

OBSERVAÇÕES PERTINENTES À  
INSTALAÇÃO DA FAUNA DE PROTOZOÁRIOS  
CILIADOS NO RÚMEN DE BEZERROS  
DE RAÇA HOLANDESA (*Bos taurus* L.),  
CRIADOS EM PINDAMONHANGABA,  
S.P., BRASIL.

JOSÉ CARLOS MACHADO NOGUEIRA FILHO

Professor Assistente  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

MARIA ELY MISEROCHI DE OLIVEIRA

Professora Assistente Doutora  
Instituto de Ciências Biomédicas da USP

JOÃO SILVA MARCONDES VEIGA

Professor Assistente Doutor  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

CARLOS DE SOUZA LUCCI

Professor Titular  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; OLIVEIRA, M.E.M.; VEIGA, J.S.M.;  
LUCCI, C.S. Observações pertinentes à instalação da fauna  
de protozoários ciliados no rúmen de bezerros de raça Holan-  
desa (*Bos taurus*, L.), criados em Pindamonhangaba, S.P.,  
20(2): 177-82, 1983.

**RESUMO:** Em câmara de Sedgwick-Rafter, foram feitas contagens de ciliados do líquido ruminal de 45 bezerros de raça Holandesa, variedade preta e branca, nascidos e criados na Estação Experimental de Pindamonhangaba, S.P., Brasil, situada no vale do Rio Paraíba do Sul. Os valores obtidos foram relacionados com a idade, que variou de 7 a 270 dias e, com o pH do rúmen, que oscilou de 4,44 a 6,80. O diagnóstico dos ciliados foi feito à nível de gênero; foram assinalados representantes de *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Isotricha* e *Dasytricha*. Quando positivado, o gênero *Entodinium* sempre predominou na população de protozoários. *Entodinium* e *Diplodinium* surgiram, simultaneamente, a partir do terceiro mês de vida, quando o pH médio do rúmen era de 4,90. *Epidinium* foi encontrado a partir do quarto mês, quando o pH alcançou 5,38. *Isotricha* e *Dasytricha* foram verificados em bezerros com mais de 6 meses e com pH ruminal acima de 6,0.

**UNITERMOS:** Protozoa\*; Protozoários ciliados; Rúmen, bezerros\*

INTRODUÇÃO E LITERATURA

O desenvolvimento da fauna microbiana no rúmen de bovinos jovens é de grande importância para os processos de digestão e de síntese que ocorrem nesse compartimento. Um dos objetivos que se pretende alcançar, visando economia na criação de bezerros, é o rápido desenvolvimento da função do rúmen, através da presença plena de microorganismos, permitindo que o animal possa utilizar, em idade precoce, maior quantidade de alimento fibroso.

A progressiva modificação funcional do rúmen, a partir do nascimento, está relacionada com transformações anatômicas, fisiológicas e bioquímicas, que propiciam variações no líquido ruminal, envolvendo a instalação de numerosas espécies de bactérias e de protozoários, que participam, ativamente, no processo de transformação da matéria alimentar.

A descoberta de protozoários no rúmen, por GRUBY e DELAFOND<sup>9</sup> (1843), deu início a uma série de estudos no sentido de um melhor conhecimento da simbiose entre estes unicelulares e seus hospedeiros. CUNHA<sup>4</sup> (1914), no Brasil, está entre os pioneiros em tais pesquisas, registrando ciliados em bovinos e ovinos, assinalando 14 espécies diferentes, 3 das quais consideradas novas.

EADIE e colab.<sup>8</sup> (1959) verificaram que a infestação natural de bezerros por protozoários do rúmen ocorre constantemente. Verificaram, também, que a instalação das diferentes espécies se dá em épocas sucessivas e que ela é condicionada pela acidez local.

EADIE<sup>6</sup> (1962) demonstrou que quando o pH do rúmen, nos bezerros, atinge 6,50, já estão presentes espécies dos diferentes gêneros de ciliados habituais em bovinos.

BRYANT e SMALL<sup>1</sup> (1956) assinalaram que, quando o pH do rúmen atinge o nível 6,0, aparece o gênero *Entodinium*; com o pH 6,50, surgem espécies de *Holotricha* e de ofrioscólecídeos.

CHURCH<sup>2</sup> (1974) assinala que os protozoários do rúmen de animais domésticos variam com a dieta alimentar, com as estações do ano (que têm influência sobre a dieta) e com a situação geográfica.

HUNGATE<sup>11</sup> (1966) observou que *Holotricha* aparece com abundância no rúmen de animais em pastejo, ou submetidos a dieta contendo quantidade considerável de feno. Afirma, ainda, que o tipo de forragem tem influência marcante sobre a presença de diferentes espécies que possam ser encontradas nesse órgão; declara, também, que o tamanho das partículas, nas diferentes forragens, não é fator relevante.

EADIE<sup>7</sup> (1962) assinalou que, apesar das condições idênticas de arraçãoamento, há variação das espécies e do número de indivíduos.

OXFORD<sup>14</sup> (1955) verificou que espécies de *Entodinium* e de *Diplodinium* são as primeiras a se estabelecer em bovinos, seguidas pelas espécies de *Holotricha*.

CONRAD e colab.<sup>3</sup> (1958) constataram que os protozoários do rúmen de bezerros se desenvolvem quando estes atingem 16 semanas de vida.

Sendo a literatura nacional restrita nesta área, procurou-se, no presente estudo, a obtenção de dados sobre a presença e prevalência dos vários gêneros de ciliados, que se instalam, durante o crescimento do hospedeiro, no rúmen de bezerros da raça Holandesa, "puros por cruzamento" e adaptados às nossas condições climáticas e de manejo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas amostras de líquido ruminal de 45 bezerros, da raça Holandesa, variedade preto e branco e "puros por cruzamento", com idades variando entre 7 a 270 dias, sem distinção de sexos.

Estes animais pertenciam à Estação Experimental de Pindamonhangaba, do Instituto de Zootecnia da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo.

Os bezerros, após o nascimento, permaneciam com suas mães durante dois dias, em períodos diários de 8 a 12 horas. A partir do 3º dia eram levados ao bezerreiro individual, onde recebiam ração adicional de leite, pela manhã e à tarde.

A partir do 8º dia, os bezerros tinham acesso a piquetes constituídos de *Braquiária* (*Brachiaria decumbens* Stapf Prain) e recebiam mistura de concentrado, na quantidade de 2,0kg por cabeça e por dia. Após 60 dias, passavam a freqüentar pastagens de capim Jaraguá (*Hyparrhe-*

*nia rufa* Ness Stapf) ou de capim de Rhodes (*Chloris gayana* Kunth). A desmama ocorria entre o 56º e o 60º dias de idade.

As colheitas de amostras de líquido ruminal foram efetuadas em janeiro e fevereiro de 1981, estando os bezerros em jejum há seis horas; tiveram, entretanto e constantemente, água à sua disposição. O material era colhido com utilização de sonda esofágica e, visando a conservação, conservado em tubos de vidro contendo 20 ml de formaldeído p.a. diluído a 1:2.

No momento da colheita, o pH do líquido era verificado com a utilização de papel indicador (Merck-Spezial indicador), com escala de 0,5 a 9,0 e divisões de 0,5.

Para a coloração dos ciliados usou-se "Verde Brilhante", obedecendo ao preconizado por DEHORITY<sup>5</sup> (1977).

Obedeceu-se à técnica de DEHORITY<sup>5</sup>, na contagem dos ciliados, feita em câmara de Sedgwick-Rafter, tendo sido percorridos 100 campos diferentes. Calculou-se fator de correção para 1,0 ml de líquido ruminal; as operações foram feitas em duplicata e levada em consideração a média obtida.

Médias, desvios, erros e coeficientes de variação foram calculados, seguindo-se os esquemas de PIMENTEL GOMES<sup>15</sup> (1970).

## RESULTADOS

Na Tab. 1, estão apresentados os resultados das contagens e são pertinentes ao número médio de ciliados e medidas do pH, em diferentes idades.

Na Tab. 2, encontram-se os valores médios obtidos para os representantes dos diferentes gêneros, em diferentes idades.

TABELA 1 — Número médio de protozoários de vários gêneros por ml de líquido ruminal e pH do suco de rúmen de bezerros, em diferentes faixas etárias. Pindamonhangaba, SP, 1981.

	FAIXA ETÁRIA (DIAS)						
	7-30	31-60	61-90	91-120	121-150	151-180	181-270
Nº de animais	4	9	10	4	4	5	9
pH do rúmen							
média	4,50	4,44	4,90	5,38	5,75	6,80	6,50
S	0,41	0,30	0,39	0,41	0,29	0,45	0,35
Erro	0,20	0,10	0,12	0,17	0,14	0,20	0,12
CV%	9,07	6,76	8,05	7,63	5,02	6,58	5,44
Total de protozoários/ml							
média	—	—	43.093,9	1.472.514,5	520.920,3	866.597,6	375.088,6
S	—	—	120.897,1	215.638,6	240.384,2	616.737,1	173.607,5
Erro	—	—	38.231,0	107.819,3	120.192,1	275.813,2	57.869,2
CV%	—	—	280,5	14,6	64,1	71,2	45,3

S = Desvio padrão

CV = Coeficiente de variabilidade

TABELA 2 – Número médio de protozoários dos gêneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Isotricha* e *Dasytricha* por ml de líquido ruminal nas diferentes faixas etárias. Pindamonhangaba, São Paulo.

Gêneros	Faixa Etária (Dias)	Faixa Etária						
		7-30	31-60	61-90	91-120	121-150	151-180	181-270
<i>Entodinium</i>	Média	–	–	41.567,3	1.201.564,0	504.034,8	848.463,0	368.535,6
	S	–	–	116.106,1	214.179,8	253.756,4	605.725,7	172.526,6
	Erro	–	–	36.716,0	107.089,9	126.878,2	270.888,8	57.508,9
	CV%	–	–	279,3	17,8	50,3	71,4	46,8
<i>Diplodinium</i>	Média	–	–	1.526,6	5.425,7	925,0	16.931,8	6.065,0
	S	–	–	4.827,5	716,9	1.557,3	18.375,5	4.541,4
	Erro	–	–	1.526,6	358,4	778,7	8.217,8	1.513,8
	CV%	–	–	316,2	13,2	168,4	108,5	74,9
<i>Epidinium</i>	Média	–	–	–	19.864,7	15.960,5	1.202,8	25,7
	S	–	–	–	1.393,7	25.571,8	2.689,5	77,0
	Erro	–	–	–	696,9	11.285,9	1.202,8	25,7
	CV%	–	–	–	7,0	141,4	223,6	300,0
<i>Isotricha</i>	Média	–	–	–	–	–	–	154,0
	S	–	–	–	–	–	–	258,3
	Erro	–	–	–	–	–	–	86,1
	CV%	–	–	–	–	–	–	167,7
<i>Dasytricha</i>	Média	–	–	–	–	–	–	308,3
	S	–	–	–	–	–	–	841,8
	Erro	–	–	–	–	–	–	280,6
	CV%	–	–	–	–	–	–	273,0

S = Desvio Padrão

CV = Coeficiente de Variabilidade

## DISCUSSÃO

Verifica-se, pelo exame da tabela 1, que, nas duas primeiras faixas etárias, de 07 a 30 dias e de 31 a 60 dias, não se evidenciou a presença de ciliados. Tal verificação está em concordância com a de diferentes autores<sup>1, 6, 8, 10</sup>.

Não obstante discorda do observado pelos seguintes pesquisadores: HUNGATE<sup>11</sup> (1966) encontrou ciliados em bezerras com 7 dias de vida; LENGEMANN e ALLEN<sup>12</sup> (1951) os encontravam em animais de 60 dias; NOGUEIRA FILHO<sup>13</sup> (1981), constatou a presença de espécies de *Entodinium*, no segundo mês de vida, de alguns mestiços, com alta proporção de "sangue holandês".

As verificações de EADIE e colab.<sup>8</sup>, (1959) afirmam a inexistência de ciliados no rúmen de bezerras jovens, devida ao pH muito ácido; está de acordo com a observação ora apresentada, em que com o pH entre 4,44 e 4,50, não foi encontrada qualquer espécie de ciliado (Tab. 1). Todavia, NOGUEIRA FILHO<sup>13</sup> (1981) verificou a presença de espécies de *Entodinium* em 1% de bezerras mestiços em que o pH do líquido ruminal estava entre 4,0 e 4,90.

Na faixa etária de 61 a 90 dias, encontravam-se espécies de *Entodinium* e de *Diplodinium* (Tab. 2), com o valor médio de 43.093,9; não obstante, o pH médio ainda fosse baixo, apenas atingindo 4,90 (Tab. 1).

O número médio de ciliados, encontrado nesta pesquisa, afasta-se consideravelmente da média de 137.000, apresentado por LENGEMANN e ALLEN<sup>12</sup>, em animais da mesma idade. NOGUEIRA FILHO<sup>13</sup> (1981), todavia, em mestiços, não encontrou ciliados do gênero *Diplodinium*, na faixa de pH 4,0 a 4,90.

O encontro de espécies de *Entodinium* e de *Diplodinium*, em meio ácido (pH 4,90) está em discordância com

a verificação de BRYANT e SMALL<sup>1</sup> (1956), que surpreenderam o estabelecimento de espécies de *Entodinium* em pH 6,0. HOBSON<sup>10</sup> (1972) afirma que o pH 6,0 é inadequado para a sobrevivência de ciliados, com possível exceção de algumas espécies de *Entodinium*.

Na verdade, representantes deste gênero parecem estar melhor adaptados que os demais a um ambiente mais ácido, uma vez que o número médio encontrado foi de 41.567,3, que é muito superior ao de espécies de *Diplodinium*, que foi de 1.526,6. O encontro do gênero *Diplodinium*, em pH 4,90, não foi confirmado na literatura compulsada.

Na faixa etária entre 91 e 120 dias, apesar do nível médio de pH ser de 5,38 (Tab. 1), verificou-se a instalação de espécies de *Epidinium*; o mesmo foi observado por NOGUEIRA FILHO<sup>13</sup> (1981) em bezerras mestiços. Nesta faixa foi assinalado o mais elevado valor médio de tais ciliados (19.854,7). O mesmo foi verificado com as espécies do gênero *Entodinium*, que chegaram a 1.201.564,0 (Tab. 2).

Com relação ao gênero *Diplodinium*, verificou-se adequado desenvolvimento em seus representantes, que passaram de 1.526,6 para 5.425,7 por ml de líquido ruminal.

Na faixa etária compreendida entre 121 e 150 dias, foram verificados somente representantes dos gêneros *Entodinium*, *Diplodinium* e *Epidinium*.

O número médio de representantes de *Entodinium*, — 504.034,8 — aumentou sensivelmente em relação à faixa etária de 61 a 90 dias (Tab. 1, 2), acompanhando a elevação do pH, de 5,38 a 5,75 (Tab. 1); o mesmo, entretanto, não ocorreu com os *Diplodinium* — 925,0 — e *Epidinium* — 15.960,5. Vale reafirmar que tal observação está em desacordo com vários autores,<sup>1, 10, 14</sup>, desde que o pH do rúmen ainda se manteve aquém de 6,0, considerando o mais favorável para a instalação de tais ciliados.

A identificação de apenas três gêneros, nesta faixa de pH, mostra pobreza na fauna ruminal, quando se faz a comparação com as verificações de NOGUEIRA FILHO<sup>13</sup> (1981), em mestiços por ele observados, que na zona de pH entre 5,0 e 5,90, apresentavam ainda ciliados dos gêneros *Isotricha* e *Dasytricha*, embora em número restrito de bezerras.

No líquido ruminal de bezerras com 151 a 180 dias, houve prevalência dos mesmos gêneros da faixa etária anterior, com aumento de número de ciliados; assim, foram identificados 848.463,0 representantes de *Entodinium*, 16.931,8 de *Diplodinium* e 1.202,8 de *Epidinium* (Tab. 2).

Tal verificação não está de acordo com a de outros autores<sup>1, 6, 14</sup>, desde que na referida faixa etária, foi assinalado o mais elevado valor de pH — 6,80 — já muito próximo à neutralidade. Tal condição seria de molde a permitir a suposição de uma população de ciliados mais diversificada, fato que não ocorreu. De outro lado, maior comparecimento de representantes de *Diplodinium* do que de representantes de *Epidinium* contraria a afirmativa de HUNGATE<sup>11</sup> (1966), quando diz que *Diplodinium* nunca é encontrado em números elevados.

Todavia, na faixa etária entre 181 e 270 dias, verificou-se o aparecimento de ciliados dos gêneros *Isotricha* — 154,0 — e *Dasytricha* — 308,3, ausentes no rúmen de bezerras de menor idade (Tab. 2). Entretanto, o valor médio do pH no líquido ruminal desses bezerras mostrou-se ligeiramente menor — 6,50 — que o da faixa etária precedente — 6,80. Tal observação dá ensejo à suposição que o pH não seja o único, ou o mais importante fator condicionado à instalação e desenvolvimento de ciliados.

A seqüência do aparecimento dos ciliados concorda com a observada por OXFORD<sup>14</sup> (1959). É conveniente assinalar que, nas duas últimas faixas etárias, o pH médio situou-se entre 6,50 e 6,80, sem o aparecimento de ofrioscólecidos. Há, neste pormenor, uma discordância com EADIE<sup>6</sup> (1962) que afirma a presença de representantes de todos os diferentes gêneros, quando o pH é de 6,50,

para cima. Este autor lembra, não obstante, que as espécies e seus números quantitativos variam de um bezerro para outro, embora submetidos à mesma dieta.

É possível que a ausência de Ophryoscolecidae e de outros ciliados seja determinada pelo tipo de capim e pelas condições locais da experimentação. Segundo HUNGATE<sup>11</sup> (1966) e EADIE<sup>7</sup> (1962) a forrageira tem marcada influência sobre os diferentes ciliados e CHURCH<sup>2</sup> (1974) informa que a variação específica dos ciliados é influenciada pela situação geográfica.

As espécies do gênero *Entodinium* constituem a maior parcela da população de ciliados em todas as faixas etárias em que foram confirmadas (Tab. 2). Surpreendentemente na faixa de 181 a 270 dias, em que se verifica o maior número de espécies e de gêneros, há sensível redução no número total de ciliados 375.088,6 por ml, quando comparado com o das faixas de 91 a 120 dias (1.472.514,5) de 121 a 150 dias (520.920,3) e de 151 a 180 dias (866.597,6) (Tab. 1).

A baixa de 0,3 no pH não explica tal verificação, uma vez que na faixa de 121 a 150 dias foi encontrado número sensivelmente maior de ciliados — 520.920,3 — embora o pH fosse de 5,75. O mesmo ocorreu na faixa de 91 a 120 dias, em que, com pH 5,38, o montante de ciliados foi, em média, 1.472.514,5 (Tab. 1).

Comparando os resultados da presente pesquisa com os de NOGUEIRA FILHO<sup>13</sup> (1981), feita em bezerros mestiços, no mesmo local, com as mesmas idades e idênticas condições de manejo e alimentação, tem-se a impressão que os bezerros “puros por cruzar”, utilizados neste trabalho, são mais tardios, em cerca de trinta dias, no que se refere ao aparecimento, dos ciliados referidos na pesquisa.

Considerando as discordâncias entre os resultados ora apresentados e os encontrados na literatura, torna-se premente a necessidade de novos estudos, com a finalidade de aclarar as divergências ora consignadas. Possivelmente são resultantes da interação de diferentes fatores, como raça, grau de mestiçagem, manejo, tipo e qualidade de concentrados e da forragem utilizada.

## CONCLUSÕES

As seguintes conclusões parecem lícitas dadas as condições em que se desenvolveu a presente investigação:

1. representantes de cinco gêneros de ciliados (*Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Isotricha* e *Dasytricha*) foram identificados, genericamente, no líquido ruminal de bezerros de raça Holandesa, “puros por cruzamento”, no período entre a primeira semana após nascimento, até o nono mês de vida;

2. nas faixas etárias em que espécies de *Entodinium* estavam presentes, elas sempre constituíram a predominância entre os diferentes ciliados;

3. as espécies de *Entodinium* e de *Diplodinium* foram verificadas a partir do segundo mês de vida dos bezerros (61-90 dias), quando o pH do rúmen ainda era muito ácido (pH = 4,90);

4. representantes do gênero *Epidinium* foram encontrados a partir do terceiro mês de idade (91-120 dias), quando o pH do rúmen subiu para 5,38;

5. os gêneros *Isotricha* e *Dasytricha* estiveram presentes, por suas espécies, nos bezerros com mais de 6 meses e com o pH ruminal superior a 6,0.

NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; OLIVEIRA, M.E.M.; VEIGA, J.S.M.; LUCCI, C.S. Observations of the fauna-development of ciliated protozoa found in the rumen of Holstein calves, raised in Pindamonhangaba, S.P., Brazil. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 20(2): 177-82, 1983.

**SUMMARY:** Forty five Holstein calves, from 7 to 270 day old, were used to estimate the ciliated protozoa fauna present in the ruminal liquid. For this purpose, the Sedgwick-Fafter chamber has been choiced. Species of five genus were detected: *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Isotricha* and *Dasytricha*. The *Entodinium* Spp constituted the most numerous protozoa in the whole populations for the different ages. After birth, species of *Entodinium* and *Diplodinium* were the first to be present, third month after birth, with an average ruminal pH 4,90. Species of *Epidinium* were found in calves with four months and ruminal pH about 5,38. Species of *Isotricha* and *Dasytricha* were the last to be present, in calves with six months and a ruminal pH of 6,0.

**UNITERMS:** Ciliated protozoa; Protozoa\*; Rumen, calves\*

## Agradecimento

À Direção e aos funcionários da Estação Experimental de Pindamonhangaba, do Instituto de Zootecnia da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo, graças aos quais foi possível a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – BRYANT, M.P. & SMALL, N. The development of rumen microorganism in inoculated vs isolated calves. *J. Dairy Sci.*, **39**: 929, 1956.
- 2 – CHURCH, D.C. *Fisiologia digestiva y nutrición de los rumiantes*. Zaragoza, Acribia, 1974. v. 1.
- 3 – CONRAD, H.R.; HIBS, J.W.; FRANK, N. High roughage system for raising calves based on early development of rumen function. IX. Effect of rumen inoculation and Chlortetracycline on rumen function of calves fed high roughage pellets. *J. Dairy Sci.*, **41**: 1248-61, 1958.
- 4 – CUNHA, A.M. Sobre os ciliados do estômago dos ruminantes domésticos do Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **6**: 58-67, 1914.
- 5 – DEHORITY, B. *Classification and morphology of rumen Protozoa*. Columbus, Ohio Agricultural Research and Developmental Center, 1977.
- 6 – EADIE, J.M. The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. *J. gen. Microbiol.*, **29**: 563-88, 1962.
- 7 – EADIE, J.M. Inter-relationships between certain rumen ciliate protozoa. *J. gen. Microbiol.*, **29**: 578-88, 1962.
- 8 – EADIE, J.M.; HOBSON, P.N.; MANN, S.O. A relationship between some bacteria, protozoa and diet in early weaned calves. *Nature*, London, **183**: 624-5, 1959.
- 9 – GRUBY & DELAFOND, 1843 apud HUNGATE<sup>11</sup>, p. 2.
- 10 – HOBSON, P.N. Physiological characteristics of rumen microbes and relation to diet fermentation patterns. *Proc. Nut. Soc.*, **31**: 135-9, 1972.
- 11 – HUNGATE, R.E. *The rumen and its microbes*. New York, Academic Press, 1966. 533 p.
- 12 – LENGEMANN, F.W. & ALLEN, N.N. The development of rumen function in the dairy calf. I. Some characteristics of rumen contents of cattle of various ages. *J. Dairy Sci.*, **38**: 651, 1955. (Resumo)
- 13 – NOGUEIRA FILHO, J.C.M. *Contribuição ao estudo sobre protozoários em rúmens de bezerros de rebanhos leiteiros*. São Paulo, 1981. (Tese de mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP).
- 14 – OXFORD, A.E. Parasitological reviews. The rumen ciliate protozoa: their composition, metabolism, requirements for maintenance and culture, and physiological significance for the host. *Exp. Parasit.*, **4**: 569-605, 1955.
- 15 – PIMENTEL GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 4. ed. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1970.

Recebido em: 09-11-1982  
Aprovado em: 24-03-1983