

II-1043 – REMOÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS (BRAs) EM LODOS DE ESGOTO SANITÁRIO TRATADOS POR ALCALINIZAÇÃO QUÍMICA

Eliane Cristina Braga Martins Gonçalves⁽¹⁾

Engenheira Agrícola e Ambiental pela Universidade Federal Fluminense (UFF). Mestra pelo Departamento de Engenharia de Materiais e de Processos Químicos e Metalúrgicos pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (DEQM - PUC-Rio). Doutoranda em Engenharia Ambiental, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto (PROAMB – UFOP).

Silvana de Queiróz Silva

Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Mestra em Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (EESC - USP). Doutora em Microbiologia Ambiental pela University of Essex e Natural History Museum. Professora Associada do Departamento de Ciências Biológicas, do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto (PROAMB – UFOP).

Sérgio Francisco de Aquino

Doutor em Engenharia Química pelo Imperial College London. Professor Titular do Departamento de Química e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto (PROAMB – UFOP).

Endereço⁽¹⁾: Laboratório de Química Tecnológica e Industrial - LQTA. Rua 11, s/n, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Universitário, Morro do Cruzeiro – Bauxita – Ouro Preto – Minas Gerais - CEP: 35400-000 - Brasil - Tel: +55 (31) 3559-1725 - e-mail: eliane.cristina@aluno.ufop.edu.br.

RESUMO

O uso indiscriminado de antibióticos pela população mundial contribui para o aumento da resistência bacteriana. A maioria dos antibióticos consumidos não são totalmente metabolizados pelo organismo, indo parar, na melhor das hipóteses, nas Estações de tratamento de Esgotos (ETEs). Nas ETEs, uma parte dos antibióticos fica retidos no lodo, propiciando a indução de bactérias resistentes a antibióticos (BRAs). Este trabalho investigou a ocorrência de BRAs em lodo anaeróbio de uma ETE da região metropolitana de Minas Gerais, bem como avaliou a eficácia do tratamento via alcalinização química na supressão desses agentes de resistência. Para a alcalinização química do lodo anaeróbio foi utilizado cal virgem nas proporções 25, 35 e 45%. As amostras caeadas foram separadas após os períodos de 2 e 72 horas, para caracterização físico-química (pH, temperatura, teor de umidade, série de sólidos) e microbiológicas (*Escherichia coli* e BRAs). A estimativa de BRAs foi executada pela determinação do número de bactérias heterotróficas totais (BHTs) na presença das classes de antibióticos β -lactâmicos (amoxicilina e cefalexina), Macrolídeos (eritromicina), Quinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina) e Sulfonamidas (sulfadiazina, sulfametoxazol, trimetoprima). Apesar da elevada remoção de *Escherichia coli* (superior a 99%), os resultados indicaram remoções inferiores, em porcentagem médias, de BHTs (55%) e BRAs (67%) nas amostras de lodos alcalinizados, em relação ao lodo anaeróbio centrifugado seco. O grupo de bactérias resistentes aos Sulfonamidas foi menos susceptível à caleação (46 – 51% de remoção, em média) em todas as proporções de cal testada, o que sugere uma adaptabilidade dessas cepas ao ambiente alcalino. A presença de BRAs, mesmo após o processo de alcalinização, indica que o lodo pode ser uma fonte de disseminação de bactérias resistentes no solo e no cultivo.

PALAVRAS-CHAVE: Biossólidos, Antimicrobianos, Agentes de resistência, Cal, Tratamento Químico.

INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de antibióticos pela população mundial tem sido objeto de preocupação ambiental, sobretudo nos últimos dois anos, em que a pandemia causada pelo SARS-CoV-2, resultou em um aumento expressivo no uso desses medicamentos a nível global (RIZVI; AHAMMAD, 2022). Os riscos ambientais crescentes associados ao consumo desses medicamentos são advindos, principalmente, do fato de que a maioria dos antibióticos não são totalmente metabolizados pelo organismo. Cerca de 40 a 90% das doses ingeridas são

excretadas no sistema de esgotamento sanitário, em sua forma inalterada ou como metabólitos biologicamente ativos, indo parar, na melhor das hipóteses, nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs). (VALCÁRCEL *et al.*, 2011).

Os processos de tratamento de esgoto usualmente empregados nas ETEs não são eficazes para a remoção de BRAs do efluente (KARKMAN *et al.*, 2016). Nesse sentido, o lodo de esgoto tem sido considerado um meio propício para o desenvolvimento rápido de cepas resistentes (AL-JASSIM *et al.*, 2015). Grande parte dos antibióticos (cerca de 70%) ficam retidos na fase sólida do processo de tratamento de efluentes, aumentando a probabilidade de acúmulo de BRAs no lodo (VALCÁRCEL *et al.*, 2011). Dessa forma, o lodo, quando encaminhado para uso agrícola sem um tratamento correto, por conter bactérias resistentes, pode disseminar agentes de resistência a antibióticos no solo e durante o cultivo agrícola, potencializando riscos diretos e indiretos à saúde humana (KARKMAN *et al.*, 2016).

A alcalinização é uma das técnicas indicadas na Resolução Conama 498/2020 (BRASIL, 2020) para a higienização do lodo visando o seu reuso agrícola. A alcalinização consiste na adição de substâncias básicas, como a cal, à massa do lodo, em dose suficiente para elevar o pH a valor igual ou superior a 12. A elevação do pH a 12 propicia presença de íons hidroxila em elevada concentração ($\sim 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1} = 170 \text{ mg.L}^{-1}$), criando um ambiente inóspito para a maioria dos microrganismos (USEPA, 2000). Além de aumentar o pH, a reação da cal virgem com a umidade presente no lodo é exotérmica, o que eleva a temperatura do meio, intensificando a desinfecção (ROSSMANN *et al.*, 2014). Ademais, a alcalinização apresenta menor custo operacional se comparado a outros métodos de tratamento, por isso, figura como um dos principais métodos empregados na desinfecção de lodos de esgoto sanitário no Brasil (COSTA *et al.*, 2018).

No Brasil, são raros os estudos (PAIVA *et al.*, 2015; TERRA *et al.*, 2015) sobre a ocorrência de BRAs e outros agentes de resistência em lodo de esgoto. Da mesma forma, são escassos os estudos (MACHADO *et al.*, 2020) sobre a eficiência dos processos de tratamento de lodo utilizados nas ETEs na redução e/ou supressão das concentrações de BRAs. Além disso, em que pese a comprovada eficiência da alcalinização na desinfecção do lodo, pouco se sabe sobre a influência dessa técnica de tratamento na supressão de BRAs eventualmente presentes.

OBJETIVOS

O presente trabalho objetivou investigar a ocorrência BRAs em lodo anaeróbico oriundo de uma ETE da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, bem como avaliar a eficácia do tratamento via alcalinização química na supressão desses agentes de resistência.

MATERIAIS E MÉTODOS

O lodo anaeróbico investigado neste trabalho foi coletado em uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) situada na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, no início do mês de agosto de 2022. A ETE opera por processo de tratamento biológico de lodos ativados convencional, sendo o lodo ativado de excesso tratado, após seu adensamento por processo de flotação, conjuntamente com o lodo primário em digestor anaeróbico. As amostras de lodo anaeróbico utilizadas neste trabalho foram coletadas após a etapa de desaguamento, ou seja, na saída da centrífuga.

As amostras de lodo coletadas foram mantidas à temperatura ambiente durante o transporte para o laboratório (tempo máximo de 3h) e colocadas para secar em local arejado, longe da luz direta do sol, até que o teor de umidade (TU) atingisse $\sim 60\%$. Alcançado o TU desejado, o lodo foi então submetido à desinfecção por alcalinização química, utilizando-se cal virgem (92% CaO, 7% MgO) como substância alcalinizante, nas proporções 25, 35 e 45%. As porcentagens de cal foram escolhidas segundo recomendação de Andreoli *et al.* (2007), que reportam os melhores resultados de desinfecção em percentuais de 15-45% de cal em relação ao peso seco do lodo. A alcalinização do lodo foi realizada seguindo as recomendações da Resolução CONAMA 498/20 (BRASIL, 2020) e as amostras foram separadas para caracterização após os períodos de 2 a 72 horas, de forma a determinar a eficácia da caleação na supressão de BRAs do lodo, e produção de biossólido Classe A e Classe B.

Os ensaios de caracterização compreenderam análises físico-químicas (pH, temperatura, teor de umidade, série de sólidos) e microbiológicos (*E. coli* e BRAs), conforme detalhado na Tabela 1.

Tabela 1: Ensaios de caracterização físico-químicos e microbiológicos.

Parâmetros	Métodos	Referências
pH	9045C – <i>soil and waste pH</i>	USEPA (1995)
ST, SV, SF, TU	1684 – <i>Total, fixed, and volatile solids in water, solids, and biosolids</i>	USEPA (2001)
<i>Escherichia coli</i>	Colilert® 18 medium	EA-UK (2003)
BRAs	9215 – <i>Heterotrophic Plate Count</i>	APHA (2017)

pH: potencial hidrogeniônico; ST: sólidos totais; SF: sólidos fixos totais; SV: sólidos voláteis totais; TU: teor de umidade.

A estimativa de bactérias resistentes a antibióticos foi realizada pela determinação do número de bactérias heterotróficas totais na presença das seguintes classes de antibióticos: β -lactâmicos (amoxicilina, cefalexina), Macrolídeos (eritromicina), Quinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina) e Sulfonamidas (sulfadiazina, sulfametoxazol, trimetoprima). Paralelamente utilizou-se também a estimativa de bactérias heterotróficas totais, sem adição de antibióticos.

Inicialmente 100 mg de cada amostra de lodo (antes e após o processo de caleação) foi ressuspensa em 900 μ L de solução salina (NaCl 0,9%) e submetida a fatores de diluição entre 10^{-3} e 10^{-8} , a depender da amostra. Um volume de 100 μ L de cada diluição foi adicionado em placas de Petri com meio de cultura Plate Count Agar (PCA/Kasvi) e distribuídas com auxílio de pérolas de vidro estéreis. As amostras, em triplicata, foram incubadas a 27 °C, por 2 dias e então à 37 °C, por 1 dia. Após o período de incubação foram realizadas contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) na melhor condição de contagem (isto é, contagem entre 30 e 300 colônias). Os valores obtidos foram corrigidos pelos respectivos fatores de diluição e expressos em UFC.g⁻¹ amostra). Os resultados foram expressos na sua forma relativa, considerando a relação entre UFC.g⁻¹ de bactérias heterotróficas totais resistentes a antibióticos pela UFC.g⁻¹ de bactéria heterotróficas totais.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da caracterização físico-química do lodo e os efeitos da caleação sobre esses parâmetros.

Tabela 2: Resultados de caracterização físico-química do lodo anaeróbico bruto e alcalinizado.

Tratamento	pH	T (°C)	TU (%)	ST (%)	SV (%)	SV/ST
AN-IN	8,26 $\pm$ 0,01	18,0 $\pm$ 0,1	76,5 $\pm$ 0,1	23,7 $\pm$ 1,0	15,4 $\pm$ 0,1	0,65 $\pm$ 0,02
AN-IN-0%	8,81 $\pm$ 0,01	19,5 $\pm$ 0,1	63,2 $\pm$ 0,1	38,2 $\pm$ 1,7	24,3 $\pm$ 1,1	0,64 $\pm$ 0,04
AN-AQ-25% B	13,04 $\pm$ 0,01	21,1 $\pm$ 0,1	56,0 $\pm$ 0,1	43,4 $\pm$ 0,6	17,7 $\pm$ 0,4	0,41 $\pm$ 0,01
AN-AQ-35% B	13,06 $\pm$ 0,01	21,5 $\pm$ 0,1	50,3 $\pm$ 0,1	47,6 $\pm$ 0,9	19,1 $\pm$ 1,4	0,40 $\pm$ 0,02
AN-AQ-45% B	13,12 $\pm$ 0,01	21,3 $\pm$ 0,1	47,4 $\pm$ 0,1	50,3 $\pm$ 1,4	14,4 $\pm$ 1,8	0,29 $\pm$ 0,03
AN-AQ-25% A	12,65 $\pm$ 0,01	20,8 $\pm$ 0,1	57,8 $\pm$ 0,1	45,5 $\pm$ 0,6	19,7 $\pm$ 0,9	0,43 $\pm$ 0,02
AN-AQ-35% A	12,68 $\pm$ 0,01	20,6 $\pm$ 0,1	52,2 $\pm$ 0,1	48,6 $\pm$ 0,2	15,3 $\pm$ 1,8	0,31 $\pm$ 0,04
AN-AQ-45% A	12,69 $\pm$ 0,01	20,5 $\pm$ 0,1	48,8 $\pm$ 0,1	51,7 $\pm$ 0,1	11,5 $\pm$ 0,7	0,22 $\pm$ 0,01

AN-IN: lodo anaeróbico in natura (coletado após centrifugação na Estação de Tratamento de Esgoto); AN-IN-0%: lodo anaeróbico centrifugado seco no laboratório em local arejado, longe da luz direta do sol, por aproximadamente 60 dias, até que o teor de umidade (TU) da atingisse 70%; AQ-25% B, AQ-35% B e AQ-45% B: lodo anaeróbico higienizado com 25%, 35% e 45% de cal virgem, respectivamente, por um período de 2 horas (Classificação Biossólido Classe B, segundo Conama 498/20); AQ-25% A, AQ-35% A e AQ-45% A: lodo anaeróbico higienizado com 25%, 35% e 45% de cal virgem, respectivamente, durante 72 horas (Classificação Biossólido Classe A, segundo Conama 498/20).

O lodo apresentava teor de umidade (TU) médio de 77% no momento da coleta e de 63% após um período aproximado de 60 dias de secagem à sombra. O tratamento químico do lodo centrifugado seco (AN-IN-0%) propiciou uma redução média no TU de 6% no tratamento com 25%, 12% no tratamento com 35% e 15% no tratamento com 45% de adição de cal. Os resultados de caracterização físico-química indicam a estabilização do lodo anaeróbico bruto e tratado (SV/ST < 0,7).

Para todos os tratamentos realizados, a elevação do pH (> 12 após 72 h) atende aos requisitos impostos pela resolução CONAMA 498/20 para obtenção de biossólido Classe A. O aumento do teor de sólidos totais nas amostras caleadas em relação ao lodo bruto era esperado devido a adição de mais massa sólida (CaO) ao lodo. As amostras tratadas com 45% de cal apresentaram ST acima de 50% após o período de 72 horas de mistura da cal. Nestes casos, a resolução (CONAMA 498/20) recomenda a secagem do lodo por exposição ao ar após o tratamento.

O lodo anaeróbico bruto apresentou concentrações de *E. Coli* na ordem de 2×10^3 NMP.g⁻¹ST para o lodo *in natura* e 7×10^2 NMP.g⁻¹ST para o lodo seco em laboratório (IN-0%). A concentração de *E. coli* em lodo de esgoto primário e digerido pode variar entre 10^{-2} e 10^5 NMP NMP.g⁻¹ST segundo dados reportados por Andreoli *et al.* (2007). O lodo tratado, por sua vez, apresentou concentrações de *E. coli* na faixa de 10^{-1} NMP.g⁻¹ST e $1,2 \times 10^{-1}$ NMP.g⁻¹ST, após 2 horas de mistura, e entre $1,9$ e $2,3 \times 10^{-1}$ NMP.g⁻¹ST, após 72 horas de mistura.

Houve redução significativa (superior a 99%) da concentração de *E. coli* no lodo anaeróbico, para todos os tratamentos analisados. Após 2 horas o lodo alcalinizado apresentava uma concentração de *E. coli* média de 10^0 NMP.g⁻¹ST, abaixo do limite máximo de 10^3 NMP.g⁻¹ST imposto pela resolução CONAMA 498/20 para obtenção de biossólido Classe A, para todas as proporções de CaO analisadas.

As concentrações de BHTs e de BRAs, nas amostras de lodo anaeróbico bruto e alcalinizado estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Abundância absoluta de BHT e BRA no lodo anaeróbico bruto e alcalinizado.

Tratamento	Valor médio Log ₁₀ UFC.g ⁻¹ ± desvio padrão				
	BHT	BRAS			
		β-Lactâmicos	Macrolídeos	Quinolonas	Sulfonamidas
AN-IN	9,00 ± 0,05	7,85 ± 0,49	8,55 ± 0,03	5,56 ± 0,27	7,07 ± 0,18
AN-IN-0%	10,54 ± 0,10	8,23 ± 0,34	9,39 ± 0,14	5,59 ± 0,17	8,13 ± 0,35
AN-AQ-25% B	6,32 ± 0,00	4,20 ± 0,21	3,92 ± 0,05	2,00 ± 0,00	4,36 ± 0,01
AN-AQ-35% B	4,51 ± 0,08	3,26 ± 0,00	3,62 ± 0,05	0,00 ± 0,00	4,40 ± 0,10
AN-AQ-45% B	4,78 ± 0,11	3,19 ± 0,08	3,84 ± 0,15	2,00 ± 0,00	4,09 ± 0,19
AN-AQ-25% A	4,48 ± 0,16	0,00 ± 0,00	2,98 ± 0,05	0,00 ± 0,00	3,89 ± 0,21
AN-AQ-35% A	4,15 ± 0,10	2,75 ± 0,64	2,95 ± 0,09	0,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
AN-AQ-45% A	4,17 ± 1,65	2,60 ± 0,85	2,74 ± 0,37	0,00 ± 0,00	3,97 ± 0,15

As concentrações de BHTs variaram de 9 a 10 log₁₀UFC.g⁻¹ no lodo anaeróbico fresco e seco, valores maiores que os reportados por Machado *et al.* (2020) e Munir *et al.* (2011), que verificaram concentrações de BHTs na ordem de 5 a 7 log₁₀UFC.g⁻¹, em amostras de lodo coletado após digestão anaeróbia e centrifugação, e por volta de 8 log₁₀UFC.g⁻¹ no lodo anaeróbico, respectivamente. Já os valores de BHT nos lodos alcalinizados variaram de 4 a 6 log₁₀UFC.g⁻¹, indicando uma remoção média de bactérias na ordem de 55%. Valores maiores de BHT, da ordem de 6 a 8 log₁₀UFC.g⁻¹, em lodo alcalinizado foram reportados por Munir *et al.* (2011).

No lodo fresco e seco foram observadas concentrações de BRAs na ordem de 5 a 11 log₁₀UFC.g⁻¹ para as classes de antibióticos estudadas. Esses valores encontram-se dentro da faixa de concentração para BRAs (6 a 11 log₁₀UFC.g⁻¹), reportadas por Machado *et al.* (2020) e Brooks *et al.* (2007). Após a caleação as concentrações médias de BRAs variaram 0 a 4 log₁₀UFC.g⁻¹, indicando que houve redução das bactérias resistentes durante a desinfecção do lodo por caleação. A maior redução média (88%) foi observada no grupo de bactérias resistentes a Quinolonas e a menor (49%), no grupo de bactérias resistentes à Sulfonamidas.

A presença de BRAs, mesmo após o processo de alcalinização indica que o lodo pode ser fonte de disseminação de bactérias resistentes, caso seja disperso no ambiente ou utilizado na agricultura, como condicionante de solo, sem um tratamento adicional.

A Figura 1 apresenta o comportamento das BRAs, em porcentagens relativas a BHT, comparando diferentes condições de tratamento com o lodo anaeróbico centrifugado seco (AN-IN-0%).

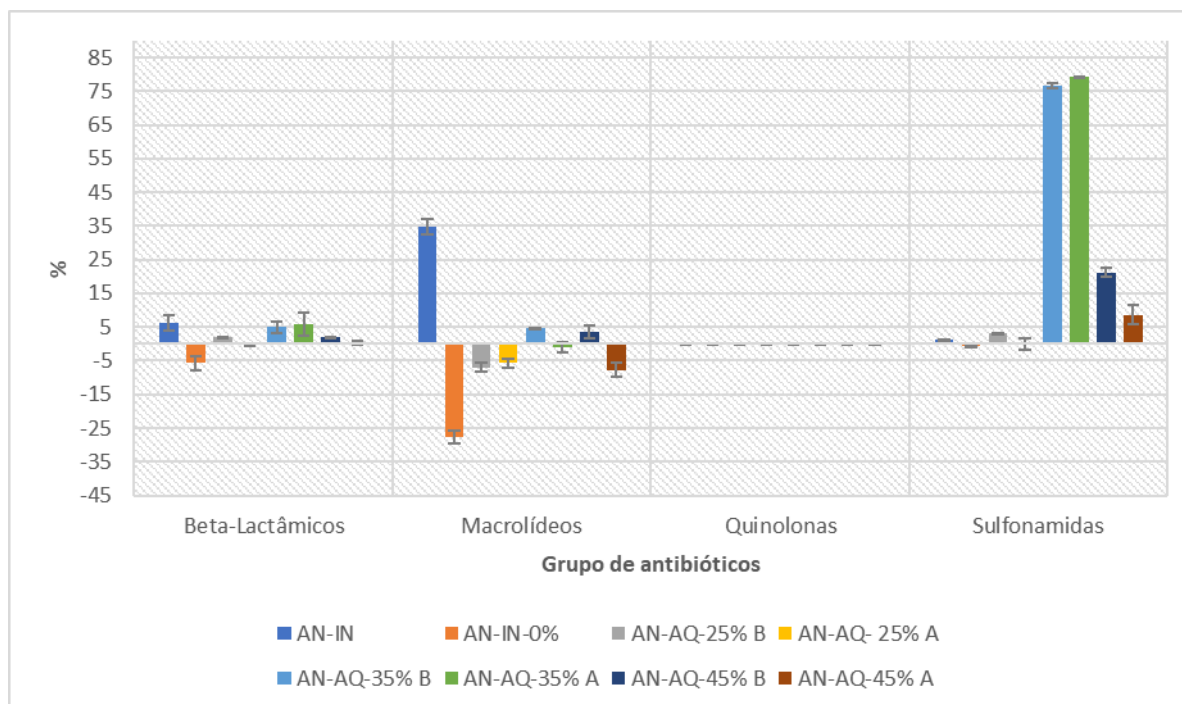


Figura 1. Comportamento de bactérias resistentes aos diferentes grupos de antibióticos, relativas ao total de bactérias heterotróficas cultiváveis, comparando amostras de lodo anaeróbico seco (IN-0%) submetidas às diferentes condições de caleação.

No lodo fresco, considerando os valores relativos, observou-se que cerca de 6% das bactérias isoladas foram resistentes aos β -lactâmicos, 35% aos Macrolídeos e 1% aos Sulfonamidas. As amostras de lodo tratadas com 25% de CaO apresentaram um decaimento nas concentrações de bactérias resistentes a todas as classes de antibióticos analisadas, após o período de 72 horas, quando comparadas às amostras AN-IN-0%. O tratamento alcalino foi mais eficaz (64 a 100% de remoção, em média) na redução das cepas resistentes à Quinolonas, em todas as proporções de cal testadas (25%, 35% e 45% de CaO) e nos tempos de contato usados no estudo (2 h e 72 h). Por outro lado, o grupo de bactérias resistentes à Sulfonamidas foi menos susceptível à caleação, em todas as proporções de cal testadas (25%, 35% e 45% de CaO) e nos tempos de contato usados no estudo (2 h e 72 h). Houve um incremento na porcentagem de bactérias resistentes aos antibióticos da classe dos Sulfonamidas, principalmente nas amostras tratadas com 35% e 45% de CaO. Algumas hipóteses poderiam explicar o aumento de bactérias resistentes à Sulfonamidas durante o tempo de contato na caleação. Uma delas se refere ao enriquecimento de BRAs tolerantes ou adaptadas a elevados valores de pH, que pode estar relacionada à capacidade de esporulação durante a alcalinização e que proliferaram nas condições de cultivo. Estudos complementares estão sendo realizados para corroborar/refutar tais hipóteses e explicar esse fenômeno.

CONCLUSÕES

Todos os tratamentos realizados nas amostras do lodo anaeróbico da ETE da região metropolitana de Minas Gerais promoveram elevação do pH e sua manutenção acima de 12 por um período de 72h, atendendo aos requisitos da resolução CONAMA 498/20 para obtenção de biossólido Classe A. Além disso, a relação SV/ST, menor que 0,7, indica a estabilização do lodo anaeróbico bruto e tratado. Como esperado foram observadas reduções significativas na concentração de *Escherichia coli* para todos os tratamentos analisados, em relação ao lodo anaeróbico fresco. As concentrações médias de *E. coli* permitem o enquadramento do lodo como biossólido Classe A, segundo Resolução Conama 498/20, para todas as proporções de CaO analisadas. No entanto, apesar da redução na abundância de bactérias heterotróficas totais foi constatada a presença de bactérias resistentes aos quatro grupos de antibióticos analisados, especialmente daquelas resistentes à Sulfonamidas, o que sugere a necessidade do emprego de um tratamento adicional de desinfecção desse lodo para redução da concentração de BRAs.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL-JASSIM, N.; ANSARI, M. I.; HARB, M.; HONG, P. Removal of bacterial contaminants and antibiotic resistance genes by conventional wastewater treatment processes in Saudi Arabia: Is the treated wastewater safe to reuse for agricultural irrigation? *Water Research*, v. 73, p. 277–290, 2015.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 23rd. Washington: APHA, 2017. 1546 p.
3. ANDREOLI, C. V.; SPERLING, M. VON; FERNANDES, F. *Biological wastewater treatment series: sludge treatment and disposal*. Londres: 2007. v. 6.
4. BRASIL. Resolução nº 498, de 19 de agosto de 2020: Define critérios e procedimentos para produção e aplicação de biossólido em solos, e dá outras providências. Brasília: *Diário Oficial da União*, 2020.
5. BROOKS, J. P.; MAXWELL, S. L.; RENSING, C.; GERBA, C. P.; PEPPER, I. L. Occurrence of antibiotic-resistant bacteria and endotoxin associated with the land application of biosolids. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 53, n. 5, p. 616–622, 2007.
6. COSTA, T. G. A.; CUNHA, L. M.; IWATA, B. de L.; COELHO, J. V.; SANTOS, J. G. P. dos; CLEMENTINO, G. E. dos S. Tratamento alcalino de lodo de esgoto no preparo do biossólido como alternativa de adubo orgânico. *Multi-Science Journal*, v. 1, n. 13, p. 374–377, 2018.
7. ENVIRONMENT AGENCY. *The microbiology of sewage sludge: Part 3 – Methods for the isolation and enumeration of Escherichia coli, including verocytotoxigenic Escherichia coli*. Bristol: EA-UK, 2003. 44 p.
8. KARKMAN, A.; JOHNSON, T. A.; LYRA, C.; STEDTFELD, R. D.; TAMMINEN, M.; TIEDJE, J. M.; VIRTÁ, M. High-throughput quantification of antibiotic resistance genes from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 92, n. 3, p. 1–7, 2016.
9. MACHADO, E. C.; LEAL, C. D.; COELHO, B. L.; CHERNICHARO, C. A. de L.; ARAÚJO, J. C. de. Detecção e quantificação de bactérias resistentes aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol em estações de tratamento de esgoto doméstico. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 25, n. 6, p. 847–857, 2020.
10. MUNIR, M.; WONG, K.; XAGORARAKI, I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Research*, v. 45, n. 2, p. 681–693, 2011.
11. PAIVA, M. C.; ÁVILA, M. P.; REIS, M. P.; COSTA, P. S.; NARDI, R. M. D.; NASCIMENTO, A. M. A. The microbiota and abundance of the class 1 integron-integrase gene in tropical sewage treatment plant influent and activated sludge. *Plos One*, p. 1–12, 2015.
12. RIZVI, S. G.; AHAMMAD, S. Z. COVID-19 and antimicrobial resistance: A cross-study. *Science of the Total Environment*, v. 807, p. 1–12, 2022.
13. ROSSMANN, M.; et al. Redução da viabilidade de ovos de helmintos em lodo de esgoto doméstico calcado. *Revista Engenharia na Agricultura*, v. 22, nas. 1, p. 43–49, 2014.
14. TERRA, M. R.; SILVA, L. B. da; IMBIRANI, J. R.; SILVEIRA, B. A.; FURLANETO, M. C.; FURLANETO-MAIA, L. Resíduos de lodo de esgoto: avaliação de risco potencial ambiental e para a saúde. V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 2015. Anais. Londrina, PR, 2015.
15. USEPA. *Biosolids Technology Fact Sheet: Alkaline Stabilization of Biosolids*. Washington: U.S. EPA, 2000.
16. USEPA. *Method 9045C: soil and waste pH*. Washington DC, EPA, 1995.
17. USEPA. *Method 1684: total, fixed, and volatile solids in water, solids and biosolids*. EPA-821-R-01-015. Washington DC, EPA, 2001.
18. VALCÁRCEL, Y.; ALONSO, S. G.; RODRÍGUEZ-GIL, J. L.; GIL, A.; CATALÁ, M. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere*, v. 84, n. 10, p. 1336–1348, 2011.
19. ZAGUI, G. S. *Avaliação da multirresistência a antibióticos e produção de ESBL e carbapenemases em bacilos gram-negativos de efluentes hospitalar e urbano*. Ribeirão Preto, 2019. Dissertação de mestrado. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2019.