

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Efeitos da compostagem termofílica industrial na qualidade do lodo de esgoto e na dissipação de resistência antimicrobiana em solos**

**Rafael Santana Mendonça**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

**Piracicaba  
2024**

**Rafael Santana Mendonça**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Efeitos da compostagem termofílica industrial na qualidade do lodo de  
esgoto e na dissipação de resistência antimicrobiana em solos**

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011.

Orientador:  
Profa. Dra. **JUSSARA BORGES REGITANO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e  
Nutrição de Plantas

**Piracicaba**  
**2024**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Mendonça, Rafael Santana

Efeitos da compostagem termofílica industrial na qualidade do lodo de esgoto e na dissipação de resistência antimicrobiana em solos / Rafael Santana Mendonça. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. Piracicaba, 2024.

93 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Biossólidos 2. Microbioma 3. Resistoma 4. Poluição do solo 5. Agricultura sustentável I. Título

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha mãe Júlia Cristina e avó Sílvia Mendes, por todo amparo emocional, pelos incentivos à realização dos meus objetivos, pelo amor e ensinamentos passados durante toda minha vida, os quais foram fundamentais para meu crescimento e; à Lílian Pio, por se tornar parte da minha família e demonstrar apoio e carinho durante minha trajetória;

À minha amiga mais antiga, Shannandrah Nascimento, que mesmo à distância sempre esteve presente, se tornando a personificação da palavra “parceria” e; aos meus queridos amigos Andre Luiz, Higor José, Maria Gabriella, Gabriela Cardoso, Alice Ferreira, Gabriel Dias e, em especial, Gabriella Silva e Alberto Vinicius, muito obrigado por tornarem meus dias em Piracicaba mais leves e especiais;

Aos colegas e ex-colegas do Grupo de Estudo em Poluição do Solo (GEPS): Gabriella Silva, Júlio Osti, Ana Duarte, Mayra Maniero, Rayana Rocha, Francielle Medeiros, Thomas Trentin, Guilherme Martins, Adijailton Souza, Douglas Viana, Rafael Leal, Alan Nunes e Lucas Pacheco, pela companhia e contribuições durante o trabalho;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jussara Borges Regitano, pela oportunidade e confiança de estar sob sua orientação, pelo conhecimento transmitido e pela contribuição para minha melhor versão como profissional e pessoa, e sobretudo, pela sensibilidade, paciência e amizade durante essa jornada;

Aos Professores Dr<sup>a</sup> Aline Coscione, Dr. Fernando Andreote, Dr. Maurício Cherubin; Dr. Carlos Eduardo Cerri e Dr. Pablo Vidal; aos técnicos e funcionários do Departamento de Ciência do Solo Denise Mescolotti, Fernando Baldesin, Caroline Rossini, Claudinei de Lara, Dorival Grisotto, Nivanda Ruiz, Eleusa Bassi, Edinéia Mondoni e; ao Dr. Fernando Carvalho e David Lima da Tera Ambiental LTDA, muito obrigado por colaborarem para a construção e/ou andamento deste trabalho;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, ao Departamento de Ciência do Solo e ao Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, por toda a excelência em estrutura, corpo docente e técnico, pelo suporte e oportunidades geradas durante o curso;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa, os quais permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais familiares e amigos que contribuíram de forma direta ou indireta para meu sucesso no mestrado e na vida, meu muito obrigado!

A Deus, por toda proteção e bênçãos concedidas que possibilitaram a concretização de mais uma etapa em minha vida e; a mim.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO .....	7
1.1 Hipóteses .....	15
1.2 Objetivos .....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
2.1 Coleta e caracterização inicial de solos .....	17
2.2 Coleta e caracterização inicial de resíduos orgânicos.....	18
2.3 Experimento em vasos.....	23
2.3.1 Coletas e determinações realizadas.....	24
2.3.2 Atividade enzimática e carbono da biomassa microbiana .....	25
2.3.3 Análise química: solos e tecido vegetal .....	25
2.3.4 Parâmetros fitotécnicos e componentes de rendimento .....	26
2.3.5 Extração de DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA.....	26
2.3.6 Quantificação de genes de resistência antimicrobiana e elementos genéticos móveis por HT-qPCR .....	27
2.4 Forma de análises dos dados .....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
3.1 Propriedades físico-químicas dos resíduos e compostos orgânicos .....	31
3.2 Atividade enzimática e carbono da biomassa microbiana do solo.....	32
3.3 Acúmulo de nutrientes, parâmetros fitotécnicos e componentes de rendimento na cultura do milho .....	42
3.4 Estrutura e composição da comunidade bacteriana dos solos.....	47
3.5 Diversidade da comunidade bacteriana dos solos .....	53
3.6 Genes de resistência à antimicrobianos e elementos genéticos móveis.....	56
4. CONCLUSÕES .....	63
REFERÊNCIAS .....	65
MATERIAL SUPLEMENTAR .....	87

## RESUMO

### **Efeitos da compostagem termofílica industrial na qualidade do lodo de esgoto e na dissipação de resistência antimicrobiana em solos**

O crescimento populacional urbano potencializa a produção de lodo de esgoto (LE), resíduo gerado em grandes quantidades e comumente destinado em aterros sanitários, mas com potencial uso agrícola como fonte alternativa de nutrientes para as plantas e condicionador de solos. No entanto, o LE tem relevante potencial poluidor e deve ser adequadamente tratado antes da aplicação em solos. Dentre os contaminantes, os emergentes, tais como os genes de resistência antimicrobiana (GRAs) e elementos genéticos móveis (EGMs), são bastante preocupantes, pois promovem perturbações ambientais que configuram grande risco à saúde pública mundial. Por isso, o manejo do LE deve ser garantido por meio de tratamentos eficientes que visem sua qualidade no amplo aspecto (aptidão agrícola, benefícios ao ambiente e à qualidade do solo e desenvolvimento vegetal). A compostagem termofílica se mostra promissora no tratamento de grandes quantidades de LE, promovendo sua estabilização e degradação de vários contaminantes orgânicos. A adição de calcário ao processo parece alavancar melhorias na sua qualidade e na dissipação de GRAs e EGMs. Porém, pouco se sabe sobre a efetividade desses tratamentos quando realizados em escala industrial e sobre a eficácia na atenuação desses genes em solos após a aplicação do composto gerado. Portanto, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da aplicação de compostos obtidos industrialmente, com e sem a adição de calcário, na qualidade biológica de solos de diferentes texturas e no completo desenvolvimento da cultura do milho, além da dissipação de resistência antimicrobiana (RAM) (real e potencial) das classes de antimicrobianos mais utilizadas. A qualidade do LE foi avaliada por meio de mudanças físico-químicas promovidas pela compostagem, parâmetros fitométricos, componentes de rendimento e acúmulo de nutrientes pelas plantas, além do potencial enzimático, alterações na comunidade bacteriana dos solos e a abundância relativa de GRAs e EGMs nos solos em distintos tempos (quantificada por HT-qPCR). A compostagem industrial foi eficaz na redução de metais pesados do resíduo e de EGMs e GRAs nos solos, sobretudo para a classe das sulfonamidas. Foram identificados os EGMs que mais contribuem para o potencial de transferência de GRAs e o resistoma natural do solo foi acessado. Os compostos promoveram benefícios à qualidade biológica dos solos por meio do incremento de atividade enzimática e não houve diferença acerca dos componentes de rendimento do milho, mesmo com a menor dose de fertilizante mineral adicionada. No entanto, o menor acúmulo de nutrientes no tecido foliar sugere que compostos de LE tem maior potencial como condicionador de solos do que como substituintes de fertilizantes minerais. A adição de calcário ao processo não potencializou a dissipação de GRAs e EGMs, porém gerou um composto de melhor qualidade biológica frente à atividade enzimática e diversidade da comunidade bacteriana, mas as principais alterações foram observadas apenas no tempo inicial. A compostagem termofílica em escala industrial melhora a qualidade do lodo de esgoto, tornando sua aplicação mais segura frente aos teores de metais pesados, à RAM nos solos e ao estímulo da atividade enzimática, porém, perdas nutricionais são observadas e refletidas no acúmulo desses elementos no tecido das plantas.

Palavras-chave: Biossólidos, Microbioma, Resistoma, Poluição do solo, Agricultura sustentável

## ABSTRACT

### **Industrial thermophilic composting on sewage sludge quality and on dissipation of antimicrobial resistance in soils**

Urban population growth intensifies the production of sewage sludge (SS), a waste generated in massive quantities and commonly disposed of in landfills but holds potential for agricultural use as an alternative nutrient source for plants and a soil conditioner. However, due to its pollution potential, SS must be adequately treated before soil application. Amongst the contaminants, emerging ones such as antimicrobial resistance genes (ARGs) and mobile genetic elements (MGEs), are highly concerning due to their capacity to cause environmental disturbances with significant risks to global public health. Therefore, SS management requires effective treatments addressing its quality in various aspects including agricultural suitability, environmental benefits, soil quality, and plant development. Thermophilic composting emerges as a promising approach for treating large volumes of SS, promoting its stabilization and degradation of various organic contaminants. The lime addition to the composting process appears to enhance improvements in SS quality and the dissipation of ARGs and MGEs. However, the effectiveness of these treatments on an industrial scale, as well as their ability to mitigate the presence of these genes in soils after the application of the composts generated, are areas of knowledge still lacking. This study aimed to assess the impact of the application of industrially obtained composts, with and without the lime addition, on the biological quality of soils with different textures and the complete development of maize. Additionally, the dissipation of antimicrobial resistance (real and potential) of the most commonly used antimicrobial classes was assessed. The quality of SS was assessed through physicochemical changes and nutrient availability promoted by composting, phytometric parameters, yield components, and nutrient accumulation by plants. Additionally, enzymatic potential, alterations in soil bacterial communities, and the relative abundance of ARGs and MGEs in soils at different times (quantified by HT-qPCR) were also analyzed. Industrial composting was effective in reducing heavy metal content in the residue and MGEs and ARGs in soils, especially for the class of sulfonamides. The MGEs that most contribute to the potential transfer of ARGs were identified, and the natural soil resistome was accessed. The composts promoted benefits to the biological quality of soils through increased enzymatic activity, and there was no difference in maize yield components, even with the lower dose of mineral fertilizer added. However, the lower accumulation of nutrients in the leaf tissue suggests that SS composts have greater potential as soil conditioners than substitutes for mineral fertilizers. The lime addition to the composting process did not enhance the dissipation of ARGs and MGEs but generated a compost of better biological quality, especially in terms of enzymatic activity and bacterial community diversity, although the main changes were observed only at the initial time. Industrial-scale thermophilic composting improves the quality of sewage sludge, making its application in soils safer in terms of heavy metal content, antimicrobial resistance risk, and the stimulation of enzymatic activity. However, nutritional losses are observed and reflected in the lower accumulation of these elements in plant tissues.

Keywords: Biosolids, Microbiome, Resistome, Soil pollution, Sustainable agriculture

## 1. INTRODUÇÃO

O avanço do crescimento populacional mundial consolida o sucesso da espécie humana no planeta, evidenciando o êxito dos esforços feitos para garantir progressos em tecnologia, alimentação, saúde, urbanização e desenvolvimento econômico. Atualmente somos 8 bilhões de pessoas, com projeção de +25% até 2050, inevitavelmente acarretando uma crescente demanda por recursos (Nações Unidas, 2019; 2022). Estima-se que, para atender tal demanda em 2050, a atual produção de alimentos deva ser acrescida em 70% e, além disso, que 75% da população mundial viverá em áreas urbanas, o que traz uma preocupação simultânea sobre a degradação do solo (recurso natural e não renovável cujo  $\frac{1}{3}$  da superfície do globo já está sob este efeito) e a produção potencializada de resíduos urbanos e industriais (+3,4 bilhões de toneladas) (FAO, 2015; Hunter et al., 2017; Kaza et al., 2018). Neste contexto, no Brasil, um país populoso, com 85% dos habitantes em zonas urbanas, e um importante produtor e exportador de alimentos, se faz necessário ações que objetivem a melhor gestão de resíduos e práticas agrícolas mais sustentáveis, visando a melhoria e/ou recuperação da saúde do solo e menores impactos ambientais (Brasil (IBGE), 2022).

Estratégias como o uso de resíduos orgânicos na agricultura trazem múltiplos benefícios, pois conferem maior diversificação de fontes nutricionais às plantas e estimulam maior retenção de água, estabilidade dos agregados, atividade biológica e sequestro de carbono nos solos, com efeitos diretos na sua qualidade (Goss et al., 2013; Sadet-Bourgeteau et al., 2018). Tal estratégia também se mostra aliada frente às metas propostas pelo Plano Nacional de Fertilizantes e pela Organização das Nações Unidas, uma vez que o uso de resíduos orgânicos na agricultura pode reduzir a dependência de fertilizantes minerais (recurso majoritariamente não-renovável e altamente dependente de importação (85%)), e também auxiliar no cumprimento de Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) como “fome zero e agricultura sustentável (2)”, “ação contra a mudança global do clima (13)”, “vida terrestre (15)”, entre outros (Nações Unidas, 2016; Brasil (CONFERT), 2022; Brasil (CONAB), 2022).

Neste contexto, o lodo de esgoto (LE), resíduo sólido das Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), merece atenção especial. Estima-se uma produção global anual de 45 milhões de toneladas (massa seca) e, no Brasil, apesar do

sistema de coleta e tratamento atender apenas 56% da população, o grande volume de esgoto coletado (6,1 bilhões de m<sup>3</sup> em 2022 ou 372 mil toneladas (base seca)) gera desafios quanto à sua disposição final (Di Giacomo & Romano, 2022; Regitano et al., 2022; Brasil (SNIS), 2023). Atualmente, o descarte do LE é feito primariamente em aterros sanitários, alternativa onerosa que confere riscos ambientais e à saúde pública (Regitano et al., 2022), porém, resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) incentivam o uso agrícola do LE como alternativa aos aterros sanitários (Brasil (CONAMA), 2006; 2020). Além disso, estima-se que a adoção de melhorias no sistema de coleta e tratamento de esgoto brasileiro seja capaz de aumentar a geração de LE para 4,7 milhões t ano<sup>-1</sup> (massa seca), que, se não forem bem manejadas, podem representar desperdício de um material orgânico com grande potencial agrônômico (Nascimento et al., 2020).

Contudo, antes de ser utilizado para qualquer atividade agrícola, o lodo de esgoto deve ser tratado e estabilizado e, a depender da sua composição, conforme critérios da resolução CONAMA nº 498-2020 será classificado como apto ou não para a aplicação em solos (Brasil (CONAMA), 2020). Esta fração útil (estabilizada) do LE é renomeada biossólido e utilizada como adubo orgânico ou condicionador de solos, melhorando aspectos físicos, químicos e biológicos que podem contribuir de forma positiva no desenvolvimento e produção das plantas e na preservação dos solos e, além disso, promover a economia circular (Bettiol & Ghini, 2011; Kumar et al., 2017). A exigência legal de tratamento e estabilização do LE se faz necessária pois, por ser um resíduo bastante heterogêneo, apresenta concentrações ambientalmente relevantes de poluentes em sua composição, tais como metais pesados, patógenos e contaminantes emergentes, os quais podem trazer implicações negativas sobre toda a cadeia trófica e o meio ambiente que não podem ser ignoradas (Fijalkowski et al., 2017; Yakameran & Aygün, 2021).

Os agentes antimicrobianos são importantes contaminantes emergentes presentes no LE, uma vez que 40-90% dos antibióticos administrados não são metabolizados e acabam sendo excretados ainda em sua forma ativa (Sarmah et al., 2006). A sua presença no ambiente estimula o aparecimento de microrganismos resistentes devido aos genes de resistência a antimicrobianos (GRAs) transferidos horizontalmente pelos elementos genéticos móveis (EGMs), sendo um processo de resposta das comunidades microbianas às perturbações ambientais que leva ao

desequilíbrio do resistoma natural (Chen et al., 2016; Wang et al., 2022). Toda a problemática é magnificada pelo uso crescente e indiscriminado de antimicrobianos pela população mundial, o qual aumentou 65% no período 2000-2015 (de 21,1 para 34,8 bilhões de doses diárias), sendo o Brasil o 17º país com maior número de doses de antimicrobianos consumidas, superando, em média, toda a Europa (Klein et al., 2018; OMS, 2018). Além disso, estudos revelam 10% de aumento no consumo mensal, no Brasil e no mundo, atribuídos à pandemia por COVID-19 (Del Fiol et al., 2022; Nandi et al., 2023).

Dentre as classes de antimicrobianos com consumo mais abundantes, as fluoroquinolonas, tetraciclina e sulfonamidas são listadas como prioritárias para monitoramento em compartimentos ambientais devido a diferentes níveis de persistência e degradação (Klein et al., 2018; Hernando-Amado et al., 2019), e, para solos da América Latina, existe uma enorme escassez de estudos de monitoramento de contaminantes emergentes e da resistência antimicrobiana (Reichert et al., 2019). As concentrações dessas classes encontradas no lodo de esgoto variam de  $>1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  para fluoroquinolonas e  $> 10 \mu\text{g kg}^{-1}$  para tetraciclina e sulfonamidas (Ezzariai et al., 2018; Uluseker et al., 2021; Barreiro et al., 2022) e por isso, atualmente a disseminação desses antimicrobianos e GRAs no solo é uma das principais preocupações associadas ao uso de LE com fins agrícolas, principalmente quando estes resíduos não são adequadamente tratados. Portanto, é fundamental monitorar sua presença (i.e. dos agentes antimicrobianos e seus GRAs), assim como sua dinâmica de dispersão e seus efeitos sobre a microbiota de diferentes solos manejados com bio sólidos (Chen et al., 2018, Chen et al., 2019).

A resistência antimicrobiana (RAM) é uma característica majoritariamente transferida horizontalmente pelos elementos genéticos móveis e ocorre quando adaptações e mudanças genéticas nas bactérias tornam menos eficiente determinada droga antes utilizada para tratar infecções. Este evento ocorre de forma mais rápida do que o lançamento de novos agentes antimicrobianos e, por isso, a RAM representa uma ameaça crescente à saúde pública mundial (Jasovský et al., 2016; Samreen et al., 2021). Em 2019, houve cerca de 1,3 e 5 milhões de mortes no mundo associadas direta e indiretamente, respectivamente, à ineficácia de tratamentos de infecções causadas por bactérias resistentes, sendo no Brasil registrado 90 óbitos diários e, estima-se que o registro mundial será de 10 milhões

de mortes por ano até 2050 (Rodríguez-Baño et al., 2021; Murray et al., 2022; Tang et al., 2023). Isto ganha magnitude quando a RAM não é observada apenas quando há pressão de seleção dos antimicrobianos de uso antrópico, sendo os GRAs também encontrados em áreas sem interferência humana, como em solos prístinos da Antártida ou de florestas boreais onde já foram encontrados genes de resistência à antimicrobianos de amplo espectro em que a RAM ainda não foi identificada na área da saúde (Van Goethem et al., 2018; Delgado-Baquerizo et al., 2022). Portanto, a população microbiana dos solos é considerada um reservatório de GRAs em seu resistoma natural e por isso, se faz necessário adotar estratégias que visem a redução de GRAs e EGMs nos bio sólidos antes da sua aplicação agrícola (Cytryn, 2013; Verraes et al., 2013; Nesme & Simonet, 2015).

No Brasil, a legislação que regulamenta o uso de LE na agricultura não inclui os agentes antimicrobianos e nem seus genes de resistência, mas somente os teores de metais pesados e os agentes patogênicos, parasitas e vetores (Brasil (CONAMA), 2020), apesar de os trabalhos mais recentes apontarem os seus riscos ao ambiente e à saúde humana (Grenni et al., 2018; Duarte et al., 2019; Sorinolu et al., 2021; Wang et al., 2021; Zhang et al., 2022; Wu et al., 2023), principalmente quando o LE é aplicado ao solo na sua forma fresca, o que ratifica a necessidade iminente de tratamento desse material antes de sua aplicação nos solos. Dentre as abordagens de tratamentos para o LE, a adição de calcário e a compostagem termofílica se mostram promissoras pois: podem ser realizadas em larga escala devido aos custos operacionais aceitáveis, auxiliando o manejo das grandes quantidades geradas; produzem fertilizantes orgânicos mais estabilizados, capazes de reduzir a biodisponibilidade de metais pesados e trazer maiores benefícios ao sistema solo-planta-microrganismo no longo prazo; pela potencial redução de GRAs e sobretudo; por conferirem maior qualidade para o lodo de esgoto (Alvarenga et al., 2015; Raheem et al., 2018; Nguyen & Shima, 2019). No entanto, a eficiência dessas abordagens (adição de calcário e compostagem termofílica) na atenuação dos GRAs ainda se mostra bastante questionável na literatura (Ezzariai et al., 2018; Hoang et al., 2022).

A adição de calcário como tratamento do LE é uma prática comum para elevar o pH do resíduo a fim de reduzir a disponibilidade de metais pesados, retardar as reações bioquímicas responsáveis por atrair vetores e promover odor (reduzindo

sua putrefação), além de reduzir até 99% de vírus e bactérias patogênicas, pois sua hidrólise gera uma reação exotérmica com capacidade higienizadora (Bina et al., 2004; Plachá et al., 2008; Anderson et al., 2015; Lopes et al., 2020) e, com isso promove maior qualidade do lodo de esgoto para fins agrícolas e ambientais (Hoang et al., 2022). A elevação do pH com a adição de calcário pode mitigar indiretamente a propagação, diversidade e abundância de GRAs, uma vez que é capaz de reduzir patógenos (Lear et al., 2023; Li et al., 2022). No entanto, outros estudos indicam que apesar de reduzir a carga microbiana, a adição de calcário pode não favorecer a degradação do material genético, tendo pouca influência na concentração de GRAs (Burch et al., 2017; Lopes et al., 2020). Ainda assim, alguns genes mostram uma relação negativa com os valores de pH, o que pode promover alteração na propagação de bactérias resistentes (Peng et al., 2018). Huang et al. (2016) reportaram que as condições alcalinas promovidas pela adição de calcário como tratamento de águas residuárias inibiu a transferência horizontal de genes, reduzindo a abundância de genes resistentes à classe tetraciclinas, enquanto em condições mais ácidas a abundância desses GRAs foi aumentada.

Já a compostagem termofílica se destaca na promoção de qualidade do lodo de esgoto ao garantir um produto final de volume reduzido e mais estabilizado, higienizado por um processo de biotransformação eficaz, econômico e ambientalmente correto (Alvarenga et al., 2015). Há a disponibilização de nutrientes, complexação de metais pesados e degradação de compostos orgânicos xenobióticos por meio da mineralização acelerada da matéria orgânica, porém a intensidade do processo e a qualidade final do biossólido dependem das condições criadas para a atividade dos microrganismos atuantes (Nafez et al., 2015; Naserian et al., 2021; Sugurbekova et al., 2023). Estudos indicam que as altas temperaturas atingidas (55 – 70 °C) favorecem também a dissipação de agentes antimicrobianos, de seus GRAs e a eliminação ou redução na população de patógenos (Su et al., 2015; Liao et al., 2018; Lin et al., 2018; Lü et al., 2021), o que potencializa a higienização e qualidade do lodo de esgoto. A compostagem termofílica de resíduos de origem animal foi capaz de reduzir em 92% e 76% os genes de resistência às tetraciclinas e sulfonamidas, respectivamente, além de atingir níveis indetectáveis após 42 dias para fluoroquinolonas (Selvam et al., 2012; Lin et al., 2021; Wang et al., 2022), porém, menor é o conhecimento acerca do comportamento dessas classes

na compostagem de LE, apesar das altas concentrações e GRAs encontrados (Werner et al., 2022).

Sabe-se que a destinação de agentes antimicrobianos e seus GRAs durante a compostagem e nos solos é menos investigada com a aplicação de biossólidos, em comparação à esterco animal (Tan et al., 2023). Porém Qiu et al. (2021) reportaram que a adição de biocarvão e turfa à compostagem do LE reduziu 18 e 43% a abundância de GRAs, respectivamente, sugerindo que a presença de diferentes aditivos promove distintas taxas de remoção de GRAs durante a compostagem. Contudo, o efeito da compostagem do LE sobre os GRAs pode ser transiente ou apresentar divergentes tendências, pois alguns podem ser efetivamente reduzidos, enquanto outros persistem ou até mesmo aumentam suas concentrações (Ezzariai et al., 2018; Wang et al., 2023). Neste contexto, as divergências podem ser explicadas pois as variações de materiais estruturantes, condições de temperatura e umidade, períodos de revolvimento e instalação, métodos de aeração e tratamentos físico-químicos empregados afetam de forma distinta a comunidade microbiana durante o processo de compostagem, o que influencia também na degradação de antimicrobianos e seus genes de resistência e elementos genéticos móveis (Zhang et al., 2016; Chen et al., 2021).

Além disso, a grande maioria dos estudos existentes (72%) foram realizados em escalas laboratoriais (Ezzariai et al., 2018), em que se utilizam reatores com condições controladas ou pilhas pequenas, que não necessariamente representam o comportamento das classes de antimicrobianos e seus GRAs quando o biossólido é produzido em larga escala (ou seja, em escala industrial), dificultando a padronização dos resultados obtidos até o presente momento. No entanto, López-González et al. (2021) conseguiram comprovar a eficácia da compostagem termofílica do lodo de esgoto em escala industrial em eliminar totalmente a população de bactérias resistentes à antibióticos após o período de 90 dias, porém seus GRAs não foram avaliados.

Ao analisar essas duas abordagens de tratamento de forma conjunta, a adição de calcário ao processo de compostagem do lodo de esgoto pode ser benéfica à sua qualidade pois a elevação do pH é capaz de otimizar a complexação de metais pesados, reduzindo em mais de 45, 75 e 70% a disponibilidade de Cu, Mn

e Zn no composto final, respectivamente (Fang & Wong, 1999; Wong & Fang, 2000). Por outro lado, valores de baixo pH não só inibem a atividade bacteriana como dificulta a transição da fase mesofílica para a termofílica (Thomas et al., 2020). Paralelamente, sabe-se que a aplicação de calcário é capaz de prolongar a fase termofílica sem interferir no tempo de maturação do composto (Wong & Fang, 2000; Samaras et al., 2008; Chen, et al., 2021; Lin, et al., 2021). Wong e Fang (2000) observaram que ao adicionar calcário, a fase termofílica da compostagem foi prolongada em 7 dias (de 50 para 57 dias) e a maturação do composto foi mantida em 63 dias, o que poderia contribuir para a dissipação dos GRAs sem prolongar o período operacional do processo. Essa mesma tendência foi observada por Awasthi et al. (2016) ao avaliarem o efeito da adição de calcário na co-compostagem de lodo de esgoto e biocarvão. Isto seria amplamente desejável no manejo de grandes quantidades de resíduos em escala industrial, pois pode otimizar formas de tratamento do lodo de esgoto buscando maior atenuação de agentes antimicrobianos, seus GRAs e EGMs.

Sem dúvidas, tratamentos mais eficazes na promoção de maior qualidade do lodo de esgoto são cada vez mais requeridos, o que fortalece a estratégia de aproveitamento de nutrientes e gestão deste resíduo. No entanto, são necessárias medidas simultâneas que abordem as perspectivas agrônômicas (fertilizantes alternativos e nutrição das plantas), de preservação dos solos (melhor condicionamento e benefícios à sua biologia) e ambientais (redução de contaminantes emergentes e riscos de RAM) (Zhu et al., 2019). Neste contexto, avaliar os benefícios da aplicação de bio sólidos por meio de respostas fisiológicas das plantas, de alterações no microbioma e os indicadores de qualidade do solo (QS) se mostra promissor com uma abordagem ampla, assertiva e de mais fácil acesso. A QS é definida como a capacidade continuada do solo em funcionar como um ecossistema vivo que sustenta o desenvolvimento de plantas, animais e humanos e, é mensurada por atributos químicos, físicos e biológicos (Karlen et al., 1997).

Os indicadores químicos e físicos costumam responder às alterações de forma mais delongada, enquanto os indicadores biológicos apresentam maior sensibilidade ao manejo do solo e às alterações ocasionadas pela aplicação de resíduos orgânicos como os bio sólidos (Song et al., 2018; Hermans et al., 2020). E,

para avaliação dos benefícios a curto-prazo, o acúmulo de nutrientes na planta e as alterações na atividade enzimática, carbono da biomassa microbiana (CBM), diversidade, composição e estrutura da comunidade bacteriana se fazem úteis, pois indicam a disponibilidade dos elementos presentes no solo, são sensíveis às alterações e garantem o monitoramento e execução de funções ecossistêmicas do solo (Schloter et al., 2018; Nunes et al., 2020; Withers et al., 2020; Sobucki et al., 2021). Portanto, o monitoramento da atividade funcional e alterações na microbiologia do solo, o acesso direto do estado nutricional e parâmetros fitotécnicos das plantas cultivadas, assim como a dispersão de genes de resistência antimicrobiana e elementos genéticos móveis nos solos se mostra uma estratégia assertiva para avaliação da qualidade do lodo de esgoto na promoção de benefícios do seu uso agrícola.

No entanto, vale lembrar que a grande maioria dos estudos de compostagem existentes foram realizados em escalas laboratoriais e, além disso, inexistem trabalhos avaliando a ocorrência de GRAs e EGMs em solos brasileiros tratados com lodo de esgoto, sendo poucos os estudos na América Latina (Reichert et al., 2019), o que dificulta entender os efeitos de seu uso em condições de solos tropicais. Em outras palavras, a real eficácia desses tratamentos na produção de um composto de qualidade precisaria ser testada e ratificada em escala industrial, com a subsequente avaliação deste bio sólido produzido aplicado em solos tropicais, a fim de verificar a capacidade de replicação e de transferência dos GRAs recorrentes do lodo de esgoto aos solos após a atenuação durante o processo compostagem. Portanto, avaliar formas de tratamentos do LE eficazes no manejo das grandes quantidades geradas, replicáveis em larga escala, assim como a abordagem agrônoma, ambiental e de preservação dos solos decorrentes da aplicação de bio sólidos faz com que este estudo se alinhe com temas atuais e de grande relevância, envolvendo o desenvolvimento de forma economicamente viável, ambientalmente sustentável e socialmente aceito (Hussain et al., 2018).

## **1.1 Hipóteses**

A compostagem termofílica do lodo de esgoto em escala industrial gera um composto de maior qualidade com benefícios à biologia do solo e ao desenvolvimento das plantas de milho.

A compostagem termofílica do lodo de esgoto em escala industrial é eficiente na dissipação da resistência antimicrobiana (real e potencial) em solos fertilizados com o lodo tratado, sendo que a adição de calcário potencializa esses efeitos.

## **1.2 Objetivos**

Avaliar como o biossólido obtido por compostagem industrial com e sem adição de calcário afeta os indicadores de qualidade biológica do solo e o completo desenvolvimento da cultura do milho.

Avaliar a dissipação de genes de resistência das classes fluoroquinolonas, tetraciclinas e sulfonamidas e elementos genéticos móveis em solos tropicais fertilizados com biossólido obtido por compostagem industrial com e sem adição de calcário.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta e caracterização inicial de solos

Dois solos de texturas contrastantes foram coletados na camada de 0-20 cm no município de Piracicaba, São Paulo, Brasil, sendo um LATOSSOLO VERMELHO distrófico (LVd) de textura argilosa (22°43'41"S, 47°33'04"O, altitude 622m) e um LATOSSOLO VERMELHO AMARELO (LVa) de textura franco-arenosa (22°43'06"S, 47°36'55"O, altitude 699m). Coletaram-se aproximadamente 500 kg de cada solo, que foram secos ao ar livre, destorroados e tamisados (2mm). Após isso, 500g de cada solo foram utilizadas para realização da determinação das propriedades físico-químicas (Tabela 1) nos laboratórios de Física do Solo e de Química e Fertilidade do Solo do Departamento de Ciência do Solo (LSO) da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (ESALQ/USP).

A caracterização física dos solos consistiu na separação dos totais de areia, silte e argila pelo método densimétrico (Bouyoucos, 1962). A caracterização química foi realizada segundo (Raij et al., 2001), sendo determinados: pH ( $\text{CaCl}_2$ , 0,01 mol L<sup>-1</sup>); acidez potencial ( $\text{H}^+ + \text{Al}^{3+}$ , solução SMP);  $\text{Al}^{3+}$  trocável (extraído com KCl (1 mol L<sup>-1</sup>) e titulado com NaOH (0,025 mol L<sup>-1</sup>);  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e P-disponível (extração por resina de troca iônica e detecção por fotometria de chama e espectrometria de absorção atômica); matéria orgânica (extração pela oxidação em dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) e detecção por colorimetria);  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  (extração pelo método DTPA e detecção por espectrofotometria de absorção atômica). Baseado em tais valores, foram obtidos: soma de bases (SB) ( $\text{K}^+ + \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ ); capacidade de troca catiônica (CTC) efetiva (SB +  $\text{Al}^{3+}$ ); saturação por bases (V%) e alumínio (m%).

**Tabela 1.** Caracterização físico-química inicial do solo argiloso (LVd) e solo franco-arenoso (LVa).

Atributos	LVd	LVa
Areia (g kg <sup>-1</sup> )	322	816
Silte (g kg <sup>-1</sup> )	104	9
Argila (g kg <sup>-1</sup> )	574	175
pH (CaCl <sub>2</sub> )	3,9	5,0
M.O. (g kg <sup>-1</sup> )	24,8	8,3
P (mg dm <sup>-3</sup> )	5	10,2
K <sup>+</sup> (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,8	0,9
Ca <sup>2+</sup> (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	6,0	8,7
Mg <sup>2+</sup> (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	3,3	4,9
S (mg dm <sup>-3</sup> )	12,3	5
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	0,5	0,2
Zn (mg dm <sup>-3</sup> )	0,3	0,6
Fe (mg dm <sup>-3</sup> )	86,6	40,8
Mn (mg dm <sup>-3</sup> )	6,8	0,9
Al <sup>3+</sup> (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	15,1	0,5
SB (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	10,1	14,5
CTC (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	25,2	15,0
V (%)	15,8	51,2
m (%)	59,9	3,3

M.O = matéria orgânica; SB = soma de bases; CTC = capacidade de troca de cátions efetiva; V = saturação de base; m = saturação de alumínio; média ( $n=3$ ).

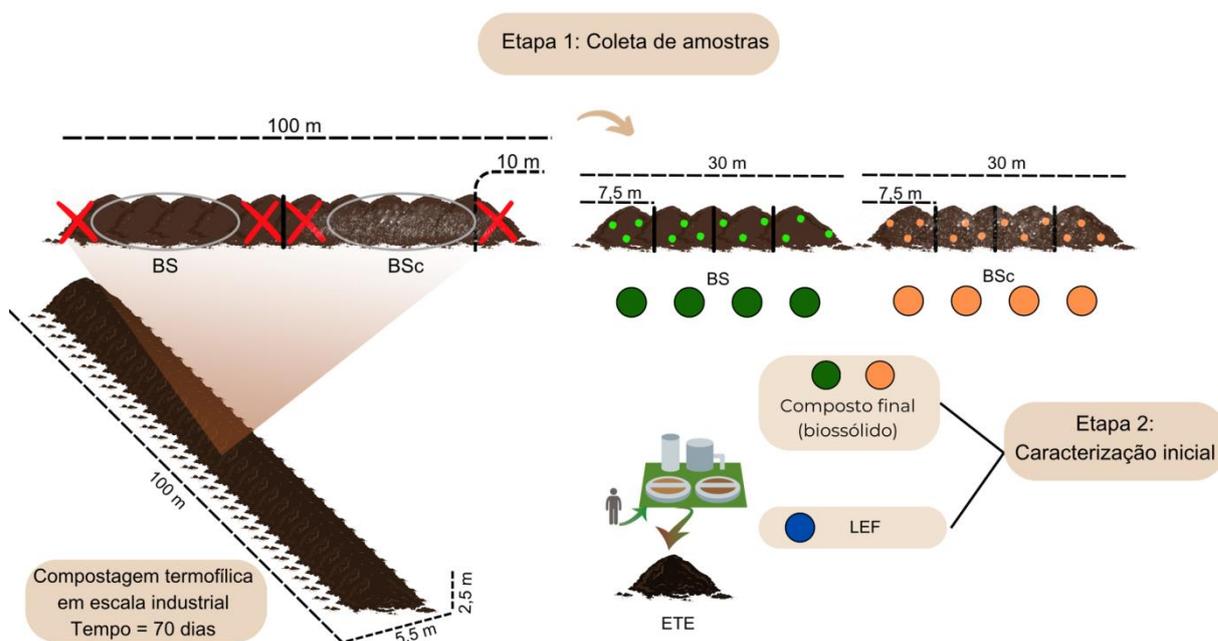
## 2.2 Coleta e caracterização inicial de resíduos orgânicos

Foram coletadas três amostras de resíduos orgânicos, sendo dois biossólidos (i.e lodo de esgoto submetido ao processo de compostagem termofílica), provenientes da Unidade de Gerenciamento de Lodos (UGL) e um material fresco (i.e lodo de esgoto fresco / in natura), da Estação de Tratamento de Esgoto de Jundiaí (Figura 1), obtido a partir de lagoas aeradas de mistura completa seguidas de lagoa de decantação, em Jundiaí, São Paulo, Brasil. A compostagem termofílica de ambos os biossólidos foi realizada em escala industrial pela UGL, em leiras de 100m de comprimento, 5,5m de largura e 2,5m de altura, pelo método de aeração por revolvimento por 70 dias, com e sem adição de calcário (15 kg de calcário por 1 t de lodo in natura) (Figura 2). Valores de relação C:N, temperatura, umidade e

aeração foram ajustados conforme proposto por Kiehl (1998), sendo os detalhes técnicos, isto é, material estruturante e tempo de revolvimento da leira, definidos e seguidos pela rotina de trabalho da UGL, a fim de ser fidedigno ao cenário de compostagem termofílica em escala industrial. A coleta dos resíduos orgânicos à base de lodo de esgoto foi realizada ao fim do processo de compostagem (70 dias, fase de maturação), sendo 10 m de cada extremidade das leiras descartados durante a amostragem, conferindo uma área útil de 30 m para cada leira com e sem calcário, que foram subdivididas em 4 partes de 7,5 m. Em cada parte, foram coletados 3 pontos para compor a amostra composta, conferindo um total de 12 amostras (2 tratamentos x 4 repetições + 4 amostras controle (lodo de esgoto fresco)) (Figura 2).



**Figura 1:** Estrutura da Unidade de Gerenciamento de Lodos (UGL) - Jundiaí, São Paulo, para realização da compostagem termofílica do lodo de esgoto em escada industrial, sendo: A) galpão de compostagem; B) leira de compostagem e; C) matéria prima para compostagem (lodo de esgoto fresco).



**Figura 2:** Esquema de coleta de amostras de biossólidos nas leiras de compostagem termofílica e de lodo de esgoto fresco (LEF). Sendo: BS = biossólido obtido por compostagem industrial sem calcário; BSc = biossólido obtido por compostagem industrial com calcário; ETE = estação de tratamento de esgoto.

Os biossólidos maturados foram tamisados em peneiras de 5mm e juntamente com o material fresco, submetidos à caracterização físico-química no Laboratório de Fertilizantes e Resíduos do Instituto Agronômico de Campinas, de acordo com as diretrizes da resolução N°375-2006 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2006) (Tabela 2). Foram determinados teores de: metais (métodos EPA-SW-846-3051 e EPA-SW-846-6010 (Amnesty International, 2007); Nitrogênio total (método Kjeldahl ((AOAC, 1995),  $\text{NO}_2+\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4+$  , carbono total, P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (B, Cu Fe, Mn, Mo e Zn) de acordo com os manuais de Análise Química de Resíduos Sólidos para Monitoramento e Estudos Agroambientais (Andrade; Abreu, 2006) e Manual de Métodos Analíticos Oficiais Para Fertilizantes e Corretivos (BRASIL, 2017); além da umidade (perda de massa a 60°C) e; pH (determinação em extrato aquoso na proporção 1:10 (resíduo/composto:água).

**Tabela 2.** Caracterização físico-química de resíduos orgânicos frescos e compostados.

Atributos	LEFi	BS	BSc	LEF
Al (mg kg <sup>-1</sup> )	34511 ± 762	4859 ± 66	6032 ± 245	24735 ± 607
As (mg kg <sup>-1</sup> )	16 ± 1,78	9 ± 0,2	11 ± 2,1	16 ± 4,9
Ba (mg kg <sup>-1</sup> )	381 ± 45,7	103 ± 3,4	102 ± 2,6	46 ± 4,7
Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	3 ± 0,08	1 ± 0,03	1 ± 0,02	2 ± 0,2
Cr (mg kg <sup>-1</sup> )	118 ± 1,5	36 ± 1,2	37 ± 1,5	101 ± 12,6
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	38 ± 1,15	19 ± 0,8	18 ± 1	34 ± 2,6
Hg (mg kg <sup>-1</sup> )	< 1	< 1	< 1	< 1
Se (mg kg <sup>-1</sup> )	< 1	< 1	< 1	< 1
TC (g kg <sup>-1</sup> )	317 ± 14,5	284 ± 12,6	277 ± 4,7	300 ± 18,8
TN (g kg <sup>-1</sup> )	28 ± 0,7	19 ± 0,5	16 ± 1,8	30 ± 2,5
C:N	11:1	15:1	17:1	10:1
P (mg kg <sup>-1</sup> )	14487 ± 473	10776 ± 366	10648 ± 215	15007 ± 1131
K (mg kg <sup>-1</sup> )	1100 ± 122	3606 ± 271,2	3647 ± 375	1947 ± 217
Ca (mg kg <sup>-1</sup> )	18430 ± 533	4756 ± 320	7684 ± 576	26073 ± 603
Mg (mg kg <sup>-1</sup> )	646 ± 91,4	1734 ± 48,4	4073 ± 196	3330 ± 380
S (mg kg <sup>-1</sup> )	21606 ± 235	22104 ± 1403	21344 ± 680	20623 ± 2312
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	28573 ± 764	6933 ± 19,7	8356 ± 315	29831 ± 655
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	590 ± 37	273 ± 3,3	281 ± 3,1	749 ± 31,7
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	227 ± 5,6	132 ± 3,9	126 ± 3,8	232 ± 9,1
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	10,3 ± 0,4	625 ± 16,9	614 ± 14,9	1048 ± 114
B (mg kg <sup>-1</sup> )	25,1 ± 0,5	25 ± 3,6	15 ± 2,3	29 ± 0,7
Mo (mg kg <sup>-1</sup> )	13 ± 0,6	6 ± 0,3	5 ± 0,1	16 ± 1,9
Ni (mg kg <sup>-1</sup> )	54 ± 0,3	22 ± 0,4	22 ± 0,6	50 ± 5,9
Na (mg kg <sup>-1</sup> )	2960 ± 111	3183 ± 228	2852 ± 271	2147 ± 222
NH <sub>4</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	72 ± 9,7	117 ± 14,1	61 ± 13,3	143 ± 31,8
NO <sub>2</sub> +NO <sub>3</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	4 ± 0,23	74 ± 8,40	31 ± 2,8	20 ± 11,6
umidade	80 ± 1,5	54 ± 1,7	57 ± 0,4	78 ± 2,9
pH (1:10)	8	7	7	8

LEFi = lodo de esgoto fresco inicial (anterior à compostagem); BS = biossólido obtido por compostagem industrial sem calcário; BSc = biossólido obtido por compostagem industrial com calcário; LEF = lodo de esgoto fresco; TC = teor de carbono total; TN = teor de nitrogênio total. Médias ± erro padrão (n=4).

### 2.3 Experimento em vasos

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação pelo período de 100 dias, com delineamento inteiramente casualizado (DIC) e 32 parcelas: [(3 resíduos + 1 controle) x 2 solos x 4 repetições] (Figura 3). Cada parcela correspondeu a um vaso com capacidade para 11L preenchido com 10 kg de solo. A acidez e a saturação de bases (~70%) (Van Raij & Cantarella, 1996) dos solos foram corrigidas com  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{MgO}$ , sendo os corretivos incorporados um dia antes da adição dos resíduos orgânicos. Todos os tratamentos (exceto o controle), receberam  $15 \text{ t ha}^{-1}$  (base seca) de compostos / resíduos orgânicos à base de lodo de esgoto, que foram incorporadas ao solo (primeiros 5 cm) uma semana antes da semeadura da cultura milho (*Zea mays* L.).

No momento da semeadura os solos foram suplementados com fertilizante mineral, sendo 100% no tratamento controle e 60% nos tratamentos com adição de resíduos, de acordo com as concentrações requeridas para adubação de solos conduzidos em vasos, proposto por Oliveira et al. (1991). Foram semeadas cinco sementes do híbrido de milho DBK 335 PRO3 (DeKalb) e, após sete dias de germinação, foi realizado desbaste para manter uma única planta por vaso. O experimento foi irrigado com água deionizada e a umidade mantida em torno de 70% da capacidade de retenção de água (Silva, 2009). As doses de fertilizantes e corretivos aplicados ao solo são apresentados na tabela S1.

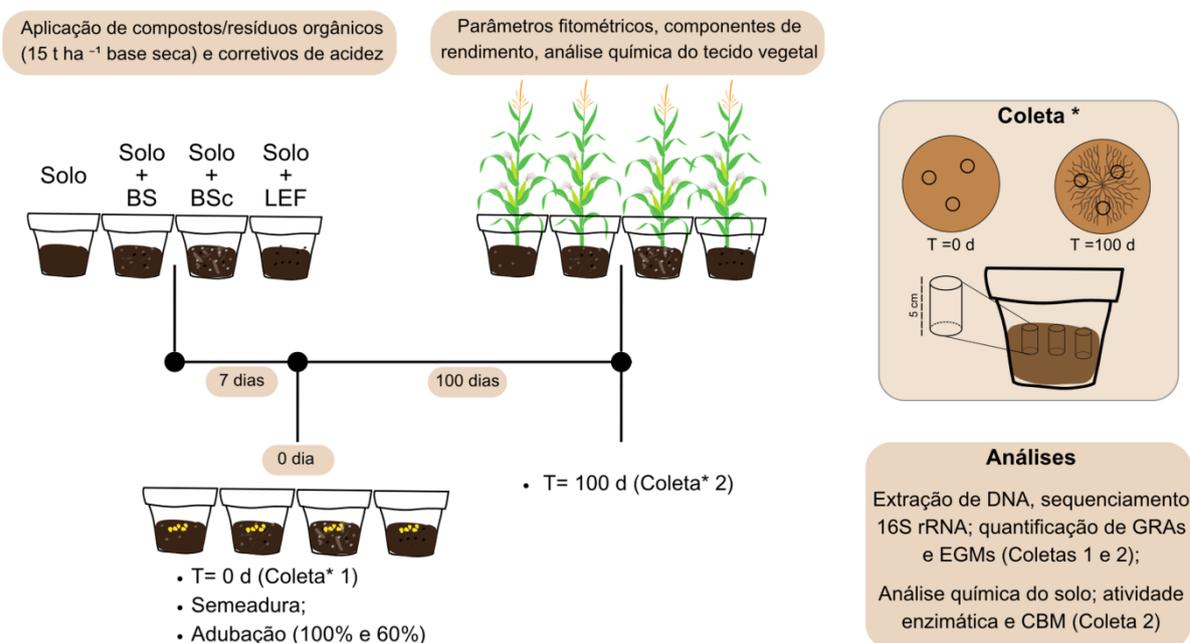


**Figura 3:** Condução do experimento em casa-de-vegetação, sendo: A) estágio vegetativo; B) estágio reprodutivo e; C) colheita das espigas.

### 2.3.1 Coletas e determinações realizadas

Para determinação dos diferentes parâmetros avaliados nos solos, duas coletas foram realizadas. A coleta 1 (Tempo = 0 dia) foi realizada momentos antes da semeadura, retirando 3 pontos de cada vaso nos primeiros 5 cm de solo para se obter uma amostra composta por parcela, sendo o mesmo realizado ao fim do experimento, no dia da colheita da cultura milho, configurando a coleta 2 (T = 100 dias). As análises da estrutura, composição e diversidade da comunidade microbiana e a quantificação de GRAs e EGMs foram realizadas em T=0 d e T=100 d. Enquanto outras determinações referentes à atividade enzimática, carbono da biomassa microbiana e análise química dos solos no fim do cultivo foram realizadas utilizando apenas T=100 d. Os parâmetros fitotécnicos e a colheita das espigas (Figura S1), além da determinação dos componentes de rendimento da cultura milho e a análise química do tecido vegetal também foram avaliadas ao final do

experimento. O esquema resumindo as atividades dos itens 2.3 e 2.3.1 é apresentado na figura 4.



**Figura 4:** Esquema de instalação, tempos de coleta e análises realizadas no experimento em casa-de-vegetação, sendo o mesmo feito tanto para o solo argiloso (LVd) quanto franco-arenoso (LVa). T = tempo (dias); BS = bioossólido obtido por compostagem industrial sem calcário; BSc = bioossólido obtido por compostagem industrial com calcário; LEF = lodo de esgoto fresco; GRAs = genes de resistência antimicrobiana; EGMs = elementos genéticos móveis; CBM = carbono da biomassa microbiana.

### 2.3.2 Atividade enzimática e carbono da biomassa microbiana

Foram determinadas as enzimas arilsulfatase (ciclo do enxofre),  $\beta$ -glicosidase (ciclo do carbono) e fosfatase ácida (ciclo do fósforo) segundo Tabatabai (1994); e as enzimas urease (ciclo do nitrogênio) segundo Tabatabai & Bremner (1972) e desidrogenase segundo Casida et al. (1964). A determinação do carbono da biomassa microbiana do solo (CBM) foi realizada pelo método de fumigação-extração (Vance et al., 1987). Todas as determinações foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Solo do LSO da ESALQ-USP.

### 2.3.3 Análise química: solos e tecido vegetal

Após o fim do experimento, os teores de nutrientes remanescentes nos solos foram determinados seguindo os mesmos parâmetros e metodologias já descritos no

item 2.1. Para a análise química do tecido vegetal, a parte aérea (folhas e colmo) foi colocada em sacos de papel e submetida a secagem por 48h a 60°C em estufa de circulação forçada de ar. Em seguida, o material seco foi triturado em moinho de facas tipo Willey.

Os macros e micronutrientes foram determinados de acordo com Malavolta; Vitti; Oliveira (1989). Para o N total, utilizou-se o método da digestão ácida seguida de destilação com ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) e titulação com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ); o P foi extraído com o método Vanadato-molibdato e quantificação por colorimetria; o S foi determinado por colorimetria da turbidez da precipitação do enxofre com cloreto de bário; enquanto os demais elementos (Ca, Mg, K, Fe, Mn, Cu, B e Zn) a partir do extrato obtido com ácido nítrico ( $HNO_3$ ) e ácido perclórico ( $HClO_4$ ) e quantificados por espectrofotometria de absorção atômica – ICP OES. Todas as determinações de macro e micronutrientes no tecido foliar foram realizadas no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do LSO da ESALQ-USP.

#### **2.3.4 Parâmetros fitotécnicos e componentes de rendimento**

Após 100 dias de experimento, as plantas foram avaliadas quanto a altura final (medição com trena), diâmetro de colmo (medição com paquímetro digital) e massa seca da parte aérea (pesagem). Além disso, foi realizada a colheita manual das espigas, sendo avaliados o diâmetro e comprimento da espiga, assim como a quantidade, massa e umidade dos grãos.

#### **2.3.5 Extração de DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA**

O DNA total foi extraído de 0,4 g de solo das coletas 1 e 2, utilizando o kit de extração comercial DNeasy® PowerSoilPro (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e qualidade do DNA extraído ( $\approx 100\mu L$ ) foram avaliadas por espectrofotometria (Nanodrop 2000c, Thermo Fisher, EUA) e a integridade foi verificada por eletroforese em gel agarose (1%) a 90V por 35 minutos, sendo usada solução de brometo de etídeo para coloração e visualização das amostras em luz ultravioleta. As amostras de DNA com bandas bem definidas e razão 260/280 nm  $\geq 1,8$  foram consideradas adequadas. O sequenciamento de DNA

foi realizado pela plataforma Illumina NovaSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA) com a amplificação do gene 16S rRNA incluindo a região V3-V4 (primers 16S-341F - CCTAYGGGRBGCASCAG e 16S-806R - GGACTACNNGGGTATCTAAT) para identificação da comunidade bacteriana (Caporaso et al., 2011).

### **2.3.6 Quantificação de genes de resistência antimicrobiana e elementos genéticos móveis por HT-qPCR**

O DNA extraído das amostras de solo nas coletas 1 e 2 foi enviado ao laboratório Resistomap Oy (Helsinque, Finlândia) onde as análises de HT-qPCR foram realizadas usando o sistema SmartChip Real-time PCR (TaKaRa Bio, Japão) incluindo genes validados pelo 384 Primer Set 2.0 (Stedtfeld et al., 2018). No presente estudo, foi utilizado um conjunto de 36 genes com primers validados, sendo 25 genes de resistência antimicrobiana (GRAs) para as classes de antimicrobianos sulfonamidas (SUL), tetraciclina (TET) e FQA (fluoroquinolona, quinolona, florfenicol, chloranfenicol e anfenicol); 10 genes de elementos genéticos móveis (EGMs) e; 1 16S rRNA como gene calibrador (Tabela S2). A mistura de reação de PCR (100 nL) foi preparada usando 1 × SmartChip TB Green Gene Expression Master Mix (TaKaRa Bio, Japão), água ultrapura livre de nuclease para PCR, 300 nM de cada primer e 2 ng/μL de DNA. Após desnaturação inicial a 95°C por 10 min, a PCR compreendeu 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 15 s e 72°C por 30 s, seguido de acréscimo de 0,4°C a cada etapa até atingir 97°C.

## **2.4 Forma de análises dos dados**

Os dados foram submetidos a teste de normalidade seguido da análise de variância (ANOVA), com teste F ao nível de 5% de significância. Em caso de diferenças entre os tratamentos, houve comparação de médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), realizada no software estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

A quantidade acumulada de nutrientes na parte aérea das plantas foi obtida pelo produto do teor de nutriente ( $\text{g kg}^{-1}$  ou  $\text{mg kg}^{-1}$ ) e a massa seca da parte aérea (g). Para o cálculo do componente de rendimento peso de mil grãos, a umidade dos grãos foi determinada e corrigida para 130 g de água  $\text{kg}^{-1}$  de massa seca.

Os dados brutos originados do sequenciamento foram processados em ambiente de linguagem de programação R usando o pacote DADA2 (Callahan et al., 2016). Os arquivos FASTQ foram filtrados para remoção de barcodes, primers e adaptadores e apenas sequências com escore Phred de alta qualidade ( $Q > 30$ ) foram mantidas para análises subsequentes, resultando em sequências de tamanho 2 x 220 bp. As leituras foram corrigidas usando o algoritmo learnErrors do DADA2 e foram desreplicadas antes da fusão de primers e remoção de quimeras. Finalmente, as amostras foram rarefeitas a 31.284 sequências para eliminar o esforço amostral / normalização dos dados, e então as sequências mescladas foram designadas como ASVs (do inglês Amplicon Sequence Variants) e classificadas de acordo com a versão 138.1 do banco de dados taxonômico SILVA (Quast et al., 2013), além disso, singletons e doubletons foram removidos.

Os dados taxonômicos gerados pelo pipeline do DADA2 foram importados para o pacote Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) e plataforma MicrobiomeAnalyst 2.0 (Chong et al., 2020; Lu et al., 2023) para as análises ecológicas (índices de diversidade) e, o pacote ggplot2 (Wickham, 2011) foi utilizado para processamentos gráficos. ASVs foram avaliadas a nível de filo e família, sendo também utilizadas como input para o acesso da estrutura da comunidade bacteriana usando o escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) baseadas na matriz de dissimilaridade de distância Bray-Curtis. A análise multivariada de variância (PERMANOVA,  $p < 0.05$ ) foi utilizada para distinguir a beta diversidade da comunidade bacteriana dos solos.

Todas as reações HT-qPCR foram realizadas em triplicata e os resultados foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: *i*) eficiência de amplificação na faixa de 90%-110% e amplicons com múltiplos picos de curvas de melting foram descartados; *ii*) um valor de threshold (cut-off -(CT)) de 31 foi utilizado como limite de detecção; *iii*) a quantificação foi considerada positiva quando ao menos duas duplicatas estavam acima do limite de detecção. O número de cópia de genes de cada GRAs, EGMs e o gene calibrador 16 rRNA foi calculado usando: Número de cópia de gene =  $10^{(\text{Cut-off} - \text{Ct}) / (10/3)}$  (Looft et al., 2012), sendo a abundância relativa para GRAs, EGMs obtidas por suas proporções de acordo com a abundância do gene bacteriano 16S rRNA. Análise de variância (ANOVA) foi realizada e, quando necessário, a normalização dos dados por transformação log foi

realizada antes das análises estatísticas. Médias, desvio padrões e valores de números de cópias de gene e abundância relativa foram determinados usando Microsoft Excel 2019, e o pacote ggplot2 (Wickham, 2011) foi usado para processamento gráficos.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

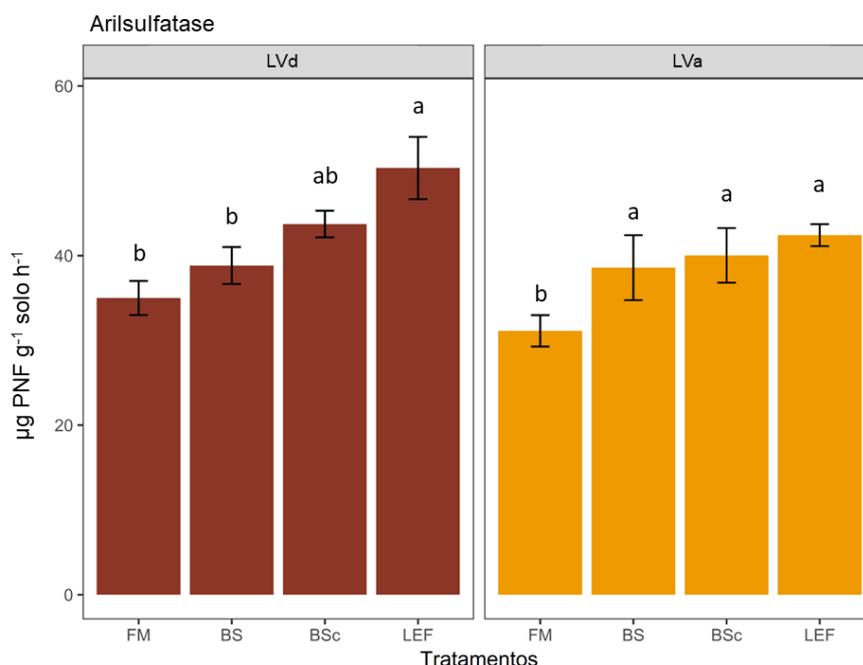
#### 3.1 Propriedades físico-químicas dos resíduos e compostos orgânicos

O processo de compostagem favoreceu a redução do pH e da maioria dos elementos determinados (Tabela 2). O lodo de esgoto é um material bastante heterogêneo e a principal limitação do seu uso na agricultura é vinculada a disponibilidade de metais pesados para o sistema solo-planta (Dede et al., 2017). Embora a concentração inicial encontrada em ambos os lodos de esgoto frescos não apresente riscos para o uso agrícola (CONAMA, 2020), a compostagem termofílica realizada em escala industrial favoreceu a qualidade do lodo de esgoto frente a redução de metais pesados (Tabela 2). Elementos como As, Ba, Cd, Cr, Pb, Fe, Al, Mn e Cu apresentaram acentuada redução em seus teores totais na comparação a antes (LEFi) e após a compostagem (BS e BSc) e isso se deve à eficiência do processo na redução da solubilidade e formação de complexos metálicos durante a estabilização da matéria orgânica. (Zhang et al., 2017; Rehana et al., 2020)

No entanto, a degradação acelerada promovida pelo processo de compostagem também foi capaz de reduzir nutrientes, resultando em perdas principalmente dos elementos voláteis como carbono total (TC), N e S. Além disso, os teores de P, Ca, Mo e Ni dos biossólidos também foram inferiores à sua versão *in natura*. Perdas de C são esperadas devido à redução da biomassa do resíduo e à estabilização do carbono orgânico pela humificação, liberando CO<sub>2</sub> à atmosfera (Xu et al., 2021), contudo, as reduções de TC observadas no presente trabalho foram menores do que o esperado. Perdas de N e P são esperadas devido à imobilização para biomassa microbiana e à volatilização de amônia (NH<sub>3</sub>) e a formação de fosfato de cálcio, respectivamente (Vandecasteele et al., 2016; Soobhany, 2018). Por outro lado, é notável que a compostagem também pode concentrar e aprimorar a disponibilidade de alguns elementos (Alvarenga et al., 2015), visto os maiores teores de K, Mg e as formas de N absorvíveis pelas raízes (NH<sup>4+</sup> e NO<sub>3</sub>) encontrados nos biossólidos. Usualmente lodo de esgoto têm menores teores de K em comparação às suas versões compostadas, uma vez que há alta solubilidade deste elemento nos efluentes e, Moretti et al. (2015) atribuíram o aumento de K em compostos de lodo de esgoto à presença de material vegetal na pilha de compostagem (cavaco / podas de árvores).

### 3.2 Atividade enzimática e carbono da biomassa microbiana do solo

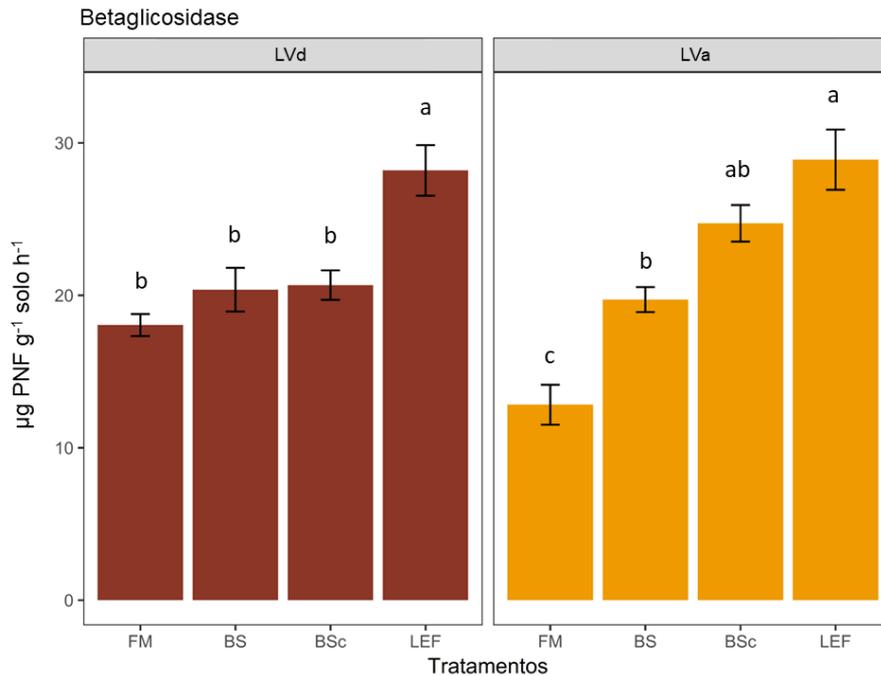
A atividade da enzima arilsulfatase (ARYL) variou de 35 a 50 e 31 a 42  $\mu\text{g PNF g}^{-1} \text{h}^{-1}$  nos solos LVd e LVa, respectivamente (Figura 5). ARYL é secretada por plantas, fungos e animais, mas principalmente por bactérias do solo, sendo capaz de catalisar a hidrólise de ésteres de sulfato orgânico (o qual pode representar de 30 a 75% do S orgânico do solo) em sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) (Tabatabai, 2005; Chen et al., 2016). Portanto, a ARYL cumpre papel crucial na disponibilidade de S por meio da mineralização do S orgânico e é amplamente encontrada em diferentes tipos de solos. Sua síntese depende da proporção entre níveis de sulfato solúvel ou adsorvido (Kunito et al., 2022), ou seja, sua síntese está relacionada à limitação de S no solo. Em outras palavras, menores valores de atividade de ARYL indicam maior disponibilidade de S no solo. Conforme esperado, esse comportamento foi observado nos solos tratados com fertilizantes minerais (FM - controle).



**Figura 5:** Atividade da enzima arilsulfatase no solo argiloso (LVd) e solo franco-arenoso (LVa), após 100 dias de experimento. As legendas se referem aos tratamentos: fertilizante mineral - controle (FM); biossólido obtido por compostagem industrial sem calcário (BS); biossólido obtido por compostagem industrial com calcário (BSc) e lodo de esgoto fresco (LEF). Médias e erro padrão ( $n = 4$ ) seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Já a aplicação de resíduos orgânicos, independentemente de sua natureza, aumentou a atividade da ARYL no solo (Figura 5), o que auxilia inclusive na recuperação de solos degradados (Carlson et al., 2015; Malik et al., 2021; Sobucki et al., 2021), tornando-os biologicamente mais ativos, uma vez que a comunidade microbiana se adapta às condições de restrição do nutriente prontamente disponível para exercer a função de decomposição de matéria orgânica e ciclagem de S. A aplicação do lodo de esgoto fresco ( $20.623 \text{ mg kg}^{-1} \text{ S no LE}$ ) resultou em maiores valores de atividade de ARYL em ambos os solos, sendo  $50$  e  $42 \text{ } \mu\text{g PNF g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$  para LVd e LVa, respectivamente, os quais foram estatisticamente diferentes do tratamento controle (Figura 5). De forma geral, os biossólidos apresentaram valores intermediários de atividade da ARYL, o que pode ser explicado devido à maior uniformidade e estabilidade do material obtido pela compostagem termofílica em escala industrial, sendo ligeiramente maior mediante à aplicação de calcário, provavelmente devido ao menor teor de Zn disponível no solo (Tabela S3). A enzima arilsulfatase é mais sensível aos efeitos deste elemento, seguido pelo Cu, Ni, Pb e Cd (Wyszkowska et al., 2016). Apesar da diferença de valores entre os tratamentos, de acordo com Mendes et al. (2018), a atividade geral da ARYL em ambos os solos pode ser considerada moderada (de  $26$  a  $145 \text{ } \mu\text{g PNF g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ). No entanto, vale ressaltar que tal classificação foi desenvolvida para Latossolos do bioma Cerrado e não para as demais regiões.

A atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase ( $\beta$ G) variou de  $18$  a  $28$  e  $13$  a  $29 \text{ } \mu\text{g PNF g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$  para LVd e LVa, respectivamente (Figura 6). A  $\beta$ G é produzida extracelularmente por plantas, animais, bactérias, fungos e leveduras e atua na ciclagem do C orgânico no solo, agindo como catalizadora da hidrólise na fase final de degradação da celulose (polissacarídeo estrutural mais abundante na parede celular vegetal). Por isso, é considerada vital na transformação da celulose em glicose (Tabatabai, 1994; Martinez & Tabatabai, 1997; Merino et al., 2016). A  $\beta$ G é amplamente distribuída em solos e está diretamente relacionada à quantidade de carbono orgânico do solo (C-org), ou seja, “quanto mais, melhor”, sendo inclusive utilizada como indicador do comportamento dos teores de C-org, uma vez que sua atividade é inibida antes mesmo que mudanças sejam mensuradas por análises laboratoriais (Chaer et al., 2023).

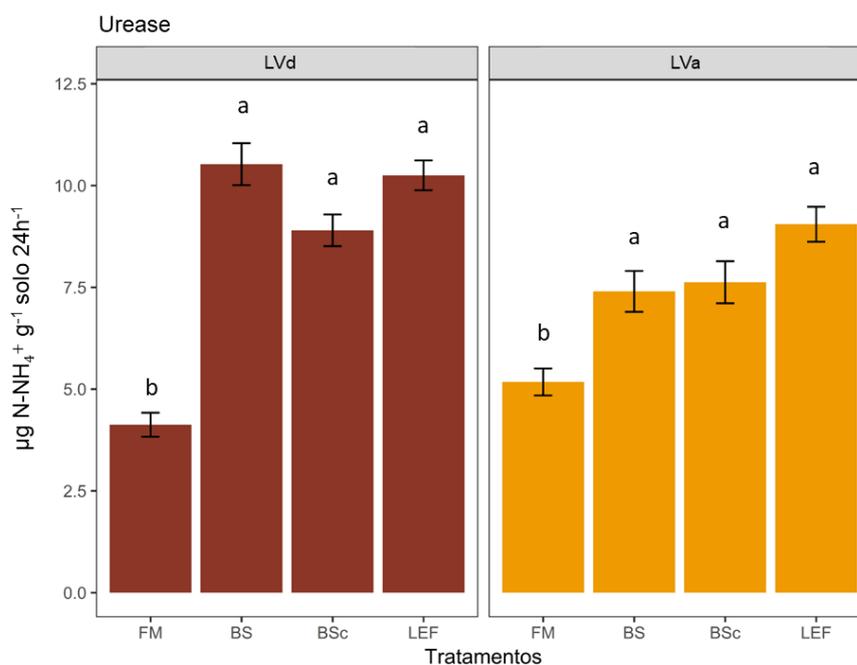


**Figura 6:** Atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase no solo argiloso (LVd) e solo franco-arenoso (LVa), após 100 dias de experimento. As legendas se referem aos tratamentos: fertilizante mineral - controle (FM); biossólido obtido por compostagem industrial sem calcário (BS); biossólido obtido por compostagem industrial com calcário (BSc) e lodo de esgoto fresco (LEF). Médias e erro padrão ( $n = 4$ ) seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A menor  $\beta$ G foi observada nos solos tratados apenas com fertilizantes minerais, sendo  $18 \mu\text{g PNF g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$  para LVd e  $13 \mu\text{g PNF g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$  para LVa (Figura 6). Já os tratamentos com lodo de esgoto fresco diferiram estatisticamente dos controles e apresentaram os maiores valores, sendo  $22$  e  $29 \mu\text{g PNF g}^{-1} \text{ solo}^{-1}$  para LVd e LVa, respectivamente, isso pode ser explicado pela qualidade do C disponível nos diferentes resíduos orgânicos, uma vez que a atividade de  $\beta$ G depende do suprimento de substrato para transformação (Almeida et al., 2015). Os biossólidos apresentam C-org mais estabilizado, uma vez que a decomposição de material orgânico foi acelerada pelo processo de compostagem termofílica, enquanto o lodo de esgoto fresco apresentou material mais lábil e com mais carbono ( $300 \text{ g kg}^{-1}$  de LE), induzindo o aumento na atividade enzimática (Souza et al., 2009). Nota-se que a aplicação de biossólidos não interferiu na atividade de  $\beta$ G no LVd e que o mesmo continha valores maiores de matéria orgânica ( $25 \text{ g kg}^{-1}$ ) em relação ao LVa ( $8 \text{ g kg}^{-1}$ ). Dentre os biossólidos, o obtido por compostagem termofílica industrial com calcário parece promover maior estímulo a atividade enzimática, tanto para  $\beta$ G

como para ARYL. Contudo, os valores observados para  $\beta$ G ainda são considerados baixos ( $< 90 \mu\text{g PNF g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$ ) de acordo com Mendes et al. (2018).

A atividade da enzima urease (UA) variou de 4 a 10 e 5 a 9,0  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ solo 2h}^{-1}$  para LVd e LVa, respectivamente (Figura 7). Abundante em solos e presente de forma intra ou extracelular, a enzima UA é produzida principalmente por plantas e microrganismos e está envolvida no processo de mineralização do N no solo, pois catalisa a hidrólise de ureia (um dos principais fertilizantes nitrogenados usados na agricultura mundial) em  $\text{NH}_3$  e  $\text{CO}_2$  (Dharmakeerthi & Thenabadu, 1996; Qin & Cabral, 2002; Koçak, 2020).

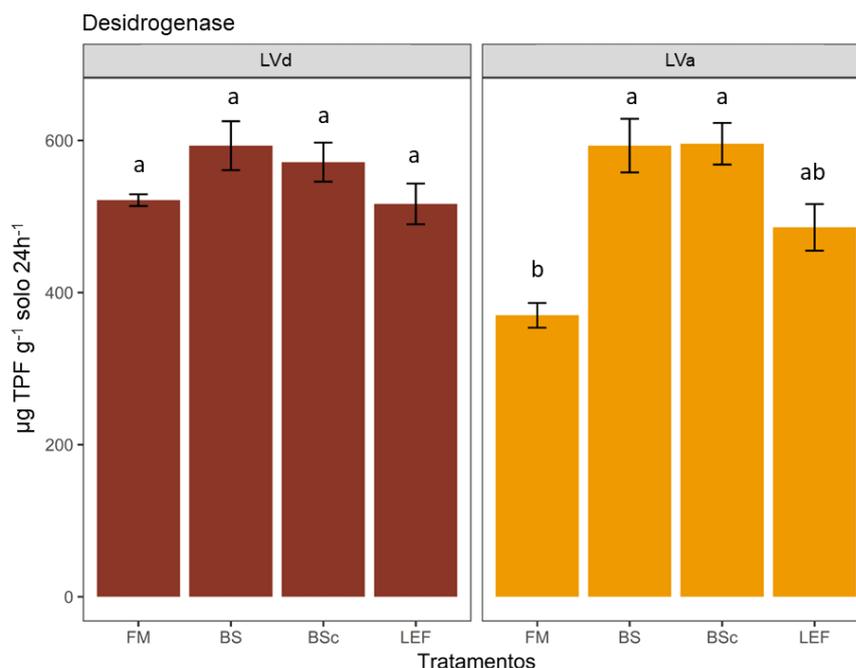


**Figura 7:** Atividade da enzima urease no solo argiloso (LVd) e solo franco-arenoso (LVa), após 100 dias de experimento. As legendas se referem aos tratamentos: fertilizante mineral - controle (FM); biossólido obtido por compostagem industrial sem calcário (BS); biossólido obtido por compostagem industrial com calcário (BSc) e lodo de esgoto fresco (LEF). Médias e erro padrão ( $n = 4$ ) seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Maiores valores de UA foram observados nos tratamentos com adição de resíduos orgânicos à base de lodo de esgoto, seja compostado ou fresco, diferindo estatisticamente dos controles. O maior aumento médio foi observado no LVd (de 4 para 10  $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ solo 2h}^{-1}$ ), enquanto a variação média em LVa foi de 5 a 8  $\mu\text{g}$

$\text{N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ solo } 2\text{h}^{-1}$  (Figura 7). Isto é esperado visto que a variação de UA encontrada em solos é atribuída principalmente à quantidade e forma da matéria orgânica presente e, sabe-se que resíduos a base de lodo de esgoto contribuem diretamente para seus aumentos (*i.e.* da matéria orgânica e atividade enzimática) (Frankenberger et al., 1983; Igalavithana et al., 2017; Wolna-Maruwka et al., 2018; Dhanker et al., 2021; Wang & Xiong, 2022; Myszura-Dymek & Żukowska, 2023). Valores altos de UA em solos agrícolas não são desejáveis, pois podem acelerar a transformação da ureia e, subseqüentemente perda do N aplicado por volatilização da amônia ( $\text{NH}_3$ ) no solo (Modolo et al., 2018; Matczuk & Siczek, 2021). E, apesar de os incrementos resultantes da adição de biossólidos e lodo de esgoto fresco aqui observados não configurarem atividade alta desta enzima ( $>15$ ), pois o maior valor encontrado foi de  $10 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ solo } 2\text{h}^{-1}$  no LVd, o aumento da atividade enzimática promovido pela adição de resíduos orgânicos pode indiretamente contribuir para perdas de N do solo (Cordero et al., 2019).

A atividade da enzima desidrogenase (Dh) variou de 516 a 593 e 370 a 596  $\mu\text{g TPF g}^{-1} \text{ solo } 24\text{h}^{-1}$  para LVd e LVa, respectivamente (Figura 8). Assim como  $\beta\text{G}$ , Dh é interpretada como “quanto mais, melhor”. A enzima Dh está diretamente ligada à funcionalidade “realmente ativa” dos solos, pois sua produção está vinculada apenas às células bacterianas intactas, uma vez que seu acúmulo extracelular não é observado (Das & Varma, 2010). A Dh pode representar a capacidade do solo em sustentar várias reações bioquímicas, pois participa diretamente do metabolismo microbiano de oxirredutase da matéria orgânica do solo e, portanto, é um indicador adequado de qualidade do solo devido à sua maior sensibilidade, principalmente às perturbações causadas por práticas de manejo e presença de pesticidas e elementos traços no solo (Wolinska & Stepniewsk, 2012; Furtak & Gajda, 2017; Navnage et al., 2018).

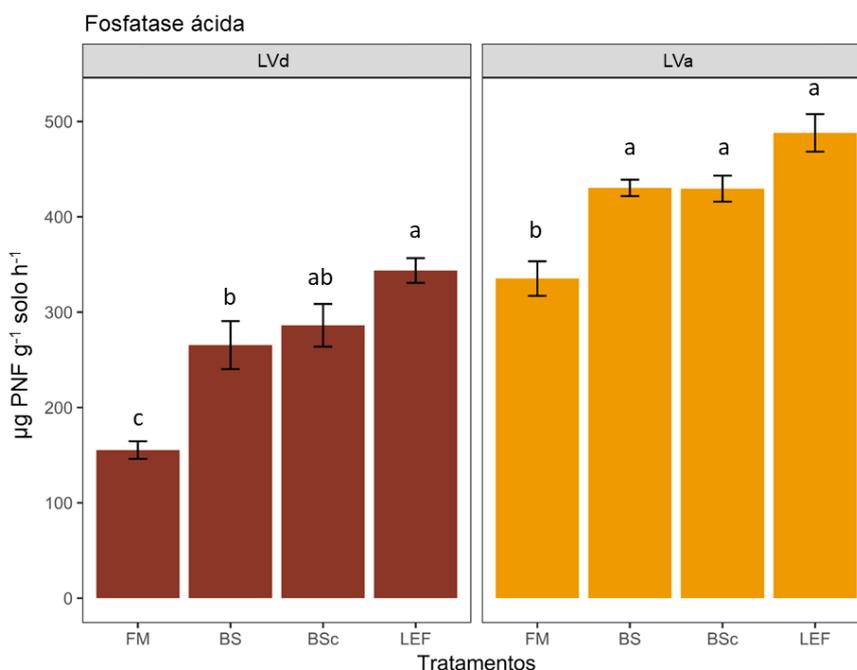


**Figura 8:** Atividade da enzima desidrogenase no solo argiloso (LVd) e solo franco-arenoso (LVa), após 100 dias de experimento. As legendas se referem aos tratamentos: fertilizante mineral - controle (FM); biossólido obtido por compostagem industrial sem calcário (BS); biossólido obtido por compostagem industrial com calcário (BSc) e lodo de esgoto fresco (LEF). Médias e erro padrão (n = 4) seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Não houve diferença estatística entre os tratamentos no solo LVd e a adição de resíduos orgânicos, compostado ou não, não foi capaz de influenciar a atividade de Dh, apesar da tendência de maiores valores de Dh obtidos com a adição de biossólidos, com 593 e 572 µg TPF g<sup>-1</sup> solo 24h<sup>-1</sup> para sem e com calcário, respectivamente (Figura 8). Para LVd, Dh foi menor após aplicação de lodo de esgoto fresco (516 µg TPF g<sup>-1</sup> solo 24h<sup>-1</sup>) e maior após aplicação de biossólidos. Para LVa, os maiores valores de Dh também foram encontrados em ambos os biossólidos, com 596 e 593 µg TPF g<sup>-1</sup> solo 24h<sup>-1</sup> respectivamente, diferindo estatisticamente do tratamento controle que apresentou o menor valor (370 µg TPF g<sup>-1</sup> solo 24h<sup>-1</sup>) e o tratamento com lodo de esgoto fresco apresentou valores intermediários (486 µg TPF g<sup>-1</sup> solo 24h<sup>-1</sup>). A adição de matéria orgânica (MO) é capaz de influenciar toda a atividade microbiana de um solo, porém, a quantidade e qualidade da MO é capaz de moldar o suprimento de energia, produção enzimática e crescimento microbiano do solo (Salazar et al., 2011) e, portanto, interferir na atividade da Dh e em sua sensibilidade às perturbações xenobióticas. Os maiores valores de Dh observados com a aplicação de biossólidos indicam os benefícios

promovidos pela estabilização do material pela compostagem termofílica em escala industrial para a qualidade do lodo de esgoto.

A atividade da enzima fosfatase ácida (Ap) e variou de 155 a 344 e de 335 a 488  $\mu\text{g PNF g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$  para LVd e LVa, respectivamente (Figura 9). A enzima Ap é secretada por plantas e microrganismos e é capaz de catalisar a hidrólise de ésteres e anidridos de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , liberando fósforo inorgânico facilmente absorvíveis pelas plantas (Dick et al., 2000). Ap está diretamente ligada ao aumento de solubilização de fosfato em solos, o que explica os maiores valores em LVd, devido seu menor teor de P disponível que LVa (10 e 5,0  $\text{mg dm}^{-3}$  de P, respectivamente) (Tabela 1).



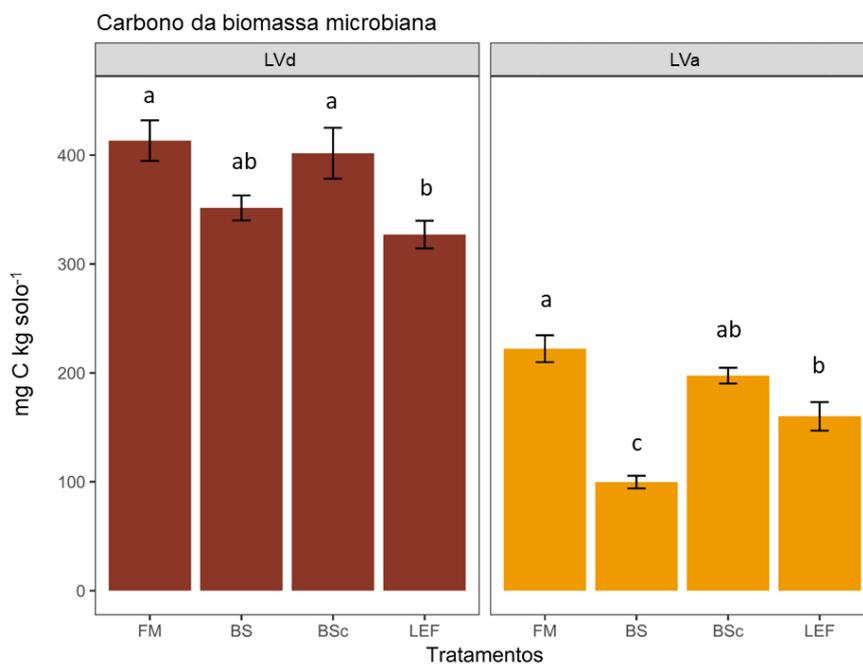
**Figura 9:** Atividade da enzima fosfatase ácida no solo argiloso (LVd) e solo franco-arenoso (LVa), após 100 dias de experimento. As legendas se referem aos tratamentos: fertilizante mineral - controle (FM); biossólido obtido por compostagem industrial sem calcário (BS); biossólido obtido por compostagem industrial com calcário (BSc) e lodo de esgoto fresco (LEF). Médias e erro padrão (n = 4) seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P <0,05).

Assim como ARYL, a enzima Ap é influenciada pela limitação do nutriente nos solos, indicando que a demanda de P pela planta é capaz de moldar a produção e atividade de Ap e, além disso, a adição de fontes orgânicas pode auxiliar no uso do arcabouço enzimático do solo para garantir a nutrição das plantas, reduzindo a

dependência de fertilizantes minerais (Adetunji et al., 2017). Logo, Ap é boa indicadora da qualidade do solo, uma vez que sua atividade pode refletir a situação do solo frente à disponibilidade de nutrientes (Inamdar et al., 2022), ou seja, “quanto menos, melhor”, pois indica maior disponibilidade de P no solo.

Os menores valores de Ap foram encontrados nos solos tratados apenas com fertilizantes minerais (155 e 335  $\mu\text{g PNF g}^{-1}$  solo  $\text{h}^{-1}$  em LVd e LVa, respectivamente), indicando menor necessidade de solubilização e maior disponibilidade de P inorgânico. Isso vale para os maiores valores encontrados nos tratamentos com aplicação de lodo de esgoto fresco, visto que a maior quantidade de material orgânico estimula a solubilização promovida pela Ap, sendo 344 e 488  $\mu\text{g PNF g}^{-1}$  solo  $\text{h}^{-1}$  para LVd e LVa, respectivamente (Figura 9). Apesar dos incrementos observados, a atividade de Ap ainda é considerada baixa ( $< 700 \mu\text{g PNF g}^{-1}$  solo  $\text{h}^{-1}$ ), de acordo com Mendes et al. (2018).

A quantificação do carbono da biomassa microbiana (CBM) variou de 327 a 413 e 100 a 222  $\text{mg C kg solo}^{-1}$ , para LVd e LVa, respectivamente (Figura 10). O CBM é usado para quantificar a fração viva expressa em carbono lábil do solo, servindo como indicador da atividade biológica e da sensibilidade da comunidade microbiana do solo à estresses (Hargreaves et al., 2003). Estima-se estoque global de 16,7 t de CBM na camada 0-30 cm do solo (Xu et al., 2013), considerado fundamental nos estudos envolvendo o ciclo do C e o funcionamento dos ecossistemas (Bastida et al., 2021). LVd apresentou valores médios muito maiores de CBM que LVa, sendo 373,4 e 169,8  $\text{mg C kg solo}^{-1}$ , respectivamente (Figura 10), o que seria esperado devido seu maior teor de argila e matéria orgânica (incluindo a fração viva) (Ramesh et al., 2019).



**Figura 10:** Quantificação do carbono da biomassa microbiana no solo argiloso (LVd) e solo francoarenoso (LVa), após 100 dias de experimento. As legendas se referem aos tratamentos: fertilizante mineral - controle (FM); biossólido obtido por compostagem industrial sem calcário (BS); biossólido obtido por compostagem industrial com calcário (BSc) e lodo de esgoto fresco (LEF). Médias e erro padrão (n = 4) seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Os maiores valores de CBM foram observados nos tratamentos controle em ambos os solos, sendo 413 e 222 mg C kg solo<sup>-1</sup>, para LVd e LVa, respectivamente (Figura 10). A adição de fertilizante mineral foi capaz de aumentar o CBM, pois a maior disponibilização de nutrientes potencializa o crescimento microbiano (Naorem et al., 2021). No entanto, apesar de promover tal acréscimo, a aplicação de fertilizante mineral não necessariamente contribui para a maior atividade enzimática dos solos, visto que esses tratamentos apresentaram menor valor para todas as enzimas avaliadas. Isto ratifica que a aplicação de resíduos orgânicos contribui para a maior qualidade biológica dos solos por induzir as funções de ciclagem de nutrientes realizadas pelos microrganismos (Adetunji et al., 2017; Sobucki et al., 2021), mesmo com menores valores de CBM.

Usualmente a maior atividade enzimática é vinculada a maiores valores de CBM devido à capacidade conjunta em controlar a taxa de decomposição do carbono orgânico do solo (Ferreira et al., 2011; Zuber & Villamil, 2016; Ren et al., 2017; Chen et al., 2021; Barbosa et al., 2023), porém, essa relação nem sempre é

óbvia, uma vez que os microrganismos e processos de degradação dos componentes orgânicos do solo são altamente diversos (Salazar et al., 2011). Além disso, nem toda enzima do solo é constitutiva da estrutura celular dos microrganismos, sendo a maioria aqui avaliadas encontradas extracelularmente e, por isso, a maior atividade enzimática não necessariamente está sempre vinculada à maior quantidade de CBM, conforme visto também em outros estudos (Moorhead et al., 2013; de Melo et al., 2020).

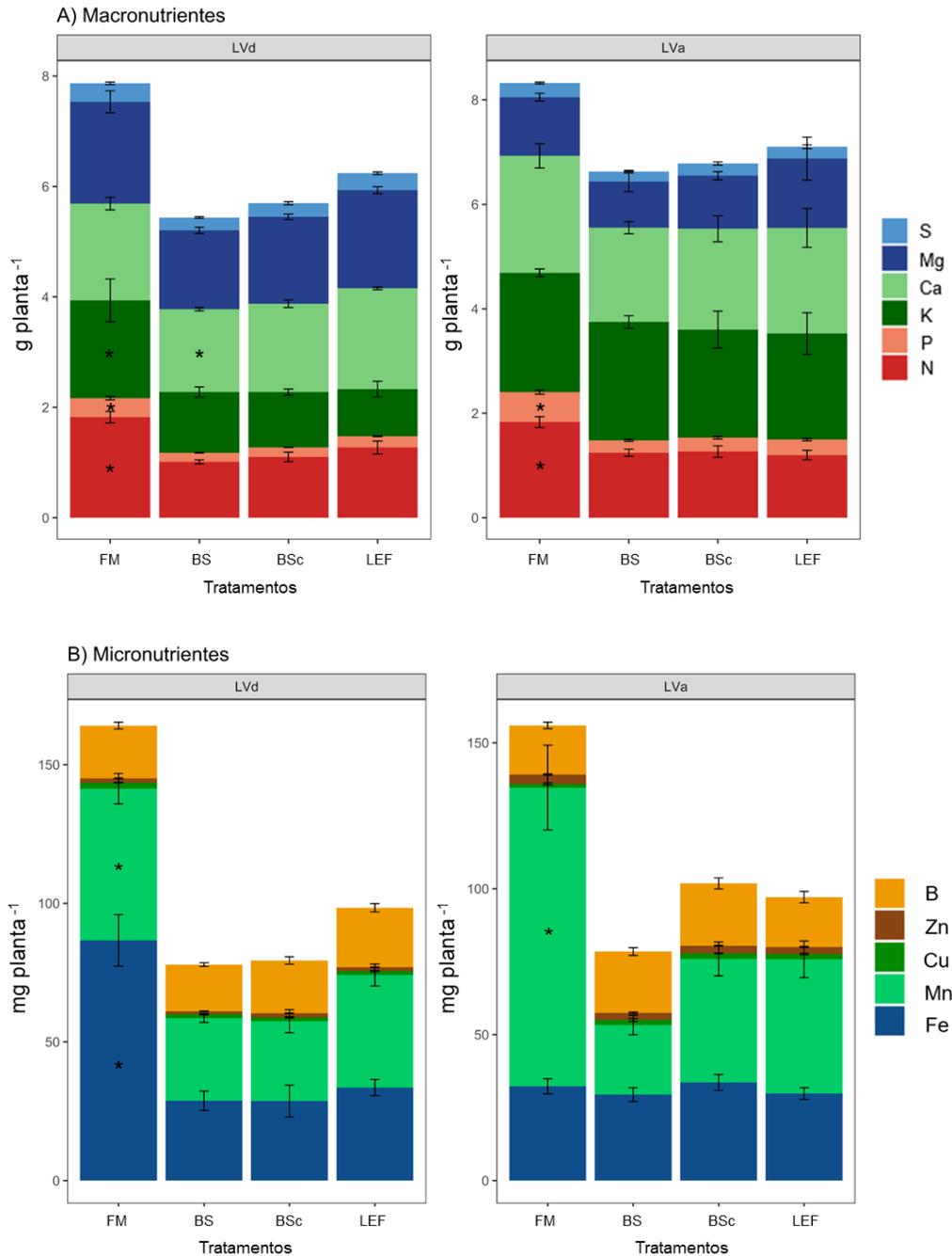
Em LVd, o menor valor de CBM foi encontrado no tratamento com a aplicação de lodo fresco ( $327 \text{ mg C kg solo}^{-1}$ ) e LVa apresentou menor valor com a aplicação de biossólido sem calcário ( $100 \text{ mg C kg solo}^{-1}$ ) (Figura 10). Para que aumentos no CBM decorrentes da aplicação de resíduos orgânicos sejam observados deve-se considerar o “efeito priming” (Fontaine et al., 2003). Este efeito prediz que deve haver um estímulo continuado de aplicação de matéria orgânica nos solos para que seus benefícios não sejam revertidos com o cessar dos recursos disponíveis no decorrer do tempo. Ye et al. (2014) atribuíram aumento de 2% a 93%, de 1% a 56% e de 2% a 33% do CBM, urease e fosfatase ácida, respectivamente, à aplicação de longo prazo de resíduos orgânicos. Além disso, Curci et al. (2020) observaram aumento da biomassa microbiana e atividade enzimática em relação ao controle após a aplicação de compostos de lodo de esgoto por três anos, independente da dose. Kayikcioglu et al. (2019) concluíram que três anos de aplicação de biossólido ( $20 \text{ t ha}^{-1}$ ) são necessárias para aumentos significativos no CBM e atividade enzimática dos solos e na produção de grãos de milho.

Apesar de o CBM ter sido determinado aos 100 dias de experimento (coleta 2), em que se considera uma rizosfera menos ativa devido ao estado de senescência da planta e que os recursos advindos da adubação orgânica já haviam sido utilizados pelos microrganismos do solo e pela planta, não é possível comprovar o efeito “priming” no presente trabalho. Isto pois não há dados de CBM assim que a aplicação de resíduos orgânicos à base de lodo de esgoto foi realizada (coleta 1), por isso, atribui-se o maior crescimento microbiano às condições de menor estresse em relação à limitação de nutrientes nos tratamentos com aplicação de fertilizante mineral.

### **3.3 Acúmulo de nutrientes, parâmetros fitotécnicos e componentes de rendimento na cultura do milho**

Em ambos os solos, no tratamento controle (FM), houve maior quantidade de macro e micronutrientes acumulados no tecido foliar do milho ao fim do experimento. As plantas em FM apresentaram maiores teores de N, P, K, Fe e Mn em LVd e de N, P e Mn em LVa, com diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 11). Isso ratifica que a maior quantidade aplicada e disponibilidade do nutriente inorgânico decorrentes da aplicação de fertilizante mineral promove maiores respostas da planta em termos de nutrientes absorvidos e acumulados, uma vez que há preferência por parte das plantas para absorção de formas mais simples e prontamente disponíveis (Urrea et al., 2019).

Além disso, BS e BSc continuam menores valores de nutrientes inorgânicos (60% da dose) e menores valores para a maioria dos nutrientes (Tabela 2), uma vez que o processo de compostagem acelera a transformações dos elementos ocasionando perdas (Soobhany, 2018). Em termos agronômicos, isto não se mostrou benéfico, uma vez que tanto para macro quanto para micronutrientes o menor acúmulo foi observado nos tratamentos com biossólidos (Figura 11). No entanto, sabe-se que apenas após a absorção da forma inorgânica disponível que há o estímulo por parte das plantas de milho para a ação dos microrganismos em solubilizar as formas orgânicas dos nutrientes, com benefícios graduais, observados à longo prazo (Geng et al., 2019), o que explica as maiores atividades enzimáticas (item 3.2), apesar do menor acúmulo nutricional no primeiro ciclo, após apenas uma aplicação de compostos orgânicos. Neste contexto, sabe-se que compostos são enriquecidos de material orgânico mais estabilizado, favorecendo a liberação mais lenta dos nutrientes e, portanto, contribuem para o balanço nutricional do solo de forma gradual (Fan et al., 2019).

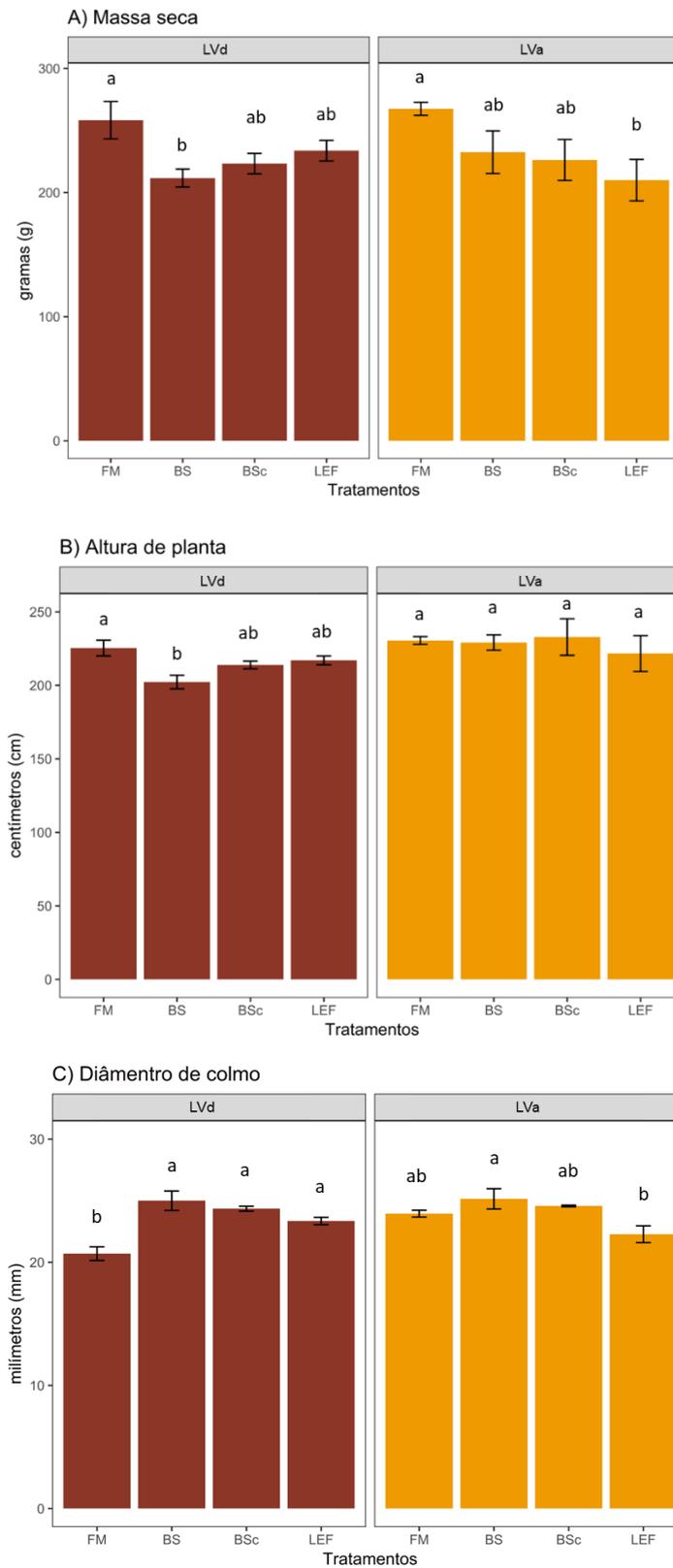


**Figura 11:** Total acumulado de macro e micronutrientes pelo tecido foliar das plantas de milho aos 100 dias de experimento, cultivadas em solo argiloso (LVd) e solo franco-arenoso (LVa) em função dos tratamentos fertilizante mineral - controle (FM); biofóssido obtido por compostagem industrial sem calcário (BS); biofóssido obtido por compostagem industrial com calcário (BSc) e; aplicação de lodo de esgoto fresco (LEF). Médias e erro padrão (n = 4) seguidas de asterisco indicam diferença pelo teste de Tukey (P <0,05).

No entanto, quando analisado à longo prazo, com a aplicação de biofóssidos a taxa de mineralização é geralmente reestabelecida e há menores perdas de nutrientes por lixiviação, configurando maior aporte nutricional para as plantas (Urra

et al., 2019). Por isso, sabe-se que a compostagem termofílica se mostra benéfica para além dos valores nutricionais e nutrição da planta, pois os biossólidos atuam também como condicionadores do solo (Schloter et al., 2018). O uso de biossólidos na agricultura permite o reaproveitamento de nutrientes, favorece a atividade e diversidade da comunidade microbiana do solo e promove a estabilidade dos agregados na superfície do solo e a infiltração de água no seu perfil, reduzindo a vulnerabilidade aos processos erosivos (Goss et al., 2013; Kirchmann et al., 2017). Logo, a análise de qualidade do lodo de esgoto deve sempre abranger aspectos amplos, com benefícios à longo prazo e não apenas pontos agronômicos, apesar de sua importância.

A aplicação de BS diminuiu a produção de biomassa aérea e altura das plantas de milho em LVd comparado a FM, porém o mesmo não foi observado em LVa (Figura 12A e 12B). Para esse mesmo tratamento, foi observado menor atividade enzimática e acúmulo de nutrientes, indicando que a presença de calcário no processo de compostagem termofílica em escala industrial pode ser um fator benéfico à qualidade do lodo de esgoto. Já a aplicação do lodo de esgoto fresco (LEF) afetou os parâmetros fitométricos do milho apenas quando cultivado no solo franco-arenoso (LVa), uma vez que os menores valores de massa seca e diâmetro de colmo foram observados neste solo e tratamento. No entanto, mais uma vez, às condições de menor estresse em relação à limitação de nutrientes nos tratamentos com aplicação de fertilizante mineral promoveu melhor resposta da planta, uma vez para todos os parâmetros avaliados, observa-se maiores valores em FM, com exceção do diâmetro de colmo em LVd.



**Figura 12:** Parâmetros fitométricos (massa seca da parte aérea (A); altura de planta (B) e diâmetro de colmo (C)) das plantas do milho aos 100 dias de experimento cultivadas em solo argiloso (LVd) e solo franco-arenoso (LVa). As legendas se referem aos tratamentos: fertilizante mineral - controle (FM); biofóssido obtido por compostagem industrial sem calcário (BS); biofóssido obtido por compostagem industrial com calcário (BSc) e lodo de esgoto fresco (LEF). Médias e erro padrão (n = 4) seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Estudos mostram efeitos positivos do uso de biofertilizantes na fisiologia, produção e teor de nutrientes de grãos de milho (Tóth et al., 2021; Corrêa et al., 2023), enquanto Ogbenna e Tesfamariam (2023) concluem que tais benefícios asseguram a substituição da fertilização inorgânica sem comprometer a produtividade de milho. De fato, no presente trabalho os componentes de rendimento comprimento e diâmetro da espiga e peso de mil grãos não foram afetados pela adubação mineral ou orgânica, mesmo com as menores doses aplicadas em BS, BSc e LEF (Tabela 4). Porém, fatores como potencial genético da variedade, condições de clima, de estresse das plantas e práticas de manejo são capazes de ditar o potencial produtivo, para além da disponibilidade de água e nutrientes (Tollenaar & Lee, 2002; Tandzi & Mutengwa, 2020). Visto o menor acúmulo de nutrientes observados com a adubação orgânica, a aplicação a curto prazo e às condições do experimento em casa-de-vegetação, mesmo com componentes de rendimento igualados, ainda não é possível defender, com o presente trabalho, a substituição de fertilizantes inorgânicos por biofertilizantes na cultura do milho. No entanto, ratifica-se que a compostagem termofílica trouxe benefícios para além do ponto de vista agrônomo e mais atenção deve ser dada.

**Tabela 4.** Componentes de rendimento das plantas de milho aos 100 dias de experimento após semeadura em solo argiloso (LVd) e solo franco-arenoso (LVa).

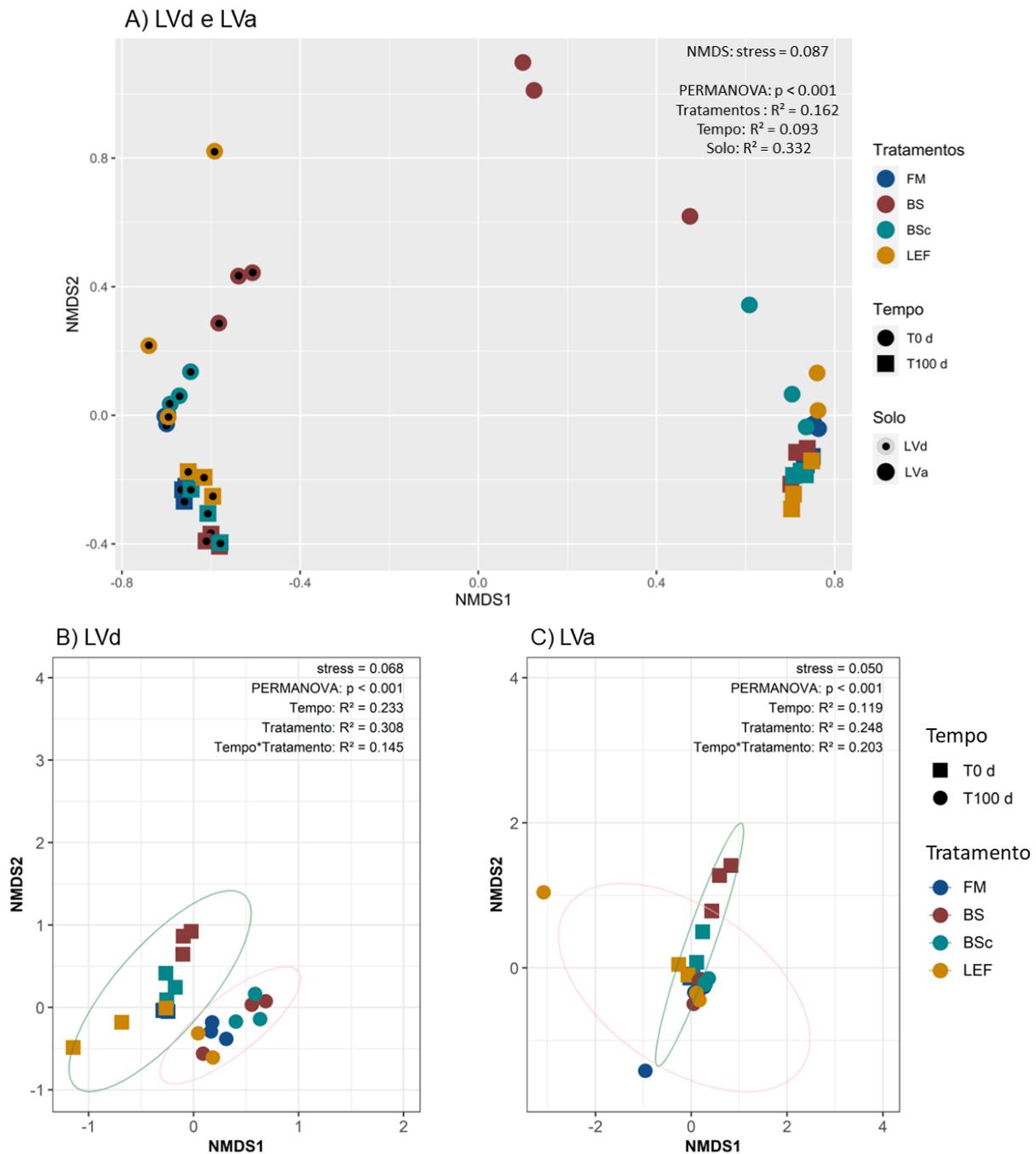
Tratamentos	Comprimento da espiga (cm)	Diâmetro da espiga (mm)	Número de grãos	Peso de 1000 grãos (g)
LVd				
FM	14.0 a	42.1 a	192.7 b	204.3 a
BS	15.0 a	42.9 a	198.0 b	245.5 a
BSc	15.4 a	43.8 a	213.7 ab	245.8 a
LEF	14.2 a	43.4 a	311.3 a	208.1 a
CV (%)	5,2	4,0	9,7	8,3
LVa				
FM	14.6 a	45.6 a	270.0 a	245.0 a
BS	12.8 a	40.7 a	215.3 a	204.1 a
BSc	13.4 a	41.9 a	246.7 a	228.3 a
LEF	14.4 a	39.9 a	299.0 a	227.6 a
CV (%)	6,3	5,7	10,8	10,4

FM= fertilizante mineral (controle); BS = biofertilizante obtido por compostagem industrial sem calcário; BSc = biofertilizante obtido por compostagem industrial com calcário; LEF = lodo de esgoto fresco; CV = coeficiente de variação. Médias (n = 4) seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P <0,05).

### 3.4 Estrutura e composição da comunidade bacteriana dos solos

O sequenciamento do gene 16S rRNA gerou cerca de 50.132 leituras por amostra, resultando em 3.694 diferentes ASVs, as quais foram agrupadas em 17 filos, 37 classes, 64 ordens, 78 famílias e 125 gêneros distintos (TABELAS4). Com esses dados é possível acessar o número total de espécies (riqueza), a sua abundância e distribuição (uniformidade/equabilidade), o que permite analisar a composição, estrutura e biodiversidade da comunidade bacteriana dos solos, importantes indicadores nas análises de preservação, integridade e sustentabilidade das funções de ecossistemas terrestres naturais ou manejados à longo prazo (Zhang & Xu, 2008)

A análise de escalonamento multidimensional não-métrica (NMDS) mostrou baixo valor de stress (0,087) para a ordenação da comunidade total baseada na distância de Bray-Curtis (Figura 13A), indicando que a estrutura da comunidade bacteriana diferiu significativamente ( $p < 0,001$ ) entre tempos, solos e tratamentos. Apesar dos solos apresentarem estruturas das comunidades bacterianas distintas, os efeitos do tempo (0 e 100 dias) e do tratamento (adição de insumos) foram similares, havendo maior padronização da comunidade bacteriana 100 dias após o manejo orgânico do solo, independente da sua natureza. Considerando os solos individualmente (Figura 13B,13C), uma vez que é esperada a diferenciação da comunidade bacteriana entre solos com texturas contrastantes (Yi & Jackson, 2021), ratifica-se os efeitos dos tempos de coletas e dos tratamentos ( $p < 0,001$ ) assim como da interação tempo x tratamento ( $p < 0,05$ ) na estrutura da comunidade bacteriana de ambos os solos, com valores de stress de 0,068 e 0,050 para LVd e LVa, respectivamente. Fica claro que a adição de bio sólido sem calcário (BS) impactou de forma distinta a estrutura da comunidade bacteriana dos solos no tempo inicial, mas com efeitos transientes até o fim do experimento (100 dias).

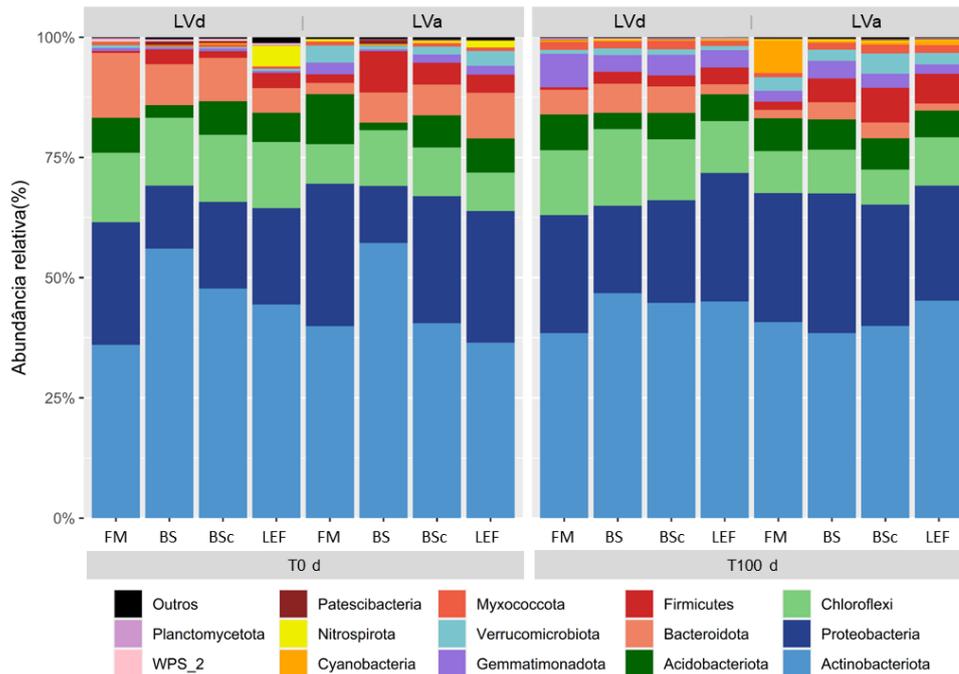


**Figura 13:** Análise de escalonamento multidimensional não métrica (NMDS) da comunidade bacteriana nos solos argiloso (LVd) e franco-arenoso (LVa) de forma conjunta (A) e separada (B e C) nos tempos de coleta inicial (T=0 d) e final (T=100 d) do experimento. As legendas se referem aos tratamentos: fertilizante mineral - controle (FM); biossólido obtido por compostagem industrial sem calcário (BS); biossólido obtido por compostagem industrial com calcário (BSc) e lodo de esgoto fresco (LEF).

Estudos apontam que a adaptação e competição entre microrganismos presentes nos solos e compostos, seus atributos físico-químicos e a presença de

xenobióticos são os principais fatores capazes de promover alterações imediatas na comunidade microbiana do solo (Saison et al., 2006; Vos et al., 2013; Zhen et al., 2014; van Rijssel et al., 2022; Xiong & Lu, 2022). No entanto, a influência da adição de compostos orgânicos pode ser revertida, principalmente em aplicações a curto-prazo, uma vez que a comunidade do solo apresenta maior adaptação e resiliência, garantindo seu reestabelecimento (Shade et al., 2012; Griffiths & Philippot, 2013; Yi & Jackson, 2021; Maretto et al., 2022), conforme observado para BS em LVd e LVa. Apesar da redundância funcional e resiliência dos solos, os distúrbios isolados, mesmo que temporários, podem afetar a estabilidade da comunidade microbiana e comprometer funções ecossistêmicas, além de promover maior competição por recursos, extinção secundária e desequilíbrio do resistoma natural do solo. Portanto, o acesso à estrutura e composição da comunidade microbiana do solo é essencial para os estudos de sua funcionalidade (Bardgett & Van Der Putten, 2014; Graham et al., 2016; Bardgett & Caruso, 2020; Philippot et al., 2021).

Em ambos os solos, os filos mais abundantes foram *Actinobacteriota* (~43%) > *Proteobacteria* (~23%) > *Chloroflexi* (~12%) > *Acidobacteriota* (~6%) > *Bacteroidota* (~6%), os quais corresponderam a 89-96 e 86-90% das espécies nos solos LVd e LVa, respectivamente (Figura 14). Esses resultados estão de acordo com os encontrados no atlas global das bactérias mais dominantes em solos (Delgado-Baquerizo et al., 2018) e em lodos de esgoto de diferentes fontes (doméstico, industrial ou misto) (Nascimento et al., 2018).



**Figura 14:** Abundância relativa da comunidade microbiana a nível de filo (top 15) nos solos argiloso (LVd) e franco-arenoso (LVa) nos tempos de coleta inicial (T=0 d) e final (T=100 d) do experimento. As legendas se referem aos tratamentos: fertilizante mineral - controle (FM); biossólido obtido por compostagem industrial sem calcário (BS); biossólido obtido por compostagem industrial com calcário (BSc) e lodo de esgoto fresco (LEF).

As principais alterações na composição da comunidade bacteriana dos solos foram observadas pela adição de BS no período inicial (Figura 14). Em relação ao controle (solo + fertilizante mineral), BS reduziu a abundância das *Proteobacterias* de 25,5 a 13,1 e de 29,6 a 11,8% nos solos LVd e LVa, respectivamente, e das *Acidobacteriotas* de 7,2 a 2,6 e de 10,4 a 1,6% nos respectivos solos, além de reduzir abundância de *Gemmatimonadotas* de 2,5 a 0,2% no solo LVa. Já a abundância de *Actinobacteriota* aumentou de 36 a 56% e de 39 a 57%, respectivamente. De forma geral, a abundância dos *Firmicutes* foi favorecida pela adição de resíduos orgânicos, aumentando em média de 0,36 a 2,54% no LVd e de 1,8 a 5,6% no LVa. Já a adição de lodo de esgoto fresco (LEF) aumentou em a abundância das *Nitrospirotas* de 0,02 a 4,25% e reduziu de 13 a 5% a abundância das *Bacteroidotas* em LVd. No entanto, em LVa, a abundância das *Bacteroidotas* aumentou de 2,3 a 9,5% enquanto a das *Nitrospirotas* não foi alterada. Com o tempo de incubação, houve favorecimento das abundâncias dos filios *Gemmatimonadota* (de 0,5% a 4,5%) e *Myxococcota* (de 0,45% a 1,5%) no LVd. As *Cyanobacterias*

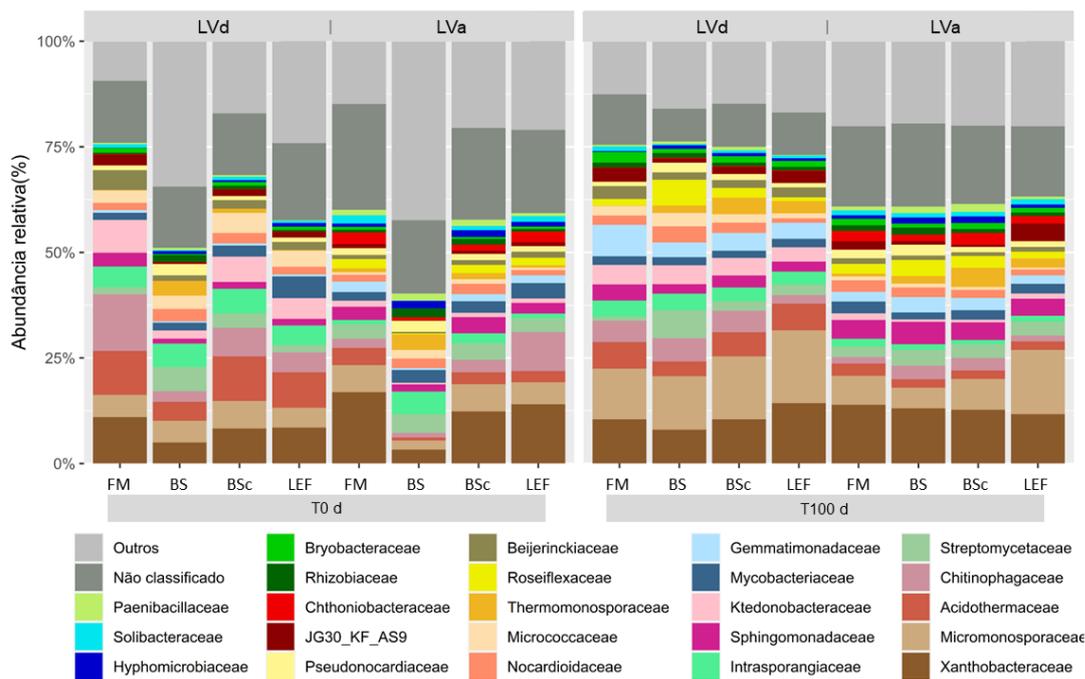
foram mais representativas apenas no tempo final do LVa (FM) e as *Verrucomicrobias* em ambos os solos.

*Actinobacteriota* e *Firmicutes* representam filos de bactérias gram-positivas capazes de mitigar estresses bióticos e abióticos, com notável capacidade de adaptação às mais diversas condições ambientais e à degradação de fontes mais estabilizadas de carbono (Rosenberg et al., 2014; Hazarika & Thakur, 2020), e ambos foram enriquecidos com a aplicação de resíduos orgânicos a base de lodo de esgoto. *Nitrospirota* foi observada em maior abundância no tempo inicial do tratamento LEF no LVd, o que merece atenção pois o filo apresenta alta versatilidade metabólica, é um importante atuante na nitrificação do solo e é usualmente encontrado em estações de tratamento e lodo de esgoto fresco, podendo ser enriquecida pela presença de alguns antibióticos frequentes nestes locais e resíduo, potencializando a transmissão de GRAs (Wang et al., 2021).

*Proteobacteria* compõe o maior e mais diversificado filo de bactérias gram-negativas atuante em funções envolvidas na ciclagem de carbono, nitrogênio e enxofre (Spain et al., 2009) enquanto *Acidobacteriota* envolve bactérias gram-negativas de grande plasticidade funcional, ou seja, apresentam genes envolvidos em uma grande quantidade de rotas metabólicas, se tornando essencial para a sobrevivência, colonização competitiva na rizosfera e estabelecimento de relações benéficas com as plantas (Kalam et al., 2020), sugerindo que a diminuição de suas abundâncias pela adição de BS deve impactar negativamente as funções ecossistêmicas do solo. *Bacteroidota* são gram-negativas sensíveis às alterações no manejo do solo e especializadas na degradação de polissacarídeos (Kruczyńska et al., 2023), e teve sua abundância reduzida em LVd e enriquecida em LVa. Estudos relacionando a presença de táxons com a textura dos solos são pouco consistentes (Sessitsch et al., 2001; Hemkemeyer et al., 2018), mas Xia et al. (2020) observaram associação positiva entre a abundância de Bacteroidotas e o teor de areia nos solos.

Já a nível de família, em média, cerca de 37% da abundância relativa total não pôde ser acessada com precisão, pois foram atribuídas ao grupos “outros” ou “não classificado” (Figura 15). Mais especificamente, a abundância relativa na categoria “outros” em FM foi de 9% e 14%, em BS de 35% e 42%, em BSc de 17% e 20% e em LEF de 24% e 21% em LVd e LVa, respectivamente. Já em “não

classificado” foi de 14% e 25% para FM, de 15% a 17% em BS, de 15% a 22% em BSc e de 18% a 20% para LEF em LVd e LVa, respectivamente. Portanto, < 50% das famílias foram identificadas para BS no tempo inicial. Isso dificulta interpretação correta das principais alterações ocorridas na composição da comunidade bacteriana dos solos a nível de família, pois grande parte da comunidade alóctone advinda dos resíduos orgânicos podem ter sido atribuídas a “outros” ou “não classificada”.



**Figura 15:** Abundância relativa da comunidade microbiana a nível de família (top 25) nos solos argiloso (LVd) e franco-arenoso (LVa) nos tempos de coleta inicial (T=0 d) e final (T=100 d) do experimento. As legendas se referem aos tratamentos: fertilizante mineral - controle (FM); bio sólido obtido por compostagem industrial sem calcário (BS); bio sólido obtido por compostagem industrial com calcário (BSc) e lodo de esgoto fresco (LEF).

As famílias mais abundantes foram: *Xanthobacteraceae* (~10,9%), *Micromonosporaceae* (~8,3%), *Acidothermaceae* (~4,7%), *Chitinophagaceae* (~4,3%), *Streptomycetaceae* (~3,3%) e *Intrasporangiaceae* (~3,1%). Além disso, houve maior padronização da comunidade bacteriana de ambos os solos no tempo final, porém BS foi novamente o tratamento com maiores alterações na composição de sua comunidade bacteriana inicial. Neste solo, a abundância de *Xanthobacteraceae* reduziu de 10% a 4% em LVd e de 16% a 3% em LVa, e a de *Acidothermaceae* reduziu de 10% a 4% em LVd e de 4% a 0,68% em LVa, em

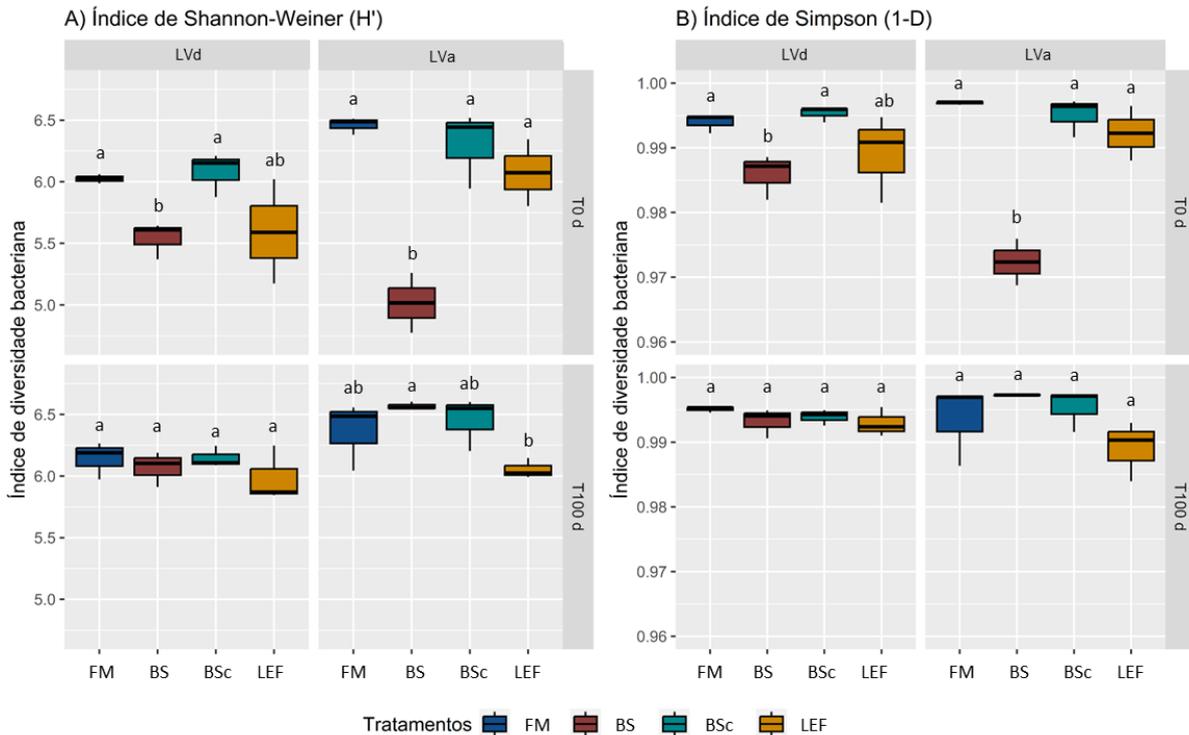
relação ao tratamento FM. Paralelamente, BS aumentou a abundância de *Thermomonosporaceae* em LVd (0,09 a 3,5%) e LVa (0,88 a 3,6%). A aplicação dos biossólidos enriqueceu a abundância de *Streptomycetaceae* em ambos os tempos, enquanto sua abundância em LEF foi similar ao tratamento FM. *Chthoniobacteraceae* apresentou maior representação em LVa do que LVd.

No geral, a comunidade bacteriana autóctone prevaleceu entre os solos e as alterações observadas foram reestabelecidas no decorrer do tempo. Isso é esperado uma vez que a adição de resíduos orgânicos à base de lodo de esgoto foi realizada apenas uma vez e, apesar da comunidade microbiana do solo ser amplamente responsiva às perturbações ambientais, os solos têm a capacidade de resiliência frente alterações no curto-prazo (Trivedi et al., 2019; Mocali et al., 2022). Identificar modificações no microbioma dos solos permite o reconhecimento de potenciais hospedeiros atuantes na transferência de resistência. Hernández et al., (2023) atribuíram o aumento da abundância de *Acidobacteriota* à incubação de antibióticos em solos agrícolas, enquanto Van Goethem et al. (2018) identificaram que a distribuição de bactérias gram-negativas contribuiu para 71% do resistoma natural do solo, sendo os filos *Bacteroidota* e *Proteobacteria* sozinhos responsáveis por quase metade dos GRAs encontrados. Os dois filos também foram predominantes no estudo do resistoma de solos sob diferentes sistemas de adubação e seus isolados apresentaram alta resistência aos antibióticos (Armalyté et al., 2019). Su et al. (2015) atribuíram a alta proporção de *Actinobacteriota* ao aumento de GRAs em compostos de lodo de esgoto. Logo, a composição da comunidade microbiana influencia diretamente a distribuição de genes de resistência a antimicrobianos (GRAs) e genes de elementos genéticos móveis (EGMs), gerando um resistoma particular entre os solos (Schages et al., 2021).

### **3.5 Diversidade da comunidade bacteriana dos solos**

A alfa diversidade ou diversidade local foi avaliada através dos índices de Shannon-Weiner e Simpson nos dois períodos de coleta (0 e 100 dias) (Figura 16). O índice de diversidade de Shannon-Weiner visa acessar a biodiversidade específica, uma vez que analisa a possibilidade de dois indivíduos de uma mesma amostra pertencerem a espécies distintas (Shannon, 1948). Enquanto o índice de

Simpson contempla a dominância entre as espécies, pois aborda a uniformidade de espécies mais comuns, analisando a possibilidade de dois indivíduos de uma mesma amostra pertencerem a mesma espécie (Simpson, 1949).



**Figura 16:** Índices de diversidade de Shannon-Weiner ( $H'$ ) e Simpson (1-D) nos solos argiloso (LVd) e franco-arenoso (LVa) nos tempos de coleta inicial ( $T=0$  d) e final ( $T=100$  d) do experimento. As legendas se referem aos tratamentos: fertilizante mineral - controle (FM); biossólido obtido por compostagem industrial sem calcário (BS); biossólido obtido por compostagem industrial com calcário (BSc) e lodo de esgoto fresco (LEF). Médias e erro padrão ( $n = 4$ ) seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

No período inicial ( $T_0$ ), ambos os índices ( $H'$  e 1-D) indicam que a adição de LEF e, principalmente, BS impactaram negativamente a alfa diversidade da comunidade bacteriana de ambos os solos em relação ao tratamento com fertilizante mineral (FM). Para BS, as reduções nas abundâncias dos principais filos encontrados (Figura 14) poderiam explicar a sua menor diversidade alfa no tempo inicial (Figura 16), além da diversidade beta, visto à diferenciação da sua estrutura, também em  $T = 0$  d (Figura 13). Já a adição de calcário no biossólido (BSc) foi suficiente para contrapor o impacto negativo da adição deste resíduo na diversidade dos solos. A adição de calcário como tratamento conjunto à compostagem de lodo de esgoto (BSc) pode potencializar a complexação de metais pesados, reduzir a

população de patógenos e ampliar a fase termofílica sem interferir no período de maturação do composto (Wong & Fang, 2000; Wong & Selvam, 2006; Farzadkia & Bazrafshan, 2014; Rehana et al., 2020), o que pode favorecer a diversidade da comunidade bacteriana. A ausência de calcário (BS) provavelmente interferiu no processo de estabilização do lodo de esgoto, impactando negativamente a diversidade bacteriana dos solos, embora tenha havido reversão deste cenário com o decorrer do experimento (100 dias). Apesar das modificações causadas pela adição de resíduos à base de lodo, a diversidade bacteriana foi sempre alta em todos os solos e tratamentos testados ( $H' > 5$ ).

Após 100 dias, a diversidade alfa da comunidade bacteriana de ambos os solos se recuperou independentemente do tratamento, e foi ligeiramente menor nos solos tratados com lodo fresco (LEF) (Figura 16), ratificando que o impacto da adição de resíduos à base lodo na diversidade foi transiente e confirmando a capacidade da comunidade microbiana natural do solo em se reestabelecer frente às alterações (Harris, 2009; Maretto et al., 2022). Normalmente, resíduos orgânicos submetidos à compostagem termofílica apresentam maior diversidade do que suas versões *in natura*, uma vez que as altas temperaturas criam ambiente capaz de favorecer certos grupos, os quais não seriam ativados em outras condições (Xu et al., 2021; Zhang et al., 2021; Martins et al., 2023). Portanto, solos agrícolas tratados com bio sólidos também tendem a apresentar maior diversidade microbiana (até 11% maior), o que está relacionado às melhorias na funcionalidade do solo e ao maior rendimento das plantas cultivadas (Shu et al., 2022).

De fato, a diversidade nos tratamentos com bio sólidos (BS e BSc) foram ligeiramente maiores do que com o lodo de esgoto fresco (LEF) no período final (100 dias), mas essas diferenças não foram estatisticamente significativas na maioria dos casos, exceto para o índice  $H'$  no solo LVa. Os maiores teores de metais pesados observados (As, Cd, Pb, Fe, Mn, Al, Cu, Zn e Ni; Tabela 2) e de outros contaminantes, tais como pesticidas e fármacos, devem contribuir para menor diversidade no LEF. Por outro lado, diferentemente do esperado, os solos tratados apenas com fertilizantes minerais apresentaram diversidade iguais aos tratados com bio sólidos, ratificando a importância do suprimento de nutrientes, independente da fonte (orgânica ou inorgânica), para assegurar a diversidade da comunidade microbiana do solo e suas interações ecológicas (Cui et al., 2021; Dai et al., 2022).

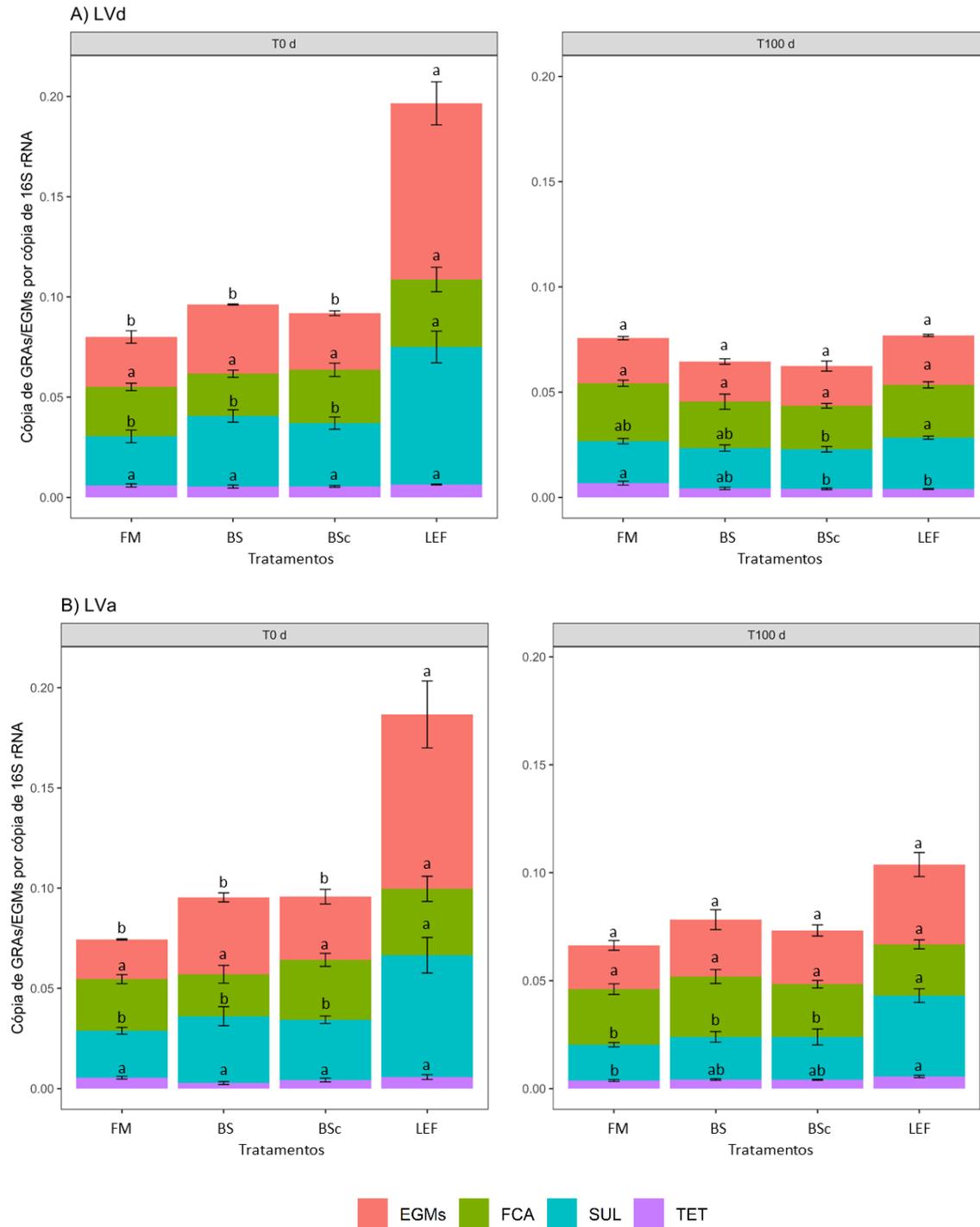
### 3.6 Genes de resistência à antimicrobianos e elementos genéticos móveis

O conjunto inicial de primers continha 36 genes, mas apenas 29 cumpriram os critérios estabelecidos para amplificação positiva: 7 para a classe das tetraciclinas (tetA\_1, tetA\_2, tetAB\_1, tetAB\_2, tetm\_3, tetV, e tetW); 6 para a classe das sulfonamidas (sul1\_1, sul1\_2, sul1\_3, sul2\_1, sul2\_2 e sul3\_1); 8 para genes de elementos genéticos móveis (intl\_1\_2, IS613, tnpA\_1, tnpA\_2, tnpA\_3, tnpA\_4, tnpA\_7 e Tp614); 7 para o conjunto de classes FCA - fluoroquinolona, quinolona, florfenicol, chloranfenicol e anfenicol (catA1, catB8, cmlA\_2, cmlA\_3, cmxA, floR\_1, qnrA); além do gene calibrador 16S rRNA. Tanto em LVd quanto em LVa houve amplificação dos 29 genes detectados no tratamento apenas com fertilizante mineral (FM), o que mostra que nenhum GRA ou EGM foi adquirido exclusivamente pela aplicação dos resíduos orgânicos à base de lodo de esgoto. No entanto, a distribuição desses genes no tratamento controle ocorreu de forma distinta nos solos, uma vez que foram observadas maior representação de genes de EGMs e de FCA para LVd e LVa no tempo inicial, respectivamente (Figura 17).

Embora a influência humana, com o uso de antimicrobianos nos setores animal, agrícola e clínico, tenha contribuído para a resistência antimicrobiana nos solos, a comunidade microbiana pode carregar GRAs mesmo em solos não poluídos com antibióticos (Singer et al., 2016; Han et al., 2022). Por isso, solos são considerados como reservatórios de GRAs, uma vez que bactérias possuem diferentes estratégias de competição para inibir o crescimento de outras. Tal efeito configura o conceito de resistoma natural do solo, que pode auxiliar também como um mecanismo de adaptação aos xenobióticos (Allen et al., 2010; Dcosta et al., 2011; Nesme & Simonet, 2015). No presente trabalho, entende-se que os genes detectados nos tratamentos com adição exclusiva de fertilizantes minerais (FM) configuram a porção de GRAs e EGMs encontrados naturalmente nos solos, uma vez que, até onde é sabido, não há histórico de aplicação de resíduos e demais fontes que potencializariam a resistência à antimicrobianos em LVd e LVa.

Para ambos os solos, as principais alterações nas proporções dos genes ou elementos associados à resistência de agentes antimicrobianos foi observada no tempo inicial, com aumento significativo na abundância relativa de elementos

geneticamente móveis (EGMs) e de genes resistentes às sulfonamidas (SULs) a adição de lodo de esgoto fresco nos solos (LEF) (Figura 17). No entanto, esses efeitos foram relativamente transientes ao longo do tempo, com redução significativa dos incrementos desses genes/elementos no período final do experimento (100 dias). Em comparação a FM, a adição de bio sólidos (BS e BSc) não interferiu na abundância relativa das classes de GRAs e EGMs avaliadas no tempo inicial, apesar de BS ter promovido diferenças significativas na diversidade, composição e estrutura da comunidade bacteriana dos solos, o que ratifica a eficácia da compostagem termofílica em escala industrial, independente da adição de calcário, como alternativa simultânea para estabilização do lodo de esgoto e mitigação dos riscos de transferência da resistência a antimicrobianos em solos.



**Figura 17:** Proporção do número de cópias de genes de resistência a antimicrobianos (GRAs) e elementos genéticos móveis (EGMs) e o gene calibrador 16S rRNA (abundância relativa) nos solos argiloso (LVd) e franco-arenoso (LVa) nos tempos de coleta inicial (T=0 d) e final (T=100 d) do experimento. As legendas se referem aos tratamentos: fertilizante mineral - controle (FM); bio sólido obtido por compostagem industrial sem calcário (BS); bio sólido obtido por compostagem industrial com calcário (BSc) e lodo de esgoto fresco (LEF) e; às classes de antimicrobianos do grupo fluoroquinolona, quinolona, florfenicol, chloranfenicol e anfenicol (FCA); sulfonamidas (SUL); tetraciclina (TET) e elementos genéticos móveis (EGMs). Médias e erro padrão (n = 3) seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

A aplicação de LEF aumentou de 0,025 a 0,088 o total de cópias de genes dos elementos genéticos móveis em LVd e de 0,020 a 0,087 em LVa, diferindo dos demais tratamentos (Figura 17). Logo, a aplicação de resíduo orgânico não devidamente estabilizado é capaz de aumentar o risco de transferência de GRAs, naturais ou adquiridos, uma vez que os EGMs são responsáveis pela transferência horizontal de genes, o que pode estar relacionado aos mecanismos de co-resistência e/ou resistência cruzada observados entre antibióticos e metais pesados nos solos (Top & Springael, 2003; Garbisu et al., 2018; Zhao et al., 2019). No entanto, o aumento na abundância relativa de EGMs diminuiu com o tempo de incubação (100 dias), não havendo diferenças estatísticas para ambos os solos mesmo com a aplicação de LEF (reduziu de 0,088 a 0,023 e de 0,087 a 0,037 em LVd e LVa, respectivamente), ratificando a transiência desses efeitos, apesar de os maiores valores ainda serem observados neste tratamento. Em resumo, a abundância de EGMs nos solos tende a ser potencializada pela aplicação recente de lodo de esgoto “in natura” (Jauregi et al., 2021) e a compostagem termofílica industrial se mostrou benéfica ao frear tal tendência, uma vez que apenas o tratamento LEF diferiu estatisticamente do controle. Apesar da transiência deste efeito, atenção ainda deve ser dada pois pouco se sabe em quais níveis os efeitos, mesmo que transientes, podem ser negativos à comunidade microbiana do solo, conferindo riscos à saúde humana e animal mesmo neste curto período de transferência potencial.

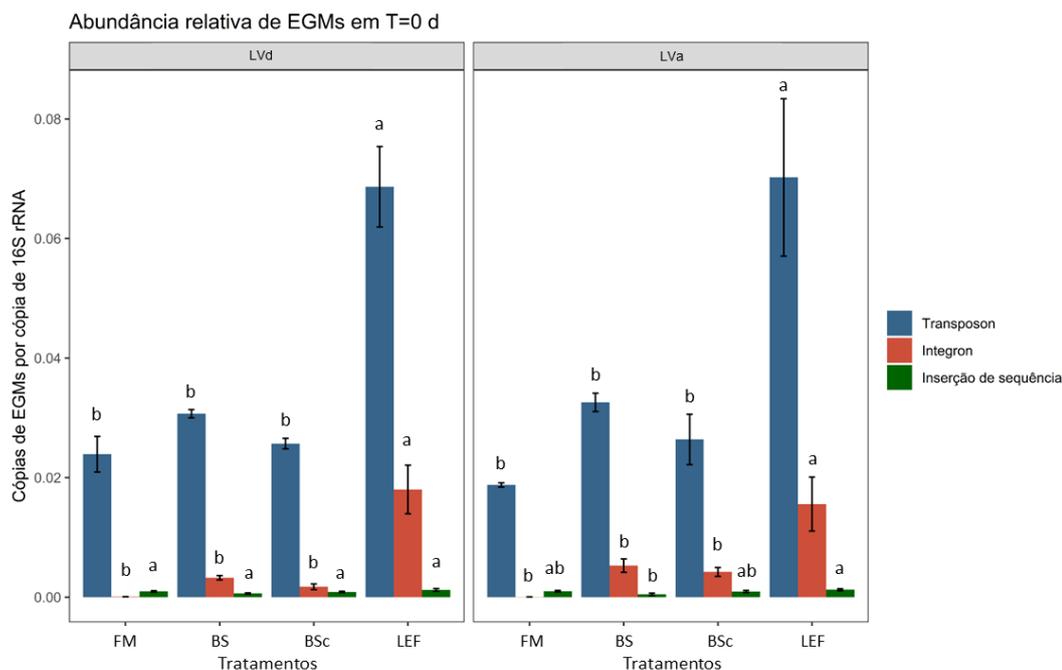
A aplicação de LEF também aumentou a abundância relativa de genes de resistência pertencentes à classe das sulfonamidas (SUL) [de ~0,030 (média) para 0,069 em LVd e de ~0,028 (média) para 0,061 em LVa], porém não interferiu nos genes das classes fluoroquinolonas, quinolonas e anfenicóis (FCA) e tetraciclina (TET). A mesma tendência de aumento na abundância relativa de genes SUL pela aplicação de LEF foi observada aos 100 dias no LVa. Percebe-se redução da abundância relativa em comparação ao tempo inicial, confirmando o efeito transiente observado anteriormente, mas ainda assim menores valores foram encontrados com a aplicação de biossólidos em relação a LEF. No entanto, a compostagem termofílica industrial se mostrou eficiente na dissipação de genes de resistência às sulfonamidas mesmo no tempo final. Em escala laboratorial, os genes de resistência às sulfonamidas se mostraram persistentes durante a compostagem do lodo de

esgoto, uma vez que reduziram na fase termofílica, mas aumentaram na fase de maturação (Wei et al., 2014). No presente estudo, em ambos os solos e tempos, a aplicação de biossólidos obtidos por compostagem termofílica realizada em escala industrial foi capaz de reduzir ao menos metade dos genes SUL em relação à quantidade observada quando lodo de esgoto fresco foi aplicado. A grande maioria dos estudos realizados frente à dissipação de GRAs por meio da compostagem termofílica do lodo de esgoto foi feita em escala laboratorial, que não necessariamente representam o comportamento desses genes quando o composto é produzido em larga escala (industrial) e aplicado ao solo (Ezzariai et al., 2018).

No entanto, os solos não são inertes à aplicação de biossólidos, uma vez que estudos relatam que a aplicação a longo-prazo pode incrementar a abundância de GRAs e seu risco de transmissão nos solos (Chen et al., 2016; Wang et al., 2023), mesmo sem alterar sua composição procariótica (Urrea et al., 2019). Neste estudo, apesar das diferenças não serem significativas, a aplicação única de biossólidos, com ou sem calcário, propiciou aumento na abundância relativa de genes de resistência a antimicrobianos e elementos genéticos móveis em comparação ao controle (FM). Mesmo assim, no período final, houve menor quantidade de cópias de genes observadas nos biossólidos (BS e BSc) do que em LEF, confirmando o sucesso da compostagem termofílica em escala industrial como abordagem promissora na produção de fertilizantes orgânicos estabilizados e ambientalmente mais seguros frente à problemática de transferência de resistência a antimicrobianos entre os solos.

Existem diferentes mecanismos pelos quais a transferência horizontal de genes pode ocorrer, sendo que diferenças na composição e abundância dos EGMS presentes nos organismos são altamente influenciadas pelas condições ambientais (Challacombe & Kuske, 2012). Portanto, entender qual classe de EGMS é afetada pela adição de lodo de esgoto de diferentes fontes auxilia na avaliação do risco de propagação de GRAs no solo de forma mais assertiva. No tempo inicial, a adição de LEF aumentou significativamente os elementos de transferência do tipo transposon [de 0,024 (FM) a 0,068 (LEF) e de 0,0188 (FM) a 0,0702 (LEF) em LVd e LVa, respectivamente] e integron [de 0,00007 (FM) a 0,018 (LEF) e de 0,00004 (FM) a 0,0156 (LEF) em LVd e LVa, respectivamente], sendo que a abundância dos genes do mecanismo de inserção de sequências foi pouco alterada (Figura 18). EGMS

podem representar até 13% de todo o genoma procariótico, sendo os transposons e integrons dominantes em vários habitats (inclusive no solo). Eles são considerados facilitadores primários no potencial de transferência de GRAs entre procariotos e, juntos, podem contribuir em até 80% desses eventos (Aminov, 2011; Khedkar et al., 2022).



**Figura 18:** Proporção (abundância relativa) do número de cópias de genes diferentes tipos de elementos genéticos móveis (EGMs) e o gene calibrador 16S rRNA no solo argiloso (LVd) e solo franco-arenoso (LVa) no tempo de coleta inicial (T=0) do experimento. As legendas se referem aos tratamentos: fertilizante mineral - controle (FM); bio sólido obtido por compostagem industrial sem calcário (BS); bio sólido obtido por compostagem industrial com calcário (BSc) e lodo de esgoto fresco (LEF). Médias e erro padrão (n = 3) seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Os transposons podem estar contidos nos plasmídeos e são chamados “genes saltadores” devido sua habilidade de mudar de posição no genoma, gerando diferentes tipos de mutações espontâneas que podem transmitir genes úteis para o processo de evolução e adaptação bacteriana, sendo a grande parte dos GRAs conhecidos encontrados nesta região (Levin & Moran, 2011). A literatura mostra alta correlação entre a abundância de transposons e genes de resistência, principalmente para a classe das tetraciclinas, em distintos ambientes (Zhu et al., 2013; Muziasari et al., 2017), o que não foi observado no presente estudo. EGMs do tipo inserção de sequências são tidos como uma variação mais simples dos

transposons, uma vez que carregam apenas genes responsáveis por codificar a enzima transposase (Nzabarushimana & Tang, 2018).

Os integrons-Classe 1 estão presentes nos plasmídeos e são responsáveis por mecanismos genéticos atribuídos à aquisição, acumulação e expressão diferencial de genes. Sua abundância no solo é motivo de alerta devido à sua ampla distribuição entre bactérias gram-negativas de importância clínica (Stalder et al., 2012). Por isso, é frequentemente utilizado como indicador de poluição antropogênica e como marcador para o rastreamento de GRAs no ambiente, sendo considerado o principal vetor contribuindo com até 63% do potencial de transferência para o resistoma do solo (Fluit & Schmitz, 1999; Gillings et al., 2015; Khedkar et al., 2022). Em relação ao tratamento FM, a aplicação de LEF potencializou em 258 vezes (de 0,00007 a 0,018) e em 388 vezes (de 0,00004 a 0,0156) a abundância relativa de integrons em LVd e LVa, respectivamente. Já a aplicação de biossólidos (BS e BSc) aumentou a sua abundância, porém sem diferenças estatísticas de FM (Figura 18). Por último, a maior abundância de genes de resistência pertencentes à classe das sulfonamidas em LEF pode estar associada à maior quantidade de integrons neste tratamento, o que é frequentemente observado em solos e outros habitats, como águas residuárias, esterco animais e até patógenos humanos (Gaze et al., 2011; Stalder et al., 2012; Du et al., 2014; Gillings et al., 2015; McKinney et al., 2018; Jiang et al., 2019). Esses resultados ratificam a importância ambiental da compostagem termofílica industrial na redução da transmissão de genes de resistência em solos agrícolas tratados com resíduos/compostos à base de lodo.

#### 4. CONCLUSÕES

A aplicação de bio sólidos torna o solo mais ativo, com benefícios à qualidade biológica do solo a longo prazo. O processo de compostagem reduz a disponibilidade de nutrientes devido à degradação acelerada da matéria orgânica. Por isso, os bio sólidos apresentam mais benefícios como condicionador de solos do que como substituintes de fertilizantes minerais.

O suprimento de nutrientes exclusivamente mineral configurou maior crescimento de biomassa microbiana e nutrição das plantas. Porém, não houve diferenças nos componentes de rendimento ao aplicar bio sólidos, mesmo com dose 40% menor.

A compostagem termofílica industrial melhorou a qualidade do lodo de esgoto, tornando sua aplicação mais segura frente aos teores de metais pesados, à resistência antimicrobiana nos solos e ao estímulo da atividade enzimática. Porém, perdas nutricionais são observadas e refletidas no acúmulo de elementos no tecido das plantas.

Os solos avaliados continham naturalmente GRAs e EGMs, sendo que transposons e integrons contribuíram mais para o potencial de transferência da resistência antimicrobiana.

A compostagem termofílica do lodo de esgoto em escala industrial é eficiente na dissipação da resistência antimicrobiana (real e potencial), principalmente para genes da classe sulfonamidas, em solos de texturas contrastantes fertilizados com bio sólidos, porém a adição de calcário não potencializou tal efeito.

A compostagem termofílica em escala industrial com adição de calcário gera um bio sólido de maior qualidade biológica frente à atividade enzimática e diversidade da comunidade bacteriana. Porém, a comunidade bacteriana autóctone do solo é resiliente e as principais alterações foram observadas apenas no tempo inicial.



## REFERÊNCIAS

- Adetunji, A. T., Lewu, F. B., Mulidzi, R., & Ncube, B. (2017). The biological activities of  $\beta$ -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: A review. In *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* (Vol. 17, Issue 3). <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000300018>
- Ali Tabatabai, M. (2005). Chemistry of sulfur in soils. In *Chemical Processes in Soils*. <https://doi.org/10.2136/sssabookser8.c3>
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 4, pp. 251–259). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Alvarenga, P., Mourinha, C., Farto, M., Santos, T., Palma, P., Sengo, J., Morais, M. C., & Cunha-Queda, C. (2015). Sewage sludge, compost and other representative organic wastes as agricultural soil amendments: Benefits versus limiting factors. *Waste Management*, 40. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.01.027>
- Aminov, R. I. (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 2, Issue JULY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00158>
- Amnesty International. (2007). MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SEDIMENTS, SLUDGES, SOILS, AND OILS. EPA Method 3051A, BY12y(235).
- Anderson, C., Malambo, D. H., Perez, M. E. G., Nobela, H. N., de Pooter, L., Spit, J., Hooijmans, C. M., van de Vossenberg, J., Greya, W., Thole, B., van Lier, J. B., & Brdjanovic, D. (2015). Lactic acid fermentation, urea and lime addition: Promising faecal sludge sanitizing methods for emergency sanitation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/ijerph121113871>
- AOAC. (1995). Official methods of analysis, 16th Ed. Method 990.03. Association of Official Analytical Chemists.
- Armalytė, J., Skerniškytė, J., Bakienė, E., Krasauskas, R., Šiugždinienė, R., Kareivienė, V., Kerzienė, S., Klimienė, I., Sužiedėlienė, E., & Ružauskas, M. (2019). Microbial diversity and antimicrobial resistance profile in microbiota from soils of conventional and organic farming systems. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00892>
- Awasthi, M. K., Wang, Q., Huang, H., Li, R., Shen, F., Lahori, A. H., Wang, P., Guo, D., Guo, Z., Jiang, S., & Zhang, Z. (2016). Effect of biochar amendment on greenhouse gas emission and bio-availability of heavy metals during sewage sludge co-composting. *Journal of Cleaner Production*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.008>

- Barbosa, J. Z., Poggere, G., Corrêa, R. S., Hungria, M., & Mendes, I. de C. (2023). Soil enzymatic activity in Brazilian biomes under native vegetation and contrasting cropping and management. *Applied Soil Ecology*, 190. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.105014>
- Bardgett, R. D., & Caruso, T. (2020). Soil microbial community responses to climate extremes: Resistance, resilience and transitions to alternative states. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 375, Issue 1794). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0112>
- Bardgett, R. D., & Van Der Putten, W. H. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. In *Nature* (Vol. 515, Issue 7528, pp. 505–511). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature13855>
- Barreiro, A., Cela-Dablanca, R., Nebot, C., Rodríguez-López, L., Santás-Miguel, V., Arias-Estévez, M., Fernández-Sanjurjo, M., Núñez-Delgado, A., & Álvarez-Rodríguez, E. (2022). Occurrence of Nine Antibiotics in Different Kinds of Sewage Sludge, Soils, Corn and Grapes After Sludge Spreading. *Spanish Journal of Soil Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/sjss.2022.10741>
- Bastida, F., Eldridge, D. J., García, C., Kenny Png, G., Bardgett, R. D., & Delgado-Baquerizo, M. (2021). Soil microbial diversity–biomass relationships are driven by soil carbon content across global biomes. *ISME Journal*, 15(7). <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00906-0>
- Bettiol, W., & Ghini, R. (2011). Impacts of Sewage Sludge in Tropical Soil: A Case Study in Brazil. *Applied and Environmental Soil Science*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/212807>
- Bina, B., Movahedian, H., & Kord, I. (2004). The Effect of Lime Stabilization on the Microbiological Quality of Sewage Sludge. In *Iranian J Env Health Sci Eng* (Vol. 1, Issue 1).
- Bouyoucos, G. J. (1962). Hydrometer Method Improved for Making Particle Size Analyses of Soils 1. *Agronomy Journal*, 54(5). <https://doi.org/10.2134/agronj1962.00021962005400050028x>
- Brasil. CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, 2022. Boletim Logístico - ano VI janeiro de 2022, página 13. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/boletim-logistico>.
- Brasil. CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA Nº 498/2022 de 19 de agosto de 2022. Define critérios e procedimentos para produção e aplicação de biossólido em solos, e dá outras providências. Disponível em: [http://conama.mma.gov.br/?option=com\\_sisconama&task=arquivo.download&id=797](http://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=797)

- Brasil. CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 375 de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências de Brasília, 2006. Disponível em: <<http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=5956>>.
- Brasil. CONFERT - Conselho Nacional de Fertilizantes Decreto nº 10.991, de 11 de março de 2022. Institui o Plano Nacional de Fertilizantes 2022–2050 e o Conselho Nacional de Fertilizantes e Nutrição de Plantas. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2019-2022/2021/decreto/D10605.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2021/decreto/D10605.htm).
- Brasil. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Portal Cidades, Panorama - Projeção de População. 2022. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/panorama>.
- Brasil. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2006). Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e corretivos. Brasília, 53(9).
- Brasil. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico Temático Serviços de Água e Esgoto – ano de referência 2022. Brasília: SNIS/MDR, 108 p., 2023.
- Burch, T. R., Sadowsky, M. J., & LaPara, T. M. (2017). Effect of Different Treatment Technologies on the Fate of Antibiotic Resistance Genes and Class 1 Integrons when Residual Municipal Wastewater Solids are Applied to Soil. *Environmental Science and Technology*, 51(24). <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04760>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Casida, L. E., Klein, D. A., & Santoro, T. (1964). Soil dehydrogenase activity. *Soil Science*, 98(6). <https://doi.org/10.1097/00010694-196412000-00004>
- Chaer, G. M., Mendes, I. C., Dantas, O. D., Malaquias, J. V., dos Reis Junior, F. B., & Oliveira, M. I. L. (2023). Evaluating C trends in clayey Cerrado Oxisols using a four-quadrant model based on specific arylsulfatase and  $\beta$ -glucosidase activities. *Applied Soil Ecology*, 183. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104742>
- Challacombe, J., & Kuske, C. (2012). Mobile genetic elements in the bacterial phylum Acidobacteria. *Mobile Genetic Elements*, 2(4). <https://doi.org/10.4161/mge.21943>
- Chen, C., Ray, P., Knowlton, K. F., Pruden, A., & Xia, K. (2018). Effect of composting and soil type on dissipation of veterinary antibiotics in land-applied manures. *Chemosphere*, 196. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.161>

- Chen, Q. L., An, X. L., Zheng, B. X., Gillings, M., Peñuelas, J., Cui, L., Su, J. Q., & Zhu, Y. G. (2019). Loss of soil microbial diversity exacerbates spread of antibiotic resistance. *Soil Ecology Letters*, 1(1–2). <https://doi.org/10.1007/s42832-019-0011-0>
- Chen, Q., An, X., Li, H., Su, J., Ma, Y., & Zhu, Y. G. (2016). Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. *Environment International*, 92–93. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.026>
- Chen, Y., Han, M., Yuan, X., Cao, G., & Zhu, B. (2021). Seasonal changes in soil properties, microbial biomass and enzyme activities across the soil profile in two alpine ecosystems. *Soil Ecology Letters*, 3(4). <https://doi.org/10.1007/s42832-021-0101-7>
- Chen, Z., Fu, Q., Cao, Y., Wen, Q., & Wu, Y. (2021). Effects of lime amendment on the organic substances changes, antibiotics removal, and heavy metals speciation transformation during swine manure composting. *Chemosphere*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128342>
- Chen, Z., Li, Y., Ye, C., He, X., & Zhang, S. (2021). Fate of antibiotics and antibiotic resistance genes during aerobic co-composting of food waste with sewage sludge. *Science of the Total Environment*, 784. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146950>
- Chong, J., Liu, P., Zhou, G., & Xia, J. (2020). Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nature Protocols*, 15(3). <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0264-1>
- Cordero, I., Snell, H., & Bardgett, R. D. (2019). High throughput method for measuring urease activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.03.014>
- Corrêa, R. S., Barbosa, J. Z., Poggere, G. C., Magri, E., & de Oliveira, S. A. (2023). Grain and Foliar Nutritional Responses of Corn (*Zea mays* L.) to Sewage Sludge Soil Application. *Waste and Biomass Valorization*, 14(8). <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02037-3>
- Cui, J., Yuan, X., Zhang, Q., Zhou, J., Lin, K., Xu, J., Zeng, Y., Wu, Y., Cheng, L., Zeng, Q., Mei, K., & Chen, Y. (2021). Nutrient availability is a dominant predictor of soil bacterial and fungal community composition after nitrogen addition in subtropical acidic forests. *PLoS ONE*, 16(2 February). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246263>
- Curci, M., Lavecchia, A., Cucci, G., Lacolla, G., De Corato, U., & Crecchio, C. (2020). Short-term effects of sewage sludge compost amendment on semiarid soil. *Soil Systems*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/soilsystems4030048>
- Cytryn, E. (2013). The soil resistome: The anthropogenic, the native, and the unknown. In *Soil Biology and Biochemistry* (Vol. 63). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.03.017>

- Dai, T., Wen, D., Bates, C. T., Wu, L., Guo, X., Liu, S., Su, Y., Lei, J., Zhou, J., & Yang, Y. (2022). Nutrient supply controls the linkage between species abundance and ecological interactions in marine bacterial communities. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27857-6>
- Das, S. K., & Varma, A. (2010). Role of Enzymes in Maintaining Soil Health. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-14225-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-14225-3_2)
- Dcosta, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. In *Nature* (Vol. 477, Issue 7365, pp. 457–461). <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- de Melo, W. J., de Melo, G. M. P., de Melo, V. P., Araujo, A. S. F., Ferraudo, A. S., & Bertipaglia, L. M. A. (2020). Soil microbial biomass and enzyme activity in six Brazilian oxisols under cropland and native vegetation. *Bragantia*, 79(4). <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20200242>
- Dede, G., Özdemir, S., Dede, H., Altundağ, H., Dündar, M., & Kızıloğlu, F. T. (2017). Effects of biosolid application on soil properties and kiwi fruit nutrient composition on high-pH soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(7). <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1252-z>
- Del Fiol, F. de S., Bergamaschi, C. de C., De Andrade, I. P., Lopes, L. C., Silva, M. T., & Barberato-Filho, S. (2022). Consumption Trends of Antibiotics in Brazil During the COVID-19 Pandemic. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.844818>
- Delgado-Baquerizo, M., Hu, H. W., Maestre, F. T., Guerra, C. A., Eisenhauer, N., Eldridge, D. J., Zhu, Y. G., Chen, Q. L., Trivedi, P., Du, S., Makhalanyane, T. P., Verma, J. P., Gozalo, B., Ochoa, V., Asensio, S., Wang, L., Zaady, E., Illán, J. G., Siebe, C., ... He, J. Z. (2022). The global distribution and environmental drivers of the soil antibiotic resistome. *Microbiome*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01405-w>
- Dhanker, R., Chaudhary, S., Goyal, S., & Garg, V. K. (2021). Influence of urban sewage sludge amendment on agricultural soil parameters. *Environmental Technology and Innovation*, 23. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101642>
- Dharmakeerthi, R. S., & Thenabadu, M. W. (1996). Urease activity in soils: A review. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka*, 24(3). <https://doi.org/10.4038/jnsfsr.v24i3.5548>
- Di Giacomo, G., & Romano, P. (2022). Evolution and Prospects in Managing Sewage Sludge Resulting from Municipal Wastewater Purification. In *Energies* (Vol. 15, Issue 15). <https://doi.org/10.3390/en15155633>
- Dick, W. A., Cheng, L., & Wang, P. (2000). Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(13). [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00166-8)

- Du, J., Ren, H., Geng, J., Zhang, Y., Xu, K., & Ding, L. (2014). Occurrence and abundance of tetracycline, sulfonamide resistance genes, and class 1 integron in five wastewater treatment plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(12). <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2613-5>
- Duarte, D. J., Oldenkamp, R., & Ragas, A. M. J. (2019). Modelling environmental antibiotic-resistance gene abundance: A meta-analysis. *Science of the Total Environment*, 659. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.233>
- Ezzariai, A., Hafidi, M., Khadra, A., Aemig, Q., El Fels, L., Barret, M., Merlina, G., Patureau, D., & Pinelli, E. (2018). Human and veterinary antibiotics during composting of sludge or manure: Global perspectives on persistence, degradation, and resistance genes. In *Journal of Hazardous Materials* (Vol. 359). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.092>
- Fan, H., Liao, J., Abass, O. K., Liu, L., Huang, X., Wei, L., Li, J., Xie, W., & Liu, C. (2019). Effects of compost characteristics on nutrient retention and simultaneous pollutant immobilization and degradation during co-composting process. *Bioresource Technology*, 275. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.049>
- Fang, M., & Wong, J. W. C. (1999). Effects of lime amendment on availability of heavy metals and maturation in sewage sludge composting. *Environmental Pollution*, 106(1). [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00056-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00056-1)
- FAO. (2015). Intergovernmental Technical Panel on Soils. Status of the World's Soil Resources. In Intergovernmental Technical Panel on Soils.
- Farzadkia, M., & Bazrafshan, E. (2014). Lime Stabilization of Waste Activated Sludge. *Health Scope*, 3(3). <https://doi.org/10.17795/jhealthscope-16035>
- Ferraz De Almeida, R., Naves, E. R., Pinheiro, R., & Mota, D. (2015). Soil quality: Enzymatic activity of soil  $\beta$ -glucosidase. *Global Journal of Agricultural Research and Reviews*, 3(2).
- Ferreira, D. F. (2000). Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA 45., 2000, São Carlos. Anais... São Carlos, SP.
- Ferreira, E. P. de B., Wendland, A., & Didonet, A. D. (2011). Microbial biomass and enzyme activity of a Cerrado Oxisol under agroecological production system. *Bragantia*, 70(4). <https://doi.org/10.1590/s0006-87052011000400024>
- Fijalkowski, K., Rorat, A., Grobelak, A., & Kacprzak, M. J. (2017). The presence of contaminations in sewage sludge – The current situation. *Journal of Environmental Management*, 203. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.068>
- Fluit, A. C., & Schmitz, F. J. (1999). Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. In *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (Vol. 18, Issue 11). <https://doi.org/10.1007/s100960050398>

- Fontaine, S., Mariotti, A., & Abbadie, L. (2003). The priming effect of organic matter: A question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry*, 35(6). [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00123-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00123-8)
- Frankenberger, W. T., Johanson, J. B., & Nelson, C. O. (1983). Urease activity in sewage sludge-amended soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 15(5). [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(83\)90048-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(83)90048-2)
- Furtak, K., & Gajda, A. M. (2017). Activity of dehydrogenases as an indicator of soil environment quality. *Polish Journal of Soil Science*, 50(1). <https://doi.org/10.17951/pjss.2017.50.1.33>
- Garbisu, C., Garaiurrebaso, O., Lanzén, A., Álvarez-Rodríguez, I., Arana, L., Blanco, F., Smalla, K., Grohmann, E., & Alkorta, I. (2018). Mobile genetic elements and antibiotic resistance in mine soil amended with organic wastes. *Science of the Total Environment*, 621. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.221>
- Gaze, W. H., Zhang, L., Abdousslam, N. A., Hawkey, P. M., Calvo-Bado, L., Royle, J., Brown, H., Davis, S., Kay, P., Boxall, A. B. A., & Wellington, E. M. H. (2011). Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME Journal*, 5(8). <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.15>
- Geng, Y., Cao, G., Wang, L., & Wang, S. (2019). Effects of equal chemical fertilizer substitutions with organic manure on yield, dry matter, and nitrogen uptake of spring maize and soil nitrogen distribution. *PLoS ONE*, 14(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219512>
- Gillings, M. R., Gaze, W. H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J. M., & Zhu, Y. G. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME Journal*, 9(6). <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>
- Goss, M. J., Tubeileh, A., & Goorahoo, D. (2013). A Review of the Use of Organic Amendments and the Risk to Human Health. In *Advances in Agronomy* (Vol. 120). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407686-0.00005-1>
- Grenni, P., Ancona, V., & Barra Caracciolo, A. (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>
- Griffiths, B. S., & Philippot, L. (2013). Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 37, Issue 2). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x>
- Han, B., Ma, L., Yu, Q., Yang, J., Su, W., Hilal, M. G., Li, X., Zhang, S., & Li, H. (2022). The source, fate and prospect of antibiotic resistance genes in soil: A review. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.976657>

- Hargreaves, P. R., Brookes, P. C., Ross, G. J. S., & Poulton, P. R. (2003). Evaluating soil microbial biomass carbon as an indicator of long-term environmental change. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(3). [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00291-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00291-2)
- Harris, J. (2009). Soil microbial communities and restoration ecology: Facilitators or followers? In *Science* (Vol. 325, Issue 5940). <https://doi.org/10.1126/science.1172975>
- Hazarika, S.N., D. Thakur, D., 2020. Actinobacteria. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi* 443–476.
- Hemkemeyer, M., Dohrmann, A. B., Christensen, B. T., & Tebbe, C. C. (2018). Bacterial preferences for specific soil particle size fractions revealed by community analyses. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00149>
- Hermans, S. M., Buckley, H. L., Case, B. S., Curran-Cournane, F., Taylor, M., & Lear, G. (2020). Using soil bacterial communities to predict physico-chemical variables and soil quality. *Microbiome*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00858-1>
- Hernández, M., Roy, S., Keevil, C. W., & Dumont, M. G. (2023). Identification of diverse antibiotic resistant bacteria in agricultural soil with H218O stable isotope probing combined with high-throughput sequencing. *Environmental Microbiome*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s40793-023-00489-7>
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. In *Nature Microbiology* (Vol. 4, Issue 9). <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>
- Hoang, S. A., Bolan, N., Madhubashini, A. M. P., Vithanage, M., Perera, V., Wijesekara, H., Wang, H., Srivastava, P., Kirkham, M. B., Mickan, B. S., Rinklebe, J., & Siddique, K. H. M. (2022). Treatment processes to eliminate potential environmental hazards and restore agronomic value of sewage sludge: A review. In *Environmental Pollution* (Vol. 293). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118564>
- Huang, H., Chen, Y., Zheng, X., Su, Y., Wan, R., & Yang, S. (2016). Distribution of tetracycline resistance genes in anaerobic treatment of waste sludge: The role of pH in regulating tetracycline resistant bacteria and horizontal gene transfer. *Bioresource Technology*, 218. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.097>
- Hunter, M. C., Smith, R. G., Schipanski, M. E., Atwood, L. W., & Mortensen, D. A. (2017). Agriculture in 2050: Recalibrating targets for sustainable intensification. In *BioScience* (Vol. 67, Issue 4). <https://doi.org/10.1093/biosci/bix010>
- Inamdar, A., Sangawe, V., & Adhapure, N. (2022). Enzymes in rhizosphere engineering. In *Rhizosphere Engineering*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89973-4.00009-0>

- Jasovský, D., Littmann, J., Zorzet, A., & Cars, O. (2016). Antimicrobial resistance—a threat to the world's sustainable development. In *Upsala Journal of Medical Sciences* (Vol. 121, Issue 3). <https://doi.org/10.1080/03009734.2016.1195900>
- Jauregi, L., Epelde, L., Alkorta, I., & Garbisu, C. (2021). Agricultural Soils Amended With Thermally-Dried Anaerobically-Digested Sewage Sludge Showed Increased Risk of Antibiotic Resistance Dissemination. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.666854>
- Jiang, H., Cheng, H., Liang, Y., Yu, S., Yu, T., Fang, J., & Zhu, C. (2019). Diverse Mobile Genetic Elements and Conjugal Transferability of Sulfonamide Resistance Genes (sul1, sul2, and sul3) in *Escherichia coli* Isolates From *Penaeus vannamei* and Pork From Large Markets in Zhejiang, China. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01787>
- Kalam, S., Basu, A., Ahmad, I., Sayyed, R. Z., El-Enshasy, H. A., Dailin, D. J., & Suriani, N. L. (2020). Recent Understanding of Soil Acidobacteria and Their Ecological Significance: A Critical Review. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580024>
- Karlen, D. L., Mausbach, M. J., Doran, J. W., Cline, R. G., Harris, R. F., & Schuman, G. E. (1997). Soil Quality: A Concept, Definition, and Framework for Evaluation (A Guest Editorial). *Soil Science Society of America Journal*, 61(1). <https://doi.org/10.2136/sssaj1997.03615995006100010001x>
- Kayikcioglu, H. H., Yener, H., Ongun, A. R., & Okur, B. (2019). Evaluation of soil and plant health associated with successive three-year sewage sludge field applications under semi-arid biodegradation condition. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 65(12). <https://doi.org/10.1080/03650340.2019.1572882>
- Kaza, S., Yao, L. C., Bhada-Tata, P., & Van Woerden, F. (2018). What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. In *What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050*. <https://doi.org/10.1596/978-1-4648-1329-0>
- Khedkar, S., Smyshlyaev, G., Letunic, I., Maistrenko, O. M., Coelho, L. P., Orakov, A., Forslund, S. K., Hildebrand, F., Luetge, M., Schmidt, T. S. B., Barabas, O., & Bork, P. (2022). Landscape of mobile genetic elements and their antibiotic resistance cargo in prokaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 50(6). <https://doi.org/10.1093/nar/gkac163>
- Kirchmann, H., Börjesson, G., Kätterer, T., & Cohen, Y. (2017). From agricultural use of sewage sludge to nutrient extraction: A soil science outlook. *Ambio*, 46(2). <https://doi.org/10.1007/s13280-016-0816-3>
- Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., Goossens, H., & Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(15). <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>

- Koçak, B. (2020). Importance of Urease Activity in Soil. International Scientific and Vocational Studies Congress – Science and Health, 12(December).
- Kruczyńska, A., Kuźniar, A., Podlewski, J., Słomczewski, A., Grządziel, J., Marzec-Grządziel, A., Gałązka, A., & Wolińska, A. (2023). Bacteroidota structure in the face of varying agricultural practices as an important indicator of soil quality – a culture independent approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 342. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108252>
- Kumar, V., Chopra, A. K., & Kumar, A. (2017). A Review on Sewage Sludge (Biosolids) a Resource for Sustainable Agriculture. *Archives of Agriculture and Environmental Science*, 2(4). <https://doi.org/10.26832/24566632.2017.020417>
- Lear, L., Hesse, E., Newsome, L., Gaze, W., Buckling, A., & Vos, M. (2023). The effect of metal remediation on the virulence and antimicrobial resistance of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Evolutionary Applications*, 16(7). <https://doi.org/10.1111/eva.13576>
- Levin, H. L., & Moran, J. V. (2011). Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 12, Issue 9). <https://doi.org/10.1038/nrg3030>
- Li, S., Yao, Q., Liu, J., Yu, Z., Li, Y., Jin, J., Liu, X., & Wang, G. (2022). Liming mitigates the spread of antibiotic resistance genes in an acid black soil. *Science of the Total Environment*, 817. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.152971>
- Liao, H., Lu, X., Rensing, C., Friman, V. P., Geisen, S., Chen, Z., Yu, Z., Wei, Z., Zhou, S., & Zhu, Y. (2018). Hyperthermophilic Composting Accelerates the Removal of Antibiotic Resistance Genes and Mobile Genetic Elements in Sewage Sludge. *Environmental Science and Technology*, 52(1). <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04483>
- Lin, H., Sun, W., Jin, D., Yu, Q., Yang, Y., Zhang, Z., Sun, P., & Ma, J. (2021). Effect of composting on the conjugative transmission of sulfonamide resistance and sulfonamide-resistant bacterial population. *Journal of Cleaner Production*, 285. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125483>
- Lin, H., Sun, W., Yu, Y., Ding, Y., Yang, Y., Zhang, Z., & Ma, J. (2021). Simultaneous reductions in antibiotics and heavy metal pollution during manure composting. *Science of the Total Environment*, 788. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147830>
- Lin, L., Xu, F., Ge, X., & Li, Y. (2018). Improving the sustainability of organic waste management practices in the food-energy-water nexus: A comparative review of anaerobic digestion and composting. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 89). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.025>

- Looff, T., Johnson, T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfeld, R. D., Sul, W. J., Stedtfeld, T. M., Chai, B., Cole, J. R., Hashsham, S. A., Tiedje, J. M., & Stanton, T. B. (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.1120238109>
- Lopes, B. C., Machado, E. C., Rodrigues, H. F., Leal, C. D., Araújo, J. C. de, & Teixeira de Matos, A. (2020). Effect of alkaline treatment on pathogens, bacterial community and antibiotic resistance genes in different sewage sludges for potential agriculture use. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 41(4). <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1505960>
- López-González, J. A., Estrella-González, M. J., Lerma-Moliz, R., Jurado, M. M., Suárez-Estrella, F., & López, M. J. (2021). Industrial Composting of Sewage Sludge: Study of the Bacteriome, Sanitation, and Antibiotic-Resistant Strains. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.784071>
- Lü, H., Chen, X. H., Mo, C. H., Huang, Y. H., He, M. Y., Li, Y. W., Feng, N. X., Katsoyiannis, A., & Cai, Q. Y. (2021). Occurrence and dissipation mechanism of organic pollutants during the composting of sewage sludge: A critical review. In *Bioresource Technology* (Vol. 328). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124847>
- Maretto, L., Deb, S., Ravi, S., Chiodi, C., Manfredi, P., Squartini, A., Concheri, G., Renella, G., & Stevanato, P. (2022). Microbial Diversity of Reconstituted, Degraded, and Agricultural Soils Assessed by 16S rDNA Multi-Amplicon Sequencing. *Frontiers in Environmental Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.807889>
- Martinez, C. E., & Tabatabai, M. A. (1997). Decomposition of Biotechnology By-Products in Soils. *Journal of Environmental Quality*, 26(3). <https://doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600030006x>
- Martins, G. L., de Souza, A. J., Mendes, L. W., Gontijo, J. B., Rodrigues, M. M., Coscione, A. R., Oliveira, F. C., & Regitano, J. B. (2023). Physicochemical and bacterial changes during composting of vegetable and animal-derived agro-industrial wastes. *Bioresource Technology*, 376. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128842>
- Matczuk, D., & Siczek, A. (2021). Effectiveness of the use of urease inhibitors in agriculture: A review. In *International Agrophysics* (Vol. 35, Issue 2). <https://doi.org/10.31545/INTAGR/139714>
- McKinney, C. W., Dungan, R. S., Moore, A., & Leytem, A. B. (2018). Occurrence and abundance of antibiotic resistance genes in agricultural soil receiving dairy manure. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(3). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy010>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

- Mendes, I.C., de Sousa, D.M.G., Junior, F.B. dos R., Lopes, A.A. de C., (2018). Bioanálise de solo: como acessar e interpretar a saúde do solo. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1110832>
- Merino, C., Godoy, R., & Matus, F. (2016). Soil enzymes and biological activity at different levels of organic matter stability. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16(1). <https://doi.org/10.4067/S0718-95162016005000002>
- Mocali, S., Gelsomino, A., Nannipieri, P., Pastorelli, R., Giagnoni, L., Petrovicova, B., & Renella, G. (2022). Short-Term Resilience of Soil Microbial Communities and Functions Following Severe Environmental Changes. *Agriculture (Switzerland)*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/agriculture12020268>
- Modolo, L. V., da-Silva, C. J., Brandão, D. S., & Chaves, I. S. (2018). A minireview on what we have learned about urease inhibitors of agricultural interest since mid-2000s. In *Journal of Advanced Research* (Vol. 13). <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.04.001>
- Moorhead, D. L., Rinkes, Z. L., Sinsabaugh, R. L., & Weintraub, M. N. (2013). Dynamic relationships between microbial biomass, respiration, inorganic nutrients and enzyme activities: Informing enzyme-based decomposition models. *Frontiers in Microbiology*, 4(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00223>
- Moretti, S. M. L., Bertocini, E. I., & Abreu-Junior, C. H. (2015). Composting sewage sludge with green waste from tree pruning. *Scientia Agricola*, 72(5). <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0341>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Muziasari, W. I., Pitkänen, L. K., Sørum, H., Stedtfeld, R. D., Tiedje, J. M., & Virta, M. (2017). The resistome of farmed fish feces contributes to the enrichment of antibiotic resistance genes in sediments below baltic sea fish farms. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02137>
- Myszura-Dymek, M., & Żukowska, G. (2023). The Influence of Sewage Sludge Composts on the Enzymatic Activity of Reclaimed Post-Mining Soil. *Sustainability (Switzerland)*, 15(6). <https://doi.org/10.3390/su15064749>
- Nafez, A. H., Nikaeen, M., Kadkhodaie, S., Hatamzadeh, M., & Moghim, S. (2015). Sewage sludge composting: quality assessment for agricultural application. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(11). <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4940-5>

- Nandi, A., Pecetta, S., & Bloom, D. E. (2023). Global antibiotic use during the COVID-19 pandemic: analysis of pharmaceutical sales data from 71 countries, 2020–2022. *Clinical Medicine*, 57. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2023.101848>
- Naorem, A., Maverick, J., Singh, P., & Udayana, S. K. (2021). Microbial community structure in organic farming and their management. In *Advances in Organic Farming: Agronomic Soil Management Practices*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822358-1.00004-3>
- Nascimento, A. L., de Souza, A. J., Oliveira, F. C., Coscione, A. R., Viana, D. G., & Regitano, J. B. (2020). Chemical attributes of sewage sludges: Relationships to sources and treatments, and implications for sludge usage in agriculture. *Journal of Cleaner Production*, 258. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120746>
- Naserian, E. S., Cheraghi, M., Lorestani, B., Sobhanardakani, S., & Sadr, M. K. (2021). Qualitative investigation of sewage sludge composting: effect of aerobic/anaerobic pretreatments. *Arabian Journal of Geosciences*, 14(10). <https://doi.org/10.1007/s12517-021-07232-x>
- Navnage, N. P., Deshmukh, P., Vidyapeeth, K., Ramteke, I. P., & Ramteke, P. R. (2018). Dehydrogenase activity (DHA): Measure of total microbial activity and as indicator of soil quality. ~ 456 ~ *International Journal of Chemical Studies*, 6(1).
- Nesme, J., & Simonet, P. (2015). The soil resistome: A critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. In *Environmental Microbiology* (Vol. 17, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12631>
- Nguyen, T. B., & Shima, K. (2019). Composting of Sewage Sludge with a Simple Aeration Method and its Utilization as a Soil Fertilizer. *Environmental Management*, 63(4). <https://doi.org/10.1007/s00267-017-0963-8>
- Nunes, M. R., Karlen, D. L., Veum, K. S., Moorman, T. B., & Cambardella, C. A. (2020). Biological soil health indicators respond to tillage intensity: A US meta-analysis. *Geoderma*, 369. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114335>
- Nzabarushimana, E., & Tang, H. (2018). Insertion sequence elements-mediated structural variations in bacterial genomes. *Mobile DNA*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13100-018-0134-3>
- Oliveira, A. J.; Garrido, W. E.; Araujo, J. D.; Lourenço, S. (Coord.). *Métodos de pesquisa em fertilidade do solo*. Brasília: EMBRAPA-SEA, 1991, 392p.
- Peng, S., Li, H., Song, D., Lin, X., & Wang, Y. (2018). Influence of zeolite and superphosphate as additives on antibiotic resistance genes and bacterial communities during factory-scale chicken manure composting. *Bioresource Technology*, 263. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.107>

- Philippot, L., Griffiths, B. S., & Langenheder, S. (2021). Microbial Community Resilience across Ecosystems and Multiple Disturbances. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(2). <https://doi.org/10.1128/membr.00026-20>
- Plachá, I., Venglovský, J., Maková, Z., & Martínéz, J. (2008). The elimination of *Salmonella typhimurium* in sewage sludge by aerobic mesophilic stabilization and lime hydrated stabilization. *Bioresource Technology*, 99(10). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.056>
- Qin, Y., & Cabral, J. M. S. (2002). Properties and applications of urease. In *Biocatalysis and Biotransformation* (Vol. 20, Issue 1). <https://doi.org/10.1080/10242420210154>
- Qiu, X., Zhou, G., Wang, H., & Wu, X. (2021). The behavior of antibiotic-resistance genes and their relationships with the bacterial community and heavy metals during sewage sludge composting. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 216. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112190>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Raheem, A., Sikarwar, V. S., He, J., Dastyar, W., Dionysiou, D. D., Wang, W., & Zhao, M. (2018). Opportunities and challenges in sustainable treatment and resource reuse of sewage sludge: A review. In *Chemical Engineering Journal* (Vol. 337). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.12.149>
- Raij, B. van, Andrade, J. C., Cantarella, H., & Quaggio, J. A. (2001). Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. In *Campinas: Instituto Agrônômico* (Issue 19).
- Ramesh, T., Bolan, N. S., Kirkham, M. B., Wijesekara, H., Kanchikerimath, M., Srinivasa Rao, C., Sandeep, S., Rinklebe, J., Ok, Y. S., Choudhury, B. U., Wang, H., Tang, C., Wang, X., Song, Z., & Freeman, O. W. (2019). Soil organic carbon dynamics: Impact of land use changes and management practices: A review. In *Advances in Agronomy* (Vol. 156). <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2019.02.001>
- Regitano, J. B., Rodrigues, M. M., Martins, G. L., Osti, J. F., Viana, D. G., & de Souza, A. J. (2022). Sewage Sludge Management for Environmental Sustainability: An Introduction. In *Sustainable Management and Utilization of Sewage Sludge*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-85226-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-85226-9_1)
- Rehana, M. R., Joseph, B., & Gladis, R. (2020). Heavy Metal Stabilization in Sewage Sludge Composting Process. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 38–48. <https://doi.org/10.9734/cjast/2020/v39i1930789>
- Reichert, G., Hilgert, S., Fuchs, S., & Azevedo, J. C. R. (2019). Emerging contaminants and antibiotic resistance in the different environmental matrices of Latin America. *Environmental Pollution*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113140>

- Ren, C., Zhao, F., Shi, Z., Chen, J., Han, X., Yang, G., Feng, Y., & Ren, G. (2017). Differential responses of soil microbial biomass and carbon-degrading enzyme activities to altered precipitation. *Soil Biology and Biochemistry*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.08.002>
- Rodríguez-Baño, J., Rossolini, G. M., Schultsz, C., Tacconelli, E., Murthy, S., Ohmagari, N., Holmes, A., Bachmann, T., Goossens, H., Canton, R., Roberts, A. P., Henriques-Normark, B., Clancy, C. J., Huttner, B., Fagerstedt, P., Lahiri, S., Kaushic, C., Hoffman, S. J., Warren, M., ... Plant, L. (2021). Antimicrobial resistance research in a post-pandemic world: Insights on antimicrobial resistance research in the COVID-19 pandemic. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.02.013>
- Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F. (2014). The prokaryotes: Firmicutes and tenericutes. In *The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes* (Vol. 9783642301209). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30120-9>
- Sadet-Bourgeteau, S., Houot, S., Dequiedt, S., Nowak, V., Tardy, V., Terrat, S., Montenach, D., Mercier, V., Karimi, B., Chemidlin Prévost-Bouré, N., & Maron, P. A. (2018). Lasting effect of repeated application of organic waste products on microbial communities in arable soils. *Applied Soil Ecology*, 125. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.02.006>
- Saison, C., Degrange, V., Oliver, R., Millard, P., Commeaux, C., Montange, D., & Le Roux, X. (2006). Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: Effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environmental Microbiology*, 8(2). <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00892.x>
- Salazar, S., Sánchez, L. E., Alvarez, J., Valverde, A., Galindo, P., Igual, J. M., Peix, A., & Santa-Regina, I. (2011). Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices. *Ecological Engineering*, 37(8). <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.02.007>
- Samaras, P., Papadimitriou, C. A., Haritou, I., & Zouboulis, A. I. (2008). Investigation of sewage sludge stabilization potential by the addition of fly ash and lime. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1–3). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.11.012>
- Samreen, Ahmad, I., Malak, H. A., & Abulreesh, H. H. (2021). Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. In *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (Vol. 27). <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. In *Chemosphere* (Vol. 65, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>

- Schages, L., Wichern, F., Geisen, S., Kalscheuer, R., & Bockmühl, D. (2021). Distinct resistomes and microbial communities of soils, wastewater treatment plants and households suggest development of antibiotic resistances due to distinct environmental conditions in each environment. *Antibiotics*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050514>
- Schlöter, M., Nannipieri, P., Sørensen, S. J., & van Elsas, J. D. (2018). Microbial indicators for soil quality. *Biology and Fertility of Soils*, 54(1). <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1248-3>
- Selvam, A., Xu, D., Zhao, Z., & Wong, J. W. C. (2012). Fate of tetracycline, sulfonamide and fluoroquinolone resistance genes and the changes in bacterial diversity during composting of swine manure. *Bioresource Technology*, 126. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.045>
- Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M. H., Kirchmann, H., & Kandeler, E. (2001). Microbial Population Structures in Soil Particle Size Fractions of a Long-Term Fertilizer Field Experiment. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9). <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4215-4224.2001>
- Shade, A., Peter, H., Allison, S. D., Baho, D. L., Berga, M., Bürgmann, H., Huber, D. H., Langenheder, S., Lennon, J. T., Martiny, J. B. H., Matulich, K. L., Schmidt, T. M., & Handelsman, J. (2012). Fundamentals of microbial community resistance and resilience. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 3, Issue DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00417>
- Shannon, C. E. (1948). A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, 27(3). <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Shu, X., He, J., Zhou, Z., Xia, L., Hu, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Luo, Y., Chu, H., Liu, W., Yuan, S., Gao, X., & Wang, C. (2022). Organic amendments enhance soil microbial diversity, microbial functionality and crop yields: A meta-analysis. *Science of the Total Environment*, 829. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154627>
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity [16]. In *Nature* (Vol. 163, Issue 4148). <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Singer, A. C., Shaw, H., Rhodes, V., & Hart, A. (2016). Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01728>
- Sobucki, L., Ramos, R. F., Meireles, L. A., Antonioli, Z. I., & Jacques, R. J. S. (2021). Contribution of enzymes to soil quality and the evolution of research in Brazil. In *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* (Vol. 45). <https://doi.org/10.36783/18069657rbcscs20210109>
- Song, D., Tang, J., Xi, X., Zhang, S., Liang, G., Zhou, W., & Wang, X. (2018). Responses of soil nutrients and microbial activities to additions of maize straw biochar and chemical fertilization in a calcareous soil. *European Journal of Soil Biology*, 84. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2017.11.003>

- Soobhany, N. (2018). Assessing the physicochemical properties and quality parameters during composting of different organic constituents of Municipal Solid Waste. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.02.049>
- Sorinolu, A. J., Tyagi, N., Kumar, A., & Munir, M. (2021). Antibiotic resistance development and human health risks during wastewater reuse and biosolids application in agriculture. In *Chemosphere* (Vol. 265). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129032>
- Souza, C. A. de, Reis Junior, F. B. dos, Mendes, I. de C., Lemainski, J., & Silva, J. E. da. (2009). Lodo de esgoto em atributos biológicos do solo e na nodulação e produção de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(10). <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2009001000016>
- Spain, A. M., Krumholz, L. R., & Elshahed, M. S. (2009). Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. *ISME Journal*, 3(8). <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.43>
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., & Ploy, M. C. (2012). Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 3, Issue APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119>
- Stedtfeld, R. D., Guo, X., Stedtfeld, T. M., Sheng, H., Williams, M. R., Hauschild, K., Gunturu, S., Tift, L., Wang, F., Howe, A., Chai, B., Yin, D., Cole, J. R., Tiedje, J. M., & Hashsham, S. A. (2018). Primer set 2.0 for highly parallel qpcr array targeting antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(9). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy130>
- Su, J. Q., Wei, B., Ou-Yang, W. Y., Huang, F. Y., Zhao, Y., Xu, H. J., & Zhu, Y. G. (2015). Antibiotic Resistome and Its Association with Bacterial Communities during Sewage Sludge Composting. *Environmental Science and Technology*, 49(12). <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01012>
- Sugurbekova, G., Nagyzbekkyzy, E., Sarsenova, A., Danlybayeva, G., Anuarbekova, S., Kudaibergenova, R., Frochot, C., Acherar, S., Zhatkanbayev, Y., & Moldagulova, N. (2023). Sewage Sludge Management and Application in the Form of Sustainable Fertilizer. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 15, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/su15076112>
- Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1972). Assay of urease activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 4(4). [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90064-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90064-8)
- Tan, Y., Cao, X., Chen, S., Ao, X., Li, J., Hu, K., Liu, S., Penttinen, P., Yang, Y., Yu, X., Liu, A., Liu, C., Zhao, K., & Zou, L. (2023). Antibiotic and heavy metal resistance genes in sewage sludge survive during aerobic composting. *Science of the Total Environment*, 866. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161386>
- Tandzi, L. N., & Mutengwa, C. S. (2020). Estimation of Maize (*Zea mays* L.) Yield Per Harvest Area: Appropriate methods. In *Agronomy* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/agronomy10010029>

- Tang, K. W. K., Millar, B. C., & Moore, J. E. (2023). Antimicrobial Resistance (AMR). In *British Journal of Biomedical Science* (Vol. 80). <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>
- Thomas, C., Idler, C., Ammon, C., & Amon, T. (2020). Effects of the C/N ratio and moisture content on the survival of ESBL-producing *Escherichia coli* during chicken manure composting. *Waste Management*, 105. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.01.031>
- Tollenaar, M., & Lee, E. A. (2002). Yield potential, yield stability and stress tolerance in maize. *Field Crops Research*, 75(2–3). [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(02\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(02)00024-2)
- Top, E. M., & Springael, D. (2003). The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 14, Issue 3). [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00066-1](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00066-1)
- Tóth, B., Bóka, K., Rothmann, L. A., & Moloi, M. J. (2021). The Effect of Four Industrial By-Products on the Photosynthetic Pigments, Dry Weight and Ultrastructure of *Zea mays* L. *Biology Bulletin*, 48(3). <https://doi.org/10.1134/S106235902103016X>
- Trivedi, C., Delgado-Baquerizo, M., Hamonts, K., Lai, K., Reich, P. B., & Singh, B. K. (2019). Losses in microbial functional diversity reduce the rate of key soil processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.05.008>
- Uluseker, C., Kaster, K. M., Thorsen, K., Basiry, D., Shobana, S., Jain, M., Kumar, G., Kommedal, R., & Pala-Ozkok, I. (2021). A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.717809>
- United Nation (2019). World population prospects 2019: Highlights. WPP, 141.
- United Nation UN, T. U. N. (2016). Sustainable Development Goals 17. The United Nations Development Programme (UNDP), October.
- United Nation. (2022). Day of Eight Billion . Population Division.
- Urrea, J., Alkorta, I., & Garbisu, C. (2019). Potential benefits and risks for soil health derived from the use of organic amendments in agriculture. In *Agronomy* (Vol. 9, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/agronomy9090542>
- Urrea, J., Alkorta, I., Mijangos, I., Epelde, L., & Garbisu, C. (2019). Application of sewage sludge to agricultural soil increases the abundance of antibiotic resistance genes without altering the composition of prokaryotic communities. *Science of the Total Environment*, 647. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.092>

- Van Goethem, M. W., Pierneef, R., Bezuidt, O. K. I., Van De Peer, Y., Cowan, D. A., & Makhalanyane, T. P. (2018). A reservoir of “historical” antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0424-5>
- Van Raij, B., & Cantarella, H. (1996). A quadratic model for fertilizer recommendations based on results of soil analyses. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 27(5–8). <https://doi.org/10.1080/00103629609369656>
- van Rijssel, S. Q., Veen, G. F., Koorneef, G. J., Bakx-Schotman, J. M. T., ten Hooven, F. C., Geisen, S., & van der Putten, W. H. (2022). Soil microbial diversity and community composition during conversion from conventional to organic agriculture. *Molecular Ecology*, 31(15). <https://doi.org/10.1111/mec.16571>
- Vance, E. D., Brookes, P. C., & Jenkinson, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(6). [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Vandecasteele, B., Boogaerts, C., & Vandaele, E. (2016). Combining woody biomass for combustion with green waste composting: Effect of removal of woody biomass on compost quality. *Waste Management*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.09.012>
- Verraes, C., Van Boxstael, S., Van Meervenue, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaezen, M. A., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J., & Herman, L. (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: A review. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 10, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>
- Wang, F., Fu, Y. H., Sheng, H. J., Topp, E., Jiang, X., Zhu, Y. G., & Tiedje, J. M. (2021). Antibiotic resistance in the soil ecosystem: A One Health perspective. In *Current Opinion in Environmental Science and Health* (Vol. 20). <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2021.100230>
- Wang, G., Kong, Y., Yang, Y., Ma, R., Li, L., Li, G., & Yuan, J. (2022). Composting temperature directly affects the removal of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in livestock manure. *Environmental Pollution*, 303. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119174>
- Wang, J., Wang, L., Zhu, L., Wang, J., & Xing, B. (2022). Antibiotic resistance in agricultural soils: Source, fate, mechanism and attenuation strategy. In *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (Vol. 52, Issue 6). <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1835438>

- Wang, J., Xu, S., Zhao, K., Song, G., Zhao, S., & Liu, R. (2023). Risk control of antibiotics, antibiotic resistance genes (ARGs) and antibiotic resistant bacteria (ARB) during sewage sludge treatment and disposal: A review. In *Science of the Total Environment* (Vol. 877). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162772>
- Wang, L., & Xiong, X. (2022). Long-Term Organic Manure Application Alters Urease Activity and Ureolytic Microflora Structure in Agricultural Soils. *Agronomy*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/agronomy12123018>
- Wang, Y., Zhao, R., Liu, L., Li, B., & Zhang, T. (2021). Selective enrichment of comammox from activated sludge using antibiotics. *Water Research*, 197. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117087>
- Wei, B., Huang, F., Li, H., & Su, J. (2014). Persistence of sulfonamide and macrolide resistance genes during sewage sludge composting. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 20(3). <https://doi.org/10.3724/SP.J.1145.2014.11011>
- Werner, K. A., Poehlein, A., Schneider, D., El-Said, K., Wöhrmann, M., Linkert, I., Hübner, T., Brüggemann, N., Prost, K., Daniel, R., & Grohmann, E. (2022). Thermophilic Composting of Human Feces: Development of Bacterial Community Composition and Antimicrobial Resistance Gene Pool. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.824834>
- Wickham, H. (2011). ggplot2. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 3(2). <https://doi.org/10.1002/wics.147>
- Withers, E., Hill, P. W., Chadwick, D. R., & Jones, D. L. (2020). Use of untargeted metabolomics for assessing soil quality and microbial function. *Soil Biology and Biochemistry*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107758>
- Wolinska, A., & Stepniowski, Z. (2012). Dehydrogenase Activity in the Soil Environment. In *Dehydrogenases*. <https://doi.org/10.5772/48294>
- Wong, J. W. C., & Fang, M. (2000). Effects of lime addition on sewage sludge composting process. *Water Research*, 34(15). [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00116-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00116-0)
- Wong, J. W. C., & Selvam, A. (2006). Speciation of heavy metals during co-composting of sewage sludge with lime. *Chemosphere*, 63(6). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.08.045>
- World Health Organization. WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption: 2016–2018 Early Implementation; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2018.
- Wu, J., Wang, J., Li, Z., Guo, S., Li, K., Xu, P., Ok, Y. S., Jones, D. L., & Zou, J. (2023). Antibiotics and antibiotic resistance genes in agricultural soils: A systematic analysis. In *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* (Vol. 53, Issue 7). <https://doi.org/10.1080/10643389.2022.2094693>

- Xia, Q., Ruffy, T., & Shi, W. (2020). Soil microbial diversity and composition: Links to soil texture and associated properties. *Soil Biology and Biochemistry*, 149. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107953>
- Xiong, C., & Lu, Y. (2022). Microbiomes in agroecosystem: Diversity, function and assembly mechanisms. In *Environmental Microbiology Reports* (Vol. 14, Issue 6). <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13126>
- Xu, X., Thornton, P. E., & Post, W. M. (2013). A global analysis of soil microbial biomass carbon, nitrogen and phosphorus in terrestrial ecosystems. *Global Ecology and Biogeography*, 22(6). <https://doi.org/10.1111/geb.12029>
- Xu, Z., Ma, Y., Zhang, L., Han, Y., Yuan, J., Li, G., & Luo, W. (2021). Relating bacterial dynamics and functions to gaseous emissions during composting of kitchen and garden wastes. *Science of the Total Environment*, 767. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144210>
- Xu, Z., Xu, W., Zhang, L., Ma, Y., Li, Y., Li, G., Nghiem, L. D., & Luo, W. (2021). Bacterial dynamics and functions driven by bulking agents to mitigate gaseous emissions in kitchen waste composting. *Bioresource Technology*, 332. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125028>
- Yakamercan, E., & Aygün, A. (2021). Ecological risk assessment of domestic sewage sludge: a case study. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, 39(4). <https://doi.org/10.14744/sigma.2021.00030>
- Ye, X., Liu, H., Li, Z., Wang, Y., Wang, Y., Wang, H., & Liu, G. (2014). EFFECTS OF GREEN MANURE CONTINUOUS APPLICATION ON SOIL MICROBIAL BIOMASS AND ENZYME ACTIVITY. *Journal of Plant Nutrition*, 37(4). <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.867978>
- Yi, C., & Jackson, N. (2021). A review of measuring ecosystem resilience to disturbance. In *Environmental Research Letters* (Vol. 16, Issue 5). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/abdf09>
- Zhang, J., Chen, M., Sui, Q., Tong, J., Jiang, C., Lu, X., Zhang, Y., & Wei, Y. (2016). Impacts of addition of natural zeolite or a nitrification inhibitor on antibiotic resistance genes during sludge composting. *Water Research*, 91. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.010>
- Zhang, J., Zhang, T., Ying, Y., & Yao, X. (2021). Effects of different additives on the chemical composition and microbial diversity during composting of *Camellia oleifera* shell. *Bioresource Technology*, 330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124990>
- Zhang, L., & Xu, Z. (2008). Assessing bacterial diversity in soil: AAAA brief review. *Journal of Soils and Sediments*, 8(6). <https://doi.org/10.1007/s11368-008-0043-z>

- Zhang, X., Wang, X. Q., & Wang, D. F. (2017). Immobilization of heavy metals in sewage sludge during land application process in China: A review. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 9, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/su9112020>
- Zhang, Z., Zhang, Q., Wang, T., Xu, N., Lu, T., Hong, W., Penuelas, J., Gillings, M., Wang, M., Gao, W., & Qian, H. (2022). Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29283-8>
- Zhao, Y., Cocerva, T., Cox, S., Tardif, S., Su, J. Q., Zhu, Y. G., & Brandt, K. K. (2019). Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils. *Science of the Total Environment*, 656. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.372>
- Zhen, Z., Liu, H., Wang, N., Guo, L., Meng, J., Ding, N., Wu, G., & Jiang, G. (2014). Effects of manure compost application on soil microbial community diversity and soil microenvironments in a temperate cropland in China. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108555>
- Zhu, Y. G., Johnson, T. A., Su, J. Q., Qiao, M., Guo, G. X., Stedtfeld, R. D., Hashsham, S. A., & Tiedje, J. M. (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.1222743110>
- Zhu, Y. G., Zhao, Y., Zhu, D., Gillings, M., Penuelas, J., Ok, Y. S., Capon, A., & Banwart, S. (2019). Soil biota, antimicrobial resistance and planetary health. In *Environment International* (Vol. 131). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105059>
- Zuber, S. M., & Villamil, M. B. (2016). Meta-analysis approach to assess effect of tillage on microbial biomass and enzyme activities. In *Soil Biology and Biochemistry* (Vol. 97). <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.03.011>

## MATERIAL SUPLEMENTAR

**TabelaS1:** Doses de fertilizantes e corretivos de acidez aplicados ao solo argiloso (LVd) e franco-arenoso (LVa).

Nutriente	Concentração*	Dosagem	Quantidade de fertilizante
N	100 mg kg solo <sup>-1</sup>	1 g N vaso <sup>-1</sup>	13,8 g MAP vaso <sup>-1</sup> (100%)
P	300 mg kg solo <sup>-1</sup>	6,9 g P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> vaso <sup>-1</sup>	3,0 g KCl vaso <sup>-1</sup> (100%)
K	150 mg kg solo <sup>-1</sup>	1,8 g K <sub>2</sub> O vaso <sup>-1</sup>	8,3 g MAP vaso <sup>-1</sup> (60%) 1,8 g KCl vaso <sup>-1</sup> (60%)
Corretivos			
LVd	--	4,3 t ha <sup>-1</sup>	12,0 g CaO vaso <sup>-1</sup> 6,0 g MgO vaso <sup>-1</sup>
LVa	--	0,3 t ha <sup>-1</sup>	2,0 g CaO vaso <sup>-1</sup> 1,0 g MgO vaso <sup>-1</sup>

\*de acordo com Oliveira et al., 1991.



**Figura S1:** Espigas de milho colhidas após cultivo no solo argiloso (S1 – LVd) (A) e solo franco-arenoso (S2 – LVa) (B), após 100 dias de experimento. As legendas se referem aos tratamentos controle (NS); bio-sólido obtido por compostagem industrial com calcário (LC); bio-sólidos obtido por compostagem industrial sem calcário (NLC) e; aplicação de lodo de esgoto fresco (FSS).

**TabelaS2:** Conjunto de primers de genes de resistência antimicrobiana e de elementos genéticos móveis (EGM) utilizados no presente estudo e sua classificação do antibiótico alvo. Sendo FCA = genes de resistência a fluoroquinolona, quinolona, florfenicol, chloramfenicol e anfenicol.

Gene	Primer - Forward	Primer - Reverse	Classificação do Gene
16S rRNA	ATGGYTGTCTGTCAGC TCGTG	GGGTTGCGCTCGTT GC	16S rRNA
intl1_1	CGAACGAGTGGCGG AGGGTG	TACCCGAGAGCTTG GCACCCA	Integrans (EGM)
intl1_2	CGAAGTCGAGGCATT TCTGTC	GCCTTCCAGAAAAC CGAGGA	Integrans
IS613	AGGTTTCGGACTCAAT GCAACA	TTCAGCACATACCG CCTTGAT	Inserção de sequência (EGM)
tnpA_1	GCCGCACTGTCTGATT TTTATC	GCGGGATCTGCCAC TTCTT	Tranposons (EGM)
tnpA_2	CCGATCACGGAAAGC TCAAG	GGCTCGCATGACTT CGAATC	Tranposons (EGM)
tnpA_3	GGGCGGGTTCGATTG AAA	GTGGGCGGGATCTG CTT	Tranposons (EGM)
tnpA_4	CATCATCGGACGGAC AGAATT	GTCGGAGATGTGGG TGTAGAAAGT	Tranposons (EGM)
tnpA_5	GAAACCGATGCTACA ATATCCAATTT	CAGCACCGTTTGCA GTGTAAG	Tranposons (EGM)
tnpA_7	AATTGATGCGGACGG CTTAA	TCACCAAAGTGTGTTA TGGAGTCGTT	Tranposons (EGM)
Tp614	GGAAATCAACGGCAT CCAGTT	CATCCATGCGCTTTT GTCTCT	Tranposons (EGM)
qepA	GGGCATCGCGCTGTT C	GCGCATCGGTGAAG CC	FCA
qnrA	AGGATTTCTCACGCC AGGATT	CCGCTTTCAATGAAA CTGCAA	FCA
qnrB	GCGACGTTTCAGTGGT TCAGA	GCTGCTCGCCAGTC GAA	FCA
qnrB_2	CGACGTTTCAGTGGT CAGATCTC	GCCAAGCCGCTCCA TGAG	FCA
qnrS_1	CGACGTTTCAGTGGT CAGATCTC	CCCTCTCCATATTGG CATAGGAAA	FCA
qnrS2	TCCCGAGCAAACCTTT GCCAA	GGTGAGTCCCTATC CAGCGA	FCA
aac(6')-Ib_1	CGTCGCCGAGCAACT TG	CGGTACCTTGCCTC TCAAACC	FCA
aac(6')-Ib_2	GTTTGAGAGGCAAGG TACCGTAA	GAATGCCTGGCGTG TTTGA	FCA

aac(6')-Ib_3	AGAAGCACGCCCGAC ACTT	GCTCTCCATTCAGCA TTGCA	FCA
sul1_1	CGCACCGGAAACATC GCTGCAC	TGAAGTTCCGCCGC AAGGCTCG	Sulfonamidas
sul1_2	GCCGATGAGATCAGA CGTATTG	CGCATAGCGCTGGG TTTC	Sulfonamidas
sul1_3	CAGCGCTATGCGCTC AAG	ATCCCGCTGCGCTG AGT	Sulfonamidas
sul2_1	TCCGGTGGAGGCCG GTATCTGG	CGGGAATGCCATCT GCCTTGAG	Sulfonamidas
sul2_2	TCATCTGCCAAACTC GTCGTTA	GTCAAAGAACGCCG CAATGT	Sulfonamidas
sul3_1	TCCGTTACGCGAATT GGTGCAG	TTCGTTACGCCTTA CACCAGC	Sulfonamidas
sul4	TCAACGTCACTCCAG ACAGC	TGGAATAACGACG TCCACA	Sulfonamidas
tetA_1	GCTGTTTGTCTGCC GGAAA	GGTTAAGTTCCTTGA ACGCCAACT	Tetraciclina
tetA_2	CTCACCAGCCTGACC TCGAT	CACGTTGTTATAGAA GCCGCATAG	Tetraciclina
tetA/B_1	AGTGCGCTTTGGATG CTGTA	AGCCCCAGTAGCTC CTGTGA	Tetraciclina
tetA/B_2	GCCCAGTGCTGTTGT TGTCAT	TGAAAGCAAACGGC CTAAATACA	Tetraciclina
tetM_2	GCAATTCTACTGATTT CTGC	CTGTTTGATTACAAT TTCCGC	Tetraciclina
tetM_3	CATCATAGACACGCC AGGACATAT	CGCCATCTTTTGCAG AAATCA	Tetraciclina
tetO_1	ATGTGGATACTACAA CGCATGAGATT	TGCCTCCACATGATA TTTTTCT	Tetraciclina
tetV	GCGGGAACGACGAT GTATATC	CCGCTATCTCACGA CCATGAT	Tetraciclina
tetW	ATGAACATTCCCACC GTTATCTTT	ATATCGGCGGAGAG CTTATCC	Tetraciclina

---

FCA = genes de resistência a fluoroquinolona, quinolona, florfenicol, chloramfenicol e anfenicol.

**TabelaS3:** Caracterização físico-química do solo argiloso (LVd) e franco-arenoso (LVa) pós cultivo.

Tratamentos	pH	H+Al	CTC	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
		--mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> --		mg dm <sup>-3</sup>		-----mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----		-----mg dm <sup>-3</sup> -----			
	LVd										
FM	5,2 b	46 a	55 c	318 a	2,4 a	26,2 d	26,2 ab	36 b	0,57 c	0,8 d	6.1 a
BS	5,4 b	34 c	70 b	305 a	1,6 b	42,3 b	25,6 b	32 b	1,5 a	10,6 a	4,0 b
BSc	5,8 a	25 d	85 a	320 a	1,6 b	53,7 a	29,2 a	37 b	1,3 ab	7,0 ab	5.1 ab
LEF	5,3 b	40 b	59 c	256 a	1,3 c	36,1 c	21,2 c	50 a	1,2 b	4,0 bc	5.0 ab
	LVa										
FM	4,7 c	28 a	18 c	350 b	1,5 a	11,4 c	5,0 bc	70 a	0,75 c	1,6 b	6.8 a
BS	5,0 b	24 b	30 b	455 a	1,4 a	22,7 b	5,6 ab	41 c	1,4 ab	6,7 a	3.6 c
BSc	5,4 a	18 c	35 a	433 a	1,4 a	26,8 a	6,3 a	57 b	1,8 a	4,8 ab	4.1 bc
LEF	4,9 bc	26 a	21 c	269 c	1,0 b	14,5 c	4,9 c	67 a	1,3 b	3,9 b	5.0 b

FM= fertilizante mineral (controle); BS = bio sólidos obtido por compostagem industrial sem calcário; BSc = bio sólido obtido por compostagem industrial com calcário; LEF = lodo de esgoto fresco; CTC = capacidade de troca catiônica efetiva. Médias e erro padrão (n = 4) seguidas de asterisco indicam diferença pelo teste de Tukey (P <0,05).

**TabelaS4:** Filos, classes, ordens, famílias e gêneros identificados pelo sequenciamento da região V3-V4 do gene 16S rRNA no presente estudo.

Filo (17)	<i>Acidobacteriota; Actinobacteriot; Bacteroidota; Bdellovibrionota; Chloroflexi; Cyanobacteria; Firmicutes; GAL15; Gemmatimonadota; Myxococcota; Nitrospirota; Patescibacteria; Planctomycetota; Proteobacteria; Sumerlaeota; Verrucomicrobiota; WPS_2.</i>
Classe (37)	<i>Acidimicrobiia; Acidobacteriae; Actinobacteria; AD3; Alphaproteobacteria; Anaerolineae; Bacilli; Bacteroidia; Bdellovibrionia; Blastocatellia; Chloroflexia; Clostridia; Cyanobacteria; Dehalococcoidia; Desulfotomaculia; Gammaproteobacteria; Gemmatimonadetes; Gitt_GS_136; JG30_KF_CM66; KD4_96; Ktedonobacteria; Limnochordia; MB_A2_108; Myxococcia; Nitrospira; Phycisphaerae; Planctomycetes; Polyangia; Rubrobacteria; Saccharimonadia; Sericytochromatia; Subgroup_5; Sumerlaeia; Thermoleophilia; TK10; Verrucomicrobiae; Vicinamibacteria.</i>
Ordem (64)	<i>Acetobacterales; Acidobacteriales; Azospirillales; Bacillales; Bdellovibrionales; Blastocatellales; Bryobacterales; C0119; Caldilineales; Catenulisporales; Caulobacterales; Chitinophagales; Chloroflexales; Chloroplast; Chthoniobacterales; Clostridiales; Corynebacteriales; Cytophagales; Desulfotomaculales; Dongiales; Elsterales; Frankiales; Gaiellales; Gemmatimonadales; Haliangiales; Hydrogenispora; IMCC26256; Kineosporiales; Ktedonobacterales; Lachnospirales; Limnochordales; Micrococcales; Micromonosporales; Micropepsales; Microtrichales; mle1_27; Myxococcales; Nitrospirales; nov_24; Paenibacillales; Pedosphaerales; Peptostreptococcales_Tissierellales; Polyangiales; Propionibacteriales; Pseudonocardiales; Pyrinomonadales; Reyranellales; Rhizobiales; Rhodobacterales; Rubrobacterales; S085; Saccharimonadales; SBR1031; Solibacterales; Solirubrobacterales; Sphingobacteriales; Sphingomonadales; Streptomyetales; Streptosporangiales; Subgroup_2; Sumerlaeales; Tepidisphaerales; Thermomicrobiales; Vicinamibacterales.</i>
Família (78)	<i>A4b; Acetobacteraceae; Acidobacteriaceae (Subgroup_1); Acidothermaceae; AKYG1722; Amb_16S_1323; Azospirillaceae; Bdellovibrionaceae; Beijerinckiaceae; Blii41; Blastocatellaceae; Bryobacteraceae; Caldilineaceae; Catenulisporaceae; Caulobacteraceae; Cellulomonadaceae; Chitinophagaceae; Chthoniobacteraceae; Clostridiaceae; Desulfotomaculales_Incertae_Sedis; Devosiaceae; Dongiaceae; Frankiaceae; Gaiellaceae; Gemmatimonadaceae; Geodermatophilaceae; Haliangiaceae; Hyphomicrobiaceae; Iamiaceae; Ilumatobacteraceae; Intrasporangiaceae; JG30_KF_AS9; JG30_KF_CM45; Kineosporiaceae; Koribacteraceae; Ktedonobacteraceae; Labraceae; Limnochordaceae; Methyloligellaceae; Microbacteriaceae; Micrococcaceae; Micromonosporaceae; Micropepsaceae; Microscillaceae; Mycobacteriaceae; Myxococcaceae; Nitrospiraceae; Nocardiaceae; Nocardiodaceae; Paenibacillaceae; Pedosphaeraceae; Peptostreptococcaceae; Polyangiaceae; Promicromonosporaceae; Propionibacteriaceae; Pseudonocardiaceae; Pyrinomonadaceae; Reyranellaceae; Rhizobiaceae; Rhizobiales_Incertae_Sedis; Rhodobacteraceae; Rhodomicrobiaceae; Roseiflexaceae; Rubrobacteriaceae; Solibacteraceae; Sphingobacteriaceae;</i>

---

	<i>Sphingomonadaceae; Sporichthyaceae; Streptomycetaceae; Streptosporangiaceae; Sumerlaeaceae; Thermomicrobiaceae; Thermomonosporaceae; URHD0088; Vicinamibacteraceae; WD2101_soil_group; Xanthobacteraceae; Xiphinematobacteraceae.</i>
Gênero (125)	<i>1921_2; 1921_3; Acidicaldus; Acidipila_Silvibacterium; Acidothermus; Actinoallomurus; Actinomadura; Actinomycetospora; Actinoplanes; ADurb_Bin063_1; Afipia; Allorhizobium_Neorrhizobium_Pararhizobium_Rhizobium; alpha_cluster; Alsobacter; Altererythrobacter; Ammoniphilus; Amycolatopsis; Angustibacter; Archangium; Aridibacter; Arthrobacter; Asanoa; Bauldia; Blastococcus; Bosea; Bradyrhizobium; Bryobacter; Candidatus_Koribacter; Candidatus_Solibacter; Candidatus_Udaeobacter; Candidatus_Xiphinematobacter; Catellatospora; Catenulispora; Cellulomonas; Clostridium_sensu_stricto_1; Cohnella; Crossiella; Dactylosporangium; Desulfallas_Sporotomaculum; Devosia; Dongia; Edaphobacter; Edaphobaculum; FCPS473; Flaviaesturariibacter; Flavisolibacter; Flavitalea; G12_WMSP1; Gaiella; Gemmatimonas; Geodermatophilus; Haliangium; Hamadaea; HSB_OF53_F07; Hyphomicrobium; Iamia; Intrasporangium; Jatrophihabitans; JG30a_KF_32; JGI_0001001_H03; Kitasatospora; Knoellia; Kribbella; Ktedonobacter; Kutzneria; Labrys; Lapillicoccus; Leifsonia; Longispora; Luedemannella; Marmoricola; Mesorhizobium; Methylobacterium_Methylorubrum; Methylovirgula; Microbacterium; Microbispora; Microlunatus; Micromonospora; Microvirga; Modestobacter; Mycobacterium; Niastella; Nitrospira; Nocardia; Nocardioides; Nonomurea; Nordella; Occallatibacter; Paenarthrobacter; Paenibacillus; Pajaroellobacter; Pedococcus_Phycoccus; Pedomicrobium; Phenylobacterium; Pseudaminobacter; Pseudarthrobacter; Pseudolabrys; Pseudonocardia; Puia; Quadrisphaera; RB41; Reyranela; Rhodococcus; Rhodomicrobium; Rhodopila; Rhodoplanes; Roseiarcus; Roseisolibacter; Rubrobacter; Rugosimonospora; Sinomonas; Sphingobium; Sphingomonas; Sporichthya; Streptacidiphilus; Streptomyces; Sumerlaea; Tellurimicrobium; Terrabacter; Terracidiphilus; Terrimonas; Thermomonospora; Thermopolyspora; Thermosporothrix; Verrucosispora.</i>

---