

AVALIAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS DO LÍQUIDO RUMINAL DE OVINOS DAS RAÇAS MERINO AUSTRALIANO E CORRIEDALE, CRIADOS EM REGIME EXTENSIVO DE PASTAGEM NO MUNICÍPIO DE BOTUCATU – SP

*Francisco Leydson Formiga Feitosa¹, Mary Marcondes Feitosa¹,
Clóvis Teixeira de Almeida², Raimundo de Souza Lopes², Luiz Cláudio Nogueira Mendes¹,
Juliana Regina Peiró¹, João Otávio Abujamra³*

RESUMO

O presente experimento teve como objetivo estabelecer padrões para a avaliação microscópica e contagem dos protozoários do líquido ruminal de ovinos das raças Merino Australiano e Corriedale, criados em regime de pastagem em duas épocas do ano (inverno e verão), no município de Botucatu – SP. Foram utilizados 103 animais no inverno, sendo 50 ovelhas da raça Corriedale e 53 da raça Merino Australiano, e 107 animais no verão, com 52 ovelhas pertencentes à raça Corriedale e 55 à raça Merino Australiano, criadas em regime extensivo de pastagem. As amostras foram obtidas por meio de sonda esofágica. Observou-se uma grande densidade de protozoários pequenos, médios e grandes, com uma mobilidade bastante ativa, não se verificando diferenças entre as raças e estações do ano. Os resultados obtidos para a contagem de protozoários na raça Merino Australiano no inverno e no verão foram, respectivamente, $39,85 \pm 22,57$ e $183,67 \pm 103,81 \times 10^3$ /ml. Os resultados observados para os ovinos da raça Corriedale, no inverno e no verão foram, respectivamente, $39,05 \pm 27,61$ e $149,55 \pm 86,83 \times 10^3$ /ml.

Palavras-chave: Líquido Ruminal, protozoários, ovinos, Merino Australiano, Corriedale.

INTRODUÇÃO

Ortolani (1980) sugeriu que o rúmen deva

ser imaginado como uma câmara de fermentação que, fisiologicamente, está numa constante atividade metabólica, sendo os principais efetores deste metabolismo as bactérias, protozoários e leveduras, adaptados ao meio ruminal, em que o substrato é o alimento ingerido ou armazenado, e o mediador é o ruminante, que controla essa marcha por meio de uma série de respostas orgânicas. A população microbiana, por sua vez, pode ser alterada em situações distintas relacionadas principalmente com a intensidade do pastejo, época do ano e, eventualmente, quando forem mantidos exclusivamente em pastagens de gramíneas (NGHE'THE; BOX, 1976).

É interessante que os resultados da função ruminal sejam avaliados levando-se em consideração a época do ano e o tipo de pastagem, sem, no entanto, desprezar a raça, haja vista que os dois primeiros fatores influenciam de forma clara os parâmetros obtidos (FIGUEIREDO; QUADROS; DA CRUZ, 2000). A manutenção de condições adequadas no complexo retículo-rúmen, tais como pH, anaerobiose, umidade e temperatura é fundamental para o desenvolvimento contínuo da população microbiana. Os aspectos relacionados com as alterações dietéticas, dentro de um contexto patológico tem sido uma das principais causas do aumento de ocorrência de alterações metabólicas nos reservatórios gástricos. Desse modo, o exame laboratorial do suco de rúmen é essencial para promover o diagnóstico das alterações da digestão nos pré-estômagos, contribuindo não só no estabelecimento do tratamento das afecções fermentativas, como também na avaliação de sua eficácia. Alonso (1979)

¹ Médico Veterinário. Professor Assistente Doutor. Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal. Curso de Medicina Veterinária/FO – Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho/UNESP. Rua Clóvis Pestana, 793, 16050.680. Araçatuba, SP.

² Médico Veterinário. Professor Assistente Doutor. Departamento de Clínica. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/FMVZ – Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho/UNESP. Botucatu, SP

³ Médico Veterinário. Residente Hospital Veterinário "Luiz Quintiliano de Oliveira"/FO/UNESP. Araçatuba, SP

comentou que, para cada localidade geográfica dever-se-ia ser estabelecido um padrão das características do conteúdo ruminal, pois o tipo de dieta, o manejo e o clima, exercem influência sobre a composição do mesmo.

Apesar da literatura referente à avaliação do líquido ruminal em bovinos ser relativamente extensa existe, ainda, uma limitação no estudo do suco de rúmen de ovinos criados em nossas condições climáticas e de manejo, já que, a maioria dos trabalhos científicos, foram e são realizados em outros países. Os transtornos da atividade dos pré-estômagos, muitas vezes são acompanhados de variações características da população de protozoários, de maneira que o estudo do suco ruminal, no que se refere a avaliação da atividade dos protozoários e a determinação do número de protozoários, sobretudo de seus desvios dos valores normais permite tirar conclusões sobre a existência de anormalidades digestivas. Dessa forma, este trabalho foi planejado com os seguintes objetivos: (1) contribuir no estabelecimento dos padrões de referência para a avaliação microscópica dos protozoários do líquido ruminal de ovinos clinicamente saudáveis, das raças Merino Australiano e Corriedale criados em regime extensivo de pastagem; (2) verificar as possíveis mudanças dessas variáveis com relação à época do ano; e (3) observar a existência de variações entre raças nas duas épocas do ano (verão e inverno).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados: Este trabalho foi realizado na Fazenda Edgardia, de propriedade da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, na cidade de Botucatu, Estado de São Paulo. Foram utilizados 103 animais no inverno, sendo 50 ovelhas da raça Corriedale e 53 da raça Merino Australiano, e 107 animais no verão, com 52 ovelhas pertencentes à raça Corriedale e 55 à raça Merino Australiano. Os animais apresentavam idade entre dois e quatro anos e eram submetidos a uma dieta básica de forragem verde, constituída exclusivamente de *Cynodon dactylon* (L) Pers e a ingestão de água "ad libitum", mimetizando as condições de criação extensiva. Antes do início do experimento os animais receberam tratamento anti-helmíntico⁴ e foram observados clinicamente a fim de comprovar o estado de higidez do rebanho, segundo Feitosa (2004).

Colheita das amostras: As colheitas das amostras foram realizadas nos meses de janeiro (verão), na época das chuvas, e de julho (inverno), na época da seca, das 9:00 às 10:00 horas, invariavelmente. Foram feitas duas colheitas em cada animal (uma em cada estação), ao longo de cada mês (janeiro e julho) obtendo-se cerca de 210 amostras analisadas. De maneira geral, os mesmos animais foram utilizados nos dois períodos do ano. As amostras, variando de 400 a 500 ml de líquido ruminal foram obtidas mediante a introdução de uma sonda esofágica, adaptada a uma bomba de vácuo⁵, no rúmen. As amostras obtidas eram imediatamente transferidas para garrafas térmicas individuais, segundo Zambrano (1975), previamente aquecidas com água à temperatura de 39°C. As garrafas eram então imediatamente fechadas, procurando-se, dessa maneira, evitar mudanças bruscas na temperatura e contato com o ar atmosférico. As amostras permaneciam nas garrafas até a realização das provas.

Avaliação dos protozoários: Os protozoários foram avaliados pelo exame direto em uma lâmina aquecida, observando-se a densidade (abundante, moderada, pouca e nenhuma) levando-se em consideração a proporção de pequenos, médios e grandes, como também a proporção entre infusórios vivos (ativos) e mortos, e pela contagem global, utilizando-se uma câmara de Fuchs-Rosenthal, de acordo com Rosenberger, (1993).

Análise da Pastagem: Foi realizada a análise da pastagem para a determinação da porcentagem de proteína bruta nas duas estações do ano, segundo o método convencional de análises (Weende), de acordo com AOAC (1984).

Análise Estatística: A contagem de protozoários foi avaliada nas duas raças (Corriedale e Merino Australiano), no inverno e verão. Os procedimentos efetuados foram: a) Estudo descritivo das variáveis (contagem de protozoários e pH) por raça e em cada época do ano, calculando-se a média (\bar{x}), desvio padrão (s), coeficiente de variação (cv) e intervalo de confiança da média a 95% (LI: limite inferior e LS: limite superior); b) Comparação da contagem de protozoários entre inverno e verão, utilizando-se o teste t para amostras pareadas (BERQUÓ; SOUZA; GOTLIEB, 1980); c) Compa-

⁴ Ripercol Injetável – Cynamid Química do Brasil

⁵ Bomba de sucção ruminal – H. Hauptner – Solingen

Tabela 1. Contagem de protozoários ($\times 10^3$ protozoários/ml) e valor do pH do líquido ruminal de ovinos das raças Merino Australiano e Corriedale, no inverno (INV) e verão (VER). Média (\bar{x}), desvio padrão (s) e intervalo de confiança da média a 95% : Limite inferior (LI) e Limite superior (LS). Botucatu-SP

GRUPOS	Nº Animais	PROTOZOÁRIOS		pH	
		$\bar{X} \pm s$	LI – LS	$\bar{X} \pm s$	LI – LS
Merino (INV)	53	39,85 \pm 22,57	33,73 – 45,96	6,69 \pm 0,20	6,64 – 6,96
Corriedale (INV)	50	39,05 \pm 27,61	31,35 – 46,74	6,70 \pm 0,21	6,64 – 6,97
Merino (VER)	55	183,67 \pm 103,81	155,01 – 212,34	6,75 \pm 0,23	6,69 – 7,02
Corriedale (VER)	52	149,55 \pm 86,83	124,87 – 174,24	6,84 \pm 0,28	6,76 – 7,11

Tabela 2. Comparações, estatísticas e comentários entre as raças (Merino Australiano e Corriedale) e a época do ano (inverno – INV / verão VER) obtidos da avaliação da contagem de protozoários e dos valores de pH do líquido ruminal de ovinos. Botucatu-SP

VARIÁVEIS/COMPARAÇÕES	PROTOZOÁRIOS		pH	
	Estatística	Comentários	Estatística	Comentários
Merino x Corriedale (INV)	$z = 0,38$; $p > 0,50$	Merino = Corriedale	$t = 0,187$; $0 > 0,50$	Merino = Corriedale
Merino x Corriedale (VER)	$z = 1,79$; $0,05 < p < 0,10$	Merino > ou = Corriedale	$t = 1,766$; $0,05 < p < 0,10$	Merino = Corriedale
INV x VER (Merino)	$z = 8,520$; $p < 0,001$	Verão > Inverno	$t = 1,330$; $p < 0,10$	Inverno = Verão
INV x VER (Corriedale)	$z = 8,015$; $p < 0,001$	Verão > Inverno	$t = 2,828$; $p < 0,01$	Inverno < Verão

ração da contagem de protozoários entre raças, utilizando-se o teste t para amostras independentes (BERQUÓ; SOUZA; GOTLIEB, 1980). Em todas as comparações efetuadas, as estatísticas calculadas foram consideradas significativas quando o nível de significância (p) resultou menor que 5% ($p < 0,05$). Quando $0,05 < p < 0,10$ foi referida tendência à significância.

RESULTADOS

A análise da pastagem nos meses de inverno e verão demonstrou uma porcentagem de proteína bruta de 5,36 e 9,43, respectivamente.

Observou-se, à avaliação direta de uma gota da amostra em uma lâmina de esfregaço, uma grande densidade de protozoários, com uma mobilidade bastante ativa, tanto no inverno como no verão. Constatou-se em todas as amostras a presença de protozoários pequenos, médios e grandes.

Os valores médios, desvios-padrão, coeficiente de variação e valores mínimos e máximos da contagem de protozoários e do pH do conteúdo ruminal de ovinos da raça Merino Australiano e Corriedale encontram-se nas tabelas 1 e 2.

DISCUSSÃO

A avaliação da densidade e da atividade dos protozoários no líquido ruminal é um sensível indicador da normalidade da amostra e, conseqüentemente, da capacidade digestiva do compartimento reticuloruminal (FEITOSA, 2004). Microscopicamente, ambos os tipos de protozoários, ciliados e flagelados, variando de tamanho e forma estão presentes no líquido ruminal, com os protozoários ciliados superando, em concentração, os flagelados. Um animal saudável apresenta em seu líquido ruminal uma grande variedade de tamanhos de protozoários, com uma atividade bastante exacerbada, comprovada pela simples observação, ao microscópio, de uma gota fresca do líquido ruminal em uma lâmina previamente aquecida. Por outro lado, nos animais com distúrbios digestivos ocorre uma grande redução no número de protozoários e de sua atividade. A alta densidade dos protozoários observada em todas as amostras ruminais denota a necessidade de uma contagem dos mesmos, já que não foram observadas diferenças na densidade entre os meses de inverno e verão, evidenciadas pela contagem global. Vale ressaltar que a avaliação

da densidade foi feita única e somente em animais saudáveis. Dessa forma, a averiguação qualitativa de diferenças macroscópicas das amostras avaliadas torna-se difícil nessa situação, em particular, por estarem os protozoários ainda vivos e, consequentemente, extremamente ativos. Certamente, se tais amostras fossem comparadas à de animais apresentando distúrbios digestivos, tal diferença seria notória e de fácil constatação, em virtude da menor quantidade observada e da maior taxa de microorganismos mortos e/ou inativos desses últimos. A mobilidade ativa da quase totalidade dos protozoários reforça as afirmações de Leek (1983) e Garry (1990), que disseram tratar-se de um indicador da normalidade da amostra.

Os dados publicados na literatura sobre a contagem total de protozoários por mililitro de fluido ruminal são muito conflitantes. Os valores obtidos neste experimento, tanto nos meses de inverno quanto nos de verão são inferiores aos relatados por Potter; Dehority (1973), Dehority (1978), Harfoot (1981) e Marinho (1983), e semelhantes aos relatados por Baumgartner (1983).

Verificou-se que o número total de protozoários foi significativamente maior no verão em relação ao inverno, confirmando os relatos de Koval, citado por Crha; Striz (1977), Dehority; Orpin (1988) e Figueiredo; Quadros; Da Cruz (2000). O aumento no número total de protozoários coincidiu com as maiores porcentagens de proteína no pasto (5,36% no inverno e 9,43% no verão), concordando com as afirmações de Purser; Moir (1959), que afirmaram que o número de microorganismos aumenta em relação direta com a quantidade de pastos verdes, e que ovinos a pasto apresentam alterações sazonais consideráveis na densidade da população de protozoários ruminais; uma densidade baixa associada com um pasto seco, e uma densidade alta quando os pastos estão verdes. Os autores sugerem que as alterações na densidade de protozoários ocorram em resposta a variações na composição química do pasto, e que o aumento no número total de protozoários está associado com um maior aporte protéico neste período.

Apesar de no verão ter sido observada estatisticamente uma tendência dos valores da raça Merino Australiano serem maiores do que os da raça Corriedale, novos estudos devem ser realizados para verificar se existe ou não tal diferença, já que durante o inverno a contagem global de protozoários não diferiu estatisticamente entre as duas raças.

Segundo Warner (1962a) e Dehority (1978), as diferenças na contagem global de protozoários

podem ser causadas por alterações no volume do fluido ruminal e não propriamente no número de protozoários. Esta não deve ser a explicação para as diferenças ocorridas no presente experimento, uma vez que os maiores valores foram obtidos durante o verão, quando há um aumento da ingestão de água pelos animais, levando a maior diluição no conteúdo do fluido ruminal.

O estudo dos fatores que determinam a variabilidade da população de protozoários ruminais permitiu a Warner (1962b), Christiansen; Woods; Burroughs, (1964), Abe; Shibui; Iriki, (1973), Clarke, citado por Nogueira Filho (1981) e Bonhomme (1990), estabelecerem que fatores alimentares, tais como a composição química da dieta, a quantidade administrada, a natureza física do alimento, o número de refeições por dia e o intervalo entre as refeições influenciam a diversidade e o número de protozoários ruminais. Esses fatores devem ser considerados quando da realização da contagem global de protozoários. Alterações na frequência de alimentação, de uma a duas vezes ao dia causam um aumento no número de protozoários ruminais, como descrito por Michalowsky; Muszynski (1978), o que evidencia a necessidade de uma padronização dos valores normais de protozoários para os diferentes manejos alimentares.

Nos animais estudados não foi constatada qualquer influência das raças sobre os valores do pH do líquido ruminal. Não se observaram diferenças desses valores para ovinos da raça Merino Australiano nas duas épocas do ano e, apesar de verificada estatisticamente a existência de diferenças entre os valores do pH com relação aos ovinos da raça Corriedale nas duas estações, essas diferenças não devem ser levadas em consideração na prática, pois não apresentam significado biológico. É sabido que os protozoários são os microorganismos mais sensíveis às mudanças abruptas de alimentação, já que as mesmas modificam sobremaneira as condições de pH que estão imperando no rúmen. Assim, por exemplo, quando uma alimentação composta inicialmente por uma grande quantidade de volumoso é substituída por uma outra constituída basicamente por grãos determinará uma maior acidez ruminal e essa acidez causará uma drástica redução do número e da atividade dos mesmos, antes mesmo que ocorra uma modificação da população bacteriana (FEITOSA, 2004). As maiores espécies são mais sensíveis à essas anormalidades e esse fator pode ser de grande auxílio na detecção da gravidade do problema e na evolução do mesmo. Por exemplo, uma predominância de protozoários médios e

pequenos e cuja atividade dos mesmos ainda esteja presente, pode sugerir que o processo em questão trata-se de um distúrbio brando ou transitório. A ausência de atividade em todas as espécies protozoárias, no entanto é um indício de um processo severo, o que requer maiores cuidados. Graves distúrbios digestivos, especialmente a queda do valor do pH abaixo de 5 tem como consequência a morte de toda a microfauna proventricular (ROSEMBERGER, 1993). A determinação da concentração iônica do líquido ruminal, portanto é de grande importância para o diagnóstico dos distúrbios dos pré-estômagos; entretanto, quando de sua avaliação, não se deve esquecer de levar em consideração o tipo de dieta e o tempo decorrido antes de sua última alimentação, pois a proporção entre os ácidos graxos voláteis e o tempo despendido na ruminação depende principalmente da qualidade e quantidade de alimentos administrados, o que pode influenciar a taxa de secreção salivar e, consequentemente, os valores do pH, que, por sua vez é fator controlador importante do desenvolvimento dos protozoários. As variações observadas na contagem global de protozoários não podem ser creditadas a mudanças no pH do conteúdo ruminal, já que os valores do pH obtidos nos meses de inverno e verão encontravam-se entre 6,2 e 7,2 (Tabela 1), limite este que, segundo Bonhomme (1990), favorece o desenvolvimento e a manutenção dos microrganismos dentro do compartimento ruminal.

CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizada a pesquisa, pode-se concluir que a contagem de protozoários do líquido ruminal de ovinos nas épocas de inverno e verão variaram de $39,05 \pm 27,61$ a $183,67 \pm 103,81 \times 10^3$ / ml; os ovinos da raça Merino Australiano possuíam, em seu conteúdo ruminal, maiores concentrações de protozoários do que os da raça Corriedale e que as maiores contagens de protozoários foram observadas na época de verão, em ambas as raças.

Evaluation and concentration of ruminal fluid protozoa from merino australian and corriedale sheep fed on asture in Botucatu, São Paulo

ABSTRACT

Evaluation of protozoa contents from rumen liquor was carried out in Australian Merino and Corriedale

sheep fed on pasture, in two seasons of the year (winter and summer), in Botucatu City, São Paulo, Brazil. Ruminal samples were collected using a standard tube, from 103 sheep during the winter period (50 Corriedale and 53 Australian Merino) and from 107 sheep in the summer (52 Corriedale and 55 Australian Merino). A heavy density of small, medium and large highly motile protozoa was observed. Statistical analysis showed no significant differences between breeds and seasons for the test mentioned above. The results obtained for protozoa total count in Australian Merino sheep in winter and summer were, respectively $39,85 \pm 22,57$ and $183,67 \pm 103,81 \times 10^3$ /ml. The results observed for Corriedale sheep in winter and summer were, respectively, $39,05 \pm 27,61$ and $149,55 \pm 86,83 \times 10^3$ /ml.

Keywords: Rumen liquor, protozoa, sheep, Australian Merino, Corriedale.

REFERÊNCIAS

ABE, M.; SHIBUI, H.; IRIKI, T., et al. Relation between diet and proozoal population in the rumen. **Br. J. Nutr.**, Cambridge, v.29, p.197-202, 1973.

ALONSO, A.N. Diagnostic analysis of rumen fluid. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, Philadelphia, v.1, p.363-376, 1979.

AOAC. Official methods of analysis. 14 ed. **Association of Official Analytical chemists.** Washington, D.C. 1984. 1141p.

BAUMGARTNER, W. Laboratory diagnosis in cattle practice V. Examination of rumen fluid. **Tierarztl. Umsch.**, Konstanz, v.38, p.560-561, 1983.

BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. **Bioestatística.** São Paulo: Pedagógica e Universitária, 1980. 325p.

BONHOMME, A. Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. **Anim. Fed. Sci. Technol.**, Amsterdam, v.30, p.203-266, 1990.

CHRISTIANSEN, W.C.; WOODS, W.; BURROUGHS, W. Ration characteristics influencing rumen protozoal populations. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v.23, p.984-988, 1964.

CRHA, J.; STRIZ, J. Dynamics of the populations of rumen ciliates in cattle kept in a pasture area.

Acta. Vet. Brno, Brno, v.46, p.271-277, 1977.

DEHORITY, B.A. Specificity of rumen ciliate protozoa in cattle and sheep. **J. Protozool.**, Lawrence, v.25, p.509-513, 1978.

DEHORITY, B.A.; ORPIN, C.G. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In: HOBSON, P. N. **The rumen microbial ecosystem**. Amsterdam: Elsevier Applied Science, 1988, p.151-183.

FEITOSA, F.L.F. **Semiologia Veterinária — A arte do diagnóstico**. Editora ROCA, 2004, 804p.

FIGUEIREDO, M. P.; QUADROS, D. G. DA CRUZ, J. F. Acidez total titulável, pH e tempo de redução do azul de metileno no fluido ruminal de caprinos mantidos em pastagens artificiais, exclusiva de gramíneas, ou em caatinga. **Braz. J. of Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.37, n.5, p.410-415, 2000.

GARRY, F. B. Indigestion in ruminants. In: SMITH, B. P. **Large animal internal medicine**. St. Louis: C.V. Mosby, 1990. v.1, p.747-782.

HARFOOT, C.G. Anatomy, physiology and microbiology of the ruminant digestive tract. In: CHRISTIE, W. W. **Lipid metabolism in ruminant animals**. London: Pergamon, 1981. p.1-19.

LEEK, B.F. Clinical diseases of the rumen: a physiologist's view. **Vet. Rec.**, London, v.113, p.10-14, 1983.

MARINHO, A.A.M. Protozoários ciliados no rúmen de ovinos em pastoreio. **Rev. Port. de Cienc. Vet.**, Lisboa, v.78, p.159-165, 1983.

MICHALOWSKI, T.; MUSZYNSKI, P. Diurnal variations in number of ciliate protozoa in the rumen of sheep fed once and twice daily. **J. Agric. Sci.**, Cambridge, v.90, p.1-5, 1978.

NGHE'THE, J.C.; BOX, T.W. Botanical composition of eland and goat diets on acacia-grassland

community in Kenya. **Journal of Range Management**, v. 29, n.4, p.290-3, 1976.

NOGUEIRA FILHO, J.C.M. **Contribuição ao estudo sobre protozoários em rúmens de bezerras de rebanhos leiteiros**. São Paulo: USP, 1981. 70p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1981.

ORTOLANI, E. L. **Determinação dos valores do pH do suco de rúmen de bovinos: efeito da espécie, cruzamento e dieta**. Belo Horizonte: UFMG, 1980, 53p. Dissertação (Mestrado em Patologia Clínica) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 1980.

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.**, Washington, v.26, p.692-698, 1973.

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

ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 429p.

WARNER, A.C.I. Enumeration of rumen microorganisms. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.28, p.119-128, 1962a.

WARNER, A.C.I. Some factors influencing the rumen microbial population. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.28, p.129-146, 1962b.

ZAMBRANO, A. F. H. **Algumas provas funcionais do rúmen em bovinos submetidos a diferentes regimes alimentares**. Belo Horizonte: UFMG, 1975. 57p. Dissertação (Mestrado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1975.