

Influência da dieta no comportamento da população de ciliados do rúmen

(Influence of diet on the behavior of rumen ciliate population)

M. D'Agosto¹, M.R. Santa-Rosa², L.J.M. Aroeira³, F.C.F. Lopes³

¹Departamento de Zoologia, ICB, UFJF
36036-330 - Juiz de Fora, MG
e-mail: dagosto@icb.ufjf.br

²Instituto de Microbiologia, UFRJ
³CNPGL/EMBRAPA

RESUMO

Foram obtidas 270 amostras de conteúdo ruminal de três vacas mestiças Holandês-Zebu, fistuladas no rúmen, avaliando-se a influência de dietas em base de silagem de milho com 20, 30 e 40% de concentrado, sobre a população de ciliados do rúmen. Foram relacionados, com respectivas quantificações em cada dieta, ciliados das famílias Blepharocorythidae (*Charonina* Strand, 1928) com 2,78% do total de ciliados, Isotrichidae (*Isotricha* Stein, 1859 e *Dasytricha* Schuberg, 1888), com 1,68% e Ophryoscolecidae (*Entodinium* Stein, 1859, *Diplodinium* Schuberg, 1888, *Eodinium* Kofoid & MacLennan, 1932, *Eremoplastron* Kofoid & MacLennan, 1932, *Polyplastron* Dogiel, 1927, *Diploplastron* Kofoid & MacLennan, 1932 e *Ostracodinium* Dogiel, 1927), com 95,54% do total. A análise de variância seguida do teste de Tukey a 5% demonstrou que o total de ciliados nas dietas com 20, 30 e 40% de concentrado, respectivamente 252.666,67, 316.266,67 e 277.191,11, diferiram significativamente. Observou-se, ainda, influência do animal hospedeiro e da época de amostragem sobre a população de ciliados do rúmen.

Palavras-Chave: Ciliados do rúmen, bovino

ABSTRACT

Two hundred and seventy samples of rumen content were obtained from three rumen-fistulate crossbred Holstein Friesian-Zebu cows to evaluate the influence of diets of corn silage with 20, 30 and 40% of concentrate on rumen ciliate population. The following families of ciliates, and the respective relative quantifications for each diet, were reported: Blepharocorythidae (*Charonina* Strand, 1928) with 2.78% of the total of ciliates, Isotrichidae (*Isotricha* Stein, 1859 and *Dasytricha* Schuberg, 1888), with 1.68% and Ophryoscolecidae (*Entodinium* Stein, 1859, *Diplodinium* Schuberg, 1888, *Eodinium* Kofoid & MacLennan, 1932, *Eremoplastron* Kofoid & MacLennan, 1932, *Polyplastron* Dogiel, 1927, *Diploplastron* Kofoid & MacLennan, 1932 and *Ostracodinium* Dogiel, 1927), with 95.54% of the total. The analysis of variance followed by the 5% Tukey's test demonstrated that the average numbers of ciliates in diets consisting of 20, 30 and 40% of concentrate, respectively 252,666.67, 316,266.67 and 277,191.11, differed significantly. The results also indicate the influence of the host individual and the time of sampling on rumen ciliate population.

Keywords: Rumen ciliate, cattle

INTRODUÇÃO

Dentre os fatores que atuam sobre o comportamento da população de ciliados do rúmen destaca-se a dieta como um dos mais estudados. A flutuação do número de ciliados relaciona-se à natureza dos componentes da dieta (D'Agosto & Santa Rosa, 1993; D'Agosto et al., 1996), à quantidade e ao ato de ingerir alimento (Abe et al., 1981), à frequência ou restrição (Potter & Dehority, 1973) e ao intervalo de tempo após a alimentação (Dehority & Mattos, 1978; Ankhah et al., 1990). Além de atuar sobre a população dos ciliados do rúmen, também foram atribuídas às dietas variações morfológicas em algumas espécies de entodiniomorfidas (Chardez, 1983).

A importância dos ciliados e o papel que desempenham na microbiota ruminal foram tema de diversos estudos, que relacionaram às dietas a influência positiva ou negativa de sua presença no desenvolvimento dos hospedeiros. Segundo Bird & Leng (1978), a importância dos ciliados no crescimento e produtividade é influenciada pelo teor de proteína da dieta e sua presença teria efeito negativo na caso de dietas com baixo teor protéico, pois predariam as bactéria, responsáveis pela maior parte da síntese de proteína microbiana. Em dietas ricas em grãos, os ciliados desempenhariam papel benéfico no ecossistema ruminal (Nagaraja et al., 1992). De acordo com informações contidas em Williams & Coleman (1991), os protistas não são indispensáveis para a degradação de proteínas solúveis, mas tornam-se progressivamente mais importantes quanto mais insolúveis elas se tornam.

Este trabalho teve por objetivo conhecer os ciliados do rúmen de bovinos e procurou avaliar se eles foram qualitativa e quantitativamente influenciados por alterações na proporção dos constituintes da dieta em base de silagem de milho e concentrado.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (CNPGL) EMBRAPA, situado no Município de Coronel Pacheco, MG e no Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Foram utilizadas três vacas mestiças Holando-Zebu (A1, A2 e A3) fistuladas no rúmen, em lactação, com idade média de seis anos e peso entre 470 e 500kg, mantidas no CNPGL.

Antes de se iniciar o trabalho os animais foram alimentados com dieta de silagem de milho, capim elefante e concentrado proteico, fornecida duas vezes ao dia. Em preparação para o experimento, receberam durante uma semana, pela manhã, 36kg de silagem de milho mais 2kg de farelo de algodão. Água foi fornecida *ad libitum*.

As dietas (D1, D2, D3), constituídas de concentrado (57% de fubá de milho, 40% de farelo de soja, 02% de calcáreo e 01% de sais minerais) e silagem de milho, tinham a seguinte relação entre a matéria seca (MS) da silagem e do concentrado: (D1) = 30,0kg de silagem de milho (80% MS) + 2,5kg de concentrado (20% MS), (D2) = 25,25kg de silagem de milho (70% MS) + 3,75kg de concentrado (30% MS) e (D3) = 22,5kg de silagem de milho (60% MS) + 5,0kg de concentrado (40% MS).

O experimento constou de três fases (F1, F2, F3), com duração de uma semana cada, precedidas por períodos de adaptação de duas semanas, quando se introduziram as dietas a serem testadas (20, 30 e 40% de concentrado). Em F1 cada animal recebeu uma das três dietas, e nas fases subsequentes as dietas eram trocadas entre os animais.

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 System), calculando-se médias com desvios padrão. Foram feitas análises de variância seguidas do teste de Tukey a 5%.

Foram obtidas 270 amostras de conteúdo ruminal, através de fistulas, pela manhã, antes do fornecimento das dietas. Em cada fase do experimento foram obtidas 30 amostras por animal, 15 dias após se introduzir a mudança da dieta. As amostras consistiram de 20ml de líquido ruminal obtido por aspiração, às quais foi adicionado volume aproximado de 20cm³ de conteúdo ruminal, recolhido do centro da massa

ruminal. As amostras foram mantidas em recipientes individualizados, homogenizadas e conservadas segundo Dehority (1984). Imediatamente 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 segundo técnica proposta por Dehority (1984) modificada por D'Agosto & Carneiro (1995). As contagens expressaram o número de ciliados por mililitro de conteúdo ruminal. A identificação dos ciliados baseou-se em Ogimoto & Imai (1981). Foram adotadas as subfamílias de Ophryoscolecidae propostas por Lubinsky (1957) e para a identificação dos gêneros de Diplodiinae, a proposta de Kofoid & MacLennan (1932), também seguida por Ogimoto & Imai (1981).

RESULTADOS

Constatou-se a presença dos seguintes ciliados: família Blepharocorythidae, com o gênero *Charonina* Strand, 1928; família Isotrichidae, com *Isotricha* Stein, 1859 e *Dasytricha* Schuberg, 1888; família Ophryoscolecidae, com duas subfamílias Entodiinae, com *Entodinium* Stein, 1859 e Diplodiinae com os gêneros *Diplodinium* Schuberg, 1888, *Eodinium* Kofoid & MacLennan, 1932, *Eremoplastron* Kofoid & MacLennan, 1932, *Polyplastron* Dogiel, 1927, *Diploplastron* Kofoid & MacLennan, 1932 e *Ostracodinium* Dogiel, 1927. Os três últimos 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 Tab. 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, 2,78% da Blepharocorythidae e 1,68% da Isotrichidae.

Tabela 1. Total de ciliados do rúmen de três bovinos (por ml de conteúdo ruminal) e respectivo percentual, por família dos organismos observados e subfamília de Ophryoscolecidae

Família	Subfamília	Subtotal n. (%)	Total n. (%)
Blepharocorythidae			23.520,00 (2,78)
Isotrichidae			14.235,56 (1,68)
Ophryoscolecidae			808.368,88 (95,54)
	Entodiinae	706.693,33 (87,42)	
	Diplodiinae	101.675,55 (12,58)	
Total			846.124,44 (100)

Na Tab. 2 são apresentados os gêneros de ciliados e respectivos valores médio e total, valores mínimo e máximo, desvios padrão e percentuais em relação ao total de protistas estimados por dieta. Destaca-se que o número total de ciliados diferiu significativamente entre as três variações de dieta testadas.

O valor médio do número de protistas e de cada gênero, analisados segundo a dieta, revelaram maior concentração total de ciliados na dieta com 30% de concentrado, com 37,38% do total, seguida pela dieta com 40% de concentrado, com 32,76%, e pela dieta com 20% de concentrado, com 29,86%, constatando-se variação significativa entre as três dietas (Tab. 3). Os valores mais elevados da maioria dos grupos de ciliados foram observados na dieta com 30% de concentrado, com exceção de *Dasytricha* e de *Eremoplastron*, significativamente maiores na dieta com 40% de concentrado. Ressalta-se que organismos do gênero *Dasytricha* foram observados apenas em A1 e, dessa forma, os dados apresentados nas três dietas relacionam-se exclusivamente a este animal. A variação das dietas resultou em diferença significativa nas populações de *Diplodinium* e de *Eremoplastron* nas três situações testadas, diferindo, ainda, entre as dietas com 20 e 30% em relação à dieta com 40% de concentrado nas populações de *Dasytricha*, P+D+O, *Eodinium* e *Charonina*, entre as dietas com 30 e 40% em relação à dieta com 20% de concentrado na população de *Isotricha* e entre as dietas com 20 e 40% em relação à dieta com 30% de concentrado na de *Entodinium* (Tab. 3).

Tabela 2. Valores mínimo, máximo, médio, percentual e desvio padrão de cada gênero de citados do rumen de três bovinos (ml de conteúdo ruminal), por dieta

Citado	20% concentrado				30% concentrado				40% concentrado			
	Mínimo	Máximo	Média	D. Padrão	Mínimo	Máximo	Média	D. Padrão	Mínimo	Máximo	Média	D. Padrão
Enterodinium (n) (%)	83.200	430.400	215.511,11	70.578,07	102.400	416.000	264.244,44	67.110,41	56.000	497.600	226.937,78	109.588,14
Isotricha (n) (%)	0	19.200	3.084,44	3.657,66	0	20.800	5.111,11	3.901,30	0	19.200	4.911,11	4.430,95
Dasytricha (n) (%)	0	1.600	53,33	287,61	0	3.200	195,56	612,57	0	8.000	880,00	1.670,00
Diplodinium (n) (%)	0	28.800	7.555,56	6.148,96	0	81.600	15.520,00	16.145,43	0	57.600	12.035,56	15.445,74
P+D+O* (n) (%)	0	44.800	8.982,22	6.836,03	0	28.800	8.102,22	5.936,13	0	25.600	6.631,11	5.302,22
Eremoplastron (n) (%)	0	33.600	5.137,78	7.733,02	0	51.200	8.671,11	11.155,55	0	73.600	13.648,89	17.337,25
Eodinium (n) (%)	0	30.400	4.386,67	3.662,39	0	20.800	5.044,44	4.244,64	0	20.800	5.960,00	4.890,35
Charonina (n) (%)	0	46.400	7.935,56	8.389,29	0	36.800	9.377,78	8.415,32	0	17.600	6.186,67	3.832,34
Total			252.666,67				316.366,67				277.191,11	

n= 90 amostras em cada dieta
 * Polyplastron + Diplodinium + Ostracodinium.

Tabela 3. Valores médio, total e percentual por gênero de ciliados do rúmen de três bovinos, em cada dieta

Ciliado		20%	30%	40%	Total
		concentrado			
Entodinium	(n)	215.511,11a	264.244,44b	226.937,78c	706.693,33
	(%)	85,29	83,55	81,87	83,52
Isotricha	(n)	3.084,44a	5.111,11b	4.911,11b	13.106,66
	(%)	1,22	1,62	1,60	1,55
Dasytricha	(n)	53,33a	195,56a	880,00b	1.128,89
	(%)	0,02	0,06	0,32	0,13
Diplodinium	(n)	7.555,56a	15.520,00b	12.035,56c	35.111,12
	(%)	2,99	4,91	0,73	4,15
P+D+O*	(n)	8.932,22a	8.102,22a	6.631,11b	23.715,55
	(%)	3,56	2,56	2,39	2,80
Eremoplastron	(n)	5.137,78a	8.671,11b	13.648,89c	27.457,78
	(%)	2,03	2,74	4,92	3,25
Eodinium	(n)	4.386,67a	5.044,44a	5.960,00b	15.391,11
	(%)	1,74	1,60	2,15	1,82
Charonina	(n)	7.955,56a	9.377,78a	6.186,67b	23.520,01
	(%)	3,15	2,97	2,23	2,78
Total	(n)	252.666,67a	316.266,66b	277.191,12c	846.124,45
	(%)	29,86	37,38	32,76	

Médias na mesma linha seguidas por letras desiguais diferem entre si (P<0,05)
Polyplastron + Diploplastron + Ostracodinium.

Na Tab. 4 são apresentados os dados referentes ao total de ciliados registrados por dieta e em cada dieta por animal e os respectivos percentuais.

Tabela 4. Valores médio e total de ciliados do rúmen de três bovinos (por ml de conteúdo ruminal) de acordo com o hospedeiro e a dieta e respectivo percentual em relação ao total de ciliados por dieta.

Animal		20%	30%	40%	Total
		concentrado			
A1	(n)	186.226,67	331.173,33	251.226,67	768.826,67
	(%)	24,57	34,90	30,24	30,29
A2	(n)	340.760,00	370.000,00	459.586,67	1.170.346,67
	(%)	44,96	39,00	55,27	46,11
A3	(n)	231.013,33	247.626,67	120.560,00	599.200,00
	(%)	30,48	26,10	14,50	23,61
Total	(n)	758.000,00	948.800,00	831.573,34	2.538.373,34
	(%)	29,86	37,38	32,76	

Na Tab. 5 são apresentados os dados referentes ao total de ciliados registrados por dieta e em cada dieta por fase do experimento e os respectivos percentuais.

DISCUSSÃO

A preponderância de organismos do gênero *Entodinium* nas três dietas foi o principal fator que influenciou na relação entre os valores totais. Os elevados percentuais observados desse gênero

coincidem com a maior parte dos levantamentos sobre ciliados do rúmen. Dentre estes, na mesma localidade em que foi desenvolvido o presente trabalho, D'Agosto et al. (1996) registraram diferença significativa no número total de ciliados em bovinos mantidos com duas dietas, influenciada pelo elevado número de organismos do gênero *Entodinium*. Há, entretanto, dados discrepantes para essas concentrações, como os relatados por Clarke (1964), que registrou percentuais de 8,0 e 35,4, e por Dehority (1986), entre 42,2% e 84,6%.

Tabela 5. Valores médio e total de ciliados do rúmen de três bovinos por fase e dieta e respectivo percentual em relação ao total de ciliados por animal

Fase		20%	30%	40%	Total
		concentrado			
F1	(n)	186.236,67	370.000,00	120.560,00	676.786,67
	(%)	24,57	39,00	14,50	26,66
F2	(n)	340.760,00	247.626,67	251.426,67	839.813,34
	(%)	44,96	26,10	30,24	33,09
F3	(n)	231.013,33	331.173,33	459.586,67	1.021.773,33
	(%)	30,48	34,90	55,27	40,25
Total	(n)	758.000,00	948.800,00	831.573,34	2.538.373,34
	(%)	29,86	37,38	32,76	

Além da diferença significativa entre os totais de ciliados, a influência da variação da dieta pôde ser observada, dentre outras, nas populações de

Diplodinium e de *Eremoplastron*, nas três situações testadas.

Notou-se, ainda, maior valor absoluto de isotríquídeos na dieta com 40% de concentrado, sendo este mais elevado para *Isotricha* na dieta com 30% de concentrado e para *Dasytricha* na dieta com 40% de concentrado. Apesar dos valores totais de *Isotricha* diferirem significativamente entre as três dietas, a proporção de organismos deste gênero em relação ao total de ciliados aferidos por dieta foi bastante semelhante. De tal forma, não foi possível detectar qualquer influência da dieta sobre essas populações.

Destaca-se que o número médio total de isotríquídeos, bem como o respectivo percentual em relação aos outros grupos de ciliados, foi bastante reduzido (Tab. 1). Esse fato pode ser atribuído à amostragem ter se dado antes da alimentação, quando se observa a menor concentração de isotríquídeos (Abe et al., 1981; Murphy et al., 1985). Há, entretanto, divergências quanto a essa flutuação antes da alimentação, conforme Dehority & Mattos (1978). Ainda de acordo com Murphy et al. (1985), as variações nesse padrão podem estar relacionadas a outros fatores, como o tipo da forragem, o que implicaria em piques diferentes de ruminação. Além disso, as altas variações da concentração de isotríquídeos observadas por Clarke (1964) independem da dieta, do animal ou da época da amostragem, demonstrando não serem claros os fatores que atuam sobre as populações desses ciliados.

Os dados registrados para *Isotricha* e *Dasytricha* são bastante inferiores aos assinalados por Arcuri et al. (1991) e por D'Agosto et al. (1996), tanto em relação aos valores médios, quanto em função dos percentuais em relação ao total de ciliados (Tab. 3). Essa diferença pode ser justificada pela influência positiva sobre o número de isotríquídeos em dietas acrescidas de uréia ou ricas em carboidratos solúveis, como por exemplo amido, maltose e sacarose, encontradas na cevada, cana-de-açúcar e melaço (D'Agosto et al., 1990; D'Agosto et al. 1996).

O percentual de organismos da família Blepharocorythidae coincidiu com os registrados

por Dehority (1986), na maioria dos bovinos examinados por este autor, no Brasil.

A maior concentração de ciliados foi observada na dieta com 30% de concentrado nos animais A1 e A3. Entretanto, independente da dieta, A2 apresentou a maior concentração de ciliados em relação aos outros animais, o que demonstra não ser conclusiva a influência das variações da dieta testada. (Tab. 4).

Com relação às fases (Tab. 5), apesar do número total de ciliados ao longo do experimento apresentar uma tendência crescente, ela não foi constante em todas as dietas e, provavelmente, foi influenciada pela tendência individual dos hospedeiros em abrigar maior ou menor número de ciliados.

Assim, os dados obtidos indicam que dieta, hospedeiro e época de obtenção das amostras devem ser considerados nos estudos com ciliados do rúmen devido à grande complexidade de suas interações. Entretanto, nas condições testadas, não foi possível precisar a influência das variações da dieta sobre as populações observadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Marcus Cordeiro Durães, pesquisador do CNPGL/EMBRAPA, pelo auxílio na análise estatística.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, M., IRIKI, T., TOBE, N. et al. Sequestration of holotrich protozoa in the reticulo-rumen of cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.41, p.758-765, 1981.
- ARCURI, P.B., AROEIRA, L.J.M., D'AGOSTO, M. et al. Efeito do farelo de algodão na população de protozoários do rúmen de bovinos alimentados com cana mais 1% de uréia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 28, 1991, João Pessoa. Viçosa: Sociedade Bras. Zootec., 1991.
- ANKRAH, P., LOERCH, S.C., DEHORITY, B.A.. Sequestration migration and lysis of protozoa in the rumen. *J. Gen. Microbiol.*, v.136, p.1869-1875, 1990.
- BIRD, S.H., LENG, R.A.. The effects of defaunation of the rumen on the growth of cattle on low

- protein high energy diets. *Br. J. Nutr.*, v.40, p.163-167, 1978.
- CHARDEZ, D. Sur la variabilité de deux espèces d'Ophryoscolecidae (Ciliophora, Entodiniomorphidae). *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, v.18, p.257-264, 1983.
- CLARKE, R.T.J. Ciliates of the rumen of domestic cattle (*Bos taurus* L.). *N.Z. Agric. Res.*, v.7, p.248-257, 1964.
- D'AGOSTO, M., CARNEIRO, M.E.. Avaliação do emprego da solução de lugol na quantificação de ciliados do rúmen. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.4, Supl. 1, p.172, 1995.
- D'AGOSTO, M., SANTA-ROSA, M.R. Effects of diet and host on the rumen ciliate populations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.88, p.315, 1993.
- D'AGOSTO, M., ARCURI, P.B., CARNEIRO, M.E. Ciliates in the rumen of steers fed sugar cane based diets. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.85, p.132, 1990.
- D'AGOSTO, M., CARNEIRO, M.E., NETTO, C.M.M. et al. Avaliação dos ciliados do rúmen de bovinos mantidos com duas dietas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.48, p.353-361, 1996.
- DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen Protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.48, p.182-185, 1984.
- DEHORITY, B.A., MATTOS, W.R.S. Diurnal changes and effect of ration on concentrations of the rumen ciliate *Charon ventriculi*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.36, p.953-958, 1978.
- KOFOID, C.A., MacLENNAN, R.F. Ciliates from *Bos indicus* Linn. II. A revision of *Diplodinium* Schuberg. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, v.37, p.53-152, 1932.
- LUBINSKY, G. Studies on the evolution of the Ophryoscolecidae (Ciliata: Oligotricha). III. Phylogeny of the Ophryoscolecidae based on their comparative morphology. *Can. J. Zool.*, v.35, p.141-159, 1957.
- MURPHY, M.R., DRONE Jr., P.F., WOODFORD, S.T. Factors stimulating migration of holotrich protozoa into the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.49, p.1329-1331, 1985.
- NAGARAJA, T.G., TOWNE, G., BEHARKA, A.A. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, p.2410-2414, 1992.
- OGIMOTO, K., IMAI S. *Atlas of rumen microbiology*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1981. 231p.
- POTTER, E.L., DEHORITY, B.A. Effects of changes in feed level, starvation, and level of feed after starvation upon the concentration of rumen protozoa in the ovine. *Appl. Microbiol.*, v.26, p.692-698, 1973.
- WILLIAMS, A.G. COLEMAN, G.S. *The rumen protozoa*. New York: Springer-Verlag, 1991. 423p.