scale gold mining in the Tapajós River Basin (Brazilian Amazon) over the past 40 years and relationship with water siltation. **Remote Sensing**, v. 8, p.579, 2016.

LOBO, F.L.; COSTA, M.; MORAES NOVO, E.M.L.; TELMER, K. Effects of small-scale gold mining tailings on the underwater light field in the Tapajós River Basin, Brazilian Amazon. **Remote Sensing**, v. 9, p.861, 2017.

LOOI, L.J.; ARIS, A.Z.; YUSOFF, F.MD.; ISA, N.M.; HARIS, H. Application of enrichment factor, geoaccumulation index, and ecological risk index in assessing the elemental pollution status of surface sediments. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 41, p. 27-42, 2019.

MARTINS, G.C.; PENIDO, E.S.; ALVARENGA, I.F.S.; TEODORO, J.C.; BIANCHI, M.L.; GUILHERME, L.R.G. Amending potential of organic and industrial by-products applied to heavy metal-rich mining soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 162, p. 581-590, 2018.

MATLABA, V.J.; MOTA, J.A.; MANESCHY, M.C.; DOS SANTOS, J.F. Social perception at the onset of a mining development in Eastern Amazonia, Brazil. **Resources Policy**, v. 54, p. 157–166, 2017.

PÁRRAGA-AGUADO, I.; ÁLVAREZ-ROGEL, J.; GONZÁLEZ-ALCARAZ, M.N.; JIMÉNEZ-CÁRCELES, F.J.; CONESA, H.M. Assessment of metal(loid)s availability and their uptake by *Pinus halepensis* in a Mediterranean forest impacted by abandoned tailings. **Ecological Engineering**, v. 58, p. 84–90, 2013.

PERLATTI, F.; FERREIRA, T.O.; ROBERTO, F.A.C.; ROMERO, R.E.; SARTOR, L.R.; OTERO, X.L. Trace metal/metalloid concentrations in waste rock, soils and spontaneous plants in the surroundings of an abandoned mine in semi-arid NE-Brazil. **Environmental Earth Sciences**, v. 74, p. 5427–5441, 2015.

SEVILLA-PEREA, A.; MINGORANCE, M. D. Field approach mining-dump revegetation by application of sewage sludge co-compost and a commercial biofertilizer. **Journal of Environmental Management**, v. 158, p. 95-102, 2015.

SHIMIZU, V.K.; KAHN, H.; ANTONIASSI, J.L.; ULSEN, C. Copper ore type definition from Sossego Mine using X-ray diffraction and cluster analysis technique. **Revista Escola de Minas**, v. 65, p.561-566, 2012.

SILVA, G.P.; FONTES, M.P.F.; COSTA, L.M.; BARROS, N.F. Caracterização química, física e mineralógica de estéreis e rejeito da mineração de ferro da Mina de Alegria, Mariana-MG. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, p. 45-52, 2006.

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: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - IPEA, 2012. Disponível em : <http://repositorio.ipea.gov.br/handle/11058/7702>. Acesso em: 14 jan. 2020.



WYCOFF, W.; LUO, R.; SCHAUSS, A.G.; NEAL-KABABICK, J.; SABAA-SRUR, A.U.O.; MAIA, J.G.S.; TRAN, K.; RICHARDS, K.M.; SMITH, R.E. Chemical and nutritional analysis of seeds from purple and white açai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 181–187, 2015.

## **2. IMPACT OF COPPER MINING WASTES IN THE AMAZON: PROPERTIES AND RISKS TO ENVIRONMENT AND HUMAN HEALTH**

(Normas da revista Journal of Hazardous Materials)





## **IMPACT OF COPPER MINING WASTES IN THE AMAZON: PROPERTIES AND RISKS TO ENVIRONMENT AND HUMAN HEALTH**

### **ABSTRACT**

Improper disposal of copper (Cu) mining wastes can threaten the ecosystem and human health due to the high levels of potentially toxic elements released into the environment. The objective of this study was to determine the properties of Cu mining wastes generated in the eastern Amazon and their potential risks to environment and human health. Samples of forest soil and artisanal/industrial Cu mining wastes were collected and subjected to characterization of properties and pseudo-total concentrations of Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, and Zn, in addition to chemical fractionation of Cu. The pH ranged from near neutrality to alkaline. Pseudo-total concentrations of Cu were high in all wastes, mainly in the artisanal rock waste, with 19034 mg kg<sup>-1</sup>, of which 61% is concentrated in the most reactive fractions. Pollution indices indicated that the wastes are highly contaminated by Cu and moderately contaminated by Cr and Ni. However, only the artisanal rock waste is associated with environmental risk. Non-carcinogenic and carcinogenic human health risks were detected, especially from exposure to Cr in the artisanal rock waste. Prevention actions and monitoring of the artisanal mining area are necessary to avoid impacts to the local population.

**Keywords:** Carajás Mineral Province; artisanal mining; metal contamination; environmental pollution; risk assessment.

## GRAPHICAL ABSTRACT

Materials	pH	Organic carbon content	Environmental risk	Non-carcinogenic human health risk		Carcinogenic human health risk	
				Adults	Children	Adults	Children
Forest soil 	Medium acidity	High	Low	No risk	No risk	No risk	No risk
Artisanal overburden 	Weak acidity	Low	Low	No risk	No risk	Risk from Cr	Risk from Cr, Ni
Artisanal rock waste 	Weak acidity	Low	Considerable	Risk from Cr, Cu, Ni	Risk from Cr, Cu, Ni	Risk from Cr, Ni	Risk from Cr, Ni
Industrial tailing 	High alkalinity	Very low	Low	Risk from Cr	Risk from Cr	Risk from Cr	Risk from Cr, Ni

**Highlights**

- Properties of mining wastes favor copper retention
- Environmental risks are associated with artisanal mining
- Chromium may represent risk to the health of children and adults
- Artisanal copper mining generates more hazardous wastes than industrial mining

## 2.1. INTRODUCTION

Copper (Cu) is one of the most important metals for the world economy, since it is essential for the production of several consumer goods (Rzymiski et al., 2017). Currently, Brazil is among the largest Cu ore producers and may become the main exporter, since 85% of reserves are concentrated in iron-copper-gold oxide deposits in the Carajás Mineral Province, eastern Amazon - Brazil (Craveiro et al., 2019). This region contains industrial extraction plants such as the Sossego and Salobo mines, which annually produce 140 and 200 thousand tons of concentrated Cu, respectively (Juliani et al., 2016), in addition to several artisanal Cu mining areas, whose information is scarce.

Artisanal Cu mining is mainly carried out in Africa (Katz-Lavigne, 2019) and South America (Castro and Sánchez, 2003). In Brazil, this activity is recent and has less prominence when compared to industrial mining, which predominates in the country. Both forms of Cu mining cause significant environmental impacts, since they are mainly conducted in open-pit mines and produce large amounts of wastes. For each 1 ton of Cu produced, more than 150 tons of ore are required for excavation, crushing, flotation, and extraction using different methods that depend on the nature of the material (Rzymiski et al., 2017).

When wastes from extraction (sterile) and processing (tailing) of metallic ores are not properly managed, they can lead to serious environmental and human health risks due to the release of potentially toxic elements (PTEs) into the ecosystem (Chileshe et al., 2020; Forján et al., 2016; Jannesar Malakooti et al., 2014; Perlatti et al., 2015; Souza Neto et al., 2020). Such elements can be transferred to water, soil and plants (Kumar et al., 2021), are not biodegradable and can be accumulated in organisms (Sobihah et al., 2018), affecting human health through ingestion, inhalation, and dermal contact (Pereira et al., 2020). Because of these potential risks, human exposure to PTEs in mining areas has been widely assessed (Ma et al., 2020; Pereira et al., 2020; Souza et al., 2017; Souza Neto et al., 2020).

In addition to Cu, elements such as arsenic (As), cadmium (Cd), cobalt (Co), chromium (Cr), manganese (Mn), nickel (Ni), lead (Pb), and zinc (Zn) may occur in Cu mining wastes at levels that vary according to the geological material and the mining methods used for extraction (Chileshe et al., 2020; Karczewska et al., 2015). In wastes from the Pedra Verde mine, northeastern Brazil, high concentrations of Cu were associated with the occurrence of malachite, chalcopyrite, chalcocite, and pseudomalachite at different levels (Perlatti et al., 2015). In Africa, high concentrations of PTEs in wastes from Cu and gold (Au) mining areas were mainly related to the low efficiency of exploration processes, especially in artisanal mining, which generally adopts little technology (Chileshe et al., 2020; Darko et al., 2019).

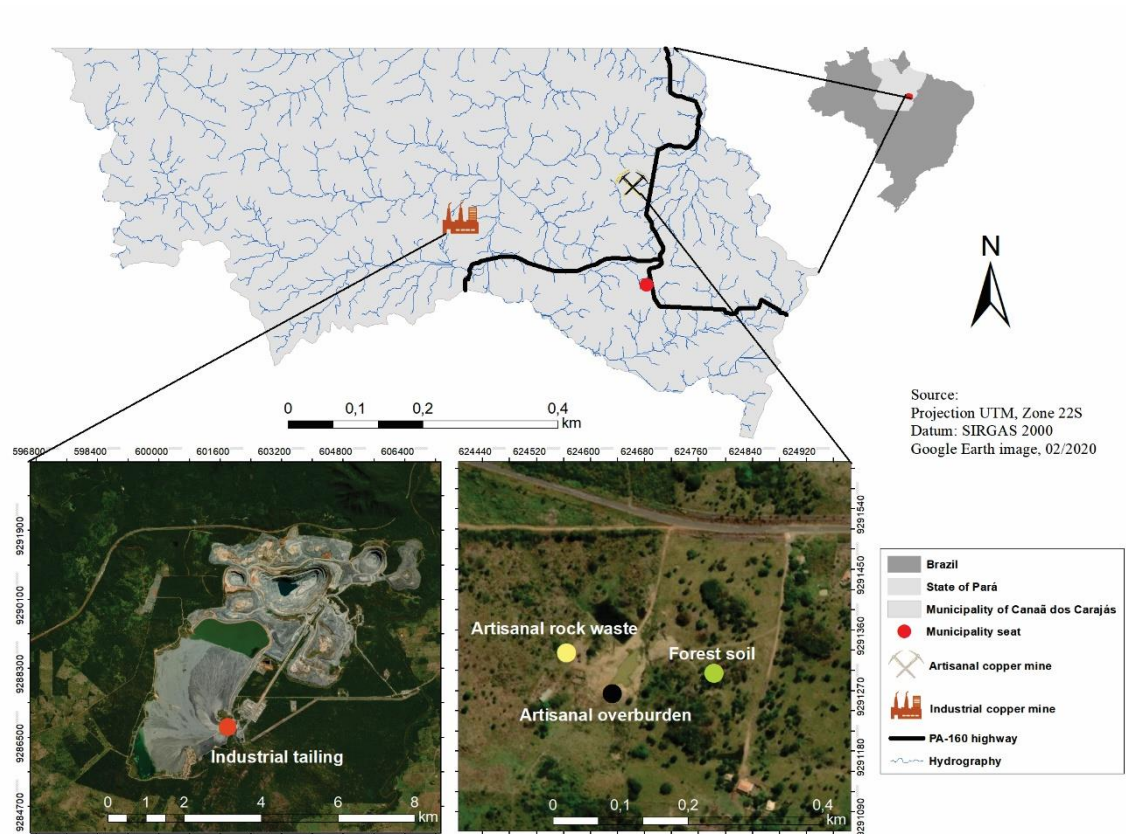
Several studies have assessed the properties and potential risks caused by mining wastes (Chileshe et al., 2020; Gitari et al., 2018; Jannesar Malakooti et al., 2014; Kowalska et al., 2016; Perlatti et al., 2015; Souza Neto et al., 2020). However, this information is unknown regarding Cu mining in Carajás Mineral Province, mainly in relation to the artisanal exploration areas. Knowledge about wastes produced by mining in this region is extremely important to support the development of recovery strategies for the mining-affected areas. Therefore, the objective of this study was to characterize the properties of wastes from artisanal and industrial Cu mining, as well as the concentrations of PTEs and potential environmental and human health risks caused by these elements.

## **2.2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.2.1. Study site**

The study was carried out in the municipality of Canaã dos Carajás (Fig. 1), southeast of the state of Pará, Eastern Amazon - Brazil. The predominant climate of this region is humid tropical, classified as Aw according to Köppen, with an average annual temperature of 27.2 °C (Alvares et al., 2013). The accumulated annual rainfall varies from 1800 to 2300 mm, with 80% concentrated in the rainiest season (November to May) (Silva Júnior et al., 2017).

**Fig. 1.** Location map of sampling points in the eastern Amazon - Brazil.



Tropical rainforest still constitutes the predominant phytophysiology in the region, associated with the occurrence of *cangas*, also known as ferriferous savannas (Mitre et al., 2018), which is a type of predominantly herbaceous-shrubby vegetation related to ferruginous rocks (Mota et al., 2018). The region is influenced by the Parauapebas, Vermelho, Itacaiúnas, Fresco and Xingu Rivers, and the local topography is characterized by hills associated with plateau areas (Teixeira and Lindenmayer, 2012).

The Carajás Mineral Province is located in the southeastern Amazonian Craton and is subdivided into two tectonic domains: Rio Maria (south) and Carajás Basin (north). The municipality of Canaã dos Carajás is located in the Transition Domain between the Rio Maria granite-greenstone terrain and the Carajás Basin, with several mafic, ultramafic and felsic rock formations (Lima et al., 2020). This region is intercepted by a shear zone that caused deformation and probably the circulation of fluids, modifying the rocks in the area (Mesquita and Feio, 2017).

The artisanal Cu mining area ( $06^{\circ}24.614'$  S and  $49^{\circ}52.346'$  W) has approximately  $12,584 \text{ m}^2$  and is located near the Planalto village, about 12 km from the municipality



headquarters (Fig. 1). Areas with possible occurrence of Cu have been identified in this region. However, the iron-copper-gold oxide deposit closest to artisanal mining is Bacuri, whose cupriferous mineral (chalcopyrite-CuFeS<sub>2</sub>/pyrite-FeS<sub>2</sub>/magnetite-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) is widespread and related to veins and gaps (Melo et al., 2014). In this area, artisanal mining was illegally carried out between 2015 and 2018. Currently, the mine is deactivated and abandoned. The exploration processes involved: i) disassembly by explosives and excavation using manual backhoe, which generated an overburden without economic value, and ii) fragmentation and grinding by means of a crusher, producing a material composed of finer particles stored in piles.

The industrial Cu mining area (06°27.109' S and 50°04.758' W), whose main mineral extracted is chalcopyrite, is located about 37 km from the municipal headquarters. In this area, mineralization of Cu is composed of the Pista, Sequeirinho, Baiano, Sossego and Curral deposits, of which Sequeirinho and Sossego are the most important (Shimizu et al., 2012). Sodium and calcium-sodium changes are well developed in Sequeirinho and are not expressive or almost absent in Sossego, where potassic, chloritic and hydrolytic changes predominate (Monteiro et al., 2008). In operation since 2004, the industrial mine employs methods that include fragmentation, grinding, classification and concentration of sulfide Cu. After extraction and primary crushing near the mineralized body, the ore is transported to the processing plant, where it is subjected to grinding and flotation processes. Flotation occurs in three stages: rougher, scavenger and cleaner, of which the rougher stage generates 95% of the final industrial tailing deposited in the dam, which has a current capacity of 154 million m<sup>3</sup> (Bergerman, 2009).

### **2.2.2. Sampling of soils and mining wastes**

The sampled materials were identified as: i) forest soil, collected in area of remaining tree vegetation near the artisanal Cu mining area, considered as a reference material, ii) artisanal overburden, consisting of sterile material resulting from the stripping of the area, collected from the top of the artisanal mining pit, iii) artisanal rock waste, collected from piles deposited on the banks of the lagoons formed after excavation, and iv) industrial tailing, collected from an industrial exploration tailings dam, resulting from the flotation of Cu ore.

Sampling was carried out using a Dutch stainless-steel auger to avoid contamination. For each composite sample, five subsamples (about 0.5 kg each) were collected at a depth of 0.0-0.2 m, totaling about 2.5 kg of material per sample. Composite samples were homogenized and stored in polyethylene bags for mineralogical, chemical, and granulometric analyzes.

### **2.2.3. Mineralogical, chemical, and granulometric characterization**

The mineralogical characterization of the soil samples (0.15 mm fine fraction) was performed by PANalytical X'PERT PRO MPD (PW 3040/60) diffractometer powder method, with goniometer PW3050/60 ( $\theta/\theta$ ), ceramic-ray tubes with Cu ( $K\alpha_1 = 1.540598 \text{ \AA}$ ), model PW3373/00, long fine focus (2200 W - 60 kV),  $K\beta$  nickel filter. The instrumental scanning conditions were:  $4^\circ$  to  $70^\circ 2\theta$ , step size  $0.02^\circ 2\theta$  and time/step of 10 s, divergent and automatic slit and anti-spreading of  $4^\circ$ ; 10-mm mask; sample in circular motion with frequency of 1 rotation/s for all samples. The materials were identified using X-ray diffraction (XRD).

The sample pH was measured at a soil-water ratio of 1:2.5. Exchangeable contents of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) and magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) were extracted with KCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$  and quantified by complexometry with EDTA  $0.0125 \text{ mol L}^{-1}$ . Potential acidity (H+Al) was released by reaction with a non-buffering KCl solution and determined by titration with NaOH in the presence of phenolphthalein. Phosphorus (P), potassium ( $\text{K}^+$ ), and sodium ( $\text{Na}^+$ ) were extracted with Mehlich 1 solution ( $0.05 \text{ HCl mol L}^{-1} + \text{H}_2\text{SO}_4 0.0125 \text{ mol L}^{-1}$ ) and quantified by visible ultraviolet spectrophotometry (P) and flame photometry ( $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$ ) (Teixeira et al., 2017). The cation exchange capacity (CEC) was found through the sum of the concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  and H+Al. Carbon was determined as described by Hussain et al. (2019), with quantification of organic carbon (OC) by loss of ignition at  $450^\circ \text{C}$  and inorganic carbon (IC) by loss of ignition at  $950^\circ \text{C}$ . The particle size was determined using the pipette method, with  $0.1 \text{ mol NaOH}$  solution as a chemical dispersant under high-speed mechanical stirring for 10 min. The clay fraction was separated by sedimentation, the sand by sieving and silt was calculated by the difference (Gee and Bauder, 1986).

#### **2.2.4. Quantification of PTE concentrations**

Pseudo-total concentrations of Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, and Zn were extracted by acid digestion (HCl:  $\text{HNO}_3$  3:1) in a microwave oven (McGrath and Cunliffe, 1985). Chemical fractionation of Cu was carried out using the sequential extraction proposed by the Bureau Community of Reference (BCR), in which four fractions are considered: exchangeable, soluble in water or linked to carbonates (F1), reducible or bound to oxides (F2), oxidable or associated with organic matter and sulfides (F3), and residual (F4), which represents the fraction associated with the crystalline structures of minerals (Pereira et al., 2020). In addition, a  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$  DTPA solution (pH 7.3) was used to study the bioavailability of Cu (Teixeira et al., 2017). Quantification of PTEs was performed in triplicate, using Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS, Perkin Elmer). The analytical

quality (for pseudo-total concentrations) was assessed using a certified reference material (ERM® CC-141), with recovery rates varying from 86 to 90%.

Based on the concentrations found in the chemical fractionation of Cu, it was possible to study the mobility of the element using the mobility factor (Gitari et al., 2018), according to equation 1:

$$\text{Mobility factor} = \frac{F_1}{F_1+F_2+F_3+F_4} \times 100 \quad (1)$$

Where F1, F2, F3 and F4 represent the concentrations of Cu in exchangeable, reducible, oxidable and residual fractions, respectively. High values of MF indicate a high mobility and, consequently, greater bioavailability (Gope et al., 2017).

### 2.2.5. Pollution indices

The enrichment factor (EF) and the contamination factor (CF) were calculated to assess the pollution levels based on the geochemical background values of the elements (Kowalska et al., 2018). The forest area was considered as a reference due to the higher concentration associated with lithogenic origin. The EF was found according to equation 2:

$$EF = \left( \frac{C_{PTE}}{C_{Fe}} \right) / \left( \frac{B_{PTE}}{B_{Fe}} \right) \quad (2)$$

Where  $C_{PTE}$  is the concentration of PTE in the sample,  $C_{Fe}$  is the concentration of iron in the same sample,  $B_{PTE}$  is the concentration of PTE in the reference area and  $B_{Fe}$  is the concentration of iron in the reference area. Iron was used for geochemical normalization because of its conservative geochemical behavior (Bhuiyan et al., 2010). The EF results were classified following the intervals proposed by Looi et al. (2019) (Table 1S).

The CF was used to estimate the individual contamination of each PTE, calculated according to Hakanson (1980), following equation 3:

$$CF_{PTE} = \frac{C_{PTE}}{B_{PTE}} \quad (3)$$

Where  $C_{PTE}$  is the concentration of PTE in the sample and  $B_{PTE}$  is the concentration of PTE in the reference area (natural forest). The CF results were interpreted according to Hakanson (1980) (Table 1S).

#### 2.2.6. Assessment of environmental and human health risks

Environmental risk was assessed by the potential ecological risk factors (PERF) and the potential ecological risk index (PERI). PERF reflects the single impact of each PTE on the environment concerning biological toxicology and ecology (Salomão et al., 2019), calculated according to equation 4:

$$PERF_{PTE} = CF_{PTE} \times TR_{PTE} \quad (4)$$

Where  $CF_{PTE}$  is the contamination factor of the PTE, and TR is the toxic-response factor of the respective PTE (As = 10, Ba = Cr = 2, Cd = 30, Co = Cu = Ni = Pb = 5, Mo = Mn = Zn = 1) (Hakanson, 1980; Shangguan et al., 2015; Yang et al., 2015; Ngole-Jeme and Fantke, 2017). The results were classified according to Hakanson (1980) (Table 2S).

PERI is an index that considers the potential joint impact of PTEs on ecosystems (Pereira et al., 2020). This index has been used in several studies to estimate the ecological risk in soils and mining wastes (Kowalska et al., 2018; Lin et al., 2019; Souza Neto et al., 2020; Tapia-Gatica et al., 2020; Xiao et al., 2019), calculated following equation 5:

$$PERI = \sum PERF_{PTE} \quad (5)$$

Where  $\sum PERF_{PTE}$  is the sum of all PERF values found for the different PTEs studied. The results were interpreted according to Hakanson (1980) (Table 2S).

The assessment of the potential non-carcinogenic risk was based on the average daily dose (ADD) considering three routes: ingestion ( $ADD_{ing}$ ), inhalation ( $ADD_{inh}$ ) and dermal contact ( $ADD_{der}$ ), which allowed the estimation of the risk quotient (HQ) and hazard index (HI) for adults and children (USEPA, 2001). The HI was calculated according to Souza et al. (2017). For the potential carcinogenic risk, calculated only for elements with carcinogenic potential reported in the literature, ADD was multiplied by the corresponding slope factor (SF) to produce a level of cancer risk (Lu et al., 2014), using equations 6-12:

$$ADD_{ing} = C \times \frac{ingR \times EF \times ED}{BW \times AT} \times CF \quad (6)$$

$$ADD_{inh} = C \times \frac{inhR \times EF \times ED}{PEF \times BW \times AT} \quad (7)$$

$$ADD_{der} = C \times \frac{SL \times SA \times ABS \times EF \times ED}{BW \times AT} \times CF \quad (8)$$

$$HQ_{ing} = ADD_{ing}/Rfd \quad (9)$$

$$HQ_{inh} = ADD_{inh}/Rfd \quad (10)$$

$$HQ_{der} = ADD_{der}/Rfd \quad (11)$$

$$HI = \sum HQ_i \quad (12)$$

Where ADD = average daily dose (mg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>); C = concentration of PTE (mg kg<sup>-1</sup>); ingR = soil intake rate, 100 mg d<sup>-1</sup> for adults and 200 mg d<sup>-1</sup> for children (USEPA, 2001); inhR = inhalation rate, 7.6 m<sup>3</sup> day<sup>-1</sup> for children and 20 m<sup>3</sup> day<sup>-1</sup> for adults (Lu et al., 2014; USEPA, 2001); PEF = particle emission factor, 1.36 x 10<sup>9</sup> m<sup>3</sup> kg<sup>-1</sup> (USEPA, 2001); SL = skin adherence factor, 0.2 cm<sup>2</sup> day<sup>-1</sup> for children and 0.875 cm<sup>2</sup> day<sup>-1</sup> for adults (USEPA, 2001); SA = exposed skin area, 732 cm<sup>2</sup> for children and 3202 cm<sup>2</sup> for adults (USEPA, 2001); ABS = dermal absorption factor, 0.03 (Lu et al., 2014); EF = frequency of exposure, 279 d y<sup>-1</sup> (Moreira et al., 2018); ED = duration of exposure, 24 hours for adults and 4 hours for children (Moreira et al., 2018); BW = body weight, 70 kg for adults and 16 kg for children (Moreira et al., 2018); TA = average time without carcinogenic effects (ED x 365 d); CF = conversion factor = 10<sup>-6</sup> kg mg<sup>-1</sup> (USEPA, 2001); Rfd = reference dose (USEPA, 2001); and SF = slope factor (Lu et al., 2014) (Table 3S).

### 2.2.7. Statistical analyzes

Descriptive statistical analysis was performed for the chemical and granulometric properties, concentrations of PTEs, pollution and ecological risk indices. The Shapiro-Wilk normality test was performed and data that did not follow a normal distribution were log transformed for adequacy. A principal component analysis (PCA) was used to assess the

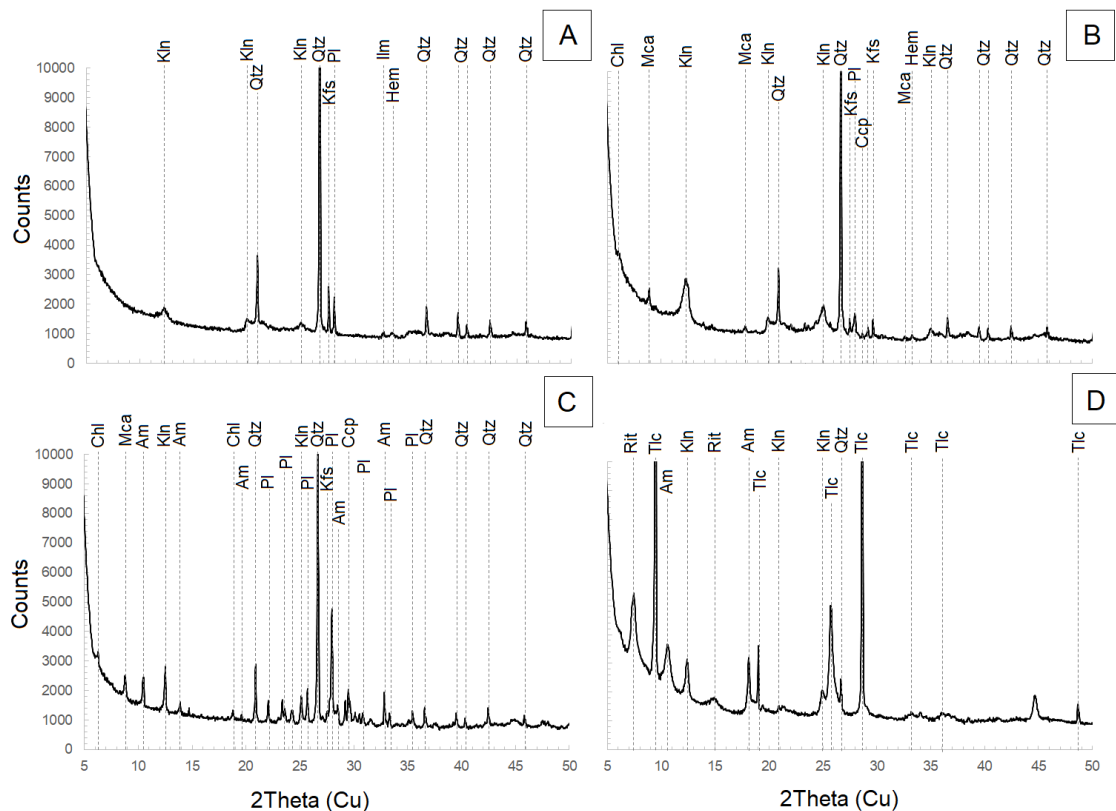
relationship between the pseudo-total concentration of PTEs and the properties of the materials assessed. The descriptive statistical analysis was carried out using R (version 3.4.3) (R Core Team, 2017) and the PCA using the Canoco 5.0 program.

## 2.3. RESULTS AND DISCUSSION

### 2.3.1. Sample characterization

The samples showed a high mineralogical variation (Fig. 2), with quartz as the main primary mineral found in all samples. The forest soil is composed of potassium feldspar, plagioclase, ilmenite, and the secondary minerals kaolinite and hematite (Fig. 2A). Amazon soils are highly weathered and have a predominance of kaolinite and Fe and Al oxides (Souza et al., 2018). The occurrence of primary minerals in the forest soil, even under the strong weathering conditions of the Amazon, is related to the geological formation that includes mafic, ultramafic and felsic rocks, which have shear zones with intense hydrothermal alterations (Craveiro et al., 2012).

**Fig. 2.** X-ray diffractograms of samples from forest soil (A), artisanal overburden (B), industrial tailing (C), and artisanal rock waste (D) collected in the eastern Amazon - Brazil.



Qtz - Quartz, Hem - Hematite, Mca - Mica, Kln - Kaolinite, Kfs - K-Feldspar, Pl - Plagioclase, Chl - Chlorite, Am - Amphibole, Ilm - Ilmenite, Ccp - Chalcopyrite, Rit - Richterite, Tlc - Talc.

A variety of gangue minerals was evidenced in the samples of artisanal overburden and industrial tailing. In the artisanal overburden, there is occurrence of quartz, chlorite, mica, potassium feldspar and plagioclase, in addition to kaolinite and hematite. Kaolinite, hematite, and chlorite are typical of the clay fraction (Souza et al., 2018). The occurrence of such minerals is related to the mixture of soils from surface layers in these wastes. Besides gangue minerals, the industrial tailing is characterized by the occurrence of amphibole. Similar results were reported by Smuda et al. (2014) in Chile and Khorasanipour et al. (2011) in Iran, both in Cu mining areas.

In artisanal overburden (Fig. 2B) and industrial tailing (Fig. 2C), mica may be occurring in the most common forms (muscovite and biotite) because of the influence of hydrolytic and potassium alterations (Shimizu et al., 2012). The occurrence of chlorite in these wastes is associated with the greatest chloritic change in the local deposits, especially in the Sossego region (Shimizu et al., 2012). The sulfide mineral found in both artisanal overburden and industrial tailing was chalcopyrite (Fig. 2B, C), which is the main Cu mineral species in the region, occurring as microcrystals included in the gangue minerals and larger crystals (Shimizu et al., 2012).

Samples of artisanal rock waste and industrial tailing contain amphibole, whose predominant forms are actinolite and hastingsite (Craveiro et al., 2012). The artisanal rock waste is composed of talc and may be distinguished from the other wastes by the occurrence of richterite (Fig. 2D). Talc was one of the main phyllosilicates in the mineral composition of Cu mining tailings derived from the transformation of mafic minerals in the region of Vigozano, Italy (Dinelli and Tateo, 2001). Due to its secondary origin, talc occurs in association with octahedral impurities in which Mg is replaced through isomorphic substitution by other metal ions such as Cu, Fe, Cr, Ni, among others (Pontes and Almeida, 2008), which may have influenced the occurrence and levels of these elements in the artisanal rock waste. However, in the artisanal rock waste, it was not possible to observe mineral phases directly associated with Cu, which may be related to the probable predominance of Cu accessory minerals, whose presence may not have been detected due to levels lower than the detection limit.

The forest soil has moderate acidity (Table 1), with pH (4.5 - 5.5) above the average value found for most soils in the state of Pará (Birani et al., 2015; Souza et al., 2018). Among the Cu mining wastes, the artisanal overburden and the artisanal rock waste have a pH close to

neutrality (6.2 and 6.6, respectively). Similar results were reported by Perlatti et al. (2015) in Cu mining area in the Brazilian semiarid. The alkaline pH of the industrial tailing was similar to that found by Chileshe et al. (2020) in Cu exploration tailing, due to the addition of lime to control acidity of the effluent before deposition into the dam.

**Table 1.** Chemical properties and granulometry of forest soil and copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.

Material		pH	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	H+Al	Na <sup>+</sup>	CEC <sup>a</sup>	P	K <sup>+</sup>	OC <sup>b</sup>	IC <sup>c</sup>	Sand	Silt	Clay
		-	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>				mg kg <sup>-1</sup>			g kg <sup>-1</sup>		%		
Forest soil	Mean	5.41	7.53	1.43	3.24	0.03	12.31	1.51	32.60	24.05	7.82	51.46	8.54	40.00
	Median	5.39	7.44	1.41	3.33	0.03	12.28	1.53	31.51	24.05	7.82	51.60	8.40	40.00
	Min.	5.20	6.75	1.21	2.20	0.03	12.05	1.40	23.30	22.80	6.74	50.00	7.50	40.00
	Max.	5.70	8.59	1.73	4.00	0.03	12.66	1.60	45.20	25.10	9.08	52.50	10.00	40.00
	SD <sup>d</sup>	0.20	0.68	0.19	0.67	0.00	0.23	0.07	8.12	0.89	1.04	9.29	9.29	0.00
Artisanal overburden	Mean	6.20	3.94	1.51	1.40	0.10	7.04	0.30	33.73	9.88	9.19	60.80	8.32	30.82
	Median	6.20	3.94	1.51	1.40	0.10	7.04	0.30	33.73	9.89	9.19	60.80	8.30	30.80
	Min.	5.70	3.06	1.01	1.20	0.06	5.79	0.10	25.70	8.40	8.56	55.00	7.50	22.50
	Max.	6.70	4.55	2.01	1.60	0.13	8.19	0.50	40.10	11.30	10.41	67.50	10.00	37.50
	SD	0.35	0.55	0.35	0.14	0.03	0.85	0.14	5.19	1.15	0.75	44.45	10.21	54.01
Artisanal rock waste	Mean	6.64	0.25	9.89	1.14	0.17	12.72	0.50	493.88	9.90	12.29	60.50	19.50	20.00
	Median	6.41	0.17	10.26	1.00	0.18	12.82	0.60	496.61	9.90	12.29	60.00	20.00	20.00
	Min.	5.80	0.10	9.02	0.70	0.17	12.46	0.10	464.90	9.40	12.07	60.00	17.50	20.00
	Max.	7.60	0.47	10.28	2.00	0.19	12.88	1.10	512.00	10.30	12.56	62.50	20.00	20.00
	SD	0.68	0.15	0.56	0.49	0.01	0.19	0.42	17.41	0.43	0.18	11.18	11.18	0.00
Industrial tailing	Mean	8.04	2.05	0.05	0.64	0.56	3.83	704.62	207.74	0.19	19.87	85.00	2.50	12.50
	Median	8.30	2.02	0.04	0.60	0.61	3.87	925.00	193.81	0.19	19.87	85.00	2.50	12.50
	Min.	7.30	1.75	0.04	0.60	0.15	3.51	8.30	185.20	0.01	3.92	82.50	2.50	10.00
	Max.	8.40	2.42	0.09	0.70	0.73	4.05	964.50	267.30	0.41	38.59	87.50	2.50	12.50
	SD	0.46	0.24	0.02	0.05	0.24	0.19	402.97	33.64	0.16	15.85	25.0	0.004	25.0

<sup>a</sup>Cation exchange capacity.

<sup>b</sup>Organic carbon.

<sup>c</sup>Inorganic carbon.

<sup>d</sup>Standard deviation.

The predominance of basic rocks may have contributed to the formation of soils with a higher pH than that usually found in other locations in the state (Craveiro et al., 2019; Souza et al., 2018). In mining wastes, the increase in pH is commonly associated with the occurrence of carbonates, phosphates and hydroxides, which have a high neutralization capacity (Ceniceros-Gómez et al., 2018). In the absence of these minerals, pH neutralization in tailings is related to



the buffering character of the chlorite dissolution (Moon et al., 2013). The pH is one of the properties that most affects the availability, persistence and mobility of PTEs in mining areas (Darko et al., 2019; Perlatti et al., 2015). Low pH values are common in Cu mining wastes rich in sulfide minerals, which release PTEs under oxidizing conditions (Forján et al., 2016). On the other hand, under neutral to alkaline pH, as found in this study, PTE immobilization and nutrient retention are favored (Chileshe et al., 2020).

In the forest soil, concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  were higher than those found in previous studies (Lima et al., 2020; Souza et al., 2018). In the artisanal rock waste,  $\text{Ca}^{2+}$  is in very low concentration, while  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  are at high levels (Venegas et al., 1999) and correspond to the highest values among the materials studied. High levels of  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  in the artisanal rock waste are associated with the occurrence of amphibole (Fig. 2D), while the concentration of  $\text{K}^+$  in the industrial tailing, which was also high, may be due to the occurrence of potassium feldspars and micas (Fig. 2C).

The available P in the industrial tailing is at levels up to 466 times higher than in the forest soil and 1,400 times higher than in the artisanal wastes. In most soils from the state of Pará, the available P is very low (less than  $6.6 \text{ mg kg}^{-1}$ ) due to the scarcity of this element in the parent material and pedogenetic processes (Souza et al., 2018). Moreover, most of P is retained in biomass or adsorbed (Guedes et al., 2018). In Cu mining wastes from the Brazilian semiarid, the highest levels of P were related to the occurrence of pseudomalachite (Perlatti et al., 2015). However, in the industrial tailing studied, the high concentration of P may be related to the application of sodium dithiophosphate without dilution during flotation (Bergerman, 2009). This reagent may also have increased the concentration of Na, which was higher in relation to the other wastes.

In the forest soil, the high CEC (Table 1) is due to the OC content ( $24 \text{ g kg}^{-1}$ ) and the occurrence of feldspar and plagioclase. In soils from tropical regions, negative charges are almost exclusively derived from organic matter, which is due to the predominance of low activity secondary minerals in the clay fraction (Fernandes et al., 2018). The accumulation of OC in the forest soil was favored by the high clay content (40%), which reduces the rate of microbial decomposition (Souza et al., 2018), in addition to the vegetation cover that reduces losses (Pereira et al., 2020).

The higher CEC in the artisanal mining wastes, especially in the artisanal rock waste, is associated with the relatively high OC content when compared to the industrial tailing (Kumar et al., 2021). On the other hand, the extremely low OC level and the high sand content in the industrial tailing contributed to a lesser amount of potential exchange sites, resulting in lower

CEC (Table 1). Practices such as the removal of vegetation cover and washing of wastes significantly reduce the organic matter content and accelerate decomposition (Pereira et al., 2020; Teixeira et al., 2019).

The industrial tailing and the artisanal rock waste, which have characteristics more similar to parent material, showed higher contents of IC than those found in forest soil and artisanal overburden. IC is the main form of carbon in the industrial tailing, with an average of  $20 \text{ g kg}^{-1}$ , which can be explained by the addition of limestone to control acidity. Considering that IC is strongly related to geological characteristics, changes in the contents of this property between the studied materials are associated with the linear increase with depth (Hussain et al., 2019).

Coarser particle sizes found in basins of Cu mining tailings indicate environments with sedimentation and high flow power (Andersson et al., 2018), such as the tailing collected in the industrial mining dam, that showed a high sand content. Similarly, a greater amount of quartz than carbonates in the parent material results in coarser tailings (Andersson et al., 2018). On the other hand, the higher silt content in the artisanal rock waste in relation to the other wastes is due to the occurrence of talc (Fig. 2D), which favors grinding and generates finer particles. High silt levels in mining wastes contribute to compaction, crusting and erosion, restricting the revegetation (Andersson et al., 2018; Chileshe et al., 2020).

### **2.3.2. Pseudo-total concentrations of PTEs**

Pseudo-total concentrations of PTEs in forest soil and Cu mining wastes indicate high chemical heterogeneity, even in materials from the same area, such as the artisanal wastes (Table 2). This variation is due to the highly varied mineralogical composition (Fig. 2) and different degrees of weathering, depths of occurrence and extraction processes, resulting in mining wastes with different concentrations of residual PTEs (Chileshe et al., 2020; Perlatti et al., 2015; Souza Neto et al., 2020).

**Table 2.** Pseudototal concentration of potentially toxic elements in forest soil and copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.

Element	Forest soil	Artisanal overburden	Artisanal rock waste	Industrial tailing	PV <sup>a</sup>	QRV <sup>b</sup>
Al (g kg <sup>-1</sup> )	22.4 ± 0.9	22.8 ± 3.2	40.3 ± 1.4	13.9 ± 1.5	-	-
Fe (g kg <sup>-1</sup> )	44.3 ± 0.4	26.3 ± 2.6	84.9 ± 3.3	71.4 ± 29.9	-	-
As (mg kg <sup>-1</sup> )	1.1 ± 0.2	0.8 ± 0.3	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.1	15.0	1.4
Ba (mg kg <sup>-1</sup> )	140.0 ± 0.0	120.0 ± 10.9	145.0 ± 7.7	47.5 ± 3.9	150.0	14.3
Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	0.05 ± 0.0	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.0	1.3	0.4
Co (mg kg <sup>-1</sup> )	54.7 ± 0.7	24.9 ± 1.9	62.6 ± 1.1	26.3 ± 6.4	25.0	-
Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	80.5 ± 0.3	13.0 ± 1.1	1407.5 ± 59.1	46.2 ± 2.9	75.0	24.1
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	451.0 ± 166.8	2113.3 ± 63.3	19033.9 ± 2716.0	1486.5 ± 1112.8	60.0	9.9
Hg (mg kg <sup>-1</sup> )	0.05 ± 0.0	0.02 ± 0.0	0.01 ± 0.0	0.01 ± 0.0	0.5	0.3
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	1100.0 ± 0.0	212.0 ± 19.4	47.2 ± 3.0	180.2 ± 57.8	-	72.0
Mo (mg kg <sup>-1</sup> )	0.5 ± 0.03	0.8 ± 0.08	2.9 ± 0.02	14.3 ± 2.4	30.0	0.1
Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	32.1 ± 2.5	29.1 ± 1.0	492.0 ± 16.0	156.9 ± 52.1	30.0	1.4
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	17.9 ± 0.7	16.8 ± 1.5	4.3 ± 0.1	14.2 ± 5.3	72.0	4.8
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	35.0 ± 1.4	25.0 ± 2.2	5.5 ± 1.0	16.2 ± 1.2	300.0	7.2

<sup>a</sup>Prevention value (PV) for Brazilian soils (CONAMA, 2009).

<sup>b</sup>Quality reference value (QRV) for soils from the state of Pará (Fernandes et al., 2018).

The forest soil presented pseudo-total concentrations of Ba, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb and Zn above the quality reference values (QRVs) for soils in the state of Pará (Fernandes et al., 2018). However, only Co, Cr, Ni and Cu exceeded the prevention value (PV), which may suggest anthropic contamination according to the Brazilian National Environment Council (CONAMA, 2009). These results are in accordance with those found by Lima et al. (2020) in soils from the southeastern Carajás Mineral Province, where the high concentrations of PTEs were related to the strong influence of the parent material. Regions with high mineral potential have soils with high metal concentrations, especially sulfide Cu ores, which are polymetallic (Karczewska et al., 2015).

In the forest soil, the concentration of Cu corresponds to 451 mg kg<sup>-1</sup>, which exceeds the PV by 700% (CONAMA, 2009). In forest soils from the Carajás Mineral Province, the pseudo-total concentration of Cu reached 408 mg kg<sup>-1</sup> (Lima et al., 2020). Soils from the Serra Pelada mine showed pseudo-total Cu concentrations ranging from 129 to 468 mg kg<sup>-1</sup> (Pereira et al., 2020), indicating that high concentrations of this element are common in soils with high mineral richness. A high concentration of Mn (1100 mg kg<sup>-1</sup>) was found in the forest soil, a value within the typical variation of the element in soils, which is between 200 and 3000 mg kg<sup>-1</sup> (Pais and Jones, 1997). In soils of the region studied, the high concentrations of Mn are

mainly due to the expressive occurrence of Mn oxides in the Carajás Formation (Schaefer et al., 2016). The local geological formation also favored the high concentrations of Al and Fe, both in forest soil and mining wastes, resulting from changes in the pre-Cambrian basic rocks of the Grão Pará Group (Lima et al., 2020).

In the Cu mining wastes studied, the pseudo-total concentrations of most PTEs are below the PV (CONAMA, 2009), with the exception of Cu in the artisanal overburden, Cu, Cr and Ni in the artisanal rock waste, and Cu and Ni in the industrial tailing. Therefore, the pseudo-total concentrations of PTEs in the artisanal overburden followed the order  $\text{Cu} > \text{Mn} > \text{Ba} > \text{Ni} > \text{Zn} > \text{Co} > \text{Pb} > \text{Cr} > \text{As} > \text{Mo} > \text{Cd} > \text{Hg}$ , while the artisanal rock waste followed the sequence  $\text{Cu} > \text{Cr} > \text{Ni} > \text{Ba} > \text{Co} > \text{Mn} > \text{Zn} > \text{Pb} > \text{Mo} > \text{As} > \text{Cd} > \text{Hg}$ . Although these two wastes are from the same mining area and have high levels of Cu, the artisanal overburden has a lower concentration ( $2113 \text{ mg kg}^{-1}$ ) than that observed in the artisanal rock waste ( $19034 \text{ mg kg}^{-1}$ ), which may be explained by the mixture of soil and surface material with less mineral potential, whose prolonged exposure to weathering may have contributed to greater solubilization and leaching of PTEs. The lack of mineral processing in the artisanal mine produced the artisanal rock waste, which is more recent and composed of crushed rock material with high concentrations of PTEs, especially Cu, Cr and Ni.

Uncommon values of PTEs, mainly Cu, Cr and Ni, which are strongly associated in the Carajás Basin, are related to local lithology (Sahoo et al., 2020). Cr and Ni had a strong correlation and exceptionally high levels, related to mafic-ultramafic complexes, with accumulation resulting from supergenic alteration (Salomão et al., 2019). The levels of Cu differ from the other elements, since it is enriched in areas of intense hydrothermal alteration and concentrated in sulfide minerals such as chalcopyrite and pyrite, that are the most abundant mineral species (Sahoo et al., 2020).

In the industrial tailing, the concentration of Cu ( $1486 \text{ mg kg}^{-1}$ ) is also higher than those found for the other PTEs, following the sequence:  $\text{Cu} > \text{Mn} > \text{Ni} > \text{Ba} > \text{Cr} > \text{Co} > \text{Zn} > \text{Mo} > \text{Pb} > \text{As} > \text{Cd} > \text{Hg}$  (Table 2), even with the highly efficient processing that recovers 90% of the metal from the sulfide ore (Bergerman, 2009). In Zambia, Chileshe et al. (2020) attributed the high concentration of Cu ( $12237 \text{ mg kg}^{-1}$ ) in mining tailings to the mineralogy and the low processing efficiency, which extracted up to 40% of metal from the ore.

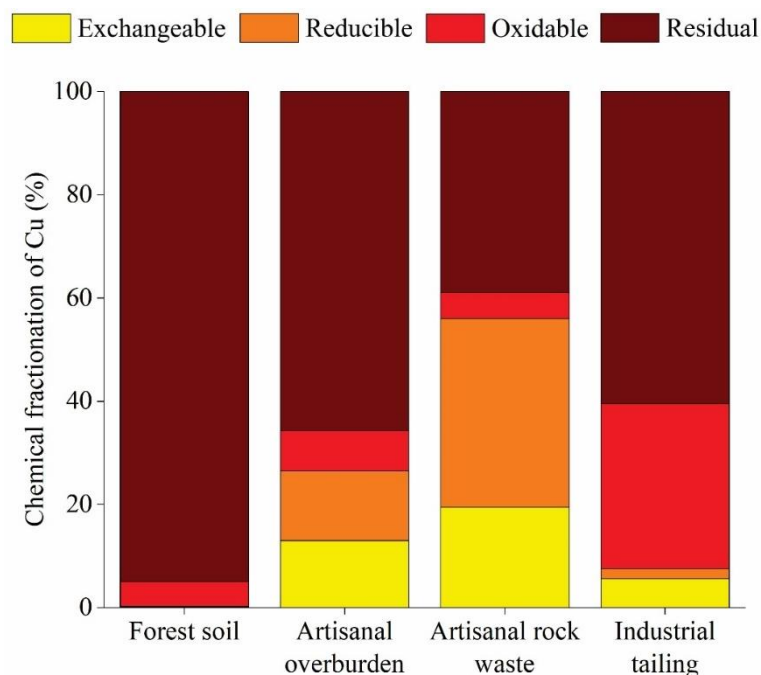
### **2.3.3. Chemical fractionation, bioavailability, and mobility of copper**

The chemical fractionation of Cu was carried out to better understand the risks associated with this metal, considering that it showed the highest concentrations among the

elements studied (Table 2). The sequential extraction revealed that the highest Cu concentrations are associated with the residual fraction, except in the artisanal rock waste (Fig. 3 and Table 4S), which indicates that Cu is strongly associated with the crystalline structure of minerals in forest soil, artisanal overburden and industrial tailing. On the other hand, in the artisanal rock waste, high concentrations of Cu are in the most reactive (exchangeable, reducible and oxidable) and potentially bioavailable forms (Pereira et al., 2020).

Artisanal overburden and artisanal rock waste have high percentages of Cu in the exchangeable fraction, corresponding to 13 and 19% of the pseudo-total concentrations, respectively (Fig. 3). These results are noteworthy, since the exchangeable fraction is more susceptible to environmental changes and considered more toxic than the other fractions. High concentrations of PTEs in this fraction have the greatest potential to cause risk to surrounding areas through the dispersion of soil, tailings and water (Gitari et al., 2018; Souza Neto et al., 2020). In this fraction, Cu is adsorbed on the wastes by a relatively weak electrostatic interaction and can be easily released by ion exchange or co-precipitated with carbonates (Gitari et al., 2018). The contents of IC (Table 1) found in the artisanal wastes, mainly in the artisanal rock waste, suggest that Cu may be linked to carbonates in the exchangeable fraction.

**Fig. 3.** Chemical fractionation of Cu in forest soil and copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.



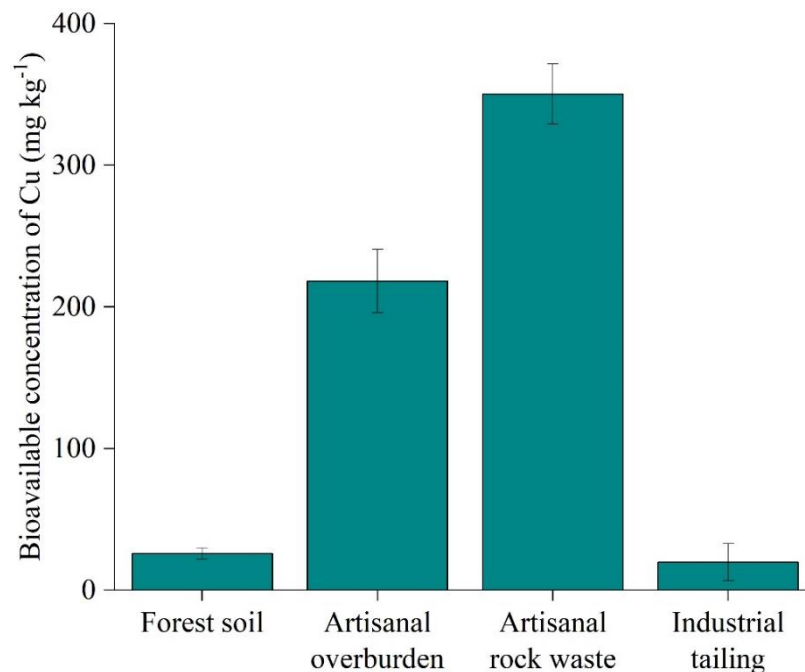
High proportion of Cu was found in the reducible fraction in the artisanal overburden and the artisanal rock waste, corresponding to 13 and 37% of the pseudo-total concentrations, respectively (Fig. 3). Such results can be related to the adsorption of  $\text{Cu}^{2+}$  by iron oxides derived from the oxidation of sulfides (Perlatti et al., 2014). The higher concentration of Cu (55%) in fractions linked to carbonates and oxides suggests that the Cu ore extracted in the artisanal mine was formed in oxidation zones (more superficial), through the alteration of sulfides, with malachite ( $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})$ ) and cuprite ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) as probable minerals, which have low dissolution (Guilbert and Park, 2007; Jannesar Malakooti et al., 2014).

In the industrial mine, the processes of flotation and washing of wastes reduced Cu concentration in the exchangeable fraction to 6% of the pseudo-total level (Fig. 3), while 32% is in the oxidable fraction, with probable association with chalcopyrite, since OC is extremely low. Most of pseudo-total Cu in the industrial tailing is concentrated in the residual fraction (60%) (Fig. 3), especially associated with gangue minerals (Fig. 2C), where chalcopyrite occurs in the form of microcrystals generally encapsulated in silicate grains, which decrease dissolution (Jannesar Malakooti et al., 2014; Shimizu et al., 2012).

In the forest soil, 95% of the total concentration of Cu is in the residual fraction and 4.8% in the oxidable fraction (Fig. 3). These results confirm the lithogenic origin of the element and suggest absence of anthropic contamination. The very low percentage of Cu (0.16%) in the exchangeable fraction of the soil may have occurred due to the losses by leaching with the strong rainfall in the Amazon region (Moreira et al., 2018), associated with the moderate soil acidity (pH 5.4) (Forján et al., 2016).

The Cu mobility factors calculated using the results of sequential extraction were 13 and 19% in the artisanal overburden and artisanal rock waste, respectively (Table 4S), which suggests high mobility and susceptibility to leaching (Gitari et al., 2018). These results are in accordance with the bioavailable concentrations of Cu extracted by DTPA solution, which were equal to  $218 \text{ mg kg}^{-1}$  in the artisanal overburden and  $350 \text{ mg kg}^{-1}$  in the artisanal rock waste, values much higher than that observed in the industrial tailing ( $19 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Fig. 4). These concentrations may put the ecosystem and the population at risk, depending on the levels of exposure (Forján et al., 2016).

**Fig. 4.** Bioavailable concentration of copper in forest soil and copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.



High bioavailability of Cu is expected when the total concentration is high (Kumar et al., 2021). However, in the present study, the available/pseudo-total ratio was low when compared to other Cu mining areas. In Cu mining tailing from the Touro mine, Spain, the available concentration exceeded 21% of the total level, which was related to the low Cu sorption in the waste, due to the low organic matter content and extremely acidic pH (Forján et al., 2016). Therefore, these properties may have significantly reduced the available concentrations of Cu in the artisanal wastes of this study.

Perlatti et al. (2015) reported a buffering mechanism through the dissolution of malachite and the consequent increase in the pH values. According to these authors, this process can also contribute to the release of Cu<sup>2+</sup>, which may have occurred partially in the artisanal wastes, especially in the artisanal rock waste. However, the pH close to neutrality favored other processes, such as the formation of complexes and stable chelates of Cu with organic matter, mainly through carboxylic and phenolic groups (Covre et al., 2020), reducing availability. In addition, it is possible that a high concentration of Cu in the reducible fraction of the artisanal rock waste is associated with amorphous Fe oxides, which have a greater Cu sorption capacity (Perlatti et al., 2021).

The industrial tailing has a low bioavailable concentration of Cu (19 mg kg<sup>-1</sup>) when compared to the other wastes studied, in addition to a mobility factor of approximately 5.5%

(Fig. 4 and Table 4S). In addition to the resistance of chalcopyrite to weathering, the alkaline character of this waste may have limited the availability of Cu, forming a geochemical barrier for the element (Dinelli and Tateo, 2001). Another factor related to the low available concentration of Cu in the industrial tailing is the high content of P (704.6 mg kg<sup>-1</sup>), since the phosphate group has an affinity for metallic cations and can adsorb or precipitate Cu in the form of Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, which reduces the availability of the metal (Deng et al., 2019). In the conditions of storage of the industrial tailing, the results indicate a low risk of Cu mobility due to the high pH and mobility factor below 10% (Mikoda and Gruszecka-Kosowska, 2018).

In the forest soil, whose pseudo-total concentration of Cu is considered high in relation to the soils from the state of Pará (Fernandes et al., 2018), the bioavailability (25 mg kg<sup>-1</sup>) and the mobility factor (0.16%) of Cu are quite low (Fig. 4 and Table 4S). The natural available concentrations of Cu usually vary from 2 mg kg<sup>-1</sup> in granite-derived soils to 150 mg kg<sup>-1</sup> in basalt-derived soils (Hugen et al., 2013). In Amazonian soils, pH, CEC, OM, and Mn oxides had a significant effect on Cu adsorption (Gonçalves et al., 2016), decreasing availability.

#### **2.3.4. Pollution indices**

The study area has high natural concentrations of PTEs (Pereira et al., 2020; Souza et al., 2017) and mining may have increased the levels of these elements in relation to the natural environment (reference area), which was studied through the enrichment factor (EF) and the contamination factor (CF), whose results were varied between the different materials studied (Table 3). In the artisanal overburden, Cd and Mo showed moderate enrichment and Cu had significant enrichment. Similarly, the CF values indicated that contamination is moderate for Cd and Mo, considerable for Cu, and low for the other elements. Higher EF values were observed in the artisanal rock waste, with moderate enrichment by Mo, significant by Cr and Ni, and extreme by Cu (Table 3). These results are in accordance with the values of CF, which suggested considerable contamination by Mo, and high contamination by Cr, Ni and Cu. Values of EF in the industrial tailing indicated absent or minimal enrichment for most elements, moderate by Cu and Ni, and very high by Mo. The minimal enrichment by As in the industrial tailing contributed with a moderate CF for this metalloid, while Cu and Ni showed considerable contamination and Mo presented high contamination.



**Table 3.** Enrichment factor (EF) and contamination factor (CF) of potentially toxic elements in copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.

Element	Artisanal overburden		Artisanal rock waste		Industrial tailing	
	EF	CF	EF	CF	EF	CF
As	1.2	0.7	0.9	1.6	1.1	1.5
Ba	1.4	0.9	0.5	1.0	0.2	0.3
Cd	2.1	1.2	0.2	0.4	0.4	0.6
Co	0.8	0.5	0.6	1.1	0.3	0.5
Cr	0.3	0.2	9.1	17.5	0.4	0.6
Cu	8.6	5.0	23.6	45.3	2.0	3.5
Hg	0.7	0.4	0.1	0.2	0.1	0.2
Mn	0.3	0.2	0.02	0.04	0.1	0.2
Mo	2.6	1.5	2.9	5.5	20.2	27.3
Ni	1.5	0.9	8.0	15.4	3.2	4.9
Pb	1.6	0.9	0.1	0.2	0.5	0.8
Zn	1.2	0.7	0.1	0.2	0.3	0.5

Anthropogenic origin for elements in mining areas is more likely to occur when EF exceeds 1.5 (Kinimo et al., 2018). Therefore, EF values above this limit indicate that the respective materials are enriched in relation to the soil from the forest area and that the metal source is probably anthropogenic (Darko et al., 2019), leading to risks of contamination by PTEs. Contamination of soils under influence of Cu mining was evidenced in China through the CF calculation, in a study that revealed high contamination by Cu and Cd (Cheng et al., 2018).

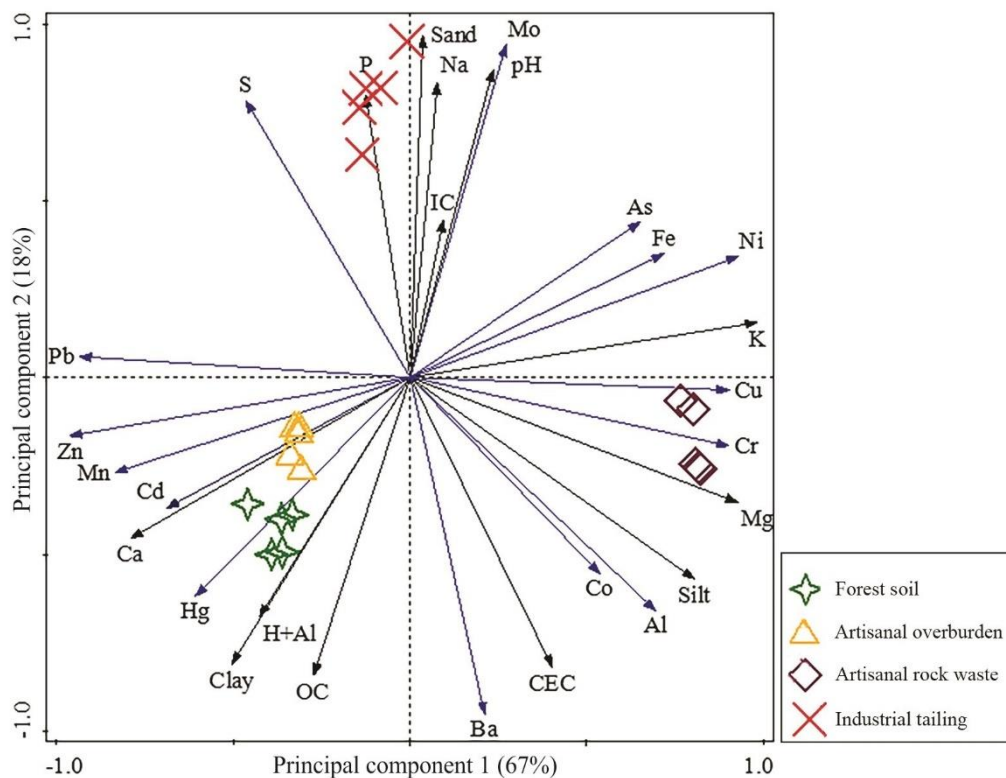
The materials showed enrichment and contamination by Mo, especially industrial tailing. However, the pseudo-total concentrations of this element (which are well below the PV) probably do not represent serious environmental risks (CONAMA, 2009). In the area studied, there is occurrence of sulfides such as molybdenite, which can disperse Mo when subjected to the revolving of soil layers (Monteiro et al., 2008). Due to the minor toxicological effects, Mo is not on the priority list of toxic substances (ATSDR, 2017).

Although the pollution indices were low in most cases, some elements showed enrichment/contamination and deserve attention regarding the threat that it may pose to biota. The results indicated that artisanal mining generates wastes that lead to greater Cu contamination in the surface layer, possibly due to the ore processing with low recovery, resulting in higher EF and CF values when compared to the industrial mining tailing.

### 2.3.5. Principal component analysis

The first component explained 64% of the total data variation, positively charged by As, Cu, Cr, Fe, Ni,  $K^+$ , silt and Mg, and negatively charged by Cd, Hg, Pb, Mn and Zn (Fig. 5). Positive correlations were found between Cu and Al, As, Cr, Fe and Ni, ranging from moderate to strong (Table 5S), indicating similar origin and geochemical behavior. Moreover, positive correlations with Al and Fe suggest that Cu may be associated with aluminum silicates and hydroxides, indicating a geogenic character. On the other hand, the negative correlation ranging from moderate to strong between Cu and Cd, Hg, Pb, Mn and Zn indicates different affinity, geochemical behavior and mineral origins between these elements and Cu, while suggests similar affinity, geochemical behavior and mineral origin between them (Fernandes et al., 2018).

**Fig. 5.** Principal component analysis between potentially toxic elements and properties of forest soil and copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.



Positive and significant correlations between Al, As, Cr, Cu, Fe and Ni are common in mining areas, due to the associated occurrence in host rocks and accessory minerals (Punia et al., 2017). In addition, the artisanal rock waste showed a predominance of minerals of the amphibole group (Fig. 2D). Such minerals are sources of these elements, which explains the

high (Table 2) and correlated (Table 5S) concentrations. When exposed to environmental conditions, these minerals oxidize and release PTEs (Souza et al., 2017). Positive correlations between As, Cu, Cr, Fe and Ni were found in Au mining areas in Brazil (Souza et al., 2017) and Cu mining areas in India (Punia et al., 2017).

The second principal component explained 21% of the total data variation (Fig. 5), positively controlled by P, sand, pH, Mo and Na<sup>+</sup>, indicating similar behavior in wastes and soil, and negatively charged by Al, Ba, Co, clay, and OC, also indicating similar geochemical characteristics and behavior, but opposite to P, sand, pH, Mo and Na<sup>+</sup>.

Samples of artisanal overburden were also negatively related to principal component 1, indicating that this material has a greater contribution to the enrichment of Cd, Pb, Mn, and Zn in the area studied. Silt and OC were the properties that most influenced the dynamics of Cd, Mn, Pb, and Zn in forest soil and artisanal overburden. The affinity of metals with OC is from the dissociation of hydroxyls from phenolic and carboxylic groups, which increases surface charges and the ability to sorb PTEs (Pereira et al., 2020; Souza et al., 2017). The association between artisanal overburden and forest soil in the principal component 1 (Fig. 5) is related to the similar granulometric composition between these areas (Table 1), since the overburden corresponds to the mixture of surface soil layers (pits are commonly 6 m deep). The correlation between PTEs and silt indicates that this fraction plays an important role on the distribution and sorption of such elements in these areas (Ličina et al., 2017).

Sand and pH were the properties that most affected the dynamics of As, Cu, Cr, Fe, and Ni in the artisanal rock waste. This material is predominantly sandy (Table 1), indicating that the concentrations of PTEs in this area are related to primary minerals. The pH is one of the properties that most affects the mobility, availability and toxicity of PTEs (Ličina et al., 2017; Punia et al., 2017), which explains the strong association found. Immobilization of PTEs increases under low acidity conditions (Fernandes et al., 2018). In samples of the artisanal rock waste, pH close to neutrality (6.6) and the occurrence of minerals such as talc, richterite and amphiboles, that are rich in Ca and Mg (Fig. 2D), can restrict the mobility of PTEs. These results are in accordance with those found in a coal mining area in Serbia, where a correlation between Co, Cr, Fe, and Ni and the sand fraction was observed by Ličina et al. (2017), and in Cu mining area in India, where association between Co, Cu, Cr, Fe and Ni was observed by Punia et al. (2017).

Al, Ba, and Co showed a significant correlation with each other and were negatively associated with principal component 2 and the forest soil (Fig. 5 and Table 5S), which suggests a common origin due to pedogenetic processes (Punia et al., 2017). It was found a negative

association of Hg with principal component 1 and the soil from the forest area (Fig. 5 and Table 5S), indicating that the concentrations of this element should not be associated with Cu mining and are derived from the parent material, soil formation processes and atmospheric depositions. The levels of Hg in all areas studied were lower than the QRV established for this element in the state of Pará (Table 2), suggesting that both industrial and artisanal mining are not contributing to the enrichment of this element.

Mo was positively associated with principal component 2 and showed positive Pearson correlations with Zn, Fe, S and pH (Fig. 5 and Tables 5S and 6S). Correlation between Mo and S suggests a common origin related to sulfide minerals (Skierszkan et al., 2016). Solubilization and leaching of Mo occur during the oxidative weathering of sulfuric rock waste. In the aqueous form ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) and under moderately acidic conditions, this element is strongly adsorbed on Fe oxyhydroxides (Xu et al., 2006). The mobility of Mo is low under acidic conditions and high under neutral to alkaline conditions, such as those found in mining wastes (Skierszkan et al., 2016).

The areas of artisanal and industrial mining are situated in the same geological formation. Nevertheless, the wastes from artisanal and industrial mining did not correlate with each other (Fig. 5), which is related to the different levels of PTEs in these areas (Table 2). Typically, due to the use of rudimentary technologies during mineral exploration and processing, artisanal mining causes greater pollution in relation to industrial mining (Liu et al., 2020).

### **2.3.6. Risks to environment and human health**

Values of PERF indicated low ecological risk for most of the materials studied according to the classification proposed by Hakanson (1980). In the artisanal overburden, PERF ranged from 0.2 to 36, indicating low ecological risk (Table 4). Similar behavior was observed in the industrial mining tailing, whose results ranged from 0.2 to 27.3. On the other hand, in the artisanal rock waste, PERF values indicated ecological risk ranging from low to high among the PTEs studied, with low risk for As, Ba, Cd, Co, Cr, Hg, Mn, Mo, Pb and Zn, moderate for Ni, and high for Cu. Values of PERI, based on the sum of all PERF, were low in the artisanal overburden (100.7) and industrial tailing (111.9), and considerable in the artisanal rock waste (389.0).

**Table 4.** Potential ecological risk factors (PERF) and potential ecological risk index (PERI) of potentially toxic elements in copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.

Element	Artisanal overburden	Artisanal rock waste	Industrial tailing
As	7.0	16.4	15.4
Ba	1.7	2.1	1.0
Cd	36.0	12.0	16.8
Co	2.3	5.7	2.4
Cr	0.3	35.0	1.1
Cu	25.2	226.5	17.7
Hg	16.5	7.3	0.9
Mn	0.2	0.04	0.2
Mo	1.5	5.5	27.3
Ni	4.6	77.1	24.6
Pb	4.7	1.2	4.0
Zn	0.7	0.2	0.5
PERI	100.7	389.0	111.9

Although the ecological risk has been low in the artisanal overburden, it deserves attention due to the abandonment conditions of the mine, whose wastes are unprotected and exposed to rainfall and wind, favoring the transport of particles, surface runoff, and leaching, which can threaten areas far from the waste disposal sites (Pereira et al., 2020; Souza et al., 2017; Teixeira et al., 2019). Even more worrying results were obtained in the artisanal rock waste, whose PERI is considerable, with a relevant contribution from the high-risk PERF of Cu, indicating that metallic contaminants represent a risk of adverse effects for the environment (Darko et al., 2019), mainly in areas without vegetation cover and erosion control. Abandoned Cu mine waste in northeastern Brazil may have released about 7.2 tons of Cu into the environment over 30 years, with chemical weathering and erosion, leading to Cu enrichment in water, sediments and biota (Perlatti et al., 2021).

The human health risk assessment considered exclusively the elements in pseudo-total concentrations above the prevention value established by Brazilian legislation (CONAMA, 2009) in mining wastes, that is, Ni, Cr and Cu (Table 2), of which only Cu has no recognized carcinogenic effects in the literature (Lu et al., 2014). Hazard index (HI) values higher than 1 indicate potential non-carcinogenic toxic effects according to the United States Environmental Protection Agency (USEPA, 2001). The results indicated that there is no non-carcinogenic risk

associated with the artisanal overburden, while there are non-carcinogenic risks for adults and children from exposure to Cr, Cu and Ni in the artisanal rock waste, and Cr in the industrial tailing (Table 5). The occurrence of carcinogenic risks, in turn, is strongly related to HI values higher than  $10^{-4}$  (Chen et al., 2015; Lu et al., 2014). In this study, carcinogenic health risks for children and adults were observed for Cr and Ni in all materials studied, with the exception of Ni for adults in the artisanal overburden and in the industrial tailing (Table 5).

**Table 5.** Non-carcinogenic and carcinogenic hazard indices (HI) of potentially toxic elements in copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.

Element	Group	Non-carcinogenic risk		
		Artisanal overburden	Artisanal rock waste	Industrial tailing
Cr	Adults	$6.66 \times 10^{-1}$	72.13	2.37
	Children	$3.44 \times 10^{-1}$	37.30	1.23
Cu	Adults	$5.79 \times 10^{-1}$	5.22	$4.07 \times 10^{-1}$
	Children	$7.51 \times 10^{-1}$	6.77	$5.28 \times 10^{-1}$
Ni	Adults	$1.66 \times 10^{-1}$	2.81	$8.95 \times 10^{-1}$
	Children	$8.93 \times 10^{-2}$	1.51	$4.81 \times 10^{-1}$
Element	Group	Carcinogenic risk		
		Artisanal overburden	Artisanal rock waste	Industrial tailing
Cr	Adults	$2.02 \times 10^{-3}$	$2.18 \times 10^{-1}$	$7.17 \times 10^{-3}$
	Children	$2.52 \times 10^{-2}$	2.73	$8.96 \times 10^{-2}$
Ni	Adults	$1.35 \times 10^{-5}$	$2.29 \times 10^{-4}$	$7.29 \times 10^{-5}$
	Children	$1.69 \times 10^{-4}$	$2.86 \times 10^{-3}$	$9.12 \times 10^{-4}$

Based on the risk assessment, it is possible to state that Cr is the element of greatest risk to human health in the study area, considering that the HI values (non-carcinogenic and carcinogenic) of this metal were above the acceptable threshold in all materials, with the exception of the non-carcinogenic HI in the artisanal overburden (Table 5). Cr is an essential element for humans, but high concentrations of this element can cause serious problems to human health, such as cardiovascular effects, lung cancer, cardiorespiratory arrest, and liver and kidney damage (Beaumont et al., 2008; Ertani et al., 2017; Manoj et al., 2021; Shadreck and Mugadza, 2013; Shakir et al., 2012). It is also possible to state that the artisanal rock waste is the most hazardous material in the study area, since it presented carcinogenic and non-carcinogenic risks for children and adults due to exposure to all the elements evaluated in the human health risk assessment (Table 5), in addition to being deposited in an unprotected manner, unlike industrial mining tailing, which despite presenting risks to human health, are not in contact with the population of the region and are properly deposited.

## 2.4. CONCLUSIONS

The materials studied have a high mineralogical variation, with quartz as the main primary mineral. Mining wastes are less acidic than the natural forest soil, mainly due to the dissolution of minerals with neutralizing potential and the addition of reagents to control acidity. The main contaminant in mining wastes is Cu, and although chemical fractionation has revealed higher concentrations of this metal in the residual form for all wastes, considerable concentrations are in forms of high reactivity in the artisanal mining wastes, which also have higher Cu mobility factors in relation to industrial mining tailing. The artisanal rock waste is the material with the greatest environmental and human health risks, with a considerable ecological risk index for biota, as well as human health risks above the acceptable thresholds for all the elements found in concentrations higher than the prevention value established by Brazilian legislation. These results indicate that industrial mining generates wastes with less environmental impact than artisanal exploration and can guide the development and application of remediation techniques for contaminated areas, aiming to protect the health of the local population.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and the Amazon Foundation for the Support of Studies and Research (FAPESPA), for the financial support and the scholarships provided in the development of this work.

## REFERENCES

- Abbas, Q., Yousaf, B., Liu, G., Zia-ur-Rehman, M., Ali, M.U., Munir, M.A.M., Hussain, S.A., 2017. Evaluating the health risks of potentially toxic elements through wheat consumption in multi-industrial metropolis of Faisalabad, Pakistan. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 26646–26657. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0311-9>
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., de Moraes Gonçalves, J.L., Sparovek, G., 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Zeitschrift* 22, 711–728. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>
- Andersson, M., Finne, T.E., Jensen, L.K., Eggen, O.A., 2018. Geochemistry of a copper mine tailings deposit in Repparfjorden, northern Norway. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.385>

ATSDR, 2017. Substance Priority List | ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Beaumont, J.J., Sedman, R.M., Reynolds, S.D., Sherman, C.D., Li, L.-H., Howd, R.A., Sandy, M.S., Zeise, L., Alexeeff, G. V., 2008. Cancer Mortality in a Chinese Population Exposed to Hexavalent Chromium in Drinking Water. *Epidemiology* 19, 12–23. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e31815cea4c>

Bergerman, M.G., 2009. Modelagem e simulação do circuito de moagem do Sossego. Universidade de São Paulo, São Paulo. <https://doi.org/10.11606/D.3.2009.tde-21102009-100600>

Bhuiyan, M.A.H., Parvez, L., Islam, M.A., Dampare, S.B., Suzuki, S., 2010. Heavy metal pollution of coal mine-affected agricultural soils in the northern part of Bangladesh. *J. Hazard. Mater.* 173, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.08.085>

Birani, S.M., Fernandes, A.R., Braz, A.M. de S., Pedroso, A.J.S., Alleoni, L.R.F., 2015. Available contents of potentially toxic elements in soils from the Eastern Amazon. *Geochemistry* 75, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.chemer.2015.01.001>

Castro, S.H., Sánchez, M., 2003. Environmental viewpoint on small-scale copper, gold and silver mining in Chile. *J. Clean. Prod.* 11, 207–213. [https://doi.org/10.1016/S0959-6526\(02\)00040-9](https://doi.org/10.1016/S0959-6526(02)00040-9)

Ceniceros-Gómez, A.E., Macías-Macías, K.Y., de la Cruz-Moreno, J.E., Gutiérrez-Ruiz, M.E., Martínez-Jardines, L.G., 2018. Characterization of mining tailings in México for the possible recovery of strategic elements. *J. South Am. Earth Sci.* 88, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2018.08.013>

Chen, H., Teng, Y., Lu, S., Wang, Y., Wang, J., 2015. Contamination features and health risk of soil heavy metals in China. *Sci. Total Environ.* 512–513, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.025>

Cheng, X., Drozdova, J., Danek, T., Huang, Q., Qi, W., Yang, S., Zou, L., Xiang, Y., Zhao, X., 2018. Pollution Assessment of Trace Elements in Agricultural Soils around Copper Mining Area. *Sustainability* 10, 4533. <https://doi.org/10.3390/su10124533>

Chileshe, M.N., Syampungani, S., Festin, E.S., Tigabu, M., Daneshvar, A., Odén, P.C., 2020. Physico-chemical characteristics and heavy metal concentrations of copper mine wastes in Zambia: implications for pollution risk and restoration. *J. For. Res.* 31, 1283–1293. <https://doi.org/10.1007/s11676-019-00921-0>

CONAMA, 2009. Resolução No 420. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasília.



Covre, W.P., Pereira, W.V. da S., Gonçalves, D.A.M., Teixeira, O.M.M., Amarante, C.B. do, Fernandes, A.R., 2020. Phytoremediation potential of *Khaya ivorensis* and *Cedrela fissilis* in copper contaminated soil. *J. Environ. Manage.* 268, 110733. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110733>

Craveiro, G.S., Villas, R.N., Da Costa Silva, A.R., 2012. Depósito Cu-Au Visconde, Carajás (PA): geologia e alteração hidrotermal das rochas encaixantes. *Rev. Bras. Geociências* 42. <https://doi.org/10.5327/Z0375-75362012000300002>

Craveiro, G.S., Xavier, R.P., Nobre Villas, R.N., 2019. The Cristalino IOCG deposit: An example of multi-stage events of hydrothermal alteration and copper mineralization. *Brazilian J. Geol.* <https://doi.org/10.1590/2317-4889201920180015>

Darko, G., Boakye, K.O., Nkansah, M.A., Gyamfi, O., Ansah, E., Yevugah, L.L., Acheampong, A., Dodd, M., 2019. Human Health Risk and Bioaccessibility of Toxic Metals in Topsoils from Gbani Mining Community in Ghana. *J. Heal. Pollut.* <https://doi.org/10.5696/2156-9614-9.22.190602>

Deng, R., Huang, D., Wan, J., Xue, W., Lei, L., Wen, X., Liu, X., Chen, S., Yang, Y., Li, Z., Li, B., 2019. Chloro-phosphate impregnated biochar prepared by co-precipitation for the lead, cadmium and copper synergic scavenging from aqueous solution. *Bioresour. Technol.* 293, 122102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122102>

Dinelli, E., Tateo, F., 2001. Factors controlling heavy-metal dispersion in mining areas: The case of Vigonzano (northern Italy), a Fe-Cu sulfide deposit associated with ophiolitic rocks. *Environ. Geol.* <https://doi.org/10.1007/s002540100316>

Ertani, A., Mietto, A., Borin, M., Nardi, S., 2017. Chromium in Agricultural Soils and Crops: A Review. *Water, Air, Soil Pollut.* 228, 190. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3356-y>

Fernandes, A.R., Souza, E.S., Braz, A.M.S., Birani, S.M., Alleoni, L.R.F., 2018. Quality reference values and background concentrations of potentially toxic elements in soils from the Eastern Amazon, Brazil. *J. Geochemical Explor.* 190, 453–463. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2018.04.012>

Forján, R., Asensio, V., Vila, A.R., Covelo, E.F., 2016. Contributions of a compost-biochar mixture to the metal sorption capacity of a mine tailing. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5489-0>

Gaetke, L.M., Chow-Johnson, H.S., Chow, C.K., 2014. Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Arch. Toxicol.* 88, 1929–1938. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1355-y>

Gee, G.W., Bauder, J.W., 1986. Particle-size analysis, in: Klute, A. (Ed.), *Methods of Soil Analysis*. American Society of Agronomy, Madison, pp. 383–411.

Gitari, M.W., Akinyemi, S.A., Thobakgale, R., Ngoejana, P.C., Ramugondo, L., Matidza, M., Mhlongo, S.E., Dacosta, F.A., Nemapate, N., 2018. Physicochemical and mineralogical characterization of Musina mine copper and New Union gold mine tailings: Implications for fabrication of beneficial geopolymeric construction materials. *J. African Earth Sci.* 137, 218–228. <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2017.10.016>

Gitari, W., Thobakgale, R., Akinyemi, S., 2018. Mobility and Attenuation Dynamics of Potentially Toxic Chemical Species at an Abandoned Copper Mine Tailings Dump. *Minerals* 8, 64. <https://doi.org/10.3390/min8020064>

Gonçalves, D.A.M., Matos, G.S.B. de, Fernandes, A.R., Barros, K.R.M., Campinas, D. do S.N., Amarante, C.B. do, 2016. Adsorption of cadmium and copper in representative soils of Eastern Amazonia, Brazil. *Semin. Ciências Agrárias* 37, 3005. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5p3005>

Gope, M., Masto, R.E., George, J., Hoque, R.R., Balachandran, S., 2017. Bioavailability and health risk of some potentially toxic elements (Cd, Cu, Pb and Zn) in street dust of Asansol, India. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 138, 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.008>

Guedes, R.S., Rodríguez-Vila, A., Forján, R., Covelo, E.F., Fernandes, A.R., 2018. Adsorption and risk of phosphorus loss in soils in Amazonia. *J. Soils Sediments*. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1845-7>

Guilbert, J.M., Park, C.F., 2007. *The Geology of Ore Deposits*. Waveland Pr Inc, Long Grove.

Hakanson, L., 1980. An ecological risk index for aquatic pollution control. A sedimentological approach. *Water Res.* 14, 975–1001. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(80\)90143-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(80)90143-8)

Hugen, C., Miquelluti, D.J., Campos, M.L., Almeida, J.A. de, Ferreira, É.R.N.C., Pozzan, M., 2013. Teores de Cu e Zn em perfis de solos de diferentes litologias em Santa Catarina. *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.* 17, 622–628. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662013000600008>

Hussain, S., Sharma, V., Arya, V.M., Sharma, K.R., Rao, C.S., 2019. Total organic and inorganic carbon in soils under different land use/land cover systems in the foothill Himalayas. *CATENA* 182, 104104. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2019.104104>

Jannesar Malakooti, S., Shafaei Tonkaboni, S.Z., Noaparast, M., Doulati Ardejani, F., Naseh, R., 2014. Characterisation of the Sarcheshmeh copper mine tailings, Kerman province, southeast of Iran. *Environ. Earth Sci.* <https://doi.org/10.1007/s12665-013-2630-6>

Juliani, C., Monteiro, L.V.S., Fernandes, C.M.D., 2016. Potencial mineral: cobre, in: *Recursos Minerais Do Brasil: Problemas e Desafios*. Rio de Janeiro, pp. 134–156.

Karczewska, A., Mocek, A., Goliński, P., Mleczek, M., 2015. Phytoremediation of copper- contaminated soil, in: *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*, Volume 2. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-10969-5\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-10969-5_12)

Katz-Lavigne, S., 2019. Artisanal copper mining and conflict at the intersection of property rights and corporate strategies in the Democratic Republic of Congo. *Extr. Ind. Soc.* 6, 399–406. <https://doi.org/10.1016/j.exis.2018.12.001>

Khorasanipour, M., Tangestani, M.H., Naseh, R., Hajmohammadi, H., 2011. Hydrochemistry, mineralogy and chemical fractionation of mine and processing wastes associated with porphyry copper mines: A case study from the Sarcheshmeh mine, SE Iran. *Appl. Geochemistry* 26, 714–730. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.01.030>

Kinimo, K.C., Yao, K.M., Marcotte, S., Kouassi, N.L.B., Trokourey, A., 2018. Distribution trends and ecological risks of arsenic and trace metals in wetland sediments around gold mining activities in central-southern and southeastern Côte d'Ivoire. *J. Geochemical Explor.* <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2018.03.013>

Kowalska, J., Mazurek, R., Gąsiorek, M., Setlak, M., Zaleski, T., Waroszewski, J., 2016. Soil pollution indices conditioned by medieval metallurgical activity – A case study from Krakow (Poland). *Environ. Pollut.* <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.053>

Kowalska, J.B., Mazurek, R., Gasiorek, M., Zaleski, T., 2018. Pollution indices as useful tools for the comprehensive evaluation of the degree of soil contamination - A review. *Environ. Geochem. Health* 40, 2395–2420. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0106-z>

Kruszewski, B., Obiedziński, M.W., Kowalska, J., 2018. Nickel, cadmium and lead levels in raw cocoa and processed chocolate mass materials from three different manufacturers. *J. Food Compos. Anal.* 66, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.012>

Kumar, V., Pandita, S., Singh Sidhu, G.P., Sharma, A., Khanna, K., Kaur, P., Bali, A.S., Setia, R., 2021. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. *Chemosphere.* <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127810>

Ličina, V., Akšić, M.F., Tomić, Z., Trajković, I., Antić Mladenović, S., Marjanović, M., Rinklebe, J., 2017. Bioassessment of heavy metals in the surface soil layer of an opencast mine

aimed for its rehabilitation. *J. Environ. Manage.* 186, 240–252. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.06.050>

Lima, M.W., Hamid, S.S., de Souza, E.S., Teixeira, R.A., da Conceição Palheta, D., do Carmo Freitas Faial, K., Fernandes, A.R., 2020. Geochemical background concentrations of potentially toxic elements in soils of the Carajás Mineral Province, southeast of the Amazonian Craton. *Environ. Monit. Assess.* <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08611-9>

Lin, W., Wu, K., Lao, Z., Hu, W., Lin, B., Li, Y., Fan, H., Hu, J., 2019. Assessment of trace metal contamination and ecological risk in the forest ecosystem of dexing mining area in northeast Jiangxi Province, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 167, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.001>

Liu, X., Shi, H., Bai, Z., Zhou, W., Liu, K., Wang, M., He, Y., 2020. Heavy metal concentrations of soils near the large opencast coal mine pits in China. *Chemosphere* 244, 125360. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125360>

Looi, L.J., Aris, A.Z., Yusoff, F.M., Isa, N.M., Haris, H., 2019. Application of enrichment factor, geoaccumulation index, and ecological risk index in assessing the elemental pollution status of surface sediments. *Environ. Geochem. Health* 41, 27–42. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0149-1>

Lu, X., Zhang, X., Li, L.Y., Chen, H., 2014. Assessment of metals pollution and health risk in dust from nursery schools in Xi'an, China. *Environ. Res.* 128, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.11.007>

Ma, L., Xiao, T., Ning, Z., Liu, Y., Chen, H., Peng, J., 2020. Pollution and health risk assessment of toxic metal(loid)s in soils under different land use in sulphide mineralized areas. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138176>

Manoj, S., RamyaPriya, R., Elango, L., 2021. Long-term exposure to chromium contaminated waters and the associated human health risk in a highly contaminated industrialised region. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 4276–4288. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10762-8>

McGrath, S.P., Cunliffe, C.H., 1985. A simplified method for the extraction of the metals Fe, Zn, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Co and Mn from soils and sewage sludges. *J. Sci. Food Agric.* 36, 794–798.

Melo, G.H.C., Monteiro, L.V.S., Moreto, C.P.N., Xavier, R.P., Silva, M.A.D., 2014. Paragenesis and evolution of the hydrothermal Bacuri iron oxide-copper-gold deposit, Carajás Province (PA). *Brazilian J. Geol.* 44, 73–90. <https://doi.org/10.5327/Z2317-4889201400010007>

Mesquita, C.J.S., Feio, G.R.L., 2017. Caracterização microestrutural e da alteração hidrotermal dos granitoides arqueanos próximos de vila Planalto - Canaã dos Carajás, Província Carajás. *Contrib. à Geol. da Amaz.* 10, 163–180.

Mikoda, B., Gruszecka-Kosowska, A., 2018. Mineral and chemical characteristics, textural parameters, and the mobility of the selected elements of flotation waste, originating from the Polish copper-mining industry. *Hum. Ecol. Risk Assess.* <https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1410694>

Mitre, S.K., Mardegan, S.F., Caldeira, C.F., Ramos, S.J., Furtini Neto, A.E., Siqueira, J.O., Gastauer, M., 2018. Nutrient and water dynamics of Amazonian canga vegetation differ among physiognomies and from those of other neotropical ecosystems. *Plant Ecol.* 219, 1341–1353. <https://doi.org/10.1007/s11258-018-0883-6>

Monteiro, L.V.S., Xavier, R.P., Hitzman, M.W., Juliani, C., de Souza Filho, C.R., Carvalho, E. de R., 2008. Mineral chemistry of ore and hydrothermal alteration at the Sossego iron oxide-copper-gold deposit, Carajás Mineral Province, Brazil. *Ore Geol. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2008.01.003>

Moon, Y., Zhang, Y.S., Sonn, Y.K., Hyun, B.K., Song, Y., Moon, H.S., 2013. Mineralogical characterization related to physicochemical conditions in the pyrite-rich tailings in Guryong Mine, Korea. *Soil Sci. Plant Nutr.* <https://doi.org/10.1080/00380768.2013.773416>

Moreira, L.J.D., Silva, E.B., Fontes, M.P.F., Liu, X., Ma, L.Q., 2018. Speciation, bioaccessibility and potential risk of chromium in Amazon forest soils. *Environ. Pollut.* 239, 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.025>

Mota, N.F.D.O., Watanabe, M.T.C., Zappi, D.C., Hiura, A.L., Pallos, J., Viveros, R.S., Giulietti, A.M., Viana, P.L., 2018. Amazon canga: The unique vegetation of Carajás revealed by the list of seed plants. *Rodriguesia.* <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869336>

Pais, I., Jones, J.B., 1997. *The handbook of trace elements.* CRC Press, Boca Raton.

Pereira, W.V. da S., Teixeira, R.A., Souza, E.S. de, Moraes, A.L.F. de, Campos, W.E.O., Amarante, C.B. do, Martins, G.C., Fernandes, A.R., 2020. Chemical fractionation and bioaccessibility of potentially toxic elements in area of artisanal gold mining in the Amazon. *J. Environ. Manage.* 267, 110644. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110644>

Perlatti, F., Ferreira, T.O., da Costa Roberto, F.A., Romero, R.E., Sartor, L.R., Otero, X.L., 2015. Trace metal/metalloid concentrations in waste rock, soils and spontaneous plants in the surroundings of an abandoned mine in semi-arid NE-Brazil. *Environ. Earth Sci.* <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4556-7>

Perlatti, F., Martins, E.P., de Oliveira, D.P., Ruiz, F., Asensio, V., Rezende, C.F., Otero, X.L., Ferreira, T.O., 2021. Copper release from waste rocks in an abandoned mine (NE, Brazil) and its impacts on ecosystem environmental quality. *Chemosphere* 262, 127843. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127843>

Perlatti, F., Otero, X.L., Macias, F., Ferreira, T.O., 2014. Geochemical speciation and dynamic of copper in tropical semi-arid soils exposed to metal-bearing mine wastes. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.086>

Pontes, L.F., Almeida, S.L.M., 2008. Talco, in: *Rochas e Minerais Industriais Usos e Especificações*. CETEM/MCT, Rio de Janeiro, pp. 607–628.

Punia, A., Siddaiah, N.S., Singh, S.K., 2017. Source and Assessment of Metal Pollution at Khetri Copper Mine Tailings and Neighboring Soils, Rajasthan, India. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 99, 633–641. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2175-6>

R Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing.

Rzyski, P., Klimaszuk, P., Marszelewski, W., Borowiak, D., Mleczek, M., Nowiński, K., Pius, B., Niedzielski, P., Poniedziałek, B., 2017. The chemistry and toxicity of discharge waters from copper mine tailing impoundment in the valley of the Apuseni Mountains in Romania. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9782-y>

Sahoo, P.K., Dall’Agnol, R., Salomão, G.N., Junior, J. da S.F., Silva, M.S., e Souza Filho, P.W.M., da Costa, M.L., Angélica, R.S., Filho, C.A.M., da Costa, M.F., Guilherme, L.R.G., Siqueira, J.O., 2020. Regional-scale mapping for determining geochemical background values in soils of the Itacaiúnas River Basin, Brazil: The use of compositional data analysis (CoDA). *Geoderma* 376, 114504. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114504>

Salomão, G.N., Figueiredo, M.A., Dall’Agnol, R., Sahoo, P.K., de Medeiros Filho, C.A., da Costa, M.F., Angélica, R.S., 2019. Geochemical mapping and background concentrations of iron and potentially toxic elements in active stream sediments from Carajás, Brazil – implication for risk assessment. *J. South Am. Earth Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2019.03.014>

Schaefer, C.E.G.R., Ribeiro, A.S.D.S., Resende, G.C., Neto, E.D.L., Simas, F.N.B., Ker, J.C., 2016. Características químicas e mineralogia de solos perférricos da Serra Sul de Carajás. *Ciências Nat.* 11, 57–69.

Shadreck, M., Mugadza, T., 2013. Chromium, an essential nutrient and pollutant: A review. *African J. Pure Appl. Chem.* 7, 310–317. <https://doi.org/10.5897/AJPAC2013.0517>

Shakir, L., Ejaz, S., Ashraf, M., Qureshi, N.A., Anjum, A.A., Iltaf, I., Javeed, A., 2012. Ecotoxicological risks associated with tannery effluent wastewater. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34, 180–191. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.03.002>

Shimizu, V.K., Kahn, H., Antoniassi, J.L., Ulsen, C., 2012. Copper ore type definition from Sossego Mine using X-ray diffraction and cluster analysis technique. *Rem Rev. Esc. Minas.* <https://doi.org/10.1590/s0370-44672012000400019>

Silva Júnior, R.O. Da, Souza, E.B. De, Tavares, A.L., Mota, J.A., Ferreira, D.B.S., Souza-Filho, P.W.M., Rocha, E.J.P. DA, 2017. Three decades of reference evapotranspiration estimates for a tropical watershed in the eastern Amazon. *An. Acad. Bras. Cienc.* 89, 1985–2002. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170147>

Skierszkan, E.K., Mayer, K.U., Weis, D., Beckie, R.D., 2016. Molybdenum and zinc stable isotope variation in mining waste rock drainage and waste rock at the Antamina mine, Peru. *Sci. Total Environ.* 550, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.053>

Smuda, J., Dold, B., Spangenberg, J.E., Friese, K., Kobek, M.R., Bustos, C.A., Pfeifer, H.-R., 2014. Element cycling during the transition from alkaline to acidic environment in an active porphyry copper tailings impoundment, Chuquicamata, Chile. *J. Geochemical Explor.* 140, 23–40. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2014.01.013>

Sobihah, N.N., Ahmad Zaharin, A., Khairul Nizam, M., Ley Juen, L., Kyoung-Woong, K., 2018. Bioaccumulation of heavy metals in maricultured fish, *Lates calcarifer* (Barramudi), *Lutjanus campechanus* (red snapper) and *Lutjanus griseus* (grey snapper). *Chemosphere.* <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.187>

Souza, E.S., Fernandes, A.R., Braz, A.M. de S., Oliveira, F.J. de, Alleoni, L.R.F., Campos, M.C.C., 2018. Physical, chemical, and mineralogical attributes of a representative group of soils from the eastern Amazon region in Brazil. *SOIL* 4, 195–212. <https://doi.org/10.5194/soil-4-195-2018>

Souza, E. S., Teixeira, R.A., Costa, H.S.C., Oliveira, F.J., Melo, L.C.A., Faial, K.C.F., Fernandes, A.R., 2017. Assessment of risk to human health from simultaneous exposure to multiple contaminants in an artisanal gold mine in Serra Pelada, Pará, Brazil. *Sci. Total Environ.* 576, 683–695. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.133>

Souza Neto, H.F. de, Pereira, W.V. da S., Dias, Y.N., Souza, E.S. de, Teixeira, R.A., Lima, M.W. de, Ramos, S.J., Amarante, C.B. do, Fernandes, A.R., 2020. Environmental and human health risks of arsenic in gold mining areas in the eastern Amazon. *Environ. Pollut.* 265, 114969. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114969>

Tapia-Gatica, J., González-Miranda, I., Salgado, E., Bravo, M.A., Tessini, C., Dovletyarova, E.A., Paltseva, A.A., Neaman, A., 2020. Advanced determination of the spatial gradient of human health risk and ecological risk from exposure to As, Cu, Pb, and Zn in soils near the Ventanas Industrial Complex (Puchuncaví, Chile). *Environ. Pollut.* 258, 113488. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113488>

Teixeira, J.B.G., Lindenmayer, Z.G., 2012. Serra dos Carajás, in: *Geologia Do Brasil*. Beca, pp. 176–182.

Teixeira, P.C., Donagemma, G.K., Fontana, A., Teixeira, W.G. (Eds.), 2017. *Manual de métodos de análise de solo*, 3rd ed. Embrapa Solos, Brasília.

Teixeira, R.A., de Souza, E.S., de Lima, M.W., Dias, Y.N., da Silveira Pereira, W.V., Fernandes, A.R., 2019. Index of geoaccumulation and spatial distribution of potentially toxic elements in the Serra Pelada gold mine. *J. Soils Sediments* 19. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02257-y>

USEPA, 2001. Supplemental guidance for developing soil screening levels for superfund sites. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington.

Venegas, V.H.A., Novais, R.F., Barros, N.F., Cantarutti, R.B., LOPES, A.S., 1999. Interpretation of soil analysis results, in: *Recommendations for the Use of Correctives and Fertilizers in Minas Gerais*. Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, Viçosa, pp. 25–32.

Xiao, R., Guo, D., Ali, A., Mi, S., Liu, T., Ren, C., Li, R., Zhang, Z., 2019. Accumulation, ecological-health risks assessment, and source apportionment of heavy metals in paddy soils: A case study in Hanzhong, Shaanxi, China. *Environ. Pollut.* 248, 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.045>

Xu, N., Christodoulatos, C., Braidá, W., 2006. Adsorption of molybdate and tetrathiomolybdate onto pyrite and goethite: Effect of pH and competitive anions. *Chemosphere* 62, 1726–1735. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.06.025>

Zambelli, B., Uversky, V.N., Ciurli, S., 2016. Nickel impact on human health: An intrinsic disorder perspective. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1864, 1714–1731. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.09.008>



## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Table 1S**

*Classes of enrichment factor (EF)<sup>a</sup> and contamination factor (CF)<sup>b</sup> considered for pollution assessment.*

Enrichment factor	Enrichment degree	Contamination factor	Pollution degree
$EF < 2$	Absent or minimal	$CF \leq 1$	Low
$2 \leq EF < 5$	Moderate	$1 < CF \leq 3$	Moderate
$5 \leq EF < 20$	Significant	$3 < CF \leq 6$	Considerable
$5 \leq EF < 10$	Very high	$CF > 6$	Very high
$10 \leq EF < 25$	Extreme	-	-

<sup>a</sup>Looi et al. (2019).

<sup>b</sup>Hakanson (1980).

**Table 2S**

Classes of potential ecological risk factors (PERF)<sup>a</sup> and potential ecological risk indices (PERI)<sup>a</sup> considered for environmental risk assessment.

Potential Ecological Risk Factor	Single Environmental Risk	Potential Ecological Risk Index	Multi-element Environmental Risk
$PERF \leq 40$	Low	$PERI \leq 150$	Low
$40 < PERF \leq 80$	Moderate	$150 < PERI \leq 300$	Moderate
$80 < PERF \leq 160$	Considerable	$300 < PERI \leq 600$	Considerable
$160 < PERF \leq 320$	High	$600 < PERI$	High
$320 < PERF$	Very high	-	-

<sup>a</sup>Hakanson (1980).

**Table 3S**

Reference daily doses (Rfd)<sup>a</sup> and slope factors (SF)<sup>b</sup> considered for human health risk assessment.

Element	Ingestion		Inhalation		Dermal contact	
	Rfd	SF	Rfd	SF	Rfd	SF
Cu	$4.0 \times 10^{-2}$	-	$4.0 \times 10^{-2}$	-	$1.2 \times 10^{-2}$	-
Cr	$3.0 \times 10^{-3}$	42	$2.9 \times 10^{-5}$	42	$6.0 \times 10^{-5}$	42
Ni	$2.0 \times 10^{-2}$	$8.4 \times 10^{-1}$	$2.1 \times 10^{-2}$	$8.4 \times 10^{-1}$	$5.4 \times 10^{-4}$	$8.4 \times 10^{-1}$

<sup>a</sup>USEPA (2001).

<sup>b</sup>Lu et al. (2014).

**Table 4S**

Chemical fractionation and mobility factor of copper in forest soil and copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.

Forest soil	
Exchangeable (mg kg <sup>-1</sup> )	0.74
Reducible (mg kg <sup>-1</sup> )	0.30
Oxidable (mg kg <sup>-1</sup> )	21.74
Residual (mg kg <sup>-1</sup> )	415.94
Mobility factor (%)	0.16
Artisanal overburden	
Exchangeable (mg kg <sup>-1</sup> )	274.07
Reducible (mg kg <sup>-1</sup> )	285.97
Oxidable (mg kg <sup>-1</sup> )	165.52
Residual (mg kg <sup>-1</sup> )	1387.78
Mobility factor (%)	12.97
Artisanal rock waste	
Exchangeable (mg kg <sup>-1</sup> )	3705.10
Reducible (mg kg <sup>-1</sup> )	6951.90
Oxidable (mg kg <sup>-1</sup> )	968.53
Residual (mg kg <sup>-1</sup> )	7407.57
Mobility factor (%)	19.47
Industrial tailing	
Exchangeable (mg kg <sup>-1</sup> )	83.00
Reducible (mg kg <sup>-1</sup> )	29.60
Oxidable (mg kg <sup>-1</sup> )	474.65
Residual (mg kg <sup>-1</sup> )	899.26
Mobility factor (%)	5.58

**Table 5S**

Pearson's correlation between potentially toxic elements in copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.

	As	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	Zn	S	Al	Fe
As	1.0														
Ba	-0.3	1.0													
Cd	-0.8*	0.2	1.0												
Co	0.3	0.7*	-0.3	1.0											
Cr	0.7*	0.4	-0.7*	0.8*	1.0										
Cu	0.4	0.2	-0.4	0.3	0.6*	1.0									
Hg	-0.5*	0.5*	0.5*	0.3	-0.2	-0.7*	1.0								
Mn	-0.6*	0.1	0.6*	0.0	-0.5*	-0.9*	0.9*	1.0							
Mo	0.7*	-0.8*	-0.7*	-0.3	0.2	0.3	-0.8*	-0.5*	1.0						
Ni	0.8*	-0.1	-0.8*	0.4	0.8*	0.7*	-0.7*	-0.8*	0.7*	1.0					
Pb	-0.6*	-0.2	0.6*	-0.5*	-0.9*	-0.7*	0.6*	0.8*	-0.3	-0.8*	1.0				
Zn	-0.7*	0.0	0.7*	-0.4	-0.8*	-0.8*	0.7 <sub>v</sub>	0.9*	-0.5*	-0.9*	0.9*	1.0			
S	0.1	-0.8*	0.0	-0.5*	-0.5*	-0.5*	-0.1	0.3	0.5*	-0.1	0.6*	0.4	1.0		
Al	0.1	0.8*	-0.2	0.7*	0.7*	0.7*	0.0	-0.4	-0.4	0.4	-0.6*	-0.6*	-0.8*	1.0	
Fe	0.8*	-0.2	-0.8*	0.6*	0.8*	0.5*	-0.4	-0.4	0.6*	0.9*	-0.6*	-0.7*	0.1	0.3	1.0

\* Significant correlations  $p < 0.05$

**Table 6S**

Pearson's correlation between potentially toxic elements and properties of copper mining wastes from the eastern Amazon - Brazil.

	pH	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	CEC <sup>a</sup>	P	K <sup>+</sup>	Cu <sup>b</sup>	OC <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup>	Sand	Silt	Clay
As	0.1	0.5*	-0.8*	0.3	-0.4	0.5*	-0.5*	-0.7*	0.0	0.2	0.3	-0.8*	0.1
Ba	0.7*	-0.8*	0.1	0.5*	-0.6*	0.4	0.4	0.3	-0.9*	0.4	0.7*	-0.1	-0.7*
Cd	-0.2	-0.4	0.7*	-0.3	0.4	-0.5*	0.4	0.6*	0.0	-0.1	-0.4	0.7*	0.0
Co	0.6*	-0.1	-0.6*	0.6*	-0.9*	0.6*	-0.4	-0.5*	-0.7*	0.3	0.7*	-0.7*	-0.4
Cr	0.7*	-0.0	-0.8*	0.7*	-0.9*	0.8*	-0.3	-0.1	-0.6*	0.4	0.8*	-0.9*	-0.5*
Cu	0.7*	-0.4	-0.1	0.7*	-0.4	0.7*	0.4	0.1	-0.6*	0.5*	0.7*	-0.3	-0.7*
Hg	-0.2	-0.1	0.0	-0.3	-0.1	-0.4	-0.2	0.1	-0.1	-0.2	-0.2	0.1	0.2
Mn	-0.5*	0.2	0.1	-0.6*	0.2	-0.7*	-0.3	0.1	0.3	-0.4	-0.6*	0.3	0.5*
Mo	-0.2	0.7*	-0.4	-0.0	0.2	0.1	-0.4	-0.6*	0.5*	-0.0	-0.2	-0.4	0.4
Ni	0.5*	0.2	-0.7*	0.6*	-0.5*	0.7*	-0.3	-0.6*	-0.2	0.4	0.6*	-0.8*	-0.3
Pb	-0.7*	0.2	0.5*	-0.8*	0.7*	-0.8*	0.0	0.4	0.6*	-0.5*	-0.8*	0.7*	0.6*
Zn	-0.6*	0.1	0.5*	-0.7*	0.5*	-0.8*	-0.0	0.4	0.4	-0.4	-0.8*	0.6*	0.5*
S	-0.1	0.8*	-0.1	-0.6*	0.6*	-0.5*	-0.5*	-0.3	0.9*	-0.3	-0.8*	0.1	0.9*
Al	0.9*	-0.7*	-0.2	0.8*	-0.8*	0.7*	0.3	0.1	-1.0*	0.5*	0.9*	-0.4	-0.9*
Fe	0.2	0.5*	-0.8*	0.4	-0.5*	0.5*	-0.6*	-0.8*	-0.1	0.2	0.4	-0.8*	0.00

<sup>a</sup>Cation exchange capacity.

<sup>b</sup>Pseudo-total Cu concentration.

<sup>c</sup>Organic carbon.

<sup>d</sup>Inorganic carbon.

\* Significant correlations  $p < 0.05$

### 3. BACTÉRIA E ADUBAÇÃO ORGÂNICA COMO CONDICIONANTES PARA A FITORREMEDIAÇÃO COM *Cenostigma tocantinum* EM REJEITO DE MINERAÇÃO DE COBRE

#### RESUMO

A mineração na Amazônia brasileira faz parte de um importante setor da economia nacional, mas produz resíduos que devem ser tratados para reduzir os efeitos negativos da sua disposição no ambiente. A fitorremediação pode auxiliar a restauração das áreas alteradas pela mineração, empregando novas abordagens para superar a alta concentração de elementos potencialmente tóxicos (EPTs) que afeta o crescimento das plantas. A integração de biotecnologias como bactérias e compostos é proposta para facilitar o crescimento da vegetação e acelerar a recuperação dos locais de mineração. O objetivo foi avaliar o desenvolvimento de *Cenostigma tocantinum* inoculada com bactéria em rejeito de mineração de cobre (Cu) tratado com composto orgânico para fins de fitorremediação. Plantas, solo e rejeitos de mineração de Cu foram coletados no município de Canaã dos Carajás - Pará. Das raízes de *Solanum torvum* foi isolada a cepa bacteriana testada para promoção de crescimento. O rejeito de mineração foi tratado com solo e composto orgânico de caroço de açaí em diferentes proporções (v/v), cujos tratamentos consistiram em: solo, rejeito, rejeito + solo (RS), rejeito + composto (RCO) e rejeito + solo + composto (RSCO). Sementes de *C. tocantinum* foram tratadas sem e com inoculação bacteriana. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação durante 100 dias e ao final as plantas foram avaliadas quanto as variáveis biométricas. As médias foram testadas pelo teste de Skott-Knott ( $p < 0,05$ ). O composto orgânico reduziu o pH, aumentou o conteúdo de carbono orgânico e disponibilizou Cu ao tratar o rejeito. Para as plantas, o composto beneficiou a produção de biomassa, produzindo plantas de alta qualidade e tolerância em ambiente contaminado. A inoculação bacteriana favoreceu a germinação das sementes no rejeito sem tratamento e aumentou a capacidade de fitoestabilização de *C. tocantinum*.

**Palavras-chave:** EPT; resíduos orgânicos; espécie nativa; promotores de crescimento; açaí.

## BACTERIA AND ORGANIC FERTILIZATION AS CONDITIONS FOR PHYTORREMEDICATION WITH *Cenostigma tocaninum* IN COPPER MINING TAILING

### ABSTRACT

Mining in the Brazilian Amazon is part of an important sector of the national economy, but it produces waste that must be treated to reduce the negative effects of its disposal on the environment. Phytoremediation can help restore areas altered by mining, employing new approaches to overcome the high concentration of potentially toxic elements (EPTs) that affect plant growth. The integration of biotechnologies such as bacteria and compounds is proposed to facilitate vegetation growth and accelerate the recovery of mining sites. The objective was to evaluate the development of *Cenostigma tocaninum* inoculated with bacteria in copper (Cu) mining tailings treated with organic compost for phytoremediation purposes. Plants, soil and Cu mining tailings were collected in the municipality of Canaã dos Carajás - Pará. The bacterial strain tested for growth promotion was isolated from the roots of *Solanum torvum*. The mining tailings were treated with soil and organic compost of açai kernels in different proportions (v/v), whose treatments consisted of: soil, tailings, tailings + soil (RS), tailings + compost (RCO) and tailings + soil + composite (RSCO). Seeds of *C. tocaninum* were treated with and without bacterial inoculation. The experiments were carried out in a greenhouse for 100 days and at the end the plants were evaluated for biometric variables. Means were tested by the Skott-Knott test ( $p < 0.05$ ). The organic compost reduced the pH, increased the organic carbon content and made Cu available when treating the tailings. For the plants, the compost benefited the production of biomass, producing plants of high quality and tolerance in a contaminated environment. Bacterial inoculation favored seed germination in the untreated tailings and increased the phytostabilization capacity of *C. tocaninum*.

**Key-words:** PTE; organic wastes; native species; growth promoters; acai.



### 3.1. Introdução

A mineração de cobre (Cu) na Província Mineral de Carajás, Amazônia oriental, é uma atividade de grande relevância socioeconômica para a população local (JULIANI et al., 2016). Todavia, a mineração e o processamento de minerais metálicos são fontes potenciais de contaminação do solo com elementos potencialmente tóxicos (EPTs), podendo colocar em risco a saúde humana e dos ecossistemas (HE et al., 2020).

Os rejeitos gerados pela mineração de Cu podem conter níveis elevados de Cu residual e outros EPTs perigosos persistentes no ambiente (PERLATTI et al., 2021). Mais limitações químicas frequentemente associadas a esses resíduos incluem o baixo conteúdo de matéria orgânica (MO) e nutrientes (CHILESHE et al., 2020), baixa capacidade de troca catiônica e pH extremamente ácido (FORJÁN et al., 2017), que restringem o estabelecimento natural da vegetação e intensificam a erosão pela chuva e vento.

A revegetação das áreas alteradas pelas atividades de mineração é recomendada como método de mitigação dos impactos e restauração de funções ecológicas (LIMA et al., 2015). Porém, ao se tratar de resíduos de mineração a revegetação se torna dificultosa pela composição complexa destes materiais, comprometendo o sucesso da sua implantação e manejo (FELLET et al., 2011). A fitorremediação pode auxiliar no êxito dos programas de revegetação destinados a região, pois utiliza plantas tolerantes para minimizar os efeitos tóxicos do potencial contaminante no meio ambiente (COVRE et al., 2020), mas precisa ser desenvolvida de acordo com as especificidades locais.

Espécies de plantas nativas que crescem em ambientes adversos, possuem capacidade de adaptação e rusticidade, representando alto potencial de uso para fins recomposição vegetal (SILVA et al., 2015). Recriar comunidades de plantas que refletem a diversidade e composição natural circundante as áreas de mineração devem ser o objetivo principal dos projetos de revegetação (PÁRRAGA-AGUADO et al., 2013). A espécie arbórea *Cenostigama tocaninum* Ducke, pertencente à família Fabaceae, ocorre naturalmente em toda região amazônica podendo se desenvolver em locais adversos com crescimento rápido e satisfatório (CRUZ, 2017). Características que tornam a *C. tocaninum* de interesse para a fitorremediação de ambientes contaminados por Cu como as áreas de mineração da região.

Em larga escala, novas abordagens de fitorremediação tem se mostrado mais eficazes por combinar técnicas que visam aumentar o desempenho das plantas ao mesmo tempo que promove melhorias no substrato (SARWAR et al., 2017; GIL-LOAIZA et al., 2016). O uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas e de resíduos orgânicos das mais variadas

origens, está cada vez mais difundido nos estudos de fitorremediação (JU et al., 2019; SOUZA et al., 2019; FORJÁN et al., 2017; BURGÉS et al., 2017; GIL-LOAIZA et al., 2016).

As bactérias promotoras de crescimento têm consolidado o seu grande potencial para facilitar a fitorremediação de sítios contaminados com metais por melhorar o crescimento das plantas direta e/ou indiretamente sob estresse por EPTs (NAYAK et al., 2018), produzir agentes quelantes de EPTs (MA et al., 2016) e promover o desenvolvimento microbiano do substrato e a disponibilidade de nutrientes (JU et al., 2019). Uma ampla variedade dessas bactérias, como os *Bacillus* spp., já foram isoladas de plantas dos locais de mineração e estimularam o crescimento e acúmulo de EPTs em outras espécies vegetais em ambientes contaminados (NAYAK et al., 2018; MA et al., 2016).

Resíduos orgânicos têm sido bastante utilizados como tratamento na recuperação de solos de áreas de mineração, pois supre a necessidade em grande escala desse material, assim como atua como fonte de matéria orgânica e proporciona o aumento do conteúdo de nutrientes biodisponíveis (FORJÁN et al., 2017). No estado do Pará, os resíduos da produção de açaí (*Euterpe Oleracea* Mart.) como os caroços pós despulpa, são encontrados em abundância (WYCOFF et al., 2015) e apresentaram potencial para remediação devido à imobilização EPTs, incremento de MO e nutrientes ao solo, além de aumentar a biomassa de plantas de alface. (SOUZA et al., 2019).

A integração de biotecnologias é proposta para facilitar o crescimento da vegetação e acelerar a recuperação dos locais de mineração (SEVILLA-PEREA; MINGORANCE, 2015). Neste contexto, o objetivo foi avaliar o crescimento de *C. tocanthum* inoculada com bactéria em rejeito de mineração de Cu tratado com composto orgânico para fins de fitorremediação.

## **3.2. Material e métodos**

### **3.2.1. Produção de composto orgânico**

O composto utilizado como tratamento orgânico foi produzido de caroço de açaí coletado nos pontos de venda da polpa na cidade de Belém e de esterco bovino proveniente da criação da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). O processo de compostagem foi conduzido durante 120 dias de acordo com Teixeira et al. (2005), no qual cerca de 150 kg de caroço de açaí foi triturado e misturado com esterco bovino na proporção de 65% (v/v), mantido em leira com 1,2 m de altura com controle da umidade e revolvimento a cada 15 dias. Amostras do composto foram separadas para posterior caracterização química.

### 3.2.2. Coleta dos materiais

Plantas, solo e rejeito de mineração de Cu foram coletados no município de Canaã dos Carajás (06°29'49" S e 49°52'42" W), sudeste do Pará, Amazônia Oriental. Duas minas de Cu do município foram utilizadas para amostragem dos materiais, uma considerada artesanal devido aos métodos rudimentares empregados e menor escala de exploração, e a outra industrial com processos de extração atuais bem definidos e exploração em grande escala.

O solo foi coletado a uma profundidade de 0-20 cm em uma área de floresta remanescente nas proximidades da mina artesanal (06°24.614' S e 49°52.346' W). Plantas que cresciam naturalmente com grande incidência nas pilhas de resíduos de sobrecarga distribuídos ao longo da área de exploração artesanal de Cu foram selecionadas para o isolamento da bactéria. Na mina industrial (06°27.109' S e 50°04.758' W) foi coletado o rejeito disposto em barragem de contenção de rejeitos do beneficiamento de minério de Cu.

O solo e o rejeito de mineração foram armazenados em sacos de polietileno e as plantas acondicionadas em sacos de papel em ambiente refrigerado, então transportados a Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) campus Belém.

### 3.2.3. Isolamento da cepa bacteriana

A cepa bacteriana endofítica utilizada foi isolada das raízes de *Solanum torvum* coletada na mina artesanal de Cu, adaptado conforme descrito por Burges et al. (2017). As raízes foram desinfetadas por imersão em álcool 70% durante 2 min, em solução de hipoclorito a 3% durante 3 min e, por fim, enxaguados três vezes com água destilada esterilizada. Foram macerados 1 g de matéria fresca das raízes em 10 mL de solução de água salina (0,85% NaCl), utilizando um almofariz e pistilo, adicionando areia de quartzo para melhorar a ruptura da parede e incubando à temperatura ambiente em um agitador orbital por 1 h. Os extratos foram diluídos em série até  $10^{-3}$  com solução de água salina e, em seguida, alíquotas de 100 µL de cada diluição foram espalhadas em placas (em triplicata) contendo meio de cultura 523 proposto por Kado e Heskett (1970). As placas foram incubadas a 28 ° C durante 72 h. Com base nas características morfológicas (cor, tamanho e forma), diferentes colônias foram selecionadas e semeadas para a obtenção de culturas puras.

As cepas bacterianas selecionadas foram avaliadas quanto à coloração de Gram, que se baseia na capacidade que certas bactérias possuem em reter a coloração de cristal violeta após a descoloração com álcool e, nesse caso, denominadas Gram-positivas (LIMA et al., 2011). Bactérias Gram-positivas apresentam resistência a íons metálicos devido a alterações na

composição da parede e/ou membrana celular, restringindo a permeabilidade desses elementos e protegendo seus componentes celulares essenciais (NANDA et al., 2019).

#### 3.2.4. Caracterização da cepa bacteriana

A avaliação da produção de ácido indol-3-acético (AIA) foi adaptada conforme descrito por Gordon (1951). A cepa bacteriana foi cultivada em tubos contendo 10 mL de meio líquido de tripticaseína de soja diluída 1/10 (4 g em 1000 mL de água destilada), adicionado de triptofano ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e colocado em agitador rotativo por 72 h a  $28^\circ \text{C}$  e 100 rpm. As culturas foram centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min. Em seguida, 90  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferido para um microtubo contendo 60  $\mu\text{L}$  de reagente Salkowski. Os microtubos foram envolvidos em papel alumínio e acondicionados no escuro durante 30 min a 2 h. Uma mudança na cor rosada na solução indica a presença de AIA.

A capacidade de solubilização de fosfato da bactéria foi determinada inoculando a cultura bacteriana em meio NBRIP a  $25^\circ \text{C}$  durante 5 dias (NAUTIYAL, 1999). O meio foi preparado com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de ágar,  $10 \text{ g L}^{-1}$  de glicose,  $2,5 \text{ g L}^{-1}$   $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $5 \text{ g L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $0,25 \text{ g L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $0,2 \text{ g L}^{-1}$   $\text{KCl}$  e  $0,1 \text{ g L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , ajustando o pH a 7,0. A capacidade da bactéria de solubilizar o fosfato insolúvel é indicada pela formação de um círculo transparente ao redor de cada colônia (NAUTIYAL, 1999).

A produção de sideróforos foi verificada em tubo de ensaio contendo solução indicadora de cromo azurol S (CAS) de acordo com Schwyn e Neilands (1987). A cepa foi inoculada em tubos de ensaio com meio líquido de tripticaseína de sojaseguido de incubação a  $28^\circ \text{C}$  por 24 h. Posteriormente, a suspensão de células foi centrifugada a  $12000 \text{ g}$  por 10 min, transferindo em seguida, 1 mL do sobrenadante para microtubos contendo 1 mL de CAS. Os microtubos foram envolvidos em papel alumínio e incubados por 15 min. A conversão da coloração azul da solução CAS para amarelo é o indicativo da produção de sideróforos e o tempo de transformação e intensidade do amarelo são indicativos de maior ou menor produção de sideróforos.

#### 3.2.5. Identificação genética da bactéria

A cepa bacteriana endofítica foi identificada usando análise de 16S rDNA. O DNA foi extraído usando o protocolo CTAB (brometo de cetil trimetil amônio) descrito por (DOYLE; DOYLE, 1990) modificado. Para obter sequências de 16S rDNA, o DNA genômico foi amplificado com PCR usando os iniciadores ... com aproximadamente 1500 pares de base de amplificação. Os produtos amplificados por PCR foram sequenciados na .... Sequências do

isolado bacteriano juntamente com outras sequências de genes de referência foram comparadas ao banco de dados GenBank usando o programa NCBI Blast e uma árvore filogenética construída usando o software de bioinformática Mega 7.0.

### 3.2.6. Teste de promoção de crescimento

A cepa bacteriana foi previamente testada para a promoção de crescimento em plantas de arroz (cultivar. Primavera Clearfield) utilizando um Latossolo Amarelo típico proveniente de floresta secundária, autoclavado a 121 ° C por 20 min. Uma suspensão bacteriana foi preparada com água destilada esterilizada, e a concentração ajustada em espectrofotômetro para densidade óptica de 550 nm ( $A_{550} = 0,1 \text{ ABS}$  correspondendo a  $10^8 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Os tratamentos consistiram no controle (sementes com água não inoculadas) e no isolado 23 (sementes inoculadas com a suspensão da cepa bacteriana selecionada). As sementes de arroz foram desinfetadas e então microbiolizadas por 24 horas a temperatura ambiente em agitador orbital. Após esse período 10 sementes de cada tratamento foram semeadas em vasos plásticos contendo 300 g de solo, de forma inteiramente casualizada, com 5 repetições.

Aos 10 dias após a semeadura um desbaste foi realizado, permanecendo 5 plantas por vaso. O experimento foi conduzido por 29 dias no total, quando as plantas foram colhidas, secas em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C, durante 72 h e os pesos conferidos em balança de precisão para a determinação da produção de matéria seca da raiz e parte aérea.

### 3.2.7. Desenho experimental e condições de crescimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação usando vasos de polietileno de 1 dm<sup>3</sup> (peso seco), preenchidos com rejeito de mineração industrial de Cu, solo de floresta e composto orgânico de caroço de açaí em diferentes misturas e proporções (Tabela 1). Os tratamentos foram previamente misturados, homogeneizados e incubados por 60 dias em sacos plásticos, com umidade próxima a 60% do volume total dos poros.

**Tabela 1.** Tratamentos identificados com as respectivas misturas e proporções.

Tratamento	Misturas	Proporção (v/v)
Solo	Solo de floresta	100%
Rejeito	Rejeito de mineração de Cu	100%
R+S	Rejeito + Solo	70% + 30%
R+CO	Rejeito + Composto orgânico	70% + 30%
R+S+CO	Rejeito + Solo + Composto orgânico	70% + 20% + 10%

Após o período de incubação dos tratamentos foi realizado o semeio de 10 sementes da espécie *C. tocaninum* por vaso. Os valores médios de comprimento, largura e espessura dessas sementes foram de 14,8 mm, 4,2 mm e 12,9 mm, respectivamente, enquanto a massa média de 100 sementes era de 51,3 g. Antes do semeio as sementes foram desinfetadas e microbiolizadas durante 24h em água para os tratamentos não inoculados e na suspensão bacteriana a  $10^8$  UFC·mL para os tratamentos com inoculação bacteriana, conforme descrito no item 3.2.6.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com dez tratamentos e três repetições, totalizando 30 unidades experimentais. Durante a condução do experimento, a umidade foi mantida aproximadamente constante, a 60% do volume total de poros, através de regas diárias.

A germinação das sementes foi avaliada através de contagens diárias, sendo consideradas germinadas a partir do aparecimento dos cotilédones na superfície do substrato. Foram calculados a porcentagem e o índice de velocidade de germinação (IVG) seguindo as equações 1 (NOVO; GONZÁLEZ, 2014) e 2 (MAGUIRE, 1962), respectivamente, e o índice de vigor de plântulas (IVP) através da equação 3 utilizada por Novo e González (2014).

$$\text{Germinação (\%)} = 100 \times \text{n}^\circ \text{ de sementes germinadas} / \text{n}^\circ \text{ total de sementes} \quad (1)$$

$$\text{IVG} = N1/D1 + N2/D2 + \dots + Nn/Dn \quad (2)$$

Onde: N = números de plântulas verificadas no dia da contagem; e D = números de dias após a semeadura em que foi realizada a contagem.

$$\text{IVP} = \text{germinação (\%)} \times \text{comprimento radicular} \quad (3)$$

O crescimento inicial das plantas foi avaliado por meio de variáveis biométricas aos 25 dias após a semeadura, seguido de desbaste para manter uma planta por vaso, cultivadas por mais 75 dias. Ao final do experimento, as plantas remanescentes foram novamente avaliadas e então colhidas, lavadas em solução de detergente (0,1% v/v) e enxaguadas em água corrente e água deionizada. As avaliações biométricas consistiram em: comprimento radicular e altura de planta, por meio de fita métrica; diâmetro de coleto, utilizando paquímetro digital; conteúdo relativo de clorofila nas folhas do terço médio das plantas utilizando medidor SPAD-502-Plus; área foliar total, medida utilizando medidor de bancada (LI-3100C); e produção de matéria seca da raiz e parte aérea (folhas e caule), secas em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C, durante 72 h e os pesos conferidos em balança de precisão.

### 3.2.8. Análises químicas

Amostras do composto orgânico, do solo de floresta e do rejeito de mineração de Cu foram analisadas antes do experimento e as características gerais de cada material são mostradas na Tabela 2. Após o experimento foram retiradas amostras dos substratos de cada tratamento para as análises químicas subsequentes.

**Tabela 2.** Propriedades químicas do composto orgânico, solo de floresta e rejeito de mineração de Cu.

	pH	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	H+Al	CTC <sup>a</sup>	P	K <sup>+</sup>	CO <sup>b</sup>
	-	cmol <sub>c</sub> dm <sup>3</sup>				mg kg <sup>-1</sup>		g kg <sup>-1</sup>
Composto	5,2	2,0	2,5	6,4	7,5	371,3	1139,0	233,5
Solo	5,4	7,5	1,4	3,2	12,3	1,5	32,6	24,0
Rejeito	8,0	2,0	0,1	0,6	3,8	704,6	207,7	0,2

<sup>a</sup> capacidade de troca catiônica; <sup>b</sup> carbono orgânico.

O pH das amostras foi medido na proporção solo-água de 1:2,5. Os conteúdos trocáveis de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) e magnésio (Mg<sup>2+</sup>) foram extraídos com KCl 1 mol L<sup>-1</sup> e quantificados por complexometria com EDTA 0,0125 mol L<sup>-1</sup>. A acidez potencial (H+Al) foi liberada pela reação com uma solução não tamponante de KCl e determinada por titulação com NaOH na presença de fenolftaleína. Fósforo (P) e potássio (K<sup>+</sup>) foram extraídos por Mehlich 1 (0,05 HCl mol L<sup>-1</sup> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0125 mol L<sup>-1</sup>) e quantificados por espectrofotometria ultravioleta visível (P) e fotometria de chama (K<sup>+</sup>) (TEIXEIRA et al., 2017). A capacidade de troca catiônica (CTC) foi encontrada através da soma das concentrações de Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> e H+Al. O carbono foi determinado conforme descrito por Hussain et al. (2019), com quantificação de carbono orgânico (CO) por perda de ignição a 450 ° C.

As concentrações pseudo-totais e biodisponíveis de Cu das amostras foram extraídas por digestão ácida (HCl:HNO<sub>3</sub> 3:1) em forno microondas (MCGRATH; CUNLIFFE, 1985) e por solução de DTPA 0,05 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,3), respectivamente. A matéria seca das plantas foi triturada em moinho Willey e processada em peneira de 20 mesh. As concentrações de Cu nos tecidos vegetais foram extraídas de 250 mg de amostra através de digestão ácida em microondas, envolvendo a adição de 2 mL de HNO<sub>3</sub> + 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 5 mL de água ultrapura (MS 2000, Gehaka) (ARAÚJO et al., 2002).

O Cu foi quantificado nos extratos por espectrometria de massa com plasma acoplado por indução (ICO-MS, Perkin Elmer). A qualidade analítica foi avaliada por meio de amostras em branco e materiais de referência certificados para concentração de PTEs em solos (ERM® CC-141) e plantas (ERM® CD-281). As taxas de recuperação foram de 97% dos substratos e 95% das plantas.

### 3.2.9. Parâmetros de eficiência de fitorremediação

O índice de tolerância (IT) das plantas ao Cu foi calculado a partir da relação matéria seca total (MST) das plantas sob doses de Cu e matéria seca total das plantas do tratamento controle (MSTc), conforme a equação 4 (SOUZA et al. 2012):

$$IT = MST (g) / MSTc (g) \quad (4)$$

O índice de qualidade de Dickson (IQD) foi determinado em função da altura (H), diâmetro de coleto (DC), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR) e matéria seca total (MST), utilizando a fórmula descrita na equação 5 (DICKSON et al. 1960).

$$IQD = [MST (g)] / [\{(H (cm)/ DC (mm))\} + \{MSPA (g) / MSR (g)\}] \quad (5)$$

Os fatores de translocação (FT) da raiz para a parte aérea e de bioconcentração (FBC) foram calculados de acordo com as equações 6 e 7 descritas por Hussain et al. (2017), e o fator de biotransferência (FBT) seguindo a equação 8, adaptada de Rodríguez-Vila et al. (2014):

$$FT = [Cu]_{\text{parte aérea}} / [Cu]_{\text{raiz}} \quad (6)$$

$$FBC = [Cu]_{\text{raiz}} / [Cu]_{\text{solo total}} \quad (7)$$

$$FBT = [Cu]_{\text{raiz}} / [Cu]_{\text{solo disponível}} \quad (8)$$

### 3.2.10. Análises estatísticas

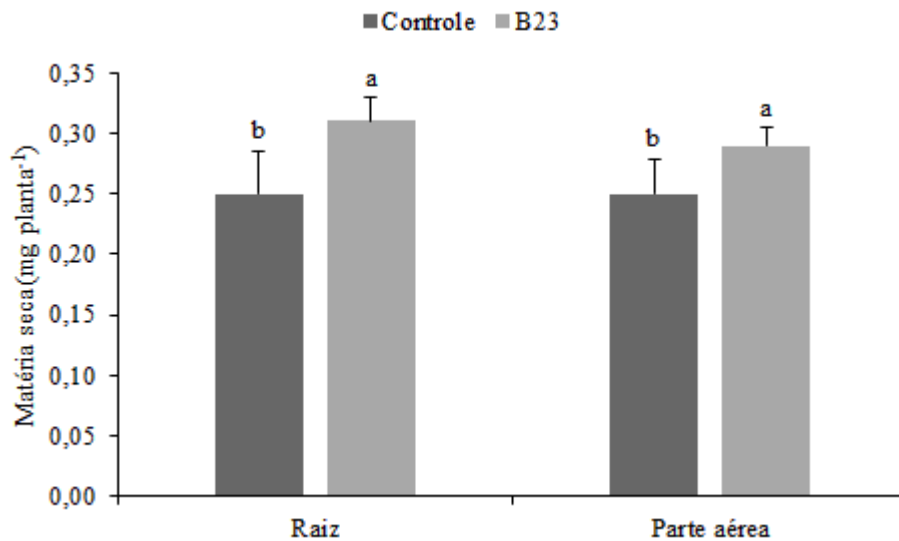
Os dados obtidos foram submetidos a análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade da variância pelo teste de Bartlett. A porcentagem de germinação foi normalizada através de arco seno e as demais normalizações quando necessárias, por meio de log transformações. Para verificar o efeito dos tratamentos nas variáveis de estudo, os resultados foram submetidos à análise de variância e quando significativos pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas por meio do software R (versão 3.4.3) (R Core Team, 2017).



### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Caracterização da cepa bacteriana

Durante a triagem inicial, um total de 6 cepas bacterianas Gram positivas (+) foram selecionadas para teste de promoção de crescimento de plantas em arroz. Contudo, apenas a cepa B23 promoveu o crescimento das plantas, cujos ganhos significativos ( $p < 0,05$ ) na produção de matéria seca de raiz e de parte aérea em comparação ao controle (sem inoculação) são mostrados na figura 1.



**Figura 1.** Matéria seca da raiz e parte aérea de plantas de arroz inoculadas com a cepa bacteriana B23. Barras seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

O crescimento melhorado das plantas de arroz devido a inoculação bacteriana levou a caracterização dos traços de promoção de crescimento de plantas. Além de Gram positiva, a cepa bacteriana isolada demonstrou capacidade de produção de sideróforos, porém, a síntese de ácido indol-3-acético (AIA) e capacidade de solubilização de fosfato não foram observadas (Tabela 3)

**Tabela 3.** Coloração Gram e características de promoção de crescimento de plantas da cepa bacteriana selecionada.

Cepa	Coloração Gram	Síntese de AIA <sup>a</sup>	Produção de sideróforo	Solubilização de P <sup>b</sup>
B23	+	-	+	-

+, positivo; -, negativo.

### 3.3.2. Germinação e crescimento inicial

As porcentagens de germinação de sementes de *C. tocaninum* foram baixas para a maioria dos tratamentos utilizados (Tabela 4). As sementes semeadas no rejeito de mineração de Cu com inoculação e no RS sem e com inoculação foram significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores que os demais tratamentos, se igualando a germinação obtida no solo. Contudo, o índice de velocidade de germinação (IVG) e o índice de vigor de plântulas (IVP) de *C. tocaninum* foram mais elevados apenas no tratamento RS, se igualando aos índices obtidos no solo (Tabela 4).

**Tabela 4.** Porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), índice de vigor de plântulas (IVP), comprimento radicular (CR) e matéria seca total (MST) de *C. tocaninum* aos 25 dias após o semeio.

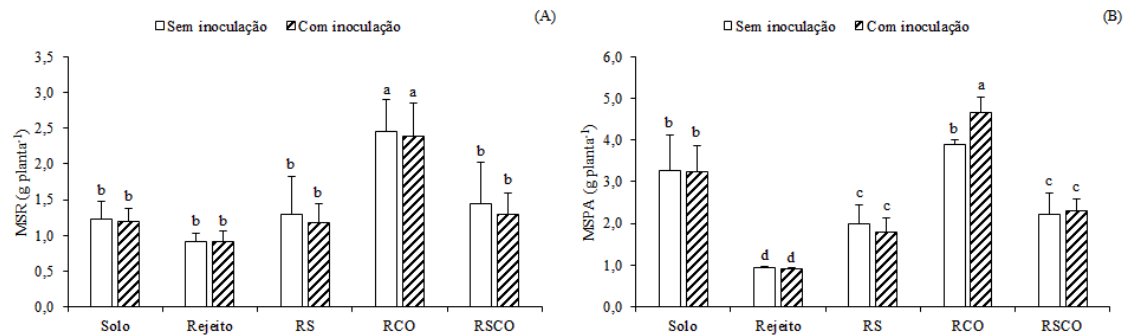
	Solo	Rejeito	RS	RCO	RSCO
	Sem inoculação				
Germinação (%)	63,3 ± 4,7 a	30,0 ± 8,1 b	56,7 ± 4,7 a	36,7 ± 4,7 b	27,0 ± 4,7 b
IVG	3,6 ± 0,4 a	2,0 ± 0,4 b	4,2 ± 0,6 a	1,9 ± 0,2 b	1,7 ± 0,3 b
IVP	468,2 ± 54,7 a	377,5 ± 5,4 b	451,6 ± 72,5 a	353,8 ± 57,9 b	230,7 ± 38,0 b
CR (cm)	7,4 ± 0,6 d	12,6 ± 0,1 a	8,0 ± 0,2 c	9,7 ± 0,9 b	8,7 ± 1,3 c
MST (mg planta <sup>-1</sup> )	337,3 ± 59,3 a	293,6 ± 81,2 a	416,6 ± 6,7 a	261,0 ± 49,0 a	432,3 ± 50,4 a
	Com inoculação				
Germinação (%)	70,0 ± 8,1 a	53,3 ± 4,7 a	60,0 ± 8,2 a	40,0 ± 8,1 b	30,0 ± 8,1 b
IVG	3,3 ± 0,9 a	2,6 ± 0,4 b	3,7 ± 0,3 a	1,8 ± 0,3 b	1,6 ± 0,2 b
IVP	442,6 ± 70,3 a	337,4 ± 51,9 b	566,8 ± 16,8 a	345,0 ± 5,7 b	306,0 ± 75,7 b
CR (cm)	8,5 ± 1,0 c	6,3 ± 0,1 d	9,0 ± 0,8 c	8,6 ± 0,1 c	10,2 ± 0,8 b
MST (mg planta <sup>-1</sup> )	439,6 ± 39,0 a	336,2 ± 41,7 a	379,0 ± 31,6 a	291,0 ± 73,0 a	353,4 ± 105,3 a

RS - Rejeito + Solo, RCO - Rejeito + Composto Orgânico, RSCO - Rejeito + Solo + Composto Orgânico. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

O comprimento radicular (CR) das plântulas aos 25 dias após a semeadura no rejeito foi consideravelmente superior aos tratamentos aplicados. Nenhuma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foi registrada entre os tratamentos para a matéria seca total (MST) das plântulas.

### 3.3.3. Crescimento e tolerância das mudas

A matéria seca de raiz (MSR) e de parte aérea (MSPA) de plantas de *C. tocaninum* foram medidas 100 dias após a semeadura no rejeito de mineração de Cu e variaram ( $p < 0,05$ ) conforme os tratamentos aplicados (Figura 2 A e B). Uma ausência de variação na MSR foi verificada entre plantas cultivadas no solo e aquelas do rejeito de mineração. O ganho na produção de MSR foi significativamente ( $p < 0,05$ ) mais elevado nas plantas do tratamento RCO em relação aos obtidos para os demais tratamentos, não havendo diferença entre plantas sem e com inoculação bacteriana (Figura 2 A).



**Figura 2.** Matéria seca de raiz - MSR (A) e matéria seca de parte aérea - MSPA (B) de plantas de *C. tocaninum* após experimento. RS – Rejeito + Solo, RCO – Rejeito + Composto Orgânico, RSCO – Rejeito + Solo + Composto Orgânico. Barras seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

O tratamento RCO também influenciou positivamente a produção de MSPA de *C. tocaninum*, com o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) promovido pela inoculação bacteriana endofítica nas plantas em cerca de 253% acima da MSPA obtida naquelas do rejeito, correspondendo a 4,66 g planta<sup>-1</sup>. Comportamento contrário foi encontrado nas plantas cultivadas no rejeito independente de inoculação bacteriana com redução média de aproximadamente 247% na MSPA em relação as plantas do solo.

A parte aérea de *C. tocaninum* foi consideravelmente beneficiada pelos tratamentos adicionados e os ganhos na MSPA corresponderam aos aumentos promovidos na altura, diâmetro de caule (DC), número de folíolos (NF) e área foliar (AF) das plantas, sobretudo no tratamento RCO (Tabela 5). A redução da AF de *C. tocaninum* cultivada no rejeito de mineração foi bastante acentuada, enquanto um efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para o aumento da AF nas plantas foi obtido com o tratamento RCO (Tabela 5). O conteúdo relativo de clorofila foi mais o elevado ( $p < 0,05$ ) nas plantas cultivadas no solo, seguido das plantas inoculadas RS e das plantas RCO sem e com inoculação. O cultivo das plantas no rejeito de mineração de Cu ainda que tratado, reduziu o conteúdo relativo de clorofila.

**Tabela 5.** Altura, diâmetro de caule (DC), área foliar (AF), número de folíolos (NF), conteúdo relativo de clorofila, índice de qualidade de Dickson (IQD) e índice de tolerância (IT) de *C. tocaninum* após o experimento.

	Solo	Rejeito	RS	RCO	RSCO
Sem inoculação					
Altura (cm)	24,5 ± 2,7 a	15,9 ± 1,0 b	18,3 ± 2,2 b	24,2 ± 2,3 a	18,6 ± 3,0 a
DC (mm)	3,9 ± 0,4 b	3,3 ± 0,1 c	4,0 ± 0,3 b	5,1 ± 0,5 a	4,1 ± 0,3 b
AF (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	440,4 ± 126,4 b	115,1 ± 9,1 d	230,7 ± 24,6 c	560,2 ± 30,6 a	298,2 ± 69,6 c
NF	51,3 ± 7,8 b	20,3 ± 3,4 c	38,7 ± 9,6 b	58,0 ± 6,7 a	48,3 ± 7,0 b
Clorofila/SPAD	29,5 ± 3,3 a	19,0 ± 0,9 c	19,9 ± 2,4 c	22,6 ± 3,3 b	19,3 ± 2,6 c
IQD	0,50 ± 0,10 b	0,31 ± 0,03 b	0,53 ± 0,17 b	0,99 ± 0,15 a	0,60 ± 0,18 b
IT	-	0,42 ± 0,03 c	0,73 ± 0,22 b	1,41 ± 0,12 a	0,82 ± 0,24 b
Com inoculação					
Altura (cm)	25,0 ± 1,5 a	13,9 ± 0,7 b	17,9 ± 1,9 b	26,4 ± 0,6 a	22,2 ± 1,6 a
DC (mm)	4,0 ± 0,1 b	3,2 ± 0,1 c	4,0 ± 0,2 b	5,1 ± 0,2 a	4,1 ± 0,1 c
AF (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	421,3 ± 61,6 b	113,2 ± 11,1 d	219,8 ± 20,9 c	668,2 ± 33,2 a	321,5 ± 74,8 c
NF	49,7 ± 4,1 b	20,3 ± 2,1 c	44,7 ± 9,4 b	71,7 ± 5,0 a	45,3 ± 7,8 b
Clorofila/SPAD	27,2 ± 3,5 a	15,9 ± 3,0 c	23,3 ± 1,4 b	24,0 ± 0,5 b	20,2 ± 1,1 c
IQD	0,50 ± 0,08 b	0,34 ± 0,03 b	0,49 ± 0,09 b	1,00 ± 0,19 a	0,50 ± 0,13 b
IT	-	0,41 ± 0,04 c	0,67 ± 0,13 b	1,59 ± 0,19 a	0,81 ± 0,12 b

RS - Rejeito + Solo, RCO – Rejeito + Composto Orgânico, RSCO – Rejeito + Solo + Composto Orgânico. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

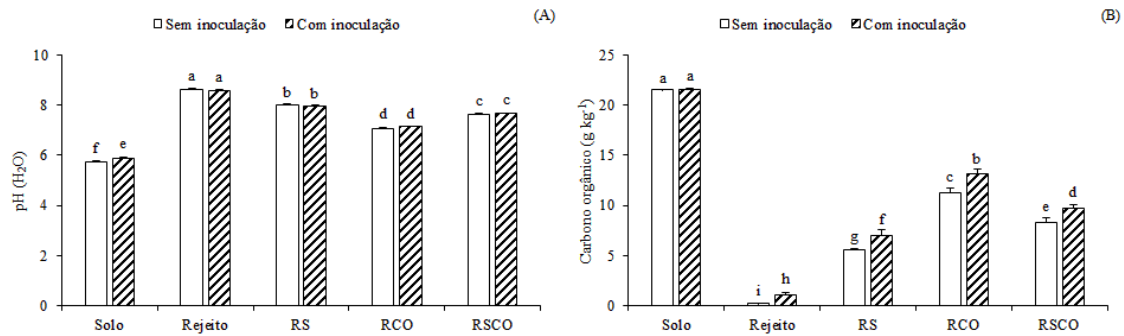
A redução da AF de *C. tocaninum* cultivada no rejeito de mineração foi bastante acentuada, enquanto um efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para o aumento da AF nas plantas foi obtido com o tratamento RCO (Tabela 5). O conteúdo relativo de clorofila foi mais o elevado ( $p < 0,05$ ) nas plantas cultivadas no solo, seguido das plantas inoculadas RS e das plantas RCO sem e com inoculação. O cultivo das plantas no rejeito de mineração de Cu ainda que tratado, reduziu o conteúdo relativo de clorofila.

Um melhor padrão de qualidade de mudas indicado pelo índice de qualidade de Dickson (IQD) foi atingido pelas plantas RCO, apresentando IQD significativamente ( $p < 0,05$ ) mais elevado em relação as demais, com valores equivalentes entre plantas sem e com inoculação bacteriana (0,99 e 1,00, respectivamente) (Tabela 5). De maneira similar, o RCO proporcionou maior tolerância das plantas as condições presentes no rejeito segundo o índice de tolerância (IT) de 1,59. Por outro lado, as plantas cultivadas no rejeito não tratado, mesmo sob inoculação bacteriana, mostraram baixa tolerância.

### 3.3.4. pH, CO e concentração de Cu após o experimento

O pH alcalino do rejeito foi significativamente ( $p < 0,05$ ) reduzido com a adição dos tratamentos e cultivo das plantas (Figura 3 A). A maior redução de pH foi observada no

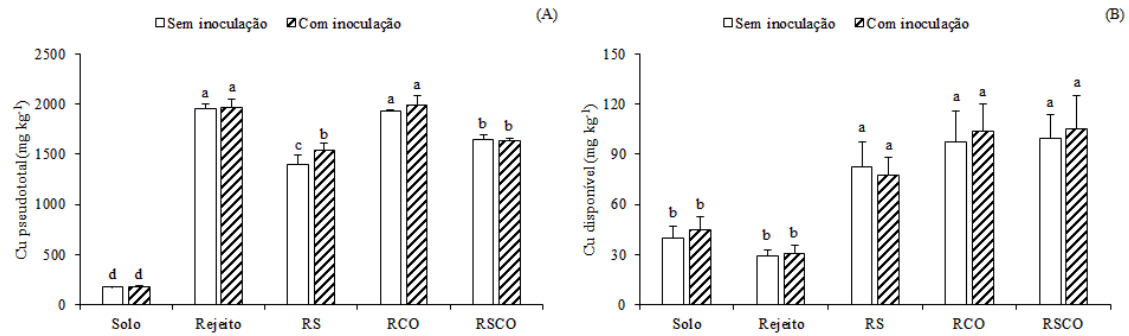
tratamento RCO chegando a uma faixa média de 7,1, seguido do tratamento RSCO com pH de 7,6. No solo, uma diferença de pH entre o cultivo com plantas sem e com inoculação foi observada.



**Figura 3.** pH (A) e conteúdo de carbono orgânico (B) nos substratos após o experimento. RS – Rejeito + Solo, RCO – Rejeito + Composto Orgânico, RSCO – Rejeito + Solo + Composto Orgânico. Barras seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Uma grande variação ( $p < 0,05$ ) no conteúdo de carbono orgânico (CO) dos substratos foi observada após o experimento, havendo diferenças significativas entre a inoculação e não inoculação das plantas (Figura 3 B). A adição dos tratamentos e a inoculação das plantas com a bactéria aumentou o conteúdo de CO nos substratos. Os maiores conteúdos de CO ocorreram nos tratamentos que receberam o composto orgânico. Contudo, de forma significativa o RCO com plantas inoculadas se sobressaiu em relação aos demais, apresentando  $13,1 \text{ g kg}^{-1}$  de CO. É importante destacar que o conteúdo de CO foi aumentado em 378% no rejeito cultivado com *C. tocaninum* inoculada com a bactéria em relação ao rejeito com a planta sem inoculação.

A adição dos tratamentos RS e RSCO ao rejeito de mineração reduziram a concentração pseudo-total de Cu após o experimento, enquanto no tratamento RCO a concentração de Cu permaneceu alta como a encontrada no rejeito (Figura 4 A).

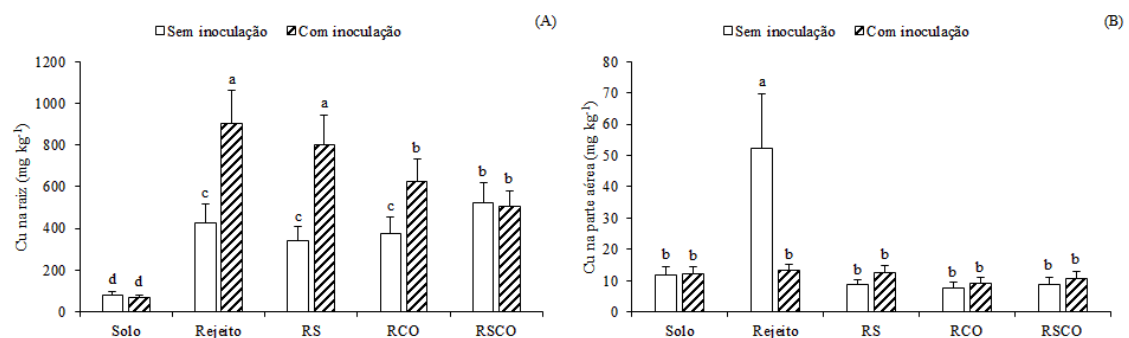


**Figura 4.** Concentração pseudo-total (A) e disponível (B) de Cu após o experimento. RS – Rejeito + Solo, RCO – Rejeito + Composto Orgânico, RSCO – Rejeito + Solo + Composto Orgânico. Barras seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

A inoculação bacteriana não influenciou a disponibilidade de Cu. A concentração disponível de Cu no rejeito sem tratamento foi baixa se assemelhando ( $p < 0,05$ ) a disponibilidade de Cu encontrada no solo (Figura 4 B). Em contrapartida, a adição dos tratamentos aumentou a disponibilidade de Cu após o experimento em 166% no RS, 235% no RCO e 240% no RSCO em relação a encontrada no rejeito (Figura 4 B).

### 3.3.5. Cu nas plantas

As plantas de *C. tocaninum* cultivadas no rejeito de mineração de Cu apresentaram concentrações elevadas do elemento na raiz variando ( $p < 0,05$ ) conforme o tratamento adicionado (Figura 5 A). Uma maior concentração de Cu na raiz em relação a parte aérea das plantas foi encontrada.



**Figura 5.** Concentração de Cu na raiz (A) e parte aérea (B) de *C. tocaninum* após o experimento. RS – Rejeito + Solo, RCO – Rejeito + Composto Orgânico, RSCO – Rejeito + Solo + Composto Orgânico. Barras seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

As concentrações mais baixas de Cu na raiz foram encontradas nas plantas do solo sem ( $80 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e com inoculação bacteriana ( $69 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Embora a inoculação bacteriana tenha contribuído de maneira menos efetiva para a promoção do crescimento de *C. tocaninum*, a

absorção de Cu pelas plantas foi fortemente influenciada pela cepa utilizada. A inoculação bacteriana nas plantas do rejeito dobrou a absorção de Cu em relação aquelas não inoculadas. Aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) da concentração de Cu foram verificados nas raízes das plantas inoculadas do rejeito não tratado e do tratamento RS, correspondendo a 905 e 800 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. O efeito positivo da bactéria também foi encontrado para a concentração de Cu nas raízes das plantas RCO. Na parte aérea das plantas, a concentração mais expressiva de Cu (52,4 mg kg<sup>-1</sup>) ocorreu apenas no rejeito sem nenhum tratamento, nos demais tratamentos a concentração variou de 7,7 a 13,2 mg kg<sup>-1</sup> sem diferenças significativas (Figura B).

Corroborando com as concentrações de Cu nas partes das plantas, o fator de translocação (FT) da raiz para a parte aérea foi baixo em todos os tratamentos (Tabela 6). O FT mais elevado ocorreu nas plantas inoculadas do solo, seguido das plantas sem inoculação do solo e do rejeito, respectivamente. Baixos fatores de bioconcentração (FBC) de Cu nas plantas foram verificados, sendo os mais elevados (0,067 e 0,069) naquelas do solo e do rejeito sem inoculação (0,026).

**Tabela 6.** Fatores de translocação (FT), bioconcentração (FBC) e biotransferência (FBT) de *C. tocaninum* após o experimento.

	Solo	Rejeito	RS	RCO	RSCO
	Sem inoculação				
FT	0,147 ± 0,008 b	0,130 ± 0,050 b	0,026 ± 0,002 c	0,021 ± 0,003 c	0,017 ± 0,001 c
FBC	0,067 ± 0,105 a	0,026 ± 0,048 b	0,006 ± 0,051 c	0,004 ± 0,041 c	0,005 ± 0,066 c
FBT	2,11 ± 0,62 c	15,14 ± 4,46 b	4,36 ± 1,24 c	4,13 ± 1,38 c	5,35 ± 1,20 c
	Com inoculação				
FT	0,180 ± 0,006 a	0,014 ± 0,001 c	0,015 ± 0,001 c	0,015 ± 0,001 c	0,021 ± 0,002 c
FBC	0,069 ± 0,061 a	0,007 ± 0,083 c	0,008 ± 0,110 c	0,005 ± 0,041 c	0,006 ± 0,049 c
FBT	1,63 ± 0,51 c	30,30 ± 7,83 a	10,66 ± 2,83 b	6,13 ± 1,23 c	5,00 ± 1,21 c

RS - Rejeito + Solo, RCO - Rejeito + Composto Orgânico, RSCO - Rejeito + Solo + Composto Orgânico. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Houve uma alta biotransferência de Cu da solução dos substratos para as raízes de *C. tocaninum*, que apresentou fatores de biotransferência (FBT) maiores que 1 em todos os tratamentos. A inoculação bacteriana nas plantas elevou em 100% o FBT de Cu para a raiz em relação aquelas não inoculadas no rejeito de mineração, estabelecendo o aumento mais significativo ( $p < 0,05$ ) verificado, com FBT de 30,3. A bactéria também favoreceu o FBT de Cu nas plantas, elevando em 143% o FBT sobre as plantas não inoculadas no tratamento RS.

### 3.4. Discussão

#### 3.4.1. Efeito dos tratamentos no rejeito

O pH foi reduzido no rejeito tratado com composto orgânico de caroço de açaí. Redução de pH também foi verificada por Souza et al. (2019) em solo de mineração ao adicionar caroço de açaí decomposto e atribuída a troca iônica entre prótons presentes nos grupos funcionais dos resíduos orgânicos pelos EPTs no solo, liberando íons  $H^+$  que acidifica o meio. A ligeira diminuição do pH de 8,6 para 7,9 em rejeito de mineração de Fe tratado com composto orgânico teve a sua causa relacionada a mineralização de CO realizada por microrganismos do solo (SEVILLA-PEREA; MINGORANCE, 2015).

O conteúdo de CO dos substratos foi aumentado nos tratamentos com composto orgânico, como era esperado proporcionalmente à aplicação. Resultados parecidos foram obtidos para adição de compostos orgânicos em resíduos de mineração de Cu das minas de Touro (NOVO; GONZÁLEZ, 2014; RODRÍGUEZ-VILA et al., 2017) e Riotinto (MINGORANCE et al., 2017) na Espanha. Segundo Horvath (2007), o acúmulo de CO no ecossistema se dá através de três formas: I) acúmulo da biomassa de plantas vivas; II) produção primária líquida; e III) acúmulo de litter e exsudados das plantas. Diante disso, pode-se inferir que o aumento do conteúdo de CO constatado no rejeito inoculado é proveniente de exsudados resultantes da interação bactéria-plantas, uma vez que esse resultado não se repetiu para rejeito sem inoculação. Vale ressaltar, que 2 a 3% do CO total presente no solo é composto pela biomassa microbiana (PULROLNIK, 2009).

De acordo com Ullah et al. (2015) as bactérias podem alterar as propriedades redox do solo ao produzir ácidos orgânicos, compostos quelatos de metal e biossurfactantes, aumentando assim a fluidez e a biodisponibilidade dos metais no solo.

#### 3.4.2. Efeito dos tratamentos nas plantas

A germinação obtida para sementes de *C. tocaninum* pode ser considerada baixa, uma vez que a espécie alcança 96% de germinação no 10º dia após o semeio (CRUZ, 2017). A baixa germinação tem relação com o teor de água das sementes, naquelas recém coletadas com teor de água de 23,4% a germinação chega a 98% (LIMA JÚNIOR et al., 2017). Mas a germinação das sementes é uma das etapas mais críticas do ciclo de vida de uma planta, pois representa a primeira interface de troca com o meio circundante (NOVO; GONZÁLEZ, 2014). Assim, a má germinação de sementes de *C. tocaninum* pode ser efeito do excesso de Cu (ADREES et al., 2015). A concentração de 400 mg kg<sup>-1</sup> de Cu não afetou a taxa de germinação de *Myracrodouon urundeuva* (FREITAS et al., 2018). Em *Schinus terebinthifolia* 10000 mg kg<sup>-1</sup> reduziu



significativamente a porcentagem de sementes germinadas (SIQUEIRA et al., 2020). Segundo Siqueira et al. (2020), a redução na germinação das sementes causada pelo excesso de metais pesados pode ser atribuída à redução da absorção de água pelas sementes devido à toxicidade e efeitos osmóticos da solução, interferências na permeabilidade da membrana celular e alterações na mobilização de reservas no embrião como a diminuição da hidrólise enzimática do amido, afetando o fornecimento de açúcar ao embrião em desenvolvimento.

O conteúdo elevado de areia no resíduo de mineração, sugere que o substrato tem baixa capacidade de agregação e de ligação de nutrientes, assim como baixa retenção água (CHILESHE et al., 2020). Isso pode ter reduzido a germinação das sementes de *C. tocaninum*, uma vez que tais características influenciam diretamente nesse processo. Embora o rejeito tenha características pouco favoráveis a germinação, a cepa bacteriana utilizada facilitou esse processo. Espécies de bactérias do gênero *Bacillus* têm efeitos variáveis (estimulantes e inibitórios) na germinação de sementes de espécies arbóreas (HADIZADEH et al., 2014). *Bacillus subtilis* aumentou a germinação de sementes de *Abies religiosa* e um dos possíveis mecanismos para melhorar a germinação incluíram a produção de sideróforos (ZULUETA-RODRÍGUEZ et al., 2015).

A aplicação de composto orgânico pouco contribuiu para a germinação das sementes, é provável que a predominância de substâncias fenólicas presentes em caroços de açaí (MELO et al., 2021) tenha inibido a germinação de *C. tocaninum*. Como o efeito alelopático dessas substâncias citado por Sousa et al. (2015) para explicar a inibição da germinação de *Sesbania virgata* (SOUSA et al., 2015).

A alta concentração de Cu como a encontrada no rejeito de mineração, pode inibir o crescimento das plantas, a começar pelas raízes (KUMAR et al, 2021). Por ser o primeiro órgão a entrar em contato com os PTEs, as raízes são geralmente mais afetadas pela toxicidade desses elementos e a sentir seus efeitos (SINGH et al. 2016). No caso do excesso de Cu, a redução do comprimento radicular, da produção de biomassa e o escurecimento e morte de raízes secundárias das plantas são comumente relatados. Entretanto, os efeitos adversos do Cu na MSR de *C. tocaninum* foram mínimos no rejeito de mineração industrial, sugerindo que mesmo sob uma alta concentração de Cu a espécie mantém o desenvolvimento radicular similar ao do cultivo nas condições naturais de solo da região. Por outro lado, a introdução de compostos orgânicos altera a produção de biomassa da raiz, aumentando a superfície radicular (REES et al., 2016).

De acordo com Araújo et al. (2021), mudas de leguminosas pioneiras, utilizadas na recuperação de áreas degradadas, são muito responsivas e apresentam crescimento significativo

quando são adicionados resíduos orgânicos ao substrato, mostrando que esses materiais podem atuar como fertilizantes orgânicos e suprir a demanda de nutrientes caracteristicamente alta dessas espécies. Os benefícios de compostos orgânicos para plantas crescidas sob altas concentrações de PTEs foram relacionados principalmente a melhoria dos seus estados nutricionais e a imobilização desses elementos no solo e/ou rizosfera (SOUZA et al., 2019; FORJÁN et al., 2017). O caroço de açaí decomposto misturado a um solo de mineração aumentou significativamente a MSPA de plantas de *Lactuca sativa* (SOUZA et al., 2019).

Incrementos substanciais no crescimento da parte aérea de plantas em ambiente contaminado por PTEs foram obtidos usando cepas bacterianas endofíticas isoladas dos tecidos de *Silene vulgaris* crescida em áreas sob influência de PTEs (PLOCINICZAK et al., 2019). A maioria dos endófitos podem ser transportados sistematicamente via xilema para os tecidos das plantas acima do solo colonizando caules, folhas e frutos com efeitos positivos na biomassa da parte aérea (COMPANT et al., 2019).

Maiores DC são associados ao desenvolvimento mais acentuado da parte aérea e, em especial do sistema radicular (FELKER et al., 2015), o que corrobora com os resultados obtidos para as plantas do RCO, que além da MSR e MSPA, apresentaram altura, NF e AF sempre superiores em relação as demais tratamentos. Além disso, compostos orgânicos ricos em K, como o utilizado no presente estudo, promovem o engrossamento do caule de mudas de espécies florestais (SOUSA et al., 2015). O DC é uma característica importante para avaliação do potencial de sobrevivência e crescimento de mudas de espécies florestais nativas após o plantio (FELKER et al., 2015). Já o conhecimento da superfície foliar é útil para avaliar a influência de fatores abióticos nos aspectos morfofisiológicos da planta (FERREIRA et al., 2017).

A AF das plantas no tratamento RCO está relacionada com o maior número de folíolos, ambos associados ao equilíbrio fisiológico e nutricional proporcionado pelo meio de crescimento. Por outro lado, uma série de distúrbios fisiológicos desencadeados pelo estresse provocado por excesso de PTEs reduz significativamente a AF das plantas (RUCINSKA-SOBKOWIAK, 2016) e isso pode ter ocorrido nas plantas do rejeito. O aumento de íons metálicos nas plantas pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e consequentemente diminuir o crescimento de órgãos como as raízes e folhas (EMAMVERDIAN et al., 2015).

A toxicidade de Cu reduz o conteúdo de clorofila através de danos às membranas do tilacóide, do deslocamento do Mg necessário e da inibição da atividade de várias enzimas associadas a biossíntese da clorofila (SALLEM et al., 2020; ADREES et al., 2015). De acordo

com Marques et al. (2018) em plantas tolerantes o conteúdo de clorofila aumenta ou não sofre mudanças em resposta aos PTEs.

Baseado IQD que é considerado um bom indicador de qualidade de mudas de espécies florestais por levar em conta a robustez e o equilíbrio da biomassa vegetal (ELOY et al., 2013), os resultados obtidos neste estudo indicaram que os tratamentos aplicados no rejeito foram eficazes para garantir o crescimento de *C. tocaninum* com padrão de qualidade semelhante ou superior ao das plantas do solo, destacando a qualidade das mudas em RCO. O excesso de Cu reduz a qualidade e a tolerância de mudas de espécies arbóreas tropicais (COVRE et al., 2020) sugerindo que alguma adição, principalmente de compostos orgânicos, é condição para que *C. tocaninum* cresça de maneira saudável nesse tipo de ambiente.

### 3.4.3. Aplicações de fitorremediação

As concentrações de Cu encontradas nas raízes de *C. tocaninum* são consideradas altas, inclusive quando cultivada no solo. Em condições normais a maioria das espécies vegetais possuem concentrações de Cu entre 20 a 30 mg kg<sup>-1</sup> de matéria seca (KABATA-PENDIAS, 2010). Em virtude da absorção e do transporte de Cu nas plantas depender predominantemente do nível do elemento e dos ambientes de crescimento (SALEEM et al., 2020), esses resultados estão relacionados a alta concentração pseudo-total de Cu residual do rejeito e a riqueza mineral do solo de floresta utilizado afim de simular as condições edáficas naturais para o crescimento da espécie na região.

Uma provável combinação de sideróforos com o Cu pode ter ocorrido, aumentando a absorção por *C. tocaninum* no rejeito e em RS de acordo com as concentrações encontradas nas raízes. A cepa bacteriana utilizada no presente estudo produz sideróforos, quelante de ferro (Fe) que é um composto orgânico de baixo peso molecular com alta afinidade para Fe<sup>3+</sup>, mas que também pode se combinar com outros elementos metálicos (Cd e Zn) para formar complexos e aumentar sua utilização em plantas (HE et al., 2020). Rizobactérias produtoras de sideróforos condicionaram a absorção de Cu por *Brassica oxyrrhina* em solo contaminado (MA et al., 2016). Em termos práticos, resultados imediatos e menos onerosos para a fitorremediação de Cu podem ser alcançados apenas com a inoculação da cepa bacteriana nas sementes de *C. tocaninum*.

A compartimentalização preferencial de Cu na raiz de *C. tocaninum* demonstrada pela maior concentração na raiz e FT < 1, ocorreu devido à natureza imóvel do elemento nos tecidos vegetais (ADREES et al., 2015). O Cu é retirado do meio de crescimento e acumulado principalmente nas raízes de espécies arbóreas tropicais (SILVA et al., 2018; MEYER et al.,

2016; SILVA et al., 2015). Contudo, isso também é citado como um mecanismo de tolerância das plantas, no qual o Cu é imobilizado através da formação de complexos insolúveis e inertes nas raízes, reduzindo a ação negativa no metabolismo (COVRE et al., 2020). Através desses mecanismos, plantas tolerantes a EPTs diminuem a biodisponibilidade e mobilidade desses elementos indicando potencial para fitoestabilização (BURGES et al., 2017).

Segundo Nayak et al. (2018), as principais características de fitoestabilização da planta são FBC da raiz  $> 1$  e TF  $< 1$ . Entretanto, o baixo FBC da raiz de *C. tocaninum* reflete aos níveis pseudo-totais de Cu elevados presentes nos substratos. Altas concentrações de EPTs no solo podem resultar em FBC  $< 1$ , mesmo que a planta absorva grandes quantidades (ALI et al., 2013). Desta forma, além do FT  $< 1$ , a recomendação de *C. tocaninum* para fitoestabilização de Cu em rejeito de mineração no presente estudo se baseia no FBT da raiz  $> 1$ .

O FBT leva em consideração os níveis disponíveis de EPTs que estão passíveis de absorção e dispersão (RODRÍGUEZ-VILA et al., 2014). A maior eficiência de absorção de Cu promovida pela bactéria inoculada em *C. tocaninum*, sobretudo cultivada no rejeito, elevou o FBT a 30, resultado muito superior aos obtidos para *Khaya ivorensis* e *Cedrela fissilis* em testes com solo contaminado artificialmente por Cu na região amazônica (COVRE et al., 2020).

### 3.5. Conclusão

A inoculação das sementes de *C. tocaninum* com a cepa bacteriana isolada neste estudo promoveu a germinação no rejeito de mineração de Cu. O composto orgânico produzido de caroço de açaí adicionado ao rejeito de mineração reduziu o pH, aumentou o conteúdo de CO e disponibilizou Cu em maior concentração. O composto incrementou a biomassa de raiz e parte aérea com elevada área foliar, produzindo plantas com melhor padrão de qualidade e maior tolerância. A cepa bacteriana utilizada aumentou a fitoestabilização de Cu por *C. tocaninum* em rejeito de mineração industrial, que apresentou elevada concentração de Cu na raiz devido à alta biotransferência da solução e baixa translocação para a parte aérea. Os resultados encontrados indicam que a espécie *C. tocaninum*, o composto de caroço de açaí e a cepa bacteriana isolada de *S. torvum* de área de mineração de Cu são promissores para a fitorremediação.

### REFERÊNCIAS

ADREES, M.; ALI, S., RIZWAN, M.; IBRAHIM, M.; ABBAS, F.; FARID, M.; ZIA-UR-REHMAN, M.; IRSHAD, M.K; BHARWANA, S.A. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 8148–8162, 2015.

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M.A. Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, p. 869-881, 2013.

ARAÚJO, E.F.; SOUSA, L.B.; NÓBREGA, R.S.A.; NÓBREGA, J.C.A.; ARAUCO, A.M.S.; PEREIRA, R.R.; LUSTOSA FILHO, J.F. Organic residues improve the quality and field initial growth of senna multijuga seedlings. **Journal of Sustainable Forestry**, v. 40, p. 249-262, 2021.

ARAÚJO, G.C.L.; GONZALEZ, M.H.; FERREIRA, A.G.; NOGUEIRA, A.R.A.; NÓBREGA, J.A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, p. 2121–2132, 2002.

BURGES, A.; EPELDE, L.; BLANCO, F.; BECERRIL, J. M.; GARBISU, C. Ecosystem services and plant physiological status during endophyte-assisted phytoremediation of metal contaminated soil. **Science of the Total Environment**, v. 584 - 585, p. 329–338, 2017.

CHILESHE, M.N.; SYAMPUNGANI, S.; FESTIN, E.S.; TIGABU, M.; DANESHVAR, A.; ODÉN, P.C. Physico-chemical characteristics and heavy metal concentrations of copper mine wastes in Zambia: implications for pollution risk and restoration. **Journal of Forestry Research**, v. 31, p. 1283–1293, 2020.

COMPANT, S.; SAMAD, A.; FAIST, H.; SESSITSCH, A. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 29–37, 2019.

COVRE, W.P.; PEREIRA, W.V. DA S.; GONÇALVES, D.A.M.; TEIXEIRA, O.M.M.; AMARANTE, C.B. DO; FERNANDES, A.R. Phytoremediation potential of *Khaya ivorensis* and *Cedrela fissilis* in copper contaminated soil. **Journal of Environmental Management**, v. 268, 110733, 2020.

CRUZ, E.D. **Germinação de sementes de espécies amazônicas: pau-preto (*Cenostigma tocaninum* Ducke)**. Comunicado técnico 290, EMBRAPA, 2017.

DICKSON, A.; LEAF, A.L.; HOSNER, J.F. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. **The Forestry Chronicle**, v. 36, p. 10–13, 1960.

DNPM - **Departamento Nacional de Produção Mineral**. Sumário Mineral / Coordenadores Thiers Muniz Lima, Carlos Augusto Ramos Neves. Brasília: DNPM, 2016.

DOYLE, J.; DOYLE, J.L. No Title Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13–15, 1990.

ELOY, E.; CARON, B.O.; SCHMIDT, D.; BEHLING, A.; SCHWERS, L.; ELLI, E.F. Avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis* utilizando parâmetros morfológicos. **Floresta**, v. 43, p. 373-384, 2013.

EMAMVERDIAN, A.; DING, Y.; MOKHBERDORAN, F.; XIE, Y. Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1–18, 2015.

FELKER, R.M.; AIMI, S.C.; STEFANELLO, M.M.; PIAZZA, E.M.; JUNG, P.H. crescimento de mudas de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* mart.) sob influência de diferentes substratos e recipientes, em viveiro. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, p.809, 2015.

FELLET, G.; MARCHIOL, L.; DELLE VEDOVE, G.; PERESSOTTI, A. Application of biochar on mine tailings: Effects and perspectives for land reclamation. **Chemosphere**, v. 83, p. 1262–1267, 2011.

FERREIRA, O.G.L; ROSSI, F.D.; VAZ, R.Z.; FLUCK, A.C.; COSTA, O.A.D.; FARIAS, P.P. Leaf area determination by digital image analysis. **Archivos de Zootecnia**, v. 66, p. 593-597, 2017.

FORJÁN, R.; RODRÍGUEZ-VILA, A.; CERQUEIRA, B.; COVELO, E.F. Comparison of the effects of compost versus compost and biochar on the recovery of a mine soil by improving the nutrient content. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 183, p. 46–57, 2017.

FREITAS, D.A.; SOUSA, I.P.; COUTINHO, M.N.; ALVARENGA, A.C. Effect of heavy metals copper and chromium on soil: germination and initial development of *Myracrodouon urundeuva*. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, p.162-171, 2020.

GIL-LOAIZA, J.; WHITE, S.A.; ROOT, R.A; SOLÍS-DOMINGUEZ, F.A.; HAMMOND, C.M.; CHOROVER, J.; MAIER, R.M. Phytostabilization of mine tailings using compost-assisted direct planting: Translating greenhouse results to the field. **Science of the Total Environment**, v. 565, p. 451–461, 2016.

GORDON, W. Colorimetric estimation of indole-3-acetic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 134–138, 1951.

HADIZADEH, F.; MEHRVARZ, S.S.; MIRPOUR, M.S. Effect of *Bacillus* spp. on seed germination of selected species of the *Genus cuscuta* (convolvulaceae). **Modern Phytomorphology**, v. 6, p.97–101, 2014.

HE, X.; XU, M.; WEI, Q.; TANG, M.; GUAN, L.; LOU, L.; XU, X.; HU, Z.; CHEN, Y.; SHEN, Z.; XIA, Y. Promotion of growth and phytoextraction of cadmium and lead in *Solanum nigrum* L. mediated by plant-growth-promoting rhizobacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 205, 111333, 2020.

HORVATH, W. Carbon cycling and formation of soil matter. In: PAUL, E. A. **Soil microbiology, ecology, and biochemistry**. 3rd edition ed. Boston: Academic Press, 2007, p. 303-340.

HUSSAIN, S.; SHARMA, V.; ARYA, V.M.; SHARMA, K.R.; RAO, C.S. Total organic and inorganic carbon in soils under different land use/land cover systems in the foothill Himalayas. **Catena**, v. 182, 104104, 2019.

HUSSAIN, S.; AKRAM, M.; ABBAS, G.; MURTAZA, B.; SHAHID, M.; SHAH, N.S.; BIBI, I.; NIAZI, N.K. Arsenic tolerance and phytoremediation potential of *Conocarpus erectus* L. and *Populus deltoides* L. **International Journal of Phytoremediation**, v. 19, p. 985–991, 2017.

IGIRI, B.E.; OKODUWA, S.I.R.; IDOKO, G.O.; AKABUOGU, E.P.; ADEYI, A.O.; EJOGU, I.K. Toxicity and bioremediation of heavy metals contaminated ecosystem from tannery wastewater: A review. **Journal of Toxicology**, v. 2018, p. 1–16, 2018.

JU, W.; LIU, L.; FANG, L.; CUI, Y.; DUAN, C.; WU, H. Impact of co-inoculation with plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on the biochemical responses of alfalfa-soil system in copper contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 167, p. 218–226, 2019.

JULIANI, C.; MONTEIRO, L.V.S.; FERNANDES, C.M.D. **Potencial mineral: cobre**, in: Recursos Minerais Do Brasil: Problemas e Desafios. Rio de Janeiro, pp. 134–156, 2016.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants**, 4th ed, Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press, 2010.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p. 969–976, 1970.

KUMAR, V.; PANDITA, S.; SINGH SIDHU, G.P.; SHARMA, A.; KHANNA, K.; KAUR, P.; BALI, A.S.; SETIA, R. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: A comprehensive review. **Chemosphere**, v. 262, 127810, 2021.

LIMA, S. L. et al. Interactions of biochar and organic compound for seedlings production of *Magonia pubescens* A. St.-Hil. **Revista Árvore**, v. 39, n. 4, p. 655-661, 2015.

LIMA, R.C.de; KOZUSNY-ANDREANI, D.I.; JUNIOR, R.A.; FONSECA, L. da; Caracterização Fenotípica de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Isoladas de Cana de Açúcar. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 6, p. 5803-5813, 2011.

LIMA JÚNIOR, M.J.V.; MENDES, A.M.S.; ARRUDA, Y.M.B.C. ***Cenostigma tocantinum* Pau-pretinho**. Nota técnica 05, Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 2017.

LOOI, L.J.; ARIS, A.Z.; YUSOFF, F.MD.; ISA, N.M.; HARIS, H. Application of enrichment factor, geoaccumulation index, and ecological risk index in assessing the elemental pollution status of surface sediments. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 41, p. 27-42, 2019.

MA, Y.; RAJKUMAR, M.; ZHANG, C.; FREITAS, H. Inoculation of *Brassica oxyrrhina* with plant growth promoting bacteria for the improvement of heavy metal phytoremediation under drought conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 320, p. 36–44, 2016.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-77, 1962.

MARQUES, D.M.; SILVA, A.B.; MANTOVANI, J.R.; PEREIRA, D.S.; SOUZA, T.C. Crescimento e respostas fisiológicas das espécies arbóreas *Hymenaea courbaril* L.,

*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. e *Myroxylon peruiferum* L. F. expostas a diferentes concentrações de cobre no solo. **Revista Árvore**, v. 42, e420202, 2018.

MCGRATH, S.P.; CUNLIFFE, C.H. A simplified method for the extraction of the metals Fe, Zn, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Co and Mn from soils and sewage sludges. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 36, p. 794–798, 1985.

MELO, P.S.; SELANI, M.M.; GONÇALVES, R.H.; PAULINO, J.O.; MASSARIOLI, A.P.; de ALENCAR, S.M. Açaí seeds: An unexplored agro-industrial residue as a potential source of lipids, fibers, and antioxidant phenolic compounds. **Industrial Crops & Products**, v. 161, 113204, 2021.

MEYER, S.T.; CASTRO, S.R.; FERNANDES, M.M.; SOARES, A.C.; DE SOUZA FREITAS, G.A.; RIBEIRO, E. Heavy-metal-contaminated industrial soil: Uptake assessment in native plant species from Brazilian Cerrado. **International Journal of Phytoremediation**, v. 18, p. 832–838, 2016.

MINGORANCE, M.D.; FRANCO, I.; ROSSINI-OLIVA, S. Application of different soil conditioners to restorate mine tailings with native (*Cistus ladanifer* L.) and non-native species (*Medicago sativa* L.). **Journal of Geochemical Exploration**, v. 174, p. 35-45, 2017.

NANDA, M.; KUMAR, V.; SHARMA, D.K. Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to ‘clean-up’ heavy metal contaminants from water. **Aquatic Toxicology**, v. 212, p. 1–10, 2019.

NAYAK, A.K.; PANDA, S.S.; BASU, A.; DHAL, N.K. Enhancement of toxic Cr (VI), Fe, and other heavy metals phytoremediation by the synergistic combination of native *Bacillus cereus* strain and *Vetiveria zizanioides* L. **International Journal of Phytoremediation**, v. 20, p. 682-691, 2018.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, p. 265–270, 1999.

NOVO, L.A.B.; GONZÁLEZ, L. Germination and early growth of Brassica juncea in copper mine tailings amended with technosol and compost. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 506392, 2014.

PÁRRAGA-AGUADO, I.; ÁLVAREZ-ROGEL, J.; GONZÁLEZ-ALCARAZ, M.N.; JIMÉNEZ-CÁRCELES, F.J.; CONESA, H.M. Assessment of metal(loid)s availability and their uptake by *Pinus halepensis* in a Mediterranean forest impacted by abandoned tailings. **Ecological Engineering**, v. 58, p. 84–90, 2013.

PERLATTI, F.; FERREIRA, T.O.; ROBERTO, F.A.C.; ROMERO, R.E.; SARTOR, L.R.; OTERO, X.L. Trace metal/metalloid concentrations in waste rock, soils and spontaneous plants in the surroundings of an abandoned mine in semi-arid NE-Brazil. **Environmental Earth Sciences**, v. 74, p. 5427–5441, 2015.

PERLATTI, F.; MARTINS, E.P.; DE OLIVEIRA, D.P.; RUIZ, F.; ASENSIO, V.; REZENDE, C.F.; OTERO, X.L.; FERREIRA, T.O. Copper release from waste rocks in an abandoned mine



(NE, Brazil) and its impacts on ecosystem environmental quality. **Chemosphere**, v. 262, 127843, 2021.

PŁOCINICZAK, T.; CHODÓR, M.; PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Metal-tolerant endophytic bacteria associated with *Silene vulgaris* support the Cd and Zn phytoextraction in non-host plants. **Chemosphere**, v. 219, p. 250-260, 2019.

PULROLNIK, K. **Transformações do carbono no solo**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. Documentos 36p.

R Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing.

REES, F.; STERCKEMAN, T.; MOREL, J. L. Root development of non-accumulating and hyperaccumulating plants in metal-contaminated soils amended with biochar. **Chemosphere**, v. 142, p. 48-55, 2016.

RÊGO, M.C.F.; CARDOSO, A.F.; FERREIRA, T.C.; FILIPPI, M.C.C.; BATISTA, T.F.V.; VIANA, R.G.; SILVA, G.B. The role of rhizobacteria in rice plants: Growth and mitigation of toxicity. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, p. 2636–2647, 2018.

RODRÍGUEZ-VILA, A.; FORJÁN, R.; GUEDES, R.S.; COVELO, E.F. Effect of waste mixed with biochar as soil amendment on trace element solubility in a mine soil. **Spanish Journal of Soil Science**, v. 7, p. 109-121, 2017.

RODRÍGUEZ-VILA, A.; COVELO, E.F.; FORJÁN, R.; ASENSIO, V. Phytoremediating a copper mine soil with *Brassica juncea* L., compost and biochar. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 11293–11304, 2014.

ROMÁN-PONCE, B.; REZA-VÁZQUEZ, D.M.; GUTIÉRREZ-PAREDES, S.; DE HARO-CRUZ, M. de J.; MALDONADO-HERNÁNDEZ, J.; BAHENA-OSORIO, Y.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; WANG, E.T.; VÁSQUEZ-MURRIETA, M.S. Plant growth-promoting traits in rhizobacteria of heavy metal-resistant plants and their effects on *Brassica nigra* seed germination. **Pedosphere**, v. 27, p. 511–526, 2017.

RUCINSKA-SOBKOWIAK, R. Water relations in plants subjected to heavy metal stresses. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, 2016.

SALEEM, M.H.; FAHAD, S.; KHAN, S.U.; DIN, M.; ULLAH, A.; SABAGH, A.E.; LIU, L. Copper-induced oxidative stress, initiation of antioxidants and phytoremediation potential of flax (*Linum usitatissimum* L.) seedlings grown under the mixing of two different soils of China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p.5211-5221, 2020.

SARWAR, N.; IMRAN, M.; SHAHEEN, M.R.; ISHAQUE, W.; KAMRAN, M.A.; MATLOOB, A.; REHIM, A.; HUSSAIN, S. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. **Chemosphere**, v. 171, p. 710-721, 2017.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, p. 47–56, 1987.

SEVILLA-PEREA, A.; MINGORANCE, M. D. Field approach mining-dump revegetation by application of sewage sludge co-compost and a commercial biofertilizer. **Journal of Environmental Management**, v. 158, p. 95-102, 2015.

SINGH, S.; PARIHAR, P.; SINGH, R.; SINGH, V. P.; PRASAD, S.M. Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2016. doi:10.3389/fpls.2015.01143

SILVA, I.C.B.; TIECHER, T.L.; SCHNEIDER, J.M.; TRENTIN, E.; DE CONTI, L.; FERREIRA, P.A.A.; CERETTA, C.A.; ARAÚJO, M.M.; TAROUÇO, C.P.; GARLET, L.P.; HAMMERSCHMITT, R.K.; BRUNETTO, G. Growth, biochemical response and nutritional status of *Angico-Vermelho* (*Parapiptadenia rigida* (Benth) Brenan) under the application of soil amendment in Cu-contaminated soil. **International Journal of Phytoremediation**, v. 20, p. 1380–1388, 2018.

SILVA, R.F.; ROS, C.O.; SCHEID, D.L.; GROLLI, A.L.; MARCO, R.; MISSIO, E.L. Copper translocation and tolerance in seedlings of tree species grown in contaminated soil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, p. 1093–1099, 2015.

SIQUEIRA, M.C.; TAVARES, A.R.; BARBOSA, J.M.; SANTOS JUNIOR, N.A. Copper stress affect seed germination and seedling establishment of *Schinus terebinthifolia* Raddi. **Hoehnea**, v. 47, e502020, 2020.

SOUSA, L.B.; NÓBREGA, R.S.A., LUSTOSA FILHO, J.F.; AMORIM, S.P.N.; FERREIRA, L.V.M.; NÓBREGA, J.C.A. *Sesbania virgata* (Cav. Pers) cultivation in different substrates. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 58, p. 240-247, 2015.

SOUZA, E.D.; DIAS, Y.N.; CARDOSO, H.S.C.; PINTO, D.A.; OLIVEIRA, D.M.; FALCÃO, N.P.S.; TEIXEIRA, R.A.; FERNANDES, A.R. Organic residues and biochar to immobilize potentially toxic elements in soil from a gold mine in the Amazon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 425-434, 2019.

SOUZA, S.C.R.; ANDRADE, S.A.L.; SOUZA, L.A.; SCHIAVINATO, M.A. Lead tolerance and phytoremediation potential of Brazilian leguminous tree species at the seedling stage. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 299–307, 2012.

SURETTE, M., STURZ, A., LADA, R., NOWAK, J. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. **Plant Soil**, v. 253, p. 381–390, 2003.

TEIXEIRA, L.B.; GERMANO, V.L.C; OLIVEIRA, R.F.; FURLAN JUNIOR, J. **Processos de compostagem usando resíduos das agroindústrias de açaí e palmito de açaizeiro**. Circular Técnica 41, EMBRAPA, 2005.

TEIXEIRA, P.C.; DONAGEMMA, G.K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W.G. (Eds.), 2017. **Manual de métodos de análise de solo**, 3rd ed. Embrapa Solos, Brasília.

ULLAH, A., HENG, S., MUNIS, M.F.H., FAHAD, S., YANG, X. Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 117, p. 28–40, 2015.

