

## Protozoários ciliados do rúmen de ovinos mestiços mantidos em pastagem natural de caatinga

*Rumen ciliated protozoa of crossbred sheep kept in natural pasture of caatinga*

MARTINELE, Isabel<sup>1</sup>; SANTOS, Gladston Rafael de Arruda<sup>2</sup>; MATOS, Daniele da Silva<sup>3</sup>; BATISTA, Ângela Maria Vieira<sup>3</sup>; D'AGOSTO, Marta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zoologia, UFJF, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup>Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Bongi, Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia, UFRP, Maceió, Pernambuco, Brasil.

\* Endereço para correspondência: isabelmartinele@yahoo.com.br

### RESUMO

Foram avaliados os efeitos do tempo de amostragem e do pH ruminal sobre a concentração de protozoários ciliados no rúmen de cinco ovinos mestiços Santa Inês, fistulados no rúmen, mantidos extensivamente em pastagem natural de caatinga no município de Sertânia, PE. As amostras de conteúdo ruminal foram obtidas nos seguintes horários: zero hora (antes dos animais serem soltos na pastagem, às 7:00h) e 2, 4, 6, 8 e 10 horas depois de iniciado o pastejo. As amostras obtidas foram fixadas em formalina 18,5% (v/v). Foram identificados e quantificados organismos dos gêneros *Dasytricha*, *Diplodinium*, *Diploplastron*, *Entodinium*, *Eodinium*, *Elytroplastron*, *Enoploplastron*, *Epidinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Isotricha*, *Metadinium* e *Ophryoscolex*, sendo que, desses, apenas *Diploplastron* e *Entodinium* apresentaram variações na concentração de suas populações em função do horário de amostragem. O número de ciliados em divisão não apresentou correlação com o horário de amostragem, sendo que a estabilidade das taxas de divisão parece contribuir para a manutenção das concentrações dos ciliados no rúmen. O pH ruminal não apresentou correlação com o número de protozoários, provavelmente, porque as variações observadas compreenderam valores considerados limítrofes para o estabelecimento e manutenção das populações de protozoários no rúmen.

Palavras-chave: *Entodinium*, pH ruminal, semi-árido, variações diurnas

### SUMMARY

Effects of the sampling time and ruminal pH on the concentration of ciliate protozoa in the rumen of five fistulated Santa Inez crossbred sheep, reared in natural caatinga (scrubland) pasture were evaluated. Ruminal content samples were obtained at zero hour (before the animals were released to the pasture, at 7:00h) and 2, 4, 6, 8 and 10 hours thereafter. Samples were fixed in formalin at 18.5% (v/v). It was identified and quantified organisms of the genera *Dasytricha*, *Diplodinium*, *Diploplastron*, *Entodinium*, *Eodinium*, *Elytroplastron*, *Enoploplastron*, *Epidinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Isotricha*, *Metadinium* and *Ophryoscolex*. Among them, only *Diploplastron* and *Entodinium* presented variations at their population concentrations in function of the sampling time. The number of ciliates undergoing division was not correlated with the sampling times. Stable division rate seemed to contribute the maintenance of ciliates concentrations in the rumen. Ruminal pH was negatively correlated with sampling time, and was not correlated with the number of protozoa, probably because the variations observed included parameters considered ideal for establishment and maintenance protozoa populations of rumen.

Key words: diurnal changes, *Entodinium*; ruminal pH; semi-arid

## INTRODUÇÃO

A evolução do trato gastrointestinal nos ruminantes desencadeou o desenvolvimento de uma relação simbiótica mutualística com protozoários ciliados, que, junto às bactérias, aos fungos e protozoários flagelados, compõem a microbiota ruminal (MACKIE, 2002). Entretanto, não é clara a relação de custos e benefícios estabelecida entre esses microorganismos e seus hospedeiros, devido principalmente à complexa dinâmica populacional desses organismos, bem como às diferenças morfofisiológicas apresentadas pelas espécies de ciliados e seus hospedeiros.

Estudos realizados com ovinos, bovinos e bubalinos apontam para a existência de variações diurnas na concentração dos protozoários ciliados no rúmen. Warner (1962) atribuiu essas variações ao tempo decorrido após a alimentação, período de inanição, taxa de divisão dos ciliados, hospedeiro e natureza da dieta. Em estudos posteriores, verificou-se maior influência da taxa de divisão dos ciliados, variável conforme as espécies (MICHALOWSKI, 1977; WARNER 1966a, b, c), e da taxa de diluição do conteúdo ruminal que ocorre devido à ingestão de alimento, água ou salivação (WARNER, 1966c; MICHALOWSKI, 1977). Outro fator promotor de alterações na concentração de protozoários no rúmen é o comportamento de escape ao retículo, apresentado por ciliados Isotrichidae durante períodos de restrição alimentar (D'AGOSTO et al., 2001; MARTINELE et al., 2007; SÁLVIO & D'AGOSTO, 1999).

Nogueira-Filho et al. (1998) ressaltaram diferenças quanto à capacidade de aproveitamento das frações de fibras e proteínas dos alimentos conforme a espécie de ruminante, visto que as alterações quantitativas que ocorrem nas concentrações dos diversos gêneros de protozoários ciliados no rúmen, em função do tempo decorrido após cada refeição,

podem estar associadas ao maior ou menor aproveitamento de determinado alimento pelas diferentes espécies de ruminantes.

O pH ruminal apresenta variações ao longo do dia em decorrência da natureza da dieta, sendo outro fator capaz de promover alterações nas populações de protozoários ciliados, tornando-se inclusive limitante para o estabelecimento e manutenção desses microorganismos no rúmen (COALHO et al., 2003). O pH ruminal também pode variar por conta de diferenças individuais na taxa de ingestão alimentar. Desse modo, uma alta taxa de ingestão alimentar eleva a produção de saliva, que, pelo seu efeito tamponante, mantém estável o pH ruminal (FRANZOLIN & DEHORITY, 1996).

Sob condições normais, o pH ruminal apresenta valores médios em torno de 5,5 a 7,0, atingindo valores mínimos, geralmente, de duas a seis horas após a alimentação, o que corresponde ao pico de produção de ácidos resultantes da atividade fermentativa, a qual desencadeia decréscimo na concentração de protozoários (DEHORITY, 2003). De acordo com Oliveira et al. (1987), a concentração de ciliados no rúmen de ovinos mantidos em pastagem tende a se tornar estável com pH em torno de 6,9.

Objetiva-se, com este trabalho, identificar e quantificar os protozoários ciliados no rúmen de ovinos, verificando-se possíveis variações nas suas populações ao longo do dia e sua relação com o pH ruminal e com o número de ciliados em divisão.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Centro de Treinamento em Caprino-Ovinocultura, pertencente à Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA, localizado em Sertânia, PE. As coletas foram realizadas em julho de 2005 e janeiro de 2006, meses que estão incluídos em períodos que compreendem,

respectivamente, as estações chuvosa e seca. A análise laboratorial foi desenvolvida no Laboratório de Protozoologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG. Foram utilizados cinco ovinos mestiços Santa Inês, machos, castrados, com idade entre 10-12 meses, peso médio de 25Kg, fistulados no rúmen e mantidos em regime de criação extensiva em pastagem de caatinga, cuja área foi de 37 ha (Latitude 8°03'38" S e Longitude 37°13'32" W). Os animais permaneceram na pastagem entre os meses de setembro de 2004 e janeiro de 2006, junto de outros cinco animais (3,08 ha/animal). Não foi fornecido nenhum tipo de suplementação, sendo a dieta composta exclusivamente pela vegetação disponível na pastagem e oferecidos apenas sal mineral e água *ad libitum*. Os ovinos tinham acesso à pastagem durante o período das 7:00 às 17:00 horas e eram recolhidos ao aprisco após as 17:00 horas para o período de pernoite.

Foram realizadas, no máximo, duas coletas de conteúdo ruminal por dia de forma a se atenuar os efeitos sobre o tempo de forrageamento dos animais, visto que esses eram trazidos ao aprisco para a realização da coleta. Os horários das coletas seguiram o tempo de soltura dos animais, sendo a primeira realizada antes de se soltar os animais, às 7:00 horas, e as demais às duas, quatro, seis, oito e dez horas após o animal estar em campo. Coletaram-se amostras de conteúdo ruminal de forma manual para cada animal em cada um dos horários de amostragem, perfazendo-se um total de 30 amostras coletadas durante o mês de julho de 2005, e 24 em janeiro de 2006. A diferença no número de amostras entre a estação chuvosa e seca ocorreu em virtude da morte de um dos animais do grupo experimental durante a segunda fase de coleta. O pH ruminal foi determinado imediatamente após a coleta, utilizando-se potenciômetro digital.

Cada amostra consistiu em 20mL de conteúdo ruminal, sendo imediatamente fixada em formol na proporção de 1:2 (DEHORITY, 1984) e armazenada em frascos plásticos. A identificação e a quantificação dos gêneros de ciliados foi feita em câmara Sedgewick-Rafter, segundo Dehority (1984), sendo que de cada amostra homogeneizada foi pipetado 1mL de conteúdo que foi transferido para tubos de ensaio, onde foram acrescentadas três gotas de lugol, em substituição ao verde brilhante, conforme a modificação proposta por D'agosto & Carneiro (1999). Após 15 minutos, o conteúdo recebia a adição de 9mL de glicerina a 30%. Para se proceder à quantificação de cada tubo de ensaio, foi pipetado 1mL do conteúdo para preenchimento da câmara de Sedgewick-Rafter. Utilizando-se uma grade de contagem em uma das oculares, foram quantificados os ciliados presentes em 50 campos e, posteriormente, após rotação da câmara em 180°, mais 50 campos. O cálculo do número total de ciliados por mililitro de conteúdo foi feito multiplicando-se os valores encontrados por 80 e por 20. Tais valores correspondem à superfície total da câmara de contagem e à diluição (DEHORITY, 1984). A quantificação dos protozoários ciliados em processo de reprodução seguiu a técnica descrita anteriormente. A identificação dos ciliados baseou-se em Ogimoto & Imai (1981).

O número médio de cada gênero de ciliado, o número médio total de ciliados e o pH ruminal foram comparados entre os horários de amostragem, em ambas estações, utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls ( $P < 0,05$ ). O teste de Pearson ( $P < 0,05$ ) foi utilizado para se verificar a correlação entre o pH ruminal e o número de ciliados, sendo o número de ciliados em cada análise correspondente a gênero, número total e número de ciliados em divisão. Os valores do pH ruminal foram comparados entre as estações pelo teste t de Student ( $P < 0,05$ ). O programa estatístico utilizado foi o BIOEST 2.0 (AYRES et al., 2000).

## RESULTADOS

Foram identificados e quantificados organismos de 13 gêneros: *Dasytricha*, *Diplodinium*, *Diploplastron*, *Entodinium*, *Eodinium*, *Elytroplastron*, *Enoploplastron*, *Epidinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Isotricha*, *Metadinium* e *Ophryoscolex*.

Durante a estação chuvosa (Tabela 1), somente o gênero *Diploplastron* apresentou alteração em sua concentração ao longo do dia, apresentando maior densidade populacional ( $P < 0,05$ ), seis horas após a soltura dos animais. A concentração dos demais gêneros e o número total de protozoários mantiveram-se constantes ao longo do dia ( $P > 0,05$ ). Na estação seca (Tabela 2), apenas organismos do gênero *Entodinium* e o número médio total de ciliados apresentaram alteração na densidade populacional, tendo em vista a maior concentração desses organismos antes dos animais serem soltos ao pasto, seguida por um significativo decréscimo na concentração de ciliados ( $P < 0,05$ ), após a soltura dos animais, a qual se manteve constante ao longo do dia.

Verificaram-se variações individuais na concentração de protozoários ciliados quando foram comparados entre os animais, em ambas as estações (Tabelas 3 e 4).

O pH ruminal variou significativamente ( $P < 0,05$ ) entre os horários, em ambas estações, sendo maior antes de se iniciar o pastejo e seis horas após os animais estarem no pasto (T6) durante a estação chuvosa e maior antes de se iniciar o pastejo durante a estação seca (Tabela 5). Variações do pH ruminal entre os animais não foram significativas em nenhuma das

estações ( $P > 0,05$ ) (Tabela 5). A média do pH ruminal dos animais entre os horários de coleta manteve valores entre  $6,37 \pm 0,22$  a  $6,99 \pm 0,22$ , durante a estação chuvosa, e  $6,17 \pm 0,12$  a  $7,27 \pm 0,27$ , durante a estação seca. Quando comparados os valores médios do pH ruminal de cada horário de coleta entre as estações chuvosa e seca. Observa-se maior valor médio do pH ruminal as duas, quatro e seis horas depois de iniciado o pastejo durante a estação chuvosa em relação à estação seca.

O processo de reprodução observado e quantificado entre os gêneros de protozoários ciliados foi o assexuado, ou seja, por fissão binária transversal homotetogênica. Não foram observados ciliados se reproduzindo por conjugação. Os números médios totais de protozoários ciliados/mL ( $\times 10^4$ ) de conteúdo ruminal em processo de reprodução durante as estações chuvosa e seca foram, respectivamente,  $1,02 \pm 0,66$  e  $0,33 \pm 0,42$  ( $P < 0,05$ ). O número médio do total de ciliados em reprodução está apresentado nas Tabelas 3 e 4. Durante a estação chuvosa, apenas o gênero *Diplodinium* apresentou maior taxa de reprodução após oito horas de pastejo. Na estação seca, os números de cada gênero e o total de ciliados em reprodução não apresentaram diferenças significativas entre os horários de obtenção das amostras, entretanto, o número total de ciliados em reprodução apresentou variação ( $P < 0,05$ ), quando comparado entre os animais (Tabela 4). O número de ciliados em divisão não apresentou correlação com o horário de amostragem, nem com o pH ruminal.

Tabela 1. Concentração média ( $\times 10^4$ ) e percentual de protozoários ciliados por mililitro de conteúdo ruminal de ovinos mestiços Santa Inês antes de serem soltos ao pasto (zero hora) e após 2, 4, 6, 8 e 10 horas de pastejo, durante a estação chuvosa, em pastagem natural de caatinga

Gêneros	0		2		4		6		8		10	
	Concentração média	%	Concentração média	%	Concentração média	%	Concentração média	%	Concentração média	%	Concentração média	%
<i>Dasytricha</i>	0,22± 0,18 <sup>a</sup>	0,19	0,76± 0,98 <sup>a</sup>	0,86	0,32± 0,29 <sup>a</sup>	0,38	0,44± 0,39 <sup>a</sup>	0,42	0,57± 0,59 <sup>a</sup>	0,73	0,28± 0,55 <sup>a</sup>	0,29
<i>Diplodinium</i>	2,08± 1,43 <sup>a</sup>	1,81	1,53± 1,16 <sup>a</sup>	1,73	0,92± 0,78 <sup>a</sup>	1,12	2,24± 1,33 <sup>a</sup>	2,17	1,24± 1,22 <sup>a</sup>	1,60	0,96± 0,96 <sup>a</sup>	1,00
<i>Diploplastron</i>	0,73± 1,31 <sup>a</sup>	0,63	-	-	1,44± 2,19 <sup>a</sup>	1,75	4,80± 5,20 <sup>b</sup>	4,65	1,47± 3,11 <sup>a</sup>	1,90	1,79± 2,37 <sup>a</sup>	1,88
<i>Entodinium</i>	98,20± 44,75 <sup>a</sup>	85,50	75,04± 39,58 <sup>a</sup>	85,24	61,56± 6,11 <sup>a</sup>	75,00	83,13± 30,40 <sup>a</sup>	80,61	65,47± 33,16 <sup>a</sup>	84,95	80,00± 32,65 <sup>a</sup>	84,14
<i>Eodinium</i>	0,83± 1,86 <sup>a</sup>	0,72	-	-	-	-	0,19± 0,42 <sup>a</sup>	0,18	0,03± 0,07 <sup>a</sup>	0,03	-	-
<i>Elytroplastron</i>	1,72± 1,64 <sup>a</sup>	1,49	1,12± 0,74 <sup>a</sup>	1,27	1,02± 0,73 <sup>a</sup>	1,24	2,30± 2,20 <sup>a</sup>	2,23	0,41± 0,46 <sup>a</sup>	0,53	0,92± 0,93 <sup>a</sup>	0,96
<i>Enoploplastron</i>	1,72± 1,64 <sup>a</sup>	1,49	1,12± 0,74 <sup>a</sup>	1,27	0,64± 0,64 <sup>a</sup>	0,01	1,92± 2,43 <sup>a</sup>	1,86	0,19± 0,26 <sup>a</sup>	0,24	0,73± 1,02 <sup>a</sup>	0,76
<i>Epidinium</i>	4,28± 4,61 <sup>a</sup>	3,72	4,80± 3,81 <sup>a</sup>	5,45	14,56± 20,30 <sup>a</sup>	17,74	5,56± 3,66 <sup>a</sup>	5,39	5,40± 3,44 <sup>a</sup>	7,00	5,60± 3,50 <sup>a</sup>	5,89
<i>Eremoplastron</i>	3,68± 3,95 <sup>a</sup>	3,20	0,73± 1,04 <sup>a</sup>	0,82	0,83± 0,85 <sup>a</sup>	1,01	1,47± 1,89 <sup>a</sup>	1,42	1,79± 1,29 <sup>a</sup>	3,32	1,15± 1,26 <sup>a</sup>	1,20
<i>Eudiplodinium</i>	0,09± 0,21 <sup>a</sup>	0,07	-	-	0,12± 0,28 <sup>a</sup>	0,14	0,03± 0,71 <sup>a</sup>	0,02	-	-	-	-
<i>Isotricha</i>	0,09± 0,08 <sup>a</sup>	0,07	0,19± 0,17 <sup>a</sup>	0,21	0,09± 0,14 <sup>a</sup>	0,10	0,19± 0,17 <sup>a</sup>	0,18	0,28± 0,30 <sup>a</sup>	0,36	0,32± 0,33 <sup>a</sup>	0,33
<i>Metadinium</i>	0,73± 1,00 <sup>a</sup>	0,63	2,08± 3,81 <sup>a</sup>	2,36	0,35± 0,62 <sup>a</sup>	0,42	0,60± 0,65 <sup>a</sup>	0,58	0,12± 0,28 <sup>a</sup>	0,15	3,26± 5,65 <sup>a</sup>	3,42
<i>Ophryoscolex</i>	0,48± 0,59 <sup>a</sup>	0,41	0,12± 0,17 <sup>a</sup>	0,13%	0,22± 0,35 <sup>a</sup>	0,26	0,25± 0,36 <sup>a</sup>	0,24	0,09± 0,14 <sup>a</sup>	0,12	0,06± 0,08 <sup>a</sup>	0,06
Total	114,85± 52,79 <sup>a</sup>		88,03± 47,82 <sup>a</sup>		82,07± 10,25 <sup>a</sup>		103,12± 54,99		77,06± 37,94 <sup>a</sup>		95,07± 39,19 <sup>a</sup>	

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem significativamente (P< 0,05).

Tabela 2. Concentração média ( $\times 10^4$ ) e percentual de protozoários ciliados por mililitro de conteúdo ruminal de ovinos mestiços Santa Inês antes de serem soltos ao pasto (zero hora) e após 2, 4, 6, 8 e 10 horas de pastejo, durante a estação seca, em pastagem natural de caatinga

Gêneros	0		2		4		6		8		10	
	Concentração média	%										
<i>Dasytricha</i>	2,80±1,87 <sup>a</sup>	3,54	1,92±1,36 <sup>a</sup>	5,22	1,44±1,68 <sup>a</sup>	4,58	2,36±2,61 <sup>a</sup>	7,71	1,24±1,28 <sup>a</sup>	4,04	1,32±0,96 <sup>a</sup>	3,54
<i>Diplodinium</i>	1,44±1,62 <sup>a</sup>	1,82	0,48±0,76 <sup>a</sup>	1,30	1,24±0,83 <sup>a</sup>	3,94	0,76±0,70 <sup>a</sup>	2,48	0,84±0,98 <sup>a</sup>	2,74	1,24±1,36 <sup>a</sup>	3,32
<i>Diploplastron</i>	4,36±3,05 <sup>a</sup>	5,51	2,28±1,72 <sup>a</sup>	6,20	2,64±1,90 <sup>a</sup>	8,39	2,92±2,13 <sup>a</sup>	9,54	2,56±2,18 <sup>a</sup>	8,35	3,52±3,02 <sup>a</sup>	9,45
<i>Entodinium</i>	61,32±40,58 <sup>a</sup>	77,58	25,36±10,48 <sup>b</sup>	68,98	20,48±10,16 <sup>b</sup>	65,13	20,60±8,23 <sup>b</sup>	67,32	18,24±9,40 <sup>b</sup>	59,53	25,96±12,50 <sup>b</sup>	69,70
<i>Elytroplastron</i>	1,52±1,51 <sup>a</sup>	1,92	1,04±1,28 <sup>a</sup>	2,82	0,96±0,87 <sup>a</sup>	3,05	0,76±0,74 <sup>a</sup>	2,48	1,24±0,57 <sup>a</sup>	4,04	1,60±0,87 <sup>a</sup>	4,29
<i>Epidinium</i>	3,44±3,15 <sup>a</sup>	4,35	2,28±2,48 <sup>a</sup>	6,20	1,80±1,90 <sup>a</sup>	5,72	1,08±0,56 <sup>a</sup>	3,52	3,24±3,77 <sup>a</sup>	10,57	2,24±1,87 <sup>a</sup>	6,01
<i>Eremoplastron</i>	0,08±0,16 <sup>a</sup>	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eudiplodinium</i>	0,76±0,91 <sup>a</sup>	0,96	0,60±1,20 <sup>a</sup>	1,63	0,12±0,24 <sup>a</sup>	0,38	0,12±0,24 <sup>a</sup>	0,39	0,36±0,45 <sup>a</sup>	1,17	0,12±0,15 <sup>a</sup>	0,32
<i>Isotricha</i>	1,64±2,02 <sup>a</sup>	2,07	1,44±1,06 <sup>a</sup>	3,19	1,68±1,85 <sup>a</sup>	5,34	0,28±0,56 <sup>a</sup>	0,91	1,52±1,21 <sup>a</sup>	4,96	1,32±0,96 <sup>a</sup>	3,54
<i>Metadinium</i>	0,88±1,55 <sup>a</sup>	1,11	0,36±0,27 <sup>a</sup>	0,97	0,52±0,73 <sup>a</sup>	1,65	1,32±1,66 <sup>a</sup>	4,31	0,96±1,29 <sup>a</sup>	3,13	0,08±0,16 <sup>a</sup>	0,21
<i>Ophryoscolex</i>	0,80±1,6 <sup>a</sup>	1,01	1,00±2,00 <sup>a</sup>	0,03	0,56±1,12 <sup>a</sup>	1,78	0,40±0,80 <sup>a</sup>	1,30	0,44±0,88 <sup>a</sup>	1,43	0,60±1,20 <sup>a</sup>	1,61
Total	79,04±48,95 <sup>a</sup>		36,76±17,40 <sup>b</sup>		31,44±15,97 <sup>b</sup>		30,60±12,56 <sup>b</sup>		30,64±12,90 <sup>b</sup>		37,24±18,76 <sup>b</sup>	

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).

Tabela 3. Concentração média ( $\times 10^4$ ) e percentual de protozoários ciliados por mililitro de conteúdo ruminal de ovinos mestiços Santa Inês (animais A1, A2, A3, A4 e A5) durante a estação chuvosa, em pastagem natural de caatinga

Gêneros	Animal									
	A1		A2		A3		A4		A5	
	Concentração Média	%	Concentração Média	%	Concentração Média	%	Concentração Média	%	Concentração Média	%
<i>Dasytricha</i>	0,10± 0,08 <sup>ac</sup>	0,19	0,16± 0,17 <sup>ac</sup>	0,20	0,18± 0,18 <sup>a</sup>	0,20	0,88± 0,74 <sup>b</sup>	0,76	0,85± 0,60 <sup>bc</sup>	0,61
<i>Diplodinium</i>	0,45± 0,25 <sup>a</sup>	0,85	2,18± 1,16 <sup>b</sup>	2,79	2,29± 0,95 <sup>b</sup>	2,64	1,28± 1,59 <sup>ab</sup>	1,11	1,28± 0,75 <sup>ab</sup>	0,92
<i>Diploplastron</i>	-	-	-	-	0,93± 1,39 <sup>a</sup>	1,07	2,26± 3,46 <sup>a</sup>	1,97	5,33± 3,8 <sup>b</sup>	3,87
<i>Entodinium</i>	49,65± 13,86 <sup>a</sup>	94,9	69,84± 25,20 <sup>a</sup>	89,5	68,80± 18,10 <sup>a</sup>	79,46	82,66± 33,74 <sup>a</sup>	72,19	115,22± 33,23 <sup>b</sup>	83,69
<i>Eodinium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,88± 1,64	0,63
<i>Elytroplastron</i>	-	-	1,04± 0,37 <sup>a</sup>	1,33	1,38± 1,31 <sup>a</sup>	1,59	2,37± 2,07 <sup>a</sup>	2,06	1,46± 0,56 <sup>a</sup>	1,06
<i>Enoploplastron</i>	-	-	1,04± 0,37 <sup>ab</sup>	1,33	1,38± 1,31 <sup>ab</sup>	1,59	2,37± 2,07 <sup>a</sup>	2,06	0,48± 0,84 <sup>ab</sup>	0,34
<i>Epidinium</i>	1,09± 0,61 <sup>a</sup>	2,08	3,01± 1,42 <sup>a</sup>	3,85	6,82± 2,18 <sup>a</sup>	7,87	20,29± 17,98 <sup>b</sup>	17,72	9,46± 1,17 <sup>a</sup>	6,87
<i>Eremoplastron</i>	0,32± 0,50 <sup>a</sup>	0,61	1,54± 1,03 <sup>a</sup>	1,97	3,12± 3,11 <sup>b</sup>	3,6	3,06± 1,99 <sup>b</sup>	2,67	-	-
<i>Eudiplodinium</i>	0,18± 0,29 <sup>a</sup>	0,34	-	-	-	-	0,02± 0,06 <sup>a</sup>	0,01	-	-
<i>Isotricha</i>	0,02± 0,06 <sup>a</sup>	0,03	0,10± 0,19 <sup>a</sup>	0,12	0,24± 0,13 <sup>ab</sup>	0,27	0,18± 0,15 <sup>a</sup>	0,15	0,42± 0,29 <sup>b</sup>	0,30
<i>Metadinium</i>	-	-	-	-	2,29± 5,38 <sup>a</sup>	2,64	1,38± 0,71 <sup>a</sup>	1,20	2,29± 3,22 <sup>a</sup>	1,66
<i>Ophryoscolex</i>	0,42± 0,37 <sup>a</sup>	0,8	0,10± 0,13 <sup>b</sup>	0,12	0,50± 0,46 <sup>a</sup>	0,57	-	-	-	-
TCR*	1,12± 0,45 <sup>a</sup>	2,14	0,74± 0,37 <sup>a</sup>	0,94	1,60± 1,03 <sup>b</sup>	1,84	0,53± 0,49 <sup>a</sup>	0,46	1,12± 0,13 <sup>ab</sup>	0,81
Total	52,29± 14,60 <sup>a</sup>		78,00± 27,43 <sup>ab</sup>		86,58± 23,74 <sup>ab</sup>		114,50± 51,70 <sup>bc</sup>		137,67± 35,36 <sup>c</sup>	

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem significativamente (P< 0,05)

TCR\* total de ciliados em reprodução

Tabela 4. Concentração média ( $\times 10^4$ ) e percentual de protozoários ciliados por mililitro de conteúdo ruminal de ovinos mestiços Santa Inês (animais A1, A2, A3, A4 e A5) durante a estação chuvosa, em pastagem natural de caatinga

Gêneros	Animal							
	A2		A3		A4		A5	
	Concentração Média	%	Concentração Média	%	Concentração Média	%	Concentração Média	%
<i>Dasytricha</i>	-	-	3,14± 1,66 <sup>a</sup>	5,58	2,48± 0,76 <sup>a</sup>	4,56	1,76± 1,48 <sup>a</sup>	4,37
<i>Diplodinium</i>	-	-	2,16 ± 0,84 <sup>a</sup>	3,83	0,88± 0,77 <sup>b</sup>	1,62	0,96± 0,85 <sup>b</sup>	2,38
<i>Diploplastron</i>	-	-	4,53± 0,61 <sup>a</sup>	1,08	3,81± 2,10 <sup>a</sup>	7,02	3,84± 1,71 <sup>a</sup>	9,53
<i>Entodinium</i>	11,22± 3,35 <sup>a</sup>	86,62	38,40± 19,34 <sup>bc</sup>	68,2	41,30± 33,87 <sup>bc</sup>	76,08	23,70± 11,46 <sup>ab</sup>	58,87
<i>Elytroplastron</i>	0,34± 0,70 <sup>a</sup>	2,67	1,04± 0,51 <sup>ab</sup>	1,84	1,28± 0,74 <sup>ab</sup>	2,35	2,08± 1,05 <sup>b</sup>	5,16
<i>Epudinium</i>	0,24± 0,37 <sup>a</sup>	1,85	1,20± 0,51 <sup>ab</sup>	2,13	2,61± 1,51 <sup>b</sup>	4,81	5,33± 2,32 <sup>c</sup>	13,24
<i>Eremoplastron</i>	-	-	0,05± 0,13	0,09	-	-	-	-
<i>Eudiplodinium</i>	-	-	1,09± 0,92 <sup>a</sup>	1,94	0,10± 0,16 <sup>b</sup>	0,19	0,18± 0,29 <sup>b</sup>	0,46
<i>Isotricha</i>	-	-	1,97± 1,56 <sup>a</sup>	3,5	0,61± 0,56 <sup>b</sup>	1,12	2,16± 1,14 <sup>a</sup>	5,36
<i>Metadinium</i>	1,14± 1,67 <sup>a</sup>	8,84	0,16± 0,20 <sup>a</sup>	0,28	1,20± 1,13 <sup>a</sup>	2,21	0,24± 0,19 <sup>a</sup>	0,59
<i>Ophryoscolex</i>	-	-	2,53± 0,91	4,5	-	-	-	-
TCR*	0,05± 0,08 <sup>a</sup>	0,38	0,37± 0,37 <sup>a</sup>	0,65	0,40± 0,22 <sup>a</sup>	0,73	0,50± 0,71 <sup>a</sup>	1,24
Total	12,96± 1,62 <sup>a</sup>		56,29± 21,54 <sup>a</sup>		54,29± 38,01 <sup>a</sup>		40,26± 16,08 <sup>a</sup>	

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem significativamente (P< 0,05)

TCR\* total de ciliados em reprodução.

Tabela 5. pH ruminal de ovinos (animais A1, A2, A3, A4 e A5) nos tempos de amostragem (zero hora, antes de se soltar os animais ao pasto, e após 2, 4, 6, 8 e 10 horas de pastejo), durante as estações chuvosa e seca, em pastagem natural de caatinga

Animal	T0	T2	T4	T6	T8	T10
Estação chuvosa						
A1	7,02	6,65	6,82	7,34	6,34	6,21
A2	7,06	6,62	6,75	6,93	6,28	6,26
A3	7,02	6,66	6,72	6,87	6,52	6,38
A4	6,75	6,97	6,75	7,08	6,93	6,76
A5	6,95	6,55	6,76	6,75	6,56	6,24
Média	6,96±0,12 <sup>Aa</sup>	6,69± 0,16 <sup>Ab</sup>	6,76± 0,03 <sup>Ab</sup>	6,99± 0,22 <sup>Aa</sup>	6,52± 0,25 <sup>Ab</sup>	6,37± 0,22 <sup>Ab</sup>
Estação seca						
A2	7,51	6,6	6,47	6,2	6,54	6,15
A3	7,34	6,55	6,44	6,43	6,35	6,06
A4	6,88	6,47	6,41	6,47	6,22	6,35
A5	7,35	6,38	6,41	6,53	6,26	6,15
Média	7,27± 0,27 <sup>Aa</sup>	6,50± 0,09 <sup>Bb</sup>	6,43± 0,02 <sup>Bb</sup>	6,40± 0,14 <sup>Bb</sup>	6,34± 0,14 <sup>Ab</sup>	6,17± 0,12 <sup>Ab</sup>

<sup>A,a</sup>Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha e por letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente (P< 0,05).

## DISCUSSÃO

A maior densidade de organismos do gênero *Entodinium* e do número médio total de protozoários durante a estação seca, antes dos animais iniciarem o pastejo, ou seja, 14 horas após a saída do pasto, seguida por um posterior decréscimo nas concentrações desses organismos corrobora os resultados de Warner (1966b). Esse autor verificou que ciliados entodínios no rúmen de ovinos, com livre acesso à pastagem, apresentaram decréscimo em suas populações ou concentração estacionária durante o pico de forrageamento dos animais, sendo que, nesse período, há um aumento das formas em divisão, que contribui para o aumento das populações que atinge o crescimento máximo pela

manhã, antes dos animais iniciarem o pastejo. O decréscimo na concentração de ciliados está associado à ingestão de alimento, água, salivacão e passagem da digesta pelo rúmen, enquanto o crescimento encontra-se associado à intensificação do processo de divisão e à queda na taxa de diluição do conteúdo ruminal (MICHALOWSKI, 1977). Considerando-se as observações de Warner (1966b), seria esperado que neste trabalho, possivelmente, ocorresse crescimento na concentração dos protozoários ciliados após os animais serem recolhidos ao aprisco, às 17 horas, quando foi realizada a última coleta, conforme a tendência de crescimento registrada dez horas após o início do pastejo (Tabela 1). Esse fato aponta para a importância de serem realizadas coletas de que atinjam um tempo mínimo de 24 horas.

Organismos do gênero *Entodinium* apresentam concentração máxima entre 16-20 horas após a alimentação, sendo esse comportamento similar ao de outros ciliados Ophryoscolecidae, como *Diploplastron*, *Polyplastron* e *Epidinium*. As observações do presente trabalho demonstraram que o gênero *Diploplastron*, durante a estação seca, apresentou maior concentração seis horas após os animais iniciarem o pastejo, o que pode ser decorrente do maior tempo gasto por esses organismos para se completar a divisão, conforme relatado por Warner (1966c).

Apesar do comportamento registrado, para o gênero *Entodinium* no rúmen de ovinos, ter se assemelhado aos resultados obtidos por Michalowski (1977) com o mesmo gênero, porém no rúmen de búfalos, alterações nas concentrações de protozoários ciliados podem ainda estar associadas ao maior ou menor aproveitamento de determinado alimento pelas diferentes espécies de ruminantes (NOGUEIRA-FILHO et al, 1998).

As diferenças observadas quanto à ocorrência e à concentração dos protozoários ciliados entre os animais demonstram a existência de variações individuais, entre hospedeiros da mesma espécie, decorrentes de diferenças na taxa de ingestão do alimento (FRANZOLIN e DEHORITY, 1996), das características metabólicas inerentes ao hospedeiro (D'AGOSTO & SANTA-ROSA, 1998), das relações de antagonismo estabelecidas entre algumas espécies de ciliados (EADIE, 1967) e das características comportamentais individuais relacionadas à alimentação (MARTINELE, 2007).

As variações no pH ruminal observadas entre as estações podem ser atribuídas a fatores como a natureza da dieta, que neste estudo pode ter sofrido variações decorrentes da estacionalidade na produção de forragem, taxa de ingestão

do alimento e tempo gasto com a ruminação (COALHO et al., 2003; FRANZOLIN & DEHORITY, 1996). O pH ruminal apresenta valores mínimos, geralmente, entre duas a seis horas após a alimentação, o que corresponde ao pico de produção de ácidos resultantes da atividade fermentativa (DEHORITY, 2003). Dietas com grandes quantidades de amido ou carboidratos solúveis resultam em valores de pH baixo, ao passo que dietas com preponderância de celulose e outros carboidratos que são metabolizados vagorosamente, não apresentam queda do pH tão acentuada (COALHO et al., 2003), conforme observado no presente trabalho.

Apesar do pH ruminal apresentar variações entre os horários de coleta, essas não foram suficientes para promover alterações nas populações de ciliados, visto que não houve correlação entre número de ciliados e o pH ruminal na estação chuvosa e baixa correlação na estação seca. Isso ocorreu porque, apesar de variável, os valores médios registrados para o pH permaneceram entre a faixa de 6,0 e 7,0, não ultrapassando a faixa de neutralidade fisiológica. De acordo com OLIVEIRA et al (1987), a concentração de ciliados no rúmen de ovinos mantidos em pastagem tende a se tornar estável com pH em torno de 6,9. Animais mantidos exclusivamente em pastagem têm acesso a uma dieta rica em fibras, o que estimula a ruminação e a secreção de saliva, que mantém o pH favorável aos microorganismos do rúmen (RUSSELL e RYCHLIK, 2001). O pH ruminal é, pois, um importante fator a ser considerado em estudos sobre a dinâmica populacional de protozoários ciliados do rúmen (COALHO et al., 2003; DEHORITY, 2005; FRANZOLIN & DEHORITY, 1996).

A variação na taxa de divisão de ciliados *Diplodinium* foi similar à verificada em

búfalos por MICHALOWSKI (1977), sendo maior o número de organismos em divisão cerca de 8 horas após a alimentação. Variações na concentração de protozoários no rúmen de diferentes hospedeiros têm sido atribuídas à taxa de divisão dos ciliados (MICHALOWSKI, 1977; WARNER, 1962; 1966c). Segundo Warner (1962), em animais mantidos com acesso livre ao alimento ou em pastagens, as divisões celulares dos ciliados ocorreriam ao acaso durante todo o dia, conforme indicam as observações do presente estudo. Possivelmente, essa aleatoriedade leva à estabilização das formas em divisão ao longo do dia, conforme mencionado por Nogueira-Filho et al. (1998).

As populações de protozoários ciliados no rúmen de ovinos criados em pastagens de caatinga não apresentam variação diurna nas suas concentrações, exceto as dos gêneros *Entodinium* e *Diploplastron*, sendo que a estabilidade das formas em divisão contribui para a manutenção da estabilidade da concentração de ciliados no rúmen. Entretanto, há uma acentuada variação na concentração de diversos gêneros de protozoários ciliados em função de características inerentes aos hospedeiros, mesmo sendo da mesma espécie.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação CAPES e ao CNPQ pela cessão de bolsas de estudos concedidas respectivamente, a I. MARTINELE, D.S. MATOS e G.R.A. SANTOS.

À Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária do estado de Pernambuco- IPA, pela cessão da área experimental e manutenção dos animais.

## REFERÊNCIAS

AYRES, M.; AYRES, M.J.R.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **Bioestat 2.0:** Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá, CNPq, 2000.

COALHO, M.R.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; CUNHA, J.A.; LIMA, C.G. Estudo dos protozoários ciliados em bovinos consumindo dietas com diferentes níveis de proteína não degradável no rúmen. **Acta Scientiarum**, v.25, n.1, p.193-199, 2003.

D'AGOSTO, M.; CARNEIRO, M.E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, p.725-729, 1999.

D'AGOSTO, M.; SIQUEIRA, I.C.V.; ESPÍRITO-SANTO, N.B. Comportamento e distribuição de protozoários ciliados (Protista, Ciliophora) no rúmen e no retículo de bovinos submetidos ao jejum. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.8, n.1, p.16-18, 2001.

DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, p.182-185, 1984.

DEHORITY, B.A. **Rumen microbiology:** an introduction to the micro-organisms in the rumen, their activities and interactions in the digestion of plant materials. Nottingham: Universidade Press, 2003. 372p.

DEHORITY, B.A. Effect of pH on viability of *Entodinium caudatum*,

*Entodinium exiguum*, *Epidinium caudatum*, and *Ophryoscolex purkynjei* in vitro. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.52, n.4, p.339-342, 2005.

FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B.A. Efeitos do pH ruminal e ingestão alimentar na defaunação em ovinos sob rações concentradas. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.25, n.6, p.1207-1215, 1996.

MACKIE, R.I. Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: diversity and evolution. **Integrative and Comparative Biology**, v.42, p.319-326, 2002.

MARTINELE, I. **Variação estacional das populações de protozoários ciliados (Protista, Ciliophora) do rúmen de ovinos (*Ovis aries* L.) mantidos em pastagens naturais no semi-árido de Pernambuco, Brasil**. 2007. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

MARTINELE, I.; DETONI, M.L.; RUST, N.M.; D'AGOSTO, M. Protozoários ciliados (Protista, Ciliophora) no conteúdo do rúmen e do retículo de bovinos. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.9, n.1, p.63-67, 2007.

MICHALOWSKI, T. Diurnal changes in concentration of rumen ciliates and in occurrence of dividing forms in water buffalo (*Bubalus bubalus*) fed once daily. **Applied Environmental Microbiology**, v.33, n.4, p.802-804, 1977.

NOGUEIRA-FILHO, J.C.M.; OLIVEIRA, M.E.M.; TOLEDO, L.R.A.; VELLOSO, L. Protozoários ciliados no rúmen de zebuínos e bubalinos

submetidos a dietas com volumosos e concentrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.6, p.993-999, 1998.

OGIMOTO, K.; IMAI, S. **Atlas of Rumen Microbiology**. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1981. 231 p.

OLIVEIRA, M.E.M.; NOGUEIRA-FILHO, J.C.M.; LUCCI, C.S.; DUPAS, W.; LIMA, C.G. Desenvolvimento de populações de protozoários ciliados no rúmen de ovinos (*Ovis Aires* L.) criados em Itapetininga, São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.24, n.2, p.225-232, 1987.

RUSSEL, J. B.; RYCHLIK, J.L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v.292, n.5519, p.1119-1122, 2001.

SÁLVIO, G.M.M.; D'AGOSTO, M. Avaliação do comportamento de escape e migração de ciliados Isotriquiidae no sistema rúmen-retículo de bovinos. **Revista Brasileira de Zoociências**, v.1, p.41-53, 1999.

SILVA, J.F.C.; LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Livroceres, 1979. 380p

WARNER, A.C.I. Some factors influencing the rumen microbial population. **Journal General Microbiology**, v.28, p.129-146, 1962.

WARNER, A.C.I. Periodic changes in the concentrations of micro-organisms in the rumens of a sheep fed limited ration every three hours. **Journal General Microbiology**, v.45, p.237-241, 1966a.

WARNER, A.C.I. Diurnal changes in the concentrations of micro-organisms in the rumens of sheep fed to appetite in pens or at pasture. **Journal General Microbiology**, v.45, p.243-251, 1966b.

WARNER, A.C.I. Diurnal changes in the concentrations of micro-organisms in the rumens of sheep fed limited diets once daily. **Journal General Microbiology**, v.45, p.213-235, 1966c.

Data de recebimento: 30/08/2007

Data de aprovação: 27/05/2008