

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E QUANTITATIVOS DE
CILIADOS DO RÚMEN DE VACAS LEITEIRAS
FISTULADAS NO BRASIL**

MARTA TAVARES D'AGOSTO

1995

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA -
PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E QUANTITATIVOS DE
CILIADOS DO RÚMEN DE VACAS LEITEIRAS
FISTULADAS NO BRASIL

MARTA TAVARES D'AGOSTO

SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR:
Dr. MILDEN RODRIGUES DE SANTA ROSA

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Philosophiae Doctor em Medicina
Veterinária - Parasitologia Veterinária.

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO
ABRIL, 1995

TÍTULO DA TESE

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E QUANTITATIVOS DE
CILIADOS DO RÚMEN DE VACAS LEITEIRAS
FISTULADAS NO BRASIL

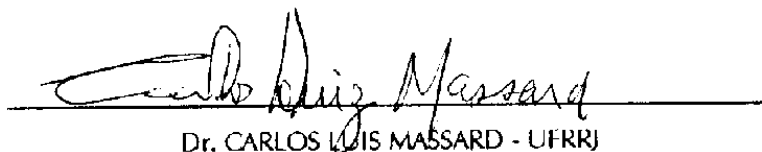
AUTORA

MARTA TAVARES D'AGOSTO

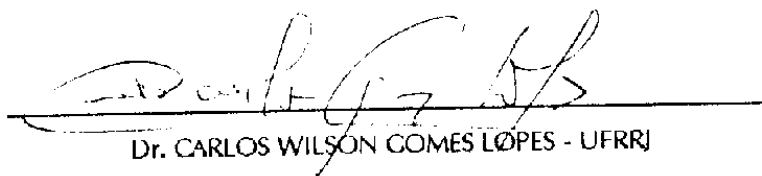
TESE APROVADA EM: 06 / 04 / 1995



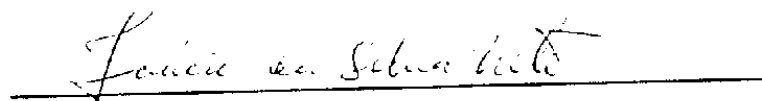
Dr. MILDEN RODRIGUES DE SANTA ROSA - UFRJ - Presidente



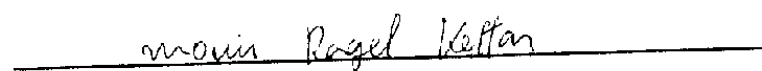
Dr. CARLOS LUIS MASSARD - UFRRJ



Dr. CARLOS WILSON COMES LOPES - UFRRJ



Dr. INÁCIO DOMINGOS DA SILVA NETO - UFRJ



Dr. MONIR RAGEL KATTAR - UFMG

A Erik

Com amor.

A Bernardo

Com todo amor que há nesta vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. MILDEN RODRIGUES DE SANTA ROSA, do Instituto de Microbiologia, Setor de Microscopia Eletrônica (IM-SME) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), orientador e amigo, pelo apoio, participação e sugestões no presente trabalho.

Ao Prof. Dr. ERIK DAEMON, do Departamento de Parasitologia Animal (DPA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pelas sugestões apresentadas nas diversas etapas do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (CNPGL/EMBRAPA), nas pessoas dos pesquisadores Dr. LUIZ JANUÁRIO AROEIRA - pela cessão dos animais para o experimento, Dr. MARCUS CORDEIRO DURÃES - pela análise estatística, PEDRO BRAGA

ARCURI - pela colaboração e amizade, e ao Sr. JOSÉ ISRAEL, tratador dos animais.

Aos colegas do IM/SME/UFRJ, em especial à Dra. MARIA EVANGELINA FERREIRA FONSECA, ao Dr. INÁCIO D. DA SILVA NETO, VENÍCIO FÉO DA VEIGA, MARCOS DE BONIS, PAULO ROBERTO RIOS, JOANA APARECIDA DOS SANTOS, ROSA PETIGROSSO e ISABELA CÃNHA DOS SANTOS, por todos estes anos de agradável convivência.

Ao Prof. Dr. CARLOS WILSON GOMES LOPES do DPA/UFRRJ, por sugerir a inclusão do tópico "Considerações Gerais".

Ao Prof. Dr. NICOLAU MAUÉS DA SERRA FREIRE do DPA/UFRRJ, pela participação na comissão de orientação.

Aos colegas do CPGMV-PV, em especial a ELISABETH BESSA, LÚCIO LEMOS, PAULO SOARES DA COSTA, RONALD BASTOS FREIRE e WILSON JACINTO SILVA DE SOUZA.

A MARIA ELISA CARNEIRO e CLÁUDIA MARIA MANEIRA NETTO, companheiras dos primeiros estudos com ciliados de rúmen.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

BIOGRAFIA

MARTA TAVARES D'AGOSTO, filha de Waldir d'Agosto e Marisa Rodrigues Tavares d'Agosto, nasceu em Juiz de Fora - MG, em 5 de abril de 1956.

Ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) em 1974, graduando-se em dezembro de 1977.

Em abril de 1978 foi aprovada em primeiro lugar em concurso público e contratada como Professora pela UFJF, no Departamento de Zoologia do Instituto de Ciências Biológicas e de Geociências, lecionando a Disciplina Zoologia I (Protistas, Poríferos, Cnidários e Ctenóforos) até a presente data. Lecionou, ainda, a Disciplina Elementos de Ecologia.

Em 1980, foi Coordenadora do Grupo de Trabalho Universitário (GTU) do Projeto Rondon, Campus Avançado de Tefé, AM, do Curso de Ciências Biológicas, em Juiz de Fora.

Iniciou o Mestrado em 1981, defendendo tese em fevereiro de 1984 intitulada "Etiologia da tripanosomíase em *Hypostomus punctatus* Valenciennes, 1840 (Osteichthyes, Loricariidae): taxonomia, prevalência e transmissão", sob orientação do Prof. Dr. Nicolau Maués da Serra Freire, no CPGMV-PV/UFRRJ.

Cursou, a partir de agosto de 1984, o "V Curso Especial de Sistemática Zoológica" promovido pela CAPES, CNPq, FINEP e PNZ.

Em 1985 foi eleita Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas da UFJF, exercendo esta função até 1987.

Lecionou a disciplina "Entomologia Aplicada" no Curso de Especialização em Zoologia - Comportamento Animal oferecido pela UFJF, em 1985.

Exerceu a função de Gerente de Pesquisa e Projetos Especiais da Pró-Reitoria de Ensino e Pesquisa, por designação do Reitor de julho de 1987 a novembro de 1988. Durante este período gerenciou a instalação do I Programa de Bolsas de Iniciação Científica da UFJF e

presidiu a Comissão Paritária do Programa de Cooperação UFJF/ EMBRAPA.

Em 1990 ingressou no doutorado do CPFMV-PV da UFRRJ, sob orientação do Prof. Dr. Milden Rodrigues de Santa Rosa.

CONTEÚDO

	Págs.
1. INTRODUÇÃO	1
2. CONSIDERAÇÕES GERAIS	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1. Posição sistemática e caracterização dos ciliados rumi- nais.....	16
3.2. Sistemática dos ciliados do rúmen	37
3.2.1. Quadro resumo das principais propostas de sistemática para a família Ophryoscolecidae	50
3.3. Ciliados do rúmen no Brasil	53

3.4. Fatores que influem na ocorrência e na concentração de ciliados no rúmen	60
3.5. Levantamento de ciliados do rúmen de animais domesticados e silvestres	83
4. MATERIAL E MÉTODOS	91
4.1. Local	91
4.2. Animais	91
4.3. Dietas	92
4.4. Experimento	93
4.5. Obtenção e exame das amostras	95
4.6. Morfologia dos ciliados	96
4.7. Técnica de contagem dos ciliados do rúmen	98
4.8. Técnicas de preparação de lâminas permanentes para microscopia fotônica	99
4.8.1. Técnica de Bodian (1936, 1937), protargol, segundo as variantes de Tuffrau (1964, 1967)	100
4.8.2. Reação nuclear de Feulgen (1926)	102

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
5.1. Influência da dieta sobre as populações dos ciliados	103
5.1.1. Resultados	103
5.1.2. Discussão	111
5.2. Influência do hospedeiro sobre as populações dos ciliados	119
5.2.1. Resultados	119
5.2.2. Discussão	129
5.3. Influência da fase do experimento sobre as populações dos ciliados	133
5.3.1. Resultados	133
5.3.2. Discussão	138
5.4. Aspectos morfológicos dos ciliados do rúmen revelados pelo protargol e pela reação de Feulgen	144
5.4.1. Resultados/Discussão	146
6. CONCLUSÕES	158
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	160

ÍNDICE DAS TABELAS

	Págs.
TABELA 1. Valores totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) e respectivos percentuais, por famílias dos organismos observados e subfamílias de Ophryoscolecidae	105
TABELA 2. Valores mínimos, máximos, médios, percentuais e desvios padrão de cada gênero de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal), por dieta.	106

TABELA 3. Valores médios, totais e percentuais por gênero de ciliados do rúmen de três bovinos, em cada dieta ...	107
TABELA 4. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos de acordo com o hospedeiro e a dieta e respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por dieta	109
TABELA 5. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos por fase e dieta, com respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por animal	110
TABELA 6. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) e respectivos percentuais, por famílias dos organismos observados e por subfamílias de Ophryoscolecidae	121

TABELA 7. Valores mínimos, máximos, médios, percentuais e desvios padrão de cada gênero de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal), por hospedeiro	122
TABELA 8. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) e respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por animal .	123
TABELA 9. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) e respectivos percentuais em relação ao total de cada gênero de ciliados	125

TABELA 10. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de bovinos (/ml de conteúdo ruminal), de acordo com dieta e o hospedeiro, e respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por animal, e pH médio de cada situação	127
TABELA 11. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml do conteúdo ruminal), de acordo com a fase e o hospedeiro, e respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por animal	128
TABELA 12. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) e respectivos percentuais, por famílias dos organismos observados e por subfamílias de Ophryoscolecidae	135

TABELA 13. Valores mínimos, máximos, médios, percentuais e desvios padrão de cada gênero de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal), por fase do experimento	136
TABELA 14. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) por fase do experimento e respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por fase	137
TABELA 15. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) de acordo com o hospedeiro e a fase do experimento e respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por fase	139

TABELA 16. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) de acordo com a dieta e a fase do experimento e respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por fase	140
---	-----

ÍNDICE DAS FIGURAS

Págs.

FIGURA 1. Representação esquemática dos ciliados do rúmen.

A. *Buetschlia*; B. *Blepharoconus*; C. *Blepharoprostium*; D. *Polymorphella*; E. *Parabundleia*; F. *Isotricha*, F'. *I. prostoma*, F''. *I. intestinais*; G. *Dasytricha*; H. *Oligoisotricha*; I. *Microcetus*; J. *Charonina*; L. *Parentodinium*; M. *Entodinium*; N. *Diplodinium*; O. *Eodinium*; P. *Eremoplastron*; Q. *Eudiplodinium*; R. *Diploplastron*; S. *Polyplastron*, S'. lado superior, S''. lado inferior; T. *Ostracodinium*; U. *Elytroplastron*, U'. lado superior, U''. lado inferior; V. *Metadinium*; X. *Enoploplastron*; Y.

<i>Ophryoscolex</i> ; <i>Z. Epidinium</i> ; AA. <i>Epiplastron</i> (lado direito); BB. <i>Opisthotrichum</i> ; CC. <i>Caloscolex</i>	32-34
--	-------

FIGURA 2. Micrografias de <i>Entodinium spp.</i> em Protargol (A,B, C) e Reação de Feulgen (D). Zona adoral de sincília (zas), Zona adoral de sincília do opisto em formação (zaso), macronúcleo (ma) em divisão na letra D, citofaringe (cf), fagossoma (f), citoprocto (cp), estrias (e), fenda superior (fs), espinho caudal (ec). Barra = 10 μ m	147
---	-----

FIGURA 3. Micrografias de <i>Entodinium sp.</i> , em Protargol (A,B) e Reação de Feulgen (C,D). Zona adoral de sincília (zas), macronúcleo (ma), micronúcleo (mi), fagossoma (f), citoprocto (cp), vacúolo pulsátil (vp); C - predação de um congênere (seta); D - restos de material nuclear de um congênere parcialmente digerido (setas). Barra = 10 μ m	148
--	-----

FIGURA 4. Micrografias de *Eodinium sp.*, em Protargol (A,B) e de *Eremoplastron sp.* em Protargol (C) e Reação de Feulgen (D). Zona adoral de sincília (zas), zona esquerda de sincília (zes), zona adoral de sincília do opisto em formação (zaso), macronúcleo (ma), micronúcleo (mi), citofaringe (cf), citoprocto (cp), vacúolo pulsátil (vp), opérculo (o). Barra = 10 μm .. 149

FIGURA 5. Micrografias de *Diplodinium sp.*, em Protargol (A,C, D) e Reação de Feulgen (B). Zona adoral de sincília (zas), zona esquerda de sincília (zes), zona adoral de sincília do opisto em formação (zaso), macronúcleo (ma), micronúcleo (mi), espinhos caudais (ec), opérculo (o). Barra = 10 μm 150

- FIGURA 6.** Micrografias de *Ostracodinium sp.*, em Protargol (A,C) e Reação de Feulgen (B,D). Zona adoral de sincília (zas), zona esquerda de sincília (zes) protraída em A e retraída em C, zona adoral de sincília do opisto em formação (zaso), zona esquerda de sincília do opisto em formação (zeso), macronúcleo (ma), micronúcleo (mi), opérculo (o), vestígio de placa esquelética (pe). Barra = 10 μm 151
- FIGURA 7.** Micrografias de *Polyplastron sp.*, em solução de Lugol (A, B, C, D). Placas esqueléticas (setas). Barra = 10 μm 155
- FIGURA 8.** Micrografias de *Eremoplastron sp.* (A), *Ostracodinium sp.* (B) e *Diploplastron sp.* (C,D), em solução de Lugol. Placas esqueléticas (setas). Barra = 10 μm 156

RESUMO

Objetivando-se realizar levantamento e quantificação de ciliados do rúmen de bovinos, foram utilizadas três vacas mestiças holando-zebu (Gir), em lactação, fistuladas, mantidas no Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (CNPGL/EMBRAPA), situado no município de Coronel Pacheco, MG.

Os bovinos foram mantidos com dieta à base de silagem de milho associada a uma ração constituída por 57% de fubá de milho, 40% de farelo de soja, 2% de calcáreo e 1% de sais minerais.

Verificou-se que os ciliados do rúmen foram quantitativamente influenciados pela alteração nas proporções dos constituintes da dieta (D1 = 20%, D2 = 30% e D3 = 40% de proteína), por fatores

inerentes aos animais hospedeiros (A1 e A3 = 3/4 HPB - 1/4 Z; A2 = 11/16 HPB - 5/16 Z) e pela fase do experimento em que as amostras foram obtidas (F1, F2 e F3). A ocorrência dos gêneros dos ciliados foi relacionada ao hospedeiro.

Foram observados ciliados das famílias Blepharocorythidae (*Charonina* Strand, 1928), Isotrichidae (*Isotricha* Stein, 1859 e *Dasytricha* Schuberg, 1888) e Ophryoscolecidae (Entodiinae: *Entodinium* Stein, 1859; Diplodiinae: *Diplodinium* Schuberg, 1888, *Eodinium* Kofoid & MacLennan, 1932, *Eremoplastron* Kofoid & MacLennan, 1932, *Polyplastron* Dogiel, 1927, *Diploplastron* Kofoid & MacLennan, 1932 e *Ostracodinium* Dogiel, 1927).

Ciliados dos gêneros citados foram observados nos três bovinos examinados, em todas as dietas e fases do experimento à exceção de *Dasytricha* só registrados em A1, e de *Eremoplastron*, presentes em A1 e A2.

Os valores totais dos ciliados e respectivos percentuais, de acordo com as famílias registradas foram os seguintes: Blepharocorythidae 23.520,00 (2,78%), Isotrichidae 14.235,56 (1,68%) e Ophryoscolecidae 808.368,88 (95,54%). O gênero predominante foi

Entodinium, correspondendo a 87,42% do total de Ophryoscolecidae ou a 83,52% do total de ciliados.

Os valores médios dos ciliados em cada dieta e respectivos percentuais foram 252.666,67 (29,86%) em D1, 316.266,66 (37,38%) em D2 e 277.191,12 (32,76%) em D3.

Os valores médios dos ciliados em cada hospedeiro e respectivos percentuais foram 256.275,56 (30,29%) em A1, 390.115,56 (46,11%) em A2 e 199.733,33 (23,61%) em A3.

Os valores médios dos ciliados e respectivos percentuais em cada fase do experimento foram 225.595,56 (26,66%) em F1, 279.937,77 (33,09%) em F2 e 340.591,11 (40,25%) em F3.

A análise de variância seguida do teste de Tukey a 5% demonstrou diferença significativa dos totais de ciliados entre as dietas testadas, entre os hospedeiros e entre as fases do experimento, indicando que todos estes fatores exerceram influência nas populações de ciliados do rúmen.

SUMMARY

With the aim of carrying out the survey and quantification of rumen ciliate in cattle, three suckling crossbred friesian-zebu (Gir) cows, with fistulas, were used. They were kept at the National Research Centre of Cattle Kept for Milk (CNPGL/EMBRAPA), situated in the town Coronel Pacheco in the state of Minas Gerais.

The cattle were kept under a diet based on silage corn associated with a ration composed of 57% of corn flour, 40% of soy bran, 2% of limestone and 1% of mineral salt.

It was verified that the rumen ciliate were quantitatively influenced by the alteration to the proportions of the constituents of the diet (% protein: D1 = 20; D2 = 30; D3 = 40) due to factors

inherent in the host animals (A1 and A3 = $\frac{3}{4}$ HPB - $\frac{1}{4}$ Z; A2 = $\frac{11}{16}$ HPB - $\frac{5}{16}$ Z) and to the stage of the experiment at which the samples were obtained (F1, F2 and F3). The occurrence of the genera of ciliate was related to the host.

Ciliate of the following families were observed: Blepharocorythidae (*Charonina* Strand, 1928), Isotrichidae (*Isotricha* Stein, 1859 and *Dasytricha* Schuberg, Stein, 1888) and Ophryoscolecidae (Entodiinae: *Entodinium* Stein, 1859; Diplodiinae: *Diplodinium* Schuberg, 1888, *Eodinium* Kofoid & MacLennan, 1932, *Eremoplastron* Kofoid & MacLennan, 1932, *Polyplastron* Dogiel, 1927, *Diploplastron* Kofoid & MacLennan, 1932 and *Ostracodinium* Dogiel, 1927).

Ciliate of the genera mentioned above were observed in the three animals examined, in all the diets and stages of the experiment; except for *Dasytricha*, which was only recorded in A1 and for *Eremoplastron*, which was present in A1 and A2.

The total values of ciliate and their respective percentage according to the families recorded were as follows: Blepharocorythidae 23.520,00 (2.78%), Isotrichidae 14.235,56 (1.68%) and Ophryoscolecidae 808.368,88 (95.54%). The predominant genus was *Entodinium*, which corresponded to 87.42% of the total of

Ophryoscolecidae or to 83.52% of the total of ciliate.

The average values of ciliate in each diet and their respective percentage were 252.666,67 (29.86%) in D1, 316.266,66 (37.38%) in D2 and 277.191,12 (32.76%) in D3.

The average values of ciliate in each host and their respective percentage in each stage of the experiment were 225.595 56 (26.66%) in F1, 279.937,77 (33.09%) in F2 and 340.591,11 (40.25%) in F3.

The analysis of variation followed by Tukey's test at 5% showed a significant difference in the total of ciliate among the diets tested, the hosts and the stages of the experiment, indicating that all these factors had influence on the rumen ciliate populations.

1. INTRODUÇÃO

Registra-se como a primeira citação de ciliados de rúmen as observações relatadas por GRUBY & DELAFOND em 1843, quando descreveram quatro tipos de organismos. Desde então, acumulou-se extensa bibliografia sobre esses ciliados abordando aspectos morfológicos, taxionômicos, filogenéticos, bioquímicos ou versando sobre ecologia ruminal, especificidade aos hospedeiros, papel dos ciliados no rúmen e suas inter-relações com os hospedeiros e outros organismos que constituem a microbiota ruminal, especialmente com as bactérias. Além dos ciliados e das bactérias, são elementos da microbiota ruminal os flagelados e os fungos.

Destaca-se a posição controvertida dos ciliados do rúmen, cujo nicho ecológico oscila entre o comensalismo, o mutualismo e o

parasitismo. Na verdade, a expressão generalizada ciliados do rúmen, engloba organismos de diversos gêneros e espécies que constituem diferentes populações da comunidade ruminal. Tais populações exercem papéis distintos aos quais sua importância se relaciona.

Diversos são os fatores que influem na ocorrência e na concentração dos ciliados do rúmen. Dentre estes fatores destacam-se o tipo e a constituição da dieta, nível de alimentação, características da ração, pH do rúmen, quantidade de água ingerida, frequência e restrição de alimento, intervalo de tempo após a alimentação, fator geográfico, migração e escape do rúmen, lise no rúmen, presença de outros microorganismos, antagonismo entre os ciliados e o tipo de hospedeiro (WARNER, 1962; CHRISTIANSEN et al., 1964; HUNGATE, 1966; PURSER & MOIR, 1966; NAKAMURA & KANEGASAKI, 1969; DEHORITY & PURSER, 1970; LATTEUR & SULTEN, 1972; POTTER & DEHORITY, 1973; DEHORITY & MATTOS, 1978; COLEMAN, 1980; FONTY et al, 1983; WILLIAMS, 1986; LENG et al, 1986; USHIDA et al., 1986; RYLE & ORSKOV, 1987; IMAI, 1988; ANKRAH et al., 1990).

Este trabalho, além de objetivar (1) conhecer os ciliados do rúmen de bovinos mantidos com dieta à base de silagem de milho associada a proporções variadas de ração, procurou abordar as seguintes questões: se os ciliados do rúmen foram qualitativa e

quantitativamente influenciados, (2) por alteração das proporções dos constituintes da dieta; (3) por fatores inerentes aos animais hospedeiros; (4) pelo momento em que as amostras foram obtidas ao longo do experimento.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os protistas ciliados são elementos importantes da microbiota ruminal que comporta ainda bactérias, fungos e flagelados. Apesar do número de ciliados ser consideravelmente menor que o de bactérias, aqueles são muito maiores, o que torna semelhante o volume e o espaço líquido ocupado por esses grupos de organismos no rúmen (HUNGATE et al., 1971).

Considerando que os ciliados do rúmen não formam cistos ou outras formas de resistência, a transmissão se dá por contaminação dos alimentos ou por contato entre os ruminantes, já que grande número de ciliados são regurgitados durante a ruminação (DEHORITY, 1986).

Os jovens se infectam, sobretudo, por contato parental, pelo hábitos

de lamberem a cria, quando esta pode ingerir saliva e digesta (HUNGATE, 1966).

Os hospedeiros mamíferos que abrigam ciliados em compartimentos de fermentação do estômago, pertencem à ordem Artiodactyla e às subordens Ruminantia (Tragulidae, Cervidae, Giraffidae, Antilocapridae, Bovidae), Tylopoda (Camelidae) e Suiformes (Hippopotamidae). As famílias dos ciliados que ocorrem em Ruminantia e Tylopoda são semelhantes, diferindo das registradas em Suiformes.

Em outros mamíferos que apresentam estômagos compartimentado e fermentação pré-gástrica, como os macacos-langur (Colobinae), não foram assinalados ciliados. Já nos hipopótamos (Hippopotamidae), apesar da presença de espécies próprias a estes hospedeiras, os ciliados observados pertencem às mesmas famílias dos que ocorrem no ceco-colon (fermentação pós-gástrica) dos eqüinos (DEHORITY, 1987).

O estômago dos ruminantes contém quatro compartimentos, rúmen, retículo, omaso e abomaso, ocorrendo intensa fermentação microbiana, com a presença de ciliados, no rúmen-retículo. Pertencem à subordem Ruminantia os representantes das famílias Tragulidae ("chevrotain"), Cervidae (veados), Giraffidae (girafas e ocapis), Antilocapridae ("pronghorn") e Bovidae (bovinos, ovinos, caprinos,

bubalinos, bisões, antílopes, antilocapras, bois-almiscarados) (DEHORITY, 1986).

Camelos, lhamas, alpacas, vicunhas e guanacos são pseudo-ruminantes da família Camelidae. Estes, apesar de regurgitarem e mastigarem o alimento ingerido, distinguem-se dos verdadeiros ruminantes por apresentarem o estômago com três compartimentos, rúmen, retículo e omaso, tendo este último a função química (DEHORITY, 1987). O rúmen dos camelídeos abriga grandes populações de ciliados semelhantes às observadas nos ruminantes.

As análises de vários parâmetros ruminais em hospedeiros faunados, defaunados ou sem ciliados indicam que este ambiente pode ser alterado pela presença dos ciliados, por influírem no metabolismo ruminal e por sua ação predatória, associada à redução de densidade bacteriana (EADIE, 1967), registrando-se nos hospedeiros defaunados aumento acentuado do número de bactérias. De acordo com WILLIAMS & COLEMAN (1991), estas alterações repercutem sobre os seguintes aspectos, com conseqüências benéficas ou prejudiciais para o hospedeiro: volume do rúmen e tempo de retenção da digesta, concentração e proporção de ácidos graxos voláteis, taxa de outros metabólitos ácidos e de amônia, pH ruminal, número e tipo de bactérias presentes.

BONHOMME-FLORENTIN (1975) ressaltou o papel da atividade metabólica dos microorganismos, destacando que a presença dos ciliados no rúmen acelera a taxa de crescimento do hospedeiro, aumenta a digestibilidade dos alimentos e a retenção de azoto e modifica a taxa de fermentação aumentando a produção de ácidos graxos voláteis e de amoníaco. Além disso, os protistas convertem proteínas vegetais e bacterianas em proteína com maior digestibilidade e valor nutritivo.

A importância desses ciliados e o papel que desempenham na fisiologia dos ruminantes já foi tema de diversos outros estudos. Existem controvérsias quanto à influência positiva ou negativa da presença desses protistas no desenvolvimento dos seus hospedeiros. Apesar de todos os trabalhos já realizados com este grupo, é difícil assinalar um papel definitivo para os ciliados do rúmen (CZERKAWSKI, 1986). Entretanto, há concordância entre os diversos autores quanto a um aspecto do nicho ecológico ocupado por estes organismos: os ciliados não são essenciais ao crescimento e desenvolvimento de seus hospedeiros. WILLIAMS & COLEMAN (1991) apresentaram uma revisão sobre o efeito da presença ou ausência de ciliados no metabolismo ruminal, reunindo observações de 73 publicações. A presença dos ciliados de acordo com a maioria dos autores, está associada ao

aumento dos processos de digestão da matéria orgânica, fibras, celulose, hemicelulose, amido, degradação da proteína, atividades proteolíticas e metanogênese. Quanto às atividades proteolíticas, número expressivo de autores não constatou alteração significativa com a presença ou não dos ciliados. Entretanto, nos animais defaunados, praticamente todos os autores que estudaram este aspecto, constataram o aumento da taxa de passagem do nitrogênio ao duodeno e a maior eficiência da síntese protéica microbiana.

A eliminação dos ciliados suprime a principal fonte de retenção de nitrogênio microbiano no rúmen, melhora a eficiência da síntese microbiana e aumenta o fluxo de proteína de origem microbiana para o duodeno (JOUANY, 1990; WILLIAMS et al., 1993).

Quanto ao efeito sobre os hospedeiros e na produtividade dos ruminantes, na ausência dos ciliados, dos 34 autores que investigaram este assunto, a maioria constatou maior susceptibilidade à toxidez por cobre e à acidose por ácido láctico. Por outro lado, ainda nos hospedeiros defaunados, apesar de vários autores constatarem o decréscimo de peso, ou efeito não significativo, a maioria assinalou maior ganho de peso e maior eficiência de conversão de alimento bem como melhor performance no crescimento de lã, só assinalada nesta situação (WILLIAMS & COLEMAN, 1991).

A ausência dos ciliados tem efeito no aumento da produção de nitrogênio bacteriano, inibição da metanogênese, estímulo à produção de propionato, redução da digestão ruminal de fibras, inibição da degradação ruminal de proteína, aumento na degradação ruminal de amido, aumento no volume do conteúdo ruminal, alterações no fluxo de saída de partículas e/ou líquidos ruminais e provável aumento nas populações fúngicas no rúmen (JOUANY et al., 1988).

Segundo BIRD & LENG 1978) o teor de proteína da dieta também influencia a importância dos ciliados no crescimento e performance do hospedeiro e que sua presença teria efeito negativo no caso de dietas com baixo teor protéico. Já em dietas ricas em grãos, os ciliados desempenhariam um papel benéfico no ecossistema ruminal NAGARAJA et al., 1992). De acordo com USHIDA & JOUANY (1986) in WILLIAMS & COLEMAN (1991), os protistas não são importantes para a degradação de proteínas solúveis, mas tornam-se progressivamente mais importantes quanto mais insolúveis tornam-se as proteínas.

A relação predador-presa é a interação mais evidente entre os ciliados e bactérias do rúmen (WILLIAMS et al., 1993). Diversos são os fatores que influem na intensidade desta relação, tais como: espécies envolvidas, quantidade e características físicas das bactérias

disponíveis, estado nutricional dos ciliados e condições do ambiente ruminal.

A competição é um outro aspecto das relações entre os constituintes da microbiota ruminal. Dentre vários fatores, CZERKAWSKI (1986) destacou a competição pelo nitrogênio que é exercida entre ciliados e bactérias que digerem amido e celulose; há ainda competição entre espécies de ciliados que é registrada como antagonismo e resulta na eliminação de uma população por outra.

Estudos sobre competição e antagonismo entre ciliados do rúmen realizados por CADIE (1962a, 1962b) demonstraram que *Polyplastron multivesiculatum* (Dogiel & Fedorowa, 1925), *Eudiplodinium maggii* (Fiorentini, 1889) e *Epidinium* spp., não estabelecem populações mistas. Com base nestas observações foram propostas as designações população do tipo A, com *P. multivesiculatum* dentre outros ciliados, tais como *Diploplastron affine* (Dogiel & Fedorowa, 1925), e população do tipo B, na qual *E. maggii* e *Epidinium* spp., juntos ou isolados, são os grandes entodiniomorfos predominantes.

Dentre os ciliados já assinalados no rúmen encontram-se espécies das famílias Buetschliidae, Isotrichidae, Blepharocorythidae, Ophryoscolecidae e Cycloposthiidae, sendo mais expressivos, por sua

ocorrência e representação numérica, os das famílias Isotrichidae e Ophryoscolecidae, comumente designados holotríquios e entodiniomorfos, respectivamente. Estas designações são resquícios das antigas propostas sistemáticas (Cheissin & Potjansky, 1963; Raabe, 1964; Honigberg et al., 1964; Jankowski, 1973 in CORLISS, 1979). Como holotríquios são referidos, principalmente, os isotríquídeos dos gêneros *Isotricha* Stein, 1859 e *Dasytricha* Schuberg, 1885, apesar desta generalização poder englobar ainda, os gêneros das famílias Buetschliidae e Blepharocorythidae.

Os isotríquídeos têm habilidade de absorver e utilizar carboidratos solúveis, que são rapidamente absorvidos e armazenados sob a forma de grãos de amido e serão utilizados nos períodos de baixa concentração de açúcar no rúmen (GUTIERREZ, 1955). Estes ciliados também são capazes de utilizar amido (SENAUD et al., 1980, GROLIERE et al., 1980), sendo mais abundantes no rúmen de animais mantidos com forragens suculentas contendo carboidratos solúveis, mas também estabelecem grandes populações quando os hospedeiros são alimentados com ração rica em grãos. Segundo ABE et al. (1973) os isotríquídeos parecem ser menos influenciados pelo tipo de dieta do hospedeiro que os entodiniomorfos. Já foi observada a ingestão de bactérias por *Dasytricha* e *Isotricha*, com a formação de vacúolos

alimentícios (GUTIERREZ & HUNGATE, 1957 in HUNGATE, 1978). Quando presentes em altas populações, esses organismos constituem expressiva parcela da biomassa ruminal, devido às suas grandes dimensões e à sua retenção seletiva no rúmen que compensaria a baixa taxa de crescimento populacional. A biomassa destes ciliados pode representar mais da metade do total da biomassa microbiana (WARNER, 1962). Apesar disso, é pequena a contribuição dos isotríquídeos na síntese total de proteína microbiana no rúmen, estimada em apenas 9% da síntese atribuída aos microorganismos (LENG et al., 1981, 1986).

ABE et al. (1981) relataram indícios do comportamento de escape dos isotríquídeos ciliados à parede do retículo e sua migração ao rúmen após o hospedeiro se alimentar. O potencial efeito prejudicial ao hospedeiro relacionado à elevada biomassa desses ciliados e sua retenção no rúmen-retículo, pode resultar da competição por substrato e por ingestão e digestão de bactérias, ocasionando decréscimo da biomassa bacteriana e dos fluxos de proteína e de energia que saem do rúmen (LENG et al., 1981).

A subfamília Ophryoscolecidae é constituída por grande número de organismos que são mais heterogêneos que os isotríquídeos. Suas espécies não apresentam equivalentes de vida livre na natureza e

os gêneros observados no rúmen são restritos a este ambiente, com exceção de *Entodinium* Stein, 1859, assinalado no intestino de lemingue (KOPPERI, 1935 in HUNGATE, 1978), de cobaias (CUNHA, 1914) e de capivaras (DEHORITY, 1987).

Os entodiniomorfos são geralmente tidos como digestores, principalmente de amido e celulose, mas apresentam respostas diferentes aos tipos de alimento de acordo com cada grupo de ciliados (HUNGATE, 1966). As bactérias são provavelmente o principal alimento nitrogenado ingerido pelos ciliados do rúmen. Estes aspectos da fisiologia de *Entodinium* foram estudados in vitro por BONHOMME-FLORENTIN (1974) que concluiu, quanto ao metabolismo do nitrogênio, que eles utilizam preferencialmente proteínas (caseína, proteína das plantas e das bactérias) mais peptídeos e aminoácidos, e que morrem por inanição em culturas com antibiótico pelo desaparecimento das bactérias. Com relação ao metabolismo do carboidrato constatou que o amido é fonte essencial de carboidrato para *Entodinium* e que estes quebram e ingerem celulose, com atividade celulolítica independente da ingestão de bactérias. Este estudo destacou que estes organismos são dependentes de bactérias, exercem alta atividade proteolítica, além de serem amilolíticos e celulolíticos.

Por outro lado, os grandes entodiniomorfos ingerem expressiva quantidade de matéria vegetal porém sua capacidade, ou não, de digerir a celulose é crítica para a elucidação de seu papel em relação ao hospedeiro (HUNGATE, 1978). Com relação ao comportamento alimentar destes entodiniomorfos, SÉNAUD et al. (1986) confirmaram o engolfamento e a degradação de fibras vegetais por *P. multivesiculatum* o que difere do modo de digestão exercido por *Epidinium* Crawley, 1923, cujo processo se inicia antes da partícula vegetal ser ingerida pelo ciliado. Durante todo o processo não registraram a participação de bactérias na degradação do material ingerido, descartando uma possível simbiose entre estes organismos.

Os menores entodiniomorfos ingerem ativamente bactérias e apresentam pequena taxa de passagem ao duodeno em relação à sua elevada concentração no fluído ruminal (HOBSON & WALLACE, 1982), que pode atingir percentuais de até 88% do total de ciliados (D'AGOSTO et al., 1990). Esta característica pode reduzir os nutrientes disponíveis ao hospedeiro, especialmente em dietas com baixo teor protéico, e contradiz um dos principais papéis positivos atribuídos aos protozoários que é a utilização da proteína dos ciliados pelo hospedeiro (HUNGATE, 1978). Esta baixa taxa de passagem foi confirmada por ANKRAH et al. (1990) quando registraram que 50% da

redução da concentração dos entodiniomorfos no rúmen após a alimentação do hospedeiro é devido à lise que sofrem no próprio rúmen, sem passagem para o duodeno, tendo como consequência elevada perda de energia e de proteína pelo hospedeiro.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Posição sistemática e caracterização dos ciliados ruminais

A classificação dos ciliados de rúmen apresentada a seguir baseou-se, dos *taxa* Phylum a Família, na sistemática segundo PUYTORAC et al. (1987). Para a Família Ophryoscolecidae, seguiu-se LUBINSKY (1957c), com as subfamílias Entodiinae, Diplodiinae e Ophryoscolecinae. Os gêneros foram relacionados segundo KOFOID & MacLENNAN (1930, 1932, 1933) e OGIMOTO & IMAI (1981) e descrições posteriores de IMAI & OGIMOTO (1983), IMAI (1984), DEHORITY (1986) e ORPIN & MATIHESEN (1986).

Phylum Ciliophora Doflein, 1901

Subphylum Prostomata Schewiakoff, 1896

Classe Prostomatea Schewiakoff, 1896

Subclasse Archistomatia Puytorac et al., 1974

Ordem Archistomatida Puytorac et al., 1974

Família Buetschliidae Poche, 1913

Gênero *Buetschlia* Schuberg, 1888

Gênero *Blopharoconus* Gassovsky, 1919

Gênero *Blepharoprosthium* Bundle, 1895

Gênero *Polymorphella* Corliss, 1960

Gênero *Parabundleia* Imai & Ogimoto, 1983

Classe Vestibulifera Puytorac et al., 1974

Ordem Trichostomatida Bütschli, 1889

Subordem Trichostomatina Bütschli, 1889

Família Isotrichidae Bütschli, 1889

Gênero *Isotricha* Stein, 1859

Gênero *Dasytricha* Schuberg, 1888

Gênero *Oligoisotricha* Imai, 1981

Gênero *Microcetus* Orpin & Mathiesen, 1986

(*incertae sedis*)

Subordem Blepharocorythina Wolska, 1971

família Blepharocorythidae Hsiung, 1929

Gênero *Charonina* Strande, 1928

Ordem Entodiniomorphida Reichenow in Doflein & Reichenow,
1929

Família Cycloposthiidae Poche, 1913

Gênero *Parentodinium* Thurston & Noirot-Thimotheé, 1973

Família Ophryoscolecidae Stein, 1859

Subfamília Entodiinae Lubinsky, 1957

Gênero *Entodinium* Stein, 1859

Gênero *Campylodinium* jankowski, 1975

Subfamília Diplodiinae Lubinsky, 1957

Gênero *Diplodinium* Schuberg, 1888

Gênero *Eodinium* Kofoid & MacLennan, 1932

Gênero *Eremoplastron* Kofoid & MacLennan, 1932

Gênero *Eudiplodinium* Dogiel, 1927

Gênero *Diploplastron* Kofoid & MacLennan, 1932

Gênero *Polyplastron* Dogiel, 1927

Gênero *Ostracodinium* Dogiel, 1927

Gênero *Elytroplastron* Kofoid & MacLennan, 1932

Gênero *Metadinium* Awerinzew & Mutafova, 1914

Gênero *Enoploplastron* Kofoid & MacLennan, 1932

Subfamília Ophryoscolecinae Lubinsky, 1957

Gênero *Ophryoscolex* Stein, 1859

Gênero *Epidinium* Crawley, 1923

Gênero *Epiplastron* Kofoid & MacLennan, 1933

Gênero *Opisthotrichum* Buisson, 1923

Gênero *Caloscolex* Dogiel, 1926

Estes taxa caracterizam-se como se segue, com adaptações, segundo CORLISS (1994) para Phylum, PUYTORAC et al. (1987) de Subphylum a Famílias, LUBINSKY (1957c) para as subfamílias de Ophryoscolecidae e para os gêneros segundo KOFOID & MacLENNAN (1930, 1932, 1933), OGIMOTO & IMAI (1981), IMAI & OGIMOTO (1983), IMAI (1984) e DEHORITY (1987).

Phylum Ciliophora: geralmente com numerosas cinécias (únicas ou aos pares), com fissão homotetogênica perinecial (fissão binária transversal na qual é mantida a polaridade dos progênes e cujo plano de fissão corta as cinécias somáticas), e distinta infraciliatura; muitos com ciliatura oral complexa; alvéolos corticais característicos de muitos grupos; cristas mitocondriais tubulares, às vezes curvas; em

espécies anaeróbicas as mitocôndrias podem ter sido perdidas ou substituídas por hidrogenossomas; aparelho nuclear heterocariótico, tipicamente com um ou mais micronúcleos diplóides e um ou mais macronúcleo poliplóide; fenômeno sexual da conjugação; nutrição heterotrófica, mas algumas espécies têm protistas algais como endosimbiontes. Amplamente distribuídos, formas frequentemente conspicuas, a maioria de vida livre em habitats aquáticos e terrestres, também com espécies simbióticas associadas a grande variedade de organismos hospedeiros.

Subphylum Prostomata: área citostomal, fundamentalmente polar no momento de sua formação, tornando-se apical ou subapical, superficial ou invaginado ao fundo de um vestíbulo. Infraciliatura pericitostomal, pouco distinta da infraciliatura somática, a qual estreita-se no momento da morfogênese, diferenciando-se a partir das porções anteriores de todas ou de parte das cinécias somáticas (= Kinetofragminophora). O aparelho citofaringeal muitas vezes é bem desenvolvido, com microtúbulos pós-ciliais e nemadesmos. Estomatogênese telocinecial (a formação da nova ciliatura oral se dá a partir dos cinetossomas das extremidades das cinécias somáticas ou de campos de origem somática). Caminhos evolutivos numerosos e variados tanto

no plano das estruturas (corticais e nucleares) quanto no de sua biologia e ecologia.

Classe Prostomatea: área citostomal apical ou subapical, superficial.

Subclasse Archistomatia: infraciliatura pericitostomal sem outra diferenciação além de um alinhamento mais fechado dos cinetossomas isolados, providos de cílios mais longos.

Ordem Archistomatida: com as características da Subclasse.

Família Buetschliidae: providos de um vacúolo de concreção. Duas espécies são uniformemente ciliadas e as outras com três, duas ou uma (*Buetschlia*) coroa ciliada. Todos comensais do tubo digestivo de cavalos, antas, hipopótamos, etc.

Gênero *Buetschila*: corpo oval com duas zonas ciliares, anterior e posterior. Uma coroa ciliada anterior. Macronúcleo elíptico; um vacúolo contrátil na região posterior e vacúolo de concreção na região anterior. Comprimento: 30-35 μm ; largura: 20-30 μm (Figura 1A).

Gênero *Blepharoconus*: organismos ovais com citóstoma pequeno, citofaringe com bastões; cílios recobrem um terço da região anterior; com cílios caudais; macronúcleo oval; com três vacúolos pulsáteis; comuns no cólon de cavalos; já assinalados no rúmen de bovinos. Comprimento: 30-63 μm ; largura: 21-60 μm (Figura 1B).

Gênero *Blepharoprosthium*: organismos piriformes, com a metade anterior retrátil, ciliada; possuem cílios caudais; macronúcleo reniforme. Comuns no ceco e cólon de cavalos; já assinalados no rúmen de bovinos. Comprimento: 54-80 μm ; largura: 34-52 μm (Figura 1C).

Gênero *Polymorphella*: corpo ovóide com o terço anterior afilado. Ciliatura presente em duas zonas ciliares: a maior na área do afilamento anterior e a menor formando tufo de poucos cílios próximo ao citoprocto, na extremidade posterior do corpo. Macronúcleo sub-esférico central; micronúcleo sub-esférico junto à margem do macronúcleo; um vacúolo contrátil posterior e um vacúolo de concreção posterior ao afilamento. Comprimento: 33,6 μm largura: 21,7 μm (Figura 1D).

Gênero *Parabundleia*: corpo ovóide com três zonas ciliares, duas anteriores, ao redor do citóstoma e próxima ao vacúolo de concreção, e uma posterior, ao lado do citoprocto. Macronúcleo elíptico, central; micronúcleo esférico junto à margem anterior do macronúcleo; um vacúolo contrátil posterior e um vacúolo de concreção anterior. Comprimento: 42,5 μm ; largura: 30,5 μm (Figura 1E).

Classe Vestibuliferea: citóstoma ao fundo de uma depressão (vestíbulo), coberto nas extremidades anteriores por cinécias somáticas meridionais que não sofrem outra reorganização que um alinhamento mais estreito de cinetossomas ou a união de segmentos de cinécias suplementares. A infraciliatura somática é dividida por toda a célula ou é limitada a bandas ou a feixes. A abertura vestibular muitas vezes subapical, às vezes deslocada ao polo posterior. Formas livres dulciaquícolas, marinhas ou edáficas. Comensais de equinodermos e de herbívoros.

Ordem Trichostomatida: ciliatura somática uniforme. Livres ou comensais.

Família Isotrichidae: abertura vestibular subterminal. Parede do vestíbulo sempre com uma parte não ciliada, estreita (*Isotricha* ou destacada (*Dasytricha*).

Gênero *Isotricha*: cílios cobrindo o corpo em cinécias longitudinais, paralelas ao eixo do corpo. Duas espécies, *I. prostoma* Stein, 1858, com a abertura do vestíbulo localizada na extremidade posterior do corpo. Comprimento: 105-207 μm largura: 73-128 μm (Figura 1F'). *I. intestinalis* Stein, 1858, cujo vestíbulo abre-se na região mediana. Comprimento: 135-200 μm ; largura: 108-155 μm (Figura 1F").

Gênero *Dasytricha*: cílios cobrindo o corpo em cinécias oblíquas ao eixo do corpo. Abertura do vestíbulo, localizada na extremidade posterior do corpo. *D. ruminantium* Schuberg, 1888. Comprimento: 60-100 μm ; largura 38-53 μm (Figura 1G).

Gênero *Oligoisotricha*: ciliatura somática ausente na extremidade posterior do corpo. *O. bubali* (Dogiel, 1928). Comprimento: 16-22 μm ; largura 13-20 μm (Figura 1H).

Gênero *Microcetus*: corpo ovóide alongado, achatado bilateralmente. Cavidade oral apical. Ciliatura somática esparsa recobrando 90% da superfície, ausente próximo ao citoprocto; citoprocto geralmente subterminal na superfície ventral. Com duas hastes citofaringeanas, dorsal e ventral. Macronúcleo geralmente central; vacúolo contrátil posterior. *M. lappus* Orpin & Mathiesen, 1986. Comprimento: 23,6 μm ; largura 12,7 μm (Figura 1I).

Subordem Blepharocorythina: ciliatura somática reduzida a duas bandas não funcionando como sincília. Vestíbulo aberto anteriormente, do lado ventral esquerdo. Todos endocomensais do tubo digestivo de mamíferos herbívoros, sobretudo de eqüídeos.

Família Blepharocorythidae: corpo ovóide a elipsoidal, achatado, vestíbulo ciliado nas partes dorsal e lateral direita, sustentato por duas fibras transversas semi-circulares bem desenvolvidas.

Gênero *Charonina*: ciliatura somática reduzida. Zonas ciliares presentes apenas nas regiões anterior e posterior do corpo. Vestíbulo distinto e longo. *C. ventriculi* (Jameson, 1925). Comprimento: 28-46 μm ; largura 9-15 μm (Figura 1J).

Ordem Entodiniomorphida: ciliatura somática reduzida a bandas ou a tufo de cílios, sincília, limitada à região anterior. Cavidade vestibular contínua com a região ciliada anterior, com a mesma estrutura desta e funciona também como sincília. A ciliatura oral é composta geralmente de uma parte pré-vestibular e de uma parte vestibular, contínuas ou não. Um tabique fibroso separa o citoplasma em periplasma contendo as organelas e núcleos e em centroplasma, espécie de trato digestivo do citóstoma ao citoprocto e que compreende o esôfago, um saco digestivo e um divertículo fetal. Estomatogênese apocinecial (com aparição súbita dos cinetossomas orais, sem associação com as cinécias somáticas ou com a ciliatura oral parental). Todos em câmaras de fermentação de mamíferos herbívoros.

Família Cycloposthiidae: ciliatura em zona adoral retrátil; tufo sinciliares em áreas dorsal e caudal em número variável (0-4) e não retráteis; um a muito vacúolos pulsáteis; placas esqueléticas em algumas espécie; em cavalos, zebras, rinocerontes, tapires e às vezes em elefantes, capivaras e hipopótamos, já tendo sido assinalado no rúmen de bovinos.

Gênero *Parentodinium*: organismos ovais, com cone anterior retrátil ciliado medindo de 10 a 20 μm ; ciliatura somática ausente; vacúolo pulsátil na região posterior. Comprimento: 26-97 μm ; largura: 13-50 μm (Figura 1L).

Família Ophryoscolecidae: ciliatura reduzida à área anterior e constituída por ciliatura oral com coroa perivestibular em continuidade com a parte vestibular, invaginando-se em uma cripta, e ciliatura somática formada de zona ciliar esquerda, às vezes ausente (*Entodinium*). Placas esqueléticas em número variável caracterizam muitos gêneros. (0: *Diplodinium*, *Eodinium*; 01. *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Eremoplastron*; 02. *Diploplastron*, *Metadinium*; 03: *Epidinium*; 04: *Elytroplastron*; 05: *Polyplastron*, *Epiplastron*).

Subfamília Entodiinae: tufos sinciliares limitados à área adoral; macronúcleo entre o micronúcleo e o limite mais próximo do corpo.

Gênero *Entodinium*: única banda ciliar em volta da abertura oral. Nos organismos vivos cílios parecem formar membranelas ou pequenos tufos chamados sincília; quando fixados são visíveis como cílios individuais. A ciliatura oral é geralmente referida como zona ciliar

adoral ou zona adoral de sincilia. Comprimento: 22-115 μm ; largura: 14-90 μm (Figura 1M).

Subfamília Diplodiinae: tufos sinciliares na área adoral e no lado anterior esquerdo; zonas adoral e esquerda no mesmo plano transversal. Placas esqueléticas presentes em muitos gêneros. Opérculo presente.

Gênero *Diplodinium*: placas esqueléticas ausentes; macronúcleo com o terço anterior inclinado à direita, localizado no meio do corpo. Comprimento: 30-120 μm ; largura: 20-80 μm (Figura 1N).

Gênero *Eodinium*: placas esqueléticas ausentes; macronúcleo reto, em bastão, próximo à extremidade esquerda do corpo; dois vacúolos contráteis. Comprimento: 40-70 μm ; largura: 20-40 μm (Figura 1O).

Gênero *Eremoplastron*: única placa esquelética estreita; macronúcleo triangular ou em bastão com a extremidade posterior inclinada à direita; dois vacúolos contráteis. Comprimento: 35-110 μm largura 25-70 μm (Figura 1P).

Gênero *Eudiplodium*: uma pequena placa esquelética alongada, alargada na porção junto ao citóstoma percorre o citossoma ao longo do lado direito do macronúcleo, afilando-se posteriormente. Comprimento: 120-200 μm ; largura: 80-150 μm (Figura 1Q).

Gênero *Diploplastron*: duas placas esqueléticas delgadas; macronúcleo em bastão; dois vacúolos contráteis à esquerda do macronúcleo. Comprimento: 90-128 μm ; largura: 65-87 μm (Figura 1R).

Gênero *Polyplastron*: presença de cinco placas esqueléticas sendo duas bem distintas no lado superior e três pequenas no lado inferior. Vacúolos pulsáteis numerosos. Única espécie, *P. multivesiculatum*. Comprimento: 122-210 μm ; largura: 97-130 μm (Figura 1S).

Gênero *Ostracodinium*: placa esquelética larga, única, cobrindo quase completamente o lado superior do ciliado. Comprimento: 50-128 μm ; largura: 36-70 μm (Figura 1T).

Gênero *Elytroplastron*: presença de quatro placas esqueléticas sendo duas bem definidas no lado superior e no lado inferior uma placa bem desenvolvida e outra pequena. Única espécie, *E. bubali* (Dogiel, 1928). Comprimento: 100-160 μm ; largura: 76-100 μm (Figura 1U).

Gênero *Metadinium*: com duas placas esqueléticas largas, unidas ou não na região posterior; macronúcleo em forma de E ou F. Comprimento: 110-210 μm ; largura: 80-140 μm (Figura 1V).

Gênero *Enoploplastron*: três placas esqueléticas, separadas ou parcialmente unidas. Comprimento: 80-110 μm ; largura: 60-78 μm (Figura 1X).

Subfamília Ophryoscolecinae: tufo sinciliares na área adoral e no lado anterior esquerdo situados em planos transversais distintos; todos com placas esqueléticas. Opérculo ausente.

Gênero *Ophryoscolex*: zona esquerda de sincília formando uma banda que circunda cerca de três quartos do corpo. Com três placas esqueléticas no lado superior. Espinhos na parte posterior do corpo. Comprimento: 140-190 μm ; largura: 80-110 μm (Figura 1Y).

Gênero *Epidinium*: zona esquerda de sincília situada ao nível do terço anterior do corpo; três placas esqueléticas ligeiramente curvas no lado superior. Comprimento: 80-150 μm ; largura: 40-70 μm (Figura 1Z).

Gênero *Epiplastron*: zona esquerda de sincília ao nível do terço anterior do corpo; cinco placas esqueléticas. Assemelha-se a *Epidinium* do qual distingue-se pelo número de placas; dois vacúolos contráteis. Em antílopes africanos. Comprimento: 98-112 μm (Figura 1AA).

Gênero *Opisthotrichum*: zona ciliar esquerda localizada perto do meio do ciliado; única placa quase forma um cilindro anteriormente. Em antílopes africanos. Comprimento: 60-80 μm ; largura: 21-28 μm (Figura 1BB).

Gênero *Caloscolex*: zona ciliar esquerda forma um cinto situado logo abaixo da extremidade anterior circundando quase completamente o corpo; três placas esqueléticas, uma larga no lado superior e duas pequenas anteriormente à direita e à esquerda. Em camelos. Comprimento: 130-160 μm ; largura: 73-90 μm (Figura 1CC).

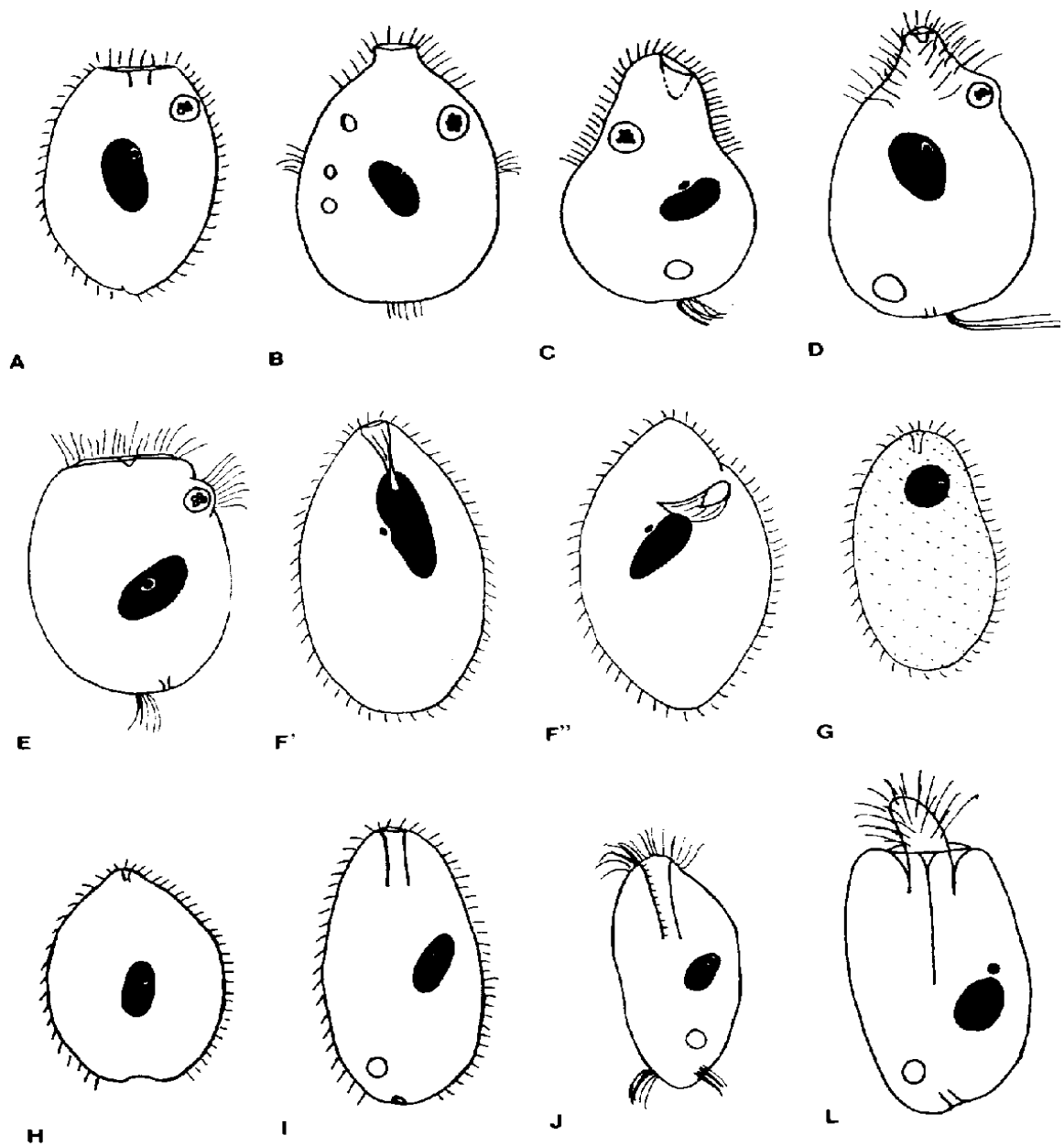


FIGURA 1. Representação esquemática dos ciliados do rúmen.

A. *Buetschlia*; B. *Blepharoconus*; C. *Blepharoprostium*;
 D. *Polymorphella*; E. *Parabundleia*; F. *Isotricha*,
 F'. *I. prostoma*, F''. *I. intestinalis*; G. *Dasytricha*;
 H. *Oligoisotricha*; I. *Microcetus*; J. *Charonina*;
 L. *Parentodinium*.

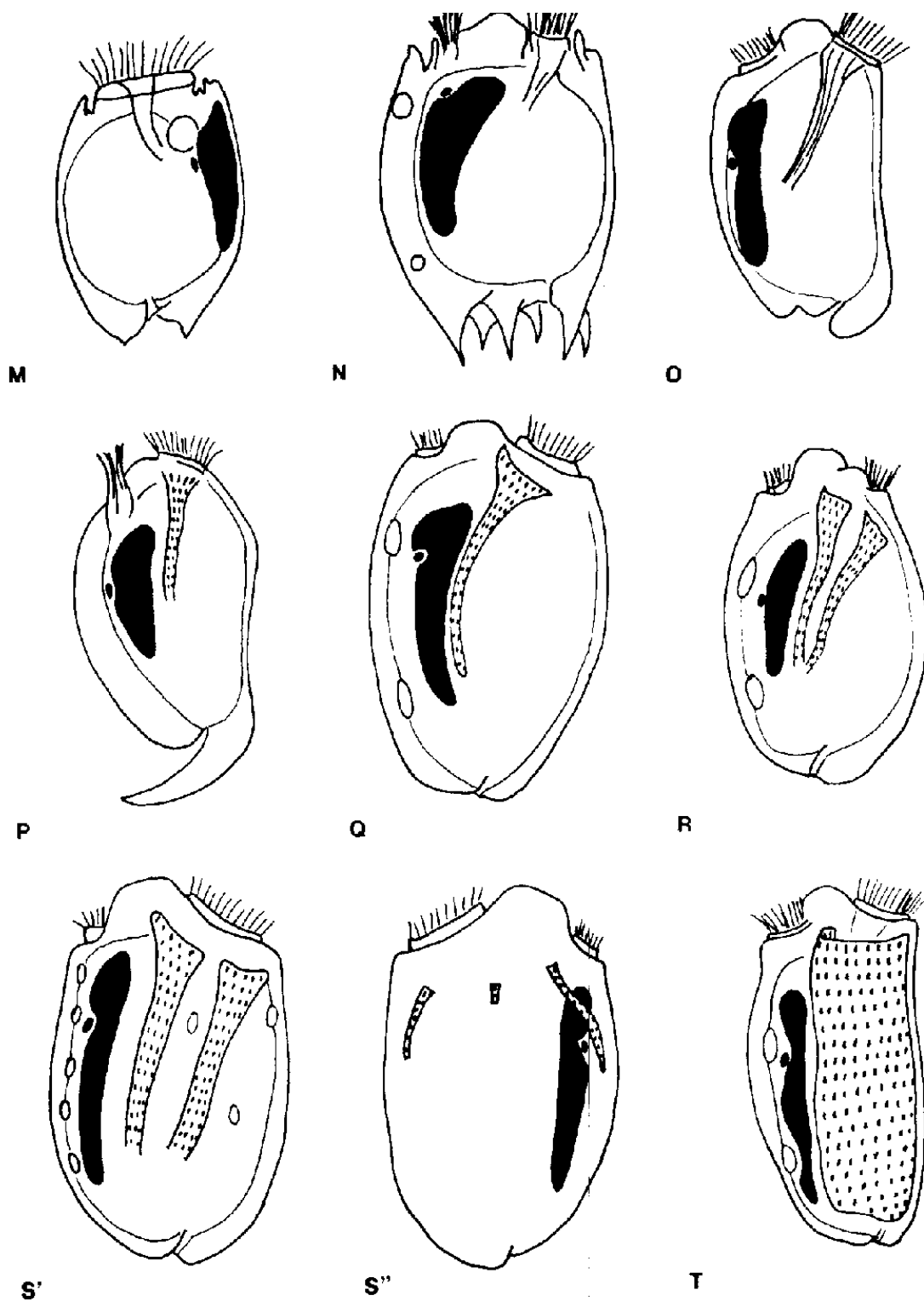


FIGURA 1 (Cont.). M. *Entodinium*; N. *Diplodinium*; O. *Eodinium*;
P. *Eremoplastron*; Q. *Eudiplodinium*; R. *Diploplastron*;
S. *Polyplastron*, S'. lado superior, S''. lado inferior;
T. *Ostracodinium*.

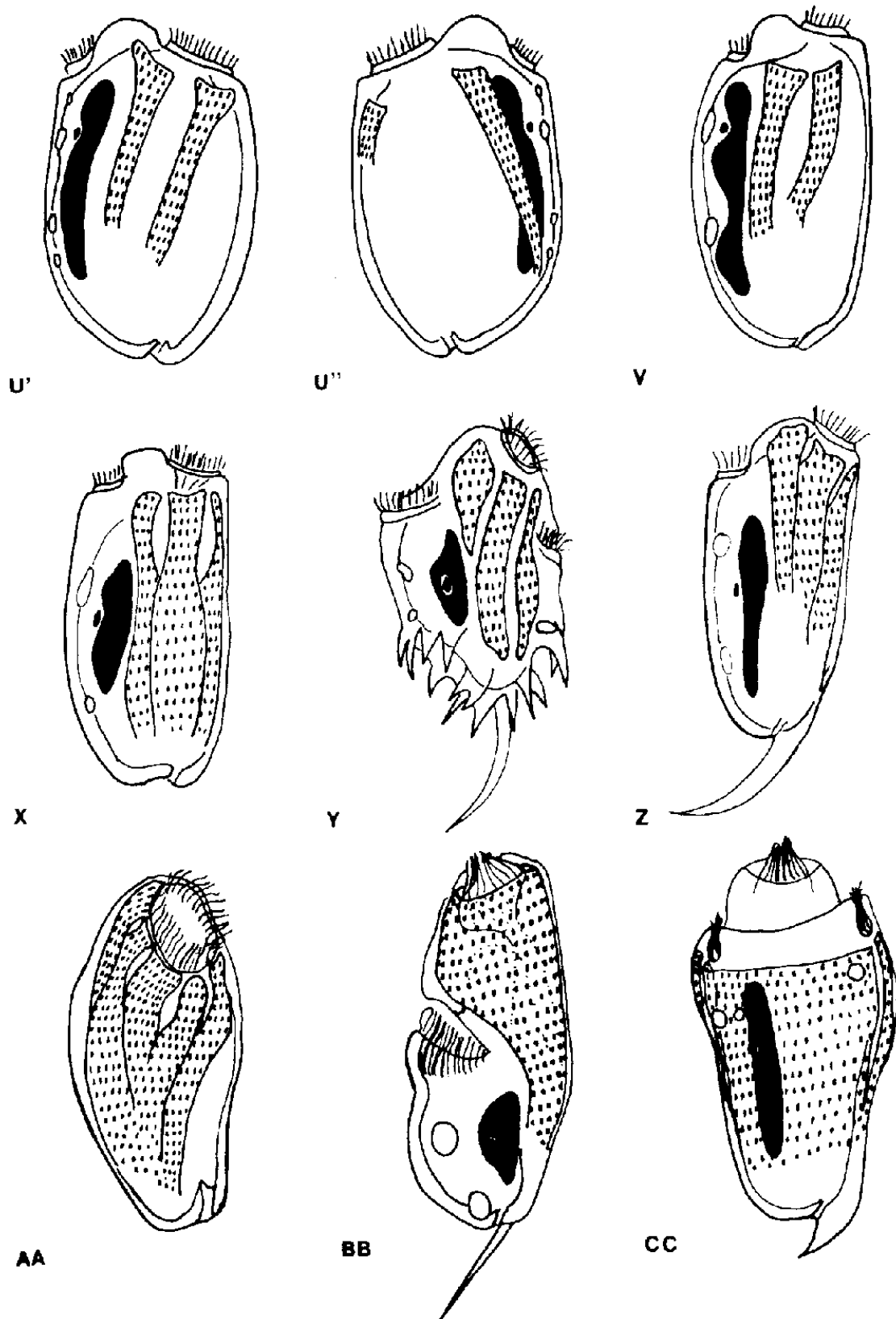


FIGURA 1 (Cont.). U. *Elytroplastron*, U'. lado superior, U''. lado inferior; V. *Metadinium*; X. *Enoploplastron*; Y. *Ophryoscolex*; Z. *Epidinium*; AA. *Epiplastron* (lado direito); BB. *Opisthotrichum*; CC. *Caloscolex*.

De acordo com a proposta de classificação do Phylum Ciliophora, até Ordens, e respectivas caracterizações, até Classes, apresentadas por PUYTORAC et al. (1993), estes ciliados do rúmen se situam da seguinte maneira:

Phylum Ciliophora Doflein, 1901

Subphylum Fiticorticata Puytorac et al., 1993

Classe Litostomatea Small & Lynn, 1981

Ordem Haptorida Corliss, 1974

Gêneros *Buetschlia*, *Blepharoconus*, *Blepharoprosthium*,
Polymorphella, *Parabundleia*

Classe Vestibuliferea Puytorac et al., 1974

Ordem Trichostomatida Bütschli, 1889

Gêneros *Isotricha*, *Dasytricha*, *Oligoisotricha*, *Microcetus*
(*incertae sedis*)

Ordem Blepharocorythida Wolska, 1971

Gênero *Charonina*

Ordem Entodiniomorphida Reichenow in Doflein & Reichenow,
1929

Gêneros *Parentodiniurn*, *Entodinium*, *Campylodinium*,
Diplodinium, *Eodinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*,

Diplopastron, Polyplastron, Ostracodinium, Elytroplastron, Metadinium, Enoploplastron, Ophryoscolex, Epidinium, Epiplastron, Opisthotrichum, Caloscolex

Subphylum Filicorticada: limite ecto-endoplásmico dos microfilamentos, contínuo ou descontínuo, em um ou dois extratos, ao menos localmente presente, ligado a parte proximal dos cinetosomas forma o sistema de raízes que são geralmente bem desenvolvidos, garantindo, desta maneira, a coesão longitudinal do sistema somático cinético. Monocinécias tipicamente com dois cordões de fibras transversas, ou policinécias.

Classe Litostomatea: citóstoma superficial. Infraciliatura pericitostomal de dicinécias diferenciadas na extremidade das cinécias somáticas, podendo estar acompanhada de monocinécias oralizadas. Rabdos formado pelas fibras transversais e nemadesmos das cinécias orais e oralizadas, acompanhadas ou não de micritúbulos acessórios de origem desconhecida. Estomatogênese telocinecial. Ciliados livres, predadores com toxicistas ou endocomensais do tubo digestivo de mamíferos.

Classe Vestibuliferea: citóstoma em um vestíbulo, invaginação constituída no opisto no momento da divisão, atraindo as extremidades das cinécias somáticas recobrem parcialmente a parede vestibular. Espécies livres ou endocomensais do tubo digestivo dos mamíferos.

3.2. Sistemática dos ciliados do rúmen

GRUBY & DELAFOND (1843) realizaram as primeiras observações de ciliados no estômago de ruminantes, assinalando a presença de quatro tipos de organismos. Sem atribuir-lhes qualquer designação, descreveu, dentre outros caracteres, como primeira espécie os organismos de forma alongada e achatada, com carapaça convexa na superfície, achatados em cima e denteados posteriormente, cabeça distinta, cílios ao meio do corpo, movimentos lentos; como segunda espécie os de forma ovóide, corpo com carapaça denteada anterior e posteriormente, com cauda cônica, com coroa de cílios anterior, movimentos distintos; terceira espécie os de forma alongada e cilíndrica, carapaça lisa, sem cauda, cílios ao redor da boca, movimentos muito rápidos; quarta espécie os organismos ovalados, sem carapaça, cílios em toda superfície do corpo, abertura bucal em uma das extremidades, movimentos rotatórios muito rápidos.

CRAWLEY (1923), apresentou discussão evolutiva sobre ciliados do rúmen que se resume aos seguintes pontos: 1. a família Ophryoscolecidae pertence aos ciliados oligotríquios cuja maioria das espécies é mutualista ou comensalista do primeiro e segundo estômago de ruminantes; 2. formam um grupo monofilético; 3. os gêneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Metadinium*, *Epidinium* e *Ophryoscolex*, formam uma série linear na qual o primeiro é o mais primitivo; 4. a distinção entre os gêneros baseia-se na forma do aparelho ciliar e entre as espécies no tamanho e forma de ornamentos presentes na extremidade posterior de quase todos os organismos; 5. relações evolutivas entre os gêneros. Finalmente, destacou a importância do estudo de parasitos para elucidar problemas relativos à evolução dos hospedeiros.

JAMESON (1925) descreveu o gênero e a espécie *Charon ventriculi* a partir de ciliados observados no estômago de oito hospedeiros, sete bovinos e um ovino, de um total de 70 ruminantes examinados na Inglaterra. Assinalou seu modo de locomoção regular e não muito rápido, promovido por dois tufo de cílios posteriores, e a ciliatura anterior abundante destacando-se dois tufo menos proeminentes que os postciores. Ressaltou que a boca situa-se na superfície ventral imediatamente posterior à extremidade anterior,

seguida de uma citofaringe proeminente; macronúcleo redondo e micronúcleo ovalado. O autor considerou *C. ventriculi* relacionado a organismos do gênero *Blepharocorys* Bundle (1895) de ceco de eqüinos.

DOGIEL (1926) descreveu a espécie *Blepharocorys bovis* ocorrente no rúmen de bovinos, contrastando com as outras espécies do gênero cuja ocorrência restringia-se ao ceco e cólon de eqüinos.

DOGIEL (1927) apresentou uma monografia sobre Ophryoscolecidae considerando os gêneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Ophryoscolex*, *Caloscolex*, *Opisthotrichum* e *Cunhaia*. Este autor subdividiu o gênero *Entodinium* nos subgêneros *Entodinium* e *Amphacantus* que passou a englobar a espécie *A. ovum-rajae* (Dogiel, 1926). O subgênero *Diplodinium* foi subdividido, por este autor, em quatro subgêneros, *Anoplodium*, *Eudiplodium*, *Polyplastron* e *Ostracodinium*.

BECKER & TALBOT (1927) realizaram estudo sobre protozoários (Sarcodina, Mastigophora e Infusoria) do rúmen-retículo de bovinos, assinalando os observados em amostras de 26 animais de abatedouro em Iowa. Além de caracterizarem cada gênero e espécie, apresentaram chave dicotômica para identificação desses protozoários e descreveram *Diplodinium clevelandi*, *Diplodinium hegnei*,

Diplodinium helseri. As tentativas de cultivo em diversos meios não lograram êxito. Os autores detectaram os seguintes gêneros de ciliados: *Isotricha*, *Dasytricha*, *Bütschli*, *Entodinium*, *Diplodinium* e *Ophryoscolex*.

DOGIEL (1928) em estudo sobre infusórios do estômago de dromedários e búfalos, destacou a semelhança entre os de bovinos e bubalinos assinalando, contudo, espécies novas e endêmicas como *Isotricha bubali*, *Diplodinium* (*Polyplastron*) *bubali* e *Epidinium lobatum* além de *Diplodinium* (*Anoplodinium*) *polygonale*, ocorrente em antílope africano, dentre outras espécies já referidas para búfalos.

CAMPBELL (1929) utilizando conteúdo ruminal de bovinos e de ovinos, fixados com líquido de Schaudin e de Zenker, corados pela hematoxilina férrica de Heidenhain, descreveu a morfologia de *Isotricha prostoma* acrescentando novas características às descrições prévias deste ciliado. Ressaltou a presença de estrutura de sustentação do núcleo como um suporte plano e a presença de vacúolos alimentícios.

KOFOID & MacLENNAN (1930) apresentaram um tratado sobre ciliados de *Bos indicus*, no qual descreveram 15 espécies e fizeram nova descrição de cinco outras espécies do gênero *Entodinium* Stein, 1858, separadas nos seguintes grupos: - Grupo bursa 1. *E.*

ellipsoideum; Grupo *longinucleatum* 2. *E. longinucleatum* Dogiel, 1925, 3. *E. acutonucleatum*; Grupo *rostratum* 4. *E. rostratum* Fiorentini, 1889, 5. *E. pisciculum*; - Grupo *biconcavum* 6. *E. biconcavum*, 7. *E. bifidum* (Dogiel, 1927), 8. *E. acutum*, 9. *E. aculeatum*; - Grupo *laterale* 10. *E. laterale*, 11. *E. rectangulatum*; - Não agrupadas 12. *E. brevispinum*, 13. *E. laterospinum*, 14. *E. nanellum* Dogiel, 1927, 15. *E. ovoideum*, 16. *E. rhomboideum*, 17. *E. bimastus* Dogiel, 1927, 18. *E. gibberosum*, 19. *E. tricoatum* e 20. *E. indicum*. Os autores discutiram aspectos morfológicos do gênero e a importância da estrutura e posição de várias organelas como base para sua sistemática, base para classificação específica e sugeriram que o termo "forma", amplamente utilizado na família Ophryoscolecidae, não deva ser usado. No mesmo estudo, destacaram não ter havido diferença significativa entre a ciliatofauna ruminal de cinco hospedeiros de Coonor, Índia e quatro de Colombo, Sri Lanka.

KOFOID & MacLENNAN (1932) apresentaram revisão do gênero *Diplodinium* Schuberg, 1888 reconhecendo *Entodinium dentatum* como *Diplodinium dentatum* (Stein, 1858), espécie tipo deste gênero. As principais propostas dos autores podem ser sintetizadas nos seguintes itens: 1. propuseram elevar à categoria taxonômica de gênero

os subgêneros propostos por Dogiel em 1927, com exceção de *Anoploadinium* que reconheceram como sinonímia de *Diplodinium*, destacando que não havia subgênero com a denominação do gênero conforme preconiza o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica; 2. reestabeleceram o gênero *Metadinium* Awerinzew & Mutafova, 1914, que havia sido suprimido por Dogiel (1927); 3. propuseram os novos gêneros *Eodinium*, *Eremoplastron*, *Diploplastron*, *Elytroplastron* e *Enoploplastron*. Para a classificação apresentada, os autores se basearam na posição e tamanho das zonas de membranelas, número e forma das placas esqueléticas, forma do macronúcleo, morfologia das fibrilas esofageanas, e outros caracteres da estrutura interna. As amostras de conteúdo ruminal de *B. indicus* examinadas continham 31 espécies dos gêneros citados.

KOFOID & MacLENNAN (1933) apresentaram estudo sobre os gêneros *Epidinium* e *Ophryoscolex* e propuseram o gênero *Epiplastron* para organismos com cinco placas esqueléticas, ficando portanto *Epidinium* restrito para ciliados com três placas esqueléticas. Os autores trabalharam com amostras de conteúdo ruminal de *Bos indicus*, nas quais identificaram, ainda, outras quatro espécies de ciliados holo-tríquios, *Isotricha prostoma* Stein, *Dasytricha ruminantium* Schuberg, *Bütschlia parva* Schuberg, 1888 e *Charon ventriculi* Jameson, 1925.

WERTHEIM (1933) in NOIROT-TIMOTHÉE (1960) distinguiu duas subfamílias de Ophryoscolecidae: Ophryoscolecinae, incluindo os gêneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Ophryoscolex*, *Caloscolex* e *Opisthotrichum* e Cunhaiinae com o gênero *Cunhaia*.

KOFOID & CHRISTENSON (1934) examinaram conteúdo ruminal de um hospedeiro da espécie *Bos gaurus* Smith, de uma reserva florestal perto do Estado de Mysore, na Índia. Os autores destacaram que apesar da expectativa de encontrarem uma ciliatofauna que elucidasse aspectos evolutivos deste grupo de ciliados, uma vez que o hospedeiro mantém-se isolado e em estado selvagem, observaram similaridade com a de outros bovinos. Foram identificadas 25 espécies de entodiniomorfos cinco das quais descritas como novas, três espécies de holotríquios além de flagelados e amebas.

WERTHEIM (1935) descreveu *Entodinium bovis*, presente em 27 dos 120 rúmen-retículos de bovinos (*Bos taurus* L.) examinados em várias regiões da Iugoslávia. Caracterizando *E. bovis* como redondo e pequeno (26,25 a 38,5 μm por 24,5 a 31,5 μm), os autores apresentaram revisão e diagnóstico diferencial com *Entodinium exiguum*, *E. nanellum*, *E. simplex*, *E. dubardi dubardi* e *E. parvum*.

LUBINSKY (1957a) iniciando estudos sobre aspectos evolutivos da família Ophryoscolecidae, descreveu a espécie *Entodinium simulans* com variabilidade intraespecífica apresentando, de acordo com modificações de extremidade posterior do corpo, as formas "caudatum" (com um espinho dorsal e dois lobos ventrais), "loboso-spinosum" (com um espinho dorsal e um lobo ventral) e "dubardi" (sem processos caudais). O autor considerou uma seqüência evolutiva o deslocamento do vacúolo contrátil para o meio do corpo e a transformação da ranhura lateral em um sulco estreito estencendo-se até a zona adoral, como o observado entre *E. caudatum*, *E. rectangulatum* e *E. simulans*.

LUBINSKY (1957b) dando seqüência a considerações evolutivas sobre Ophryoscolecidae, comparou estruturas de *Diplodinium* e *Entodinium* do grupo "caudatum-laterale", concluindo que *Diplodinium* sofreu torção com deslocamento do aparelho nuclear, da fenda lateral esquerda e do vacúolo contrátil, no sentido do lado dorsal ao ventral. Desta forma, o lado ventral de *Entodinium* foi transformado em dorsal em *Diplodinium* o que levou o autor a propor terminologia para as regiões corporais desses organismos.

LUBINSKY (1957c) apresentou proposta de uma seqüência evolutiva de Ophryoscolecidae na qual considerou como curso principal o deslocamento do aparelho nuclear do seu lado primário, o lado "ventral" de *Entodinium*, à uma posição secundária, o lado "dorsal" dos outros membros da família. Considerou ainda, que esta mudança foi acompanhada do progressivo desenvolvimento do citoesqueleto e da polimerização das organelas, dentre outras. Na ocasião, propôs as seguintes subfamílias para a família Ophryoscolecidae, com suas respectivas caracterizações: Entodiinae - uma zona de membranela, um vacúolo contrátil. Em visão lateral, macronúcleo situado entre o micronúcleo e o limite corporal mais próximo; Diplodiinae - duas zonas de membranelas situadas aproximadamente no mesmo plano transversal. Dois ou mais vacúolos contráteis. Em visão lateral, micronúcleo situado entre o macronúcleo e o limite corporal mais próximo; Ophryoscolecinae - duas zonas de membranelas situadas em planos transversais diferentes. Dois ou mais vacúolos contráteis. Em visão lateral, micronúcleo situado entre o macronúcleo e o limite corporal mais próximo. O autor situou nestas subfamílias os gêneros propostos por KOFOID & MacLENNAN (1930, 1932, 1933).

LUBINSKY (1958a) redescobriu 10 espécies de *Entodinium* encontrados no conteúdo ruminal de 14 renas da região ártica do Canadá. O autor referiu-se a trabalhos anteriores (1957b, 1957c) nos quais assinalava ser inadequado os termos lados "dorsal" e "ventral" para organismos assimétricos, não orientados em relação à gravidade. Desta forma, utilizou estruturas próprias aos organismos para situá-los morfológicamente. Por exemplo, polo oral, polo aboral ou ainda lado nuclear, que considerou mais adequadas aos gêneros de Ophryoscolecidae. O autor destacou que o aparelho nuclear dos organismos desta família, anteriormente associado ao lado dorsal, deslocou-se, ao longo da evolução do grupo, 100° a 180° ao redor do eixo do corpo, mas manteve a relação entre macro e micronúcleo. Assim, o "lado nuclear" do corpo dos grandes Ophryoscolecidae não é homólogo ao de *Entodinium*. Com a orientação proposta pelo autor, ou seja, extremidade oral voltada para 12 horas e micronúcleo à esquerda do macronúcleo, têm-se superfícies corporais homólogas, que correspondem ao "lado esquerdo" de *Entodinium* e "lado direito" dos demais, segundo terminologia de DOGIEL (1927). Nesta superfície encontram-se as estruturas mais importantes desses ciliados, como fenda lateral esquerda de *Entodinium* e de *Diplodinium*, vacúolo contrátil de *Entodinium*, e placas esqueléticas principais. A esta

superfície chamou de "lado superior" e à superfície oposta "lado inferior". O autor destaca ainda que o sistema de terminologia proposto tem como vantagens a padronização de termos para lados homólogos do corpo para todos os organismos de Ophryoscolecidae e por dispensar o conceito de dorsalidade para estes ciliados. Neste mesmo trabalho, Lubinsky apresentou chave dicotômica para as subfamílias Entodiinae, Diplodiinae e Ophryoscolecinae e para espécies do gênero *Entodinium* registradas em renas.

NOIROT-TIMOTHÉE (1960) realizou estudo sobre ciliados da família Ophryoscolecidae sob aspectos estruturais, ultraestruturais e sistemático. Considerou a existência de quadro grandes modelos *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium* e *Ophryoscolex*; ampliou ainda para seis os subgêneros propostos por DOGIEL (1927) para o gênero *Diplodinium*, a saber: *Diplodinium* (sem placas esqueléticas; dois vacúolos pulsáteis), *Eudiplodinium* (uma ou duas placas esqueléticas do lado direito; dois vacúolos pulsáteis), *Polyplastron* (cinco placas esqueléticas, duas à direita e três pequenas à esquerda; nove vacúolos pulsáteis), *Elytroplastron* (quatro placas esqueléticas, duas à direita e duas à esquerda; quatro vacúolos contráteis alinhados ao longo do lado dorsal), *Ostracodinium* (uma placa esquelética larga; dois a seis vacúolos pulsáteis) e *Enoploplastron* (três placas esqueléticas; dois

vacúolos pulsáteis). Considerou dois subgêneros para o gênero *Epidinium*: *Epidinium*, com três placas esqueléticas e *Epiplastron*, com cinco placas esqueléticas. Considerou ainda que o conjunto dos gêneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Ophryoscolex*, *Caloscolex* e *Opisthotrichum* formam um grupo bem definido, constituindo a família Ophryoscolecidae.

LATTEUR (1966) propôs alteração sistemática da família Ophryoscolecidae, após analisar comparativamente os sistemas propostos por DOGIEL (1927) e por KOFOID & MacLENNAN (1930, 1932, 1933). Comparando os gêneros *Eodinium* e *Diplodinium*, *Eudiplodinium* e *Eremoplastron*, *Diploplastron* e *Metadinium* concluiu que a maior fragilidade da proposta de KOFOID & MacLENNAN (1932) foi a utilização de caracteres do aparelho nuclear na formulação genérica. Estabeleceu como caracteres sistemáticos de primeira ordem os relacionados à zona acessória de membranelas (a presença ou ausência, o perfil, a extensão e a posição); como de segunda ordem, os relacionados à armadura esquelética (a presença ou ausência, o número e a posição). Baseado na combinação desses caracteres, o autor reconheceu seis subfamílias e 13 gêneros conforme se segue: - Entodiinae: *Entodinium*; - Diplodiinae: *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Metadinium*, *Enoploplastron*, *Elytroplastron* e

Polyplastron; - Epidiinae: *Epidinium* e *Epiplastron*; - Opisthotrichinae: *Opisthotrichum*; - Ophryoscolecinae: *Ophryoscolex*; - Caloscolecinae: *Caloscolex*. Ao nível específico, distinguiu as espécies em estáveis e variáveis, sendo as variações restritas aos espinhos caudais.

LATTEUR (1968, 1969) apresentou revisão sistemática do gênero *Entodinium*, agrupando suas espécies em sete tipos segundo a posição do vacúolo pulsátil. Baseado na combinação desses caracteres, o autor reconheceu seis subfamílias e 13 gêneros conforme se segue: I. sem zona acessória de membranelas: Entodiinae, *Entodinium*. II. (A) com zona acessória de membranelas transversal, dorsal, percorrendo um terço da circunferência A.1.) ao nível da zona adoral: Diplodiinae, *Diplodinium* (sem placa esquelética); *Eudiplodinium* (uma placa estreita); *Ostracodinium* (uma placa larga); *Metadinium* (duas placas esqueléticas); *Enoploplastron* (três placas esqueléticas); *Elyplastron* (quatro placas esqueléticas); *Polyplastron* (cinco placas esqueléticas); A.2.) ao nível do terço anterior do corpo: Epidiinae, *Epidinium* (três placas esqueléticas); *Epiplastron* (cinco placas esqueléticas); A.3.) ao nível da metade do corpo Opisthotrichinae, *Opisthotrichum*. II (B) com zona acessória de membranelas espiralada B.1.) percorrendo três quartos da circunferência: Ophryoscolecinae, *Ophryoscolex*; B.2.) com espiral completa: Caloscolecinae, *Caloscolex*.

ORPIN & MATHIESSEN (1986) propuseram novo gênero de ciliado de rúmen ao descreverem a espécie *Microcetus lappus*, observada em dois bovinos "norwegian red". Os autores apresentaram diagnóstico diferencial com organismos dos gêneros *Oligoisotricha*, *Charonina* e *Parabundleia*. Discutiram ainda que *M. lappus* não se enquadra em Vestibulifera nem em Hypostomata, podendo representar um novo taxon ainda não descrito.

3.2.1. Quadro resumo das principais propostas de sistemática para a família Ophryoscolecidae

DOGIEL (1927)

Gênero	Subgênero
<i>Entodinium</i>	<i>Entodinium</i>
	<i>Amphacanthus</i>
<i>Diplodinium</i>	<i>Anoplodinium</i>
	<i>Eudiplodinium</i>
	<i>Polyplastron</i>
	<i>Ostracodinium</i>
<i>Epidinium</i>	
<i>Ophryoscolex</i>	
<i>Caloscolex</i>	
<i>Opisthotrichum</i>	
<i>Cunhaia</i>	

KOFOID & MacLENNAN (1930, 1932)

Subfamília	Gênero
Entodiinae	<i>Entodinium</i>
Ophryoscolecinae	<i>Ophryoscolex</i>
Diplodiinae	<i>Diplodinium</i>
	<i>Eodinium</i>
	<i>Eremoplastron</i>
	<i>Eudiplodinium</i>
	<i>Diploplastron</i>
	<i>Polyplastron</i>
	<i>Elytroplastron</i>
	<i>Metadinium</i>
	<i>Ostracodinium</i>
	<i>Enoploplastron</i>
	<i>Epidinium</i>
	<i>Epiplastron</i>

WERTHEIM (1933) in NOIROT-THIMOTHÉE (1960)

Subfamília	Gênero
Ophryoscolecinae	<i>Entodinium</i>
	<i>Diplodinium</i>
	<i>Epidinium</i>
	<i>Ophryoscolex</i>
	<i>Caloscolex</i>
	<i>Opisthotrichum</i>
Cunhaiinae	<i>Cunhaia</i>

LUBINSKY (1957c)

Subfamília	Gênero
Entodiinae	<i>Entodinium</i>
Diplodiinae	<i>Diplodinium</i> <i>Eodinium</i> <i>Eremoplastron</i> <i>Eudiplodinium</i> <i>Diploplastron</i> <i>Metadinium</i> <i>Polyplastron</i> <i>Elytroplastron</i> <i>Ostracodinium</i> <i>Enoploplastron</i>
Ophryoscolecinae	<i>Ophryoscolex</i> <i>Epidinium</i> <i>Opisthotrichum</i> <i>Caloscolex</i> <i>Epiplastron</i>

NOIROT-TIMOTHÉE (1960)

Gênero	Subgênero
<i>Entodinium</i> <i>Diplodinium</i>	<i>Diplodinium</i> <i>Eudiplodinium</i> <i>Polyplastron</i> <i>Elytroplastron</i> <i>Ostracodinium</i> <i>Enoploplastron</i>
<i>Epidinium</i>	<i>Epidinium</i> <i>Epiplastron</i>
<i>Ophryoscolex</i> <i>Caloscolex</i> <i>Opisthotrichum</i>	

LATTEUR (1966)

Subfamília	Gênero
Entodiinae	<i>Entodinium</i>
Diplodiinae	<i>Diplodinium</i>
	<i>Eudiplodinium</i>
	<i>Ostracodinium</i>
	<i>Metadinium</i>
	<i>Enoploplastron</i>
	<i>Elytroplastron</i>
	<i>Polyplastron</i>
Epidiinae	<i>Epidinium</i>
	<i>Epiplastron</i>
Opisthotrichinae	<i>Opisthotrichum</i>
Ophryoscolecinae	<i>Ophryoscolex</i>
Caloscolecinae	<i>Caloscolex</i>

3.3. Ciliados do rúmen no Brasil

CUNHA (1914) examinou conteúdo do rúmen e do retículo de bovinos e ovinos provenientes de matadouros encontrando ciliados dos gêneros *Isotricha*, *Dasytricha*, *Ophryoscolex*, *Diplodinium* e *Entodinium* e identificando 14 espécies, dentre as quais as três novas que descreveu. O autor assinalou grande analogia entre a fauna parasitológica encontrada e a de outros países, bem como a semelhança entre as espécies observadas nos dois tipos de hospedeiros, atribuindo a não ocorrência de algumas destas nos ovinos ao menor número examinado com relação aos bovinos.

DEHORITY (1979) determinou o número total e a distribuição por gêneros e subgêneros de ciliados do rúmen de quatro búfalos *Bubalus bubalis* L., no Brasil. Um destes hospedeiros (búfalo número 1 era mantido em proximidade com gado europeu (*Bos taurus*) e zebu (*Bos indicus*), o que resultou em ciliatofauna diferente da observada nos outros animais, mantidos isolados em um rancho. O autor assinalou o total de 49 espécies sendo oito descritas como novas. Destacou ainda, que o búfalo número 1 apresentou a concentração mais elevada de ciliados ruminais, com o maior percentual ocupado por organismos do gênero *Entodinium*, menor percentual de organismos Diplodiinae e com distribuição genérica semelhante à observada em gado na América, enquanto nos outros animais a distribuição era mais relacionada com a do gado na Índia e Nova Zelândia.

NOGUEIRA FILHO et al. (1983), acompanharam a implantação de ciliados no líquido ruminal de 45 bezerros de raça holandesa, em Pindamonhangaba, SP, assinalando organismos dos gêneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Isotricha* e *Dasytricha*. Os animais foram observados dos sete aos 270 dias de idade, período em que o pH do rúmen variou de 4,44 a 6,80, registrando-se *Entodinium* e *Diplodinium* ao terceiro mês de vida dos bezerros com pH ruminal de 4,90; *Dasytricha* e *Isotricha*, foram os de instalação mais

tardia, aos seis meses, com pH acima de 6,0. Os autores ressaltaram que, *Entodinium* sempre foi predominante em relação aos demais gêneros assinalados.

NOGUEIRA FILHO et al. (1984), utilizando 115 bezerros do tipo "Mantiqueira", acompanharam a cronologia do aparecimento de ciliados no rúmen, nos quais registraram os mesmos gêneros registrados por NOGUEIRA FILHO (1983), porém com *Entodinium* já ao segundo mês de idade quando o pH ruminal foi cerca de 4,22. Registraram que embora a instalação de ciliados no rúmen de bezerros do tipo "Mantiqueira" ocorra mais precocemente que em bezerros Holandês puro, seu desenvolvimento quanto às densidades populacionais é menos acelerado.

DEHORITY (1986) estudou a composição da ciliatofauna do conteúdo ruminal de quatro vacas Nelore (*B. indicus*), no Estado de São Paulo, Brasil, mantidas com uma mistura de capins colônia, pangola e grama batatais, registrando a presença de 55 espécies de ciliados das famílias Buetschliidae (*Blepharoconus*, *Buetschlia*), Isotrichidae (*Dasytricha*, *Isotricha*), Blepharocorythidae (*Charonina*), Ophryoscolecidae (*Entodinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Metadinium*, *Elytroplastron*, *Epidinium*), Cycloposthiidae (*Parentodinium*) e provavelmente Paraisotrichidae

(*Paraisotricha*). O número total de ciliados estimados variou de 9,0 a $51,2 \times 10^4$ por mililitro de conteúdo ruminal, de acordo com o animal examinado. Numericamente, houve predominância dos organismos do gênero *Entodinium* cujo percentual, com relação ao número total por animal, variou entre 42,2% e 84,6%. O autor relatou o primeiro registro de organismos da família Cycloposthiidae, *Parentodinium africanum*, no habitat ruminal. Registrou, ainda, a presença de *Blepharoconus krugerensis* para o qual bovino seria novo registro de hospedeiro, de uma outra espécie desconhecida, com características da família Paraisotrichidae em um espécimen dos hospedeiros examinados, e descreveu uma subespécie, *Diplodinium flabellum laterospinatum*.

OLIVEIRA et al. (1987) observaram o desenvolvimento de ciliados no rúmen de 15 ovinos (*Ovis aries* L.) criados em Itapetinga, SP, desde o nascimento até 11 meses de idade. Assinalaram organismos dos gêneros *Entodinium* (76,16%), *Diplodinium* (15,87%), *Epidinium* (4,25%), *Isotricha* (0,73%) e *Dasytricha* (2,99%), com respectivos percentuais sobre o total 191729,5 ciliados/ml. Estes dados referem-se aos obtidos a partir do oitavo mês de idade dos hospedeiros, quando ocorreu estabilização das populações, com pH de 6,90. Os autores sugeriram que os valores médios encontrados da estabilização até os 11

meses possam servir de referência para animais adultos.

OLIVEIRA et al. (1989) observaram o desenvolvimento de ciliados no rúmen de 15 caprinos (*Capra hircus* L.) criados em Itapetinga, SP, desde o nascimento até 11 meses de idade. Assinalaram organismos dos gêneros *Entodinium* (69,88%), *Diplodinium* (25,66%), *Epidinium* (2,01%), *Isotricha* (0,69%) e *Dasytricha* (1,74%), com respectivos percentuais sobre o total de $217,02 \times 10^3$ ciliados/ml, cujos dados referem-se aos obtidos a partir do décimo mês, quando houve tendência à estabilização, com pH de 6,9.

D'AGOSTO et al. (1990) avaliaram populações de ciliados do rúmen com amostras periódicas obtidas em julho de 1989, em novilhos hotando-zebu, mantidos com cana-de-açúcar + 1% de uréia + farelo de algodão (D1) e com cana-de-açúcar + 1% de uréia (D2). Os percentuais dos ciliados assinalados em D1 e D2 foram, respectivamente, os seguintes: *Entodinium* (77,8 e 88,2), *Dasytricha* (15,5 e 6,1), *Isotricha* (6,7 e 5,7) e Diplodiinae (0,30 e 0,15).

ARCURI et al. (1991) compararam populações de ciliados do rúmen de quarto bovinos, alimentados com dietas à base de cana-de-açúcar e 1% de uréia (D1) e acrescida de 15% de farelo-de-algodão (D2), recolhendo amostras com o animal em jejum, duas e cinco horas após o fornecimento do alimento. Registraram a presença de

organismos dos gêneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Isotricha*, *Dasytricha* e *Epidinium*. As contagens médias apresentaram o total de 12×10^4 e 19×10^4 ciliados/ml de conteúdo ruminal para D1 e D2, respectivamente. Ressaltaram o efeito positivo da suplementação sobre a concentração de ciliados, o que segundo os autores indicaria a importância da proteína na microbiota ruminal.

OLIVEIRA (1991) em estudo de aspectos do suco ruminal de 51 vacas nelore mantidas com dieta de forragem verde, com predominância de *Brachiaria decumbens*, no município de Botucatu, SP, utilizando a câmara de Fuchs-Rosenthal registrou número total de protozoários significativamente maior no verão ($134 \times 10^3/\text{ml}$) que no inverno ($85 \times 10^3/\text{ml}$).

CARNEIRO et al. (1992) avaliaram a influência das dietas (D1) cana-de-açúcar + 1% de uréia e de (D2) capim elefante sobre as populações de ciliados do rúmen de novilhos holando-zebu, em Minas Gerais. Registraram total de ciliados em D1 de $18,12 \times 10^4$ e em D2 de $7,35 \times 10^4/\text{ml}$ de conteúdo ruminal. Os autores assinalaram os seguintes percentuais por grupo de ciliados em D1 e D2, respectivamente: *Entodinium* 83,13 e 62,93%, Diplodiinae 2,40 e 10,57%, *Isotricha* 3,12 e 6,17% e *Dasytricha* 11,35 e 14,96%. Com relação às concentrações do total de ciliados segundo tempos após a

alimentação, constataram diferença significativa em D1 entre T0 e T5 e em D2 entre T0 e T3 e entre T2 e T5.

BRANDO & D'AGOSTO (1993) compararam as populações de ciliados de rúmen em amostras obtidas da parte superior e do meio da massa alimentar de uma vaca holando-zebu em lactação, mantida com dieta à base de silagem de milho. Os valores médios dos organismos dos gêneros *Entodinium*, *Isotricha*, *Charonina* e da subfamília Diplodiinae diferiram significativamente entre as duas regiões de amostragem.

D'AGOSTO & SANTA ROSA (1993) examinaram 270 amostras de conteúdo ruminal de três vacas holando-zebu em lactação mantidas com dietas à base de silagem de milho e ração com diferentes concentrações de proteína, utilizando o quadrado latino como modelo experimental. Identificaram ciliados dos gêneros *Entodinium*, *Isotricha*, *Diplodinium*, *Eodinium*, *Charonina* e outros agrupados como "Diplodiinae" nos três animais, e *Dasytricha* no animal referido como A1 e *Eudiplodinium* nos animais A1 e A2. Constataram que a variação na concentração de proteína diferiu significativamente entre as três dietas para as populações de *Diplodinium* e de *Eudiplodinium*. Os autores destacaram ainda que a concentração de ciliados em relação ao

número total manteve proporção constante nos três hospedeiros independente da dieta ou época da amostragem.

D'AGOSTO & SANTA ROSA (1994) investigaram a utilização de técnicas de preparações permanentes, o protargol e a reação de Feulgen, no estudo de ciliados entodiniomorfos do rúmen de bovinos, com amostras de conteúdo ruminal fixadas e conservadas em formalina. Concluíram que apesar da não impregnação da infraciliatura pelo protargol, as duas técnicas evidenciaram bem as seguintes estruturas: núcleos, zonas de sincília, citofaringe, citoprocto e fagossoma.

3.4. Fatores que influem na ocorrência e na concentração de ciliados no rúmen

WARNER (1962) observou que a concentração de micro-organismos no rúmen altera-se em relação ao intervalo de tempo após a alimentação, refletindo-se ainda na proporção de organismos em divisão registrados. Destacou que diferentes animais sob a mesma dieta apresentam populações diferentes de micro-organismos. O autor não assinalou efeito da quantidade de alimento sobre a concentração dos constituintes da microbiota ruminal, porém com os hospedeiros

mantidos em jejum, registrou redução ou eliminação de alguns daqueles.

EADIE (1962a) acompanhou a instalação e o desenvolvimento de bactérias e de protozoários no rúmen de 58 ruminantes, cordeiros e bezerros, mantidos sob diversas condições de manejo. Avaliou especialmente até que ponto as populações de micro-organismos são influenciadas pela idade do hospedeiro, dieta, disponibilidade de micro-organismos, espécie do hospedeiro e se há variação individual entre os animais. Destacou que a dieta foi o fator preponderante para a instalação dos ciliados e que a inoculação foi tão eficiente quanto o contato parental. Após o período inicial de pH baixo, tanto nos bezerros como nos borregos, os primeiros ciliados a se estabelecerem foram espécies do gênero *Entodinium*. De tal forma, observou que quando o pH estava mais baixo que 6,0 a ocorrência foi de pequeno número de ciliados; pouco acima que 6,0 várias espécies de *Entodinium* foram observadas e com pH maior que 6,5, populações mistas, incluindo grandes organismos da família Ophryoscolecidae. Assinalou ainda, que não houve diferença significativa na performance dos animais mantidos com ou sem ciliados e que ocorrem variações individuais entre os hospedeiros que não podem ser atribuídas à diferença de manejo.

EADIE (1962b) investigou as interrelações entre ciliados do rúmen por meio de inoculações intra-ruminais em cordeiros, ovelhas e bezerros concluindo que apesar da não especificidade ao hospedeiro de certas espécies, o estabelecimento da microfauna foi influenciado pelo hospedeiro. Observou ainda que ciliados das espécies *Polyplastron multivesiculatum* (Dogiel & Fedorowa), *Eudiplodinium maggii* (Fiorentini) e *Epidinium* spp. não formam populações mistas estáveis, e apesar de não precisar a causa deste antagonismo não o atribui ao canibalismo, competição por alimento ou a bruscas modificações bacterianas. Destacou ainda que não foram assinaladas diferenças em ganho de peso e ingestão de alimento entre animais faunados e defaunados. Agrupou os ciliados da família Ophryoscolecidae em Tipo A ou Tipo B de acordo com a tendência de serem encontrados juntos em populações estáveis sob condições naturais. Assim, constituem população do Tipo A os organismos. *P. multivesiculatum* associados a outros como *Diploplastron affine* (Dogiel & Fedorowa), *Ophryoscolex tricornatus* (Dogiel) e do Tipo B no qual *E. maggii* e *Epidinium* spp., juntos ou isolados, são os grandes entodiniomorfos predominantes. Espécies comuns ao tipo A e B são *Entodinium* spp. e holotríquios.

WARNER (1966a) investigou padrões de alteração da concentração de microorganismos do rúmen de ovinos, concluindo que há um padrão característico para cada grupo, e que estes padrões são pouco influenciados pela hora do dia, tipo de dieta ou animal hospedeiro. O autor constatou que a alteração de concentração de ciliados da família Ophryoscolecidae é resultante da diluição ocasionada pela alimentação, seguida de crescimento das populações em resposta aos nutrientes. Já o comportamento apresentado pelos holotríquios, o autor ressaltou ser mais difícil analisar, não tendo observado processos de divisão até 18 horas após a alimentação, e constatado pique da concentração durante ou logo após a alimetenção.

WARNER (1966b) acompanhou alterações da concentração de micro-organismos do rúmen de um ovino com quantidade de dieta controlada, à base de alfafa e palha de trigo, fornecida a cada três horas. Registrou que após a alimentação havia aumento da atividade metabólica pelo aumento da concentração de amônia e de ácidos graxos voláteis e decréscimo do valor do pH. Todos os micro-organismos mostraram algum grau de aumento na concentração imediatamente após a alimentação, o que o autor atribuiu ao aumento dos nutrientes. O aumento de formas em divisão registrado para *Entodinium spp.* foi altamente significativo após a alimentação. Antes

da alimentação, foram observadas as menores concentrações de ciliados holotríquios, porém a maior proporção de formas em divisão.

WARNER (1966c) investigou a concentração e a variação diurna de micro-organismos em ovinos alimentados *ad libitum* com palha de trigo ou em pastagem, com predominância de *Lolium perene* e *Trifolium subterraneum*. Nas duas situações estudadas os microorganismos apresentaram padrões semelhantes aos assinalados por WARNER (1966a) em hospedeiro com restrição alimentar, com dieta fornecida uma vez ao dia. Assinalou que *Entodinium*, *Diploplastron* e formas ovais, assinaladas por EADIE (1962a), mostram padrão de comportamento semelhante, com as mais baixas concentrações enquanto o hospedeiro está se alimentando. Neste momento estes organismos apresentaram a maior atividade de divisão. Os ciliados holotríquidos (*Dasytricha* e *Isotricha*) apresentaram os menores valores nas primeiras horas do dia investigadas.

EADIE (1967) estudou o organismo entre certas espécies de ciliados de rúmen mediante a inoculação de populações conhecidas em animais não faunados e utilizando viveiros, concluindo que por predação, uma população dominante de *P. multivesiculatum* pode eliminar *Epidinium*, *E. maggi*, *Eremoplastron* e *Destracodinium*.

Assinalou, ainda, evidências de antagonismo entre *Epidinium* e *Ophryoscolex*.

PURSER & MOIR (1966) verificaram a associação entre a variação do volume ruminal e variações no metabolismo do rúmen e a concentração de ciliados, em 11 ovinos. Foram assinalados protozoários dos gêneros *Entodinium*, *Epidinium*, *Diplodinium* e *Dasytricha*, contados segundo PURSER & MOIR (1959). No trabalho realizado, os autores assinalaram correlação negativa entre a concentração de ciliados holotríquios (*Dasytricha* sp.) e o consumo de água, e que esta foi notada nos oligotríquios com relação ao aumento do consumo de água e de alimento e ao maior volume do rúmen. Os autores destacaram, ainda, a influência de fatores metabólicos individuais dos hospedeiros na concentração de protistas.

ABOU AKKADA et al. (1969) examinaram o conteúdo ruminal de 70 vacas holandesas em lactação, alimentadas com cinco tipos de ração, detectando espécies de ciliados de oito gêneros da família Ophryoscolecidae (*Entodinium*, *Eodinium*, *Diplodinium*, *Metadinium*, *Eudiplodinium*, *Polyplastron*, *Ostracodinium*, *Epidinium* e *Ophryoscolex*) e de dois da família Isotrichidae (*Isotricha* e *Dasytricha*). Os dados, apresentados por percentual de ocorrência de cada grupo, demonstraram que *Entodinium* esteve presente em todas as amostras;

Isotricha foi mais freqüente em vacas cuja ração continha 10% de melado de cana; *Polyplastron*, *Ophryoscolex* e *Epidinium* foram mais freqüentes em vacas cuja ração continha extrato de hemicelulose. Os autores discutiram ainda as relações e antagonismo entre os ciliados, confirmando o antagonismo entre *P. multivesiculatum* e *Epidinium caudatum* e entre *P. multivesiculatum* e *Metadinium medium* e assinalando associação entre *Ophryoscolex caudatus* com *P. multivesiculatum* ou *Epidinium tricaudatum* ou ambos.

NAKAMURA & KANAGASAKI (1969) avaliaram a densidade de protozoários ruminais em quatro ovinos fistulados, mantidos com quantidades diferentes de dieta e alimentados uma ou duas vezes ao dia, recolhendo as amostras por sucção antes da primeira alimentação. Verificaram ainda o total de ácidos graxos voláteis, pH e índice de liquidez do conteúdo ruminal. Observaram maior densidade de protozoários em animais alimentados com forragem acrescida de concentrado em relação aos animais que receberam apenas forragem. A população de *Dasytricha ruminantium* foi semelhante nas duas condições de dieta; populações de três espécies de *Entodinium* decresceram acentuadamente e de uma outra espécie moderadamente nos ovinos que não receberam concentrado. As outras espécies observadas, *P. multivesiculatum*, *E. maggi*, *Epidinium caudatum* f.

caudatum e *Diplodinium rostratum*, mostraram respostas diversas. Com base nestes dados, sugeriram que as espécies de *Entodinium* observadas têm hábitos alimentares específicos.

DEHORITY & PURSER (1970) realizaram experimentos para verificar a influência da restrição de água e de alimento ingeridos pelo hospedeiro do número de holotríquios e o estabelecimento destes por meio de inoculação. Os autores concluíram que a restrição da quantidade de água ingerida ocasionou pequeno aumento no número de holotríquios em alguns animais; com o tempo, decréscimo gradual foi observado em todos os animais mantidos sob restrição de água. A redução da quantidade de alimento ingerida pareceu-lhes contribuir para o aumento do número de holotríquios ruminais quando estas apresentavam baixas populações. Populações de holotríquios foram estabelecidas em animais submetidos às restrições citadas, ou seja, com redução do alimento de 800 gr para 600 gr e de 3 litros para 1 litro de água.

DEHORITY & MALES (1974) investigaram, em sete ovinos fistulados, a pressão osmótica do líquido ruminal como possível fator de influência na ocorrência e no número de protozoários dos gêneros *Isotricha*, predominantemente, e *Dasytricha*, concluindo que não se

correlacionam. O número máximo de isotríquidos ocorreu antes ou logo após a alimentação, permanecendo baixo pelas 20 a 22 horas seguintes.

METZGER et al. (1976) após período de padronização da dieta de 15 vacas holandesas em lactação, testaram a influência de cinco concentrações de ração sobre ciliados e bactérias ruminais. As situações testadas foram as seguintes: 1) controle; 2) 14% de soro total seco; 3) 5,9% de soro mineralizado; 4) 11,8% de soro desmineralizado; 5) 9,8% lactose. Com relação aos ciliados, registraram número médio total de $1,8 \times 10^5/\text{ml}$ sem diferença, apesar da tendência à diminuição durante o período na ração 4 (quatro). Ciliados do gênero *Dasytricha* diminuíram nas situações 1, 2 e 4; o número de *Isotricha*, *Entodinium* e *Diplodinium* não foi consistente; poucos *Ophryoscolex* foram observados em apenas duas amostras.

VASHISHTA (1976), por meio do exame de amostras de fluído ruminal de 33 vacas, avaliaram o total de ciliados, pelo método de Purser & Moir (1958), constatando correlação positiva entre o número de protozoários por mililitro de fluído ruminal e o percentual do conteúdo de massa seca. Não houve correlação entre a concentração de protozoários ruminais e o pH.

DEHORITY (1978), para verificar a especificidade de ciliados do rúmen entre bovinos e ovinos, inoculou conteúdo ruminal de um novilho em seis ovinos fistulados e sem protozoários, sendo que três receberam dieta semelhante à do novilho, à base de palha de alfafa, e os outros dieta concentrada. As 24 espécies de ciliados do inóculo se estabeleceram nos ovinos alimentados com palha de alfafa enquanto nos demais só foram detectados nove espécies. O autor assinalou a presença de organismos dos seguintes gêneros: *Entodinium*, *Diplodinium* (*Diplodinium*, *Ostracodinium*, *Eudiplodinium*, *Polyplastron*), *Ophryoscolex*, *Isotricha*, *Dasytricha* e *Buetschlia*.

DEHORITY & MATTOS (1978) registraram 30% de *Charon ventriculi* em relação ao número total de ciliados do rúmen de uma vaca Flamenga alimentada com palha de capim Rhodes (*Chloris gayana*). Observaram diminuição na concentração desse ciliado com a alteração da dieta. Observações no ciclo diurno demonstraram que apesar de *C. ventriculi* ser um holotríquio, sua variação diurna assemelha-se à dos entodiniomorfos.

EADIE (1979) avaliou condições na ecologia ruminal que provocam alterações no tamanho de alguns organismos. Observou em *P. multivesiculatum* e *E. maggii* o aparecimento de formas gigantes relacionadas à dieta do hospedeiro e a interações entre as espécies. Em

P. multivesiculatum, o fenômeno foi observado quando o hospedeiro recebeu continuamente ração composta principalmente por amido e quando estes removeram ativamente outros organismos por predação seletiva. Já *E. maggii*, espécie frequentemente removida por *P. multivesiculatum*, só apresentou aumento do tamanho médio da população sob condições de competição entre as duas espécies. O autor destacou em suas observações, que a presença da forma gigante de *E. maggii* não impediu sua predação por organismos do gênero *Polyplastron*, todavia, sua presença foi invariavelmente assinalada nas ocasiões em que *E. maggii*, tornou-se predominante, parecendo estar relacionada à sobrevivência da espécie.

PRINS (1980) relatou o desaparecimento de *Isotricha intestinalis* e de *Epidinium spp.* em vacas, poucos meses após sua fistulação. Assinalou não ter observado a reversão espontânea deste quadro com a alteração da dieta de feno para forragem fresca, o que se deu apenas com grande dose de conteúdo ruminal contendo estes ciliados.

SENAUD et al. (1980) utilizando seis ovinos adultos fistulados, mantidos com alfafa-cevada com relação de celulose e amido 40/50, observaram a instalação e o desenvolvimento de ciliados das espécies *P. multivesiculatum*, *Entodinium spp.* e *Isotricha prostoma*

em hospedeiros defaunados e faunados. As principais observações sobre as relações destes ciliados foram as seguintes: 1) competição nutricional, pela utilização do amido, entre *Polyplastron* e *Isotricha* com decréscimo da população pré-estabelecida do primeiro após inoculação de *Isotricha*, e vice versa; 2) competição semelhante entre *Entodinium* e *Isotricha*; 3) Implantação de *Polyplastron* com populações de *Entodinium* spp. estabelecidas resultou no aumento de *Polyplastron* e eliminação de *Entodinium* spp.; 4) Não foi possível a implantação de *Entodinium* com *Polyplastron* estabelecido sozinho ou com *Isotricha*. Os autores apresentaram a suposição que a incompatibilidade entre *Polyplastron* e *Entodinium* resulte da predação do primeiro sobre o outro e também da competição por nutrientes, e que a importância destes fatores se reduz em presença de outros ciliados.

GLOLIERE et al. (1980) utilizando 21 ovinos adultos fistulados, mantidos com dieta à base de feno e feno-cevada observaram a implantação e o desenvolvimento de *P. multivesiculatum*, *Entodinium* sp. e *Isotricha protoma* em hospedeiros defaunados ou contendo um destes ciliados. Os autores confirmaram a competição por amido entre *Polyplastron* e *Isotricha* (Senaud et al., 1980); *Isotricha* não pode ser implantada sem amido; entre *Entodinium* e *Isotricha* há

alguma competição por amido; entre *Polyplastron* e *Entodinium* com dieta apenas de feno, a presença prévia de *Entodinium* favorece o desenvolvimento de *Polyplastron* e a presença de *Polyplastron* estimula a proliferação de *Entodinium*, não se demonstrando assim a competição entre eles. Com dieta de feno-cevada, com taxa de amido menor que 35% o desenvolvimento de *Polyplastron* e de *Entodinium* é favorecido pelo amido e eles podem coexistir. Com dieta com alta taxa de amido, *Entodinium* não permanece sozinho no rúmen. Os autores assinalaram que o gênero do ciliado e a natureza da dieta modulam a intensidade dos fenômenos predação, proliferação e competição pelo mesmo substrato e que a influência das bactérias nestas inter-relações precisam ser estudadas.

ABE et al. (1981) observaram que o número de holotríquios no fluído ruminal quadruplicou em vacas holandesas uma hora após o fluído da alimentação, decrescendo abruptamente em seguida. Resultados semelhantes foram notados em animais alimentados com 2 kg de concentrado e 1,5 kg de palha de arroz, em animais que receberam isoladamente um desses componentes ou com a introdução do alimento diretamente por meio da fístula ruminal. Os autores observaram, ainda, em novilhos abatidos após uma noite sem alimentação, uma camada fina de ciliados na parede do retículo,

constituída basicamente de holotríquios. Os autores concluíram: 1) que a flutuação do número de holotríquios está relacionada não apenas à natureza ou aos componentes dos alimentos mas também a fatores como a quantidade ou volume da dieta e ao ato de ingerir o alimento. Relacionaram ainda a flutuação ao comportamento de rápida migração dos holotríquios do retículo ao rúmen quando o hospedeiro alimenta-se e ao seu escape à parede do retículo algumas horas após. O comportamento dos holotríquios quanto à ingestão dos alimentos apresenta-se em bovinos de maneira diferente que em caprinos e ovino; 2. que os holotríquios geralmente escapam para a parede do retículo e migram ao rúmen por poucas horas após a alimentação e que esse comportamento pode ser essencial para a manutenção de suas populações no rúmen de bovinos pois, quanto mais freqüentes são as migrações, maior é o número de organismos carreados com o fluído ruminal.

CHARDEZ (1983) atribuiu variações morfológicas em espécies de *Entodinium* e de *Epidinium* à influência da dieta do hospedeiro. Utilizou no experimento dois ovinos alimentados com dieta à base de feno de pradaria (60%), cevada (17%) e torta de soja (6%) e dois com dieta à base de feno de pradaria (70%), cevada e aveia mais concentrado vitaminado organo-mineral (30%).

FONTY et al. (1983) estudaram fatores ecológicos que determinam o estabelecimento de bactérias celulolíticas e protistas no rúmen de cordeiros, por meio de inoculações *per os*, em animais jovens, ou por fístulas ruminais. Com relação aos ciliados, foram inoculados *Entodinium* sp. e *P. multivesiculatum*. Os autores destacaram que o êxito do estabelecimento desses organismos no rúmen depende da presença de outros micro-organismos, de uma flora abundante e diversificada, e que é favorecida pela inoculação precoce dos animais.

DEHORITY & TIRABASSO (1989) estudaram fatores que afetam a migração e o escape de ciliados da família Isotrichidae no rúmen, utilizando seis ovinos fistulados. A migração quimiostática de organismos dos gêneros *Isotricha* e *Dasytricha* ao conteúdo ruminal foi observada no momento da alimentação, bem como logo após a esta, seguida de abrupto decréscimo, presumivelmente como resultado de escape. Segundo os autores, os resultados indicaram que o número de isotríquídeos no conteúdo ruminal é variável e influenciado pelo momento da amostragem, quantidade de alimento e frequência da alimentação. Sugeriram que a quantidade de carboidratos armazenados por esses ciliados deva ser outro fator de controle da

migração, e que os isotríquidos parecem escapar por sedimentação para a parte ventral do rúmen.

LENG et al. (1986) utilizaram seis vacas adultas (cinco holandesas x Jersey; uma Ayrshire) alimentadas com grama fresca (*Lolium multiflorum* Lam) para estudar a dinâmica de ciliados ruminais dos gêneros *Isotricha* e *Dasytricha*, marcados com carbono 14. O tempo de passagem indicou que esses holotríquios são extensivamente retidos no rúmen e que apenas uma pequena proporção sai na digesta.

YANG & VARGA (1989a) testaram o efeito da frequência de ingestão de concentrado sobre os protozoários do rúmen, dinâmica da digesta ruminal e produção de leite, utilizando três vacas holandesas fistuladas e alimentadas com dieta à base de silagem de milho (55%) e concentrado (45%), sendo o concentrado oferecido uma, duas ou quatro vezes ao dia. Verificaram que o número médio de ciliados no líquido ruminal foi semelhante independente da frequência da ingestão de concentrado ou do tempo da amostragem feita antes da alimentação e duas, quatro e oito horas após, e que houve aumento da concentração de gordura e proteína no leite, quando as vacas receberam concentrado quatro vezes ao dia.

YANG & VARGA (1989b) testaram o efeito do local de obtenção da amostra de conteúdo ruminal sobre os ciliados e os produtos finais da fermentação, nas mesmas condições citadas por YANG & VARGA (1989a), comparando amostras recolhidas dos sacos dorsal, ventral e anterior e antes da alimentação, duas, quatro e oito horas após. Com relação ao total da amostragem, encontraram número de entodiniomorfos significativamente maior no saco dorsal em relação ao ventral e anterior, e número semelhante de holotríquios. O saco dorsal apresentou valores mais baixos de pH e maiores concentrações de ácidos graxos voláteis (AGV) em relação aos das outras regiões investigadas, parecendo haver relação entre esses fatores. Já o pH elevado na digesta do saco anterior os autores atribuíram à influência da saliva, pela proximidade da região com o orifício esofágico. Com relação ao tempo após a alimentação, constataram que número de holotríquios variou, atingindo o máximo duas horas após a alimentação. Este resultado, entretanto, não influenciou a contagem total de protozoários nos diversos tempos investigados, uma vez que representaram apenas 1,5% do total. A concentração de amônia também atingiu o ponto máximo duas horas após a alimentação, sendo sua maior flutuação, em relação ao tempo, observada no saco dorsal. A concentração de AGV (ácidos butírico, propiônico e acético) ruminais

tende a aumentar duas horas após a alimentação e manter-se elevada até cerca de oito horas após. Concluíram que o local e o tempo de amostragem são variáveis essenciais quando se comparam concentrações de ciliados e produtos finais da fermentação. O maior número de ciliados foi observado no saco dorsal, com alta concentração de produtos finais de fermentação microbiana.

MURPHY et al. (1985) utilizando dois novilhos holandeses canulados e dieta à base de palha de trigo picada (1,5 kg) e concentrado (2 kg) oferecida duas vezes ao dia ou introduzida diretamente no rúmen, testaram a influência da administração de três litros de diversas infusões no retículo água, saliva artificial, glucose, NaCl e amido), sobre a migração de protozoários holotríquios ao rúmen. Constataram que apenas a glucose estimulou a migração. Ao acompanharem a flutuação das populações de isotríquios assinalaram que aumentam cerca de dez vezes na segunda hora após a alimentação, retornando ao nível pré-alimentar em cinco a seis horas. Concluíram que o ato de ingestão é menos importante para a concentração desses ciliados do que sugerido por ABE et al. (1981) uma vez que a introdução de alimento diretamente no rúmen ocasionou aumento substancial e transitório de suas populações.

FFOULKES & LENG (1988) realizaram estudo sobre a dinâmica de ciliados no rúmen de bovinos fistulados, alimentados com melago + 30 g de uréia/kg do animal adicionados a dietas com baixo teor de fibras (6 g de palha de cereais/kg do animal) e alto teor de fibras (18 g de palha de cereais/kg do animal). Os autores acompanharam ciliados marcados com $^{14}\text{CH}_3$ coline e injetados intra-rúmen verificando sua sobrevivência e taxa de produção de metano. Observaram populações diferentes de ciliados em função das dietas, que foram significativamente maiores e com sobrevivência mais longa em bovinos que receberam dieta com alta taxa de fibras, não assinalando, todavia, diferenças na taxa de produção de metano. Apesar do número total de ciliado ter sido menor com dieta com alta taxa de fibras, a biomassa de protistas manteve-se semelhante, compensada por ciliados maiores. Destacaram que 74% dos protistas são perdidos no rúmen e apenas 26%, aparentemente, passam para outras partes do trato digestivo, confirmando ainda a retenção de pequenos ciliados no rúmen.

KAYOULI et al. (1988) investigaram a influência de ciliados do rúmen na taxa de degradação de palha de milho e de alfafa, utilizando pequenos sacos com malha de 100 e 5 μm , em carneiros faunados e defaunados. Relataram que protozoários do tipo B tem efeito positivo direto sobre a degradação desses alimentos, compensando o declínio

da atividade bacteriana em animais faunados, e que foram mais eficientes que as bactérias em animais defaunados. Notaram, ainda, que a adição de amido à dieta não modificou esse comportamento, mas diminuiu a taxa de degradação da palha de milho e aumentou a de alfafa.

TOWNE et al. (1988) examinaram o conteúdo ruminal de 79 bisões abatidos e de outros dois com fístulas ruminais, em Kansa, para obterem informações sobre o número total e espécies de ciliados presentes, que foram avaliados por contagem em 20 campos microscópicos em câmara Sedgwick-Rafter. Os autores estimaram, ainda, o volume celular relativo. Os resultados foram analisados separando-se os hospedeiros segundo os seguintes grupos de dieta: pastagem ou feno, forragem com moderada suplementação de grãos e concentrado + silagem. Assinalaram maior número de ciliados ($210,1 \times 10^4/\text{g}$) e de volume celular no grupo que recebeu suplementação de grãos e o menor ($27,1 \times 10^4/\text{g}$), bem como o menor volume celular, no grupo alimentado apenas com forragem. Populações de ciliados caracterizadas como do tipo B (caracterizada pela presença de *Epidinium* sp., *E. maggii*, e *Eudiplodinium bovis*) foram detectadas em 30 bisões; 38 apresentaram populações mistas A/B (presença de *Polyplastron* sp. coexistindo com baixo número de *E. maggii* ou de

Epidinium sp., ou ambos); 12 com população do tipo A e um bisão com população do tipo O, caracterizada pela presença de *Entodinium* spp. e/ou holotríquios. *Ophryoscolex* sp. foi detectada apenas em oito bisões, *Microcetus lappus* em cinco e *C. ventriculi* em 18 animais. Os autores ressaltaram que pelo menos 29 bisões com *Polyplastron* spp. haviam tido contato com gado enquanto todos os bisões isolados deste contato apresentaram populações do tipo B.

TOWNE et al. (1990) acompanharam as flutuações de ciliados do rúmen em 40 novilhas Hereford-Angus concluindo que a mudança rápida (3 dias) ou lenta (12 dias), para um dieta com 85% de concentrado, com ou sem monensina (30 ppm), não ocasionou diferença significativa entre os tratamentos quanto à concentração total de protozoários, pH ruminal ou a concentração de ácido láctico. A concentração do número total de ciliados declinou até o 56 dia após o qual aumentou, estabilizando-se. Algumas novilhas apresentaram-se defaunadas ao longo dos experimentos, reinfectando-se exógena ou endogenamente. Os autores assinalaram que após o 28 dia apenas organismos dos gêneros *Entodinium*, *Isotricha* e *Polyplastron* foram registrados contrastando com observações iniciais nas quais 11 gêneros de ciliados foram notados. Os autores ressaltaram diferença em relação

a outros autores que observaram a redução drástica do número total de ciliados ou sua eliminação à introdução de dieta rica em grãos.

ANKRAH et al. (1990) utilizando recipientes de nylon e aço inoxidável com poros de 10 e 20 mm, investigaram as variações da concentração de Ophryoscolecidae e de Isotrichidae no rúmen de novilho. Observaram que a concentração de isotríquídeos no rúmen aumentou 8.7 vezes em 40 minutos e decresceu 88% em quatro horas, porém nos recipientes o números destes organismos manteve-se constante, o que os levou atribuir à migração e ao escape as variações constatadas. Quanto à concentração de Ophryoscolecidae, os autores assinalaram concentrações semelhantes tanto no rúmen quanto nos recipientes, com decréscimo de 50% logo após a alimentação do hospedeiro, atribuído à diluição pelo alimento e água, pequena taxa de passagem, mas sobretudo pela lise que estes ciliados sofrem no rúmen. O efeito da lise, estimado em 50% do total da redução, teria como principal consequência a perda de proteína e energia que poderia ser aproveitada pelo hospedeiro.

NAGARAJA et al. (1992) compararam valores do pH, produtos da fermentação ruminal e número de bactérias em novilhos faunados e defaunados, alimentados com dieta com alto teor de grãos (85% de concentrado + silagem de alfafa). Foi observado que o número total de

ciliados nos novilhos faunados, $4,3 \times 10^5/\text{g}$, não foi afetado pelo tempo da amostragem em relação à alimentação, exceto para *Isotricha* e *Dasytricha* que aumentaram significativamente uma hora após. Registraram ainda a presença de organismos do gênero *Charonina*, além dos entodiniomorfos, *Entodinium* spp. (73,4%), *Diplodinium dentatum* (1,3%), *Epidinium caudatum* (6,7%), *Ophryoscolex purkenei* (4,6%) e *Polyplastron multivesiculatum* (0,3%). Os autores verificaram valores de pH menores nos novilhos defaunados (pH 5,97) em relação aos faunados (pH 6,45); lactato ruminal e concentração de amônia foram semelhantes; contagem total de bactérias anaeróbicas foi quatro vezes maior nos defaunados; apesar de não significativo, nos faunados a contagem de produtores de ácido láctico foi maior e de fermentadores de ácido láctico foi menor que nos defaunados. Concluíram que os ciliados em bovinos mantidos com dietas ricas em grãos aparentemente moderam a taxa de fermentação, conforme indicam seus valores de pH mais elevados e menor concentração de ácido graxos voláteis (AGV). Apesar dos protozoários sequestrarem amido, a moderação da taxa de fermentação ruminal deve-se à redução do número de bactérias e possivelmente à redução de sua atividade. Deste modo, quando dietas ricas em grãos são ingeridas, os protozoários exercem um efeito tampão, através da diminuição da taxa de fermentação do amido assim,

desempenham papel benéfico no ecossistema ruminal. A variação no pH entre faunados e defaunados foi relacionada ao total de AGV e não concentração de lactato, e o aumento de AGV nos defaunados refletiu o aumento do número e atividade das bactérias.

3.5. Levantamento de ciliados do rúmen de animais domesticados e silvestres

DAS-GUPTA (1935) investigou os protozoários ocorrentes no rúmen de 12 caprinos em abatedouros de Tangra, Calcutá, assinalando espécies de ciliados dos gêneros *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eremoplastron*, *Epidinium* e *Ophryoscolex*.

LUBINSKY (1958a) apresentou redescrição de 10 espécies de *Entodimum* observadas no conteúdo ruminal de 14 renas da região ártica do Canadá, e a compilação de chave dicotômica para identificação das espécies deste gênero no hospedeiro citado (ver sistemática, orientação do corpo e subfamílias).

LUBINSKY (1958b) apresentou redescrição de nove espécie de organismos da subfamília Diplodiinae observadas no conteúdo ruminal de 14 renas da região ártica do Canadá e chave dicotômica para sua identificação.

LUBINSKY (1964) destacou a baixa especificidade de ciliados da família Ophryoscolecidae ao examinar o conteúdo ruminal de um Guanaco, procedente do Canadá, constatando a presença de espécies típicas de bovino e nenhuma peculiar a camelídeos. Foram registrados os gêneros *Entodinium*, *Eudiplodinium* e *Elytroplastron* e a ausência de isotríquídeos.

CLARKE (1964) examinou conteúdo ruminal de quatro vacas fistuladas alimentadas com dieta de silagem e de trevo vermelho fresco, registrando a presença de organismos dos gêneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eodinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Metadinium*, *Ostracodinium*, *Epidinium*, *Isotricha*, *Dasytricha*, *Buetschlia* e *Charon*. O autor destacou que poucos estudos sobre estes ciliados foram realizados com bovinos da Nova Zelândia. Dentre os dados apresentados, foram ressaltados os elevados percentuais de *Charon* (12,8%) e de *Buetchlia* (3,4%) em animais alimentados, respectivamente, com silagem de capim e com trevo fresco. As maiores populações foram as de organismos dos gêneros *Entodinium* (8,0 a 33,6%), *Eremoplastron* (21,4 a 32,4%) e *Epidinium* (3,4 a 25,4%); *Isotricha* variou de 1,6 a 7,6% e *Dasytricha* de 5,5 a 23,2%, dependendo do animal e da dieta.

ABOU AKKADA et al. (1969) examinaram o conteúdo ruminal de 70 vacas holandesas em lactação alimentadas com cinco tipos de ração, detectando espécies de ciliados de nove gêneros da família Ophryoscolecidae (*Entodinium*, *Eodinium*, *Diplodinium*, *Metadinium*, *Eudiplodinium*, *Polyplastron*, *Ostracodinium*, *Epidinium* e *Ophryoscolex*) e de dois da família Isotrichidae (*Isotricha* e *Dasytricha*). Os dados, apresentados por percentual de ocorrência de cada espécie, demonstraram que *Entodinium* esteve presente em todas as amostras; *Isotricha* foi mais freqüente em vacas cuja ração continha extrato de hemicelulose. Os autores discutiram ainda as relações e antagonismo entre os ciliados, confirmando o antagonismo entre *Polyplastron multivesiculatum* e *Epidinium caudatum* e entre *P. multivesiculatum* e *Metadinium medium* e assinalando associação entre *Ophryoscolex caudatus* com *P. multivesiculatum* ou *Epidinium tricaudatum* ou ambos.

DEHORITY (1970) registrou a ocorrência de *Buetschlia parva* no rúmen de ovinos. Em observações preliminares sugeriu que este ciliado tem ciclo diurno semelhante ao de *Isotricha* e *Dasytricha*.

DEHORITY (1974) realizou levantamento do número total, distribuição genérica e do percentual por espécies de ciliados do rúmen de *Alces americana*, *Ovibos moschatus* e de *Ovis dalli* no Alaska. Relatou semelhança entre o número total de ciliados em

contraste com a nítida diferença na distribuição genérica entre as três espécies hospedeiras, nas quais apenas o gênero *Entodmium* foi detectado em todas. Os outros gêneros observados foram *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Dasytricha*, *Buetschlia* e *Ophryoscolex*. O autor descreveu quatro novas espécies.

VAN HOVEN (1975) examinou o conteúdo ruminal de 16 TSESSEBE (*Damaliscus lunatus lunatus* Burchell, 1823) na África do Sul, identificando 18 espécies de Ophryoscolecidae, sendo três descritas na ocasião. Os gêneros assinalados foram os seguintes: *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eremoplastron*, *Ostracodinium*, *Enoploplastron*, *Epidinium* e *Opisthotrichum*. O autor destacou variações na ocorrência em relação à época do ano, uma vez que quatro animais foram abatidos a cada intervalo de três meses.

BONHOMME-FLORENTIN et al. (1978) realizam estudo das espécies de ciliados do rúmen de *Bos indicus* analisando-se quantitativamente em relação às estações seca e chuvosa. Constataram maior número total de ciliados na estação úmida, $1,2 \times 10^5/\text{ml}$, em relação à estação seca, $5,9 \times 10^4/\text{ml}$. Durante a estação seca as populações de Entodiinae representaram cerca de 89% do total, as de Diplodiinae 5,7%, holotríquios 4,2% e a de *Epidinium* sp. inexpressiva. Na estação úmida, Entodiinae variou entre 75 a 85% ou 35 a 55%

dependendo da flutuação de Diplosiinae entre 3 a 15% ou 30 a 40%, respectivamente. Holotríquios representaram 7% e *Epidinium* sp. 6%.

DEHORITY et al. (1983) detectaram em bovinos, *Bos taurus*, provenientes de duas áreas do Tennessee, ciliados da espécie *Oligoisotricha bubali*, assinalada anteriormente apenas duas vezes e em búfalos. Os autores destacaram que, contrastando com outros organismos holotríquios, o número total e o percentual de concentração aumentaram quando os hospedeiros eram alimentados com dieta de silagem de milho e concentrado.

DEHORITY (1985) com amostras de conteúdo ruminal de 13 bois almiscarados (*Ovilbos moschatus* L.) constatou variação no número total de ciliados entre $38,5 \times 10^4$ a $124,6 \times 10^4/\text{ml}$, e o seguinte percentual médio de distribuição genérica: *Entodinium*, 52,4%, *Diplodinium*, 45,9% e *Epidinium*, 1,7%. O autor seguiu a classificação proposta por NOIROT-TIMOTHÉE (1960) e os subgêneros englobados em *Diplodinium* foram *Diplodinium*, *Ostracodinium*, *Eudiplodinium* e *Enoploplastron*.

IMAI (1985) realizou levantamento de ciliados do rúmen em oito bovinos em Bali (*Bos javanicus javanicus*) e 17 búfalos (*Bubalus bubalis*) com amostras obtidas em matadouros na Indonésia, assinalando, respectivamente, 15 gêneros de ciliados, incluindo 45

espécies e 15 formas e 11 gêneros, 37 espécies e 12 formas, das quais 30 espécies foram comuns às duas espécies de hospedeiros. Quanto à concentração média de ciliados por mililitro de conteúdo ruminal, registrou $7,8 \times 10^4$ nos bovinos e $1,5 \times 10^4$ nos búfalos. Comparando as populações de ciliados observadas com as de outros animais domesticados de áreas vizinhas, assinalou forte indicação de distribuição geográfica, com algumas espécies ocorrendo apenas no sudeste da Ásia.

DEHORITY (1987) assinalou a presença de ciliados da família Ophryoscolecidae em amostras de fezes recém-expelidas de duas capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) alojadas em zoológico em Columbus, Ohio. As espécies foram identificadas como representantes dos gêneros *Entodinium*, *Eudiplodinium* e *Elytroplastron*. O autor destacou ser o primeiro registro destes organismos no intestino de herbívoros não ruminantes.

IMAI (1988) investigou a composição de ciliados ruminais de gado zebu, *Bos indicus*, em duas regiões do Kenya, examinando amostras obtidas em matadouro de um total de 27 animais, detectando 13 gêneros, sendo um descrito como novo, contendo 51 espécies, quatro assinaladas como novas. Ao analisar a composição percentual de cada gênero detectado, o autor destacou contrastes em relação a

trabalhos anteriores. Desta forma, o gênero *Entodinium* que em geral predominante, apresentou valores baixos (14,6 e 14,1%) em contraste com alguns da subfamília Diplodiinae como *Eudiplodinium* (24,2 e 21,8%), *Ostracodinium* (15,8 e 15,5%) e *Diplodinium* (13,1 e 11,9%).

IMAI et al. (1989) levantaram as populações de ciliados ruminais em 11 bovinos holandeses e seis ovinos na região ocidental do Canadá, obtendo resultados semelhantes aos encontrados no Japão para estes hospedeiros. Nos bovinos foram registradas 28 espécies de ciliados e número médio total por mililitro de $6,9 \times 10^4$ e nos ovinos 17 espécies e $1,9 \times 10^5$, sendo todas as populações caracterizadas como do tipo A (com *Polyplastron* sp., *Diploplastron* sp. e *Ophryoscolex* sp., dentre outros). Nos bovinos foram observados os gênero *Dasytricha*, *Isotricha*, *Charonina*, *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eodinium*, *Eremoplastron*, *Polyplastron*, *Diploplastron*, *Ostracodinium*, *Enoploplastron* e *Ophryoscolex*. Nos ovinos não foram assinalados os gêneros *Charonina*, *Diplodinium*, *Eodinium*, *Eremoplastron* e *Ostracodinium*.

TOWN & NAGARAJA (1989) após registrarem a ocorrência do ciliado *Microcetus lappus*, realizaram experimentos com bisões e bovinos para estudar a flutuação diurna de sua população. Observaram que a concentração varia intensamente com o hospedeiro, podendo

exceder 50% em alguns bovinos, e em média 2% nos bisões. Verificaram ainda, que apesar de ser um holotríquio, o ciclo diurno de *M. lappus* difere do de outros do grupo, decrescendo bruscamente após a alimentação e voltando a aumentar gradualmente. As mais altas concentrações foram observadas no retículo e as mais baixas no saco dorsal. Os autores apresentaram percentuais de ocorrência de ciliados dos gêneros *Isotricha*, *Dasytricha*, *Charonina*, *Microcetus*, *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Metadinium*, *Ostracodinium*, *Polyplastron*, *Epidinium* e *Ophryoscolex*, num total ciliados de $352,9 \times 10^3/\text{g}$, e sob diferentes tipos de dietas. O gênero *Entodinium* apresentou maior intensidade média com percentual de 62,7%.

TOWNE & NAGARAJA (1990) realizaram estudo comparativo entre ciliados encontrados no omaso e no rúmen em 54 hospedeiros bovinos, 15 bisões e 40 ovinos. Constataram no omaso a presença dos mesmos ciliados observados no rúmen do hospedeiro correspondente, e que apesar da concentração cerca de 80% menor no omaso em relação à do rúmen, aquele abriga elevado número de ciliados de difícil remoção, especialmente nos bovinos, e que aparentemente são responsáveis pela reinoculação de rúmens defaunados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local

Os trabalhos foram desenvolvidos no Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (CNPGL)/EMBRAPA, situado no Município de Coronel Pacheco, MG, na Universidade Federal de Juiz de Fora, na Universidade Federal do Rio de Janeiro e na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

4.2. Animais

Foram utilizadas três vacas mestiças holando-zebu (Gir) (A1, A2 e A3), em lactação, fistuladas, com idade de seis anos e peso entre

470 e 500 kg, mantidas no CNPGL. Os animais de números 1 e 3 apresentavam grau sanguíneo de $3/4$ HPB - $1/4$ Z e o de número 2, $11/16$ HPB - $5/16$ Z.

4.3. Dietas

Antes de se iniciar os trabalhos os animais foram alimentados com silagem de milho, capim e concentrado protéico, fornecida duas vezes ao dia. Em preparação para o experimento, receberam durante uma semana, pela manhã, 36 Kg de silagem de milho + 2 Kg de farelo de algodão (Dieta O = DO). Água ingerida *ad libitum*.

As dietas (D1, D2, D3), constituídas à base de ração e silagem de milho, foram estabelecidas de acordo com a proporção entre esses elementos, e com a seguinte relação entre a massa seca (ms) da silagem e da ração:

Composição da Ração

57% de fubá de milho

40% de farelo de soja

02% de calcáreo

01% de sais minerais

Dieta 1 (D1)

30,0 Kg de silagem de milho	80% ms
2,5 Kg de ração	20% ms

Dieta 2 (D2)

25,25 Kg de silagem de milho	70% ms
3,75 Kg de ração	30% ms

Dieta 3 (D3)

22,5 Kg de silagem de milho	60% ms
5,0 Kg de ração	40% ms

4.4. Experimento

O experimento constou de três fases (F1, F2, F3), com duração de uma semana cada, precedidas por períodos de adaptação de duas semanas, nos quais as dietas a serem testadas (D1, D2, D3) foram introduzidas. Em F1 cada animal recebeu uma das três dietas, sendo que nas fases subseqüentes os animais foram permutados entre as dietas, de tal maneira que todos recebessem as três dietas.

O quadro abaixo representa o esquema do experimento, no qual estão relacionados os números dos animais às dietas que receberam em cada fase.

Fases	Dietas		
	1	2	3
1	1	2	3
2	2	3	1
3	3	1	2

O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino, considerando três tratamentos (variações na dieta) e três animais com repetições no tempo (fases).

Para a análise estatística utilizou-se o SAS (Statistical Analysis Sistem), calculando-se médias com desvios padrão. Foram feitas análises de variância seguidas do teste de Tukey a 5%.

4.5. Obtenção e exame das amostras

Foram obtidas 270 amostras de conteúdo ruminal através de fístulas ruminais, no período compreendido entre novembro de 1991 a janeiro de 1992. Todas as amostras foram recolhidas pela manhã, antes de serem fornecidas as dietas. Em cada fase do experimento foram obtidas, em duas coletas, 30 amostras de conteúdo ruminal por hospedeiro. Outras três amostras de conteúdo ruminal, uma de cada animal, foram recolhidas enquanto estes recebiam DO, como base de comparação do efeito da dieta sobre os ciliados.

As amostras consistiram de 20 ml de líquido ruminal obtido por aspiração, ao qual foi adicionado volume aproximado de 20 cm³ de conteúdo ruminal, recolhido do centro da massa ruminal. Estas amostras foram mantidas em recipientes individualizados, homogenizadas, fixadas na proporção 1 : 1 em formalina a 18,5% (DEHORITY, 1974) e conservadas em frascos vedados com as especificações. Logo após a obtenção das amostras, verificou-se o pH de cinco amostras de cada animal, escolhidas aleatoriamente.

Avaliações qualitativas e quantitativas dos ciliados ruminais foram realizadas no laboratório do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, segundo técnica proposta por

DEHORITY (1984) modificada, na qual o corante verde brilhante foi substituído por três gotas de solução de Lugol, por pelo menos 15 minutos antes da contagem de cada amostra. Os resultados das contagens foram expressos em número de ciliados por mililitro de conteúdo ruminal.

As contagens foram precedidas por observações dos ciliados presentes por meio de preparações provisórias em lâmina e lamínula, coradas com solução de Lugol e com verde de metila, para possibilitar identificação mais segura na câmara de contagem.

4.6. Morfologia dos ciliados

Para estudos morfológicos de ciliados de rúmen em microscopia fotônica, empregaram-se técnicas clássicas de ciliatologia utilizando-se as amostras fixadas e conservadas em formalina a 18,5%. Foram feitas preparações permanentes, segundo as seguintes técnicas, com algumas modificações devido às especificidades dos ciliados estudados: técnica de Bodian (protargol) segundo as variantes de TUFFRAU (1964, 1967) e reação nuclear de FEULGEN (1926).

Os ciliados foram observados também, em montagens provisórias em glicerina a 30%, corados com solução de Lugol, para evidenciação das placas esqueléticas de alguns organismos da subfamília Diplodiinae.

Os trabalhos relacionados aos estudos morfológicos e de preparação de lâminas permanentes com os ciliados foram desenvolvidos no Setor de Microscopia Eletrônica do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

As observações dos ciliados, o exame das preparações permanentes e as micrografias foram feitas ao microscópio fotônico ZEISS-Germany com aumentos de 400 a 1000x, do Curso de Pós-Graduação em Parasitologia Veterinária do Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A identificação dos ciliados baseou-se nos seguintes autores: DOGIEL (1927), KOFOID & CHRISTENSON (1934), KOFOID & MacLENNAN (1930, 1932, 1933), LATTEUR (1966, 1968, 1969), DEHORITY (1979), OGIMOTO & IMAI (1981). Para a identificação dos gêneros de Diplodiinae adotou-se a proposta de KOFOID & MacLENNAN (1932), também seguida por OGIMOTO & IMAI (1981). A terminologia e o posicionamento dos ciliados foram empregados de acordo com o proposto por LUBINSKY (1957c).

4.7. Técnica de contagem dos ciliados do rúmen

A técnica utilizada para fixação e contagem dos ciliados seguiu o preconizado por DEHORITY (1984), substituindo-se o corante verde brilhante por solução de Lugol.

A partir de 20 ml de líquido ruminal e volume aproximado de 20 cm³ de conteúdo ruminal, homogeneizados, obtinham-se as amostras das quais 20 ml foram fixadas em igual volume de formalina a 18,5%. Estas amostras foram identificadas e conservadas em frascos vedados. Para se proceder às contagens, uma alíquota de 1,0 ml da amostra formalizada foi pipetada com pipeta de 1,0 ml de orifício largo (Bellco Glass Inc. No. 1231-01001) transferida para tubo de ensaio, à qual se acrescentava 9,0 ml de solução de glicerol a 30% e três gotas de solução de Lugol, por no mínimo 15 minutos antes do início da contagem. Após este tempo e utilizando a pipeta de orifício largo, preenchia-se a câmara de contagem, Sedgewick-Rafter, com 1 ml da amostra diluída.

Com a grade de contagem em uma das lentes oculares do microscópio, foram contados diferencialmente os ciliados observados em 50 campos e depois, com rotação de 180° da câmara de contagem, em outros 50 campos. Calculou-se o número de ciliados por mililitro

de conteúdo ruminal com os valores da média das duas contagens, considerando-se a superfície da câmara avaliada e a diluição.

4.8. Técnicas de preparação de lâminas permanentes para microscopia fotônica

A triagem dos ciliados foi feita em saleiras, com o auxílio de micropipetas munidas de peras para aspiração, a partir de amostras de conteúdo ruminal fixadas e conservadas em formalina a 18,5% (v/v), sob microscópio estereoscópio da American Optical, mod. 570, com aumentos entre 20 e 40 x. As amostras foram filtradas em gaze para eliminação dos fragmentos vegetais maiores e lavadas sucessivamente com água destilada para eliminação dos resíduos de conteúdo ruminal e para concentração dos ciliados. Para otimizar a concentração dos ciliados, algumas amostras foram centrifugadas em água destilada.

4.8.1. Técnica de Bodian (1936, 1937), protargol, segundo as variantes de Tuffrau (1964, 1967)

O princípio desta técnica consiste na utilização de sais de prata, no caso o proteinato de prata, como agente impregnante e posterior revelação em hidroquinona.

A cada gota de água contendo ciliados foi adicionada quantidade cinco vezes maior de Bouin Hollande como pós-fixador, o que facilitava a visualização e, conseqüentemente, a triagem dos ciliados. O material foi lavado em água destilada até a eliminação dos resíduos do Bouin e de vestígios de conteúdo ruminal. A seguir, separavam-se os ciliados, agrupando-os segundo o grupo e dimensões (e.g. isotríquideos, grandes entodiniomorfos, pequenos entodiniomorfos) em diversas saleiras, para clarificação em água de Javel, cuja concentração e tempo variaram de acordo com o grupo de ciliados. A clarificação foi interrompida pelo acréscimo de água destilada à saleira, em substituição à água de Javel, e mais uma lavagem em água destilada. Gotas de ciliados lavados foram transferidas para lâminas desengorduradas e friccionadas às quais se adicionava uma microgota de albumina glicerizada preparada segundo FOISSNER (1991). Após a homogenização da preparação, o excesso de

água e de albumina glicerizada foi retirado com micropipeta e a secagem do material se deu à temperatura ambiente em um ou dois dias. As lâminas foram então mergulhadas em álcool a 95°, hidratadas em série alcoólica decrescente (80°, 70°, 50°, 30°) e banhadas por duas vezes em água destilada. Procedeu-se então à impregnação do material no proteinato de prata a 1%, por tempo variável de acordo com o material. O tempo de impregnação no proteinato de prata, variou de 24 horas, para isotríquideos e pequenos entodiniomorfos, a duas e três horas, para os grandes entodiniomorfos. Todas as impregnações foram realizadas a temperatura ambiente. A seguir as lâminas passaram por dois banhos em água destilada e foram mergulhadas em hidroquinona por um a três minutos para a revelação. Esta etapa foi acompanhada a cada minuto e ao atingir o ponto desejado a revelação foi interrompida pela imersão da lâmina em água destilada e lavagem em dois outros banhos. As lâminas foram ainda banhadas em tiosulfato de sódio a 5%, por 5 a 10 minutos, que age como fixador, em fotografia, e clarificador, aumentando o tempo de conservação das preparações. A desidratação foi feita em série alcoólica crescente (30°, 50°, 70°, 80°, 96°, 100°, 100°) e duas passagens em xilol, antes da montagem permanente em bálsamo do Canadá.

4.8.2. Reação nuclear de Feulgen (1926)

Esta técnica objetiva a evidenciação das estruturas nucleares uma vez que, após uma hidrólise ácida, os componentes nucleares coram-se de vermelho intenso por reação com a fuesina do preparado de Schiff.

Os ciliados lavados, triados e concentrados foram aderidos às lâminas com albumina glicerizada, cuja secagem se deu em um ou dois dias. Procedia-se então à hidrólise ácida, Pela imersão das lâminas por 14 minutos em ácido clorídrico a 1 N a 60°C. A hidrólise era interrompida mergulhando-se as lâminas em água destilada fria. Em seguida, as preparações foram imergidas no preparado de Schiff por três horas. Após este tempo, as lâminas foram mergulhadas em água destilada, seguindo-se três banhos em água sulfurosa (bissulfito de sódio a 10%), por dois minutos cada. Foram então lavadas em água corrente por cinco minutos, banhadas em água destilada por dois minutos, seguindo-se da desidratação em série alcoólica e dois banhos em xilol. A montagem das preparações permanentes foram feitas em bálsamo do Canadá.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Influência da dieta sobre as populações dos ciliados

5.1.1. Resultados

Foram observados ciliados de famílias Blepharocorythidae (*Charonina* Strand, 1928), Isotrichidae (*Isotricha* Stein, 1859 e *Dasytricha* Schuberg, 1888) e Ophryoscolecidae (Entodiinae: *Entodinium* Stein, 1859, Diplodiinae: *Diplodinium* Schuberg, 1888, *Eodinium* Kofoid & MacLennan, 1932, *Eremoplastron* Kofoid & MacLennan, 1932 além de *Polyplastron* Dogiel, 1927, *Diploplastron* Kofoid & MacLennan, 1932 e *Ostracodinium* Dogiel, 1927 que foram analisados em conjunto e estão referidos como P+D+O.

Ciliados dos gêneros citados foram observados nos três bovinos examinados, em todas as dietas e fases do experimento, à exceção de *Dasytricha*, só registrados em A1, e de *Eremoplastron*, presentes apenas em A1 e A2.

A tabela 1 apresenta a distribuição dos ciliados por famílias e por subfamílias de Ophryoscolecidae. Com relação ao total de ciliados registrados, 95,54% foram organismos da família Ophryoscolecidae, cabendo a Blepharocorytidae e Isotrichidae, respectivamente, 2,78 e 1,68%.

Na tabela 2 estão apresentados os grupos de ciliados e respectivos valores médios e totais, valor mínimo e máximo observados, desvios padrão e percentuais em relação ao total de protistas estimados por dieta. Todos os dados apresentados representam valores médios da contagem de ciliados em 90 amostras por dieta, sendo 30 de cada animal e/ou fase do experimento, expressando o número de ciliados por mililitro de conteúdo ruminal.

O valor médio dos protistas e de cada grupo identificado analisados segundo a dieta, revelou maior concentração de ciliados em D2 com 37,38% do total, seguida por D3 com 32,76% e D1 com 29,86%, constatando-se variação significativa entre as três dietas (Tabela 3). Os valores mais elevados da maioria dos grupos de ciliados

TABELA 1. Valores totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) e respectivos percentuais, por famílias dos organismos observados e subfamílias de Ophryoscolecidae

Ciliados		Subtotais nº (%)	Totais nº (%)
Famílias	Subfamílias		
Blepharocorythidae			23.520,00 (2,78)
Isotrichidae			14.235,56 (1,68)
Ophryoscolecidae			808.368,88 (95,540)
	Entodiinae	706.693,33 (87,42)	
	Diplodiinae	101.675,55 (12,58)	
Totais			846.124,44 (100)

TABELA 2. Valores mínimos, máximos, médios, percentuais e desvios padrão de cada gênero de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal), por dieta

Ciliados		N	Dieta*											
			1				2				3			
			Mínimo	Máximo	Média	D. padrão	Mínimo	Máximo	Média	D. padrão	Mínimo	Máximo	Média	D. padrão
<i>Entodinium</i>	(nº) (%)	90	83.200	430.400	215.51,11 85,30	70.578,07	102.400	416.000	264.244,44 83,55	67.110,41	56.000	497.600	226.937,78 8,187	109.588,14
<i>Isotricha</i>	(nº) (%)	90	0	19.200	3.084,44 1,22	3.657,66	0	20.800	5.111,11 1,62	3.901,30	0	19.200	4.911,11 1,77	4.430,95
<i>Dasytricha</i>	(nº) (%)	90	0	1.600	53,33 0,02	287,61	0	3.200	195,56 0,06	612,57	0	8.000	880,00 0,32	1.670,00
<i>Diplodinium</i>	(nº) (%)	90	0	28.800	7.555,56 2,99	6.148,96	0	81.600	15.520,00 4,91	16.145,43	0	57.600	12.035,56 4,34	15.445,74
P+D+O**	(nº) (%)	90	0	44.800	8.982,22 3,55	6.836,03	0	28.800	8.102,22 2,56	5.936,13	0	25.600	6.631,11 2,39	5.302,22
<i>Eremoplastron</i>	(nº) (%)	90	0	33.600	5.137,78 2,03	7.733,02	0	51.200	8.671,11 2,74	11.155,55	0	73.600	13.648,89 4,92	17.337,25
<i>Eodinium</i>	(nº) (%)	90	0	30.400	4.386,67 1,74	3.662,39	0	20.800	5.044,44 1,68	4.244,64	0	20.800	5.960,00 2,15	4.890,35
<i>Charonina</i>	(nº) (%)	90	0	46.400	7.955,56 3,15	8.389,29	0	36.800	9.377,78 2,97	8.415,32	0	17.600	6.186,67 2,23	3.832,34
Totais					252.666,67				316.266,67				277.191,11	

* D1, D2 e D3 correspondem, respectivamente, a 20, 30 e 40% de proteína na dieta.

** *Polyplastron* + *Diploplastron* + *Ostracodinium*.

TABELA 3. Valores médios, totais e percentuais por gêneros de ciliados do rúmen de três bovinos, em cada dieta

Ciliado		Dieta*			Totais
		1	2	3	
<i>Entodinium</i>	(nº) (%)	215.511,11 ^a 85,29	264.244,44 ^b 83,55	226.937,78 ^c 81,87	706.693,33 83,52
<i>Isotricha</i>	(nº) (%)	3.084,44 ^a 1,22	5.111,11 ^b 1,62	4.911,11 ^b 1,60	13.106,66 1,55
<i>Dasytricha</i>	(nº) (%)	53,33 ^a 0,02	195,56 ^a 0,06	880,00 ^b 0,32	1.128,89 0,13
<i>Diplodinium</i>	(nº) (%)	7.555,56 ^a 2,99	15.520,00 ^b 4,91	12.035,56 ^c 0,73	35.111,12 4,15
P+D+O**	(nº) (%)	8.932,22 ^a 3,56	8.102,22 ^a 2,56	6.631,11 ^b 2,39	23.715,55 2,80
<i>Eremoplastron</i>	(nº) (%)	5.137,78 ^a 2,03	8.671,11 ^b 2,74	13.648,89 ^c 4,92	27.457,78 3,25
<i>Eodinium</i>	(nº) (%)	4.386,67 ^a 1,74	5.044,44 ^a 1,60	5.960,00 ^b 2,15	15.391,11 1,82
<i>Charonina</i>	(nº) (%)	7.955,56 ^a 3,15	9.377,78 ^a 2,97	6.186,67 ^b 2,23	23.520,01 2,78
Totais	(nº) (%)	252.666,67 ^a 29,86	316.266,66 ^b 37,38	277.191,12 ^c 32,76	846.124,45

Médias nas mesmas linhas seguidas por letras designais diferem a um nível de significância de 5%.

* D1, D2 e D3 correspondem, respectivamente, a 20, 30 e 40% de proteína; ** *Polyplastron* + *Diploplastron* + *Ostracodinium*.

foram observados em D2, com excessão de *Dasytricha* e de *Eremoplastron*, significativamente maiores em D3. Ressalta-se que organismos do gênero *Dasytricha* foram analisados apenas em A1 e desta forma, os dados apresentados nas três dietas relacionam-se exclusivamente a este animal. A preponderância de organismos do gênero *Entodinium* nas três dietas foi o principal fator que influiu na relação entre os valores totais. A variação das dietas resultou em diferença significativa para as populações de *Diplodinium* e de *Eremoplastron* nas três situações testadas, diferindo ainda, entre D1 e D2 em relação à D3 para *Dasytricha*, P+D+O, *Iodinium* e *Charonina*; entre D2 e D3 em relação à D1 para *Isotricha* e entre D1 e D3 em relação à D2 para *Entodinium* (Tabela 3).

Na tabela 4 estão apresentados os dados referentes ao total de ciliados registrados por dieta, e em cada dieta por animal, e os respectivos percentuais. Ao se analisar o efeito das dietas em cada animal, nota-se que A2 apresentou a maior concentração absoluta ou relativa de ciliados em D3, com 55,27% em relação a A1 e A3, e que os maiores valores absolutos de A1 e A3 foram em D2. A2 apresentou sempre as maiores concentrações de ciliados em relação aos outros animais, independente da dieta.

TABELA 4. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos de acordo com o hospedeiro e a dieta e respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por dieta

Animal	Dieta*			Totais
	1	2	3	
A1 (nº)	186.226,67	331.173,33	251.226,67	768.826,67
(%)	24,57	34,90	30,24	30,29
A2 (nº)	340.760,00	370.000,00	459.586,67	1.170.346,67
(%)	44,96	39,00	55,27	46,11
A3 (nº)	231.013,33	247.626,67	120.560,00	599.200,00
(%)	30,48	26,10	14,50	23,61
Totais (nº)	758.000,00	948.800,00	831.573,34	2.538.373,34
(%)	29,86	37,38	32,76	

* D1, D2 e D3 correspondem, respectivamente, a 20, 30 e 40% de proteína.

Na tabela 5 estão apresentados os dados referentes ao total de ciliados registrados por dieta e em cada dieta por fase do experimento e os respectivos percentuais. Ao se analisar os totais em cada fase, notou-se tendência crescente da concentração de ciliados ao longo do experimento com 26,66% em F1, 33,09% em F2 e 40,25% em F3.

TABELA 5. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos por fase e dieta, com respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por animal

Fase		Dieta*			Totais
		1	2	3	
F1	(nº)	186.236,67	370.000,00	120.560,00	676.786,67
	(%)	24,57	39,00	14,50	26,66
F2	(nº)	340.760,00	247.626,67	251.426,67	839.813,34
	(%)	44,96	26,10	30,24	33,09
F3	(nº)	231.013,33	331.173,33	459.586,67	1.021.773,33
	(%)	30,48	34,90	55,27	40,25
Totais (nº)		758.000,00	948.800,00	831.573,34	2.538.373,34
		(%)	29,86	37,38	32,76

* D1, D2 e D3 correspondem, respectivamente, a 20, 30 e 40% de proteína.

5.1.2. Discussão

As variações nas dietas testadas, com modificação na proporção entre silagem de milho e ração basal, correspondem basicamente ao fornecimento de diferentes percentuais de proteína aos animais. Desse modo, D1, D2 e D3 constituíram-se respectivamente, aproximadamente de 20, 30 e 40% de proteína.

A influência do tipo e da quantidade de alimento fornecido aos hospedeiros sobre as populações de ciliados ruminais foi tema de diversos estudos (HUNGATE, 1966; PURSER & MOIR, 1966; POTTER & DEHORITY, 1973; CHRISTIANSEN et al., 1964; WILLIAMS, 1986; COLEMAN, 1980; FFOULKES & LENG, 1988).

Qualquer dieta, por mais pobre que seja, contém proteína, mas o seu efeito dependerá da sua proporção na ração basal (WILLIAMS & COLEMAN, 1991), havendo divergência entre os autores quanto a influência da proteína adicional sobre estes protistas.

Dentre os diversos fatores que determinam o papel dos ciliados do rúmen para o hospedeiro relaciona-se a disponibilidade de proteína da dieta, e os ciliados exerceriam efeito prejudicial aos hospedeiros em dietas com baixo teor protéico (BIRD & LENG, 1978). Desta forma, em ovinos mantidos com dieta com baixo teor protéico

estes autores observaram maior eficiência na utilização da dieta nos hospedeiros defaunados, com significativo aumento no crescimento de lã e possivelmente na produção de leite e ganhos de peso. Esta situação, somada aos resultados de FFOULKES & LENG (1988), com bovinos, é explicada pela reciclagem dos ciliados no próprio rúmen. Estes autores constataram que a maior perda é devido à lise dos ciliados no rúmen, ao invés da passagem ao longo do trato digestivo. Ocorre, então, grande decréscimo na quantidade de proteína que poderia escapar da fermentação do rúmen para o duodeno e ser utilizada pelo hospedeiro. Estes resultados foram corroborados por ANKRAH et al. (1990).

Já a suplementação de proteína pode ser obtida em dietas ricas em grãos, nas quais, segundo NAGARAJA et al. (1992), os ciliados desempenhariam papel benéfico pela moderação da taxa de fermentação do amido. Todavia, em regiões tropicais não é usual nem economicamente viável o fornecimento de grãos na dieta animal.

Com relação aos isotríquídeos, PURSER & MOIR (1959) e DEHORITY & PURSER (1970) assinalaram que a redução da quantidade de alimento contribui para o aumento da concentração desses ciliados no rúmen, associado a maior concentração em relação ao menor volume de massa alimentar; todavia há aumento de suas populações

quando os hospedeiros recebem dietas ricas em carboidratos utilizáveis como constatado por ABOU AKKADA et al. (1969) em vacas alimentadas com dieta acrescida de 10% de melado de cana, cujos dados foram obtidos em experimento que utilizou 70 vacas em lactação. Já FFOULKS & LENG (1988) registraram aumento na proporção de isotríquídeos em bovinos que ingeriam melaço *ad libitum* no grupo que recebeu maior quantidade de palha de aveia.

Nas variações das dietas testadas notou-se maior valor absoluto de isotríquídeos em D3, sendo este mais elevado para *Isotricha* em D2 e para *Dasytricha* em D3. Apesar dos valores totais de *Isotricha* diferirem significativamente entre as três dietas, o percentual de organismos deste gênero em relação ao total de ciliados aferidos por dieta é bastante semelhante. De tal forma, não foi possível detectar qualquer influência da dieta sobre estas populações.

O número de isotríquídeos é influenciado ainda, pela hora de obtenção das amostras em relação ao momento da alimentação e o número de vezes que esta é fornecida ao dia. PURSER (1961) e WARNER (1962) observaram que a densidade populacional de *Dasytricha ruminantium* diminui continuamente por 16 horas após a alimentação e então aumenta rapidamente até cinco vezes mais após o período de quatro horas. Em animais alimentados com trevo vermelho

fresco (CLARKE, 1965) e com cana de açúcar (VALDEZ et al., 1977) notaram aumento de 3 a 4 vezes do número de *Dasytricha* e de *Isotricha* spp. duas horas após a alimentação seguida do declínio nas próximas 3-6 horas permanecendo constante até a próxima alimentação (WILLIAMS, 1986).

Destaca-se que o número médio total de isotríquídeos registrado (14.235,56), bem como o respectivo percentual (1,68%) em relação aos outros grupos de ciliados foi bastante reduzido (Tabela 1).

Os maiores e menores valores médios por mililitro de conteúdo ruminal de organismos dos gêneros *Isotricha* (5.111,11 e 3.084,44) e *Dasytricha* (880,00 e 53,33) observados no presente trabalho e os respectivos percentuais de 1,60-1,22% e 0,332-0,02% em relação ao total de ciliados por dieta, em hospedeiros alimentados uma vez ao dia seriam, os menores a serem observados nestes hospedeiros em função da obtenção das amostras ter ocorrido antes da alimentação. Esta suposição, entretanto, não foi testada. Há divergência quanto à flutuação diurna de isotríquídeos. Desta forma, MURPHY et al. (1985) em concordância com ABE et al. (1981) e discordando de DEHORITY & MATTOS (1978) não observaram aumento do número de isotríquídeos antes da alimentação de dois bovinos, mas pique entre uma e duas horas após. Ainda de acordo com MURPHY et al. (1985) as

divergências de resultados poderiam ser relacionadas ao tipo da forragem o que implicaria em piques diferentes de ruminação.

Outros fatores que influenciam o número de isotríquidos são restrições no consumo de água e de alimento, segundo DEHORITY & PURSER (1970) e DEHORITY & MALES (1974) que investigaram estes fatores, respectivamente, em quatro e em sete ovinos, e a frequência de alimentação (DEHORITY & TIRABASSO, 1989).

A variação na concentração de isotríquidos assinalada por CLARKE (1964), na Nova Zelândia, em quatro bovinos mantidos com silagem de capim ou com trevo fresco, registrou percentuais de *Isotricha* entre 1,6 e 7,6% e para *Dasytricha* entre 5,5 e 23,2%. Ao se analisar estas variações entre os mesmos hospedeiros com dietas diferentes, notou-se que as variações são amplas, sobretudo em *Dasytricha*, e independeram do animal, da dieta ou da época da amostragem.

Na mesma localidade em que foi desenvolvido o presente trabalho, em novilhos mantidos com cana de açúcar + 1% de uréia e com capim elefante, CARNEIRO et al. (1992) registraram 3,12% e 6,17% de *Isotricha* e 11,35% e 14,96% de *Dasytricha*, respectivamente por dieta, do total de ciliados. Ainda na mesma localidade, ARCURI et al. (1991) em quatro bovinos alimentados com dietas de cana-de-

açúcar + 1% de uréia ou 85% da matéria seca da cana + -1% de uréia + 15% de farelo de algodão registraram, respectivamente por dieta, $6,4 \times 10^3$ (5,3%) de *Isotricha* e $1,2 \times 10^4$ (10%) de *Dasytricha*, e $9,1 \times 10^3$ (7,5%) de *Isotricha* e $3,0 \times 10^4$ (25%) de *Dasytricha*.

Os dados ora registrados, são bastante inferiores aos assinalados por CARNEIRO et al. (1992) e por ARCURI et al. (1991), tanto em relação aos valores médios, que variaram por dietas entre 3.084,44 e 5.111,11 para *Isotricha* e entre 53,33 a 880,00 para *Dasytricha*, quanto em função dos percentuais em relação ao total de ciliados, que variou entre 1,22 e 1,62 para *Isotricha* e 0,02 e 0,32 para *Dasytricha* (Tabela 3).

Por outro lado, são outros os principais fatores que influem na ocorrência e flutuação populacional das espécies de Ophryoscolecidae. ABOU AKKADA et al. (1969) constataram maior freqüência de *Polyplastron*, *Ophryoscolex* e *Epidinium* nos hospedeiros que receberam ração acrescida de extrato de hemicelulose. Para FFOULKS & LENG (1988) pequenos ciliados predominaram no rúmen de bovinos alimentados com baixa quantidade de palha de aveia, sendo que em dois animais o gênero *Entodinium* foi o único observado, e nos outros dois hospedeiros, além deste, foram registrados ciliados dos gêneros *Epidinium* ou *Polyplastron* com cerca de 1% do total.

Neste caso, a influência da dieta parece ter sido significativa já que nos hospedeiros que receberam grande quantidade de palha de aveia, apesar da predominância de *Entodinium* spp., foram registrados os gêneros *Epidinium*, variando entre 3 e 17% do total, e cerca de 18% de *Isotricha*, além de outros organismos da subfamília Diplodiinae.

Utilizando três vacas em lactação, mantidas com dieta à base de silagem de milho YANG & VARGA (1989a) não registraram alteração no número total de ciliados em função do número de vezes ao dia, uma, duas ou quatro, em que concentrado foi fornecido, nem em relação ao tempo após a alimentação. Registraram número médio de ciliados, em relação a estes tempos, de 53,1, 55,3, 54,6 e 55,9 x 10⁴/g.

De acordo com o apresentado na tabela 1, o número total de organismos da família Ophryoscolecidae registrado, 808.368,88, correspondeu a 95,54% do total de ciliados assinalados nas três dietas. Em relação à esta família, os organismos do gênero *Entodinium* corresponderam a 87,42%. Ao se analisar os valores médios destes ciliados em cada dieta, destacou-se que estes valores diferiram significativamente entre D1, D2 e D3, apesar dos percentuais em relação aos totais de ciliados por dieta manterem-se elevados e relativamente semelhantes com, respectivamente, 85,29%, 83,55% e 81,87%.

Os elevados percentuais observados para *Entodinium* coincidem com a maior parte dos levantamentos sobre ciliados do rúmen. Há entretanto dados discrepantes para bovinos como os de CLARKE (1964) que registrou percentuais de 8,0 e 35,4 e de DEHORITY (1986) entre 42,2 e 84,6.

Já o percentual de organismos da família Blepharocorythidae observado (2,78) (Tabela 1), coincidiu com os registrados por DEHORITY (1986) em três dos quatro bovinos examinados por este autor no Brasil.

Com base em todos os fatores e resultados apresentados, e pontos coincidentes e divergentes que possam haver entre eles, chama a atenção, entretanto, o registro feito por CLARKE (1964) ao investigar influência da dieta em bovinos gêmeos. Na tabela que este autor apresentou, com percentuais de cada gênero observado em relação ao total de ciliados, notou-se que *Eremoplastron* teve registro mais constante em relação a esses fatores variando entre 21,4% a 32,4%; variou de 10,8% (trevo fresco) a 23,2% (silagem) e 17,2% (trevo fresco) e 9,6% (silagem) no mesmo animal, com dietas e épocas diferentes. Além disso, a variação entre animais diferentes mantidos com as mesmas dietas apresentaram maior variação com dieta de silagem.

Estes dados parecem indicar que tanto a influência da época da obtenção das amostras, quanto a influência da dieta e do hospedeiro devem ser consideradas, e que é grande a complexidade desses fatores, sobre as populações de ciliados do rúmen.

5.2. Influência do hospedeiro sobre as populações dos ciliados

5.2.1. Resultados

No conteúdo ruminal examinado dos três bovinos foram detectados e quantificados ciliados das famílias Blepharocorythidae (*Charonina*), Isotrichidae (*Isotricha*, *Dasytricha*) e Ophryoscolecidae (Entodiinae: *Entodinium*; Diplodiinae: *Diplodinium*, *Eodinium*, *Eremoplastron*, *Polyplastron*, *Diploplastron* e *Ostracodinium* sendo os três últimos analisados em conjunto e referidos como P+D+O). A exceção de *Dasytricha*, só registrado em A1, e de *Eremoplastron*, presente em A1 e em A2, esses ciliados foram observados nos três animais em todas as fases do experimento. Esta distribuição dos gêneros foi constante para os três animais em todas as dietas e/ou fases, mesmo enquanto os animais recebiam DO, excetuando-se *Isotricha* e *Dasytricha* que não foram registrados em A1 em DO.

O número médio de ciliados observados por famílias e por subfamílias de Ophryoscolecidae em A1, A2 e A3 estão apresentados na tabela 6. Nota-se que a família Ophryoscolecidae deteve absoluta supremacia sobre Blepharocorythidae e Isotrichidae, representando 93,14%, 96,67% e 97,67% em A1, A2 e A3, respectivamente, do total de ciliados observado em cada animal. Destaca-se ainda, que os organismos da subfamília Entodiinae representam 83,52% do total de Ophryoscolecidae. Todos os dados expressam o número de ciliados por mililitro de conteúdo ruminal.

Na tabela 7 estão apresentados os grupos de ciliados e respectivos valores médios e totais, valor mínimo e máximo observados, desvio padrões e percentuais em relação ao total de protistas estimado por animal.

A relação entre o número total de protistas e de cada hospedeiro revelou maior concentração de ciliados em A2 com 46,11% do total, seguido por A1 (30,29%) e A3 (23,61%) (Tabela 8). A tabela 8 apresenta ainda, os dados de cada grupo de ciliado e respectivos percentuais em relação ao total por hospedeiro, destacando-se a predominância de *Entodinium* sobre os outros ciliados, representando 83,22%, 78,04 e 94,99% do total em A1, A2 e A3, respectivamente.

TABELA 6. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) e respectivos percentuais, por famílias dos organismos observados e por subfamílias de Ophryoscolecidae

Ciliados		Animal			Totais
Famílias	Subfamílias	1	2	3	
Blepharocorythidae (nº)		12.364,44	8.404,44	2.751,11	23.520,00
	(%)	4,82	2,19	1,93	2,78
Isotrichidae (nº)		5.204,45	7.124,44	1.906,67	14.235,66
	(%)	2,03	1,82	0,96	1,68
Ophryoscolecidae (nº)		238.706,67	374.586,66	192.075,55	808.368,88
	(%)	93,14	96,02	97,67	95,54
	Entodiinae (nº)	213.280,00	304.431,11	188.982,22	706.693,33
	(%)	89,35	81,27	96,88	87,42
	Diplodiinae (nº)	25.426,67	70.155,55	6.093,33	101.675,55
	(%)	10,65	18,73	3,12	12,58
Totais*		256.275,56	390.115,56	199.733,33	846.124,44

* Os totais referem-se às somas dos ciliados registrados nas famílias.

TABELA 7. Valores mínimos, máximos, médios, percentuais e desvios padrão de cada gênero de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal), por hospedeiro

Ciliados		N	Animal											
			1				2				3			
			Mínimo	Máximo	Média	D. padrão	Mínimo	Máximo	Média	D. padrão	Mínimo	Máximo	Média	D. padrão
<i>Entodinium</i>	(nº) (%)	90	83.200	368.000	213.280,00 83,22	63.199,54	161.600	497.600	304.431,11 78,04	63.283,23	56.000	416.000	188.982,22 94,62	84.329,78
<i>Isotricha</i>	(nº) (%)	90	0	17.600	4.075,56 1,59	4.184,23	0	20.800	7.124,44 1,83	3.942,04	0	11.200	1.906,67 0,96	1.976,40
<i>Dasytricha</i>	(nº) (%)	90	0	8.000	1.128,89 0,44	1.669,34	0	0	0,00 0,00	0,00	0	0	0,00 0,00	0,00
<i>Diplodinium</i>	(nº) (%)	90	0	25.600	6.813,33 2,66	4.650,58	1.600	81.600	26.973,33 6,91	13.366,24	0	8.000	1.324,44 0,66	1.708,46
P+D+O*	(nº) (%)	90	0	27.200	8.728,89 3,41	4.426,14	0	44.800	12.400,00 3,20	6.168,28	0	12.800	2.506,67 1,26	2.093,14
<i>Eremoplastron</i>	(nº) (%)	90	0	16.000	2.915,56 1,14	2.889,22	4.800	73.600	24.542,22 6,29	12.354,55	0	0	0,00 0,00	0,00
<i>Eodinium</i>	(nº) (%)	90	0	30.400	6.968,89 2,72	4.912,69	0	20.800	6.160,00 1,58	3.823,31	0	16.000	2.262,22 1,13	2.267,98
<i>Charonina</i>	(nº) (%)	90	0	46.400	12.364,44 4,82	3.562,43	0	32.000	8.404,44 2,15	5.459,60	0	14.400	2.751,11 1,38	3.327,45
Totais					256.275,56				390.115,56				199.733,33	

* *Polyplastron* + *Diploplastron* + *Ostracodinium*.

TABELA 8. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) e respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por animal

Ciliado		Animal			Totais
		1	2	3	
<i>Entodinium</i>	(nº)	213.280,00 ^a	304.431,11 ^b	188.982,22 ^c	706.693,33
	(%)	83,22	78,04	94,62	83,52
<i>Isotricha</i>	(nº)	4.075,56 ^a	7.124,44 ^b	1.906,67 ^c	13.106,67
	(%)	1,59	1,83	0,96	1,55
<i>Dasytricha</i>	(nº)	1.128,89 ^a	-----	-----	1.128,89
	(%)	0,44			0,13
<i>Diplodinium</i>	(nº)	6.813,33 ^a	26.973,33 ^b	1.324,44 ^c	35.111,10
	(%)	2,66	6,91	0,66	4,15
P+D+O*	(nº)	8.728,89 ^a	12.480,00 ^b	2.506,67 ^c	23.715,56
	(%)	3,41	3,20	1,26	2,80
<i>Eremoplastron</i>	(nº)	2.915,56 ^a	24.542,22 ^b	-----	27.457,78
	(%)	1,14	6,29		3,25
<i>Eodinium</i>	(nº)	6.968,89 ^a	6.160,00 ^a	2.262,22 ^b	15.391,11
	(%)	2,72	1,58	1,13	1,82
<i>Charonina</i>	(nº)	12.364,44 ^a	8.404,44 ^b	2.751,11 ^c	23.519,99
	(%)	4,82	2,15	1,38	2,78
Totais	(nº)	256.275,56 ^a	390.115,56 ^b	199.733,33 ^c	846.124,43
	(%)	30,29	46,11	23,61	

Médias nas mesmas linhas seguidas por letras desiguais diferem a um nível de significância de 5%.

* *Polyplastron* + *Diploplastron* + *Ostracodinium*.

Em A1, *Charonina* foi o segundo gênero mais observado (4,82%) enquanto *Dasytricha* foi o de menor concentração (0,44%) e só esteve presente neste animal. Já em A2, destacaram-se os organismos dos gêneros *Diplodinium* (6,91%) e *Eremoplastron* (6,29%) sendo este último valor expressivo para A2 por representar 89,38% do registro destes organismos (Tabela 9).

Ao se observar a posição relativa de cada grupo de ciliados em cada hospedeiro com relação ao registro total destes grupos (Tabela 9), destacaram-se em A2, além da elevada representação absoluta e percentual de *Eremoplastron*, os maiores percentuais de *Entodinium* (43,08%), *Isotricha* (54,36%), *Diplodinium* (76,82%), P+D+O (52,62%). Já em A1 observaram-se os mais elevados percentuais de *Dasytricha* (100%), *Eodinium* (45,28%) e *Charonina* (52,57%).

A3 apresentou a menor diversidade de ciliados e os menores valores por grupos e total em relação aos outros hospedeiros.

As médias das contagens de cada grupo de ciliados variou significativamente entre os três animais em todos os grupos, à exceção de *Eodinium* que não diferiu significativamente entre A1 e A2; do mesmo modo as médias das contagens totais dos ciliados variaram significativamente entre A1, A2 e A3 (Tabela 8 e 9).

TABELA 9. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) e respectivos percentuais em relação ao total de cada gênero de ciliados

Ciliado		Animal			Totais
		1	2	3	
<i>Entodinium</i>	(nº)	213.280,00 ^a	304.431,11 ^b	188.982,22 ^c	706.693,33
	(%)	30,18	43,08	26,74	83,52
<i>Isotricha</i>	(nº)	4.075,56 ^a	7.124,44 ^b	1.906,67 ^c	13.106,67
	(%)	31,10	54,36	14,55	1,55
<i>Dasytricha</i>	(nº)	1.128,89 ^a	-----	-----	1.128,89
	(%)	100,00			0,13
<i>Diplodinium</i>	(nº)	6.813,33 ^a	26.973,33 ^b	1.324,44 ^c	35.111,10
	(%)	19,41	76,81	3,77	4,15
P+D+O*	(nº)	8.728,89 ^a	12.480,00 ^b	2.506,67 ^c	23.715,56
	(%)	36,81	52,62	10,57	2,80
<i>Eremoplastron</i>	(nº)	2.915,56 ^a	24.542,22 ^b	-----	27.457,78
	(%)	10,62	89,38		3,25
<i>Eodinium</i>	(nº)	6.968,89 ^a	6.160,00 ^a	2.262,22 ^b	15.391,11
	(%)	45,28	40,02	14,70	1,82
<i>Charonina</i>	(nº)	12.364,44 ^a	8.404,44 ^b	2.751,11 ^c	23.519,99
	(%)	52,57	35,73	11,70	2,78
Totais	(nº)	256.275,56 ^a	390.115,56 ^b	199.733,33 ^c	846.124,43
	(%)	30,29	46,11	23,61	

Médias nas mesmas linhas seguidas por letras desiguais diferem a um nível de significância de 5%.

* *Polyplastron* + *Diploplastron* + *Ostracodinium*.

Na tabela 10 estão apresentados os dados referentes ao total de ciliados registrado por animal e total em cada dieta por animal com os respectivos percentuais em relação ao total por animal, observando-se a maior concentração de ciliados em A2, seguido de A1. Ao se analisar os dados dos animais em relação a cada uma das dietas notou-se que esta correspondência foi mantida, com A2 apresentando as maiores concentrações de ciliados em todas as dietas, seguido por A1, exceto em D1 quando A3 apresentou maior número de ciliados que A1. As proporções mais elevadas foram observadas em D2 para A1 e A3 e em D3 para A2. Nesta tabela estão apresentados, ainda, os valores médios do pH de cinco amostras de cada coleta, por animal.

Ao se analisar as relações percentuais dos ciliados observados em A1, A2 e A3 com dietas iguais (Tabela 10), confirmou-se a predominância de ciliados em A2 em todas as dietas. A2 apresentou maior concentração de ciliados registrada, absoluta ou relativa, em D3, com percentual de 55,27% em relação aos outros animais nesta dieta.

Na tabela 11 estão apresentados os dados referentes às médias de ciliados registrados por animal e em cada fase do experimento. Notou-se que a tendência crescente ao longo das fases foi constante somente em A1 e que as maiores concentrações de ciliados em A2 e A3 foram, respectivamente, em F3 e F2.

TABELA 10. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de bovinos (/ml de conteúdo ruminal), de acordo com a dieta e o hospedeiro, e respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por animal, e pH médio de cada situação

Dieta*	Animal/pH						Totais
	1	pH	2	pH	3	pH	
D1 (nº)	186.226,67	6,98	340.760,00	6,98	231.013,33	6,40	758.000,00
(%)	24,22	+0,13	29,12	+0,24	38,55	+0,20	29,86
D2 (nº)	331.173,33	7,35	370.000,00	6,97	247.626,67	5,76	948.800,00
(%)	43,08	+0,07	31,62	+0,16	41,33	+0,66	37,38
D3 (nº)	251.426,67	6,83	459.586,67	7,30	120.560,00	6,51	831.573,34
(%)	32,70	+0,33	39,27	+0,31	20,12	+0,16	32,34
Totais (nº)	768.826,67		1.170.346,67		599.200,00		2.538.373,34
(%)	30,29		46,11		23,61		

* D1, D2 e D3 correspondem, respectivamente, a 20, 30 e 40% de proteína.

TABELA 11. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml do conteúdo ruminal), de acordo com a fase e o hospedeiro, e respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por animal

Fase		Animal			Totais
		1	2	3	
F1	(nº)	186.226,67	370.000,00	120.560,00	676.786,67
	(%)	24,22	31,62	20,12	26,66
F2	(nº)	251.426,67	340.760,00	247.626,67	839.813,34
	(%)	32,70	29,12	41,33	33,08
F3	(nº)	331.173,33	459.586,67	231.013,33	1.021.773,33
	(%)	43,08	39,27	38,55	40,25
Totais	(nº)	768.826,67	1.170.346,67	599.200,00	2.538.373,24
	(%)	30,29	46,11	23,61	

5.2.2. Discussão

Os gêneros de ciliados do rúmen, registrados em A1, *Entodinium*, *Isotricha*, *Dasytricha*, *Diplodinium*, *Eodinium*, *Eremoplastron*, *Polyplastron*, *Diploplastron* e *Ostracodinium*, e o registro semelhante nos outros animais, excetuando-se organismos do gênero *Dasytricha* em A2 e de *Dasytricha* e *Eremoplastron* em A3, permitiu o reconhecimento da ocorrência de população do tipo A nos três hospedeiros. Segundo EADIE (1962b), além de espécies de *Entodinium* e de isotríquídeos, comuns aos dois tipos de populações assinaladas por este autor, a população do tipo A caracteriza-se pela ocorrência de *Polyplastron multivesiculatum* geralmente associada a *Diploplastron* affine, como registrado no presente trabalho, ou a *Ophryoscolex tricornatus*. Esta caracterização de populações baseia-se no antagonismo entre algumas espécies e ciliados já relatada por outros autores (EADIE, 1967; ABOU AKKADA et al., 1969; JOUANY et al., 1988). Apesar de ter sido caracterizado como do tipo A, o conjunto de ciliados detectados apresentou organismos que geralmente estão associados a outro tipo de população. Desta forma, registrou-se a ocorrência de *Ostracodinium* nos três animais e de *Eremoplastron* em A1 e A2. Estes organismos geralmente coexistem com *Eudiplodinium*

maggie Epidinium spp., constituindo a chamada população do tipo B. Todavia, o registro de população estável de *Eremoplastron* junto com *Polyplastron* já havia sido relatado por EADIE (1962b), e o de *Ostracodinium* em populações mistas A-B com a presença de *Polyplastron*, em bisões, por TOWNE et al. (1988) e a coexistência destes últimos em ovinos por DEHORITY (1978), o que respalda a presente caracterização.

A distribuição dos gêneros e respectivas concentrações observadas, possivelmente relacionam-se aos valores do pH, tendo sido os mais baixos registrados em A3, que foi o hospedeiro que apresentou as menores concentrações e a menor diversidade de ciliados. Estas considerações coincidem com o observado por PURSER & MOIR (1959) quanto à inibição na divisão de ciliados do rúmen nos períodos diurnos de pH mais baixo. Tanto a instalação quanto a manutenção das populações de ciliados do rúmen parecem estar relacionadas ao pH conforme já relatado por PURSER & MOIR (1966), EADIE (1962a), NOGUEIRA FILHO et al. (1984) e OLIVEIRA et al. (1987, 1989). Provavelmente a instalação precoce de *Entodinium*, assinalada em bezerros com dois meses de idade e pH de 4,2 por NOGUEIRA FILHO (1984), deva-se, dentre outros fatores, à sua tolerância a esta variação. Outros autores assinalaram que com pH ruminal abaixo de 6,0 (in

DEHORITY, 1987) as espécies de *Entodinium* constituíam basicamente o total de ciliados presentes. O baixo pH, possivelmente associado a outros fatores individuais não investigados, podem ter determinado as altas concentrações de *Entodinium*, sobretudo em A3 que apresentou a maior proporção de *Entodinium*, cujas populações atingiram 94,62% do total de protistas detectados neste animal (Tabela 8). A menor concentração de ciliados registrada ($12,06 \times 10^4$) (Tabela 10), coincidiu com os mais baixos valores de pH, próximos a 5, em A3 na D3 em um dos momentos de coleta, mas estes dados ficaram mascarados pelas médias.

No presente trabalho foram assinaladas diferenças significativas no total de ciliados e em cada grupo analisado entre os três animais examinados, demonstrando que há influência individual na ocorrência e na concentração de ciliados ruminais. Procurou-se minimizar este efeito pelo modelo estatístico adotado, no qual todos os animais receberam todas as variações da dieta. Todavia, pelo número reduzido de animais disponíveis esta influência não pôde deixar de ser considerada. Desta forma, a ocorrência de cada grupo de ciliado manteve-se constante nos três animais das diversas situações, bem como a concentração total de ciliados foi maior em A2, independente das dietas e fases, e os menores valores, com única exceção, foram os

apresentados por A2 (Tabelas 5 e 6).

A grande variação na concentração de ciliados por hospedeiro já havia sido destacada por TOWNE et al. (1988) em levantamento dos ciliados ruminais de 81 bisões, quando registraram, para grupos com a mesma dieta, variações no número total de protistas de 17×10^4 a $822 \times 10^4/\text{g}$ nos animais mantidos com forragem, 126×10^4 a $4.187 \times 10^4/\text{g}$ no mantidos com forragem-concentrado e 420×10^4 a $4.187 \times 10^4/\text{g}$ nos que receberam forragem-grão.

No Brasil, em levantamento de ciliados do rúmen em quatro vacas Nelore, DEHORITY (1986) assinalou variações no total de ciliados, relacionadas ao hospedeiro, de $9,0 \times 10^4$ a $51,2 \times 10^4$. As variações registradas por este autor refletiram-se também em cada família de ciliados observadas, até mesmo na subfamília Entodiinae, cujos percentuais variaram entre 42,2% e 84,6%. Nos registros ora apresentados, apesar das contagens totais diferenciadas, os percentuais destes organismos foi elevado em todos os hospedeiros representando 78,04% a 94,62% do total de ciliados por animal (Tabela 6). Todas essas variações indicam que além da influência das dietas, fatores inerentes ao metabolismo dos hospedeiros não podem ser desprezados.

Estas observações encontram ressonância nas considerações de WILLIAMS & COLEMAN (1991) que destacaram a importância da influência individual do hospedeiro ao afirmarem que resultados nos quais efeito de diferentes regimes alimentares foram determinados usando-se poucos animais, devem ser tratados com cuidado.

5.3. Influência da fase do experimento sobre as populações dos ciliados

5.3.1. Resultados

No exame do conteúdo ruminal dos três bovinos foram detectados e quantificados, em todas as fases do experimento, ciliados dos gêneros *Charonina*, *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eodinium*, *Eremoplastron*, *Polyplastron*, *Diploplastron* e *Ostracodinium* sendo os três últimos analisados em conjunto e referidos como P+D+O.

O número médio de ciliados e respectivos percentuais em relação aos totais das famílias Blepharocorythidae, Isotrichidae e Ophryoscolecidae segundo cada fase do experimento estão apresentados na Tabela 12. Notou-se tendência ao aumento do número

de ciliados ao longo do experimento, que foi determinada por organismos da família Ophryoscolecidae, sobretudo pelos Entodiinae, por sua predominância quantitativa. Os isotríquídeos apresentaram tendência semelhante sem, contudo, exercerem influência no total de cada fase por representarem, em média, 1,68% do total de ciliados.

Os grupos de ciliados e respectivos valores médios e totais, valor mínimo e máximo observados, desvios padrão e percentuais em relação ao total de protistas por fase do experimento estão apresentados na Tabela 13.

Na tabela 14 estão apresentados os valores médios e totais de cada grupo de ciliados, com percentuais de 26,66, 33,09 e 40,25 em F1, F2 e F3, respectivamente. Os totais diferiram significativamente entre as três fases. Os valores absolutos de *Entodinium* e de *Isotricha* apresentaram concentrações crescentes por fase e diferenças significativas entre elas. Os elevados valores de *Entodinium* determinaram a relação entre os totais por fase, uma vez que este gênero representou em F1 78,63%, em F2 87,06% e em F3 83,85% dos ciliados registrados.

TABELA 12. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) e respectivos percentuais, por famílias dos organismos observados e por subfamílias de Ophryoscolecidae

Ciliados		Fase			Totais
Famílias	Subfamílias	1	2	3	
Blepharocorythidae	(nº)	11.475,56	4.533,33	7.511,11	23.520,00
	(%)	5,09	1,62	2,21	2,78
Isotrichidae	(nº)	2.791,11	5.586,67	5.857,78	14.235,66
	(%)	1,24	2,00	1,72	1,68
Ophryoscolecidae	(nº)	211.328,89	269.817,77	327.222,22	808.368,88
	(%)	93,10	96,38	96,07	95,54
	Entodiinae (nº)	177.377,78	243.728,89	285.586,67	706.693,33
	(%)	83,93	90,33	87,28	87,42
	Diplodiinae (nº)	33.951,11	26.088,88	41.635,55	101.675,55
	(%)	16,07	9,67	12,72	12,58
Totais*		225.595,56	279.937,77	340.591,11	846.124,44

* Os totais referem-se às somas dos ciliados registrado nas famílias.

TABELA 13. Valores mínimos, máximos, médios, percentuais e desvios padrão de cada gênero de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal), por fase do experimento

Ciliados	N	Fase												
		1				2				3				
		Mínimo	Máximo	Média	D. padrão	Mínimo	Máximo	Média	D. padrão	Mínimo	Máximo	Média	D. padrão	
<i>Entodinium</i>	(nº) (%)	90	56.000	352.000	177.377,78 81,59	77.327,30	102.400	430.400	243.728,89 87,86	75.891,64	150.400	497.600	285.586,67 83,85	71.324,19
<i>Isotricha</i>	(nº) (%)	90	0	20.800	2.737,78 0,99	3.793,40	0	19.200	4.706,67 1,59	4.068,95	0	19.200	5.662,22 1,66	3.915,05
<i>Dasytricha</i>	(nº) (%)	90	0	1.600	53,33 0,03	287,61	0	8.000	880,00 0,36	1.670,00	0	3.200	195,56 0,06	612,57
<i>Diplodinium</i>	(nº) (%)	90	0	81.600	14.915,56 4,78	16.641,54	0	28.800	5.853,33 1,85	5.911,72	0	57.600	14.342,22 4,21	14.334,86
P+D+O*	(nº) (%)	90	0	28.800	7.964,44 3,31	6.487,33	0	44.800	7.746,67 2,65	6.655,61	0	25.600	8.004,44 2,35	5.146,97
<i>Eremoplastron</i>	(nº) (%)	90	0	51.200	7.742,22 2,17	11.592,84	0	33.600	6.564,44 2,10	7.306,89	0	73.600	13.151,11 3,86	17.577,43
<i>Eodinium</i>	(nº) (%)	90	0	30.400	3.328,89 1,53	3.144,55	0	20.800	5.924,44 2,09	4.752,44 2,09	0	20.800	6.137,78 1,80	4.384,08
<i>Charonina</i>	(nº) (%)	90	0	46.400	11.475,56 5,59	7.819,84	0	19.200	4.533,33 1,51	4.213,79	0	36.800	7.511,11 2,21	7.601,15
Totais					225.595,56				279.937,78				340.591,11	

* *Polyplastron* + *Diploplastron* + *Ostracodinium*.

TABELA 14. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) por fase do experimento e respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por fase

Ciliado		Fase			Totais
		1	2	3	
<i>Entodinium</i>	(nº)	177.377,78 ^a	243.728,89 ^b	285.586,67 ^c	706.693,34
	(%)	78,63	87,07	83,85	83,52
<i>Isotricha</i>	(nº)	2.737,78 ^a	4.706,67 ^b	5.662,22 ^c	13.106,67
	(%)	1,21	1,28	1,66	1,55
<i>Dasytricha</i>	(nº)	53,33 ^a	880,00 ^b	195,56 ^c	1.128,89
	(%)	0,02	0,24	0,06	0,13
<i>Diplodinium</i>	(nº)	14.915,56 ^a	5.853,33 ^b	14.342,22 ^a	35.111,11
	(%)	6,61	1,60	4,21	4,15
P+D+O*	(nº)	7.964,44 ^a	7.746,67 ^a	8.004,44 ^a	23.715,55
	(%)	3,53	2,11	2,35	2,80
<i>Eremoplastron</i>	(nº)	7.742,22 ^a	6.564,44 ^a	13.151,11 ^b	27.457,77
	(%)	3,43	1,79	3,86	3,25
<i>Eodinium</i>	(nº)	3.328,89 ^a	5.924,44 ^b	6.137,78 ^b	15.391,11
	(%)	1,48	1,61	1,80	1,82
<i>Charonina</i>	(nº)	11.475,56 ^a	4.533,33 ^b	7.511,11 ^c	23.520,00
	(%)	5,09	1,24	2,21	2,78
Totais	(nº)	225.595,56 ^a	279.937,77 ^b	340.591,11 ^c	846.124,44
	(%)	26,66	33,09	40,25	

Médias nas mesmas linhas seguidas por letras desiguais diferem a um nível de significância de 5%.

* *Polyplastron* + *Diploplastron* + *Ostracodinium*.

Ao se analisar as relações entre as fases em cada animal destacou-se que a tendência crescente ao longo das fases só ocorreu em A1, enquanto A2 apresentou maiores valores absolutos em F3 seguido por F1 e A3 em F2 (Tabela 15).

Não foi possível estabelecer relação entre as fases de cada dieta (Tabela 16), uma vez que a influência do hospedeiro (Tabela 15) predominou.

5.3.2. Discussão

Há pouca informação sobre influência da variação sazonal na concentração de ciliados do rúmen, sendo a maioria dos experimentos realizados sob condições controladas, intensivas e com ração constante (WILLIAMS & COLEMAN, 1991). Além disso, geralmente são utilizados poucos animais hospedeiros e em curtos períodos, não permitindo relacionar os resultados com as condições ambientais.

De acordo com citado por WILLIAMS & COLEMAN (1991), VAN DER WATH & MYBURGH (1941) observaram em ovinos, mantidos em pastagens na África do Sul, médias crescentes nas contagens de ciliados no inverno, primavera, outono e verão. Destacaram que no inverno 20,6% do total foram de grandes entodiniomorfos, ciliados

TABELA 15. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) de acordo com o hospedeiro e a fase do experimento e respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por fase

Animal	Fase			Totais
	1	2	3	
A1 (nº)	186.226,67	251.426,67	331.173,33	768.826,67
(%)	27,52	29,94	32,41	30,29
A2 (nº)	370.000,00	340.760,00	459.586,67	1.170.346,67
(%)	54,67	40,58	44,98	46,11
A3 (nº)	120.560,00	247.626,67	231.013,33	599.200,00
(%)	17,81	29,49	22,61	23,61
Totais (nº)	676.786,67	839.813,34	1.021.773,33	2.538.373,34
(%)	26,66	33,09	40,25	

TABELA 16. Valores médios e totais de ciliados do rúmen de três bovinos (/ml de conteúdo ruminal) de acordo com a dieta e a fase do experimento e respectivos percentuais em relação ao total de ciliados por fase

Fase		Dieta*			Totais
		1	2	3	
F1	(nº)	186.226,67	340.760,00	231.013,33	757.999,67
	(%)	27,52	40,58	22,61	29,86
F2	(nº)	370.000,00	247.626,67	331.173,33	948.800,00
	(%)	54,67	29,49	32,41	37,38
F3	(nº)	120.560,00	251.426,67	459.586,67	831.573,34
	(%)	17,81	29,94	44,98	32,76
Totais	(nº)	676.786,67	839.813,34	1.021.773,33	2.538.373,34
	(%)	26,66	33,09	40,25	

* D1, D2 e D3 correspondem, respectivamente, a 20, 30 e 40% de proteína.

capazes de utilizar forragem com lignina; este percentual caiu para 15,7% no verão, com a ampliação das populações de *Entodinium* spp.

Já BONHOMME-FLORENTIN et al. (1978) constataram a influência das estações sobre os ciliados ruminais de *Bos indicus* no Senegal, observando que na estação chuvosa, ou "invernal", o número total de ciliados foi acentuadamente maior do que na estação seca, $1,2 \times 10^5$ e $5,9 \times 10^4$, respectivamente. Além da variação sazonal, os autores atribuíram também à modificação do valor nutritivo da pastagem o aumento das populações de ciliados.

No Brasil, no município de Botucatu-SP, há o relato de OLIVEIRA (1991) que, ao obter amostras de conteúdo do ruminal de 51 vacas em março (verão) e em agosto (inverno), observou número total de ciliados significativamente maior no verão ($134 \times 10^3/\text{ml}$) que no inverno ($85 \times 10^3/\text{ml}$). Este autor, concordando com as observações de BONHOMME-FLORENTIN et al. (1978), ressaltou que no verão a pastagem encontrava-se mais succulenta e a umidade do ar mais elevada.

Não se pode desprezar nestas considerações o modo de transmissão dos ciliados ruminais. Estes ciliados não apresentam a formação de cistos e a transmissão ocorre por via oral, por contato direto com outro ruminante ou por contaminação dos alimentos ou da pastagem pela saliva, uma vez que grande número de ciliados são

regurgitados durante a ruminação (HUNGATE, 1966; DEHORITY, 1986). Pode-se inferir que, pelo modo de transmissão exclusivamente contaminativa, a maior umidade favoreça a sobrevivência dos ciliados no meio externo, já que as condições deste ambiente lhes são, a priori, desfavoráveis por serem as espécies de ciliados de rúmen estritamente anaeróbicas. Todavia, de acordo com CZERKAWSKI (1986), como o hospedeiro ruminante ingere água e produz grande quantidade de saliva, ambas saturadas de oxigênio, e o animal passa muito tempo ruminando, é provável que os organismos do rúmen não sejam tão sensíveis ao oxigênio em seu ambiente natural. Esta hipótese é reforçada pelas observações de NOUZAREDE (1965) que destacou ser a sobrevivência desses ciliados fora do rúmen relativamente elevada, assinalando a sobrevivência por seis dias, a 27°C, para *Isotricha*, *Entodimum* e *Polyplastron* e por 4-5 dias para os mesmos organismos a 37-38°C.

As amostras de conteúdo ruminal ora examinadas foram obtidas ao longo de três meses, novembro, dezembro e janeiro, que correspondem a meses da estação chuvosa. Este período, todavia, é muito curto para caracterizar qualquer alteração nas populações dos ciliados ruminais observados, e não se dispõe de dados com a mesma dieta básica em outras épocas, neste local, para comparação. A única

referência disponível, situando uma determinada época do ano, é a citada por CARNEIRO et al. (1992) para dois novilhos alimentados com cana-de-açúcar + 1% de uréia e com capim elefante, também no CNPGL/EMBRAPA. O total de ciliados observados nestes hospedeiros, respectivamente, foi $18,12 \times 10^4$ e $7,35 \times 10^4$, nos meses de julho e agosto de 1990 que correspondem ao período seco. Os totais de ciliados citados por CARNEIRO et al. (1992) foram inferiores aos registrados em todas as fases do presente trabalho que variaram entre $22,56 \times 10^4$ e $34,06 \times 10^4$ (Tabelas 12-16).

No presente trabalho, coube assinalar apenas que foi notado o aumento gradual e estatisticamente significativo do número total de ciliados ao longo das fases do experimento. Esta observação poderá servir de base para trabalhos comparativos e ser tema de futuros estudos o acompanhamento dos ciliados ruminais ao longo do ano, suas relações com as dietas oferecidas neste período e com a variação das condições ambientais.

5.4. Aspectos morfológicos dos ciliados do rúmen revelados pelo protargol e pela reação de Feulgen

Desde a primeira observação por GRUBY & DELAFOND, em 1843, espécies de ciliados de rúmen vêm sendo assinaladas e descritas nas diversas regiões de ocorrência de seus hospedeiros, ruminantes e pseudo-ruminantes domesticados ou silvestres. Quanto às técnicas de evidenciação de suas estruturas são utilizadas montagens provisórias com ciliados não corados (VAN HOVEN, 1983), em glicerina (KOFOID & MacLENNAN, 1930; WERTHEIM, 1935; DAS-GUPTA, 1935; CLARKE, 1964) ou corados. Para evidenciar o macronúcleo é comum o emprego do verde de metila CLARKE, 1964; DEHORITY, 1974; IMAI, 1988), verde de metila-pironina-acéto-orceina-clorídrico ou reação ao Azur A. Gürr (CHARDEZ, 1983) ou azul de metileno acidificado (DEHORITY, 1974), e para evidenciação das placas esqueléticas, solução de Lugol ou outra contendo iodo (KOFOID & CHRISTENSON, 1934; DAS-GUPTA, 1935; LUBINSKY, 1958b; ZIELYK, 1961; CLARKE, 1964; DEHORITY, 1974; VAN HOVEN, 1975, 1983; CHARDEZ, 1983).

Quanto às preparações permanentes, foram referidas a coloração pela hematoxilina de Heidenhain, Mallory, Delafield ou de Mayer, e ainda hematoxilina e eosina (KOFOID & MacLENNAN, 1930,

1932; WERTHEIM, 1935; DAS-GUPTA, 1935; ZIELYK, 1961; VAN-HOVEN, 1975, 1983; OGIMOTO & IMAI, 1981; IMAI, 1988). Preparações com verde de metila desidratadas em álcool e xilol e montadas em Euparal foram feitas por CLARKE (1964), e com carmim borácico por ZIELYK (1961).

OGIMOTO & IMAI (1981) citaram como possíveis técnicas para preparações permanentes de ciliados de rúmen, além da hematoxilina férrica de Heidenhaim, a impregnação pela prata, segundo Bodian, mencionando ainda a técnica de CHATTON-LWOFE (1930) simplificada, de acordo com FRANKEL & HECKMANN (1968).

ZIELYK (1961), além das técnicas já citadas, fez preparações utilizando nigrosina, 10% de azul opala, e técnicas de impregnação pela prata de KLEIN (1958) e CHATTON-LWOFF (1930) para evidenciar estriações longitudinais de organismos do gênero *Entodinium*. O autor assinalou não haver obtido nenhum resultado positivo na coloração ou impregnação da infraciliatura.

O presente trabalho objetivou investigar o resultado da utilização de duas técnicas de preparações permanentes, o protargol e a reação de Feulgen, no estudo de ciliados de rúmen de bovinos por se tratar de técnicas clássicas em ciliatologia, de ampla aplicação e que raramente são utilizadas para preservação de entodiniomorfos.

5.4.1. Resultados e Discussão

Apesar de rotineiramente utilizadas em ciliatologia, não é comum o emprego do protargol ou da reação de Feulgen para evidenciação de estruturas de ciliados de rúmen ou para sua preservação em coleções de referência.

O registro dos resultados obtidos com o protargol e a reação de Feulgen em ciliados ruminais dos gêneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eodinium*, *Eremoplastron* e *Ostracodinium* pode ser observado nas Figuras 2-6.

Com o protargol, os caracteres morfológicos principais para a identificação específica destes ciliados foram evidenciados como, por exemplo, a estrutura externa e suas particularidades como estrias e fendas na película (Figura 2A, B), zonas de sincílica (Figuras 2-6), macro e micronúcleo (Figuras 2-6), vacúolo pulsátil (Figuras 3B; 4A). Outros caracteres como o opérculo - quando presente -, citofaringe, citoprocto e fagossomo também podem ser observados (Figuras 2-6). Registraram-se ainda, a impregnação do macronúcleo (Figuras 2D; 4B) e do micronúcleo (Figura 2D) em divisão e de novas zonas ciliares na formação do opisto (Figura 4B; 5D; 6A).

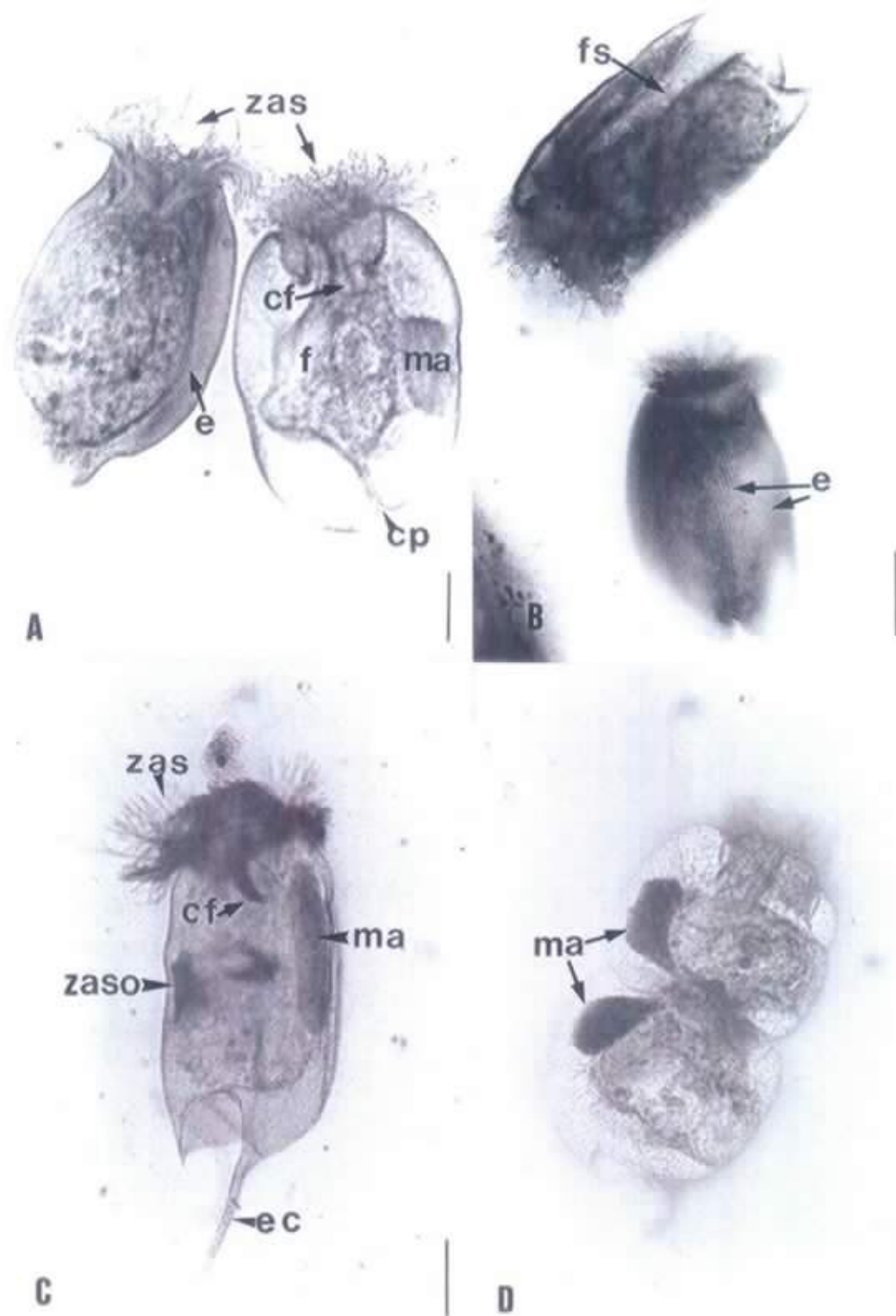


FIGURA 2. Micrografias de *Entodinium* spp. em Protargol (A,B,C) e Reação de Feulgen (D). Zona adoral de sincília (zas), Zona adoral de sincília do opisto em formação (zaso), macronúcleo (ma) em divisão na letra D, citofaringe (cf), fagossoma (f), citoprocto (cp), estrias (e), fenda superior (fs), espinho caudal (ec). Barra = 10 µm.

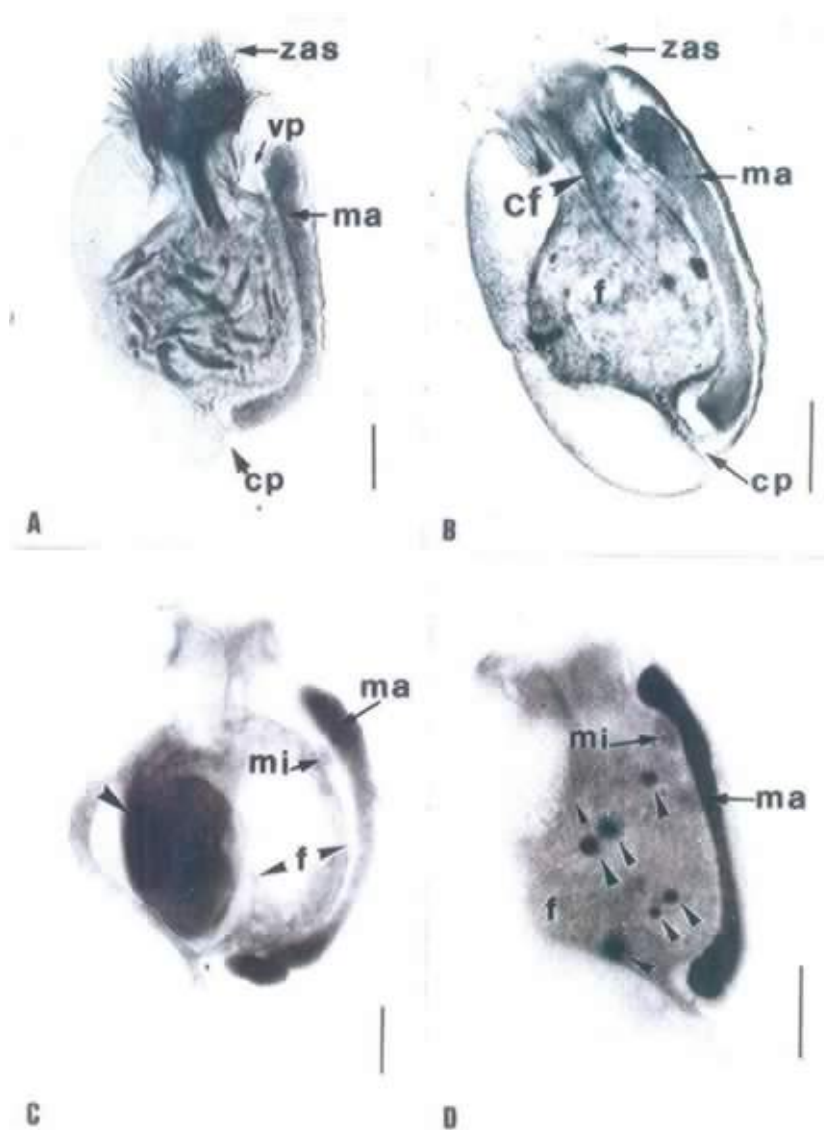


FIGURA 3. Micrografias de *Entodinium* sp., em Protargol (A,B) e Reação de Feulgen (C,D). Zona adoral de sincília (zas), macronúcleo (ma), micronúcleo (mi), fagossoma (f), citoprocto (cp), vacúolo pulsátil (vp), C - predação de um congênere (seta); D - restos de material nuclear de um congênere parcialmente digerido (setas). Barra = 10 µm.

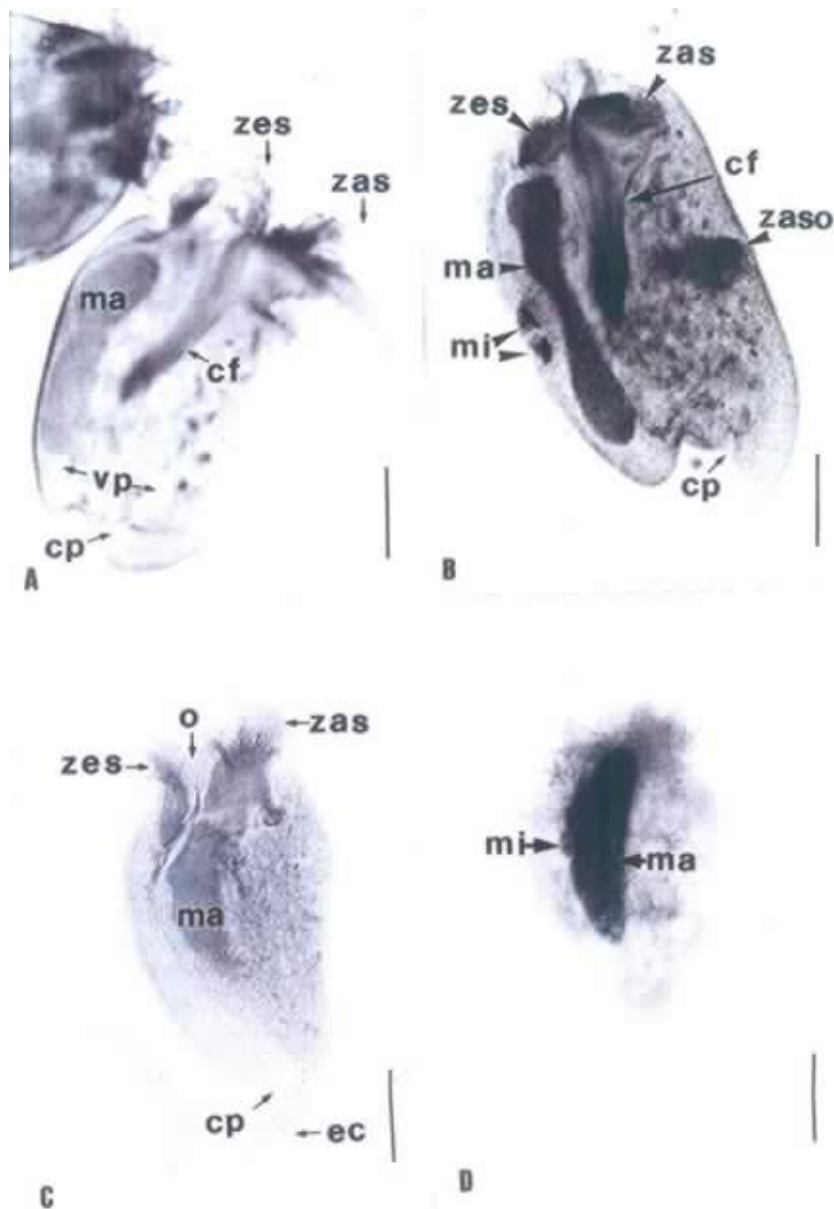


FIGURA 4. Micrografias de *Eodinium* sp., em Protargol (A,B) e de *Eremoplastron* sp. em Protargol (C) e Reação de Feulgen (D). Zona adoral de sincília (zas), zona esquerda de sincília (zes), zona adoral de sincília do opisto em formação (zaso), macronúcleo (ma), micronúcleo (mi), citofaringe (cf), citoprocto (cp), vacúolo pulsátil (vp), opérculo (o). Barra = 10 µm.

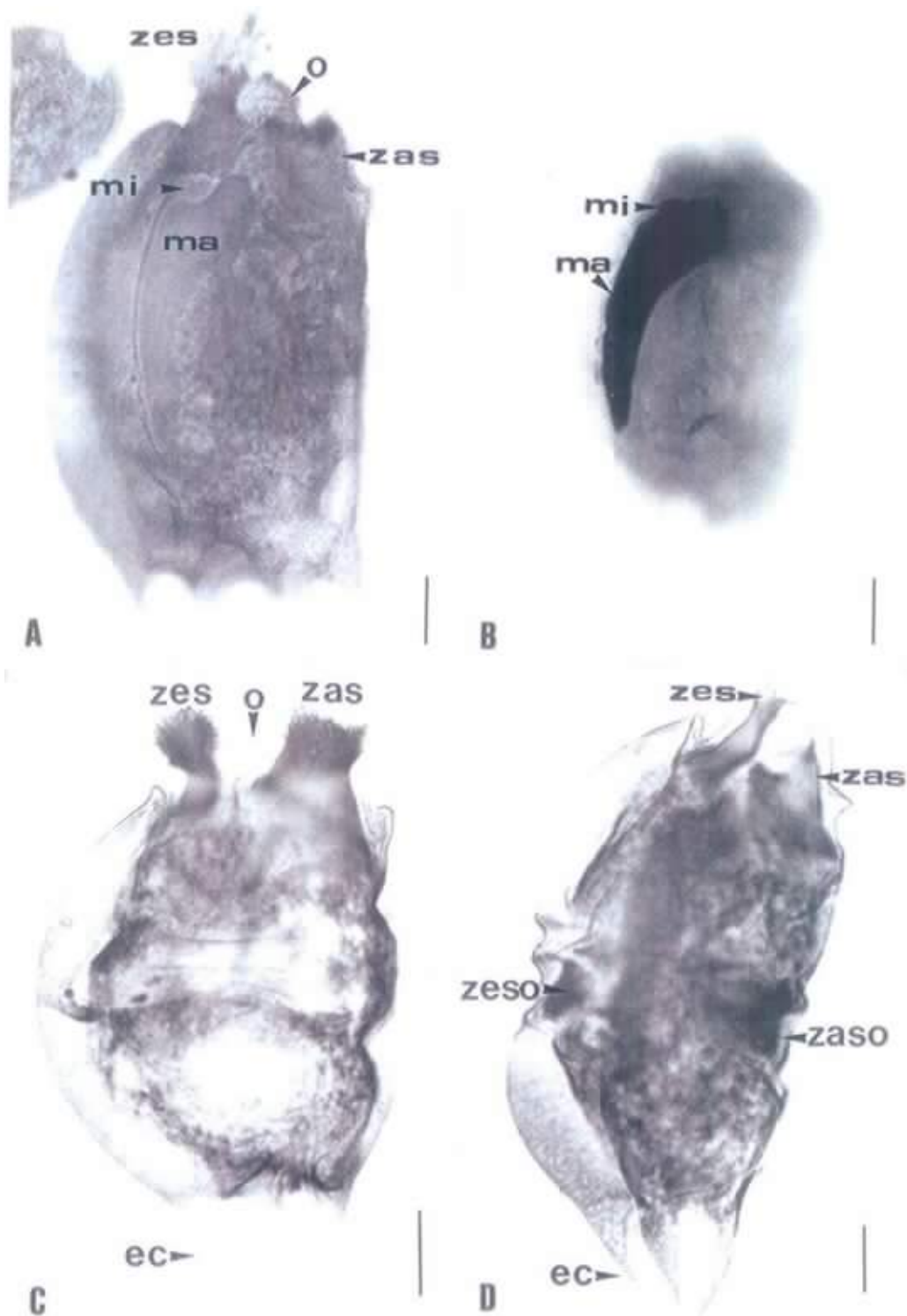


FIGURA 5. Micrografias de *Diplodinium* sp., em Protargol (A,C,D) e Reação de Feulgen (B). Zona adoral de sincília (zas), zona esquerda de sincília (zes), zona adoral de sincília do opisto em formação (zaso), macronúcleo (ma), micronúcleo (mi), espinhos caudais (ec), opérculo (o). Barra = 10 μm.

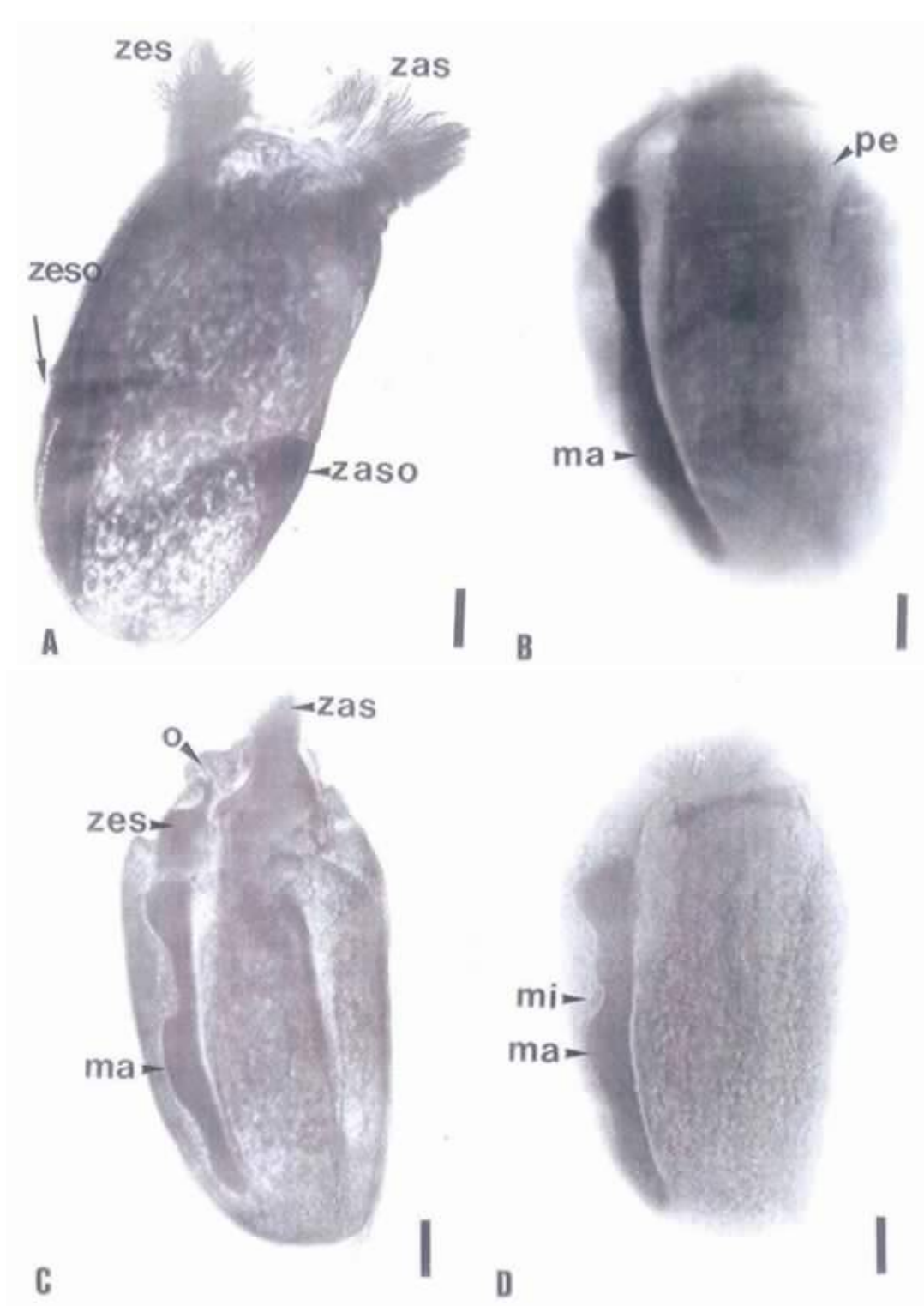


FIGURA 6. Micrografias de *Ostracodinium* sp., em Protargol (A,C) e Reação de Feulgen (B,D). Zona adoral de sincília (*zas*), zona esquerda de sincília (*zes*) protraída em A e retraída em C, zona adoral de sincília do opisto em formação (*zaso*), zona esquerda de sincília do opisto em formação (*zeso*), macronúcleo (*ma*), micronúcleo (*mi*), opérculo (*o*), vestígio de placa esquelética (*pe*). Barra = 10 μ m.

Destacam-se as melhores impregnações nos organismos de menores dimensões e em geral sem placas esqueléticas, excetuando-se os do gênero *Eremoplastron* que apresentam pequena placa esquelética e bons resultados de impregnação. Todavia, para os ciliados cuja identificação genérica é feita pelo número e forma das placas esqueléticas, em geral grandes entodiniomorfos, a impregnação argêntica é inadequada por não evidenciar completamente estas estruturas, apenas vislumbrando-se sua presença em algumas preparações (Figura 6B). As melhores evidenciações das placas esqueléticas são obtidas com o emprego de soluções a base de iodo (CHARDEZ, 1983; VAN HOVEN, 1975, 1983), apesar de serem preparações provisórias.

Para os entodiniomorfos de maiores dimensões como os dos gêneros *Ostracodinium*, *Polyplastron* e outros, o emprego do protargol é restrito pela excessiva impregnação destes organismos, observada mesmo com a redução do tempo de imersão no proteinato de prata. Em algumas preparações, entretanto, nota-se a nítida impregnação do macronúcleo e das zonas de sincília, protraídas ou não (Figura 6A, C), como as observadas em *Ostracodinium* sp. Com os organismos de outros gêneros deste grupo não foram obtidos bons resultados.

Dentre as poucas referências à esta técnica para entodiniomorfos, OGIMOTO & IMAI (1981) citam uma variante do protargol como um dos métodos para montagem permanentes de ciliados. Os autores não apresentaram, contudo, resultados do seu emprego. Em estudo de organismos da família Ophryoscolecidae, especialmente de *Entodinium dubardi* Buisson, 1923 de cervídeo, ZIELYK (1961) utilizou técnicas de impregnação pela prata de KLEIN (1958) e de CHATTON-LWOFF (1930) assinalando não ter observado a impregnação da infraciliatura. O autor concluiu que material fixado com formalina é inadequado a esta impregnação. A impregnação da infraciliatura de entodiniomorfos com carbonato de prata com piridina foi obtida por NOIROT-TIMOTHÉE (1960) e por FERNÁNDEZ-GALIANO (1958), sem o emprego de piridina, em método que chamou de impregnação rápida. Este autor realizou estudo sobre *Polyplastron multivesiculatum* (Dogiel & Fedorowa, 1925), ressaltando ter obtido bons resultados. Nos resultados obtidos no presente trabalho, em concordância com o observado por ZIELYK (1961), não houve a impregnação da infraciliatura.

Nas preparações em que se utilizou a reação de Feulgen (Figuras 2D; 3C, D; 4D; 5B; 6B, D) nota-se que o objetivo da técnica, que é a evidenciação das estruturas nucleares, foi atingido sendo

possível a observação do macro e do micronúcleo. Até mesmo nos grandes entodiniomorfos os resultados foram bastante relevantes como os demonstrados em *Ostracodinium* sp. (Figura 6B, D).

Credita-se à conservação prolongada do material em formalina a dificuldade de se obter a completa hidrólise do citoplasma, observando-se, em muitos organismos, uma coloração discreta do mesmo, o que não é comum nesta técnica. Com o emprego da reação de Feulgen destacou-se ainda o hábito de predação de outros ciliados, aqui registrado para *Entodinium* sp. com outro organismo do mesmo gênero no interior de um fagossomo (Figura 3C) e resto de material nuclear de ciliado já digerido (Figura 3D). Graças à especificidade desta reação, pôde-se identificar como nucleares as estruturas observadas nestes fagossomos.

As placas esqueléticas dos organismos dos gêneros *Eremoplastron*, *Polyplastron*, *Diplodinium* e *Ostracodinium* foram evidenciadas em preparações provisórias com solução de Lugol (Figuras 7 e 8), uma vez que as técnicas empregadas não realçaram essas estruturas.

Apesar do longo tempo decorrido entre a obtenção das amostras e o emprego das técnicas de impregnação e de coloração, é possível a sua utilização. Ressalta-se ainda, a importância de se



FIGURA 7. Micrografias de *Polyplastron* sp., em solução de Lugol (A,B,C,D). Placas esqueléticas (setas). Barra = 10/ μ m.



FIGURA 8. Micrografias de *Eremoplastron* sp. (A), *Ostracodinium* sp. (B) e *Diploplastron* sp. (C,D), em solução de Lugol. Placas esqueléticas (setas). Barra = 10 μ m.

preparar lâminas permanentes que sirvam de material de referência para o estudo destes ciliados, sobretudo quando novas espécies são descritas, a despeito da possibilidade de se observar algumas de suas estruturas em preparações não coradas ou temporárias.

As duas técnicas empregadas evidenciaram particularmente bem as seguintes estruturas: núcleos (macro e micronúcleo), zonas de sincília, citofaringe, citoprocto e fagossoma.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, concluiu-se que:

1. Variações da dieta, características individuais dos hospedeiros e o momento de obtenção das amostras foram os fatores que influenciaram significativamente a população de ciliados;

2. A ocorrência dos gêneros dos ciliados foi influenciada pelos hospedeiros;

3. Organismos dos gêneros *Charonina* Strand, 1928, *Isotricha* Stein, 1859, *Dasytricha* Schuberg, 1888, *Entodinium* Stein, 1859,

Diplodinium Schuberg, 1888, *Eodinium* Kofoid & MacLennan, 1932, *Eremoplastron* Kofoid & MacLennan, 1932, *Polyplastron* Dogiel, 1927, *Diplosplastron* Kofoid & MacLennan, 1932 e *Ostracodinium* Dogiel, 1927 permaneceram na microbiota ruminal, associados a cada hospedeiro, durante todas as fases do experimento e foram influenciados quantitativamente pelas variações das dietas estudadas.

4. As técnicas de impregnação pelo proteinato de prata (Protargol) e da reação de Fuelgen podem ser utilizadas para preparações permanentes de ciliados do rúmem, mesmo quando fixados e conservados em formalina por, pelo menos, 18 meses.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M., H. SHIBUI, T. IRIKI & F. KUMENO. Relation between diet and protozoan population in the rumen. Br. J. Nutr., 29:197-202. 1973.

ABE, M., T. IRIKI, N. TOBE & H. SHIBUI. Sequestration of holotrich protozoa in the reticulo-rumen of cattle. Appl. Environ. Microbiol., 41:758-765, 1981.

ABOU AKKADA, A.R., E.E. BARTLEY & L.R. FINA. Ciliate protozoa in the rumen of the lactating cow. J. Dairy Sci., 52:1088-1091, 1969.

ANKRAH, P., S.C. LOERCH & B.A. DEHORITY. Sequestration migration and lysis of protozoa in the tureen. J. Gen. Microbiol., 136:1869-1875, 1990.

ARCURI, P.B., L.J.M. AROEIRA, M. D'AGOSTO, M.S. DAYRELL & M.E. CARNEIRO. Efeito do farelo-de-algodão na população de protozoários do rúmen de bovinos alimentados com cana mais 1% de uréia. ANAIS DA 28º - REUNIÃO ANUAL DA SBZ, João Pessoa, PB, 1991.

BECKER, E.L. & M. TALBOTT. The protozoan fauna of the rumen and reticulum of american cattle. Iowa State J. Sci., 1:345-373, 1927.

BIRD, S.H. & R.A. LENG. The effects of defaunation of the rumen on the growth of cattle on low protein high energy diets. Br. J. Nutr., 40:163-167, 1978.

BODIAN, D. A new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffin sections. Anat. Rec., 65:89-97, 1936.

BODIAN, D. The staining of paraffin sections of nervous tissue with activated protargol. The role of fixatives. *Anat. Rec.*, 69:153-162, 1937.

BONHOMME-FLORENTIN, A. Contribution a L'étude de la physiologie des ciliés entodiniomorphes endocommensaux de ruminants et des équidés. *Ann. Sci. Nat. Zool.*, 16:221-284, 1974.

BONHOMME-FLORENTIN, A. Importance et valeur nutritive pour leur hôte des populations ciliaires et bactériennes du rumen. *Ann. Biol.*, 14:193-225, 1975.

BONHOMME-FLORENTIN, A., J. BLANCOU & C. LATTEUR. Étude des variations saisonnières de la microfaune du rumen de zébus. *Protistologica.*, 14:283-289, 1978.

BRANDO, M.A.N. & M. D'AGOSTO. Evaluation of ciliate in bovine rumen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88:315, 1993.

CAMPBELL, A.S. The structure of *Isotricha prostoma*. *Arch. Protist.*, 66:331. 1929.

CARNEIRO, M.E., C.M.M. NETTO, M. D'AGOSTO & P.B. ARCURI.

Ciliados do rúmen de bovinos mantidos com diferentes dietas. XII CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ZOOLOGIA, Belém, PA. Resumo 599:144, 1992.

CHARDEZ, D. Sur la variabilité de deux espèces d'Ophryoscolecidae (Ciliophora, Entodiniomorphidae). Bull Rech. Agron. Gembloux, 18:257-264, 1983.

CHATTON, E. & A. LWOFF. Impregnation par diffusion argentique de l'infaciliature de ciliés marins et d'eau douce, aprons fixation cytologique et sans dessication. C.R. Soc. Biol., 104:834-836, 1930.

CHRISTIANSEN, W.C., W. DOODS & W. BURROUGHS. Ration characteristics influencing rumen protozoal population. J. Anita. Sci., 23:984-988, 1964.

CLARKE, R.T.J. Ciliates of the rumen of domestic cattle (*Bos taurus* L.). N.Z.S. Agric. Res., 7:248-257, 1964.

- CLARKE, R.T.J. Diurnal variations in the number of ciliate protozoa in cattle. N.Z.J. Agric. Res., 7:248-257, 1965.
- COLEMAN, G.S. Rumen Ciliate Protozoa. Advances in Parasitology, Academic Press, London, 18:121-173, 1980.
- CORLISS, J.O. The Ciliated Protozoa. Characterization, Classification and Guide to the literature. Pergamon Press, New York, 455 p., 1979.
- CORLISS, J.O. An interim utilitarian ("user-friendly") hierarchical classification and characterization of the protists. Acta Protozool., 33:1-51, 1994.
- CRAWLEY, H. Evolution in the ciliate family Ophryoscolecidae. Proc. Acad. Nat. Sci, 75:393-412, 1923.
- CUNHA, A.M. da. Sobre os ciliados intestinais dos mamíferos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 7:139-145, 1914.

CZERKAWSKI, J.W. An Introduction to Rumen Studies. Pergamon Press, 236 p., 1986.

D'AGOSTO, M., P.B. ARCURI & M.E. CARNEIRO. Ciliates in the rumen of steers fed sugar cane based diets. Mere. Inst. Oswaldo Cruz, 85:132, 1990.

D'AGOSTO, M. & M.R. SANTA ROSA. Effects of diet and host on the rumen ciliate populations. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 88:315, 1993.

D'AGOSTO, M. & M.R. SANTA ROSA. Aspectos morfológicos de ciliados de rúmen (Entodiniomorphida, Ophryoscolecidae) revelados pelas técnicas do protargol e da reação de Feulgen. Revta bras. Zool., 11:215-225, 1994.

DAS-GUPTA, M. Preliminary observations on the protozoan fauna of the rumen of the Indian goat, *Capra hircus* Linn. Arch. Protist., 85:153-172, 1935.

DEHORITY, B.A. Occurrence of the ciliate protozoa *Butschlia parva* Schuberg in the rumen of the ovine. *Appl. Microbiol.*, 79:179-181, 1970.

DEHORITY, B.A. Rumen ciliate fauna of Alaskan Moose (*Aloes americana*), Musk-Ox (*Ovibos moschatus*) and Dall Mountain Sheep (*Ovis dalli*). *J. Protozool.*, 21:26-32, 1974.

DEHORITY, B.A. Specificity of rumen ciliate Protozoa in cattle and sheep. *J. Protozool.*, 25:509-513, 1978.

DEHORITY, B.A. Ciliate Protozoa in the Rumen of Brazilian Water Buffalo, *Bubalus bubalis* Linnaeus. *J. Protozool.*, 26: 536-544, 1979.

DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen Protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48:182-185, 1984.

DEHORITY, B.A. Rumen ciliates of Musk-Oxen (*Ovibos moschatus* Z.) from the Canadian Arctic. *J. Protozool.*, 32:246-250, 1985.

DEHORITY, B.A. Protozoa of the digestive tract of herbivorous mammals. *Insect Sci. Applic.*, 7:279-296, 1986.

DEHORITY, B.A. Rumen ciliate fauna of some brazilian cattle: occurence of several ciliates new to the rumen, including the cycloposthid *Parentodinium africanum*. *J. Protozool.*, 33:416-421, 1986.

DEHORITY, B.A. Rumen Ophryoscolecoid Protozoa in the hindgut of the Capaybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *J. Protozool.*, 34(2):143-145, 1987.

DEHORITY, B.A., W.S. DAMRON & J.B. McLAREN. Occurrence of the rumen ciliate *Oligoisotricha bubali* in domestic cattle (*Bos taurus*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(4):1394-1397, 1983.

DEHORITY, B.A. & J.R. MALES. Rumen fluid osmolality: evaluation of its influence upon the occurrence and numbers of holotrich protozoa in sheep. *J. An. Sci.*, 38:865-870, 1974.

DEHORITY, B.A. & W.R.S. MATTOS. Diurnal changes and effect of ration on concentrations of the rumen ciliate *Charon ventriculi*. Appl. Environ. Microbiol., 36:953-958, 1978.

DEHORITY, B.A. & D.B. PURSER. Factors affecting the establishment and numbers of holotrich protozoa in the ovine rumen. J. An. Sci., 30:445-449, 1970.

DEHORITY, B.A. & P.A. TIRABASSO. Factors affecting the migration and sequestration of rumen protozoa in the family Isotrichidae. J. Gen. Microbiol., 135:539-548, 1989.

DOGIEL, V. Une nouvelle espèce du genre *Blepharocarys*, *B. bovis* n. sp. habitant l'estomac du boeuf. Ann. Parasitol., 4:61, 1926.

DOGIEL, V.A. Monographie der Familie Ophryoscolecidae. Arch. Protistenkd, 59:1-288, 1927.

DOGIEL, V.A. La faune d'infusoires habitant l'estomac du buffle et du dromadaire. Ann. Parasitol., 6:323-338, 1928.

EADIE, M. The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. J. Gen. Microbiol, 29:563-578, 1962a.

EADIE, M. Inter-relationships between certain rumen ciliate protozoa. J. Gen. Microbiol., 29:579-588, 1962b.

EADIE, M. Studies on the ecology of certain rumen ciliate protozoa. J. Gen. Microbiol., 49:175-194, 1967.

EADIE, M. A study of variation in size in the rumen ciliate protozoa *Polyplastron multivesiculatum* (Dogiel et Fedorowa) and *Eudiplodinium maggii* (Forentini). Protistologica, 15:293-305, 1979.

FERNANDEZ-GALIANO, D. La infraciliación en *Polyplastron multivesiculatum* y su genesis durante la division del ciliado. Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Secc. Biol.), 56:89-108, 1958.

FEULGEN, R. Die nuclealfarburg abderharden's. Haudb. Biol. Arbests, meth Abt, 5:1055, 1926.

FFOULKES, D. & R.A. LENG. Dynamics of protozoa in the rumen of cattle. Br. J. Nutr., 59:429-436, 1988.

FOISSNER, W. Basic igh and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliate protozoa. Europ. J. Protistol., 27:313-330, 1991.

FONTY, G., P. GOEUT, J.P. JOUANY & J. SENAUD. Ecological factors determining establishment of cellulolytic bacteria and protozoa in the rumens of meroxenic lambs. J. Gen. Microbiol., 129:213-223, 1983.

FRANKEL, J. & K. HECKMAN. A simplified Chatton-Lwoff silver impregnation proceding for use in experimental studies with ciliates. Trans. Amer. Microsc. Sci., 87:317-321, 1968.

GROLIERE, C.A., J. SENAUD, J.P. JOUANY, J. GRAIN & P. de PUYTORAC. Implantation et développement des populations de protozoaires ciliés (*Polyplastron multivesiculatum*, *Entodinium* sp., *Isotricha prostoma*) dans le rumen de moutons recevant différents régimes alimentaires II. Régimes à base de foin, enrichis en céréales. *Protistologia*, 16: 385-394, 1980.

GRUBY, D. & O. DELAFOND. Recherches sur des animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans les intestins, pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 17:1304-1308, 1843.

GUTIERREZ, J. Experiments on the culture and physiology of holotrichs from the bovine rumen. *Biochem. J.*, 60:517-522, 1955.

HOBSON, P.N. & R.J. WALLACE. Microbial ecology and activities in the rumen: Part 1. *Cer. Crit. Rev. Microbiol.*, 165-225, 1982.

HUNGATE, R.E. The rumen and its microbes. Academic Press Inc., London, 533 p., 1966.

HUNGATE, R.E. The rumen protozoa, p. 655-695. In: J.P. KREIER (ed.). Parasitic Protozoa. Vol. 2. Academic Press. Inc., London, 1978.

HUNGATE, R.E., J. REICHL & R.A. PRINS. Parameters of rumen fermentation in a continuously fed sheep: evidence of a microbial rumination pool. Appl. Microbiol., 22:1104-1113, 1971.

IMAI, S. New rumen ciliates, *Polymorphella bovis* sp. n. and *Entodinium longinucleatum* forma *spinolobum* f. n., from the zebu cattle in Thailand. Jpn. J. Vet Sci., 46:391-395, 1984.

IMAI, S. Rumen ciliate protozoal faunae of Bali cattle (*Bos javanicus* domesticus) and waterbuffalo (*Bubalus bubalus*) in Indonesia, with the description of *Entodinium javanicum* new species. Zool. Sci., 2:591-600, 1985.

IMAI, S. Ciliate protozoa in the rumen of Kenyan zebu cattle, *Bos taurus indicus*, with the description of four new species. J. Protozool., 35:130-136, 1988.

IMAI, S. & K. OGIMOTO. Parabundleia ruminantium gen. n., sp. n., Diplodimum mahidoli sp. n. with two formae, and Entodinium parvum forma monospinosum forma n. from the zebu cattle (Bos indicus L., 1758) in Thailand. *jpn. J. Vet. Sci.*, 45:585-591, 1983.

IMAI, S., S.S. HAN, K.S. CHENG & H. KUDO. Composition of the rumen ciliate population in experimental herds of cattle and sheep in Lethbridge, Alberta, Western Canada. *Can. J. Microbiol.*, 35:686-690, 1989.

JAMESON, A.P. A new ciliate, Charon ventriculi n. g., n. sp. from the stomachs of ruminants. *Parasitology*, 17:403-405, 1925.

JOUANY, J.P. Defaunation of the rumen. In: *Indian Summer (Course on Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion. Vol. 2. Clermon-Ferrand/Theix, France., 1990.*

JOUANY, J.P., D.I. DEMEYER & J. GRAIN. Effect of defaunating the rumen. *Anim. feed Sci. Technol.*, 21:229-265, 1988.

KAYOULI, C., K. USHIDA, S. DE SMET, J.P. JOUANY & D.F. DEMEYER.

Effect of rumen ciliate protozoa on the degradation of wheat and lucine straw in sacco. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 28:87-88, 1988.

KLEIN, B.M. The "dry" silver method and its proper use. *J. Protozool.*, 5:99-103, 1958.

KOFOID, C.A. & J.F. CHRISTENSON. Ciliates from *Bos gaurus*. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 39:341-391, 1934.

KOFOID, C.A. & R.F. MacLENNAN. Ciliates from *Bos indicus* Linn. I. The genus *Entodinium* Stein. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 33:471-544, 1930.

KOFOID, C.A. & R.F. MacLENNAN. Ciliates from *Bos indicus* Linn. II. A revision of *Diplodinium* Schuberg. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 37:53-152, 1932.

KOFOID, C.A. & R.F. MacLENNAN. Ciliates from *Bos indicus* Linn. III, *Epidinium* Crawley, *Epiplastron* gen. nov., and *Ophryoscolex* Stein. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 39:1-34, 1933.

KRASCHENIMIKOW, S. Observations on the morphology and division of *Eudiplodinium neguctum*, etc. J. Protozool., 2: 124, 1955.

LATTEUR, B. Contributions à la systématique de la Famille des Ophryoscolecidae Stein. Ann. Soc. R. Zool., Belg., 96:117-144, 1966.

LATTEUR, B. Revision systematique de la Famille des Ophryoscolecidae Stein, 1958. Sous famille des Entodiniinae Lubinsky, 1957. Genre *Entodinium* Stein, 1958. Ann. Zool. Belg., 99:1-41, 1968.

LATTEUR, B. Revision systematique de la Famille des Ophryoscolecidae Stein, 1958. Sous famille des Entodiniinae Lubinsky, 1957. Genre *Entodinium* Stein, 1958. Ann. Zool. Belg., 99:3-23, 1969.

LATTEUR. B. Revision systematique de la famille des Ophryoscolecidae Stein, 1958. Sous famille des Diplodiniinae Lunbinsky, 1957. Genre *Diplodinium* (Schuberg, 1888) sensu novo. Ann. Soc. R. Zool. Belg., 100:275-312, 1970.

LATTEUR, B. & E. SULTEN. Contribution à L'étude de la spécificité écologique des ciliés Ophryoscolecides. Acta Zool. Pathol. Antverpiensia, 5-5:41-54, 1972.

LENG, R.A., D. DELLOW & G. WAGHORN. Dynamics of large ciliate protozoa in the rumen of cattle fed on diets of freshly cut grass. Br. J. Nutr., 56:455-462, 1986.

LENG, R.A., M. GILL, T.J. KEMPTON, J.B. ROWE, J.V. NOLAN, S.J. STACHIW & T.R. PRESTON. Kinetics of large ciliate protozoa in the rumen of cattle given sugar cane diets. Br. J. Nutr., 46:371-384, 1981.

LUBINSKY, G. Studies on the evolution of the Ophryoscolecidae (Ciliata: Oligotricha). I. A new species of Entodinium with "caudatum", "loboso-spinosum", and "dubardi" forms, and some evolutionary trends in the genus Entodinium. Can. J. Zool., 35:111-133, 1957a.

LUBINSKY, G. Studies on the evolution of the Ophryoscolecidae (Ciliata: Oligotricha). II. On the origin of the higher Ophryoscolecidae. Can. J. Zool., 35:15-140, 1957b.

LUBINSKY, G. Studies on the evolution of the Ophryoscolecidae (Ciliata: Oligotricha). III. Phylogeny of the Ophryoscolecidae based on their comparative morphology. Can. J. Zool., 35:141-159, 1957c.

LUBINSKY, G. Note on the phylogenetic significance of predatory habits in the Ophryoscolecidae (Ciliata: Oligotricha). Can. J. Zool., 35:577-580, 1957d.

LUBINSKY, G. Ophryoscolecidae (Ciliata: Entodiniomorphida) of reindeer (*Rangifer tarandus* L.) from the Canadian Arctic. I. Entodiniinae. Can. J. Zool., 36:819-835, 1958a.

LUBINSKY, G. Ophryoscolecidae (Ciliata: Entodiniomorphida) of reindeer (*Rangifer tarandus* L.) from the Canadian Arctic. II. Diplodiinae. Can. J. Zool., 36:937-959, 1958b.

LUBINSKY, G. Ophryoscolecidae of a guanaco from the Wiinipeg Zoo.

Can. J. Zool., 42:159, 1964.

METZGER, V.L., R.J. BAKER, D.J. SCHINGOETHE. Responses of rumen microflora to high-concentrate low-roughage diets containing whey products. J. Dairy Sci., 59:1 769-1775, 1976.

MURPHY, M.R., P.F. DRONE Jr. & S.T. WOODFORD. Factors stimulating migration of holotrich protozoa into the rumen. Appl. Environ. Microbiol., 49:1329-1331, 1985.

NAGARAJA, T.G., G. TOWNE & A.A. BEHARKA. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a high-grain diet. Appl. Environ. Microbiol., 58:2410-2414, 1992.

NAKAMURA, K. & J. KANEGASAKI. Densities of ruminal protozoa of sheep established under different dietary conditions. J. Dairy Sci., 52:250-255, 1969.

NOGUEIRA FILHO, J.C.M., M.E.M. OLIVEIRA, J.S.H. VEIGA & C.S. LUCCHI. Observações pertinentes à instalação da fauna de protozoários ciliados no rumen de bezerros de raça Holandesa (*Bos taurus* L.), criados em Pindamonhangaba, SP, Brasil. Rec. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 20:177-182, 1983.

NOGUEIRA FILHO, J.C.M., M.E.M. OLIVEIRA, J.S.M. VEIGA & C.S. LUCCHI. Cronologia do aparecimento de protozoários ciliados no rúmen de bezerros do tipo "Mantiqueira" (*Bos taurus* L.), na região do Vale do Rio Paraíba, SP. Rev. fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 21:119-123, 1984.

NOIROT-TIMOTHÉE, C. Etude d'une famille de ciliés: les Ophryoscolecidae. Structures et ultrastructures. Ann. Sci, Nat. Zool. Biol. Anita., 2:527-718, 1960.

NOUZARÈDE, M. L'infestation infusorienne des ruminants. Arch. de Zool. Exp. et Gén., 105:155-167, 1965.

OGIMOTO, K. S. IMAI. Atlas of Rumen Microbiology. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, viii + 231 pp., 1981.

OLIVEIRA, D.B. Estudo do suco ruminal de bovinos criados em regime extensivo de pastagem (*Brachiaria decumbens*) no município de Botucatu SP. Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP/Campus de Botucatu, 42 pp., 1991.

OLIVEIRA, M.E.M. de, J.C.M. NOGUEIRA FILHO, C. de S. LUCCHI & C.G. de LIMA. Desenvolvimento de população de protozoários ciliados no rúmen de ovinos (*Ovis aries* L.) criados em Itapetininga, São Paulo. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 24:225-232, 1987.

OLIVEIRA, M.E.M. de, J.C.M. NOGUEIRA FILHO & C.S. LUCCHI. Observações sobre o comportamento de populações de protozoários ciliados do rúmen de caprinos (*Capra hircus* L.) criados em Itapetininga, São Paulo. Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 26:15-20, 1989.

ORPIN, C.G. & S.D. MATHIESEN. *Microcetus lappus* gen. nov., sp. nov.: new species of ciliated protozoan from the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol., 52:527-530, 1986.

OXFORD, A.E. Rumen ciliate protozoa: their chemical composition, metabolism, requirements for maintenance and physiological significance for their host. *Exp. Parasitol.*, 4:569-605, 1955.

POTTER, E.L. & B.A. DEHORITY. Effects of changes in feed level, starvation, and level of feed after starvation upon the concentration of rumen protozoa in the ovine. *Appl. Microbiol.*, 26:692-698, 1973.

PRINS, R.A. Rumen ciliate populations in fistulated cows. *Vet. Bull.*, 50:306, 1980.

PURSER, D.B. A diurnal cycle for holotrich protozoa of the rumen. *Nature*, 190:831-832, 1961.

PURSER, D.B. & R.J. MOIR. Ruminal flora studies in sheep. IX. The effect of pH on the ciliate population of the rumen in vivo. *Aust. J. Agric. Res.*, 10:555-564, 1959.

PURSER, D.B. & R.J. MOIR. Variations in rumen volume and associated effects as factors influencing metabolism and protozoa concentration in the rumen of sheep. J. Anita. Sci., 25:516-520, 1966.

PUYTORAC, P. de, J. GRAIN & J.P. MIGNOT. Précis de Protistologie. Société Nouvelle des Editions Boubée. Paris. 581 pp, 1987.

PUYTORAC, P. de, A. BATISSE, G. DEROUX, FLEURY, J. GRAIN, M. LAVAL-PEUTO & M. TUFFRAU. Proposition d'une nouvelle classification du phylum des protozoaires Ciliophora Doflein, 1901. C.R. Acad. Sci. Paris, 316:716-720, 1993.

RYLE, M. & E.R. ORSKOV. Rumen ciliates and tropical feeds. World An. Rev., 64:21-30, 1987.

SENAUD, J., J. BOHATIER & J. GRAIN. Comparaisons du comportement alimentaire de 2 protozoaires ciliés du rumen, *Epidinium caudatum*, *Polyplastron multivesiculatum*: mecanismes d'ingestion et de digestion, Reprod. Nutr. Dévelop., 26:287-289, 1986.

SENAUD, J., C.A. GROLIERE, B. ZAINAB, J. GRAIN & J.P. JOUANY.

Implantation et developpement des populations de protozoaires ciliés (*Polyplastron multivesiculatum*, *Entodinium* sp., *Isotricha prostoma*) dans le rumen de moutons recevant différents régimes alimentaires I. Régime Luzerne-Orge (40/50). *Protistologica*, 16:329-337, 1980.

TOWNE, G. & T.G. NAGARAJA. Occurrence and diurnal population fluctuations of the ruminal protozoan *Microcetus lappus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:91-94, 1989.

TOWNE, G. & T.G. NAGARAJA. Omasal ciliate protozoa in cattle, bison, and sheep. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:409-412, 1990.

TOWNE, G., T.G. NAGARAJA & K.E. KEMP. Ruminal ciliate in bison. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2733-2736, 1988.

TOWNE, G., T.G. NAGARAJA, R.T. BRANDT Jr. & K.E. KEMP. Dynamics of ruminal ciliated protozoa in feedlot cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:31 74-31 78, 1990.

- TUFFRAU, M. Quelques variantes techniques de l'impregnation des ciliés par le protéinate d'argent. Arch. Zool. Exp., 104:186-190, 1964.
- TUFFRAU, M. Perfectionnement et pratique de la technique d'impregnation au Protargol des infusoires ciliés. Protistologica, 3:91-98, 1967.
- USHIDA, K., A. MIYAZAKI & R. KAWASHIMA. Effect of defaunation on ruminal gas and VFA production in vitro. Japanese J. Zootech. Sci., 57: 71-77, 1986.
- VALDEZ, R.E., F.J. ALVAREZ, H.M. FERREIRO, F. GUERRA, J. LOPEZ, A. PRIEGO, T.H. BLACKBURN, R.A. LENG & T.R. PRESTON. Rumen function in cattle given sugar cane. Trop. An. Prod., 2:260-272, 1977.
- VAN HOVEN, W. Rumen ciliates of the tsessebe (*Damaliscus lunatus lunatus*) in South Africa. J. Protozool., 22:457-462, 1975.

VAN HOVEN, W. Rumen ciliates with description of two new species from three African reedbuck species. J. Protozool., 30:688-691, 1983.

VASHISHTA, M.S. Relations of ruminal protozoal numbers to per cent dry matter of pH in cattle. Indian J. Anim. Hlth., 15:51, 1976.

WARNER, A.C.I. Some factors influencing the rumen microbial population. J. Gen. Microbiol., 28:129-146, 1962.

WARNER, A.C.I. Diurnal changes in the concentration of microorganisms in the rumens of sheep fed limited diets daily. J. Gen. Microbiol., 45:213-235, 1966a.

WARNER, A.C.I. Periodic changes in the concentrations of microorganisms in the rumen of a sheep fed a limited ration every three hours. J. Gen. Microbiol., 45:237-241, 1966b.

WARNER, A.C.I. Diurnal changes in the concentrations of microorganisms in the rumens of sheep fed to appetite in jum or at pasture. J. Gen. Microbiol., 45:243-251, 1966c.

WERTHEIM, P. A new ciliate, *Entodinium bovis* sp. n. from the stomach of *Bos taurus* L. with the revision of *Entodinium exiguum*, *E. nanellum*, *E. simplex*, *E. dubardi* and *E. parvum*. Parasitology, 27:226-230, 1935.

WILLIAMS, A. Rumen holotrich ciliate protozoa. Microbiol. Rev., 50:25-49, 1986.

WILLIAMS, A.G. & G.S. COLEMAN. The Rumen Protozoa. Springer-Verlag, 113 figs., 115 tab. New York Inc, 423 p., 1991.

WILLIAMS, A.G., K.N. JOBLIN, R.D. BUTLER, G. FONTY & R. BERNALIER. Interactions Bactéries - Protiste dans le Rumen. Ann. Biol, 32:14-29, 1993.

YANG, C.M.J. & G.A. VARGA. Effect of three concentrate feeding frequencies on rumen protozoa, rumen digesta kinetics, and milk yield in dairy cows. J. Dairy Sci., 72:950-957, 1989a.

YANG, C.M.J. & G.A. VARGA. Effect of sampling site on protozoa and fermentation end products in the rumen of dairy cows. J. Dairy Sci., 72:1492-1498, 1989b.

ZIELYK, M.W. Ophryoscolecoid fauna from the stomach of the white tailed deer (*Odocoileus virginianus borealis*), and observations on the division of *Entodinium dubardi* Buisson 1923 (Ciliata, Entodiniomorpha). J. Protozool., 8:33-41, 1961.