



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE  
AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA PROGRAMA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL**

**BIOTECNOLOGIA APLICADA PARA O APROVEITAMENTO  
SUSTENTÁVEL DE RESÍDUOS NA EQUIDEOCULTURA**

**ANA GABRIELA CARVALHO RODRIGUES DO NASCIMENTO  
TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF  
Dezembro/2023**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE  
AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA PROGRAMA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL**

**BIOTECNOLOGIA APLICADA PARA O APROVEITAMENTO SUSTENTÁVEL DE  
RESÍDUOS NA EQUIDEOCULTURA**

**ANA GABRIELA CARVALHO RODRIGUES DO NASCIMENTO**

**ORIENTADOR: ANTONIO RAPHAEL TEXEIRA NETO**

**COORIENTADOR: JADER GALBA BUSATO**

**TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MEDICINA PREVENTIVA**

**LINHA DE PESQUISA: PREVENÇÃO E CONTROLE DE DOENÇAS ANIMAIS E**

**GESTÃO DOS RISCOS PARA A SAÚDE PÚBLICA**

**PUBLICAÇÃO: 12/2023**

**BRASÍLIA /DF  
Dezembro/2023**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE  
AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA PROGRAMA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL**

**BIOTECNOLOGIA APLICADA PARA O APROVEITAMENTO SUSTENTÁVEL DE  
RESÍDUOS NA EQUIDEOCULTURA**

**ANA GABRIELA CARVALHO RODRIGUES DO NASCIMENTO**

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À  
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
SAÚDE ANIMAL.**

**APROVADA POR:**

---

**ANTONIO RAPHAEL TEXEIRA NETO Prof. Dr.**  
**(Universidade de Brasília - UnB; Orientador)**

---

**JOSÉ RENATO JUNQUEIRA BORGES Prof. Dr.**  
**(Universidade de Brasília- UnB; Examinador Interno)**

---

**ALESSANDRA MONTEIRO DE PAULA Profa. Dra.**  
**(Universidade de Brasília- UnB; Examinador Externo)**

---

**IVERALDO DOS SANTOS DUTRA Prof. Dr.**  
**(UNESP, Araçatuba; Examinador Externo)**

**BRASÍLIA, 06 DE DEZEMBRO DE 2023**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

Nascimento, A.G.C.R. Biotecnologia aplicada ao aproveitamento sustentável de resíduos na equinocultura: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2023, 83 p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, que foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

|        |   |
|--------|---|
| NN244b | Nascimento, Ana Gabriela Carvalho Rodrigues<br>BIOTECNOLOGIA APLICADA AO APROVEITAMENTO SUSTENTÁVEL DE<br>RESÍDUOS NA EQUINOCULTURA / Ana Gabriela Carvalho<br>Rodrigues Nascimento; orientador Antonio Raphael Teixeira<br>Neto ; co-orientador Jader Galba Busato. -- Brasília, 2023.<br>83 p.<br><br>Tese (Doutorado em Saúde Animal) -- Universidade de<br>Brasília, 2023.<br><br>1. Sustentabilidade . 2. Compostagem. 3. Equinos . 4.<br>Resíduos. 5. Microorganismos. I. Teixeira Neto , Antonio<br>Raphael, orient. II. Busato, Jader Galba, co-orient. III.<br>Titulo. |
|--------|---|

*Dedico esta conquista ao meu pai Jarbas, que hoje já não se encontra nesse plano, mas estará sempre em meu coração, pelo seu exemplo de hombridade, desprendimento e honestidade... Essa vitória é para você meu pai.*

## AGRADECIMENTO

Desejo manifestar os meus agradecimentos a todos aqueles que diretamente ou indiretamente de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e finalização dessa tese.

Agradeço primeiramente a Deus que me deu força, sabedoria e energia para que esse trabalho fosse concluído, sem ele nada seria possível.

Ao Prof. Dr. Antônio Raphael Texeira Neto por ter acreditado em mim e nas minhas capacidades e ter permitido que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa. E ainda pelo comportamento simples, correto e científico que sempre tratou nossas reuniões, e por sempre acreditar nas mais simples ideias que surgiam referente ao tema desse trabalho, ajudando a elevar a essência dessa pesquisa e nunca permitindo que o abatimento se instalasse.

Agradeço de igual forma ao Prof. Dr. Jarder Galba Busato, pelo seu acolhimento e por sempre acreditar no trabalho realizado, pelos seus conselhos, sugestões e ensinamentos, um agradecimento em especial pelas leituras atentas, crítica construtiva, bem como pela sua presença constante em cada etapa, foram determinantes para o resultado alcançado. Desejo poder contribuir à ciência e ao mundo acadêmico com a mesma ética que me transmitiu.

Ao Prf. Dra. Alessandra Monteiro de Paula pela sua especial delicadeza, valorização do trabalho, paciência e atenção no trato, agradeço o apoio, rigor científico e amizade. Todos os seus conselhos e sugestões foram fundamentais para o desenvolvimento e concretização desse trabalho.

Ao Prf. Dr. Gino Chaves Rocha pelo seu incentivo, generosidade, disponibilidade e direcionamentos importantes passados em diversos momentos.

Ao Prof. Dra. Simone Perecmanis, obrigada pela sua dedicação e paciência, o que fez por muitas vezes deixando de lado seus momentos de descanso para me orientar. E principalmente obrigada por ter acreditado nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Renato Junqueira Borges, pelas suas orientações e contribuições sempre pontuais em diversas etapas desenvolvidas durante este trabalho.

Aos funcionários do Hospital Veterinário de Grandes Animais da UnB, sem eles nenhuma etapa seria possível desse trabalho, em especial aos funcionários Raimundo Nonato Gomes da Costa e Mauricio Gomes da Costa, por serem tão solícitos, pela disposição e por terem me ajudado em diversos momentos cruciais para implementação e desenvolvimento desse projeto, obrigada pelo esforço e dedicação.

Aos meus amigos do Laboratório de Química do Solo da UnB, Laboratório de Microbiologia do Solo e Laboratório de Análises de Alimentos cuja os esforços e auxílio

tonaram possível a concretização desse trabalho, obrigada pelo compartilhamento de importantes conhecimentos e em especial a Samia Gomes da Silva, pelas palavras de incentivo e pela sua constante presença ao meu lado.

Aos colegas dos Laboratório de Doenças Parasitárias e Parasitologia e ao Laboratório de Microbiologia Veterinária da UnB pelo esforço e prontidão aliados aos ensinamentos que me proporcionaram, nesse período que trabalhamos juntos foram primordiais para qualidade desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal pela oportunidade de cursar o doutorado.

Ao Instituto Federal do Tocantins por viabilizarem esse projeto e por incentivar a minha capacitação.

Por fim o meu agradecimento mais do que especial aos meus pais Jarbas (*in memoriam*) e Gertrudes, as minhas filhas Laura e Ana Julia, ao meu esposo Guilherme e aos meus irmãos Jarbas Junior e Rodrigo, à vocês minha família sou eternamente grata, sem vocês nada poderia ser realizado, não pouparam esforços para me ajudar a fazer esse trabalho, gratidão pelo profundo apoio, por estarem sempre ao meu lado e pelos estímulos nos momentos difíceis, vocês são meu esteio, minha fortaleza e minha maior fonte inspiradora.

## RESUMO

A população de cavalos do Brasil ocupa o terceiro lugar no mundo, com 5,9 milhões de animais, incluindo animais de trabalho, competição, terapia, entretenimento e de alto valor genético. O ciclo de produção de cavalos é relativamente longo e prevalecem sistemas de criação intensivos. Portanto, um dos principais desafios deste segmento surge dos problemas decorrentes da estabulação dos cavalos, como causar distúrbios comportamentais, distúrbios fisiológicos e demandas ambientais, levando à redução do bem-estar destes animais. Locais como estábulos, regimentos de cavalaria e hípicas, muitas vezes localizados em grandes centros urbanos, geram grandes quantidades de resíduos sólidos, principalmente provenientes de camas utilizadas para promover melhores condições de bem-estar aos animais. Esse resíduo quando descartados de forma inadequada no meio ambiente, acarreta problemas, como contaminação de lençóis freáticos e corpos receptores, atração de pragas urbanas e degradação da estética ambiental. A produção sustentável desses animais impulsiona a busca por novas tecnologias e a realização de pesquisas nesse universo, sendo um dos maiores desafios dos pesquisadores o destino deste tipo de resíduos que se tornou uma questão relacionada tanto com aspectos ecológicos, como sanitários e econômicos. Existem diversas formas de tratamento desses resíduos antes de serem lançados no meio ambiente, como processos físicos, químicos e bioquímicos. A compostagem é uma das principais formas de tratamento bioquímico, que visa converter a matéria orgânica que não pode ser incorporada ao solo, em fertilizante biológico aproveitável. Vários esforços de pesquisa têm sido feitos em relação a estudos aplicados para compostagem de resíduos em diversos setores industriais, porém pouca pesquisa tem sido feita para investigar a viabilidade no descarte de dejetos de cavalos. A compostagem de camas saturada de equinos é um processo demorado, pode gerar um composto de baixa qualidade devido a natureza do material recalcitrante que constitui a cama, o que torna necessário vários ciclos para a sua decomposição. O presente trabalho objetivou isolar e identificar fungos presentes em pilhas de compostagem de camas saturadas de equinos, confeccionadas com maravalha ou palha de arroz, visando selecionar isolados fúngicos com maior potencial para atividade celulolítica. Em uma segunda etapa da pesquisa reintroduzi-los no processo de compostagem, buscando reduzir o tempo de degradação da matéria orgânica bem como o custo de produção do composto e assim tornar a técnica mais atrativa para os geradores desse tipo de resíduos. Os isolados com maior atividade celulolítica foram identificados como pertencentes à espécie *Aspergillus fumigatus*. Observou-se que nas pilhas de composto com uso de maravalha houve redução nos valores de carbono orgânico total e na relação C/N de maneira mais acentuada no tratamento inoculado com o *A. fumigatus* em relação ao tratamento controle, assim como reduções nos teores de celulose e hemicelulose. Os índices de nitrogênio total, carbono orgânico total, a relação C/N e a degradação da ligninocelulose, não distinguiram significativamente nas pilhas com o uso de palha de arroz como substrato. A inoculação de *A. fumigatus* nas camas saturadas de maravalha, melhorou as características finais do composto, sendo uma alternativa para aperfeiçoar a eficiência do processo de compostagem desse tipo de resíduo. Contudo, não se observou o mesmo efeito para camas saturadas com uso de palha de arroz, onde a inoculação seriada de *A. fumigatus* não foi eficaz para otimizar o processo de compostagem.

**Palavras chaves:** Cavalos, microrganismo, sustentabilidade, composto



## ABSTRACT

Brazil's horse population ranks third in the world, with 5.9 million animals, including working, competition, therapy, entertainment, and high technical genetic value animals. The production cycle of horses is relatively long and intensive breeding systems prevail. Therefore, one of the main challenges of this segment arises from the problems arising from the stalling of horses, such as causing behavioral disorders, physiological disorders, and environmental demands, leading to reduced in the welfare of these animals. Places such as stables, cavalry, and horse riding regiments, often located in large urban centers, generate large amounts of waste, mainly from bedding used to promote better animal welfare conditions. This waste, when disposed of improperly in the environment, causes problems, such as contamination of groundwater and receiving bodies, attraction of urban pests, and degradation of environmental aesthetics. The sustainable production of these animals drives the search for new technologies and the carrying out of research in this universe, and one of the biggest challenges for researchers is the destination of this type of waste, which has become an issue related to ecological, sanitary, and economic aspects. There are several ways of treating this waste before it is released into the environment, such as physical, chemical, and biochemical processes. Composting is one of the main forms of biochemical treatment, which aims to convert organic matter that cannot be incorporated into the soil into usable biological fertilizer. Several research efforts have been made about applied studies for waste composting in various industrial sectors, but little research has been done to investigate the feasibility of horse waste disposal. Composting saturated equine litter is a time-consuming process and can generate low-quality compost due to the nature of the recalcitrant material that makes up the litter, requiring several cycles for its decomposition. The objective of this study was to isolate and identify fungi present in compost piles of saturated equine litter made with wood shavings or rice straw, to select fungal isolates with greater potential for cellulolytic activity. Isolate them and reintroduce them in the composting process, seeking to optimize the process of degradation of organic matter to have a reduction in the time and cost of compost production and thus increase the acceptance of the technique. The isolates with the highest cellulolytic activity were identified as belonging to the species *Aspergillus fumigatus*. It was observed that in the compost piles with the use of wood shavings, there was a reduction in the total organic carbon values and the C/N ratio in a more accentuated way in the inoculated treatment with *A. fumigatus* compared to the control treatment, as well as reductions in the levels of cellulose and hemicellulose. The total nitrogen and total organic carbon indexes, the C/N ratio, and the lignocellulose degradation did not differ significantly in the piles with the use of rice straw as substrate. The inoculation of *A. fumigatus* in the saturated beds of wood shavings, improved the final characteristics of the compost, being an alternative to improve the efficiency of the composting process of this type of waste. However, the same effect was not observed for saturated litter with the use of rice straw, where serial inoculation of *A. fumigatus* was not effective in optimizing the composting process.

**Keywords:** Horses, microorganisms, sustainability, compost

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

**Table 1-** Average total cellulase (FPase) enzyme activities during 21 days of cultivation expressed in UI/mL<sup>-1</sup> for the selected colonies. -----30

**Table 2-** Results of the identification process of the selected colonies by molecular analysis using the barcoding primers ITS and amplicons Kit Big Dye™ Terminator v3.1 using Cycle Sequencing Kit from Applied Biosystems. -----31

### CAPÍTULO 3

**Tabela 1** - Result of the most probable number per gram (MPN g<sup>-1</sup>) of Fecal and Thermotolerant Coliforms, *Salmonella* sp in 10g of compost on day 0 of the composting process and after 90 days (beginning and end), in compost from saturated horse bedding with wood shaving substrate, compared to the standards established by MAPA ..... 52

**Tabela 2:** Occurrence of viable Strongyloidea helminth eggs in 4g of wet matter and viable Strongyloidea helminth larvae per gram of total solids on different days of the composting process (0, 5, 33, 90), in compost from saturated horse bedding with wood shaving substrate, compared to the standards established by MAPA..... 53

### CAPÍTULO 4

**Tabela 1** - Resultado do número mais provável por grama (NMPg<sup>-1</sup>) de Coliformes Fecais, *Salmonella* sp em 10g de composto no dia 0 do processo de compostagem e após 90 dias (início e fim), compostagem de cama saturada de equinos com substrato de palha de arroz, em comparação aos padrões estabelecidos pelo MAPA \_\_\_\_\_ 73

**Tabela 2** - Ocorrência de ovos viáveis de helmintos tipo Strongyloidea em 4g de matéria úmida e de larvas viáveis de helmintos tipo Strongyloidea por grama de sólidos totais em diferentes dias do processo de compostagem (0,7,30,90), como uso de substrato de palha de arroz. \_\_\_ 74

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1** - Esquema das fases do processo de compostagem ..... 16

### CAPÍTULO 2

**Figure 1**-Average of enzymatic activities of the total cellulase (FPase) in 14 days and 21 days of culture expressed in UI mL. .... 30

**Figure 2**- Macromorphological characteristics of the selected fungi. .... 301

### CAPÍTULO 3

**Figure 1** - Average temperature of the measuring points from the first day of the composting process of horse bedding with wood shavings substrate. .... 46

**Figure 2** - Average pH value in water (a),  $\text{CaCl}_2$   $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  (b), and (c) Average Electrical Conductivity (EC) in  $\text{mS.cm}^{-1}$  in the compost from the control and inoculated treatments obtained on different days of the composting process. .... 47

**Figure 3** - Average value of Total Nitrogen (a); Average value of Total Organic Carbon (b); Average value of C/N Ratio (c), of the compost in the control and inoculated treatment obtained on different days of the composting process. .... 49

**Figure 4** - Average variation expressed as a percentage of the degradation content of lignocellulose components during the composting process in the control and inoculated treatments obtained on different days. .... 50

### CAPÍTULO 4

**Figura 1** - Média de temperatura dos pontos de medição ao longo do processo de compostagem da cama de equinos com substrato de palha de arroz, do tratamento controle e tratamento com aplicação de inóculo. .... 65

**Figura 2** - Valor médio de pH em  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (a), pH em água (b) e (c) Médias de Condutividade Elétrica (C.E) em  $\text{mS/cm}^{-1}$  no composto do tratamento controle e inoculado obtidos em diferentes dias do processo de compostagem. .... 67

**Figura 3**- Valor médio de Nitrogênio Total (a); Valor médio Carbono Orgânico Total (b); Valor médio Relação C/N (c), do composto no tratamento controle e inoculado obtidos em diferentes dias do processo de compostagem. .... 69

**Figura 4** - Variação média expressa em porcentagem do teor de degradação de componentes da lignocelulose durante o processo de compostagem nos tratamentos controle e inoculados obtidos em diferentes dias. .... 71

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

|         |  |
|---------|--|
| MA      | Maravalha  |
| PA      | Palha de Arroz                                     |
| BDA     | Potato-Dextrose-Carbon                             |
| DNS     | Ácido dinitricisalicílico                          |
| ITS     | Interna Transcribed Spacer                         |
| PCR     | Polymerase Chain Reaction                          |
| CAZymes | Carbohydrate-active-enzymes                        |
| E.C     | Electrical Conductivity                            |
| NT      | Total Nitrogen                                     |
| TOC     | Total Organic Carbon                               |
| C/N     | Carbon and Nitrogen ratio                          |
| NDF     | Neutral Detergent Fiber                            |
| ADF     | Acid Detergent Fiber                               |
| RV      | Rapport-Vassiliadis                                |
| SS      | Agar Samonella-Shigella                            |
| LPMOs   | Polysacharides Monooxygenases                      |
| MPN     | Most Probable Number                               |
| MAPA    | Ministerio da Agricultura Pecuária e Abastecimento |
| CONAMA  | Conselho Nacional do Meio Ambiente                 |
| ARGs    | Genes de Resistências a Antibióticos               |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| CAPÍTULO I   | 14 |
| 1 – INTORDUÇÃO   | 14 |
| 2. OBJETIVO GERAL  | 19 |
| 3. OBJETIVO ESPECÍFICO   | 20 |
| REFERÊNCIAS  | 20 |
| CAPÍTULO II  | 24 |
| Abstract   | 24 |
| 1. Introduction  | 24 |
| 2. Materials and Methods   | 26 |
| 2.1 - Place of the Experiment, Assembly of the Piles and Obtaining the Samples | 26 |
| 2.2 - Isolation of Fungi with Cellulolytic Ability                             | 27 |
| 2.3 - Total Cellulase Activity   | 28 |
| 2.4- Morphological Characterization and Molecular Identification of Isolates   | 28 |
| 3. Results   | 29 |
| 3.1 - Isolation of Fungi with Cellulolytic Ability                             | 29 |
| 3.2 - Total Cellulase Activity   | 29 |
| 3.3 - Morphological Characterization and Molecular Identification of Isolates  | 30 |
| 4. Discussion  | 32 |
| 5. Conclusions   | 34 |
| References   | 34 |
| CAPITULO III   | 39 |
| Abstract   | 39 |
| 1. Introduction  | 40 |
| 2. Material and methods  | 41 |
| 2.1 - Composting process   | 41 |
| 2.2 - Microbial inoculant  | 43 |
| 2.3 - Chemical Analysis  | 43 |
| 2.4 - Microbiological and parasitological analyses                             | 44 |
| 2.5 Statistical analysis   | 44 |
| 3. Results and discussion  | 45 |
| 3.1 - Temperature changes  | 45 |
| 3.2 - Effects of inoculation on physicochemical properties                     | 46 |
| 3.2.1 pH and Electrical Conductivity (EC)                                      | 46 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.2 Total Organic Carbon (TOC), Total Nitrogen (NT), C/N Ratio               | 47        |
| 3.2.3 Lignocellulose constituents  | 49        |
| 3.3 - Pathogenic microorganisms  | 51        |
| 3.3.1 Bacteriological  | 51        |
| 3.3.2 Parasitology   | 52        |
| 4. Conclusion  | 53        |
| References   | 54        |
| <b>CAPITULO IV</b>   | <b>59</b> |
| Resumo   | 59        |
| 1. Introdução  | 59        |
| 2. Material e métodos  | 61        |
| 2.1 - Processo de compostagem e amostragem                                     | 61        |
| 2.2 - Preparação de microrganismo e inóculo                                    | 61        |
| 2.3 - Determinação das propriedades físico-químicas                            | 62        |
| 2.4 - Determinação de microrganismos patogênicos                               | 63        |
| 2.5 - Análise estática   | 64        |
| 3. Resultados e discussão  | 64        |
| 3.1 Efeito da aplicação do inóculo nos índices de temperatura (análise física) | 64        |
| 3.2 Alterações no perfil de pH e condutividade elétrica (C.E)                  | 66        |
| 3.3 Alterações nos parâmetros de COT, NT e relação C/N                         | 67        |
| 3.4 Análises da biodegradação do material lignocelulolítico                    | 69        |
| 3.5 Eficiência da eliminação de agentes bacteriológicos patogênicos            | 71        |
| 3.6 Eficiência da eliminação de agentes parasitários                           | 73        |
| Referências  | 75        |

## CAPÍTULO I

### **Biotecnologia aplicada ao aproveitamento sustentável de resíduos na equinocultura**

#### **1. INTRODUÇÃO**

O rebanho brasileiro de equinos é o terceiro maior do mundo com 5,9 milhões de exemplares somando os animais de lida, competições, terapias, lazer e de alto valor zootécnico. A atividade movimenta anualmente R\$ 16,15 bilhões gerando cerca de 610 mil empregos diretos e 2.430 mil empregos indiretos sendo responsável por 3 milhões de postos de trabalho, sua produção é relevante no cenário nacional, destacando-se tanto na importação como na exportação de animais vivos (MAPA, 2016).

Porém o ciclo produtivo dos equinos é relativamente longo e o sistema intensivo de criação é predominante. Desse modo, passa a existir um dos principais desafios nesse segmento alusivos aos problemas decorrentes da estabulação, como por exemplo ocasionar distúrbios comportamentais, desordem fisiológicas tendo como consequência a redução do bem-estar dos equinos e demandas ambientais oriundo dos resíduos produzidos (MOLENTO, 2005).

Locais como hípcas, hipódromos e regimentos de cavalaria, comumente localizados em grandes centros urbanos produzem uma grande quantidade de resíduos oriundos principalmente das camas utilizadas para promover melhores condições de bem-estar aos animais estabulados, as camas usadas nas baias devem ser macias e secas promovendo um bom acolchoamento, não produzir poeira e abrasividade, ter boas propriedade absorventes para se evitar mau cheiro pelo acúmulo de urina e fezes, ser livre de produtos químicos, tóxicos ou de substâncias que são prejudiciais aos cavalos ou as pessoas, o material escolhido deve ser de fácil limpeza, sendo que a retirada dos excrementos deve ser diária conservando-a limpa e seca e permitindo assim um controle de vetores e microrganismos infectantes (BIRD 2006).

Existe uma quantidade enorme de matéria prima que pode ser utilizada como cama em estábulos. A escolha pelo tipo de cama baseia-se principalmente na disponibilidade regional e nos custos. O tipo de matéria prima aceitável para fazer a cama é de qualquer material com base sólida que proporcione absorção, como: palha de trigo e arroz, aveia, centeio, feno, recortes de pastagens secas, aparas de madeira ou aglomerados (“maravalha”), musgo de turfa, serragem, papel, papelão desfiado e areia (CINTRA, 2010).

Lagomarsimo (2019) discorreu que para se manter os equinos estabulados são utilizados em média 5 a 10 kg de cama por dia, produzindo de 2 a 3 cm<sup>3</sup> de resíduo cavalo /dia sendo que os criatórios podem não apresentar recursos e nem locais físicos adequados para o tratamento

correto desses resíduos dispendo-os inadequadamente no meio ambiente. Usualmente as esterqueiras são acondicionadas a céu aberto e diretamente no solo, podendo proporcionar dessa maneira a proliferação de vetores, agentes patógenos, reservatórios de bactérias e genes que podem ser resistentes a antibióticos bem como a contaminação de solos e dos recursos hídricos, atração de pragas urbanas e degradação do ambiente (CINTRA, 2011).

O destino desse tipo de resíduo tem se constituído num problema que envolve tanto aspectos ecológicos, sanitários e econômicos (RESENDE, 2005). A produção sustentável desses animais motiva a busca por novas tecnologias e execução de pesquisas dentro desse universo, sendo que um dos grandes desafios imposto aos pesquisadores é o destino de toneladas de camas saturadas de diferentes substratos utilizados.

O uso destes resíduos orgânicos, adequadamente tratados, na produção vegetal pode ser uma solução viável, haja visto que a intensificação agrícola tem como consequência uma queda na qualidade do solo e um declínio dos conteúdos orgânicos. Simultaneamente, o aumento da demanda de fertilizantes sintéticos afeta negativamente o meio ambiente e a biota do solo, com isso existe atualmente um grande interesse no desenvolvimento de estratégias e abordagens para um sistema agrícola sustentável como os demais sistemas de produção (DINESH et al., 2010).

Fliessbach et al. (2007) descreveram que a utilização dos fertilizantes orgânicos de maneira correta pode ser uma alternativa adequada na redução do uso de fertilizantes sintéticos por melhorarem as propriedades físico-química e biológica do ecossistema de um modo geral. Assim os resíduos produzidos pela atividade agropecuária, como por exemplo a equinocultura, quando tratados com técnicas confiáveis de reciclagem podem contribuir de maneira significativa para a redução dos danos causados ao meio ambiente e a recuperação de solos. São várias as formas de tratamento disponíveis desses dejetos antes de serem despejados no meio ambiente, tais como processos físicos, químicos e bioquímicos (FUJII et al., 2014).

A compostagem é uma das principais formas de tratamento bioquímico, na qual se objetiva a conversão do material orgânico que não se encontra em condições de ser incorporado ao solo, em fertilizante biológico admissível para ser utilizado (HARUTA et al., 2005). É um dos processos mais antigos de reciclagem de resíduos grosseiros e uma forma viável, por ser de baixo custo de produção e manutenção (FUECHTER; OENNING; OTTO, 2020).

Ao longo da história, a compostagem tem sido aprimorada por meio de estudos que analisam os fatores físicos, químicos e biológicos que influenciam a decomposição da matéria orgânica. Algumas das inovações na compostagem são o uso de microrganismos específicos para acelerar o processo, a aplicação de tecnologias para controlar a temperatura e a umidade,



a eliminação de patógenos e a fixação de nitrogênio com objetivo de otimizar o processo e melhorar a qualidade do produto (LIM, 2022).

A biodegradação da matéria orgânica é influenciada por vários fatores, que podem ser classificados em três categorias: (i) fatores relacionados à composição e proporção da matéria orgânica, o pH, o tamanho das partículas e porosidade; (ii) fatores relacionados ao manejo do processo, como a concentração de oxigênio, a temperatura e umidade; (iii) pelo equilíbrio de nutrientes sendo que o indicador principal é a relação em C/N (BERNAL et al., 2009; ASSANDRI et al., 2021; LIM, 2022)



Figura 1 - Esquema das fases do processo de compostagem. Adaptado de ASSANDRI et al., 2021

O processo de compostagem é influenciado pela atividade microbiana, que determina o padrão de temperatura, que é definido em três categorias diferentes; A primeira fase mesofílica (abaixo de 45°C) leva à produção de ácido orgânico; Na fase termofílica (acima de 45°C) caracterizada por uma intensa biodegradação aeróbica, acontece um consumo alto de O<sub>2</sub> e carbono, máxima decomposição dos compostos orgânicos e a maior decomposição de matéria orgânica complexa como celulose, hemicelulose e lignina, nessa fase há a eliminação de agentes patogênicos; No estágio final advém a maturação do composto quando a temperatura inicial retorna, ocorre a decomposição dos carboidratos remanescentes constituído de estruturas de difícil decomposição, tais como as ligninas, aumentando a concentração de substâncias húmicas como por exemplo ácidos fúlvicos, humina e ácidos húmicos (Figura 1) (BUSATO et al., 2019; ASSANDRI et al., 2021; LIM, 2022)

O pH é um fator que afeta diretamente a perda de nitrogênio, que podem ser altas quando o pH for superior a 7,5. Na fase inicial, devido à degradação da matéria orgânica simples para produzir ácidos orgânicos, o pH atinge um nível ácido; na fase de alta

temperatura, devido à degradação das proteínas, a produção de ácidos orgânicos diminui e a produção de amônia aumenta, resultando em aumento do valor do pH. Na fase final de maturação, devido à formação de húmus, o pH tende a ser neutro (AGNEU, 2003; ASSANDRI et al., 2021; GUZMÁN-ANAYA, 2021).

O processo de compostagem requer aeração adequada para manter o equilíbrio entre os fatores que afetam a degradação da matéria orgânica. A aeração regula a temperatura, remove o excesso de água e dióxido de carbono e fornece oxigênio aos microrganismos aeróbicos. Se o oxigênio se tornar escasso, os microrganismos anaeróbicos podem assumir o controle e atrasar o processo de compostagem. A hiperaeração, por outro lado, reduz a atividade metabólica e o rendimento do composto (ASSANDRI et al., 2021; GUZMÁN-ANAYA, 2021).

O teor de água é um fator essencial para a compostagem, pois influencia na atividade dos microrganismos que degradam a matéria orgânica. A umidade ideal depende do tipo de resíduo que está sendo compostado e deve ser ajustada para facilitar a circulação do ar e o controle da temperatura. Umidade excessiva (acima de 60%) pode causar compactação do material, reduzindo o fluxo de oxigênio e favorecendo a anaerobiose. Umidade insuficiente (abaixo de 30%) pode diminuir a velocidade da decomposição, pois diminui a atividade biológica (GUZMÁN-ANAYA, 2021).

A concentração de sais dissolvidos presentes na solução do substrato é medida pela condutividade elétrica (C.E). Quanto maior a salinidade, mais fácil é gerar corrente elétrica, ou seja, quanto maior o C.E, maior a concentração de sais. À medida que a compostagem continua, a mineralização da matéria orgânica aumenta, aumentando as concentrações de nutrientes e sal, levando ao aumento da CE ao longo do processo. Porém, em alguns momentos, a CE pode diminuir devido à lixiviação dos sais pela água (IGLESIAS, 2019; GUZMÁN-ANAYA, 2021).

No processo de compostagem o carbono é considerado como fonte de energia pelos microrganismos sendo metabolizado pela microflora e o nitrogênio é utilizado pelos microrganismos como síntese de proteínas. O carbono e o nitrogênio são elementos químicos para a manutenção da vida e atividade metabólica, a proporção entre eles na composição no material orgânico é chamada relação C/N (FUECHTER et al., 2020). Uma boa relação C/N para compostagem é geralmente considerada 30/1. 20 partes do carbono liberado como dióxido de carbono são usadas pelas bactérias como energia, e as outras 10 partes de carbono e nitrogênio são usadas para produzir protoplasma microbiano. Para que o protoplasma de um microrganismo combine 10 partes de carbono com uma de nitrogênio e assim crie seu próprio protoplasma, o microrganismo precisa de cerca de 20 átomos de carbono como fonte de energia.

O gerenciamento do teor de carbono em relação de ao nível de nitrogênio é um fator que irá influenciar na qualidade final do composto e no tempo necessário para estabilização (DAL BOSCO et al., 2017)

Entretanto a decomposição dos resíduos da cama saturadas pelos equinos pode ser um processo longo, necessitando vários ciclos para chegar ao um produto de qualidade. Esse fato pode estar relacionado a dois fatores, primeiramente ao esterco dos equinos por apresentarem maiores valores na relação C/N pelo alto teor de carbono orgânico e possuírem uma quantidade limitada de microrganismos totais (SOUZA, 2017) e pela biomassa de lignocelulose presente nos substratos comumente utilizados na confecção da cama. Tal biomassa é uma estrutura recalcitrante e possui uma rede complexa, presente na parede celular das plantas, de difícil degradação, dificultando o processo de compostagem (WILHELM et al., 2019; JIANG et al., 2020).

A atividade microbiana possui um papel significativo na degradação de substâncias lignocelulósicas que compõem a maior parte da matéria orgânica total (ZHANG et al., 2018). Embora esses microrganismos possam ocorrer de forma natural durante o processo de compostagem e sejam responsáveis pela degradação do material recalcitrante do composto (DASTPAK et al., 2020), sua eficiência depende muito de diversos parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e ambientais (SILVIA et al., 2009, FRANKE-WHITTLE et al., 2014, GREFF et al., 2021), podendo resultar em baixa biodegradação reduzindo a eficiência do processo como um todo e/ou em tempo de conclusão prologando e, conseqüentemente uma qualidade indesejável do produto ( XU et al, 2019; GREFF et al., 2022).

Neste contexto o uso de tecnologia para acelerar e melhorar o processo de compostagem (*e.g.* inoculação de culturas pré-selecionadas), podem desempenhar um papel importante na eficiência do processo de degradação da compostagem de resíduos de camas saturadas oriundos da equinocultura. A inoculação desses microrganismos pode ser uma estratégia para potencializar a compostagem, melhorando o processo de degradação, as propriedades do produto maduro bem como o grau de humificação (FANG et al.,2019, CHI et al., 2020).

Diversos estudos destacam a importância da inoculação de microrganismos como fungos e bactérias para se otimizar a compostagem, bem como a importância de se analisar as relações entre as culturas microbianas e melhor tempo para a sua inoculação (EL-HADDAD et al., 2014; PATLE et al., 2014; KARNCHANAWONG & NISSAIKLA, 2014; WANG et al., 2014; ZHOU et al., 2015; GOU et al., 2017; LI et al., 2019; LUYIMA et al., 2019; XU et al., 2019; AWASHI et al., 2020; DUAN et al., 2020; GUO et al., 2020; WAN et al., 2020).

Dentre os microrganismos, os fungos da podridão branca, que são constituídos representativamente por microrganismos com capacidade de degradar material lignocelulolítico, possuem potencial tanto de otimização do processo de compostagem, diminuindo assim os ciclos de degradação, como na melhoria da qualidade final do composto (ANDLAR et al., 2018). Os fungos filamentosos, pertencentes ao grupo de fungos de podridão branca, classificados como ascomicetos, possuem a capacidade de degradar a parede celular por produzirem uma variedade de enzimas com atividades catalíticas do material lignocelulolíticos. Esses grupos de fungos conseguem assimilar polímeros recalcitrantes devida diversidade de sua evolução biológica que lhe confere alta capacidade de adaptação a diferentes ambientes e substratos. Além disso esses fungos possuem uma diversidade filogenética e fenotípica que refletem a variedade de enzimas produzidas (KRACHER et al., 2016, ANDLAR et al., 2018).

Entre os filos dos ascomicetos, os fungos do gênero *Aspergillus sp* são de grande interesse, pela sua aptidão de produzir enzimas com maior termoestabilidade, especificidade e maior velocidade de degradação se comparada a outros fungos (PAULUSSEN et al., 2017) e por possuírem grande capacidade de se desenvolver na presença de biomassas complexas, presente no processo de compostagem (GRUJIC et al., 2015).

Ao analisar o gênero *Aspergillus sp*, destaca-se o potencial fúngico da espécie *Aspergillus fumigatus* devido as suas características, como termotolerância e seu grande número de genes (263 GH), que codificam enzimas ativas do carboidrato (CAZymes) existentes em seu genoma (VALESCO, 2022). Apesar do *Aspergillus fumigatus* ser uma espécie patogênica para animais e humanos imunossuprimidos, este se consagra com um importante produtor de enzimas eficientes na degradação de material lignocelulolítico.

## **2. OBJETIVO GERAL**

O objetivo desta pesquisa foi o de avaliar e caracterizar a eficiência da compostagem de cama saturada de equinos com diferentes substratos (maravalha e palha de arroz), bem como verificar a influência da ação de microrganismo proveniente de inóculo nativo no tratamento de substratos que constituem a camas em estábulos de equinos, como uma alternativa sustentável e ambientalmente viável.

### 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I - Avaliar a dinâmica física e química que ocorre durante a compostagem como método de tratamento para dois tipos de resíduos comumente utilizados em camas saturadas de equinos.

II - Verificar os indicadores sanitários no final da compostagem, além de monitorar a redução de microrganismos patogênicos ao longo do processo por consequente manipulação adequada do composto;

III- Isolar e selecionar a população fúngica com capacidade de degradar materiais lignocelulósicos e com potencial de produção de enzimas celulase.

IV - Determinar a atividade enzimática das culturas fúngicas identificadas;

V – Monitorar as diferenças de temperatura atingida e avaliar as características químicas (pH, condutividade elétrica, nitrogênio totas carbono orgânico total relação C/N e degradação da celulose, hemicelulose e lignina) nos diferentes métodos de compostagem, com e sem inóculos contendo fungos isolados dos resíduos em estudo.

### REFERÊNCIAS

AGNEW, J. M., & LEONARD J.J., (2003) The Physical Properties of Compost, *Compost Science & Utilization*, 11:3, 238-264. doi.org. 10.1080/1065657X.2003.10702132.

ANDLAR, M., REZIĆ, T., MARĐETKO, N., KRACHER, D., LUDWIG, R., & ŠANTEK, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 768-778.

AWASTHI, M.K., DUAN, Y.M., AWASTHI, S.K., LIU, T., ZHANG, Z.Q. (2020). Effect of biochar and bacterial inoculum additions on cow dung composting. *Bioresour. Technol.* 297. doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122407.

BERNAL, M. P., ALBURQUERQUE, J. A., & MORAL, R. (2009). Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource technology*, 100(22), 5444-5453.

BUSATO, J. G.; DE PAULA, A. M.; FERRARI, L. H. (2019). Enriquecimento microbiano visando otimizar o processo de compostagem. In: sociedade brasileira ciência do solo (Ed.). *Tópicos em Ciência do Solo*. 1ºed Ed. Viçosa: SBCS, p. 522–576.

CHI, C. P., CHU, S., WANG, B., ZHANG, D., ZHI, Y., YANG, X., ZHOU, P. (2020). Dynamic bacterial assembly driven by *Streptomyces griseorubens* JSD-1 inoculants correspond to composting performance in swine manure and rice straw co-composting. *Bioresource Technology*, 313, 123692.

DAL BOSCO, T. C., GONÇALVES, F., DE ANDRADE, F. C., JUNIOR, I. T., DOS SANTOS SILVA, J., SBIZZARO, M. (2017). Contextualização teórica: compostagem e vermicompostagem. In: Compostagem e vermicompostagem de resíduos sólidos. São Paulo: Bulcher, p. 19–4.

DASTPAK, H., PASALARI, H., JAFARI, A. J., GHOLAMI, M., & FARZADKIA, M. (2020). Improvement of Co-Composting by a combined pretreatment Ozonation/Ultrasonic process in the stabilization of raw activated sludge. *Scientific Reports*, 10(1), 1-7.

DUAN, M.L., ZHANG, Y.H., ZHOU, B.B., QIN, Z.L., WU, J.H., WANG, Q.J., YIN, Y.A., (2020). Effects of *Bacillus subtilis* on carbon components and microbial functional metabolism during cow manure–straw composting. *Bioresour. Technol.* 303, 2020. doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122868.

EL-HADDAD, M.E., ZAYED, M.S., EL-SAYED, G.A.M., HASSANEIN, M.K., EL-SATAR, A.M.A. (2014). Evaluation of compost, vermicompost and their teas produced from rice straw as affected by the addition of different supplements. *Ann. Agric. Sci.* 59, 243–251. doi.org/10.1016/j.aoad.2014.11.013.

FANG, Y., JIA, X., CHEN, L., LIN, C., ZHANG, H., CHEN, J. (2019). Effect of thermotolerant bacterial inoculation on the microbial community during sludge composting. *Canadian journal of microbiology*, 65(10), 750-761.

FRANKE-WHITTLE, I. H., CONFALONIERI, A., INSAM, H., SCHLEGELMILCH, M., KÖRNER, I. (2014). Changes in the microbial communities during co-composting of digestates. *Waste Management*, 34(3), 632-641.

FUECHTER, J., OENNING, M. C., OTTO, T., (2020). COMPOSTAGEM. In: As Diversidades de Debates na Pesquisa em Matemática 3. p.50-56, Ed. Atena.

GOU, C.L., WANG, Y.Q., ZHANG, X.Q., LOU, Y.J., GAO, Y.H., (2017). Inoculation with a psychrotrophic–thermophilic complex microbial agent accelerates the onset and promotes maturity of dairy manure–rice straw composting under cold climate conditions. *Bioresour. Technol.* 243, 339–346, 2017. doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.097.

GUO, H.H., GU, J., WANG, X.J., NASIR, M., YU, J., LEI, L.S., WANG, Q.Z., (2020). Elucidating the effect of microbial inoculum and ferric chloride as additives on the removal of antibiotic resistance genes from chicken manure during aerobic composting. *Bioresour. Technol.* 309. doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122802

GUZMÁN ANAYA, J. M. (2021). Evaluación del compostaje de estiércol de caballo de un centro ecuestre en la región Lima. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima- Perú.

GREFF, B., SZIGETI, J., VARGA, Á., LAKATOS, E., SÁHÓ, A., & VARGA, L. (2021). Effect of bacterial inoculation on co-composting of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) waste and cattle manure. *3 Biotech*, 11(6), 306.

GREFF, B., SZIGETI, J., NAGY, Á., LAKATOS, E., VARGA, L. (2022). Influence of microbial inoculants on co-composting of lignocellulosic crop residues with farm animal manure: A review. *Journal of environmental management*, 302, 114088.

- GRUJIĆ, M., DOJNOV, B., POTOČNIK, I., DUDUK, B., & VUJČIĆ, Z. (2015). Spent mushroom compost as substrate for the production of industrially important hydrolytic enzymes by fungi *Trichoderma* spp. and *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 290-298.
- JIANG, Y., DONG, W., XIN, F., & JIANG, M. (2020). Designing synthetic microbial consortia for biofuel production. *Trends in biotechnology*, 38(8), 828-831.
- KARNCHANAWONG, S. & NISSAIKLA, S. (2014). Effects of microbial inoculation on composting of household organic waste using passive aeration bin. *Int J Recycl Org Waste Agricult.* 7 p.
- KRACHER, D.; LUDWIG, R., (2016). Cellobiose dehydrogenase: An essential enzyme for lignocellulose degradation in nature - A review. *J. Land. Manag. Food Enviro.* 2016, 67, 145–163.
- LAGOMARSINO, M. M. (2019). Avaliação e gerenciamento de resíduos do impacto ambiental proveniente de equinos estabulados. Tese de Mestrado (Pós-graduação e Agronegócio) Universidade Federal de Santa Maria - UFSM-RS, Rio Grande do Sul, 48p.
- LI, C.N., LI, H.Y., YAO, T., SU, M., RAN, F., HAN, B., LI, J.H., LAN, X.J., ZHANG, Y.C., YANG, X. M., GUN, S.B., (2019). Microbial inoculation influences bacterial community succession and physicochemical characteristics during pig manure composting with corn straw. *Bioresour. Technol.* 289, 2019.doi.org/10.1016/j. biortech.2019.121653.
- LIM, J. Y. (2022). Evaluation of biological processing of manure . Doctoral dissertation. Iowa State University).
- LUYIMA, D., LEE, J.H., KIM, S.H., SHINOGI, Y., BALIKUDEMBE, B., TUMUHAIRWE, J.B., LEE, K. S., OH, T.K. (2010). Efficiencies of a commercial microbial inoculant and poultry litter in composting dry maize stovers. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 64, 205–211. doi.org/10.5109/2339104
- IGLESIAS, E. (2019). Aspectos físicoquímicos, bioquímicos y microbiológicos del proceso de compostaje. Evaluación de la calidad – Unidad Temática 4: Métodos para la madurez del compost. (pp 3 - 4). Máster universitario en gestión, tratamiento y valorización de residuos orgánicos. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca. 30p.
- PATLE, A. V.; WILLIAMS, S. P. M. P.; GABHANE, J.; DHAR, H.; NAGARNAIK, P. B. (2014). Microbial assisted rapid composting of agriculture residues. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, Volume 5, Issue 5.
- PAULUSSEN, C.; HALLSWORTH, J.; ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; NIERMAN, W.; HAMILL, P.; BLAIN, D.; REDIERS, H.; LIEVENS, B. (2017). Ecology of Aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology*, v. 10, n. 2, p. 296-322.
- MOLENTO, C. F. M. (2005). Bem-estar e produção animal: aspectos econômicos - revisão. *Archives of Veterinary Science*, v.10,1-11.

SILVA, M. E., LEMOS, L. T., CUNHA-QUEDA, A. C., NUNES, O. C. (2009). Co-composting of poultry manure with low quantities of carbon-rich materials. *Waste Management & Research*, 27(2), 119-128.

VELASCO, J., SEPULCHRO, A. G. V., HIGASI, P. M., PELLEGRINI, V. O., CANNELLA, D., DE OLIVEIRA, L. C., SEGATO, F. (2022). Light Boosts the Activity of Novel LPMO from *Aspergillus fumigatus* Leading to Oxidative Cleavage of Cellulose and Hemicellulose. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*.

WAN, L.B., WANG, X.T., CONG, C., LI, J.B., XU, Y.P., LI, X.Y., HOU, F.Q., WU, Y.Y., WANG, L. L. (2020) Effect of inoculating microorganisms in chicken manure composting with maize straw. *Bioresour. Technol.* 301. doi.org/10.1016/j.biotech.2019.122730

WANG, L.; WANG, L.; WANG, D.; LI, J. (2014). Isolation and Application of Thermophilic and Psychrophilic Microorganisms in the Composting Process. *Waste Biomass Valor* 5: p. 433–440.

WILHELM, R. C., SINGH, R., ELTIS, L. D., & MOHN, W. W. (2019). Bacterial contributions to delignification and lignocellulose degradation in forest soils with metagenomic and quantitative stable isotope probing. *The ISME Journal*, 13(2), 413-429.

XU, J.Q., LU, Y.Y., SHAN, G.C., HE, X.S., HUANG, J.H., LI, Q.L., (2019). Inoculation with compost-born thermophilic complex microbial consortium induced organic matters degradation while reduced nitrogen loss during co-composting of dairy manure and sugarcane leaves. *Waste Biomass V.*10, 2467–2477, 2019. doi.org/10.1007/ s12649-018-0293-y

ZHANG, C., XU, Y., ZHAO, M., RONG, H., ZHANG, K. (2018). Influence of inoculating white-rot fungi on organic matter transformations and mobility of heavy metals in sewage sludge based composting. *Journal of hazardous materials*, 344, 163-168.

ZHOU, C; LIU, Z; HUANG, Z; DONG, M; YU, X; NING, P., (2015). A new strategy for co-composting dairy manure with rice straw: Addition of different inocula at three stages of composting. *Waste Management* 40 38–43.



## CAPÍTULO II

### Prospection of Cellulolytic Fungi from Composted Samples of Saturated Horse Litter

Nascimento, A.G.C.R.d.; Paula, A.M.d.; Busato, J.G.; Silva, S.G.d.; Texeira Neto, A.R

Agriculture 2023, 13, 1308. <https://doi.org/10.3390/agriculture13071308>

Recebido: 20/04/2023; Aceito: 02/06/2023; Publicado: 26/06/2023

#### Abstract

The treatment of saturated horse beds before their final destination is necessary to avoid the risk of animal and environmental contamination. For this purpose, the composting process has great functionality due to its low cost, effectiveness, and operational ease. However, because of the nature of the materials used, this process can be long, and it is necessary to improve it to optimize the composting cycles. This work aimed to isolate and identify fungi present in compost piles of saturated equine bedding made with shavings and rice straw, selecting those with the greatest potential for cellulase production. Using specific cellulolytic media containing shavings or rice straw, seven strains were isolated. The total cellulase enzymatic activity of the isolates from the beds made with shavings was lower than that obtained from rice straw beds. Four strains showed high enzymatic potential for use in the shavings substrate (MA6.2.1, MA6.2.2, MA7.9, and MA7.10) and three had potential for use in the rice straw substrate (PA7.5, PA7.7, and PA7.10). The isolate PA7.5 reached  $0.376 \text{ IU mL}^{-1}$ , which was the best index among all the isolates. These isolates were identified as belonging to the *Aspergillus fumigatus* species.

**Keywords:** horse waste, composting process, microorganisms, beneficial, enzymes; cellulase; *Aspergillus sp.*

#### 1. Introduction

The bioconversion of organic waste in processes such as composting enables the safe recycling of such materials and produces a stabilized product that is enriched with humic substances and plant nutrients [1]. Because of its simplified operability, low cost, and effectiveness, composting has been the main strategy for treating organic waste. Through this practice, the circular bioeconomy is fostered [2] and the negative environmental impacts from the inadequate disposal of these materials are minimized. Composting is also a tool recognized by the United Nations in Goal 12 (sustainable consumption and production), which was proposed in the 2030 Agenda [3] that was formulated to encourage countries to adopt actions for sustainable development. Horses that are bred and treated in feedlots require bedding formed from organic materials such as shavings and rice straw, as it is used to absorb moisture from the animal excreta, ensuring greater sanitation in the environment [4]. On average,

between 8 to 9 kg of integral materials are required per day to make the beds, resulting in up to 25 kg of bedding saturated with feces and urine [5]. Annually, each adult horse can generate up to 10 tons of saturated bedding [6], which is usually directly applied in pastures without treatment and can potentially produce unpleasant odors, increase the emission of greenhouse gases, contaminate the soil, and increase the incidence of pathogenic microorganisms in the area [6,7]. The disposal of these and antimicrobial resistance genes (ARGs) [8]. The search for economically viable, attractive, and sustainable alternatives is still a major challenge for production systems. Composting, despite being an old methodology of waste recycling, is effective for the correct reuse of organic waste, as it is capable of producing biological and fully acceptable fertilizers [9,10].

Some chemical characteristics of the materials used in the composition of horse litter (e.g., a high C/N ratio) may negatively affect composting. In this sense, adjustments to the nitrogen availability, temperature, aeration, and humidity of the compost piles can improve the process. This can possibly reduce the time needed for the completion of the process and ensure that the product (compost) is stable and free of pathogens [6]. The enrichment of the compost piles with microorganisms with specific degradation abilities can also favor the composting process since some of these microorganisms produce a high number of enzymes responsible for the degradation of biomolecules, such as cellulose. Thus, the microbial inoculation of these in compost piles can be a promising biotechnological tool for improving composting [11–13]. The microorganisms present in the composting process are responsible for the generation of heat, the conversion of nutrients, and the depolymerization of the compounds through the production of specific enzymes. The fungi naturally present in the composting degrade most of the organic polymers. However, if there is not enough diversity, if the environmental parameters are not ideal, and depending on the characteristics of the raw material, they may require multiple degradation cycles, which can result in an increased composting time and a lower efficiency [14].

The isolation of degrading fungi during the thermophilic phase of composting (temperatures above 45 °C) potentiates the selection of strains capable of surviving the high temperatures of the process when inoculated in the compost piles. Besides the ability to tolerate high temperatures, the isolated fungi produce considerable amounts of enzymes responsible for the degradation of cellulose and lignin, as well as compounds of a secondary metabolism that assist in the degradation of carbohydrates [15].

The inoculation of preselected thermophilic fungi, according to their capacity to produce ligninolytic enzymes, may be a strategy capable of influencing the degradation process in

composting lines, and thus reducing the period of time required for the stabilization of the material. In addition, it is possible that some of these microorganisms interfere with the cycle of some plant nutrients, such as nitrogen and phosphorus, increasing their availability in the final product obtained [1]. Research that applied mixed microbial inoculants belonging to the genera *Bacillus* and *Aspergillus*, which were applied in the initial phase of composting residues from milk mixed with sugarcane leaves, resulted in a more accelerated succession of the microbial population, increasing the participation of microorganisms that degrade lignocellulosic compounds [16]. Similarly, fungi belonging to the genus *Trichoderma*, which were isolated from cattle manure compost, as well as those belonging to *Trichoderma* and *Aspergillus*, which were obtained from a mixture of chicken manure with corn straw, were applied in the composting process of animal and vegetable waste and consistently accelerated the stabilization of the material, making the necessary cycle shorter and enabling the safe use of the compost [17,18]. Fungi belonging to the genera *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride*) and *Aspergillus* (*A. niger*) isolated from the composting of municipal solid waste also showed high enzymatic activities associated with the cellulose cycle [13]. Wu et al., (2019) [19], observed that the application of microbial inoculants potentiated the transformation of lignocellulose into straw manure compounds during the thermophilic phase of the process.

However, the range of waste used in composting is large and the microbial groups employed as process accelerators may present selectivity. In this sense, studies involving the isolation of fungi with the potential for degradation directly from equine litter were not found at the time of the preparation of the present study; thus, this topic deserves to be evaluated. With this in mind, the main objective of this study was to isolate fungi with a high potential for the production of enzymes associated with the cellulose cycle in compost samples (during the thermophilic phase) from the saturated bedding in equine stalls that are formed by shavings and rice straw, with the aim of reusing them in compost piles.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 - Place of the Experiment, Assembly of the Piles and Obtaining the Samples*

The composting process was performed at the Large Animal Veterinary Hospital of the Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Brasilia, Brasilia-DF (latitude  $-15^{\circ}74'93''$ , longitude  $-47^{\circ}87'64''$  an altitude of 1028 m). The residues used in the composting were obtained from saturated equine bedding formed with shavings and rice straw from the

treatment of two adult male crossbred horses subjected to a 12% crude protein concentrate diet (4 kg divided into two daily portions) and tifton (*Cynodon dactylon*) hay-based volume. The animals stayed in the stalls for 20 days, with the manure mixed with the bedding collected daily. At the end of this period, two compost piles were made with the bedding remaining in the stalls in a covered shed with a cement floor. The material was homogenized to make pyramidal piles with dimensions of  $1.80 \times 0.90 \times 2.10 \text{ m}^2$ , for shavings, and  $1.70 \times 0.98 \times 2.40 \text{ m}^2$ , for rice straw. The temperature was monitored daily using a digital thermometer with a 15 cm stem at 7 different points. The humidity was maintained between 40% and 50% throughout the process to ensure sufficient water content for the activities of the microorganisms. The piles were turned with the help of hand tools every three days over a period of 30 days. Samples from each pile were collected in the thermophilic phase, when the piles reached temperatures higher than  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , which occurred on day 5 for shavings and day 13 for rice straw. Single samples were obtained at 5 different points in the piles, and these were homogenized to form the final sample. Each composite sample was subdivided into 4 replicates and kept under refrigeration at the temperature of  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  until the isolation of fungi.

## 2.2 - Isolation of Fungi with Cellulolytic Ability

For the isolation of fungi, the samples were submitted to serial dilution (up to  $10^{-8}$ ), in 0.9% NaCl saline solution and inoculated in selective medium for cellulolytic fungi, according to Parkinson et al. [20], with adaptations. In substitution of the carboxymethyl cellulose, used as the carbon source, compounds based on shavings and rice straw were used. Each substrate was grounded in a Willy's type knife mill, macerated, passed through a 0.25 mm of mesh, and then decontaminated by autoclaving in 3 cycles at  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  and 1 atm. After sterilization, streptomycin antibiotic ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) was added to prevent bacterial growth. Subsequently, the plates were conditioned in germination chambers at  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  for 7 days. The amount of substrate (shavings or rice straw) equivalent to the same amount of carbon supplied to their media with the use of carboxymethyl cellulose was calculated from the determination of the total organic carbon content (TOC) present in the substrates, according to Tedesco [21]. The distinct fungal colonies observed from the morphological characteristics were isolated using the streak depletion technique [22] on potato-dextrose-agar (BDA) medium and incubated in a growth chamber at  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  for 3 days. The isolates were deposited in test tubes containing slanted BDA medium and filled with autoclaved water for preservation [23].

### *2.3 - Total Cellulase Activity*

To evaluate the cellulase enzyme activity, the isolates obtained were inoculated in liquid basal medium containing the original substrate of the beds as carbon sources (shavings or rice straw). In a laminar flow chamber, flasks containing 100 mL of sterile basal medium composed of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , at pH 5.5 [24], enriched with shavings or rice straw (100 g  $\text{L}^{-1}$  of substrate). Discs with 0.6 cm diameter containing mycelia and spores of the selected fungi were inoculated in the flasks in triplicate. The flasks were incubated in a shaker incubator with orbital motion for a period of 21 days at 45 °C under continuous 180 rpm agitation.

The total cellulase activity was evaluated after 14 and 21 days of incubation from the amount of reducing sugars formed by the enzymatic hydrolysis of cellulose, using the 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) method [25,26]. Strips of Whatman filter paper rolled into a spiral shape were placed in a test tube containing 1 mL of sodium citrate buffer solution (0.05 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 4.8) to which 0.5 mL of fungal enzyme broth was added. The solution was homogenized and kept in a water bath at 50 °C for 60 min. Afterward, the tubes were cooled at room temperature and 0.5 mL of DNS reagent was added. The tubes were shaken vigorously, and the resulting suspension was heated in a water bath at 100 °C for 15 min. The tubes were cooled at room temperature, with the subsequent addition of 5 mL of distilled water, and then the absorbance at 540 nm was read in a spectrophotometer. The enzyme activity of total cellulase was expressed by the enzyme activity unit (UI), defined as the amount of enzyme capable of releasing 1  $\mu\text{mol}$  of reducing sugar per minute, being  $\text{UI mL}^{-1}$  the concentration of enzyme activity of the sample.

### *2.4 - Morphological Characterization and Molecular Identification of Isolates*

The morphological characterization and molecular identification were performed for the isolates that stood out in the evaluation of the enzymatic activity of total cellulase. The molecular characterization was performed using 1  $\text{cm}^2$  blocks of potato agar placed on a sterile slide contained in a sterile Petri dish supported on a glass. Each isolate was inoculated with a needle, from colonies grown for 7 days on the 4 vertices of the upper side of the agar blocks, which were covered with sterile coverslip. The plates were sealed and incubated for up to 7 days, until evidence of sporulation was observed. The coverslips were carefully removed with tweezers and transferred to slides containing lactophenol cotton blue. The characteristics of the hyphae and the sporulation pattern were evaluated by light microscopy

using a 40X objective. Molecular identification was performed from fungal DNA extraction using the Fa- vorPrep™ Soil DNA Isolation Mini Kit, followed by amplification of genetic material by the polymerase chain reaction (PCR) technique, using the primers ITS1 and ITS4 (Internal transcribed spacer) [27]. Amplicons were sequenced from the capillary electrophoresis (Sanger) sequencing method using the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit from Applied Biosystems. The sequences were processed using the CLC SequenceViewer 8.0.0 Software and submitted for analysis in the nBLAST tool.

The data related to enzyme activity were submitted to analysis of variance and the means were compared by Tukey's test at a significance level of 1% probability when significant differences were found. The statistical analyses were performed by the software SISVAR 4.0 [28]. The morphological characterization and molecular identification of the isolates were discussed in a descriptive way.

### **3. Results**

#### *3.1 - Isolation of Fungi with Cellulolytic Ability*

Five fungal isolates were obtained with medium enriched with rice straw and six with medium enriched with wood shavings, with the potential to hydrolyze cellulosic material. Strains that did not show satisfactory growth were eliminated.

#### *3.2 - Total Cellulase Activity*

From 11 fungal colonies, seven that showed the best growth were chosen to evaluate the total cellulase activity, in order to verify the production capacity of cellulolytic enzymes.

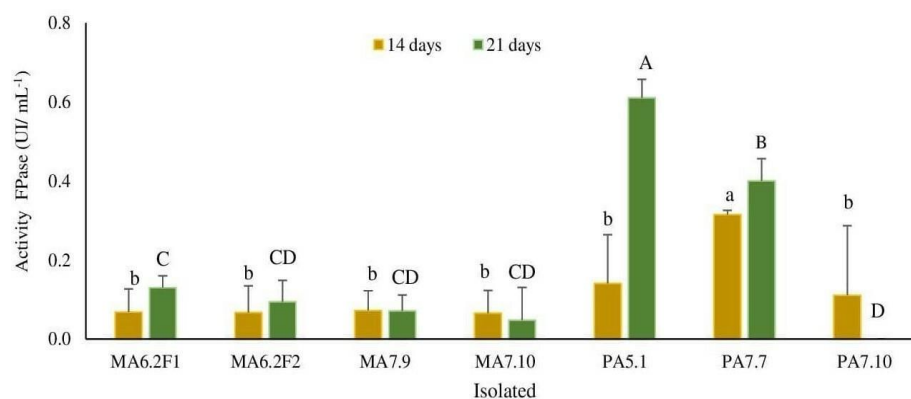
The selected isolates were analyzed for their ability to produce cellulase during the 21 days incubation period using filter paper as substrate. Considering the average of the total cellulolytic enzyme activities in the two culture times (14 and 21 days), all isolates showed cellulase production. The isolates PA 5.1 and PA 7.7, obtained from rice straw, had the highest values, 0.376 and 0.358 IU mL<sup>-1</sup>, respectively (Table 1). The other isolates MA 6.1 F1, MA6.1 F2, MA7.9, MA7.10 and PA7.10 showed the lowest activities, and they had similar activity.

**Table 1-** Average total cellulase (FPase) enzyme activities during 21 days of cultivation expressed in UI/mL-1 for the selected colonies.

| Treatments | Average Value (UI mL <sup>-1</sup> ) |
|------------|--------------------------------------|
| MA6.2 F1   | 0.099 ± 0.03 a1                      |
| MA6.2 F2   | 0.081 ± 0.05 a1                      |
| MA7.9      | 0.072 ± 0.04 a1                      |
| MA7.10     | 0.057 ± 0.08 a1                      |
| PA5.1      | 0.376 ± 0.05 b2                      |
| PA7.7      | 0.358 ± 0.06 b2                      |
| PA7.10     | 0.055 ± 0.01 a1                      |

PA: colonies of fungi with thermophilic growth in composted horsemeat bedding using rice straw substrate; MA: colonies of fungi with thermophilic growth in composted horsemeat bedding using shavings substrate. Averages followed by numbers and equal letters do not differ by the *t* test (Student) at 1% probability.

When evaluating the performance of the total cellulolytic enzyme activity of the fungal isolates over time, after 14 and 21 days, it was observed that 4 isolates (MA6.F1, MA6.F2, PA5.1 and PA7.7) had the highest enzyme activity after 21 days of culture growth in selective medium containing shavings and rice straw as carbon source (Figure 1). The isolate MA7.9 and MA 7.10 showed the lowest enzymatic activity among the evaluated isolates, without the influence of the evaluation time. The isolates MA7.10 and PA 7.10 showed low enzymatic activity after 14 days of culture, with no activity detected in the isolate PA7.10 after this period.

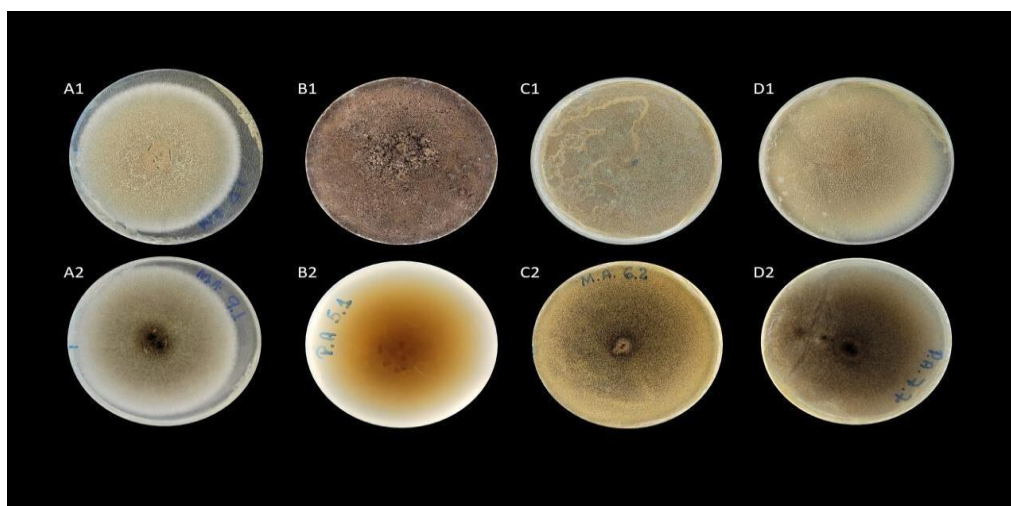


**Figure 1-** Average of enzymatic activities of the total cellulase (FPase) in 14 days and 21 days of Zulture expressed in UI mL. MA: fungi isolated from horse bed compost made with shavings; PA: fungi isolated from horse bed compost made with rice straw. Lower case letters compare the enzymatic activity of the isolates in the incubation period of 14 days. Capital letters compare the enzymatic activity of cellulase of the isolates in the incubation period of 21 days. Different letters indicate difference by *t* test (Student) at 1% probability.

### 3.3 - Morphological Characterization and Molecular Identification of Isolates

The fungal isolates that presented the best rates in relation to the total cellulolytic activity

were conducted for morphological characterization and molecular identification. The microbiological characteristics of the isolates showed morphological structures, such as: conidia, spores, conidiophores and vesicles with characteristics belonging to the genus *Aspergillus* sp. in the microculture test on slides, shown in Figure 2.



**Figure 2** - Macromorphological characteristics of the selected fungi. (A): MA7.9; (B): PA5.1; (C): MA6.F1; (D): PA7.7. The plates were photographed from the top (1) and bot- tom (2).

Converging with the microbiological results, the molecular identification of the seven selected isolates performed through the amplification of the ITS1 and ITS4 region, defined with fungal DNA barcodes, obtained amplicons for the genus *Aspergillus* sp, presenting the sequencing for the species identified as *Aspergillus fumigatus*. The seven isolates presented the same molecular identification (Table 2).

**Table 2-** Results of the identification process of the selected colonies by molecular analysis of the colonies using the barcoding primers ITS and amplicons Kit Big Dye™ Terminator v3.1 using Cycle Sequencing Kit from Applied Biosystems.

| Treatments            | Sequence Code | Molecular Identification     |
|-----------------------|---------------|------------------------------|
| PA <sup>-7</sup> 7    | ITS1 01       | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| PA <sup>-7</sup> 7    | ITS4 01       | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| PA <sup>-7</sup> 5    | ITS1 02       | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| PA <sup>-7</sup> 5    | ITS1 02       | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| MA <sup>-6</sup> 2 F2 | ITS1 03       | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| MA <sup>-6</sup> 2 F2 | ITS4 03       | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| MA <sup>-7</sup> 9.1  | ITS1 04       | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| MA <sup>-7</sup> 9.1  | ITS4 04       | <i>Aspergillus fumigatus</i> |



#### 4. Discussion

The isolation and selection of microorganisms with abilities to decompose complex organic compounds, such as the most recalcitrant plant polymers, are among the main studies that aim for the use of microorganisms to accelerate the stability and enrich the compounds [29,30]. In this sense, recent works that focused on the isolation of fungi with the ability to produce lignocellulolytic enzymes pointed out that some species such as *Phanerochaete chrysosporium* [29,31], *Gloeophyllum trabeum* [32], *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *Aspergillus niger* [11], *A. nidulans* [24] and *A. fumigatus* [33–35], have played an important part. Similarly, the use of microbial consortium has been successfully carried out in studies where each species was chosen based on specific ability has been successfully carried out [36].

The inoculation of fungal cultures isolated and selected from the compost heaps themselves in order to maximize the existing colonies can promote improvements in all the phases of the process and decrease adverse effects such as competition from exogenous microorganisms during the various phases of the composting process. The results presented in this research are preliminary; however, it is already evident that the studied compost itself can present lignocellulolytic microorganisms capable of degrading the recalcitrant material existing in the equine bedding, through the production of specific enzymes, capable of using a wide source of carbon such as: rice straw and shavings. Similar conclusions were presented by Li et al., 2019 [37] when analyzing the composting process of pig manure and corn straw with the application of bacterial inoculants selected from the pig manure compost. It was observed that these native inoculants prolonged the thermophilic phase of the process by two days and increased the germination rate.

Although the compound process of maturation presents several variables that will influence the quality of the product, the analysis of the effects of the enzymatic activities, produced by the organisms that degrade high complexity substrates, can be a way to boost decomposition cycles.

The total cell activity analyzed in this research shows that some isolates presented a satisfactory result in the first 14 days, the isolates PA5.1 and PA7.7 obtained the best index and showed a tendency to increase the values over time. These indices can be explained by the identification of the isolates as fungal strains *A. fumigatus*.

This species is recognized among the dominant species in the thermophilic phase of composting [33,34]. *A. fumigatus* are thermophilic, saprophytic and pathogenic fungi, being

one of the most abundant species in decomposing materials [38]. They can survive in environments whose temperatures range from 12 to 65 °C and pH ranges from 2.1 to 8.8.[39]. Isolates of *A. fumigatus* have also been described for their ability to produce gibberellins and other plant hormone regulators [40], in addition to their ability to produce bio surfactants, which assist the degradation of crude oil [41], reinforcing the versatility and potential of this fungal species in various bioprocesses.

The dominance of the genus *Aspergillus* spp. among the fungal isolates corroborates the results of other studies on the same topic [13,35]. In a study conducted to evaluate the diversity of fungi in organic compost of fruit waste, the species *A. fumigatus* was the most frequent [30], a result similar to what was observed in this study.

Investigation of secretomes of *A. fumigatus* grown on 3 carbon sources (glucose, avicel and rice straw) observed an increased production of lignocellulose in the medium containing rice straw, leading to the conclusion that specific enzyme mixtures are produced by the fungus under specific conditions [42].

The high cellulolytic activity of *A. fumigatus* isolates has also been recognized in research isolating fungi from organic composts of fruit waste [35] and municipal solid waste [13]. Isolates of *A. fumigatus*, inoculated separately or in consortium with other fungi or bacteria, have efficiently contributed to reduce composting time and humification of composted organic waste [30,43]. Promising results were observed in the joint inoculation of *A. fumigatus* Z5 and *Geobacillus stearothermophilus* B5 in rice straw waste, with prolongation of the thermophilic phase and greater degradation of cellulose and hemicellulose [30]. The use of a consortium of 3 *Aspergillus* species (*A. fumigatus*, *A. flavus* and *A. terreus*) reduced the compost stabilization time of rice straw waste and poultry manure [43].

The results found provided information of different responses of *A. fumigatus* strains regarding the enzymatic production indexes using the same carbon source and in different carbon sources. This fact can be explained by the fact that *A. fumigatus* are constituted by multiple sets of important genes for cellulolytic enzymes and their gene expression depends among other factors on the carbon source. This species employs important strategy and versatility to compound degradation, diversifying secretory enzyme production, suggesting differentiated patterns of enzyme expression activated by different carbon sources [44–46]. *A. fumigatus* can grow in the presence of complex biomasses as its transcriptional profile can be completely distinct when subjected to distinct carbon sources, varying the profile of genes encoding hydrolytic enzymes [47].

## 5. Conclusions

Biotechnological tools such as the isolation of microorganisms with specific degradation abilities of certain organic compounds are important to optimize waste recycling through composting. The isolation of fungi with potential cellulolytic ability, obtained from residues of saturated bed of horses, formed by shavings and rice straw, allowed the selection of seven isolates identified as belonging to the species *A. fumigatus*.

The degree of complexity of this fungus in producing enzymes amidst the available carbon source was identified. *A. fumigatus* showed excellent rates of total cell activity in environments containing rice straw as a carbon source. The isolates PA7.5 and PA7.7 presented the highest enzymatic activity of total cellulase, standing out for inoculation in composting processes of saturated bedding of horses, with potential for maintaining the thermophilic phase of the process, as well as the acceleration of maturation of the compounds.

From the analysis of the enzymatic activities, the present study demonstrated that *A. fumigatus* has cellulolytic capacity with carbon sources from the studied compost, indicating its potential for the degradation of lignocellulosic substrates present in saturated horse litter, which can be used as an inoculant to optimize the maturation process of this material. The reapplication of these microorganisms can be important to optimize the time required for the stabilization of residues through composting.

## References

- [1] BUSATO, J.G., PAULA, A. M., FERRARI, L. H. Enriquecimento microbiano visando otimizar o processo de compostagem. In: Severiano, E.C., Moraes, M.F., Paula, A.M. (Org.). Tópicos em Ciência do Solo. **2019**, Volume X. pp 522-576 1ªed. Viçosa: SBCS.
- [2] KHAM, F., ALI, Y. Moving towards a sustainable circular bio-economy in the agriculture sector of a developing country. *Ecological Economics*. **2022**. v. 196, 107402. doi:[10.1016/j.ecolecon.2022.107402](https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2022.107402)
- [3] ONU. Organização das Nações Unidas. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Disponível em <https://nacoesunidas.org/pos> . **2015**. Acesso 15/05/2022.
- [4] DE SOUZA, G. H. R.; RODRIGUES, G. A. O tratamento da cama de equinos através do processo de compostagem. *Revista Inter-face Tecnológica*, **2017**, v.14, n.2, p. 100-110. doi: [10.31510/infa.v14i2.193](https://doi.org/10.31510/infa.v14i2.193)
- [5] BÖSKE J.; WIRTH B.; GARLIPP F.; MUMME J.; VAN DEN W. H. Anaerobic digestion of horse dung mixed with different bedding materials in an upflow solid-state (UASS)

reactor at mesophilic conditions. *Bioresource Technology*, **2014**, v. 158, p.111-118. doi:[10.1016/j.biortech.2014.02.034](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.034)

- [6] WESTENFORD, M., WILLIAN, C.A., MURPHY, S., KENNY, L., HASHEMI, M. Generation and Management of Manure from Horses and Oter Equids. In: WALDRIP, H.M., PAGLIARI P.H., HE, Z.: *Animal Manure: Production, Characteristics, Environmental Concerns, and Management.*, Inc. Soil Science Society of America. **2020**. doi: 10.2134/asaspepub67.c8
- [7] FUJII, K. Y.; DITTRICH, J. R.; CASTRO, E. A. D.; SILVEIRA, E. O. C. Processos de tratamento de resíduos de coqueira e a redução ou eliminação de ovos e larvas infectantes do gênero *Strongylus* spp. *Arquivos do Instituto Biológico*, **2014**, v. 81, p. 226-231. doi [10.1590/1808-1657000482012](https://doi.org/10.1590/1808-1657000482012)
- [8] GREFF, B.; SZIGETIJ.; NAGY A.; LAKATOS E.; VARGA L. Influence of microbial inoculants on co-composting of lignocellulosic crop residues with farm animal manure: A review. *Journal of Environmental Management*, **2022**, v. 302, p. 114088. doi: 10.1016/j.jenvman.2021.114088.
- [9] HARINDINTWALI, J.D., ZHOU, J.L., YU, X.B. Lignocellulosic crop residue composting by cellulolytic nitrogen-fixing bacteria: a novel tool for environmental sustainability. *Sci. Total Environ.* **2020** 715, 136912. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136912.
- [10] JIMENEZ-LOPEZ, C., FRAGA-CORRAL, M., CARPENA, M., GARCÍA-OLIVEIRA, P., ECHAVE, J., PEREIRA, A.G., LOU- RENÇO-LOPES, C., PRIETO, M.A., SIMAL-GANDARA, J. Agriculture wastes valorisation as a source of antioxidant phenolic compounds within a circular and sustainable bioeconomy. *Food Funct*, **2020**, 11, 4853–4877. doi.org/10.1039/d0fo00937g.
- [11] DU G.; FENG W.; CAI H.; MA Z.; LIU X.; YUAN C.; ZHANG B. Exogenous enzyme amendment accelerates maturity and changes microflora succession in horse and wildlife animal manure co-composting. *Environmental Science and Pollution Research*, **2021** v.28 p. 1-11. doi: [10.1007/s11356-020-11568-4](https://doi.org/10.1007/s11356-020-11568-4)
- [12] DOS SANTOS PEREIRA, T.; PAULA, A.M.; FERRARI, L.H.; SILVA, J.; PINHEIRO, J.B.; NAVAS CAJAMARCA, S.M.; JINDO, K. ; SANTOS, M.P.; ZANDONADI, D.B.; BUSATO, J.G. Trichoderma-Enriched Vermicompost Extracts Reduces Nematode Biotic Stress in Tomato and Bell Pepper Crops. *Agronomy-Basel*, **2021**, v. 11, p. 1655. doi: [10.3390/agronomy11081655](https://doi.org/10.3390/agronomy11081655)
- [13] AWASTHI, A K., YUAN Z., AWASTHI. M.K., LI, M., MISHRA S., PANDEY A.K. Bioprocess potential of Eco-friendly fungal isolates converting organic waste to bioresource. *Bioresource Technology*, **2022** v. 346. doi: [10.1016/j.biortech.2021.126586](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126586)
- [14] GREFF, B., SZIGETI J.; VARGA, A.; LAKATOS, E.; SAH'O, A., VARGA, L. Effect of bacterial inoculation on co-composting of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) waste and cattle manure. *3 Biotech*, **2021**, 11, 306. doi.org/10.1007/s13205-021-02860-2.

- [15] SHARMA, P.; GAUR V.K.; KIM SH.; PANDEY A. Microbial strategies for bio-transforming food waste into resources. *Biore- source technology*, 2020, v. 299, p. 122. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122580
- [16] XU, J.Q., LU, Y.Y., SHAN, G.C., HE, X.S., HUANG, J.H., LI, Q.L., Inoculation with compost-born thermophilic complex microbial consortium induced organic matters degradation while reduced nitrogen loss during co-composting of dairy manure and sugarcane leaves. *Waste Biomass Valor*, **2019a**, 10, 2467–2477. doi.org/10.1007/s12649-018-0293-y.
- [17] BUSATO, J. G.; FERRARI, L. H.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; SILVA, D. B.; PEREIRA, T. S.; PAULA, A. M. Trichoderma strains accelerate maturation and increase available phosphorus during vermicomposting enriched with rock phosphate. *Journal of Applied Microbiology*, **2021**, v. 130, p. 1208-121. doi: [10.1111/jam.14847](https://doi.org/10.1111/jam.14847)
- [18] WANG, X.; KONG, Z; WANG, Y.; WANG, M.; LIU, D.; SHEN, Q. Insights into the functionality of fungal community during the large scale aerobic co-composting process of swine manure and rice straw. *Journal of Environmental Management*, **2020**, v.270, p. 110958 .doi 10.1016/j.jenvman.2020.110958.
- [19] WU, Y.P., CHEN, Y.X., SHAABAN, M., ZHU, D.W., HU, C.X., CHEN, Z.B., WANG, Y. Evaluation of microbial inoculants pretreatment in straw and manure co-composting process enhancement. *J. Clean. Prod.*, **2019**, 239, 118078. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118078>.
- [20] PARKINSON, D.T., GRAY, R.G., WILLIAMS, S.T. *Methods for studying the ecology of soil microorganisms*. Melbourne. 19<sup>o</sup> ed. Blackwell Scientifi, California, **1997**, p. 465.
- [21] TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análises de solo, plantas e outros materiais. 2.Ed. Porto Alegre: Dpto. de solos da UFRGS, 174 p. 1995. In: TIAGO, P. V.; MELZ, E. M.; SCHIEDECK, G. Comunidade de bactérias e fungos de esterco antes e após vermicompostagem e no substrato hortícola após uso de vermicomposto. *Revista Ciencia Agronomica*, **2008**, v.39, n. 2, p. 187-192.
- [22] RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R.: *Microbiologia prática: roteiro e manual*. Atheneu, São Paulo, (2002).
- [23] CASTELLANI, E. D.; SILVA, A.; BARRETO, M. Influência do tratamento químico na população de fungos e na germinação de sementes de *Bauhinia variegata* L. VAR. *Variegata*. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, **1996**, v.8, n.1, p.41-44.
- [24] MANDELS. M.; WEBER, J. Production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*. Whashington, **1996**, v.95, p.391-414.
- [25] MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **1959**, v.31, p.426-428.
- [26] GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, **1987**, v.59, 257-268.

- [27] WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J.: PCR Protocols **1990**.
- [28] FERREIRA, D. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. 255-258, **2000**.
- [29] SAJID, S.; KUDAKWASHE O.; RESCO DE DIOS V.; NABI F.; KYUNG Y.; KALERI A. R.; MA L.; ZHOOL.; ZHANG W.; DONG F.; HAN Y. Pretreatment of rice straw by newly isolated fungal consortium enhanced lignocellulose degradation and humification during composting. *Bioresource Technology*, **2022**, v.354, p.127. doi:10.1016/j.biortech.2022.127150.
- [30] WANG, M. WANG, X. YUNCHENG, W. XIAOSONG, W. JIAVIN, Z. YU, L. ZHE, C. ZHONGKUN, J. WEI, T. JIBING Z. Effects of thermophiles inoculation on the efficiency and maturity of rice straw composting. *Bioresource Technology*, **2022**, v. 354, p. 127-195. doi: 10.1016/j.biortech.2022.127195.
- [31] ZENG, G., YU, M., CHEN, Y., HUANG, D., ZHANG, J., HUANG, H., YU, Z. Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* at various time points on enzyme activities during agricultural waste composting. *Bioresource Technology*, **2010**, v. 101, n. 1, p. 222-227. doi: 10.1016/j.biortech.2009.08.013
- [32] ZHU, N., ZHU, Y., KAN, Z., LI, B., CAO, Y. JIN, H. Effects of two-stage microbial inoculation on organic carbon turnover and fungal community succession during composting of cattle manure and rice straw. *Bioresource Technology*, **2021**, v. 341, p. 125842. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125842
- [33] HEFNAWY, M.; GHARIEB, M.; NAGDI. O.M.: Microbial diversity during composting cycles of rice straw. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. **2019**, v.7, p.30-43. doi: [10.3390/biology11040569](https://doi.org/10.3390/biology11040569)
- [34] NOREEN, N.; RAMZAN, N.; PARVEEN, Z.; SHAHZAD, S. A comparative study of cow dung compost, goat pellets, poultry waste manure and plant debris for thermophilic, thermotolerant and mesophilic microflora with some new reports from Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, **2019**, v.42, p.1155-1159. doi: 10.30848/PJB2019-3(42)
- [35] DANISH, S.A.; HAQ, T.; PAULA, A.M.; FERRARI, L.H.; SILVA, J.; ZAFAR, U. Succession and Catabolic Properties of Fungal Community During Composting of Fruit Waste at Sub-Tropical Environment Waste Biomass (2022). doi:10.1007/s12649-021-01653-1.
- [36] XU, J.Q., JIANG, Z.W., LI, M.Q., LI, Q.L. A compost-derived thermophilic microbial consortium enhances the humification process and alters the microbial diversity during composting. *J. Environ. Manag.* **2019b**, 243, 240–249. doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.008.
- [37] LI, S.Y., LI, J.J., YUAN, J., LI, G.X., ZANG, B., LI, Y.Y.2. The influences of inoculants from municipal sludge and solid waste on compost stability, maturity and enzyme activities during chicken manure composting. *Environ. Technol.*, 2017 38, 1770–1778. doi.org/10.1080/09593330.2017.1291755

- [38] ROCHA, V.A.L.; MAEDA, N. R.; PEREIRA JR, N.; KERN, F.M.; ELIAS, L.; SIMISTER, R.; MCQUEEN-MASON, S. J. Characterization of the cellulolytic secretome of *Trichoderma harzianum* during growth on sugarcane bagasse and analysis of the activityboosting effects of swollenin. *Biotechnology progress*, **2016**, v.32(2), p. 327-336. [doi:10.1002/btpr.2217](https://doi.org/10.1002/btpr.2217)
- [39] KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. *Aspergillus fumigatus*—what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen?. *PLoS pathogens*, **2013**, v.9(12), 1003743. [doi:10.1371/journal.ppat.1003743](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003743)
- [40] BILAL, L.; ASAF, S.; HAMAYUN, M.; GUL, H.; IQBAL, A.; ULLAH, I.; LEE, I-J.; HUSSAIN, A. Plant growth promoting endophytic fungi *Aspergillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulates plant endogenous hormones. *Symbiosis*, **2018**, v.76, p.117–127. [doi: 10.1007/s13199-018-0545-4](https://doi.org/10.1007/s13199-018-0545-4)
- [42] LIU, D.; LI, J.; ZHAO, S.; ZHANG R.; WANG, M.; MIAO, Y.; SHEN, Y.; SHEN, Q. Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources. *Biotechnol Biofuels*, **2013**, v.6, p.149 (2013). [doi: 10.1186/1754-6834-6-149](https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-149)
- [42] OTHMAN, A. R.; ISMAIL N. S.; SHEIKH S.R. Potential of indigenous biosurfactant-producing fungi from real crude oil sludge in total petroleum hydrocarbon degradation and its future research prospects. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **2022**, v. 10, n. 3, p. 107-621. [doi: 10.1016/j.jece.2022.107621](https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107621)
- [43] KHYALIA, P.; DANGI, J.; BARAPATRE, S.; DHANIA, G.; LAURA, J.; NANDAL, M. Comparative Analysis of Compost Quality Produced from Fungal Consortia and Rice Straw by Varying C/N Ratio and its Effect on Germination of *Vigna radiata*, **2022**, v.21, p.1235-1243. [doi.org/10.46488/NEPT.2022.v21i03.029](https://doi.org/10.46488/NEPT.2022.v21i03.029)
- [44] GREFF, B., SZIGETI, J., NAGY, Á., LAKATOS, E., & VARGA, L. Influence of microbial inoculants on co-composting of lignocellulosic crop residues with farm animal manure: A review. *Journal of environmental management*, **2022**, 302, 114088. [doi.:10.1016/j.jenvman.2021.114088](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114088)
- [45] DE GOUVÊA, P.F.; BERNARDI, A.V.; GEROLAMO, L.E.; DE SOUZA SANTOS, E.; RIAÑO-PACCHÓN, D.M.; UYMURA, S.A.; DINAMARCO, T.M.; Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse. *BMC Genomics*, **2018**, v.19, p. 232. [doi.:10.1186/s12864-018-4627-8](https://doi.org/10.1186/s12864-018-4627-8)
- [46] VELASCO, J.; SEPULCHRO, A. G. V.; HIGASI, P. M.; PELLEGRINI, V. O.; CANNELLA, D.; DE OLIVEIRA, L. C.; SEGATO, F. Light Boosts the Activity of Novel LPMO from *Aspergillus fumigatus* Leading to Oxidative Cleavage of Cellulose and Hemicellulose. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2022**, 10, 50, 16969–16984. [doi.:/10.1021/acssuschemeng.2c06281](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c06281).
- [47] BERNARDI, A. V. Identificação das principais enzimas hidrolíticas de *Aspergillus fumigatus* quando crescido em bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Química). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, **2017**. [doi:10.11606/D.59.2017](https://doi.org/10.11606/D.59.2017)



## CAPITULO III

### **Impact of *Aspergillus fumigatus* inoculation on the composting of wood shavings bedding for horses**

A.G.C.R. Nascimento, A. M. Paula, J.G. Busato, G. C. Rocha, S. Perecmanis, S. G. da Silva, A. R Texeira Neto  
Letters in Applied Microbiology: Applied Microbiology International

#### **Abstract**

Equine farming is an important part of the Brazilian production chain, but it produces a significant amount of recalcitrant waste. The composting process is an important tool for treating this waste. The addition of filamentous fungi, capable of producing specific enzymes for degrading recalcitrant materials, is promising for speeding up composting and making the final waste safe for agricultural use. The aim of this study was to assess whether the inoculation of two different isolates of *A. fumigatus* affects variables associated with stability (carbon and nitrogen content, C/N ratio, pH, electrical conductivity, cellulose, hemicellulose and lignin) and its viability using parasitological and bacteriological markers throughout the composting of saturated horse bedding made from wood shavings bedding. The beds were placed in stalls and were cleaned daily while becoming saturated. Two treatments were set up -a control and an inoculated treatment- and the composting process lasted 90 days. Physical parameters (temperature), physicochemical parameters (pH, electrical conductivity, carbon and nitrogen content, C/N ratio and hemicellulose, cellulose and lignin content) and microbiological and parasitological parameters were monitored every 15 days. The characteristic temperatures of the thermophilic phase (greater than 55°C) were reached on the fourth day of composting, regardless of the application of the inoculum. Both treatments entered the mesophilic phase of maturation (40.8°C) 35 days after composting began. The pH values in both water and CaCl<sub>2</sub> remained close to neutral throughout the process. Higher electrical conductivity was observed in the inoculated treatment after 30 days of composting. The reduction in total organic carbon values was more pronounced in the inoculated treatment (42.85%) compared to control treatment (38.29%); there was no significant difference in total nitrogen. There was a sharper reduction in the C/N ratio in the inoculated treatment compared to the control (64.10% and 62.2% respectively), as well as greater reductions in cellulose (inoculated treatment 37.2% and control 29.3%) and hemicellulose (inoculated treatment 42.3% and control 30.4%). At the end of the process, the treatments showed Total and Thermotolerant Coliform values below 1x10<sup>3</sup>, no bacterial isolates of *Samonella* sp were identified, and a reduction in the number of larvae throughout the composting process in all treatments, was noted. The inoculation of *A. fumigatus* in saturated horse beddings made from shavings improved the final characteristics of the compost and is an alternative for improving the efficiency of the composting process for this type of waste.

**Keywords:** horse waste; composting process; microorganisms; beneficial; *Aspergillus* sp.



## 1. Introduction

In Brazil, the production cycle of horses is relatively long, and the intensive system is predominant. Currently, the environmental demands arising from the production of waste generated during confinement have become one of the main challenges in this segment. Places such as equestrian facilities, racecourses, and cavalry regiments, commonly located in large urban centers, produce a large amount of organic waste, mainly from the bedding used in the stalls of stabled animals. However, these places generally do not have adequate resources for the correct treatment of this waste which, when inappropriately disposed of in the environment, causes problems such as the contamination of the water table and water catchments, attract urban pests and promote environmental aesthetic degradation [1, 2].

It is estimated that the daily amount of manure produced (feces and urine) per an adult horse range is between 20.9 and 30.6 kg, depending on management, animal size and activity level. Wood shavings are commonly added to stalls to promote horse welfare. On average, 3.8 to 6.8 kg/day are added. Thus, the amount of saturated bedding produced by a stabled horse can be estimated at 28.5 to 31.7 kg/day, so each animal can generate around 10 tons of waste per year. [3, 4]

There are various forms of treatment available for this waste before it is discharged into the environment, which include physical, chemical, and biochemical processes. Among these, composting is one of the oldest processes for recycling coarse organic waste. It is also a viable form, because of its low production and maintenance costs [5, 6].

However, compost from saturated horse beds contains large amounts of carbon and is not a low concentration of nitrogen [7]. This means that the carbon/nitrogen (C/N) ratio is critical in determining the duration of the composting process. Data published by Krogman and Kesimen [8,9] indicate that this ratio can be as high as 45:1, depending on the type of substrate it is made up of. This condition is one of the limiting factors for the composting process of these types of waste, which can alter the time and quality of the product. Associated with this factor, bedding waste is mostly made up of lignocellulosic material, which are three-dimensional polymers (cellulose, hemicellulose and lignin) with aromatic rings with and stable bonds, rendering their degradation difficult. Even with the synergistic actions of enzymes, the decomposition cycles of organic matter by microorganisms are increased [10, 11, 12]. Therefore, the biodegradation of lignocellulose is of great importance for the efficiency of the composting process and for the quality of the product. Although the microorganisms and enzymes present in a natural composting process are efficient, the degradation of lignocellulose can be slow [13]. In this sense, the use of inoculants with microorganisms capable of degrading this type of material can speed up the composting process and improve the final quality of the product, i.e., make the composting of horse bedding more efficient.

According to previous studies de Bechera *et al.* [14], De Gouvêa *et al.* [15], Du *et al.* *et al.* [16], the inoculation of white rot fungi has the potential to increase the decomposition of

cellulose, hemicellulose and lignin through a consortium of various enzymes *e.g.* hydrolase, peroxidase, endoglucanase, cellobihydrolase, xylase, hemicellulase, cellulase and others. Wang et al. [17], researching the inoculation of white rot fungi (*Penicillium expamsum*) in the co-composting of wheat straw with cattle and chicken manure, observed that the inoculated piles obtained the fastest lignocellulose degradation rate compared to those that were not inoculated.

The largest percentage of white rot fungi belong to the Ascomycetes and Basidiomycetes groups [18]. Among the Ascomycetes fungi, the genus *Aspergillus* sp. has been gaining prominence due to its ability to secrete enzymes with the potential to degrade lignocellulosic material [19]

Among *Aspergillus* sp., the fungus species *Aspergillus fumigatus* has been recognized to have biotechnological potential in composting processes due to its specific characteristics, such as thermotolerance (12 to 65°C). This species can withstand pH variations (2.2 to 8.8) and has many genes coding for carbohydrate-active enzymes (CAZymes) in its genome, making it capable of degrading lignocellulolytic material and thrive in the presence of complex biomass [20, 21, 22, 23].

In this context, the aim of this study was to evaluate the physical and biological changes, on different days of the composting process, with the use of saturated horse bedding substrate after the joint inoculation of two different isolates of *Aspergillus fumigatus*.

## **2. Material and methods**

### *2.1 - Composting process*

The experiment was carried out at the Veterinary Hospital for Large Animals of the Faculty of Agronomy and Veterinary Science of the University of Brasilia (HVet-UnB), located in Asa Norte, Granja do Torto, geographic coordinates latitude 15°74'93", longitude 47°87'64", elevation 1028 m. The composting systems were carried out in a covered shed measuring 35 x 13 m<sup>2</sup> with a waterproof floor.

All procedures were approved by ethics committee of animal use (CEUA-UnB) in protocol number. The experiment used six horses of no defined breed, between 3 and 10 years of age, with no clinical alterations suggestive of any infectious or non-infectious pathological process. The animals were part of the HVet-UnB herd. The animals received 1kg of commercial ration concentrate twice a day. In addition, they had free access to Tifton hay (*Cynodon spp*), mineral salt, and clean, fresh water in suitable troughs. Stool samples were collected directly from the

rectal ampulla for parasitological tests to determine the type of gastrointestinal parasitism and estimate the parasite load.

The bedding was prepared to a height of 8 cm and consisted of a 100% natural and sterilized pine wood substrate, produced from reforested wood, purchased from the company JF MARAVALHA, Brasília/DF. Horses were kept in stalls for 15 to 20 days, when the waste (feces, urine, and substrate) was removed according to the saturation of the bedding. The waste from the stables, collected at the time of daily cleaning, was transported to a covered shed to make piles.

Six piles were set up, divided into three replicates for control (control treatment) and three replicates for the inoculum treatment. Piles were arranged side by side in a trapezoidal shape measuring 1.80 x 0.90 x 2.10 m<sup>2</sup>, with a space of equal size besides, allowing the turning of the piles. The composting process followed the aerobic fermentation system, in a closed environment, with a slow decomposition process of different volumes, depended on the production flow of the substrate (saturated beds), coming from the stalls. The piles were aerated every five days for oxygenation during the thermophilic phase of the process, with temperatures above 50°C, and every 15 days during the mesophilic phase, through manual turning. The complete composting process for the treatments lasted 90 days. The internal temperature of the piles was measured using two sensors per pile at different depths (40 and 60 cm). The sensors employed were of the high-precision digital type (Dallas semiconductor DS18S20, TO-92 sensor), which determine temperature between -55°C and 125°C, with a variation of ± 0.5°C, with 3-meter cables. The data was stored in the MySQL database. The piles were manually irrigated to achieve and maintain the appropriate relative humidity (R.H.) of 40 to 60%. Moisture analyses were carried out following the methodology described by the Ministry of Agriculture for humidity 65°C, To determine the humidity, triplicate was performed using 20 g of the sample that was placed in an oven at 65°C for at least 24 hours or until constant weight was obtained, then the material was transferred to a desiccator to cool to room temperature before weighing the dry sample [24]. The carbon/nitrogen (C/N) ratio was balanced to obtain the best possible C/N ratio in the initial phase (39/1). The balance was calculated according to the formula described by Brito [25].

Samples were taken during the initial phase (day 0), the thermophilic phase (day 15), the cooling phase (days 30 and 45) and the maturation phase (days 75 and 90). A 30 g composite sample was formed from homogenizing 7 simple samples from different pile sites.

## 2.2 - Microbial inoculant

Thermophilic fungi that can degrade lignocellulosic materials were used as inoculum for this study. They were isolated and selected from composts from equine litter residues with wood shavings as substrate, as described by Nascimento et al., [26]. These fungi have the potential to be applied in biotechnological processes that involve the conversion of biomass into value-added products. Two isolates that obtained the best production were selected and identified as lignocellulolytic filamentous fungi belonging to *Aspergillus fumigatus*.

Before applying the inoculum, the selected fungal strains were grown in PDA (Potato Dextrose Agar) for seven days, at 30°C. After incubation, the spores were quantified using a Neubauer chamber. The two isolates were associated and mixed in an inoculum suspension. To do this, 30 mL of distilled water was placed in the petri dishes with the colony and the surface was scraped to loosen the spores. The concentration of the solution was adjusted with distilled water to reach  $1 \times 10^7$  /mL [27]. At the end of the adjustment, the number of spores of isolates was of  $8.8 \times 10^7$  /mL and  $3.4 \times 10^7$  /mL, respectively for each isolate. The final suspension was applied to the compost piles at a ratio of 5:1 (5ml of suspension for each kg of compost substrate). To enhance the development of the micro-organisms, serial applications were made in four periods during the composting process (0, 15, 30 and 45 days of composting).

The fungal suspension was spread over the piles, which received the inoculum, and mixed evenly. The control treatment did not receive any inoculation.

## 2.3 - Chemical Analysis

The chemical pH analyses were carried out using a meter equipped with a glass electrode (Tec5, TECNAL). After stirring the sample, the measurement was carried out in water and  $\text{CaCl}_2$   $0.01 \text{ molL}^{-1}$  in a ratio of 1:5 (w/v).

The Electrical Conductivity (E.C.) was assessed using conventional conductivity determination equipment (microprocessor conductivity meter Q405M-QUIMIS), adjusted from the conductance of cells attached to electrodes following the methodology described by the Ministry of Agriculture [24].

To determine total organic carbon (TOC), the samples were submitted to the potassium dichromate volumetric method following the modified Walkley-Black methodology. Total Nitrogen (TN) was determined according to the Kjeldahl methodology, based on digesting the sample with sulfuric acid [28]. The C/N ratio was calculated from the quotient between the TOC (dag/kg) and TN (dag/kg) of the sample.

The hemicellulose, cellulose and lignin contents were estimated following the methodology suggested by Van Soest [29] and Van Soest and Win [30]. The difference between neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) expresses the hemicellulose value, the difference between ADF and lignin expresses the cellulose value. The lignin was determined using concentrated sulfuric acid at 72%, followed by incineration of the residue obtained at 500°C for 2 hours.

#### 2.4 - Microbiological and parasitological analyses

The microbiological and parasitological seven samples were taken at different points in the piles, forming a pool of the individual samples. The microbiological variables measured were total coliforms, thermotolerant coliforms and *Samonella* sp. For the analyses, 10g of the composite sample were used and from it,  $10^{-1}$  dilutions were made by homogenizing them in 90 mL of 0.1% peptone water. Subsequently,  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$  dilutions were made. For the presumptive coliform test, 1 mL of the last dilution in peptone water ( $10^{-3}$ ) was transferred into multiple tubes containing 9 mL of LST (Lauryl Sulphate Tryptose) and EC (*E. coli*) broth, both containing inverted Durham tubes, and then incubated for 48 hours at 35°C. The presence of gas in the Durham tubes indicates fermentation of lactose in the medium. Total and thermotolerant coliforms were analyzed using the most probable number method (MPN  $g^{-1}$ ), according to Kornacki and Johnson [31]. The determination of *Samonella* sp. was based on the methodology by Andrews and Hammack [32], by means of selective enrichment in Rappaport-Vassiliadis (RV), followed by plating and isolation of the colonies in Salmonella-shigella (SS) and MacConkey selective agars. The results obtained were compared with the limits recommended by MAPA Normative Instruction 25/2009 and Resolution 375/2006 of the National Environment Council (CONAMA) [33].

For the parasitological evaluation, samples were collected at 4 different times: on day zero (0), day five (start of the thermophilic phase), day 33 (start of the maturation phase) and day 90 (end of the composting process). Parasitological analyses were carried out by counting eggs per gram of compost (EPG), a quantitative coproparasitological technique [34]. The modified Baermann technique described by Rugai et al. [35] was used to recover and quantify the number of larvae present in each sample.

#### 2.5 Statistical analysis

The analysis of variance (ANOVA) was carried out, considering of the variables of all the samples over the time of the composting process, and the effect of inoculation on the variables at each time. The means were compared using Student's t-test at a significance level of 1% and

5of probability, when significant differences were found. The statistical analyses were carried out using SISVAR 4.0 software, version 5.6 [36].

### **3. Results and discussion**

#### *3.1 - Temperature changes*

The composting beds reached the thermophilic phase and there was no difference between the control treatment and the treatment that received the inoculum, as can be seen in figure 1. Temperature increase was observed from the second day after the start of the process. Peak temperature was obtained on the seventh day of composting in both piles. The thermophilic phase began in all treatments from the fourth day of composting and continued for 30 days, when the maximum peak temperature was 56.3°C, which was maintained, with small variations, for 14 days. Both treatments entered the mesophilic phase 32 days after the start of the composting process and were maintained in this phase until stabilization with temperatures close to 35°C until 77 days and close to 25°C until the end of the process (90 days). In the maturation phase (mesophilic phase), the influence of the inoculated treatments was observed, which correspond with the decline in temperature. In this phase, temperatures remained higher than in the control treatment (treatment inoculated at 28°C, and control treatment at 24°C).

The temperature results showed that both treatments reached the thermophilic phase in the first few days of composting, due to the action of microorganisms with intense oxygen consumption and energy release. The maintenance of this phase was due to weekly oxygenation through turning and humidity correction, which was adjusted, when necessary. This was done to maintain a favorable environment for the degradation of organic matter, which is an indicator of the efficiency of the composting process.

There was no difference between the treatments in the duration and intensity of the thermophilic phase of composting. The fungi did not influence the temperature rise or the maintenance of heat during the process. In the mesophilic phase, the higher temperature of the inoculated treatment may have been due to the continuation of lignocellulose hydrolysis by maintaining the fungal colonies. Similar results were found by Du [37], when studying the effect of exogenous enzymes on horse and wild animal manure, who obtained a longer thermophilic phase in the inoculated piles.

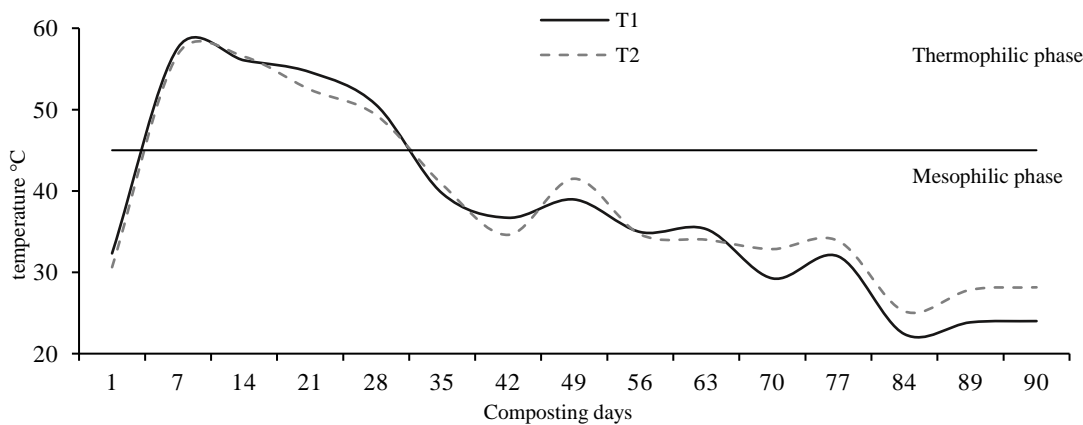


Figure 1 - Average temperature of the measuring points from the first day of the composting process of horse bedding with wood shavings substrate, where T1 - average of the control treatment; T2 - average of the treatment with the application of inoculum treatment.

### 3.2 - Effects of inoculation on physicochemical properties

#### 3.2.1 pH and Electrical Conductivity (EC)

The pH values, measured in both water and CaCl<sub>2</sub>, were close to neutral throughout the composting process (Figure 2). Regarding the pH measured in water, there was a significant difference between the compost piles at 60 days, and the value of the control treatment was lower than that of the inoculated treatment ( $p < 0.05$ ) (Figure 2, graph **a**). As for the pH measured in CaCl<sub>2</sub>, there was no significant difference ( $p > 0.05$ ) (Figure 2, graph **b**).

The pH measured in water indicates the activity of H<sup>+</sup> ions in the solution prepared with the compost, while the CaCl<sub>2</sub> pH quantifies, in addition to the H<sup>+</sup> ions in the solution, those absorbed in the organic matter exchange complex. In the final phase, all the piles had a pH close to neutral, in compliance with MAPA Normative Instruction 25/2009, which states that the minimum acceptable pH value for composts in Brazil is 6.0 [38]. Therefore, all the treatments complied with the legislation (Figure 2, graph **a** and **b**). In the first few days of composting, the pH values dropped (slightly acidic medium). After 45 days, the values tended to increase, making the medium basic. PH variation was directly related to microbial activity during the substrate decomposition process, due to the production of organic acids, decomposition of soluble proteins and nitrification [6,39]. When studying *Aspergillus* sp. in composting spent coffee grounds (SCG) with poultry and cattle manure, AFRILIANA et al. [39] observed that the use of activators such as fungi and bacteria can improve the quality of certain variables, including pH. They obtained a slightly acidic pH in the initial phase (6.7), which increased from

the seventh day of composting to levels greater than 8.0, at the end of the composting *process*, the pH reached *neutrality* (7.0).

In the analyses of E.C ( $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (Figure 2, graph c), there was a significant difference between the means ( $p < 0.0008$ ) of the inoculum application during the decomposition process. The control treatment had a more significant effect than the inoculated treatment, with higher values at 30 days ( $p < 0.01$ ). E.C is related to the number of ions in the decomposition process, reflecting the degree of salinity of the compost. The increase in E.C. may be due to the active degradation of organic matter, resulting in soluble components and in an increase of ions [40]. In the period from zero to 15 days. E.C values were similar (Figure 2, graph c). The values of the control treatment were higher, differing significantly from the inoculated treatment, at 30 days into the process (1.63 and  $0.943 \text{ mS}/\text{cm}^{-1}$ , respectively). It was only during the maturation phase that an increase in E.C. in the inoculated treatments was observed, which can be explained by the greater degradation of organic matter. Similar results were found by Thiyageshwari et al. [41]. Their aim was to improve the degradation of rice straw by inoculating a consortium of lignocellulose-degrading fungi, including *Aspergillus* sp. They concluded that the E.C. of the composts that received the consortium remained well below  $3 \text{ mS}/\text{cm}^{-1}$ .

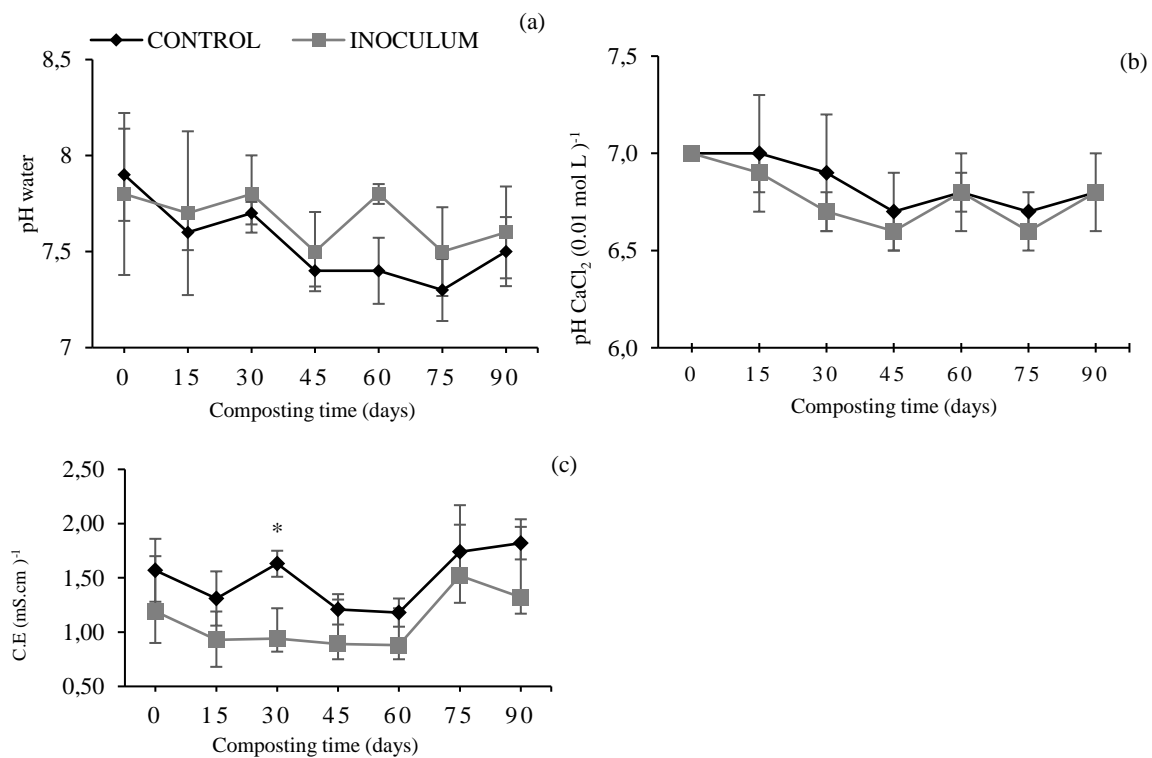


Figure 2 - Average pH value in water (a), CaCl<sub>2</sub> 0.01 mol L<sup>-1</sup> (b), and (c) Average Electrical Conductivity (EC) in  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  in the compost from the control and inoculated treatments obtained on different days of the composting process.

\* Shows significant difference ( $p < 0.01$ ). (Student t-test)

\*\* Shows significant difference ( $p < 0.05$ ). (Student t-test)



### 3.2.2 Total Organic Carbon (TOC), Total Nitrogen (NT), C/N Ratio

The results found for the nitrogen (N) analyses (dag/kg) showed that there was no significant effect between the treatments ( $p>0.05$ ). For Total Organic Carbon (TOC) (dag/kg) and the ratio between carbon and nitrogen (C/N), a significant effect between treatments ( $p<0.05$ ) has been found (Figure 3). Higher levels of carbon were found in the inoculum treatment that received the application of inoculum, when compared to the control at 15 days into the composting process. Factors such as carbon and nitrogen and their ratio are determining parameters in the ideal conditions for microbial degradation [42].

In relation to N, no additional effects were observed after the inoculum was applied (Figure 3, graph a). This is explained by the fact that the main microorganisms involved in nitrogen transformation are nitrogen-fixing bacteria, which produce nitrogenase and catalyze the conversion of  $N_2$  into  $NH_3$ . To obtain nitrogen, most filamentous fungi carry out the microbial ammonification process, which transforms nitrate into nitrite and then into  $NH_3$ . For this to happen, the optimum pH must be between 4 and 6 [43]. In the inoculated treatments, pH was a limiting factor, as its values remained between 7.5 and 7.8 (neutral to basic) throughout the composting process.

A marked loss of carbon was observed in the treatments during the first 15 days of composting, which coincides with the thermophilic phase. Thereafter, the loss was slower until 60 days (Figure 3, graph b). A peak of loss was still being found until the 75th day, before it stabilized. At 15 days, there was a difference in the control treatment (31.9% reduction) compared to the inoculation treatment (28.6% reduction).

The C/N ratio decreased significantly in the treatments ( $p<0.05$ ) (Figure 3, graph c). There was a 62.2% reduction in the control and a 64.10% reduction in the inoculated treatment. Similar results were found by Du et al. [37], when they analyzed the physicochemical parameters in composting horse and wild animal manure with the addition of exogenous enzymes in the thermophilic phase.

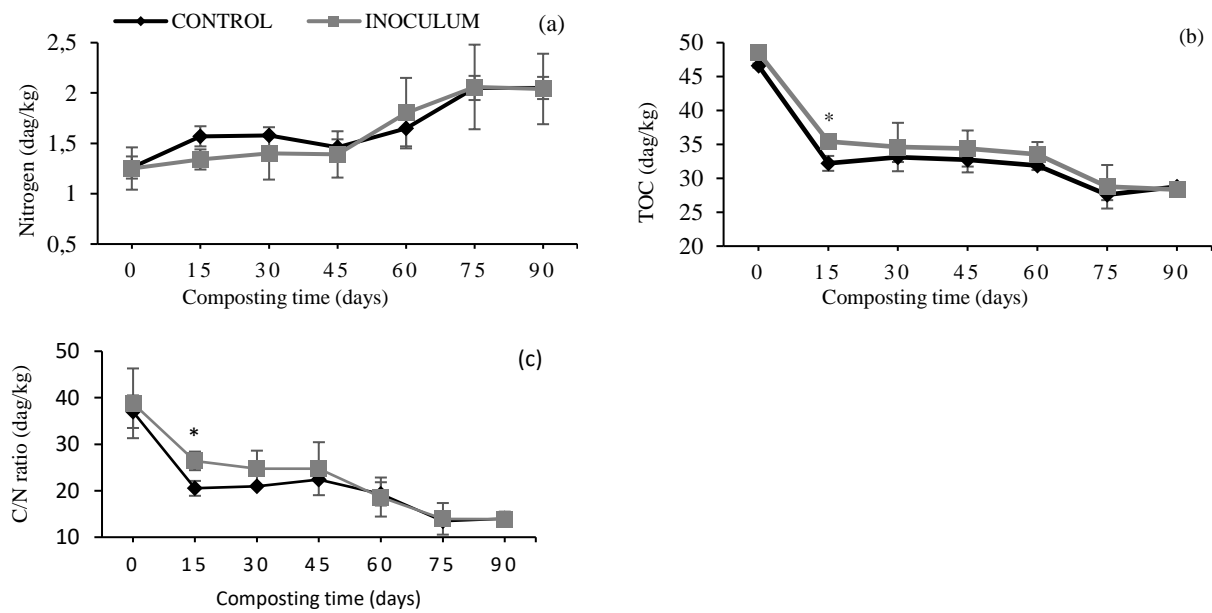


Figure 3 - Average value of Total Nitrogen (a); Average value of Total Organic Carbon (b); Average value of C/N Ratio (c), of the compost in the control and inoculated treatment obtained on different days of the composting process

\* Shows significant difference ( $p < 0.05$ ). (Student t-test)

### 3.2.3 Lignocellulose constituents

The lignocellulose complex was gradually degraded during the composting cycle in both treatments, as shown in Figure 4. In the degradation of hemicellulose, a difference was observed in the mesophilic phase of maturation, at 90 days ( $p < 0.0578$ ). In the control treatment, the reduction rate was 10% and in the inoculated treatment it was 22%.

Cellulose degradation in the treatments that received the inoculum showed a significant difference (37.2%) when compared to the control (20.3%) ( $p < 0.05$ ). At 75 days, the rate was significantly higher in the inoculated treatment (22%) compared to the control treatment (10%) ( $p < 0.016$ ). There was no significant difference in the degree of lignin degradation across the treatments.

It is possible that the greater degradation of cellulose and hemicellulose observed in the inoculated treatment was due to the implementation of the fungal colonies obtained through the inoculation of *A. fumigatus*. The highest reduction rates were found in the final stage of the process, indicating that these fungi promoted better degradation of hemicellulose and cellulose in the mesophilic stage of maturation. This can be attributed to the higher cellulolytic activity of the fungus at this stage of the process.

*Arpegillus* sp. are fungi that make up the white rot fungus complex. They are ascomycetes that rapidly metabolize cellulose and hemicellulose, only slightly modifying lignin [44]. *A. fumigatus* is made up of genes that encode and express treatments of enzymes

belonging to the glycoside hydrolase family and functional genes with helper activity(s) that express enzymes such as LPMOs (polysaccharides monooxygenases). These enzymes are directly involved in the degradation of lignocellulose biomass [45, 46, 23]. *A. fumigatus* also has thermostable properties, being able to produce thermotolerant enzymes. These enzymes can act on different organic substrates, even under ambient conditions. This gives *A. fumigatus* an adaptive advantage and biotechnological potential[47].

In addition to these fungal characteristics, a peak in the number of colonies was observed after 45 days, the date of the last inoculum application. This is due to previous recurrent applications, which may explain their greater fungal activity during the maturation phase. When they analyzed the fungal community and cellulose degrading genes in medicinal herb compounds with a high lignocellulose content, Tian et al. [45] found that the dominant genus was *Arpegillus sp.* In this context, *A. fumigatus* represented 99.5% of this genus, giving it an important role in the degradation of lignocellulose after the thermophilic stage. The data obtained corroborates the findings of Zhu et al. [48] in their study of the inoculation of fungi in two application stages in compost made from manure and rice straw. They observed an increase in the degradation of lignocellulose in the composts that were inoculated and noticed that *Arpegillus sp* was the main genus found in the cooling phase.

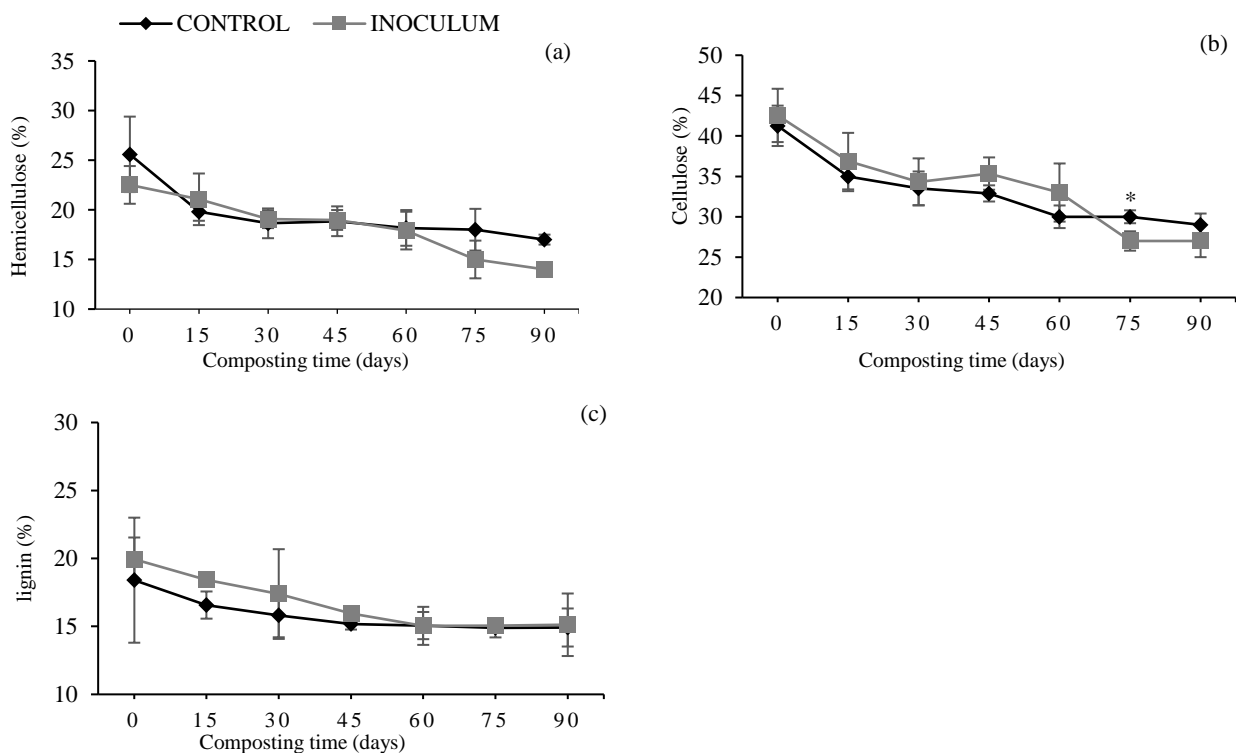


Figure 4 - Average variation expressed as a percentage of the degradation content of lignocellulose components during the composting process in the control and inoculated treatments obtained on different days. Hemicellulose degradation content (a); Cellulose degradation content (b); Lignin degradation content (c).

\* Shows significant difference ( $p < 0.016$ ). (Student t-test).

### 3.3 - Pathogenic microorganisms

#### 3.3.1 Bacteriological

Data obtained from the analysis of MPNs, and bacterial isolates compared to the standards established by MAPA are shown in Table 1. At the start of the composting process, there were more than  $1.6 \times 10^3$  MPNg<sup>-1</sup> of total and thermotolerant coliforms in both treatments. At the end of the composting process, there were a significant decrease in total coliforms ( $0,46 \times 10^3$  MPNg<sup>-1</sup> for the control treatment and  $0.27 \times 10^3$  MPNg<sup>-1</sup> for the inoculated treatment) and thermotolerant coliforms  $0.53 \times 10$  MPNg<sup>-1</sup> in both treatments. The reduction in total coliform MPNs in the inoculated treatment was greater than in the control treatment. However, in both treatments, the results for total coliforms and thermotolerant coliforms were lower than  $1.0 \times 10^3$  MPN g<sup>-1</sup>, the maximum value allowed by MAPA Normative Instruction 25/2009 and Resolution 375/2006 of the National Environment Council (CONAMA) [33]. In this study, no bacterial isolates of *Samonella* sp were identified from the start of the process in both treatments, thus meeting the requirements set by MAPA.

The results obtained showed high total coliform and thermotolerant coliform counts in all the treatments for the initial time (day 0). This result was expected, because these microorganisms are common in the environment and are part of the resident microbiota of animals. The significant decrease in MPNs shows that the composting process in both treatments was efficient in reducing these pathogens. Similar results were found by Souza et al. [49], who, when analyzing the composting process of small ruminant production at different times of the year, observed that the process was efficient in eliminating pathogens and could be safely used. However, the results found differ from those obtained by Ferreira et al. [50], who, when analyzing the efficiency of the composting process of conventional poultry and horse manure in relation to parasite load and microbiology, concluded that, although the process proved to be effective in reducing coliform levels, it was not sufficient for the final compost to meet the requirements of MAPA legislation for use in agriculture. In relation to the difference between the treatments, it was observed that the inoculated treatments had a more marked decrease in total coliforms, when compared to the control treatment. This effect can be explained by the fact that the temperature was maintained at a higher level during the maturation phase in the treatments that received the inoculation, thus making the process more effective than the control treatment.

In this study, no bacterial isolates of *Samonella* sp were identified from the start of the process in both treatments, as required by MAPA. The absence of *Samonella* in this study,

among many factors, can be explained by the increase in temperature reached in the treatments during the thermophilic phase. The destruction of these microorganisms can occur at temperatures above 55°C [51].

Tabela 1 - Result of the most probable number per gram (MPN g<sup>-1</sup>) of fecal and Thermotolerant Coliforms, Samonella sp in 10g of compost on day 0 and after 90 days of the composting process (beginning and end), compared to MAPA standards.

| Composting time                                      | T1                     | T2                     | MAPA                    |
|--|------------------------|------------------------|-------------------------|
| <b>Total coliforms (MPN g<sup>-1</sup>)</b>          |                        |                        |                         |
| 0  | > 1,6 x10 <sup>3</sup> | > 1,6 x10 <sup>3</sup> | ≤ 1,0 x 10 <sup>3</sup> |
| 90   | 0,46 x 10 <sup>3</sup> | 0,27 x 10 <sup>3</sup> |                         |
| <b>Thermotolerant coliforms (MPN g<sup>-1</sup>)</b> |                        |                        |                         |
| 0  | > 1,6 x10 <sup>3</sup> | > 1,6 x10 <sup>3</sup> | ≤ 1,0 x 10 <sup>3</sup> |
| 90   | 0,53x 10 <sup>3</sup>  | 0, 53x 10 <sup>3</sup> |                         |
| <b>Salmonella sp (test in 10 g)</b>                  |                        |                        |                         |
| 0  | Absent                 | Absent                 | Absent                  |
| 90   | Absent                 | Absent                 |                         |

T1: control treatment; T2: inoculated treatment

### 3.3.2 Parasitology

The results are shown in Table 2, where similar behavior can be observed in both treatments. Eggs were only found in the first sample (day 0). After this period, no more helminth eggs with viable aspects were found (eggs with intact structures and continuing stage development, such as the presence of larvae). All treatments showed a reduction in the number of larvae throughout the composting process. In the first five days of the thermophilic phase, there was an increase in the number of larvae. At the end of the thermophilic phase, there was a reduction in larvae in the control treatment. However, in the inoculated treatment, this reduction was only observed in the maturation phase, at the end of the process.

The parasitological analyses carried out on the compost are essential because the waste can contain a significant parasite load. Most of the helminth species that parasitize horses, their eggs, and larvae are excreted in the feces. According to the results obtained, only in the initial composting sample, in both treatments, was the presence of viable helminth eggs observed. The elimination of the eggs can be seen as the product of two probable factors: (i) the hatching of the eggs, since the larval development temperature of the cyathostomines was in the range of 10° to 30°C [52], (ii) and the start of the thermophilic phase of the composting process on the second day, which peaked on the 7th day. Studies carried out by Wichuk and Maccartney [53] concluded that temperatures above 55°C for three consecutive days are effective in eliminating viable helminth eggs.

The detection of larvae was observed in the first sample (day 0), in the inoculated treatment, and from the second sample (day 5). In both treatments, the peak detection of larvae was 5 days after the composting process. This is probably due to the hatching of viable eggs. With the increase in temperature and the maintenance of the thermophilic phase, the larvae of the control treatment showed a reduction, while the inoculated treatment kept this number stable, decreasing only in the maturation phase. This reduction may be associated with an increase in the number of fungal colonies obtained through the application of inoculants. Research using fungi of the genus *Aspergillus* sp. as nematophages has shown promising results for the biological control of helminths. These fungi produce different bioactive metabolites with inhibitory potential that act on egg hatchability and larval development [54,55,56].

Tabela 2: Occurrence of viable Strongyloidea helminth eggs in 4g of wet matter and viable Strongyloidea helminth larvae per gram of total solids on different days of the composting process (0, 5, 30, 90), compared to the standards established by MAPA

| Composting time  | T1  | T2 | MAPA         |
|--|-----|----|--------------|
| <b>Viable eggs of Strongyloidea-type helminths/4g of TS</b>    |     |    |              |
| 0  | 148 | 68 |              |
| 5  | 0   | 0  | < 0.25/ g TS |
| 30   | 0   | 0  |              |
| 90   | 0   | 0  |              |
| <b>Viable larvae of Strongyloidea type helminths /4g of TS</b> |     |    |              |
| 0  | 0   | 1  |              |
| 5  | 2   | 2  | 1/ g TS      |
| 30   | 1   | 2  |              |
| 90   | 1   | 1  |              |

T1: control treatment; T2: inoculated treatment

#### 4. Conclusion

By analyzing the results obtained after the joint application of two isolates of the fungus *Aspergillus fumigatus*, the following conclusions can be drawn:

- The inoculated piles had a significant effect on the maturation phase of the composting process, with little effect on the initial phase.
- The inoculated isolates favored the degradation of cellulose and hemicellulose, with no significant effect on the degradation of lignin.
- Both treatments were efficient for microbiological and parasitological control, meeting MAPA standards, but a greater reduction in total coliforms was detected in the compost from the inoculated piles compared to the compost from the control piles.

## References

- [1] Molento, C. F. M. (2005). Bem-estar e produção animal: aspectos econômicos - revisão. *Archives of Veterinary Science*, v.10,1-11.
- [2] Lagomarsino, M. M. (2019) Avaliação e gerenciamento de resíduos do impacto ambiental proveniente de equinos estabulados. Tese de Mestrado (Pós-graduação e Agronegócio) Universidade Federal de Santa Maria - UFSM-RS, Rio Grande do Sul, 48p.
- [3] Wheeler, E.F. (2008). *Horse stable and riding arena design*. John Wiley & Sons, USA, pp. 91–92.
- [4] Westenford, M., Willian, C.A., Murphy, S., Kenny, L., Hashemi, M. (2020). Generation and Management of Manure from Horses and Oter Equids. In: Waldrip, H.M., Pagliari P.H., He, Z.: *Animal Manure: Production, Characteristics, Environmental Concerns, and Management.*, Inc. Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2134/asaspecpub67.c8>
- [5] Fujii, K. Y., Dittrich, J. R., Castro E. A., Silveira, E. O. (2014) Processos de tratamento de resíduos de coqueira e a redução ou eliminação de ovos e larvas infectantes do gênero *Strongylus* spp. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.81, n.3, p. 226-231, 6 p. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000482012>
- [6] Fuechter, J., Oenning, M. C., Otto, T. (2020). COMPOSTAGEM. In: *As Diversidades de Debates na Pesquisa em Matemática 3*. p.50-56, Ed. Atena.
- [7] Chastain, J. P. (2022). Composition of Equine Manure as Influenced by Stall Management. *Agriculture*, 12(6), 823. <https://doi.org/10.2134/asaspecpub67.c8>
- [8] Krogmann, U., Westendorf, M.L., Rogers, B.F. Best. (2006). *Best management Practices for Horse Manure Composting on Small Farms*; Rutgers University: New Brunswick, NJ, USA.
- [9] Keskinen, R., Saastamoinen, M., Nikama, J., Särkijärvi, S., Myllymäki, M., Salo, T., Uusi-kämpä, J. (2017). Recycling nutrients from horse manure: Effects of bedding type and its compostability. *Agric. Food Sci.* 26, 68–79. <https://doi.org/10.23986/afsci.60443>
- [10] Cragg, S.M., Beckham, G.T., Bruce N.C., Bugg T.D., Distel D.L., Dupree P. (2015). Lignocellulose degradation mechanisms across the tree of life. *Curr Opin Chem Biol.* V.29, p.108–19. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.018>
- [11] Santos Júnior, C. D. (2019) Degradação de matéria orgânica terrestre por microrganismos do rio Amazonas–Metagenômica e genômica populacional. 2018. 225f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde) - Universidade Federal de São Carlos.
- [12] Gomes, D. J. S. (2021). Aceleração da compostagem em resposta à inoculação bacteriana. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Instituto de Ciências Agrárias. (Dissertação Mestrado). <https://locus.ufv.br/handle/123456789/27876>. Acesso: 03/02/2023
- [13] Detain, J., Rémond, C., Rodrigues, C. M., Harakat, D., Besaury, L. Co-elicitation of lignocellulolytic enzymatic activities and metabolites production in an *Aspergillus*-

Streptomyces co-culture during lignocellulose fractionation. Current research in microbial sciences, v.3, 100108, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100108>

[14] Behera, S., Arora, R.; Nandhagopal, N., Kumar, S. (2014). Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. Renew Sustain En Rev. v36, p.91–106. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>

[15] DE Gouvêa, P. F., Bernardi, A. V., Gerolamo, L. E.; DE Souza Santos, E., Riaño-pachón, D. M., Uyemura, S. A.; Dinamarco, T. M. (2018). Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse. BMC genomics, v.19, p. 232. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4627-8>

[16] Du, X., Li, B., Chen, K., Zhao, C., Xu, L., Yang, Z., ... & Wu, G. (2021). Rice straw addition and biological inoculation promote the maturation of aerobic compost of rice straw biogas residue. Biomass Conversion and Biorefinery, 11, 1885-1896. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00587-y>

[17] Wang, H.Y., Fan, B. Q; Ying, Z.W. (2021). Effect of inoculation with *Penicillium expansum* on the microbial Community and maturity of compost. Bioresour. Technol. 102 (24), 11189-11193. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.044>

[18] Ferraz, A.; Baeza, J.; Durán, N. (1991) Softwood biodegradation by an ascomycetes *Chysonilia sitophila* (TFB 27441 strain). Letters in Applied Microbiology, Oxford, v.13, p.86-91, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1991.tb00576.x>

[19] Liu, D., Li, J., Zhao, S., Zhang, R., Wang, M., Miao, Y., Shen, Y., Shen, Q. (2013). Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources. Biotechnology for biofuels, 6, 1-16. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-149>

[20] Kwon-Chung, K.J., Sugui, J.A. (2013) *Aspergillus fumigatus* what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? Plos Pathog, 9(12): e 1003743. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003743>

[21] Bernardi, A. V. (2017). Identificação das principais enzimas hidrolíticas de *Aspergillus fumigatus* quando crescido em bagaço de cana-de-açúcar – Dissertação de Mestrado, USP Universidade de São Paulo.

[22] Couger, B., Weirick, T., Damasio, A. R. L., Segato, F., Polizeli, M. L. T. M., DE Almeida, R. S. C., Goldman, G. H., Prade, R. A. (2018) The Genome of a Thermo Tolerant, Pathogenic Albino *Aspergillus fumigatus*. Front. Microbiol. 9, No. 1827. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01827>

[23] Velasco, J., Sepulchro, A. G. V., Higasi, P. M., Pellegrini, V. O., Cannella, D., DE Oliveira, L. C., Segato, F. (2022). Light Boosts the Activity of Novel LPMO from *Aspergillus fumigatus* Leading to Oxidative Cleavage of Cellulose and Hemicellulose. ACS Sustainable Chemistry Engineering. Volume 50, p. 16969–16984. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c06281>.

[24] BRASIL (2017). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e corretivos/Ministério da Agricultura, Pecuária e



Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária., Brasília-DF: MAPA, 240 p.

[25] Brito, L.M. Compostagem para agricultura biológica:Manual de Agricultura Biológica-Terras de Bouro. Disponível em: <http://www.ci.esapl.pt/mbrito/Manual%20de%20AB%20%20compostagem.pdf>. Acesso em: 10/02/2023.

[26] Nascimento, A. G. C. R., Paula, A. M. D., Busato, J. G., Silva, S. G. D., & Texeira Neto, A. R. (2023). Prospection of Cellulolytic Fungi from Composted Samples of Saturated Horse Litter. *Agriculture*, 13(7), 1308. <https://doi.org/10.3390/agriculture13071308>.

[27] Alfenas, A. C.; Mafia, R. G. (2007). Isolamento de Fungos Fitopatogênicos. In: Alfenas, A. C.; Mafia, R. G. Métodos em fitopatologia. Lavras: UFV, p. 53-90.

[28] Tedesco, M.J.; Gianello, C.; Bissani, C. A.; Bohnen, H.; Volkweiss, S. J. (1995) Análises de solo, plantas e outros materiais. 2.Ed. Porto Alegre: Dpto. de solos da UFRGS, 174 p. (Boletim Técnico 5).

[29] Van Soest, P. J. Use of detergents in the analyses of fibrius feeds, 2 (1963) A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal Association Official Analytical Chemical*, Gaithersburg, v. 46, p. 829-835.

[30] Van Soest, P. J., Wine, R. H. (1968) Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. *Journal Association Official Analytical Chemical*, Gaithersburg, v. 51, p. 780-78.

[31] Kornacki, J.L., Johnson, J.L. Enterobacteriaceae, coliforms and Escherichia coli as quality and safety indicators. In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.8, p.69-82.

[32] Andrews, H., Hammack, T. S. (2007). Bacteriological analytical manual. 8ed. New Hampshire:FDA.chap.5.21.Acessado:21/01/2023.<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM244774.pdf>.

[33] BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente- CONAMA. (2006). Resolução nº 375, de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos, para uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estação de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasi, Brasília-DF, p. 141-146.

[34] Gordon, H. M., Whitlock, H. V. (1939). A new technique for counting nematode eggs in sheep Faeces. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research*.

[35] Rugai, E.; Mattos, T.; Brisola, A. P. (1954). Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes; modificação do método de Baermann. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*.

[36] Ferreira, D. (2000). Análises estatísticas por meio do Sisvar para-Windows versão 4.0. 2000. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. 255-258.

[37] Du, G., Feng, W., Cai, H., Ma, Z., Liu, X., Yuam, C., Shi, J., Zhang, B., (2021). Exogenous enzyme amendment accelerates maturity and changes microflora succession in horse and

wildlife animal manure co-composting. *Environ Sci Pollut Res* 28, 21610-21620. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11568-4>.

[38] BRASIL. (2009) Instrução Normativa N° 25, de 23 de julho de 2009, aprova as Normas sobre as Especificações e as Garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a Rotulagem dos Fertilizantes Orgânicos Simples, Mistos, Compostos, Organominerais e Biofertilizantes destinados à agricultura, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília-DF, 18 p.

[39] Afriliana, A., Hidayat, E., Mitoma, Y., Masuda, T. Harada, H. (2021). Studies on Composting Spent Coffee Grounds by *Aspergillus* sp and *Penicillium* sp in Aerobic Static Batch Temperature Control. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 10, 91-112. <https://doi.org/10.4236/jacen.2021.101007>.

[40] Awasthi M.K.; Selvam A; Lai K.M.; WONG J.W.C. (2017). Critical evaluation of post-consumption food waste composting employing thermophilic bacterial consortium. *Bioresource Technol.* p.245-665, n.72. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.014>.

[41] Thiyageshwari, S.; Gayatri, P.; Krishnamoorthy, R.; Anandham, R.; Paul, D. (2018) Exploration of Rice Husk Compost as an Alternate Organic Manure to Enhance the Productivity of Blackgram in Typic Haplustalf and Typic Rhodustalf. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 5, 358. <https://doi.org/10.3390/ijerph15020358>.

[42] Zhang Z., Liu, D., Qiao, Y, Li, S. Chen, Y., Hu, C. (2021) Mitigation of carbon and nitrogen losses during pig manure composting: A meta-analysis, *science of The Total Environment*, Volume 783. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147103>

[44] Andlar, M., Rezić, T., Mardetko, N., Kracher, D., Ludwig, R.; Šantek, B., (2018). Lignocellulose degradation: an overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, vol. 18, no. 11, pp. 768-778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>

[45] Tian, X.; Yang, T.; He, J.; Chu, Q.; Jia, X.; Huang, J. (2017). Fungal community and cellulose-degrading genes in the composting process of Chinese medicinal herbal residues, *Bioresource Technology*, Volume 241, 374-383. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.116>

[46] Fang, W.; Zhang, X.; Zhang, P.; Morera X.C.; Lier J. B.; Spanjers, H. (2020). Evaluation of white rot fungi pretreatment of mushroom residues for volatile fatty acid production by anaerobic fermentation: Feedstock applicability and fungal function, *Bioresource Technology*, Volume 297. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122447>

[47] Adav, S.; Ravindran, A.; Sze, S. K. (2015). Estudo proteômico quantitativo do secretoma de *Aspergillus fumigatus* revelou desamidação de enzimas secretoras. *Journal of Proteomics*, v. 119, p. 154-168, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.02.007>

[48] Zhu, N.; Zhu Y.; Kan, Z.; Li, B.; Cao, Y.; Jin, H. (2021). Effects of two-stage microbial inoculation on organic carbon turnover and fungal community succession during co-composting of cattle manure and rice straw, *Bioresource Technology*. Volume 341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125842>

- [49] Souza, H.A., Oliveira, E.L., Faccioli-Martins, P.Y., Santiago, L., Primo, A.A., M.D. Melo M.D., Pereira G.A.C. (2019). Características físicas e microbiológicas de compostagem de resíduos animais, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.71, n.1, p.291-302. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9735>
- [50] Ferreira, P.F.A., Xavier, J.F., Bartholoto, D.M., Melo, D.A., Correia, T.R., Coelho, S.M.de O., Souza, M.M.S., Leal, M.A.A., Araújo, E.S., Coelho, I.S. (2021). Efeito da compostagem sobre a carga microbiana e parasitária nos resíduos da produção animal no Brasil. International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture. 10:265-273. <https://doi.org/10.30486/i.jrowa.2021.1909128.1132>
- [51] Haseen, T. (2001). Manual for leadership effectiveness scale. Agra: Rakhi Prakashan Company.
- [52] Mfitalidze, M.W.; Hutchinson, G.W. Development and survival of free-living stages of equine strongyles under laboratory conditions. Veterinary Parasitology, v. 23, n. 1-2, p. 121-133. 1987. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(87\)90030-6](https://doi.org/10.1016/0304-4017(87)90030-6)
- [53] Wichuk, K.M.; McCartney, D.A. (2007) Review of the effectiveness of current time temperature regulations on pathogen inactivation during composting. J Environ Eng Sci 6:573-586. <https://doi.org/10.1139/S07-011>
- [54] Khattak, B., Safi, A. U. R., Sindhu, Z. U. D., Attaullah, M., Jamal, Q., Khan, T. A.; Hussain, M., Anjum, S. I., Israr, M., Khan, I. A (2018). Biological control of *Haemonchus contortus* by fungal antagonists in small ruminants. A. Ecol. Environm. Res., v.16, n.5, p.5825-5835. [http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1605\\_58255835](http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1605_58255835)
- [55] Soares, F.E.F.; Sufiate, B.L.; Queiroz, J. H. (2018) Nematophagous fungi: Far beyond the endoparasite, predator and ovicidal groups. Agric. Nat. Resour., v.52, n.1, p.1-8. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.05.010>
- [56] Vieira, T. M.; Fonseca, L. D.; DE Lima, M. D.; Júnior, V. S. M.; DE Souza Cândido, R. C.; DE oliveira, N. J. F.; Duarte, E. R. (2022). Extrato Etanólico e Filtrado do Cultivo de *Aspergillus terreus* na Eclodibilidade e Desenvolvimento de Nematódeos Gastrointestinais de Ovinos e Bovinos. Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde, 26(4), 370-376.

## CAPITULO IV

### **Efeito da inoculação de *Aspergillus fumigatus* sobre a compostagem de cama de palha de arroz para equinos**

#### **Resumo**

A compostagem é um método eficiente e ecológico para o tratamento de camas de equinos saturadas, mas esse processo pode ser demorado e pode gerar um composto de baixa qualidade. Nesse estudo foi avaliado o efeito da inoculação de colônias fúngicas de isolados de *Aspergillus fumigatus*, aplicadas em dias alternados das fases de compostagem (0,15,30 e 45), nas camas de equinos saturadas com o uso de palha de arroz na sua composição. O tratamento inoculado apresentou uma taxa de elevação de temperatura superior à do tratamento controle. Nos dois tratamentos ocorreu uma redução do pH na fase inicial do processo, um aumento na fase de resfriamento e maturação, e estabilização no final do processo. A condutividade elétrica (C.E.) no tratamento inoculado se manteve menor que no controle ao longo do processo. Os índices de nitrogênio total (N.T.), carbono orgânico total (C.O.T.), relação C/N, e a degradação da ligninocelulose, não mostraram diferença significativa entre os tratamentos. Com base nas análises realizadas a inoculação de *Aspergillus fumigatus* não foi eficaz para otimizar o processo de compostagem de camas de equinos saturadas com o uso de palha de arroz.

**Palavras chaves:** Microrganismo, cavalo, composto, sustentabilidade

#### **1. Introdução**

A criação de cavalos é uma atividade que vem se expandindo no Brasil, colocando o país entre os principais mercados das Américas, possuindo um plantel superior a 5,7 milhões de equinos (IBGE, 2022). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, após realizarem um estudo do complexo agronegócio do cavalo, em parceria com outras instituições, relatou que a criação de cavalos movimentava cerca de R\$ 16,15 bilhões por ano e gera 610 mil empregos diretos e 2.430 mil empregos indiretos (MAPA, 2016).

Há uma busca constante nesse ciclo produtivo por técnicas ambientais sustentáveis, principalmente, em relação ao descarte correto de camas saturadas das baias que contém, além de esterco (fezes e urina), material recalcitrantes como a palha de arroz (De Souza 2017). Um cavalo com peso médio de 450 Kg pode produzir de 14 a 23 kg de esterco diariamente, sendo 31g de fezes e 20 ml de urina por quilo de peso corporal (Wheeler *et al.*, 2009). Esses resíduos quando não manejados corretamente e utilizados como matéria orgânica diretamente, sem tratamento, podem causar impactos ambientais negativos e sanitários importantes.

A poluição do ar, do solo e da água, devido ao excesso de nitrogênio, fósforo e carbono; a transmissão e a manutenção de focos de infecções, pela propagação de agentes patogênicos, pela inserção de bactérias resistentes a antibióticos e genes de resistências a antibióticos (ARGs); o acúmulo de metais pesados e substâncias tóxicas e a emissão de material

particulado e gases de efeito estufa são algumas das consequências dos descartes inadequados dos resíduos (Guzmán Anaya, 2021, Kabelitz *et al.*, 2021, Lima *et al.*, 2020, Chen *et al.*, 2019, Zubair *et al.* 2020).

A utilização do processo de compostagem para a reciclagem desses resíduos pode ser uma alternativa viável e ambientalmente sustentável, por serem técnicas acessíveis, de fácil implementação, redução de volume de resíduos bem como uma importante ferramenta da gestão de saneamento. Contudo, a degradação pode sofrer variação sobre o tempo de processamento, conforme a composição química dos substratos e a disponibilidade de nutrientes do material orgânico podendo tornar-se demasiadamente lento e influenciar o produto ao final do processo que podem conter valores nutricionais baixos se comparadas aos dos fertilizantes industriais (Busato; De Paula; Ferrari, 2019).

Os substratos usados para fazer a cama dos cavalos, como a palha de arroz, podem conter alto índice do complexo lignina-carboidrato, ou seja, carbono orgânico resistente (celulose, hemicelulose) e lignina, que dificultam o processo de compostagem tradicional, pois a atividade de degradação microbiana pode ser insuficiente para decompor essas substâncias (Gou *et al.*, 2017, Zhu *et al.*, 2021,).

A aplicação de microrganismos especializados em degradar a lignocelulose pode ser uma estratégia eficaz para aumentar a velocidade e a qualidade da compostagem desse tipo resíduo orgânico. Esses microrganismos são capazes de quebrar as moléculas complexas de lignina e celulose, liberando nutrientes essenciais e otimizando o processo de compostagem (Gao *et al.*, 2023). Assim, a inoculação desses microrganismos pode contribuir para o manejo sustentável dos resíduos.

Entretanto, as inoculações fúngicas estão sujeitas a sofrer diversas influências, como competições da fauna microbiana, tempo e estratégia de inoculação (Greff, 2022). A inoculação de colônias fúngicas que ocorrem naturalmente na compostagem tem se mostrado promissora, por estas colônias desempenharem um papel importante na eficiência da decomposição da matéria orgânica favorecendo o crescimento de microrganismos desejáveis acelerando o processo de compostagem sem desequilibrar a microbiota nativa, mantendo assim o equilíbrio biológico do sistema (Wan *et al.*, 2020, Selvamani *et al.*, 2019, Xu *et al.*, 2019).

Estudos realizados por Nascimento *et al.*, (2023), avaliaram a atividade celulolítica de fungos isolados do próprio composto de cama saturadas de equinos formada com palha de arroz. Nessa pesq foram obtidos sete isolados da espécie *Aspergillus fumigatus* que possuíam

potencial para produção da celulase, importante enzima envolvida na degradação e transformação da lignocelulose.

O presente estudo objetivou avaliar as alterações físicas, químicas e biológicas, ao longo do tempo, do processo de compostagem de cama saturadas de equinos com substrato de palha de arroz após a inoculação, conjuntamente, de duas cepas diferenciadas de *Aspergillus fumigatus*, isoladas do próprio composto.

## **2. Material e métodos**

### *2.1 - Processo de compostagem e amostragem*

O experimento foi conduzido no Hospital Veterinário de Grandes Animais da Faculdade de Agricultura e Medicina Veterinária, da Universidade de Brasília (HVet-UnB), localizado próximo à Asa Norte, Granja do Torto, latitude -15°74'93". longitude - 47°87' 64', altura 1028 m. O sistema de compostagem foi realizado em galpão coberto de 35 x 13 m<sup>2</sup> com piso impermeável. Foram utilizados no experimento seis equinos sem raça definida, com idades entre 3 e 10 anos. A dieta dos animais era baseada em 1 kg de concentrado duas vezes ao dia (manhã e tarde), feno de tifton (*Cynodon spp.*), sal mineral e água a vontade.

As camas foram preparadas com altura de 8 cm, constituídas por substrato por palha de arroz. Os animais foram mantidos em baias, durante 15 a 20 dias, quando os resíduos (fezes, urina e substrato) eram retirados, de acordo com a saturação das camas. Os resíduos das cocheiras, coletados no momento da limpeza diária, eram transportados para a confecção das pilhas no galpão coberto. Foram montadas seis pilhas dúbidas (três para o controle e três para a aplicação do inóculo). As pilhas foram dispostas, lado a lado, em formato trapezoidal com dimensões de 1,80 x 0,90 x 2,10 m<sup>2</sup>, antevisto o espaço para o revolvimento com a mesma dimensão. O processo de compostagem seguiu com o sistema aeróbio de fermentação, em ambiente fechado, com processo lento de decomposição de diferentes volumes que dependiam do fluxo de produção do substrato obtido das camas saturadas oriundo das baias.

### *2.2 - Preparação de microrganismo e inóculo*

As pilhas de compostagem dos resíduos de cama saturadas de equinos com substrato de palha de arroz formam montadas para o isolamento e seleção de fungos termofílicos com habilidades de degradação da celulose como detalhado em Nascimento et al., (2023). Foram selecionados dois isolados com melhor produção e identificados como fungos filamentosos lignocelulolíticos pertencentes a espécie *Aspergillus fumigatus* (Nascimento, 2023).

As cepas fúngicas selecionadas foram cultivadas em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) por sete dias a 30°C em incubadora antes de serem inoculadas. Em seguida, contou-se o número de esporos usando uma câmara de Neubauer. Preparou-se uma suspensão inoculada com a associação dos dois isolados, diluindo-os com água destilada e raspando as placas. Adicionou-se 30mL de água destilada sobre a colônia e raspou-se para liberar os esporos. Ajustou-se a concentração da solução com água destilada para obter  $1 \times 10^7/\text{mL}$  (Alfenas et al., 2007). A quantidade de esporos dos dois isolados foi de  $8.8 \times 10^7/\text{mL}$  e  $3.4 \times 10^7/\text{mL}$ , respectivamente, após o ajuste. Aplicou-se a suspensão final nas pilhas de compostagem na proporção de 5:1 (5ml de suspensão para cada kg de substrato de compostagem). Fez-se aplicações seriadas em quatro períodos durante o processo de compostagem (0, 15, 30 e 45 dias de compostagem). Misturou-se a suspensão fúngica uniformemente nas pilhas que receberam o inóculo. O tratamento controle não foi inoculado.

### 2.3 - Determinação das propriedades físico-químicas

Os dados relacionados à temperatura foram coletados diariamente, durante 90 dias. Foi utilizado um sistema automático (*datalogger*) com uso de dois sensores de temperatura DS18S20 com encapsulamento de aço inox e cabos de 3 metros, por pilhas colocados em diferentes profundidades (40 e 60 cm). Os sensores possuíam sensibilidades de 0,5°C, atuando na faixa de valores entre -55° e 125°C. A frequência de registro dos dados foi programada para 60 minutos. Os dados do micro SD foram armazenados em planilhas do programa Microsoft Excel. Em seguida, foram realizados os cálculos de média aritmética e análise estatística descritiva da temperatura das composteiras.

Para realizar a análise química, as amostras foram coletadas quinzenalmente (0,15,30,45,60,75,90). As alíquotas foram de cerca de 500g de material misturado, obtidas após revolvimento das pilhas.

As análises químicas do potencial de hidrogênio (pH) foram determinadas em amostras *in natura* durante o processo de compostagem. A metodologia foi baseada no método de Tedesco et al., (1995), o valor do pH foi obtido em triplicata usando agitador magnético e pHmetro com um medidor equipado com um eletrodo de vidro (Tec5, TECNAL). Após a agitação da amostra a determinação foi realizada em água e em  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol/L<sup>-1</sup> na proporção de 1: 5 (p / v).

A Condutividade Elétrica (C.E.), foi realizada com equipamento convencional de determinação da condutividade (condutímetro microprocessado Q405M-QUIMIS), ajustado

a partir da condutância de células fixadas em eletrodos seguindo a metodologia descrita pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2017).

Para a determinação do carbono orgânico total (COT), as amostras foram submetidas ao método volumétrico de dicromato de potássio seguindo a metodologia de Walkley-Black modificada. O método consiste na oxidação do carbono com íons de dicromato em meio fortemente ácido, e a determinação da quantidade de íons  $\text{Cr}^{3+}$  reduzido é feita por titulação do dicromato em excesso com íons  $\text{Fe}^{2+}$ . O nitrogênio total (NT) foi determinado, segundo a metodologia de Kjeldahl, baseado na digestão da amostra com ácido sulfúrico (Tedesco, 1995). A técnica consiste na digestão do material por peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) com mistura de digestão catalítica composta por selênio e cobre à alta temperatura, elevando-se gradualmente até  $320^\circ\text{C}$  em bloco digestor. Para determinação do nitrogênio total, a amostra digerida foi destilada, após a adição de hidróxido de sódio (NaOH) 50%, em destilador de nitrogênio, recolhendo-se o condensado em solução de ácido bórico-indicador. Em seguida, a titulação do destilado foi feita com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,03N utilizando o titulador automático. A razão entre C/N foi calculada a partir do quociente entre o COT (dag/kg) e NT (dag/kg) da amostra.

A metodologia de Van Soest (1963) e Van Soest e Win (1968) foi utilizada para estimar os teores de hemicelulose, celulose e lignina. A hemicelulose foi calculada pela diferença entre a fibra detergente neutro (FDN) e a fibra detergente ácido (FDA). A celulose foi calculada pela diferença entre a FDA e a lignina. A lignina foi determinada por meio da digestão do resíduo com ácido sulfúrico concentrado a 72%, seguida de incineração a  $500^\circ\text{C}$  por 2 horas.

#### 2.4 - Determinação de microrganismos patogênicos

Para a determinação da flora microbiológica foram realizadas coletas de amostras no dia zero (fase inicial) do processo de compostagem e com 90 dias do processo (fase final de maturação) onde uma amostra composta de cerca de 30 g foi obtida a partir da homogeneização de 7 amostras simples coletadas em diferentes pontos de cada pilha. Foram utilizados como indicadores bacteriológicos patogênicos a presença de *Escherichia coli* (*E. coli*), para coliforme fecais e *Salmonella* sp., a partir de 10 g de amostras de resíduos *in natura* do composto orgânico. As análises de *E. coli*, foram realizadas pela técnica do substrato cromogênico enzimático utilizando o método de detecção Colilert, em Seladora Quanty-Tray, Modelo 2X (IDEXX, Rydalmere, Austrália), seguindo a instrução do fabricante e, posteriormente, incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 24hs. A leitura dos poços foi realizada sob luz ultravioleta onde os que apresentavam fluorescência azul eram considerados positivos. Controle negativo (água estéril) foi utilizado



nos testes. Após contagem das células dos poços da cartela, utilizou-se a tabela estatística do Número Mais Provável (NMP), do sistema Quanti-Tray, para a determinação do NMP/g de sólidos totais (ST), de *E. coli* (Morgado, 2008). As análises de *Samonella* sp. foram realizadas, seguindo a metodologia de Andrews *et al.* (2018), por meio de pré-enriquecimento em água peptonada e enriquecimento seletivo em meio Rappaport-Vassiliais, seguido de plaqueamento diferencial em ágar seletivo *Samonella-Shihgella* e ágar MacConhey. Posteriormente, as colônias com aspectos compatíveis com o gênero *Samonella* sp., foram confirmadas pelo comportamento bioquímico nos meios: caldo ureia, ágar citrato de Simmons, ágar fenilalanina, ágar tríplice-ferro-açúcar, meio motilidade-lisina-indol, meio Vermelho de Metila e meio Vorges Proskauer.

Os indicadores parasitológicos foram analisados, pela presença de ovos e larvas do tipo *Strongyloides* spp. As análises parasitológicas foram realizadas pela contagem de ovos por grama de composto (OPG), técnica coproparasitológica quantitativa (Gordon; Whitlock, 1939). Os ovos de *Strongyloides* spp., foram visualizados e contados utilizando microscopia óptica (aumento 100x). A identificação foi fundamentada nas características morfológicas particulares do gênero, tais como conteúdo dos ovos, espessura da membrana externa, entre outras (Soulsby, 1987). Para a recuperação e quantificação do número de larvas presente em cada amostra utilizou-se a técnica de Baermann modificada, descrita por Rugai *et al.* (1954), após recuperadas foram visualizadas e contadas, também, pela microscopia óptica (aumento 100x).

### 2.5 - Análise estática

Foi realizada a análise de variância (ANOVA), considerando as variáveis de todas as amostragens, ao longo do tempo do processo de compostagem, e o efeito da inoculação nas variáveis em cada tempo e foram comparadas pelo teste “t” de Student a significância de 1% e 5% e de probabilidade, quando encontradas diferenças significativas. As análises estatísticas foram realizadas pelo software SISVAR 4.0 versões 5.6. (FERREIRA, 2000).

## 3. Resultados e discussão

### 3.1 Efeito da aplicação do inóculo na temperatura (análise física)

Durante o processo de compostagem a temperatura pode mudar de acordo com as diferentes fases de decomposição da matéria orgânica. Essas mudanças indicam as alterações na atividade microbiana (Liu *et al.*, 2019).

Os dados coletados da variação da temperatura durante o período de avaliação podem ser observados na Figura 1. Em ambos os tratamentos a temperatura inicial foi de 35°C. A elevação da temperatura (fase de aquecimento) foi observada logo no primeiro dia. A partir do segundo dia iniciou-se a fase termofílica, o tratamento que recebeu inoculação atingiu temperaturas superiores nessa fase que variou de 61°C a 48°C em relação ao tratamento controle variando de 57°C a 45°C. Na fase de resfriamento as médias de temperatura do composto que recebeu a inoculação foram menores em relação ao controle (entre 40°C e 37°C e 42°C e 44°C respectivamente). Não se observou diferença entre as médias de temperatura entre os tratamentos na fase de maturação (a partir dos 35 dias).

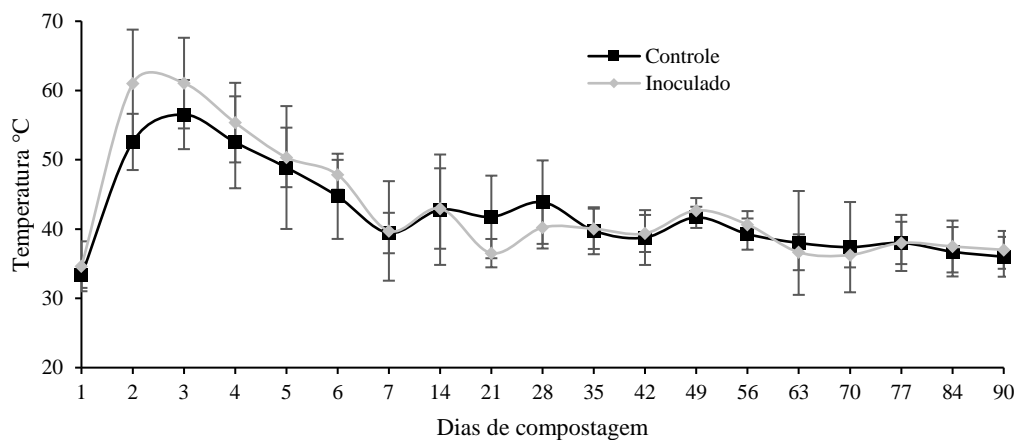


Figura 1 - Média de temperatura dos pontos de medição ao longo do processo de compostagem da cama de equinos com substrato de palha de arroz, do tratamento controle com aplicação de inóculo.

A temperatura é um dos parâmetros básicos do processo de compostagem, pois afeta diretamente o processo biológico, principalmente na sucessão e evolução microbiana, na eliminação de patógenos e, afeta diretamente a eficiência do processo (Wang *et al.* 2019). O presente estudo mostrou que as pilhas inoculadas com *A. fumigatus* atingiram temperaturas mais altas na fase termofílica (7 dias) de 61 °C, em média 8 °C a mais que o composto controle, indicando que o microrganismo inoculado foi ativo desde a primeira inoculação maximizando a temperatura. No entanto, não foi observada diferença no tempo da fase termofílica entre os compostos. Estudo de Wu *et al.* (2019) demonstraram que a aplicação de inoculantes comerciais (CTA – Composite Trichoderma Agent) durante a compostagem conjunta de esterco suíno e palha de arroz conseguiu manter a temperatura acima de 55 °C, por 11 dias. Outros estudos com inoculantes biológicos observaram aumento de temperatura na co-compostagem com resíduos de palha de arroz. Chi *et al.*, (2020) ao analisar o processo de compostagem de esterco suíno com resíduos de palha de arroz inoculado com microrganismo (JSP-1 *Streptomyces griseorubens*) observaram aumento significativo da fase termofílica do composto inoculado

(>60°C) em relação ao controle. (> 50°). Jiang *et al.* (2021), estudaram a aplicação de inóculo fúngico (*Aerobasidium paleasum* - DW1) em áreas frias atingindo temperaturas acima de 60 °C, por 10 dias com compostos inoculados, superiores ao controle que atingiu 55,5 °C, indicando o potencial de aplicação de fungos em processo de compostagem com resíduos de palha de arroz. A utilização de fungos nos resíduos orgânicos provocou um aumento da temperatura média em 8°C, em comparação ao controle durante o processo de compostagem, mas não influenciou a duração da fase termofílica. Essa fase é relevante para a remoção de patógenos e sementes de plantas invasoras, assim como ativação de microrganismos lignocelulolíticos. Os fungos podem contribuir para acelerar a decomposição da matéria orgânica e a gerar um composto de melhor qualidade (Andrade *et al.*, 2021).

### 3.2 Alterações no perfil de pH e condutividade elétrica (C.E)

A atividade microbiana durante a degradação da matéria orgânica é influenciada e influencia as mudanças de pH (Voběrková *et al.*, 2017). As amostras analisadas mostraram uma variação semelhante entre os tratamentos, sem diferenças significativas ( $p>0.01$ ) nas fases de aquecimento, termofílica e de maturação conforme observado na figura 2a e 2b. Na fase de aquecimento, termofílica (0 ao 15 dia) houve uma alteração gradual de condições alcalinas (pH em água de 9,1 para 8,7 e pH CaCl<sub>2</sub> de 8,5 para 7,5) nos dois tratamentos. Nas primeiras etapas da compostagem, ocorre uma queda do pH devido à alta atividade dos microrganismos que degradam a matéria orgânica e produzem ácidos orgânicos como subprodutos, acidificando o meio (Voběrková *et al.*, 2017, Li *et al.*, 2023). Observou-se diferença significativa ( $p<0.01$ ) entre os tratamentos na fase de resfriamento (15 ao 30 dia); o tratamento controle atingiu valores inferiores (pH em água 7,7 e pH em CaCl<sub>2</sub> 6,5) em relação ao inoculado (pH em água 8,3 e pH em CaCl<sub>2</sub> 7,1).

Na fase de maturação foi observado o aumento do pH após 30 dias do processo, os tratamentos permaneceram alcalinos até 75 dias do composto e finalizando com pH neutro em água 7,3 para o controle e 7,5 para o tratamento inoculado e ligeiramente ácido em pH em CaCl<sub>2</sub> 6,4 em ambos os tratamentos. Uma possível explicação para o aumento dos valores de pH para condições alcalinas ao longo do tempo é a hidrólise das proteínas e a degradação dos ácidos orgânicos presentes nos meios que produzem quantidade significativa de amônia elevando assim os índices de pH (Jain *et al.*, 2019, Zhang *et al.*, 2021, Li *et al.* 2023).

A C.E uma medida da capacidade de uma solução de conduzir corrente elétrica, que depende da presença e da quantidade de sais dissolvidos (Gondeck 2019). Durante os primeiros 15 dias, não houve diferença significativa ( $p>0.05$ ) na C.E entre os tratamentos, que

apresentaram uma redução de 1,6 mS/cm para 1,4 mS/cm no controle e de 1,54 mS/cm para 1,3 mS/cm no inoculado, como mostra a Figura 2 c. Essa redução pode ser explicada pelo consumo de nutrientes pela microbiota do composto, que gera subprodutos orgânicos que diminuem a concentração de íons na solução (Jiang-Ming, 2017, Zhang *et al.*, 2017). A partir dos 15 dias, observou-se uma diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os tratamentos na fase de maturação do composto. O tratamento controle mostrou um aumento na C.E de 1,4 mS/cm para 1,8 mS/cm entre os dias 15 e 45, enquanto o tratamento inoculado apresentou um aumento mais tardio e menor, de 1,3 mS/cm para 1,5 mS/cm entre os dias 30 e 60. Esse aumento pode ser atribuído à biodegradação dos compostos orgânicos e à liberação de íons minerais na solução (Gondek *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2022). O tratamento inoculado teve uma atividade microbiana mais lenta e menos intensa do que o controle, o que pode ter influenciado na C.E do composto.

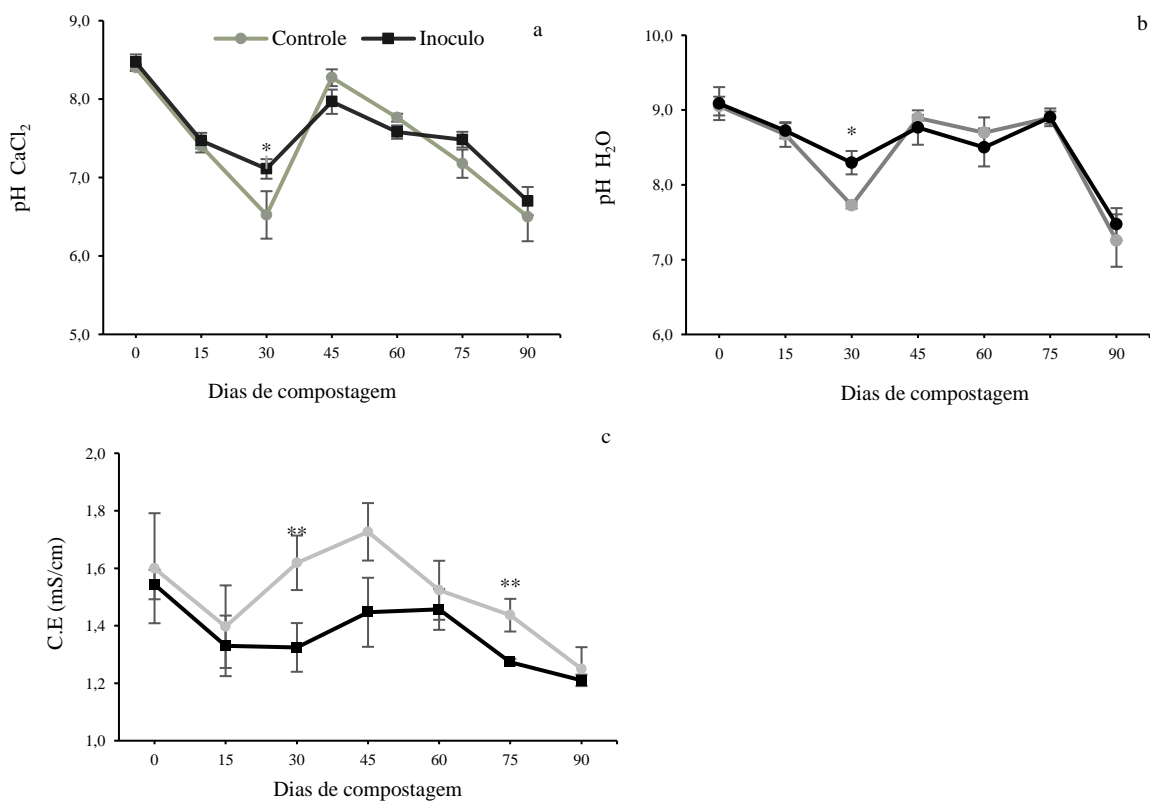


Figura 2 - Valor médio de pH em CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup> (a), pH em água (b) e (c) Médias de Condutividade Elétrica (C.E) em mS.cm<sup>-1</sup> no composto do tratamento controle e inoculado obtidos em diferentes dias do processo de compostagem.

\* Mostra diferença significativa ( $p < 0.01$ ). (Student t-test)

\*\*Mostra diferença significativa ( $p < 0.05$ ). (Student t-test)

### 3.3 Alterações nos parâmetros de COT, NT e relação C/N

As mudanças observadas nos parâmetros químicos NT, COT e relação C/N ao longo do tempo de compostagem estão demonstradas na figura 3 (a, b e c).

A disponibilidade de N na mistura de compostagem é um fator importante para o desempenho dos microrganismos e a velocidade de decomposição da matéria orgânica, pois o N é essencial para a formação de proteínas e o crescimento celular dos microbiano (Greff et al. 2022). Não houve diferença significativa nos índices de NT entre os tratamentos analisados ( $p > 0.05$ ). Na fase inicial do processo (dia 0) o tratamento inoculado apresentou os índices de NT de 1,6 dag/kg e após 90 dias de compostagem o NT aumentou para 2,1 dag/kg, já o controle apresentou um índice de 1,5 dag/kg na fase inicial e 2,2 dag/kg após 90 dias. Wang et al. (2020) realizaram uma pesquisa sobre as alterações físico-químicas e a dinâmica fúngica da compostagem de dejetos de suínos e palha de arroz. Eles observaram que os níveis de NT aumentaram progressivamente ao longo dos 85 dias de compostagem e que o *A. fumigatus* foi o fungo predominante isolado durante o processo. Contudo a disponibilidade de N é considerada um fator crítico que podem afetar a sobrevivência e limitar o crescimento e a reprodução dos fungos (Zhang, 2023). Os baixos valores de NT apresentado pelo composto (próximos a 1,6 dag/kg pode ter reduzido a eficiência no fungo inoculado).

O carbono é o elemento básico que constitui a maior parte dos microrganismos, tendo uma importância crítica no processo de decomposição da matéria orgânica (Temel, 2023). A degradação do carbono orgânico resulta na formação de substâncias húmicas, que são compostas por ácidos húmicos e ácidos fúlvicos. Os ácidos húmicos são formados por estruturas mais complexas, como celulose, hemicelulose e lignina, que conferem estabilidade e resistência à decomposição. Os ácidos fúlvicos são estruturas de menor peso molecular, que são mais solúveis e reativas a degradação (Oliveira 2020, Ren *et al.* 2023). No início do experimento (dia 0), os teores de concentração COT foram semelhantes nos dois tratamentos (próximos a 45 dag/kg). Os tratamentos não apresentaram diferença significativa ( $p > 0.05$ ) ao longo do processo de compostagem. Resultado semelhantes foram encontrados por Fetti (2014) que estudou o efeito da aplicação de colônias de fungos constituído principalmente por cepas de *A. fumigatus* no processo de compostagem de lixo urbano e observou que os perfis de redução do carbono foram similares entre o controle (22%) e o tratamento (32%).

O processo de degradação da matéria orgânica resultou em uma diminuição da relação C/N nos dois tratamentos, inoculado e controle. A redução foi de 43% no inoculado e de 48% no controle, sem diferença estatística significativa entre eles. A relação C/N inicial dos

tratamentos foi de 28/1 para o inoculado e 29/1 para o controle, e na fase final foi de 16/1 em ambos os casos.

Um estudo recente avaliou a capacidade do fungo *Aspergillus fumigatus* de produzir enzimas que degradam a lignocelulose (CMCase) em diferentes condições. Os autores encontraram que, em condições in vitro, as cepas do fungo apresentaram uma alta atividade enzimática (Nascimento *et al.*, 2023), possivelmente devido à padronização de fatores como temperatura, umidade, pH e fonte de carbono. No entanto, em condições in vivo, utilizando palha de arroz como substrato, não houve uma melhora significativa na degradação da matéria orgânica. Tal fato pode ser explicado pela dificuldade de controlar as variáveis do processo, pela porosidade do material e pelas alterações ambientais que podem afetar o desempenho do microrganismo inoculado.

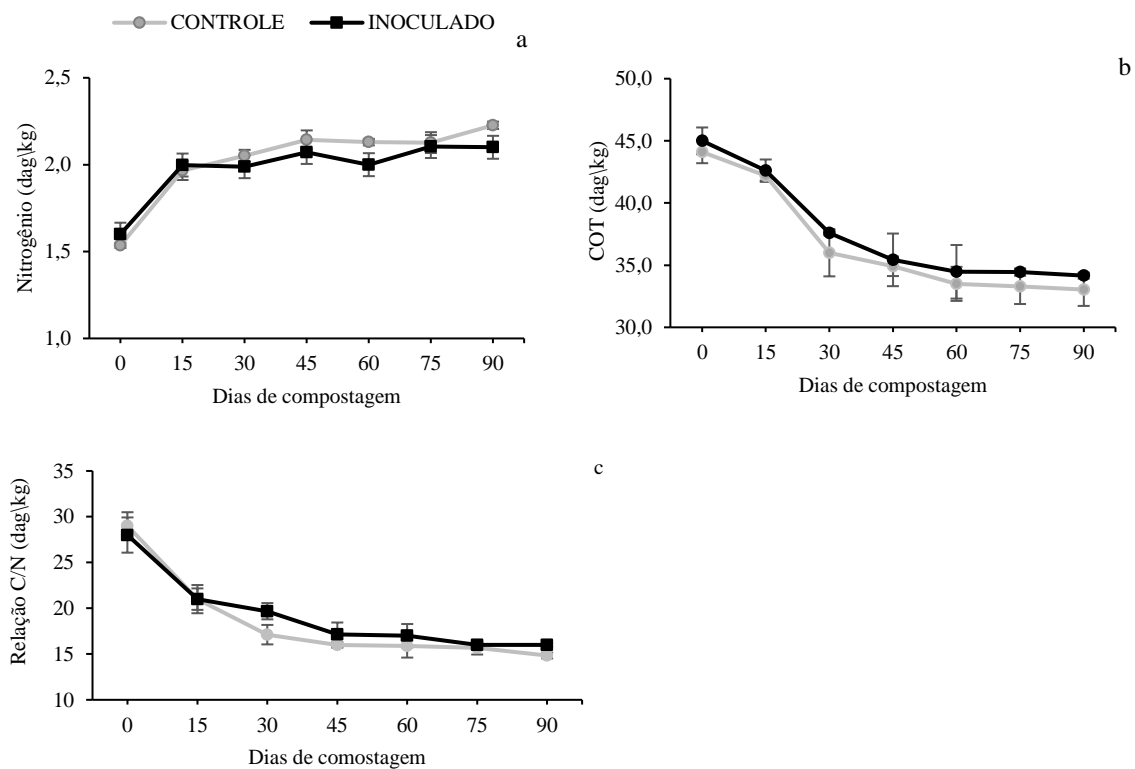


Figura 3-Valor médio de Nitrogênio Total (a); Valor médio Carbono Orgânico Total (b); Valor médio Relação C/N (c), do composto no tratamento controle e inoculado obtidos em diferentes dias do processo de compostagem.

### 3.4 Análises da biodegradação do material lignocelulolítico

A decomposição de materiais lignocelulósicos tem um papel fundamental no ciclo do carbono durante o processo de compostagem, as mudanças nas taxas de degradação da

lignocelulose forma mostradas na Figura 4 (a, b e c). A lignocelulose é composta principalmente por hemicelulose, celulose e lignina, que são degradadas durante a compostagem em açúcares simples e compostos aromáticos, respectivamente. Estes últimos são precursores das substâncias húmicas, que se formam principalmente na fase de maturação da compostagem (Andlar *et al.* 2018, Zhu *et al.* 2021). No início da compostagem, os teores de hemicelulose foram semelhantes no tratamento inoculado e no controle, com 21,9% e 22%, respectivamente ( $p > 0.05$ ). A fase termofílica foi a mais intensa na degradação da hemicelulose com uma redução de 18,8% no controle e 21,3% no tratamento inoculado. Na fase de maturação não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Os precursores das substâncias húmicas são os compostos fenólicos, que se originam da degradação de polímeros vegetais durante a compostagem (Andlar *et al.*, 2018, Zhu *et al.*, 2021).

A hemicelulose é outro componente da parede celular vegetal que sofre degradação durante o processo. No presente estudo não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto ao teor de hemicelulose ( $p > 0.05$ ). No início da compostagem, os teores de hemicelulose foram semelhantes no tratamento inoculado e no controle, com 21,9% e 22%, respectivamente. A fase termofílica foi a mais intensa na degradação da hemicelulose, com uma redução de 18,8% no controle e 21,3% no tratamento inoculado. Os resultados encontrados divergem de Xu *et al.* (2019) que ao estudar a inoculação de um misto microbiana contendo *Bacillus sp.e Aspergillus sp.* em composto de esterco bovinos, observaram uma melhor eficiência na degradação da hemicelulose do que o tratamento controle.

Os valores iniciais dos teores de celulose foram de 45% para o tratamento controle e 43% para o tratamento inoculado. A biodegradação da celulose foi mais intensa na fase termofílica do experimento com o tratamento inoculado, que apresentou uma redução de 16,36% nesse componente, enquanto o grupo controle teve uma redução de apenas 4,4% ( $p < 0.01$ ). Isso demonstra que o tratamento inoculado foi mais eficaz na degradação da celulose do que o controle nessa etapa do processo. *A. fumigatus* possui alta capacidade de produção de enzimas capazes de quebrar a celulose com atividade expressiva em temperatura entre 40 e 60°C, demonstrando a natureza termofílica desta linhagem (Gouvêia *et al.*, 2018).

A lignina apresentou uma menor degradação em relação à celulose e à hemicelulose, o que pode ser atribuído à sua complexa estrutura tridimensional com muitas ramificações (Xu *et al.* 2019). No final do processo de compostagem, os níveis de lignina diminuíram 25% para o

tratamento controle e 21% para o inoculado, sem diferença significativa entre os tratamentos ( $p>0,05$ ). Neste experimento, a inoculação com *A. fumigatus* não teve efeito na decomposição da lignina. Os resultados divergem dos encontrado por Zhou *et al.* (2015), que estudou a aplicação de consorcio de fungo (*Hermoactinomyces* sp. e *Thermoactinomyces* sp) em diferentes fases do processo de compostagem com uso de esterco de bovinos e palha de arroz, que foram inoculados em diferentes estágios do processo de compostagem de esterco bovino e palha de arroz. Eles observaram que as pilhas inoculadas foram mais eficientes na degradação da lignina (45%) do que o grupo controle (15%) na fase de maturação.

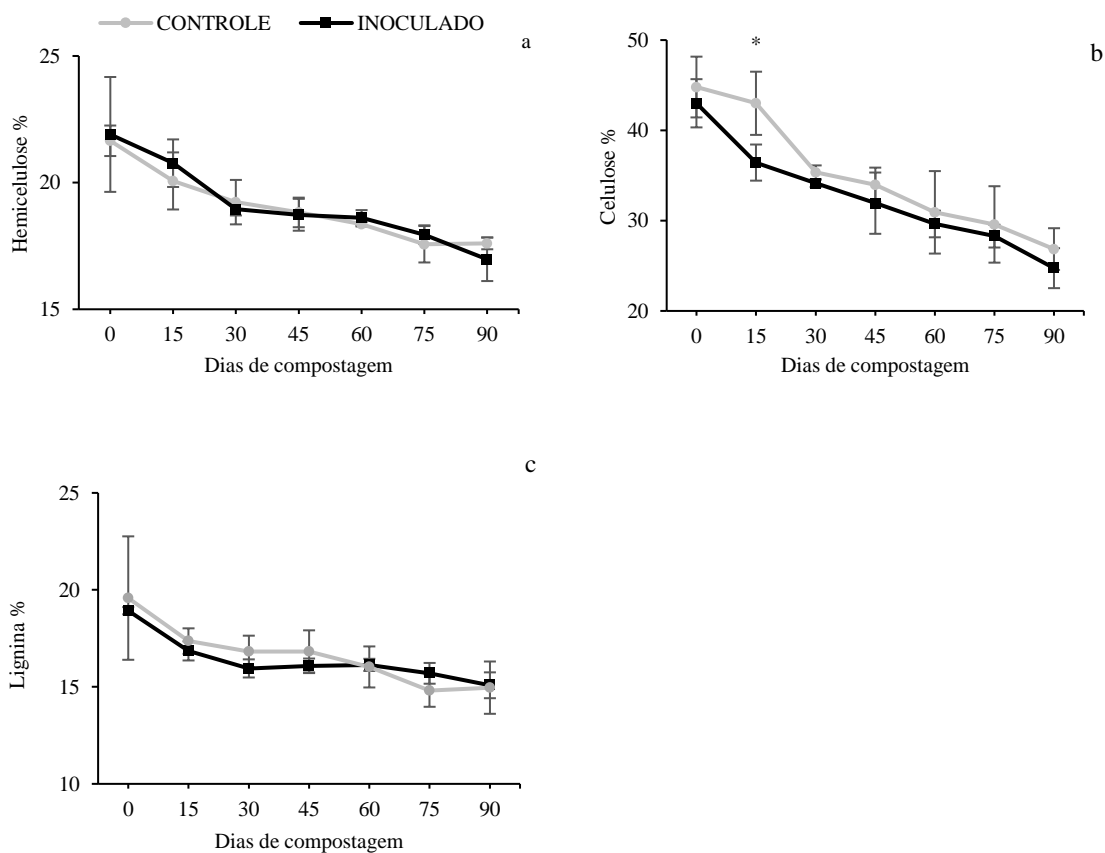


Figura 4 -Variação média expressa em porcentagem do teor de degradação de componentes da lignocelulose durante o processo de compostagem nos tratamentos controle e inoculados obtidos em diferentes dias. Taxa de degradação da hemicelulose (a); taxa de degradação da celulose (b); taxa de degradação da lignina (c).

\* Mostra diferença significativa ( $p<0.01$ ). (Student t-test).

### 3.5 Eficiência da eliminação de agentes bacteriológicos patogênicos

A quantificação do NMP de *E. coli* na fase inicial (dia 0) e fase final (90 dias) do processo de compostagem estão representadas na tabela 1. Pode-se observar que houve



diminuição significativa em ambos os tratamentos. O tratamento controle iniciou o processo com os números mais prováveis de bactérias superior a  $125 \times 10^3$  NMP  $g^{-1}_{(st)}$  reduzindo para números menores que  $1 \times 10^3$  NMP  $g^{-1}_{(st)}$  e o tratamento inoculado iniciou com números superiores a  $813 \times 10^3$  NMP  $g^{-1}_{(st)}$  e reduziu ao final do processo para menos de  $9 \times 10^3$  NMP  $g^{-1}_{(st)}$ . Em ambos os tratamentos não foi detectada a presença de *Salmonella sp* em nenhuma das amostras experimentais. Como esperado, os tratamentos mostraram elevados níveis de *E. coli* no início do experimento (dia 0), devido à origem fecal do material. A utilização de resíduos de esterco animal na compostagem inicial pode acarretar a presença de patógenos, que devem ser eliminados por um processo de compostagem adequado para evitar riscos à saúde animal e humana, bem como ao ecossistema (Li *et al.*, 2021).

A eliminação de microrganismos nocivos depende da combinação adequada de temperatura e tempo durante a fase termofílica do processo de compostagem (Manga *et al.*, 2023). Para garantir a qualidade sanitária do composto, recomenda-se que as pilhas de material orgânico sejam mantidas a uma temperatura mínima de 55 °C por pelo menos 15 dias e 60°C por 3 dias (Manga *et al.*, 2023). No entanto, esse critério isolado não é suficiente para assegurar a inocuidade do produto, pois outros fatores podem influenciar na redução dos patógenos, como o pH, a umidade, a aeração e a granulometria (Lepesteur *et al.*, 2022).

Nas leiras compostas em ambos os tratamentos, houve uma diminuição de 99% na contaminação bacteriana de coliformes fecais. O tratamento inoculado, embora tenha alcançado temperaturas acima de 60°C por três dias seguidos e tenha reduzido significativamente a contaminação bacteriana (99%), não atendeu aos padrões exigidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2009). Possivelmente, isso se deve à alta contaminação de coliformes presentes no material orgânico proveniente das fezes dos animais usados para formar a leiras do composto que foram inoculadas.

A partir da correlação entre o dado levantado no presente estudo e os resultados das análises bacterianas, pode-se inferir que o processo de compostagem das camas saturadas de equinos imunossuprimidos requer maior investigação. Isso se deve ao fato de que o somente o critério tempo-temperatura durante a fase termofílica da compostagem pode não ser suficiente para eliminar os agentes patogênicos presentes nas camas. Estudos realizado por Vasconceles *et al.*, (2019) analisou a compostagem de poda de árvore e resíduos alimentares urbanos com e sem tela de sombreamento, e verificou que os compostos sem tela de sombreamento

apresentaram altos níveis de coliformes termotolerantes na matéria prima ( $7,1 \times 10^4$  NMPg<sup>-1</sup>), o que indicou uma possível fonte de contaminação desses microrganismos no final do processo.

Tabela 1 - Resultado do número mais provável por grama (NMPg-1) de Coliformes Fecais, *Salmonella sp* em 10g de composto no dia 0 do processo de compostagem e após 90 dias (início e fim) em comparação aos padrões estabelecidos pelo MAPA

| Tempo de compostagem                              | Tratamento controle   | Tratamento Inoculado   | MAPA (Instruções Normativas 25/2009) |
|---|-----------------------|------------------------|--------------------------------------|
| <b>Coliformes fecais (NMP g<sup>-1</sup>(st))</b> |                       |                        |                                      |
| 0   | > 125x10 <sup>3</sup> | > 813 x10 <sup>3</sup> | ≤ 1,0 x 10 <sup>3</sup>              |
| 90  | <1 x 10 <sup>3</sup>  | < 9 x 10 <sup>3</sup>  |                                      |
| <b>Salmonella sp (pesquisa em 10 g)</b>           |                       |                        |                                      |
| 0   | Ausente               | Ausente                | Ausente                              |
| 90  | Ausente               | Ausente                |                                      |

Etapas do processo de compostagem em dia: 0 – fase inicial; 90 -final do processo de compostagem

### 3.6 Eficiência da eliminação de agentes parasitários

O monitoramento de ovos por grama de composto e larvas de *Strongyloides spp.* foi utilizado como parâmetro parasitológico de eficiência do processo de compostagem. Todas as amostras coletadas no dia zero em ambos os tratamentos apresentaram alta detecção de ovos de helmintos viáveis, conforme Tabela 2. Ao final da fase termofílica (7 dias), a contagem de OPG não foi observada até o final do processo (90 dias), indicando que as temperaturas alcançadas em ambos os tratamentos foram suficientes para a remoção dos ovos. Neste estudo, observou-se redução no número de larvas viáveis de *Strongyloides spp* ao longo do processo de compostagem para todos os tratamentos. Os valores encontrados ao final do processo permaneceram abaixo dos níveis preconizados pela legislação brasileira para utilização na agricultura agrícolas (MAPA- Diretriz Normativa 25/2009) (Brasil, 2009). O composto inoculado apresentou maior redução em relação ao controle (87% e 78%, respectivamente).

Vários microrganismos têm sido estudados como inoculantes para induzir a atividade microbiana natural do composto. Um de seus objetivos é um aumento rápido e acentuado da temperatura o que contribui para a desinfecção eficaz do composto (Wan *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2021). Neste estudo, o tratamento com inoculações sequenciais de *Aspergillus fumigatus* apresentou temperaturas termofílicas mais elevadas em relação ao controle (61°C e 53° C, respectivamente). Outros estudos demonstram que o uso de fungos do

gênero *Aspergillus* sp. na eliminação de nematoides podem ser uma promessa para o controle biológico de helmintos. Esses fungos produzem vários compostos bioativos que têm o potencial de inibir a eclosão e o desenvolvimento larval (Khattack *et al.*, 2018; Soares *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2023). Esses dois fatores podem ter contribuído para que o tratamento inoculado seriadamente com *Aspergillus fumigatus* tenha sido capaz de suprimir larvas viáveis de forma mais eficiente que o controle (87 % e 78 %, respectivamente). Nesse contexto, ao final do processo todos os tratamentos atenderam aos padrões estabelecidos pelo CONAMA - resolução Conama nº 375 de 2006 (Brasil, 2006), indicando que a compostagem desses resíduos auxilia na remoção de patógenos associados aos helmintos. Os resultados encontrados corroboram com os estudos conduzidos por Ferreira *et al.*, (2021) que analisaram a carga parasitária de ovos de helmintos em compostagem de cama de equinos e aves onde concluíram que o processo de compostagem (120 dias) nos tratamentos estudados fora eficazes na eliminação de ovos de helmintos aos 90 dias do processo.

Tabela 2 - Ocorrência de ovos viáveis de helmintos tipo Strongyloidea em 4g de matéria úmida e de larvas viáveis de helmintos tipo Strongyloidea por grama de sólidos totais em diferentes dias do processo de compostagem (0,5,30,90).

| Tempo de compostagem   | Tratamento controle | Tratamento inoculado | MAPA<br>(Instruções Normativas<br>25/2009) |
|--|---------------------|----------------------|--|
| <b>Ovos viáveis de helmintos tipo Strongyloidea/4g de ST</b>   |                     |                      |  |
| 0  | 133                 | 228                  |  |
| 5  | 0                   | 0                    | < 0,25/ g de ST                            |
| 30   | 0                   | 0                    |  |
| 90   | 0                   | 0                    |  |
| <b>Larvas viáveis de helmintos tipo Strongyloidea /g de ST</b> |                     |                      |  |
| 0  | 1,5                 | 4,6                  |  |
| 5  | 0                   | 0                    | 1/ g de ST                                 |
| 30   | 0,33                | 1                    |  |
| 90   | 0,33                | 0,66                 |  |

Etapas do processo de compostagem em dia: 0 – fase inicial; 5 - final da fase termofílica; 30 - início da fase de maturação;90 -final do processo de compostagem

#### 4. Conclusão

A aplicação de *Aspergillus fumigatus* foi benéfica para aumentar a temperatura na fase termofílica, mas não teve efeito no prolongamento desta fase. O inóculo fúngico teve pouco

efeito na degradação de matéria orgânica e na alteração dos parâmetros químicos. Não houve influência na degradação da lignocelulose após sucessivas inoculações fúngicas ao longo do processo de compostagem. No tratamento que houve a inoculação, o número de bactérias patogênicas foi reduzido significativamente, mas ao final do processo o composto não atendeu às exigências da legislação brasileira. Ambos os tratamentos foram eficazes na eliminação de microrganismos parasitas. A partir das análises dos dados, conclui-se que a inoculação seriada *Aspergillus fumigatus* não teve efeito significativo na melhoria da qualidade do composto de cama saturada de equinos com palha de arroz, portanto seu uso não se mostrou uma estratégia eficaz para otimizar o processo de compostagem com este tipo de resíduo.

## Referências

- Andrade, F. C., Fernandes, F., Oliveira Júnior, A., Rondina, A. B., Hungria, M., Nogueira, M. A. (2021). Enriquecimento de composto orgânico com microrganismos benéficos e desempenho produtivo do milho e trigo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 25, 332-339.
- Andrews, W. H., Jacobson, A., & Hammack, T. (2018). Bacteriological analytical manual (BAM) chapter 5: Salmonella. *Bacteriological Analytical Manual*, 110.
- Busato, J. G.; De Paula, A. M.; Ferrari, L. H. Enriquecimento microbiano visando otimizar o processo de compostagem. In: SOCIEDADE BRASILEIRA CIÊNCIA DO SOLO (Ed.). *Tópicos em Ciência do Solo*. 1ª ed. Viçosa: SBCS, p. 522–576, 2019.
- BRASIL. (2009) Instrução Normativa Nº 25, de 23 de julho de 2009, aprova as Normas sobre as Especificações e as Garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a Rotulagem dos Fertilizantes Orgânicos Simples, Mistos, Compostos, Organominerais e Biofertilizantes destinados à agricultura, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília-DF, 18 p.
- BRASIL (2017). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e corretivos/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária., Brasília-DF: MAPA, 240 p.
- De Souza, G. H. R.; Rodrigues, G. A. O tratamento da cama de equinos através do processo de compostagem (2017). *Revista Interface Tecnológica*, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 100-110. <https://doi.org/10.31510/infa.v14i2.193>.
- IBGE, Pesquisa da Pecuária Municipal. Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho. 2018. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>. Acesso em: 05 de setembro de 2023.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. 2016 Disponível em: <https://tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo>> Acesso em 01 de setembro de 2023.

De Souza, G. H. R.; Rodrigues, G. A O tratamento da cama de equinos através do processo de compostagem. 2017. Revista Interface Tecnológica, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 100-110. [doi.org/10.31510/infa.v14i2.193](https://doi.org/10.31510/infa.v14i2.193)

Ferreira, D. (2000). Análises estatísticas por meio do Sisvar para-Windows versão 4.0. 2000. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. 255-258.

Fetti, L. R. G. (2014). Avaliação do efeito da inoculação de fungos termofílicos em pilhas de compostagem de lixo urbano. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, São José do Rio Preto-Sp.

Gao, X., Liu, W., Li, X., Zhang, W., Bu, S., Wang, A. (2023). A novel fungal agent for straw returning to enhance straw decomposition and nutrients release. Environmental Technology & Innovation, 30, 2352-1864. doi.org/10.1016/j.eti.2023.103064

Gou, C., Wang, Y., Zhang, X., Lou, Y., Gao, Y. (2017). Inoculation with a psychrotrophic-thermophilic complex microbial agent accelerates onset and promotes maturity of dairy manure-rice straw composting under cold climate conditions. Bioresource Technology, 243, 339-346. doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.097

Gondek, M., Weindorf, D. C., Thiel, C., & Kleinheinz, G. (2020). Soluble salts in compost and their effects on soil and plants: A review. Compost Science & Utilization, 28(2), 59-75. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2020.1772906>

Gordon, H. McL.; Whitlock, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep Faeces. Journal of the Council for Scientific and Industrial Research v.12, p.50-52, 1939.

Guzmán Anaya, J. M. (2021). Evaluación del compostaje de estiércol de caballo de un centro ecuestre en la región Lima.

Jain, M. S., Daga, M., Kalamdhad, A. S. (2019). Variation in the key indicators during composting of municipal solid organic wastes. Sustainable Environment Research, 29(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s42834-019-0012-9>

Jiang-Ming, Z. (2017). Effect of turning frequency on co-composting pig manure and fungus residue. Journal of the Air & Waste Management Association, 67(3), 313-321. <https://doi.org/10.1080/10962247.2016.1232666>.

Kabelitz, T., Biniash, O., Ammon, C., Nübel, U., Thiel, N., Janke, D., Swaminathan, S., Funk, R., Münch, S., Rosler, U., Siller, P., Amon, B., Aarnink, A.J.A., Amon, T., 2021. Particulate matter emissions during field application of poultry manure – the influence of moisture content and treatment. Sci. Total Environ. 780, 146652. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146652>.

Lepesteur M. Human and livestock pathogens and their control during composting. Crit Ver Environ Sci Technol. 2022;52(10):1639–1683 <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1862550>.

Li, C., Li, H., Yao, T., Su, M., Ran, F., Li, J., Chen., Li, H., Qiu, H. (2021). Effects of swine manure composting by microbial inoculation: heavy metal fractions, humic substances, and bacterial

community metabolism. *Journal of Hazardous Materials*, 415, 125559. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125559>.

Li, Q., Koyama, M., Nakasaki, K. (2023). Effect of storage time on organic matter decomposition during composting by inoculating enriched microorganisms. *Environmental Technology e Innovation*, 29, 102984. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102984>

Lima, T., Domingues, S., Da Silva, G.J., 2020. Manure as a potential hotspot for antibiotic resistance dissemination by horizontal gene transfer events. *Vet. Sci.* 7, 110. <https://doi.org/10.3390/vetsci7030110>.

Liu, N., Hou, T., Yin, H., Han, L., & Huang, G. (2019). Effects of amoxicillin on nitrogen transformation and bacterial community succession during aerobic composting. *Journal of hazardous materials*, 362, 258-265. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.09.028>

Chen, C.Q., Pankow, C.A., Oh, M., Heath, L.S., Zhang, L.Q., Du, P., Xia, K., Pruden, A., 2019. Effect of antibiotic use and composting on antibiotic resistance gene abundance and resistome risks of soils receiving manure-derived amendments. *Environ. Int.* 128, 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.043>.

Chi, C. P., Chu, S., Wang, B., Zhang, D., Zhi, Y., Yang, X., Zhou, P. (2020). Dynamic bacterial assembly driven by *Streptomyces griseorubens* JSD-1 inoculants correspond to composting performance in swine manure and rice straw co-composting. *Bioresource Technology*, 313, 123692. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123692>

Manga, M., Muoghalu, C. C., & Acheng, P. O. (2023). Inactivation of faecal pathogens during faecal sludge composting: A systematic review. *Environmental Technology Reviews*, 12(1), 150-174. [doi.org/10.1080/21622515.2023.2182719](https://doi.org/10.1080/21622515.2023.2182719)

Morgado, W. F. F. (2008). Desinfecção de águas naturais por radiação solar utilizando os bioindicadores: *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás- Goiânia-Go.

Nascimento, A. G. C. R., Paula, A. M. D., Busato, J. G., Silva, S. G. D., Texeira Neto, A. R. (2023). Prospection of Cellulolytic Fungi from Composted Samples of Saturated Horse Litter. *Agriculture*, 13(7), 1308. <https://doi.org/10.3390/agriculture13071308>

Oliveira, J. D. (2020). Efeitos da aeração e da estação do ano na compostagem dos resíduos de incubatório. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS.

Ren, H., Wu, F., Ju, H., Wu, D., & Wei, Z. (2023). Elaborating the role of rhamnolipids on the formation of humic substances during rice straw composting based on Fenton pretreatment and fungal inoculation. *Bioresource Technology*, 376, 128843. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128843>

Rugai, E.; Mattos, T.; Brisola, A. P. (1954). Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes; modificação do método de Baermann. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*.

Selvamani, K., Annadurai, V., Soundarapandian, S., 2019. Improved co-composting of poultry manure with complementary consortium of indigenous *Bacillus* spp. *3 Biotech* 9, 215. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1745-1>.

Soulsby, E.J.L. (1987). *Paratología y enfermedades parasitarias em los animales domésticos*. 7 ed. 823 p. Editora Interamericana, Mexico D.F.

Tedesco, M.J.; Gianello, C.; Bissani, C. A.; Bohnen, H.; Volkweiss, S. J. (1995) *Análises de solo, plantas e outros materiais*. 2.Ed. Porto Alegre: Dpto. de solos da UFRGS, 174 p. (Boletim Técnico 5).

Temel, F. A. (2023). Evaluation of the influence of rice husk amendment on compost quality in the composting of sewage sludge. *Bioresource Technology*, 373, 128748. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3805>

Van Soest, P. J. Use of detergents in the analyses of fibrius feeds, 2 (1963) A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal Association Official Analytical Chemical*, Gaithersburg, v. 46, p. 829-835.

Van Soest, P. J., Wine, R. H. (1968) Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. *Journal Association Official Analytical Chemical*, Gaithersburg, v. 51, p. 780-78.

Vasconcelos, C. V. (2019). *Caracterização e tratamento do composto orgânico de resíduos urbanos de Belo Horizonte-MG para a utilização em ações de Agricultura Urbana*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro <https://tede.ufrj.br/jspui/handle/jspui/5058>.

Voběrková, S., Vaverková, M. D., Burešová, A., Adamcová, D., Vršanská, M., Kynický, J., Adam, V. (2017). Effect of inoculation with white-rot fungi and fungal consortium on the composting efficiency of municipal solid waste. *Waste Management*, 61, 157-164. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.12.039>

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, 124990. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124990>

Zhang, D., Sun, J., Wang, D. Peng, S., Wang, Y., Li, X., Hua, Q. (2023). Comparison of bacterial and fungal communities structure and dynamics during chicken manure and pig manure composting. *Environ Sci Pollut Res* 30, 94347–94360. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-29056-w>

Zhu, N., Zhu, Y., Kan, Z., Li, B., Cao, Y.; Jin, H. (2021). Effects of two-stage microbial inoculation on organic carbon turnover and fungal community succession during co-composting of cattle manure and rice straw. *Bioresource Technology*, 341, 125842. [doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125842](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125842)

Zubair, M., Wang, S.Q., Zhang, P.Y., Ye, J.P., Liang, J.S., Nabi, M., Zhou, Z.Y., Tao, X., Chen, N., Sun, K., Xiao, J.H., Cai, Y.J., 2020. Biological nutrient removal and recovery from solid and liquid livestock manure: recent advance and perspective. *Bioresour. Technol.* 301, 122823. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122823>.

Wan, L.B., Wang, X.T., Cong, C., Li, J.B., Xu, Y.P., Li, X.Y., Hou, F.Q., Wu, Y.Y., Wang, L. L., 2020. Effect of inoculating microorganisms in chicken manure composting with maize straw. *Bioresour. Technol.* 301, 122730. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122730>.

Wang, J., Liu, Z., Xia, J., & Chen, Y. (2019). Effect of microbial inoculation on physicochemical properties and bacterial community structure of citrus peel composting. *Bioresource Technology*, 291,121843 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121843>.

Wang, G., Kong, Y., Yang, Y., Ma, R., Shen, Y., Li, G., & Yuan, J. (2022). Superphosphate, biochar, and a microbial inoculum regulate phytotoxicity and humification during chicken manure composting. *Science of the Total Environment*, 824, 153958. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153958>

Wu, Y., Chen, Y., Shaaban, M., Zhu, D., Hu, C., Chen, Z., Wang, Y. (2019). Evaluation of microbial inoculants pretreatment in straw and manure co-composting process enhancement. *Journal of Cleaner Production*, 239, 118078. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118078>

Wheeler, E.; ZAJaczkowski, J. (2009). Horse Stable Manure Management- Horse Facilities. Penn State College of Agricultural Sciences research, extension, and resident education programs are funded in part by Pennsylvania counties, the Commonwealth of Pennsylvania, and the U.S. Department of Agriculture (pp.3 - 13) The Pennsylvania State University, 112 Agricultural Administration Building, University Park, PA 16802.

Xu, J.Q., Jiang, Z.W., Li, M.Q., Li, Q.L., 2019. A compost-derived thermophilic microbial consortium enhances the humification process and alters the microbial diversity during composting. *J. Environ. Manag.* 243, 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.008>.