



Artigo Científico

IDENTIFICAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS CILIADOS (ALVEOLATA, CILIOPHORA) DO RÚMEN DE CAPRINOS DOMÉSTICOS (*Capra hircus* L) COM PASTAGEM NATURAL NO DISTRITO DE MONTEPUEZ-CABO DELGADO

Identification of ciliated Protozoa (Alveolata, Ciliophora) from the rumen of domestic goats (*Capra hircus* L.) grazing on natural pasture in the district of Montepuez – Cabo Delgado

André Tomás Changana¹, Zacarias Rosalina João da Silva^{1*}

¹Faculdade de Ciências, Universidade Rovuma, C.Postal: 544, E-mail: fcnme@unirovuma.ac.mz - Moçambique.

Submetido em: 01.02.2024; Aceito em: 01.04.2024; Publicado em: 25.04.2024.

*Autor para correspondência: zacarosalina@gmail.com. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-7611-9126>

Resumo: O rúmen é um dos compartimentos do trato-gastrointestinal (TGI) de animais ruminantes e é colonizado por microrganismos anaeróbios, como bactérias, fungos, vírus, archeas metanogênicas e protozoários. Visando contribuir para o conhecimento da microbiota ruminal, este estudo tem por objetivo compreender a morfologia e um pouco das relações filogenéticas de protozoários ciliados de caprinos domésticos. Para tal, a identificação dos ciliados foi feita e abundância genérica estimada utilizando-se preparações semipermanentes à base de iodo. As relações filogenéticas foram inferidas baseando-se em Máxima Verossimilhança. De acordo com as análises, dez gêneros de protozoários ciliados pertencentes a duas famílias foram identificados. *Entodinium* foi o gênero mais abundante e o gênero menos abundante foi o *Polyplastron*. Em termos de prevalência, os gêneros *Entodinium* e *Dasytricha* foram os mais prevalentes (100%) e *Ophryoscolex* menos prevalente (28.57%). Os resultados mostram que o rúmen dos caprinos estudados é habitado por dois grupos monofiléticos: Entodiniomorpha e Vestibuliferida.

Palavras-chave: Caprinos, endossimbiontes, protozoários, ciliados, rúmen.

Abstract: The rumen is one of the compartments of the gastrointestinal tract (GIT) in ruminant animals and is colonized by anaerobic microorganisms such as bacteria, fungi, viruses, methanogenic archaea, and protozoa. With the aim of contributing to the understanding of ruminal microbiota, this study seeks to comprehend the morphology and some phylogenetic relationships of ciliated protozoa in domestic goats. For this purpose, the identification of ciliates was conducted, and the generic abundance was estimated using semi-permanent iodine-based preparations. Phylogenetic relationships were inferred based on Maximum Likelihood. According to the analyses, ten genera of ciliated protozoa belonging to two families were identified. *Entodinium* was the most abundant genus, while *Polyplastron* was the least abundant. In terms of prevalence, the genera *Entodinium* and *Dasytricha* were the most prevalent (100%), and *Ophryoscolex* was less prevalent (28.57%). The results show that the rumen of the studied goats is inhabited by two monophyletic groups: Entodiniomorpha and Vestibuliferida.

Keywords: Goats, endosymbionts, protozoa, ciliates, rumen.



INTRODUÇÃO

O rúmen é um dos compartimentos do trato-gastrointestinal (TGI) de animais ruminantes e representa um complexo ecossistema, composto principalmente por microrganismos anaeróbios, como bactérias, fungos, archeas metanogênicas e protozoários, os quais desempenham importantes funções bioquímicas e fisiológicas para os seus hospedeiros (GÜRELLI & DAW, 2020). Dentre essas funções, podemos incluir o metabolismo dos nutrientes, pois produzem enzimas capazes de degradar a celulose das plantas que é ingerida pelos animais, fornecendo energia ao hospedeiro em uma relação mutualística (GÜRELLI & DAW, 2020).

Ao contrário por exemplo de suínos, aves e humanos classificados como monogástricos, os ruminantes desenvolveram um estômago compartimentado com quatro câmaras (rúmen, retículo, omaso e abomaso) em seu TGI onde esses compartimentos são colonizados pela microbiota logo que os ruminantes nascem (XIE *et al.*, 2021; DA SILVA *et al.*, 2022). Essa relação, mutualística, permite a ocorrência de processos fermentativos por meio de atividades físicas e microbiológicas, o que facilita a transformação de componentes provenientes da dieta, em produtos úteis (ácidos graxos voláteis - AGVs, proteína microbiana, vitaminas) para o hospedeiro (ZEINELDIN *et al.*, 2018). Por sua vez, os hospedeiros mantêm a população microbiana no rúmen ao ingerir e triturar os alimentos com regularidade e criam condições apropriadas para o crescimento microbiano, como pH ótimo, anaerobiose, temperatura e umidade adequadas (LOZANO *et al.*, 2017).

Os protozoários ciliados do rúmen são classificados na subclasse Trichostomatia Butschli 1889, nas subordens Vestibuliferida Puytorac *et al.* 1974 e Endodiniomorpha Reichenow in Doflein e Reichenow 1929 (LYNN, 2008), e podem contribuir com mais de 60% da biomassa viável no ambiente ruminal, possuem tamanho de 20-200µm (NEWBOLD *et al.*, 2015; FRANCISCO *et al.*, 2019), são unicelulares, anaeróbios, e ainda, não patogênicos ao hospedeiro (OGIMOTO & IMAI, 1981; WLODARSKI *et al.*, 2017).

A microbiota de ruminantes tem sido estudada com vários objetivos incluindo os estudos relacionados com genes e seus genomas em diferentes hospedeiros, nomeadamente vacas leiteiras, ovinos, búfalos e outros, no entanto, a microbiota do TGI de caprinos do distrito de Montepuez ainda permanece maioritariamente por explorar, apesar de serem animais importantes na pecuária (DA SILVA *et al.*, 2023). Aliás, o nosso conhecimento sobre essa microbiota pode ser ainda mais insignificante e incompleto se olharmos os caprinos como ruminantes com TGI contendo dez compartimentos físicos distintos (rúmen, retículo, omaso, abomaso, duodeno, jejum, íleo, ceco, cólon e reto), e cada uma dessas regiões é especializada dependendo de fatores que incluem a disponibilidade de substrato, tempo de retenção da digestão e níveis de pH (STEVENS & HUME, 1998; RUSSELL & RYCHLIK, 2001), o que pode contribuir para a ocorrência da especialização desses microrganismos em cada região (XIE *et al.*, 2021).

A procura de novos conhecimentos sobre a microbiota ruminal, especialmente dos protozoários ciliados do rúmen vem crescendo pelo fato de se tratar de uma demanda mundial quando falamos, por exemplo, na redução da metanogênese (produção de metano e preocupação sobre mudanças climáticas), na melhoria da produtividade dos rebanhos e no desenvolvimento de biotecnologia de processos degradativos de biomassa por microrganismos do rúmen (REIS, 2015). Por isso, é de relevante importância que estudos desta natureza sejam conduzidos em Montepuez e Moçambique em geral, pois o estudo da microbiota ruminal é uma importante área de pesquisa estratégica (RUSSEL & RYCHLICK, 2001), para o incremento da produtividade na pecuária Moçambicana e consequente produção da carne e leite de forma sustentável.

Visando contribuir para o conhecimento da microbiota ruminal de caprinos domésticos com pastagem natural em Montepuez-Cabo Delgado, este estudo tem por objetivos compreender a morfologia e



as relações filogenéticas de protozoários ciliados de caprinos. E de forma específica, identificar os protozoários ciliados do rúmen de caprinos domésticos, determinar a composição genérica, comparar os resultados com registros em outros estudos e inferir as relações filogenéticas entre as espécies identificadas neste trabalho utilizando sequências livres e disponíveis no Genbank.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi conduzido na cidade de Montepuez, em Moçambique, localizada entre Latitude $13^{\circ}7.5336$ S e Longitude $38^{\circ}59.9832$ E. Os mercados de Montepuez e de Sanina foram os pontos de coleta das amostras do líquido ruminal com as seguintes localizações: $13^{\circ}07.437$ 'S de Latitude Sul, $039^{\circ}00.444$ 'E de Longitude Leste; $13^{\circ}07.817$ 'S de Latitude Sul e $038^{\circ}59.735$ 'E de Longitude Leste, respectivamente (Figura 1).

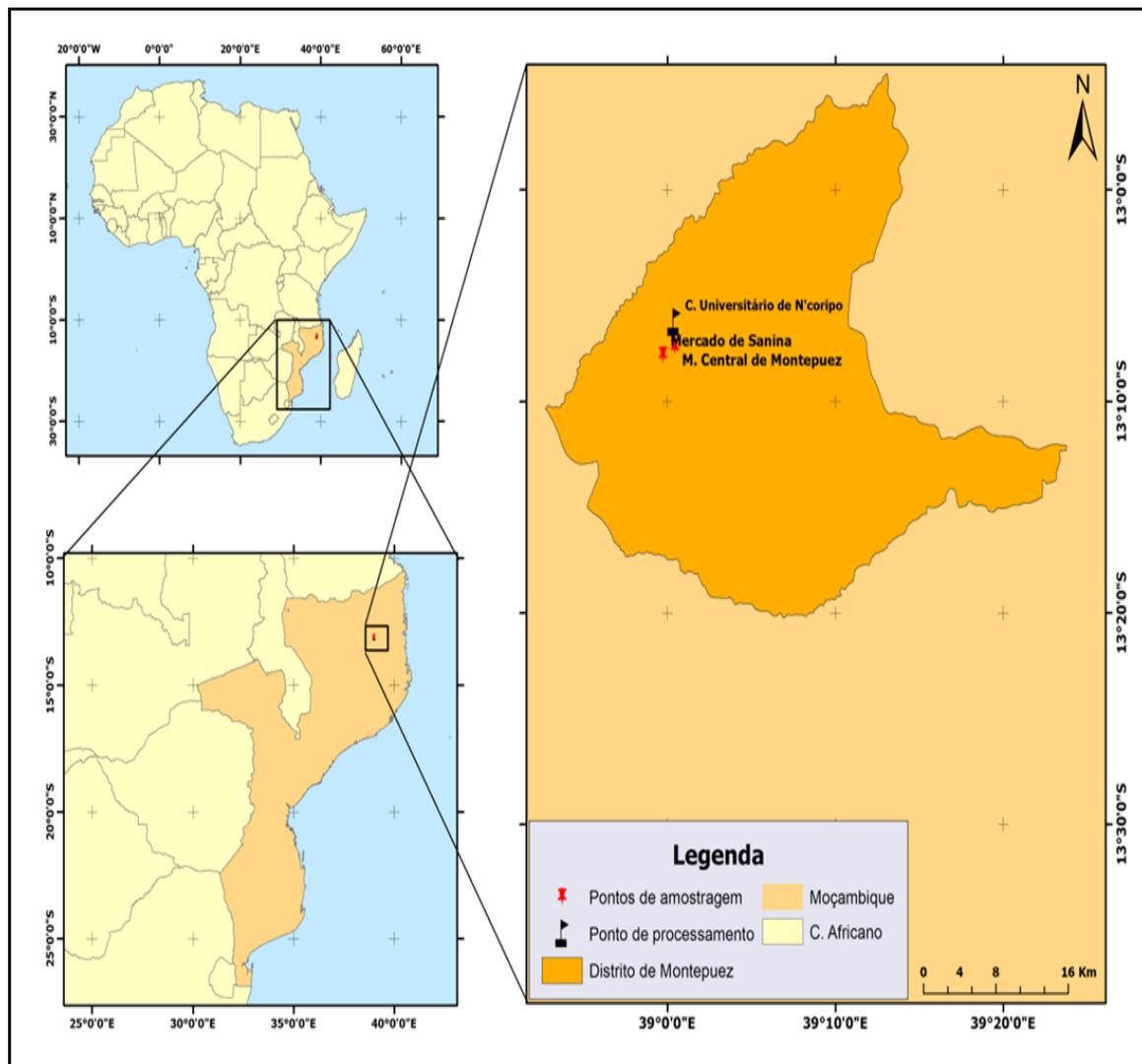


Figura 1. Mapa ilustrativo da área de estudo em Moçambique.



Obtenção das amostras

As amostras do líquido ruminal foram obtidas de animais abatidos por criadores, no período entre 5h às 7h da manhã. Depois do abate dos animais era feita a remoção da bolsa ruminal no animal abatido. Os animais são criados em sistemas tradicionais com uma pastagem nativa livre das 7h da manhã às 17h da tarde, tendo acesso livre à água e recolhidos no final do dia para baias coletivas construídas com material local. Em seguida, depois do abate, a parede do rúmen foi eviscerada longitudinalmente para que o conteúdo ruminal fosse coletado. Em cada hospedeiro, 20cm³ de amostra ruminal foi coletada e fixada em formalina 18.5% (v/v) (DEHORITY, 1984), totalizando 7 amostras. Depois do processo de coleta, as amostras foram levadas para o Laboratório do Instituto Superior de Recursos Naturais e Ambiente da Universidade Rovuma, Cabo Delgado, para o processamento e análise.

Abundância relativa e identificação de gêneros

A abundância relativa dos gêneros foi calculada de acordo com a proposta de Mishima *et al.* (2009), com 300 indivíduos em microscopia óptica em aumento de 400X. A classificação e identificação dos gêneros foram feitas baseando-se em atlas de identificação (OGIMOTO & IMAI, 1981), descrições de espécies publicadas anteriormente e listas taxonômicas em artigos de revisão e caracterização morfológica de ciliados do rúmen (DOGIEL, 1927; KOFOID & MACLENNAN, 1930; HSIUNG, 1932; KOFOID & MACLENNAN, 1932; 1933; WILLIAMS & COLEMAN, 1992; GRAIN, 1994; GÖÇMEN & ATATÜR, 2002; GÖÇMEN *et al.*, 2002; RASTGELDI & GÖÇMEN, 2003; GÖÇMEN & RASTGELDI, 2004). A terminologia sobre a posição anatômica dos ciliados seguiu o proposto por Dogiel (1927), em que a região dorsal do ciliado se refere ao local onde se situa o macronúcleo e a região oposta é designada como ventral.

Análises morfológicas

Técnica semipermanente com corante à base de iodo

Para melhor compreender o número e a morfologia de placas esqueléticas, foi utilizada a técnica semipermanente com corante à base de iodo (D'AGOSTO & CARNEIRO, 1999; CEDROLA *et al.*, 2015). A partir das amostras fixadas e homogeneizadas, foi colhida uma alíquota de 1ml da amostra em tubo de ensaio com capacidade de 14ml, sendo adicionadas três gotas de corante à base de iodo – Solução de Lugol. Após 15 minutos, destinados a coloração dos organismos, foram realizadas observações e fotomicrografias feitas em microscópio BX40.

Inferência filogenética

Compilou-se um “dataset” de ciliados 18S-rDNA com sequências presentes no banco de dados GenBank NCBI. Uma sequência representante da subclasse Haptoria (*Spathidium papilliferum*) foi escolhida como grupo externo. Como critérios de curadoria do banco de dados, somente foram selecionadas sequências maiores de 1,300 bp e de organismos identificados ao nível específico. O alinhamento foi realizado no programa MAFFT v.7.0 (KATO *et al.*, 2019) e inspeccionado visualmente usando o software SeaView v.7.5.8 (GOUY *et al.*, 2009). Os sítios pobremente alinhados foram removidos usando o software online Gblocks v. 0.91b (CASTRESANA, 2000), permitindo a obtenção de uma matriz de 1614 pares de base. Esta matriz curada foi usada para inferência filogenética de Máxima Verosimilhança (MV) por meio de software RAxML v.8.2.4 (STAMATAKIS, 2014).

O modelo de substituição de nucleotídeos GTR + G + I foi escolhido como o melhor modelo pelo software JmodelTest v.2.1.4 (DARRIBA *et al.*, 2012) implementado na Plataforma MEGAX v.10.0.5 (KUMAR *et al.*, 2018). O suporte dos ramos foi estimado usando o critério de convergência de bootstrap no software RAxML v.8.2.4 (STAMATAKIS, 2014), com 1000 pseudoréplicas.

RESULTADOS

Um total de sete amostras do conteúdo ruminal de caprinos domésticos foram analisados. Das amostras, foram identificados dez gêneros de protozoários ciliados pertencentes a duas famílias, Isotrichidae (*Isotricha* e *Dasytricha*) e Ophryoscolidae (*Entodinium*, *Eremoplastron*, *Polyplastron*, *Metadinium*, *Epidinium*, *Ophryoscolex*, *Diplodinium* e *Elytroplastron*). O gênero mais abundante foi o *Entodinium* (70.3) e o gênero menos abundante foi o *Polyplastron* (4.7). Em termos de prevalência, os gêneros, *Entodinium* e *Dasytricha* foram os mais prevalentes e o *Ophryoscolex* menos prevalente, com 100% e 28.57%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Estimativa da abundância relativa genérica de ciliados do rúmen de caprinos domésticos de Montepuez-Cabo Delgado.

Gênero	N	Prevalência (%)	Porcentagem da contagem total (%)	Mean	SD
<i>Isotricha</i>	07	85.7	22.7	9.7	8.6
<i>Dasytricha</i>	07	100	12.3	5.2	5.0
<i>Entodinium</i>	07	100	70.3	211.3	14.6
<i>Eremoplastron</i>	07	85.7	8.0	3.4	2.9
<i>Polyplastron</i>	07	85.7	4.7	2.0	2.0
<i>Metadinium</i>	07	71.4	8.7	3.7	3.6
<i>Epidinium</i>	07	57.14	5.7	2.4	4.3
<i>Ophryoscolex</i>	07	28.57	5.0	2.1	4.8
<i>Diplodinium</i>	07	42.8	6.3	2.7	5.1
<i>Elytroplastron</i>	07	85.7	21.0	9.0	10.0

N-Tamanho da amostra; Mean- Média; SD-Desvio padrão; %- Porcentagem

Por meio da técnica semi-permanente com corante à base de iodo foram identificadas algumas características morfológicas de ciliados em caprinos domésticos de Montepuez. Das características mais evidentes podemos mencionar: a presença do macronúcleo (A e B), presença das zonas ciliares (E), presença de placas esqueléticas (F, G e O), vacúolos contrácteis (F), assim como as espinhas caudais (H e I) (Figura.2).

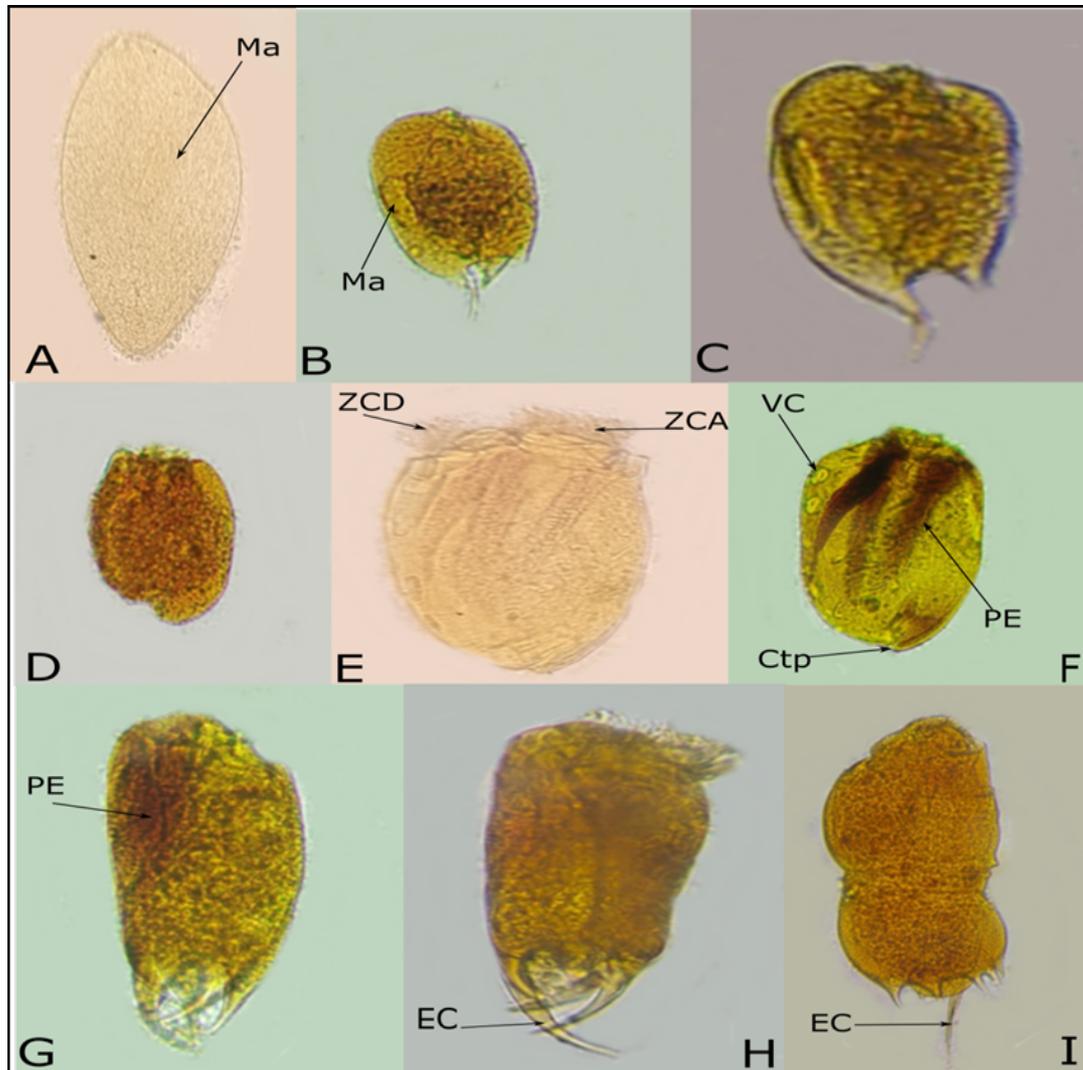


Figura 2. Ilustração de fotomicrografias de ciliados do rúmen de caprinos domésticos de Montepuez, evidenciando algumas características morfológicas. A- *Isotricha* sp; B, C e D-*Entodinium* sp; E e F-*Polyplastron* sp; G e H- *Epidinium* sp; I- *Ophryoscolex* sp. Legendas: Ma- macronúcleo; ZCA- zona ciliar adoral; Ctp- citoprocto; VC- vacúolo contráctil; ZCD- zona ciliar dorsal; PE- placa esquelética; EC- espinha caudal.

Na inferência filogenética, foram utilizadas sequências de ciliados do rúmen de outros autores, disponíveis no banco de dados GenBank e usadas espécies pertencentes à dez (10) gêneros identificados neste trabalho. Foram recuperadas duas ordens distintas de ciliados do rúmen, Vestibuliferida e Entodiniomorpha. Os nossos resultados mostraram que a ordem Entodiniomorpha foi constituída por espécies da família Ophryoscolecidae com o valor de suporte variando entre 27 a 100%. E a ordem Vestibuliferida formada por espécies da família Isotrichidae com valores de suporte de 73 e 99 %. Os resultados mostram que o rúmen dos caprinos estudados é habitado por dois grupos monofiléticos: Entodiniomorpha e Vestibuliferida. Ambos, na análise feita, grupos naturais.

O grupo formado pelas espécies *Ophryoscolex purkynjei*, *Epidinium caudatum* e *Epidinium ecaudatum* recuperou um bootstrap de 94% e 100%. O ramo formado pelas espécies *Metadinium medium*, *Eremoplastron dilobum* e *Polyplastron multivesiculatum* foi suportado por 50% e 65% de bootstrap. Por sua vez, o clado formado pelas espécies *Entodinium longinucleatum*, *Entodinium nanellum* e *Entodinium caudatum* teve um suporte de 100% e 42% de bootstrap. E por fim, os valores de suporte para o grupo formado pelas espécies *Dasytricha ruminantium*, *Isotricha intestinalis* e *Isotricha prostoma* foram de 73% e 99% (Figura 3).

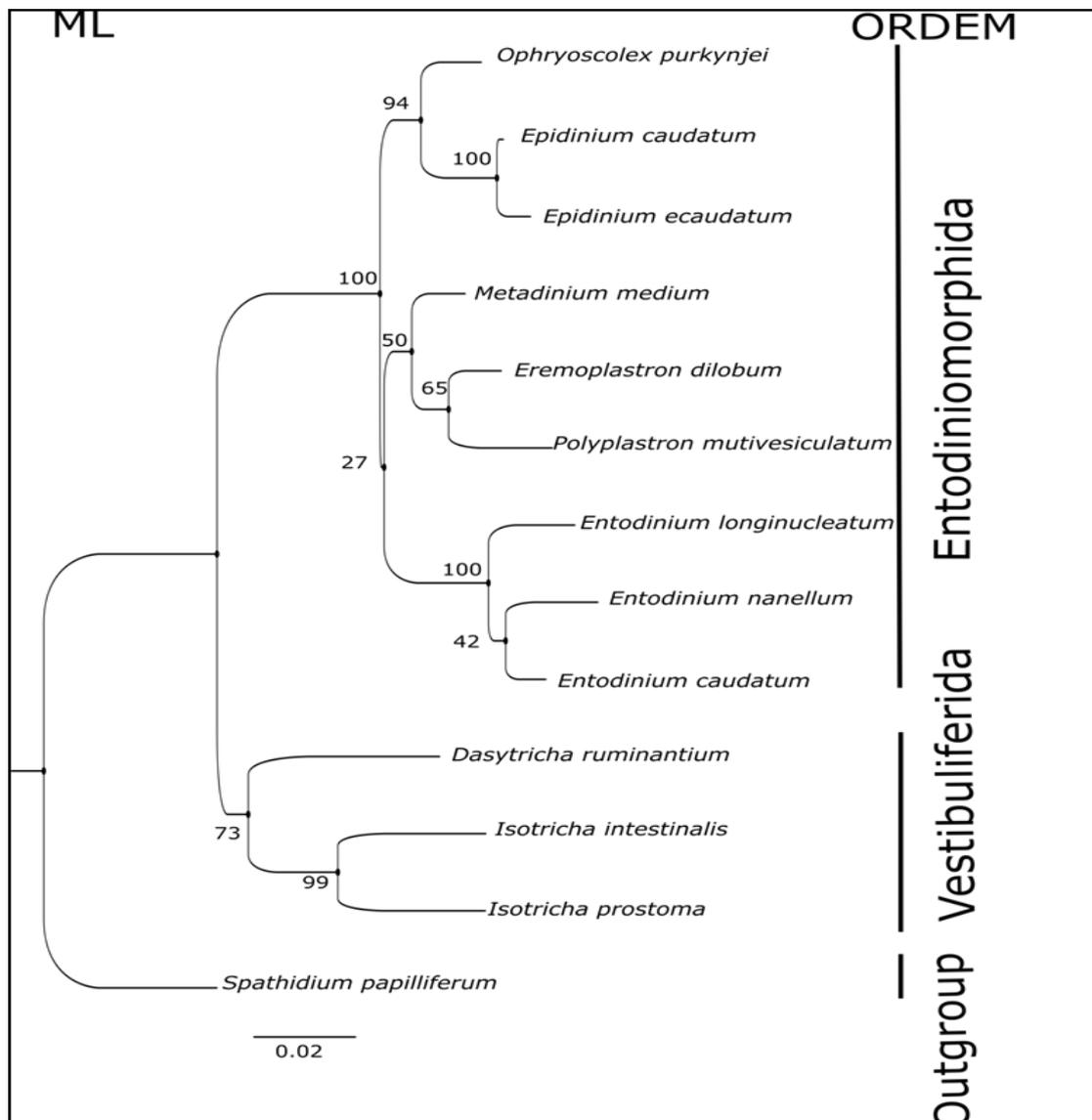


Figura 3. Árvore filogenética obtida por máxima verossimilhança representando relações evolutivas de algumas espécies de ciliados pertencentes aos gêneros identificados no presente trabalho. A espécie *Spathidium papilliferum* foi escolhida como grupo externo. Os valores em cada nó da árvore representam o bootstrap de Máxima Verossimilhança. A barra de escala representa 2 substituições por 100 posições de nucleotídeos.



DISCUSSÃO

No presente trabalho foram identificados dez (10) gêneros de ciliados de rúmen pertencentes à duas famílias de protozoários ciliados de caprinos domésticos (*Capra hircus* L) no distrito de Montepuez. Entretanto, não se verificou o registro de novos gêneros, para além dos descritos anteriormente por outros autores, *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Eremoplastron*, *Polyplastron*, *Metadinium*, *Epidinium*, *Ophryoscolex*, *Diplodinium* e *Elytroplastron*.

Quando comparados resultados da presente pesquisa com estudos de ciliados de caprinos em outros países, o número de gêneros de ciliados ruminais identificados em Montepuez foi maior em relação a Kagoshima no Japão (ITO *et al.*, 1995), Mongólia na China (IMAI *et al.*, 2004), no Egito (BARAKA, 2012), na Turquia (GÜRELLI, 2014) e Bishkek no Quirguistão (GÜRELLI *et al.*, 2016), onde foram identificados cinco (5), oito (8), sete (7), sete (7) e oito (8) gêneros, respectivamente, e menor em relação aos resultados obtidos no sudeste da Turquia (GÖÇMEN & KARAOGLU, 2005) e no nordeste do Irão (EBRAHIMI *et al.*, 2018) com 12 gêneros cada. Porém, o número de gêneros de protozoários ciliados registrados em caprinos (*Capra hircus*) no Norte de Moçambique por Da silva *et al.* (2023) foi similar ao registrado no presente estudo, com 10 gêneros.

Em relação as porcentagens de prevalência mostradas no presente trabalho, *Dasytricha* e *Entodinium* tiveram 100% de prevalência. Relatos similares em relação ao *Entodinium* são encontrados nos estudos feitos por Ito *et al.* (1995) em Kagoshima no Japão; Göçmen & Karaoglu (2005) no sudeste da Turquia, Gürelli (2014) na Turquia e Da silva *et al.* (2023) no norte de Moçambique, onde o gênero *Entodinium* foi o mais prevalente com 100%. Por outro lado, resultados divergentes em relação ao gênero *Dasytricha*, são observados nos estudos feitos pelo Göçmen & Karaoglu (2005) e Da silva *et al.* (2023) onde a prevalência do gênero *Dasytricha* foi de 75.0 e 79.0 %, respectivamente. O gênero *Ophryoscolex* foi o menos prevalente no presente trabalho, com 28.57%, corroborando com o estudo feito por Da silva *et al.* (2023) onde mostrou que o *Ophryoscolex* e *Eudiplodinium* foram os menos prevalentes com 9%.

Em relação a abundância genérica, o gênero *Entodinium* foi o mais abundante com uma contagem total de 70.3 e o gênero *Polyplastron*, menos abundante com uma contagem total de 4.7 em todas as sete amostras. Resultados similares podem ser encontrados no trabalho feito por Da silva *et al.* (2023) onde relata que o gênero *Entodinium* foi o mais abundante com uma contagem total de 71.6, porém, no mesmo estudo de Da silva *et al.* (2023) o gênero menos abundante foi o *Eudiplodinium* com a contagem total de 0,07 da contagem. A predominância do gênero *Entodinium* nos estudos, tem sido atribuída aos vários factores que incluem a dieta e o baixo valor de pH no rúmen (EADIE, 1962; HUNGATE, 1966; WILKINSON & VAN HOVEN, 1976; NAKAMURA *et al.*, 1988; GÜRELLI *et al.*, 2012; GÜRELLI, 2014; DA SILVA *et al.*, 2023).

Por meio da técnica semipermanente à base de iodo usada neste trabalho, foram identificadas algumas características morfológicas de ciliados em caprinos domésticos que auxiliaram na identificação dos gêneros, por exemplo, macronúcleo, zonas ciliares, placas esqueléticas, vacúolos contrácteis e espinhas caudais. Entretanto, essa técnica, apesar de várias modificações feitas ao longo do tempo (KOFOID & CHRISTENSON, 1933; DEHORITY, 1974; VAN HOVEN, 1983; D'AGOSTO & CARNEIRO, 1999), continua sendo válida para observação de ciliados do rúmen, pois o corante utilizado, apresenta afinidades por polissacarídeos, que são os principais constituintes das placas esqueléticas encontradas em grande parte dos gêneros de ciliados da família Ophryoscolecidae (NOIROT-TIMOTHÉE, 1960). O número, a morfologia e a biometria das placas esqueléticas constituem importantes caracteres de diagnósticos de gêneros e espécies da família Ophryoscolecidae (WILLIAMS & COLEMAN, 1992).

Na presente pesquisa, foram utilizadas sequências do marcador molecular 18S- rDNA de outros autores, depositadas no GenBank para reconstrução filogenética de ciliados endossimbiontes. Os resultados mostram que o rúmen dos caprinos estudados é habitado por dois grupos monofiléticos: Entodiniomorpha e Vestibuliferida. Este resultado é concordante com os resultados de Da Silva *et al.* (2022), apesar de os autores (ROSSI *et al.*, 2015; CEDROLA *et al.*, 2022) acreditarem que de acordo com os dados morfológicos e moleculares, existem três subfamílias monofiléticas dentro de ciliados do rúmen (Entodiniinae, Diplodiniinae e Ophryoscolecinae). Futuramente, estudos utilizando ferramentas integrativas serão essenciais, por exemplo, para melhor acurácia na identificação dos gêneros e espécies assim como de espécies crípticas de ciliados do rúmen.

CONCLUSÕES

A composição de ciliados no rúmen de caprinos domésticos de Montepuez revelou a presença de dez gêneros distribuídos em duas famílias de protozoários ciliados: *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Eremoplastron*, *Polyplastron*, *Metadinium*, *Epidinium*, *Ophryoscolex*, *Diplodinium* e *Elytroplastron*. Entre esses gêneros, *Entodinium* e *Dasytricha* apresentaram maior prevalência, enquanto *Ophryoscolex* foi o menos comum. A identificação, realizada por meio da técnica semipermanente de coloração com iodo, revelou características distintas, incluindo macronúcleo, zonas ciliares, placas esqueléticas, vacúolos contráteis e espinhas caudais. Além disso, os resultados utilizando sequências depositadas no GenBank mostram que o rúmen dos caprinos estudados pode ser habitado por dois grupos monofiléticos: Entodiniomorpha e Vestibuliferida. No entanto, ressaltamos a importância de estudos abrangentes, envolvendo amostras de animais domésticos e selvagens de diferentes regiões de Moçambique, para uma compreensão morfológica mais completa da diversidade e distribuição desses protozoários no país.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com o respaldo do Instituto Superior de Recursos Naturais e Ambiente da Universidade Rovuma, localizado em Cabo Delgado, Moçambique. Agradecemos à instituição pelo fornecimento do espaço laboratorial, onde foram conduzidas todas as análises morfológicas das amostras.

REFERÊNCIAS

- BARAKA, T.A. Comparative Studies of Rumen pH, Total Protozoa Count, Generic and Species Composition of Ciliates in Camel, Buffalo, Cattle, Sheep and Goat in Egypt. **Journal of American Science**, 2012.
- CASTRESANA, J. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. **Molecular Biology and Evolution**, 2000.
- CEDROLA, F; ROSSI, M; DIAS, R.J.P; MARTINELE, I; D'AGOSTO, M. Methods for Taxonomic Studies of Rumen Ciliates (Alveolata: Ciliophora): A Brief Review. **Zoological Science**, 32 (1), 8–15. 2015. <https://doi.org/10.2108/zs140125>.
- CEDROLA, F; SENRA, M.V.X; FREGULIA, P; D'AGOSTO, M; DIAS, R.J.P. Insights into the systematics of the family Ophryoscolecidae (Ciliophora, Entodiniomorpha). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, e12915. 2022. <https://doi.org/10.1111/jeu.12915>.
- D'AGOSTO, M; CARNEIRO, M.E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, 16 (3), 725–729, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751999000300011>.
- DA SILVA, Z.R.J; CEDROLA, F; ROSSI, M.F; COSTA, F.D.S; DIAS, R.J.P. Rumen ciliates (Alveolata, Ciliophora) associated with goats: checklist, geographic distribution, host specificity, phylogeny and molecular dating. **Zootaxa**, 5165(2), 191-216, 2022.



- DA SILVA, Z.R.J; CEDROLA, F; ROSSI, M.F; DIAS, R.J.P. Ciliates in domestic ruminants in Africa and the first characterization of ciliates (Alveolata, Ciliophora) in the rumen of domestic caprines of the Landim breed (*Capra hircus* L) from Mozambique. **Symbiosis**, **90**(3), 241-257, 2023.
- DARRIBA, D; TABOADA, G.L; DOALLO, R.; POSADA, D. JmodelTest 2: more models, new heuristic and parallel computing. **Nature MethodS**, **9**, 772, 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.
- DEHORITY, B.A. Rumen ciliate fauna of Alaskan moose (*Alces Americana*), musk-ox (*Ovibus machattus*) and dall mountain sheep (*Ovis dalli*). **Journal of Protozoology**, **21**, 26-32, 1974.
- DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen Protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, **48**, 182-185, 1984.
- DOGIEL, V.A. Monographie der familie Ophryoscolecidae. **Archiv für Protistenkunde**, **59**, 1-288. 1927.
- EADIE, J.M. Inter-relationships between certain rumen ciliate protozoa. **Journal of General and Applied Microbiology**, **29**, 578-888, 1962. <https://doi.org/10.1099/00221287-29-4-579>.
- EBRAHIMI, S.H; ALIZADEH, R; MIRI, V.H. Rumen Microbial Community of Saanen Goats Adapted to a High-Fiber Diet in the Northeast of Iran. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, **8**(2), 271-279, 2018.
- FRANCISCO, A.E; SANTOS-SILVA, J.M.V; PORTUGAL, A.P; ALVES, S.P.B; BESSA, R.J. Relationship between rumen ciliate protozoa and biohydrogenation fatty acid profile in rumen and meat of lambs. **Plos one**, **14**(9), e0221996, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221996>.
- GÖÇMEN, B; ATATUR, M.K. Some Rumen Ciliates (Isotrichidae, Trichostomatida; Epidininae, Ophryoscolecidae) of the Domestic Goat (*Capra hircus* L.) from Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, **26**, 15-26, 2002.
- GÖÇMEN, B; DEHORITY, B.A; RASTGELDI, S. The occurrence of the rumen ciliate *Metadinium banksi* Dehority, 1985 (Ophryoscolecidae, Entodiniomorpha) from domestic goats (*Capra hircus* L.) in southeastern Turkey. **Turkish Journal of Zoology**, **26**, 367-370, 2002
- GÖÇMEN, B; RASTGELDI, S. A New Rumen Ciliate from the Turkish Domestic Goat (*Capra hircus* L.): *Entodinium salmani* n.sp. (Entodiniidae, Entodiniomorpha). **Turkish Journal of Zoology**, **28**, 295-299, 2004.
- GÖÇMEN, B; KARAOGLU, A. Entodiniid Ciliates (Entodiniidae, Entodiniomorpha) Living in the Rumen of Domesticated Goats (*Capra hircus* L.) in Southeastern Turkey, **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, **29** (3), 211-218, 2005.
- GOUY, M; GUINDON, S; GASCUEL, O. Sea View version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, **27** (2), 221-224, 2009. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>.
- GRAIN, J. Infusoiros ciliés (ordre des Entodiniomorpha). In: Grasse, P. (Ed.). **Traité de Zoologie**, Paris, 327-364pp, 1994.
- GÜRELLI, G; GÖÇMEN, B; YILDIZ, M.Z. Rumen ciliates from the goitered gazelle (*Gazella subgutturosa*) living in the Şanlıurfa Province of Turkey. **Biharian Biology**, **6**, 42-44, 2012 <http://biozoojournals.3x.ro/bihbiol/index.html>.
- GÜRELLI, G. Rumen ciliate fauna (Ciliophora, Protista) of Turkish domestic goats living in İzmir, Turkey. **Turkish journal of zoology**, **38**, 136-143, 2014. <https://doi.org/10.3906/zoo-1303-21>.
- GÜRELLI, G; CANBULAT, S; ALDAYAROV, N; DEHORITY, B.A. Rumen ciliate protozoa of domestic sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra aegagrus hircus*) in Kyrgyzstan. **FEMS Microbiology Letters Advance Access**, 2016.
- GÜRELLI, G; DAW, A.F.O. E. Endosymbiotic Ciliated Protozoan Biota of Dromedary Camels and Domestic Cattle in Tunisia. **Zootaxa**, **4859**(3), 409-418, 2020. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4859.3.6>.
- HUNGATE, R.E. The rumen and its microbes. New York, **Academic Press**, 533 p, 1966
- HSIUNG, T.S. A general survey of the protozoan fauna of the Chinese cattle. Bulletin of the Fan **Memorial Institute of Biology**, **3**, 87-107, 1932.
- IMAI, S; OKU, Y; MORITA, T; IKE, K; GUIRONG. Rumen Ciliate Protozoal Fauna of Reindeer in Inner Mongolia, China. **Journal of Veterinary Medical Science**. **66**(2): 209-212, 2004
- ITO, A; IMAI, S; MANDA, M; OGIMOTO, K. Rumen ciliates of Tokara Native Goat in Kagoshima, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, **57**(2), 355-357, 1995. <https://doi.org/10.1292/jvms.57.355>.
- KATO, K; ROZEWICKI, J; YAMADA, K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings of Bioinformatics**, **20** (4), 1160-1166, 2019. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>.
- KOFOID, C.A; CHRISTENSON, J.F. Ciliates from *Bos gaurus* H. Smith. **University of California Publications in Zoology**, **33**, 471-544, 1933.
- KOFOID, C.A; MACLENNAN, R.F. Ciliates from *Bos indicus* Linn. I. The genus *Entodinium* Stein. **University of California (Berkeley) Publications of Zoology**, **33**, 471-544, 1930.
- KOFOID, C.A; MACLENNAN, R.F. Ciliates from *Bos indicus* Linn III. *Epidinium* Crawley, *Epiplastron* gen. nov., and *Ophryoscolex* Stein. **University of California Publications in Zoology**, **39**: 1-34, 1933.

- KOFOID, C.A; MACLENNAN, R.F. Ciliates from *Bos indicus* Linn II. The genus *Diplodinium* Schuberg. **University of California Publications in Zoology**, 37: 53–152, 1932
- KUMAR, S; STECHER, G; LI, M; KNYAZ, C; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary 665 genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology Evolution**, 35 (6), 1547–1549, 2018. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- LOZANO, M.G; GARCIA, Y.P; ARELLANO, K.A; ORTIZ, C.L; BALAGURUSAMY, N. Livestock methane emission: microbial ecology and mitigation strategies. **Livestock Science. Intech Open**, 55–69, 2017.
- LYNN, D.H. The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification, and Guide to the Literature 3rd ed., **Springer**, 2008
- MISHIMA, T; KATAMOTO, H; HORI, Y; KAKENGI, V.A.M; ITO, A. Rumen ciliates from Tanzanian short horn zebu cattle *Bos taurus indicus* and the infraciliature of *Entodinium palmare* n. sp. and *Enoploplastron stokyi* (Buisson, 1924). **European Journal of Protistology**, 45, 77–86, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejop.2008.07.002>.
- NAKAMURA, I; OGIMOTO, K; IMAI, S; NAKAMURA, N. Production of lactic acid isomers and change of microbial features in the rumen of feedlot cattle. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 61,139–144, 1988. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1989.tb00093.x>.
- NEWBOLD, C.J; DE LA FUENTE, G; BELANCHE, A; RAMOS-MORALES, E; MCEWAN, N. R. The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. **Frontiers in Microbiology**, 6, 1312, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01313>.
- NOIROT-TIMOTHÉE, C. Etude d'une famille de ciliés: les Ophryoscolecidae. Structures et ultrastructures. **Annales de Sciences Naturelles Zoologique**, 12, 526-718, 1960.
- OGIMOTO, K; IMAI, S. Atlas of rumen microbiology. Japan Scientific Press, Tokio, 231p, 1981
- RASTGELDI, S.; GÖÇMEN, B. Türkiye Evcil Keçilerinde (*Capra hircus* L.) İşkembe Siliyatları, *Diplodinium crista-galli* ve *Diplodinium flabellum* (Entodiniomorphida) Bulunuşu. **Türkiye Parazitoloji Dergisi**, 27 (4), 287–293, 2003.
- REIS, C.C. dos. Protozoários ciliados no rúmen de bovinos Nelore e Cruzados Nelore x Europeu sob diferentes sistemas de alimentação, 2015, 64p. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos.
- ROSSI, M.F; DIAS, R.J.P; SENRA, M.V.X; MARTINELE,I; CARLOS A. G. SOARES, C.A.G; D'AGOSTO, M. Molecular Phylogeny of the Family Ophryoscolecidae (Ciliophora, Litostomatea) Inferred from 18S rDNA sequences. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 62, 584–590, 2015. <https://doi.org/10.1111/jeu.12211>
- RUSSELL, J.B; RYCHLIK, J.L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, 292(5519):1119-22, 2001. <https://doi.org/10.1126/science.1058830>.
- STAMATAKIS, A. RAXML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, 30 (9), 1312–1313, 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
- STEVENS C. E; HUME, I.D. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. **PhysiolRev**.78 (2):393–427, 1998. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.2.393>
- VAN HOVEN, W. Rumen ciliates with description of two new species from the African reedbeek species. **Journal of Protozoology**, 30, 127-130, 1983.
- WILKINSON, R.C; VAN HOVEN, W. Rumen ciliate fauna of the springbok (*Antidorcas marsupialis*) in southern Africa. **African Zoology**, 11(1), 1–22, 1976.
- WILLIAMS, A.G; COLEMAN, G.S. **The rumen protozoa**. Springer, New York,1992
- WLODARSKI, L; MAEDA, E.M; FLUCK, A.C; GILIOLI, D. Microbiota ruminal: diversidade, importância e caracterização. **Revista Electrónica de Veterinária**, 18(11),1–20, 2017.
- XIE, F; JIN, W; SI, H; YUAN, Y; TAO, Y; LIU, J; WANG, X; YANG, C; LI, Q; YAN, X; LIN, L; JIANG, Q; ZHANG, L; GUO, C; GREENING, C; HELLER, R.; GUAN, L.L; POPE, B.P; TAN, Z; ZHU, W; WANG, M; QIU, Q; LI, Z; MAO, S. An integrated gene catalog and over 10,000 metagenome-assembled genomes from the gastrointestinal microbiome of ruminants. **Microbiome**, 9(1), 1–20,2021.
- ZEINELDIN, M; BARAKAT, R; ELOLIMY, A; SALEM, A. Z. M; ELGHANDOUR, M. M. Y; ONROY, J. C. Synergetic action between the rumen microbiota and bovine health. **Microbial Pathogenesis**, 124, 106–115, 2018 <http://doi.org/10.1016/j.micpath..08.0>.