

PROTOZOÁRIOS CILIADOS NO RÚMEN DE ZEBUÍNOS E BUBALINOS SUBMETIDOS A DIETAS COM VOLUMOSOS E CONCENTRADOS¹

JOSÉ CARLOS MACHADO NOGUEIRA FILHO², MARIA ELY MISEROCHI DE OLIVEIRA³,
LUIZ ROBERTO AGUIAR DE TOLEDO⁴ e LÍCIO VELLOSO⁵

RESUMO - Este trabalho teve por objetivo verificar eventuais alterações quantitativas de populações de protozoários ciliados ruminais de zebuínos da raça Nelore e bubalinos da raça Mediterrâneo submetidos a dieta composta de feno de capim coast-cross (65%) e concentrado (20% de fubá de milho e 15% de farelo de algodão), e sal mineral no cocho, à vontade. A mistura constituiu-se numa ração com 9,9% de proteína bruta, 88,8% de matéria seca e 2,4 Mcal/kg de energia digestível, dividida em duas refeições e oferecidas às 8 e 16 horas. Foram utilizados quatro bovinos de cada espécie animal, providos de cânulas ruminais, com peso médio de 530 kg. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com repetição do experimento no tempo, de modo que cada animal era testemunha de si próprio. Os zebuínos apresentaram maior concentração média total ($p < 0,05$) de protozoários ciliados, demonstrando melhores condições de adaptação ruminal. Ficou caracterizado comportamento diferenciado entre os gêneros de protozoários estudados quando se oferece duas refeições diárias, com intervalo de oito horas. Detectou-se que, nos gêneros *Entodinium*, *Epidinium*, *Diplodinium* e *Isotricha*, quatro a seis horas após as refeições, as concentrações de ciliados entre as espécies animais não diferiram ($p > 0,05$), provavelmente pelas divisões celulares estarem estabilizadas.

Termos para indexação: concentração, zebu, búfalo.

CILIATE PROTOZOA IN THE RUMEN OF A ZEBU FED WITH ROUGHAGE AND CONCENTRATES

ABSTRACT - Aiming to verify quantitative differences on ciliate protozoa concentrations in the rumen of zebu cattle (Nelore) compared to water buffalo (Mediterranean), both receiving 65% of coast-cross hay plus concentrate (ground corn - 20% and cotton seed meal - 15%), fed twice a day (8:00 am and 4:00 pm), with a complete salt mixture *ad libitum*. Feed composition was: 88.8% dry matter; 9.9% crude protein and 2.4 Mcal digestible energy/kg. Four animals, rumen cannulated averaging 530 kg of live weight were used. A completely randomized experimental design with a repetition on time was utilized. Zebu showed higher total concentration of ciliate protozoa ($p < 0.05$), with better ruminal adaptation to the diet. No differences in the concentration of the genera *Entodinium* spp., *Epidinium* spp., *Diplodinium* spp. and *Isotricha* spp. were detected between zebu and buffalo four to six hours after meals ($p > 0.05$), probably due to the stabilization of the cellular division.

Index terms: rumen ciliate protozoa, Nelore, Mediterranean buffalo.

¹ Aceito para publicação em 2 de dezembro de 1997.

² Méd. Vet., Dr., Prof. Associado, USP, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Dep. de Zootecnia, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13630-000 Pirassununga, SP. E-mail: jocamano@abelha.zoot.usp.br

³ Méd. Vet., Dr., USP, Instituto de Ciências Biomédicas, Dep. de Parasitologia, Av. Lineu Prestes, 1374, CEP 05508-000 São Paulo, SP.

⁴ Eng. Agr., Ph.D., USP, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. E-mail: lratoled@usp.br

⁵ Méd. Vet., Dr., Prof. Titular, USP, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos.

INTRODUÇÃO

Trabalhos realizados com ovinos, bovinos e bubalinos mostram existir variações diurnas na concentração ruminal dos protozoários ciliados (Clarke, 1965; Dehority & Mattos, 1978; Abe et al., 1981; Kurar et al., 1988; Franzolin Neto et al., 1990). Além disso, são conhecidas as diferenças entre espécies de ruminantes quanto à capacidade de aproveitamento das frações de fibra e proteína dos alimentos. As alterações quantitativas que ocorrem nas concentra-

ções 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.

Bovinos Nelore e bubalinos Mediterrâneo são grupamentos genéticos que representam, respectivamente, o maior efetivo bovino brasileiro e a espécie que, entre os grandes ruminantes, mais tem crescido no país nos últimos dez anos (taxa média anual aproximada de 15%). Assim sendo, o estudo das alterações quantitativas da população de protozoários no rúmen dessas espécies poderá trazer valiosa contribuição ao entendimento dos processos de fermentação.

Purse & Moir (1959) ao trabalharem com ovinos alimentados com uma ração contendo feno de alfafa, aveia esmagada e farelo de linho registraram um distinto ciclo diurno dos ciliados, principalmente *Entodinium* spp. A concentração de protozoários ciliados decresceu acentuadamente na primeira hora após a alimentação, e continuou a cair até 4-6 horas após o arraçoamento. Oito horas após a ingestão de alimentos, a concentração de ciliados começou a se elevar até atingir um nível pré-alimentação 16 horas após a oferta da ração. Subseqüente estudo de Purse (1961) estabeleceu que um ciclo diurno também existia nos Holotricha; contudo diferia do ciclo dos entodiniomorfos. Observou um pico de concentração no momento do arraçoamento (animais alimentados uma vez ao dia), gradualmente diminuindo até 20 horas após a alimentação, e então com rápido crescimento antes da próxima oferta de alimentos.

Warner (1962) registrou variações diurnas no número de protozoários ciliados do rúmen, em animais alimentados uma vez ao dia, às 8 horas. A multiplicação ocorreu principalmente nas oito horas anteriores ao arraçoamento. Concluiu que os ciliados possuem ritmo diário de divisão celular correlacionado com o tempo de alimentação. Em animais alimentados freqüentemente, essas divisões ocorreriam ao acaso durante todo o dia.

Já Clarke (1965) estudou o ciclo diurno dos protozoários ciliados do rúmen de bovinos alimentados com feno de trevo vermelho e a mesma forrageira na forma fresca, oferecidos uma vez ao

dia, e verificou que o comportamento dos dois tratamentos obedeceu praticamente à mesma curva, com variação no número de ciliados nos tratamentos: aumentando até duas horas após a alimentação, decrescendo nas horas subseqüentes, e com tendência à elevação 14 horas depois do arraçoamento.

Dehority & Mattos (1978) observaram as variações diurnas na concentração de diferentes gêneros de protozoários ciliados quando alimentaram uma vaca da raça Flamengo com feno de capim Rhodes uma vez ao dia. Dos protozoários ciliados estudados, os autores concluíram que *Entodinium* spp. apresentou aumento da concentração duas horas após o arraçoamento; posteriormente uma queda, que ficou estabilizada por 12 horas, com uma tendência a aumentar nas horas que precediam a nova alimentação. Por sua vez, Kurar et al. (1988) ao analisarem líquido ruminal proveniente de búfalos obtiveram contagem de protozoários ciliados mais baixa antes da alimentação e aumento até seis horas após o arraçoamento, contrariando trabalhos conduzidos por Michalowski (1975, 1977), que observou, em todos os grupos de protozoários estudados em búfalos, que a mais alta concentração ocorreu imediatamente antes da alimentação, seguido de queda na densidade e nova elevação até a realimentação.

Franzolin Neto et al. (1990), trabalhando com búfalo e mestiço bovino (zebu-europeu), alimentados duas vezes ao dia (às 8 e 17 horas) com feno de capim coast-cross (70%) e concentrado (30%), colheram amostras de líquido ruminal de hora em hora, das 6 às 12 horas, e depois a cada três horas, até a zero hora, e constataram, no bubalino, que o ciclo diurno aparentemente ocorreu com a maior parte dos protozoários estudados, apresentando números elevados de ciliados antes da primeira refeição, declinando em seguida, com menores valores à noite. No bovino notaram não haver ciclo diurno aparente, embora tenha se evidenciado ligeira queda no número de ciliados a partir do tempo inicial de colheita. Franzolin Neto et al. (1991b), alimentando bubalinos duas vezes ao dia (às 9 e 17 horas) com rações contendo níveis crescentes de proteína bruta na matéria seca, constataram que o nível de proteína na ração pode ter influenciado de alguma forma as concentrações diárias dos ciliados no rúmen, mostrando, no geral, marcada variação diurna defi-

nida por uma curva quadrática positiva, com diminuição até doze horas após a primeira alimentação, aumentando em seguida até o momento imediatamente anterior à primeira oferta de alimentos do dia subsequente.

Franzolin Neto et al. (1991a) colheram amostras de líquido de rúmen de búfalos canulados submetidos a pastejo de grama batatais em três dias consecutivos, nos horários de 6, 12, 18 e zero horas, e verificaram que as concentrações de *Entodinium* spp. e de totais de ciliados alcançaram valores mínimo e máximo às 12 e zero horas, respectivamente ($4,03 \times 10^4/\text{mL}$ e $7,52 \times 10^4/\text{mL}$, em *Entodinium* spp., e $7,14 \times 10^4/\text{mL}$ e $11,20 \times 10^4/\text{mL}$, no total de ciliados).

Este trabalho teve por objetivo verificar as alterações quantitativas e os ciclos de crescimento, num período de 24 horas, da população ruminal de protozoários ciliados em zebuínos Nelore e bubalinos Mediterrâneo alimentados com feno de capim coast-cross e concentrado.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado de março a maio de 1994 no Campus Administrativo de Pirassununga, SP, na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados oito bovídeos machos, sendo quatro bovinos da raça Nelore e quatro bubalinos da raça Mediterrâneo, providos de cânulas ruminais. Os zebuínos com peso médio de 530 kg e três anos de idade, e os bubalinos com 520 kg e dois anos de idade no início do ensaio. Todos os animais eram emasculados.

Os bovídeos foram alojados em baias individuais, em estábulo experimental de alvenaria, com cochos e bebedouros automáticos individualizados, e onde permaneceram confinados durante todo o período de experimentação, recebendo alimento à vontade às 8 e 16 horas.

A alimentação oferecida aos animais era constituída de feno de capim coast-cross (*Cynodon dactylon* - 65%), concentrado (20% de fubá de milho e 15% de farelo de algodão), e sal mineral no cocho, à vontade, compondo-se em ração com 9,9% de proteína bruta (P.B.), 88,8% de matéria seca (M.S.), e 2,4 Mcal/kg de energia digestível (E.D.). O consumo foi de 2,0% do peso vivo animal, equivalente a 10,60 kg de ração por dia.

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, num esquema de parcelas subdivididas, sendo espécie (bovina e bubalina)

o tratamento nas parcelas, e o tempo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas após a primeira refeição), o tratamento nas subparcelas. Foram avaliadas populações de sete gêneros de protozoários ciliados.

Cada período experimental teve duração de seis semanas, sendo as quatro primeiras de adaptação dos animais à dieta e às instalações. Na quinta semana foi colhido líquido ruminal para determinação de protozoários ciliados a cada duas horas, a partir da ingestão matinal da ração, durante 24 horas, para estabelecer as curvas de pico de aparecimento dos gêneros de ciliados.

Foram colhidos de 30 a 40 mL de líquido de rúmen, por meio de bomba de sucção, que eram recebidos em um balão kitasato; uma alíquota de 10 mL era transferida para um tubo de ensaio com 20 mL de formaldeído a 37% (diluído em água destilada a 1:2); o tubo era agitado imediatamente após a colheita, para fixação dos ciliados. As amostras permaneciam em repouso por uma noite, para depois serem diluídas a 1:20 em solução de glicerol a 30%. O verde brilhante foi o corante utilizado (Dehority, 1977).

As contagens diferenciais dos protozoários ciliados basearam-se na técnica descrita por Dehority (1977), com uso de câmara de Sedgwick-Rafter e microscópio ótico com ocular provida de retículo, área de $0,4323 \text{ mm}^2$, aferida por lâmina micrométrica. Foram percorridos cem campos diferentes e calculou-se o fator de correção para 1,0 mL de líquido ruminal. As operações foram executadas em duplicata e consideradas as médias obtidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença significativa na concentração ruminal de protozoários entre as espécies de bovídeos estudadas ($p < 0,05$) e entre os tempos de amostragem ($p < 0,05$), todavia, não houve interação significativa entre espécies e tempo ($p > 0,05$) (Figs. 1 e 2).

No gênero *Diplodinium* Fig. 3, foi significativa a interação entre a espécie e o tempo ($p < 0,05$). Nos tempos 0, 2, 4, 8, 10 e 12 horas após a primeira refeição, os búfalos apresentavam maiores concentrações que os Nelore; nos tempos 6, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 horas não houve diferença na concentração dos protozoários entre as duas espécies.

No gênero *Eudiplodinium* (Fig. 4) não houve diferença significativa entre espécies ($p > 0,05$), mas houve diferença entre os tempos de amostragem ($p < 0,05$).

No gênero *Ostracodinium* (Fig. 5) constatam-se diferenças significativas na concentração dos

protozoários no rúmen entre espécies animais ($p < 0,05$) e entre tempos de amostragem ($p < 0,05$), mas não houve interação entre eles ($p > 0,05$).

Quanto ao gênero *Dasytricha* (Fig. 6) houve diferenças ($p < 0,05$) à zero hora (14.342 ± 4.252

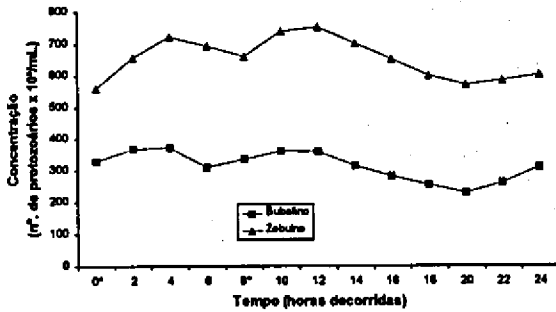


FIG. 1. Concentração média de *Entodinium* spp., no rúmen, no período de 24 horas, em bubalinos (Mediterrâneo) e zebuínos (Nelore). (* arraçamento).

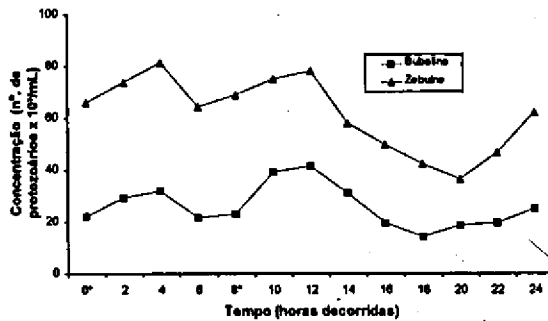


FIG. 2. Concentração média de *Epidinium* spp., no rúmen, no período de 24 horas, em bubalinos (Mediterrâneo) e zebuínos (Nelore). (* arraçamento).

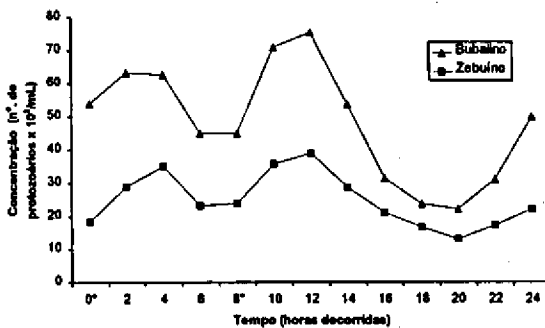


FIG. 3. Concentração média de *Diplodinium* spp., no rúmen, no período de 24 horas, em bubalinos (Mediterrâneo) e zebuínos (Nelore). (* arraçamento).

protozoários/mL em búfalos e 24.288 ± 2.003 protozoários/mL em Nelore), e às 8 horas, quando da oferta da segunda refeição (20.124 ± 3.213 /mL em búfalos e 26.369 ± 2.242 /mL em Nelore).

No gênero *Isotricha*, a interação espécie x tempo foi significativa ($p < 0,05$), apresentando seis horas após a primeira refeição, respectivamente em bubalinos e zebuínos, concentrações de 11.681 ± 2.367 protozoários/mL e 20.818 ± 2.736 protozoários/mL (Fig. 7).

Como ilustrado na Fig. 8 constatarem-se, na concentração média total de ciliados, diferenças significativas entre as espécies estudadas ($p < 0,05$) e tempos de amostragem ($p < 0,05$), mas tal significância não foi observada na interação entre espécies animais e tempo ($p > 0,05$). Verificou-se que a concentração média total de ciliados não diferiu ($p > 0,05$) entre as espécies animais às 12 horas, isto é, quatro

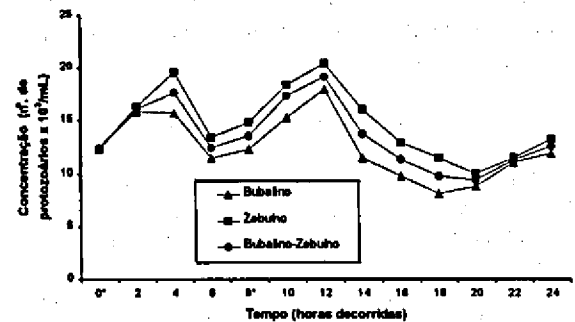


FIG. 4. Concentração média de *Eudiplodinium* spp., no rúmen, no período de 24 horas, em bubalinos (Mediterrâneo) e zebuínos (Nelore). (* arraçamento).

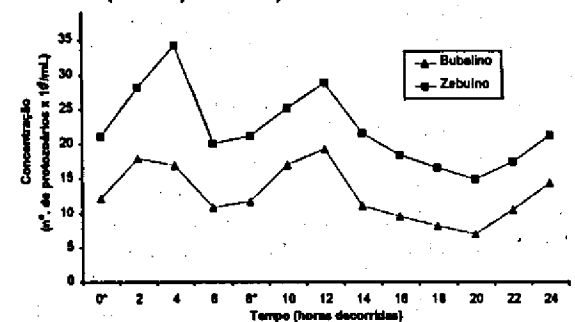


FIG. 5. Concentração média de *Ostracodinium* spp., no rúmen, no período de 24 horas, em bubalinos (Mediterrâneo) e zebuínos (Nelore). (* arraçamento).

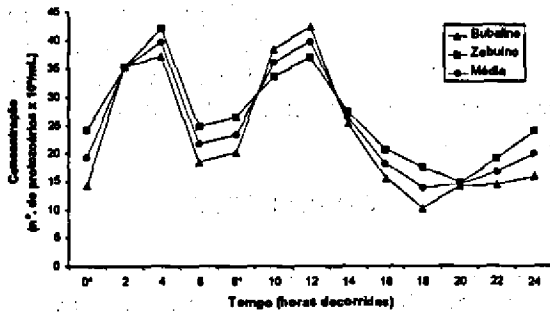


FIG. 6. Concentração média de *Dasytricha* spp., no rúmen, no período de 24 horas, em bubalinos (Mediterrâneo) e zebuínos (Nelore). (* arração).

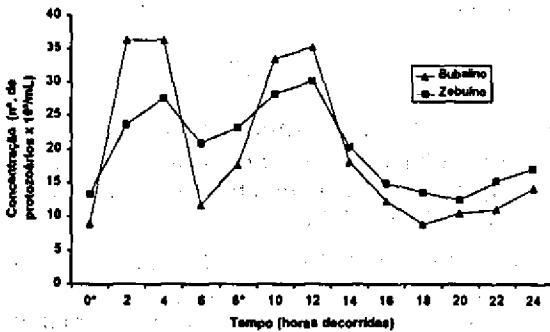


FIG. 7. Concentração média de *Isotricha* spp., no rúmen, no período de 24 horas, em bubalinos (Mediterrâneo) e zebuínos (Nelore). (* arração).

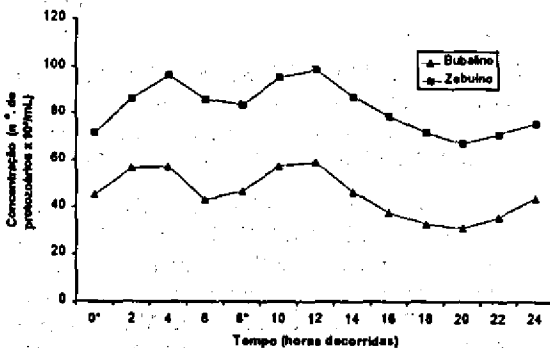


FIG. 8. Concentração média de protozoários ciliados, no rúmen, no período de 24 horas, em bubalinos (Mediterrâneo) e zebuínos (Nelore). (* arração).

horas após o segundo arração (585.775 e 729.915 ± 347.453/mL, respectivamente para búfalo e Nelore). A variabilidade das contagens entre os animais foi muito acentuada, identificada pelo erro padrão das médias. As curvas de concentração média de protozoários ciliados no período de 24 horas tiveram um comportamento praticamente idêntico entre as duas espécies, embora os zebuínos apresentassem concentrações numericamente superiores de protozoários ciliados.

Nos sete gêneros de ciliados estudados observou-se, em ambas as espécies animais, aumento na concentração de protozoários imediatamente após a alimentação matinal, atingindo um pico cerca de quatro horas após, e decrescendo nas horas subsequentes, e voltando a aumentar antes do novo arração, e novamente repetindo a condição anterior, ao contrário do que foi observado por Michalowski (1977) em búfalos alimentados uma vez ao dia. Todos os entodiniomorfos decresciam após a refeição (4 a 16 horas), aumentando vagarosamente até o momento que precedia nova oferta de alimentos; nos *Holotricha* foi observado o mesmo quadro, com decréscimo até 12 a 30 horas após a ingestão da ração. Franzolin Neto et al. (1988) também observaram reduções drásticas no número de ciliados no líquido ruminal quando substituíram duas por quatro refeições diárias.

Parece que o nível de proteína bruta na ração não favoreceu a elevação da densidade populacional de ciliados em búfalos, quando alimentados duas vezes ao dia, pois Franzolin Neto et al. (1991b) detectaram níveis mais altos de ciliados no momento do arração, decrescendo até 12 horas depois, e aumentando em seguida até o momento imediatamente anterior à primeira oferta da dieta. Entretanto, Kurar et al. (1988) obtiveram contagens de ciliados mais baixas antes da alimentação e aumentos até seis horas após arração de búfalos. Bragg et al. (1986) verificaram, na alimentação de novilhos, que os protozoários ciliados se mantiveram num nível altíssimo na frequência de oito refeições diárias, quando comparados aos novilhos que recebiam duas refeições, apesar de estes também apresentarem níveis elevados de ciliados imediatamente após o arração, como o observado neste experimento.

A marcante variação diurna na concentração dos protozoários ciliados do rúmen encontrada neste ensaio vem corroborar os dados apresentados por Clarke (1965). O autor encontrou valores de 2×10^9 protozoários totais/mL e duas horas depois o número detectado foi de 3×10^9 /mL, decrescendo em seguida até 14 horas, com tendência de elevação ($2,3 \times 10^9$ /mL) posteriormente, quando os bovinos eram alimentados uma vez ao dia. Dehority & Mattos (1978) arraçando um bovino da raça Flamenga, com volumosos, uma vez ao dia, apesar do número baixo de ciliados, obtiveram curva de concentração de protozoários no líquido ruminal semelhante à obtida neste trabalho. Foi observado que o gênero *Entodinium* teve um incremento na sua concentração duas horas após a alimentação, decrescendo a partir das 12 horas, para em seguida aumentar novamente nas horas que antecediam a nova alimentação. A variação diurna observada por Abe et al. (1981), com *Holotricha*, também concorda com os resultados deste experimento, pois foram observados por esses autores valores de $0,8 \times 10^4$ protozoários ciliados/mL às 9h30; $2,6 \times 10^4$ /mL, uma hora depois, diminuindo em seguida até a última observação feita às 13h30, que foi de $1,3 \times 10^4$ /mL.

Aparentemente, os resultados deste trabalho discordam dos observados por Purse & Moir (1959), que detectaram números decrescentes após a alimentação (de 787×10^3 /mL para 364×10^3 /mL), quatro a seis horas após a oferta de alimentos, somente vindo a atingir valores mais elevados 16 horas depois de oferecida a ração (543×10^3 /mL). Warner (1962) também detectou multiplicação celular nas horas que antecediam a alimentação às 8 horas, e não após. Franzolin Neto et al. (1991b) verificaram em búfalos valores totais de ciliados mais elevados no momento da alimentação ($10,3 \times 10^4$ /mL), com diminuição até 12 horas depois ($6,4 \times 10^4$ /mL), e sofrendo novo incremento até o momento da realimentação ($10,7 \times 10^4$ /mL). Franzolin Neto et al. (1991a) notaram em búfalos sob pastejo valores mínimo e máximo de *Entodinium* de $4,03 \times 10^4$ /mL e $7,52 \times 10^4$ /mL, e totais de ciliados de $7,14 \times 10^4$ /mL e $11,20 \times 10^4$ /mL, respectivamente, às 12 e zero horas. Com búfalo e bovino mestiço, Franzolin Neto et al. (1990) observaram números

elevados de ciliados antes da primeira refeição ($22,1 \times 10^4$ /mL e $24,7 \times 10^4$ /mL, respectivamente), com declínio em seguida, atingindo menores valores à noite ($6,13 \times 10^4$ /mL e $11,8 \times 10^4$ /mL, respectivamente).

CONCLUSÕES

1. Os zebuínos apresentam no rúmen maior concentração média total de protozoários ciliados do que os bubalinos, demonstrando melhores condições de adaptação ruminal a esses unicelulares.

2. Existe um comportamento diferenciado entre os gêneros de protozoários ciliados estudados, quando se oferece duas refeições diárias a intervalos de oito horas.

REFERÊNCIAS

- ABE, M.; IRIKI, N.T.; SHIBUI, H. Sequestration of holotrich protozoa in the reticulo-rumen of cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, v.41, n.3, p.758-765, 1981.
- BRAGG, D.S.A.; MURPHY, M.R.; DAVIS, C.L. Effect of source of carbohydrate and frequency of feeding on rumen parameters in dairy steers. *Journal of Dairy Science*, v.69, p.392-402, 1986.
- CLARKE, R.T.J. Diurnal variation in the numbers of rumen ciliate protozoa in cattle. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v.8, p.1-9, 1965.
- DEHORITY, B.A. Classification and morphology of rumen protozoa. Wooster: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1977. 82p.
- DEHORITY, B.A.; MATTOS, W.R.S. Diurnal changes and effect of ration on concentrations of the rumen ciliate *Charon ventriculi*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.36, n.6, p.953-958, 1978.
- FRANZOLIN NETO, R.; FRANZOLIN, M.H.T.; VELLOSO, L.; LIMA, C.G. Efeitos da *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit sobre a concentração de protozoários ciliados no rúmen de ovinos. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v.25, p.267-273, 1988.
- FRANZOLIN NETO, R.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; HERLING, V.R.; OLIVEIRA, M.E.M. Rumen ciliate protozoa in buffaloes grazing native pasture

- in Brazil. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 3., 1991, Varna. **Proceedings...** Sofia: International Buffalo Federation, 1991a. v.4, p.914-918.
- FRANZOLIN NETO, R.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; OLIVEIRA, M.E.M. Efeitos de dietas com diferentes níveis de proteína sobre os protozoários ciliados no rúmen de búfalos (*Bubalus bubalis* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.4, p.487-493, 1991b.
- FRANZOLIN NETO, R.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; ZANETTI, M.A. Avaliação dos protozoários ciliados no rúmen de búfalo e bovino. In: CONGRESSO MUNDIAL DE BUIATRIA, 16., 1990, Salvador. **Anais...** Salvador: Interlink Consultoria e Eventos, 1990. p.258-262.
- KURAR, C.K.; GUPTA, B.N.; MOHINI, M. Protozoal status in strained rumen liquor of cattle and buffaloes. **Indian Journal of Animal Science**, v.58, p.112-115, 1988.
- MICHALOWSKI, T. Diurnal changes in concentration of rumen ciliates and in occurrence of dividing forms in water buffalo (*Bubalus bubalis*) fed one daily. **Applied and Environmental Microbiology**, v.33, n.4, p.802-804, 1977.
- MICHALOWSKI, T. Effect of different diets on the diurnal concentrations of ciliate protozoa in the rumen of water buffalo. **Journal of Agricultural Science**, v.85, p.145-150, 1975.
- PURSE, D.B. A diurnal cycle for holotrich protozoa of the rumen. **Nature**, v.190, p.831-832, 1961.
- PURSE, D.B.; MOIR, R.J. Ruminant flora studies in the sheep: IX. The effect of pH on the ciliate population of the rumen "in vivo". **Australian Journal of Agricultural Research**, v.10, p.555-564, 1959.
- WARNER, A.C.I. Some factors influencing the rumen microbial population. **Journal of General Microbiology**, v.28, p.129-146, 1962.