

Comunicación

CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTOZOOS RUMINALES DE UN NOVILLO BRAFORD ALIMENTADO CON HENO DE ALFALFA Y BAGAZO DE LIMÓN

*Identification and characterization of ruminal protozoa of one Braford steer feed with
alfalfa hay and lemon bagasse*

**Nieto RA¹, Uñates Pellene FA¹, Juárez Sequeira AV^{1,2}, López A^{1,3},
Gómez Rojas JR², Palma GA^{1,2*}, Coria MS^{1,2*}**

¹Facultad de Agronomía y Agroindustrias, ²Laboratorio de Producción y Reproducción Animal. Instituto de Bionanotecnología del NOA, CONICET; Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina.

³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), EEA Santiago del Estero, Argentina

*E-mails de contacto: gustavo.palma@reprobiotec.com; sumicoria@gmail.com

RESUMEN

El rumen es un ecosistema complejo en el que los alimentos consumidos por los rumiantes son digeridos por microorganismos, entre los cuales podemos encontrar bacterias, hongos y protozoos. El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio exploratorio para identificar, caracterizar y cuantificar protozoos en muestras de líquido ruminal de un novillo Braford. Se trabajó con líquido ruminal de un novillo Braford fistulado alimentado con heno de alfalfa y bagazo de limón en una proporción 60:40. Se realizó la identificación mediante microscopía óptica y electrónica de barrido. Posteriormente, se realizó la caracterización de los protozoos analizando el largo y ancho de los mismos. Finalmente, se cuantificó el número total de protozoos presentes en la muestra. De este modo, fue posible identificar protozoos de las familias *Ophryoscolecidae* e *Isotrichidae* y entre ellos los siguientes géneros: *Entodinium*, *Epidinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ophryoscolex*, *Isotricha* y *Dasytricha*. A su vez, se registraron valores de $1,55 \times 10^5$ protozoos/ml de líquido ruminal, de los cuales el 97% corresponde a individuos de la familia *Ophryoscolecidae*. La metodología empleada permitió evaluar la diversidad de protozoos presentes en líquido ruminal y posibilitó la caracterización y cuantificación de los protozoos de las familias *Ophryoscolecidae* e *Isotrichidae* predominantes en el bovino estudiado, generando el primer estudio de fauna ruminal del noroeste argentino alimentado con heno de alfalfa y bagazo de limón. Los resultados obtenidos indican que la población de protozoos ruminales sería comparable a la descrita en la literatura, sugiriendo el posible uso de este subproducto (*i.e.* bagazo de limón) en la formulación de raciones para ganado. Asimismo, se establecieron las bases para futuras investigaciones que podrían tener un impacto significativo en la nutrición animal y la producción ganadera sostenible.

Palabras clave. rumiantes, microscopía, subproducto, fauna ruminal, nutrición animal.

ABSTRACT

The rumen is a complex ecosystem in which the food consumed by ruminants is digested by microorganisms, among them we can find bacteria, fungi and protozoa. The aim of this work was to carry out an exploratory study to identify, characterize and quantify protozoa in samples of one Braford steer, feed with alfalfa hay and lemon bagasse (60:40). Rumen fluid from a fistulated Braford steer was used. Identification and characterization were made by optical and scanning electron microscopy. Subsequently, the characterization of the protozoa was carried out, analyzing their length and width. Finally, the total number of protozoa present in the sample was quantified. Protozoa of the families *Ophryoscolecidae* and *Isotrichidae*, including the following genera: *Entodinium*, *Epidinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ophryoscolex*, *Isotricha* and *Dasytricha* were identified and characterized. Furthermore, values of 1.55×10^5 protozoa/ml of rumen fluid were recorded, of which 97% correspond to the *Ophryoscolecidae* family. The methodology used allowed us to evaluate the diversity of protozoa present in rumen fluid and made possible the characterization and quantification of the protozoa of the families *Ophryoscolecidae* and *Isotrichidae* predominant in the bovines studied, generating the first study of ruminal fauna of northwestern Argentina fed with alfalfa hay and lemon bagasse. The obtained results indicate that the ruminal protozoa population is comparable to that described in the literature. This agreement suggests the possibility of considering this by-product (*i.e.* lemon bagasse) in livestock feed formulation and lays the foundation for further research that could have a significant impact on animal nutrition and sustainable livestock production.

Key words. ruminants, microscopy, by-product, ruminal fauna, animal nutrition.

Recibido: Marzo 2023

Aceptado: Agosto 2023

Introducción

Los bovinos tienen la capacidad de convertir, de manera eficiente, los carbohidratos de la pared celular vegetal en carne y leche. Esta capacidad es el resultado de la evolución de una asociación simbiótica con una comunidad microbiana que incluye un gran número de bacterias, arqueas metanogénicas, hongos anaerobios y protozoos (Gruninger et al. 2019; Wright y Klieve 2011).

Los protozoos se encuentran ubicuamente en el rumen, y se estima que abarcan entre el 25% y el 50% de la biomasa microbiana (Gruninger et al. 2019). La población de protozoos abarca una gran variedad de especies diversas en el entorno del rumen caracterizadas por diferentes morfologías y tamaños, con especies de más de 100 μm a menos de 10 μm de longitud (Dehority 2003). Estos organismos realizan diversas funciones en el rumen, como regular la población bacteriana, la concentración de amonio e hidrógeno, el pH, volumen y tasa de dilución ruminal (Scorcione Turcuto 2013). A su vez, se ha demostrado que los protozoos tienen un fuerte impacto en la diversidad del ecosistema microbiano del rumen y que diferentes comunidades de protozoos afectan de manera diferencial la estructura de la comunidad microbiana (Solomon et al. 2022).

Por otro lado, se debe mencionar que el procesamiento industrial de cítricos da origen a subproductos con elevado contenido de pectina (fibra altamente digestible) que aporta bajos valores de almidón y proteína, que los hacen interesantes como sustitutos de los granos, al menos en un cierto porcentaje, en las dietas de terminación del ganado bovino (Bittner et al. 2013; Bastos et al. 2015; Gouvêa et al. 2016). En este contexto, el uso de bagazo de limón como alternativa para la alimentación de los rumiantes permitiría revalorizar a un sub-producto de la industria del limón al incluirlo adecuadamente como ingrediente en la formulación de raciones. Si bien se ha reportado que la fermentación del bagazo de limón produce menores cantidades de lactato con alteraciones mínimas en el pH ruminal (Villarreal et al. 2006) y que la sustitución del 100% de la porción energética (grano de maíz) por pulpa de cítrico deshidratada resultó en un incremento en el pH ruminal y en la producción de acetato (López et al. 2014), no se ha estudiado su efecto en la población de protozoos ruminales.

Considerando que la identificación y cuantificación de protozoos mediante microscopía representa una técnica "gold standard" en el análisis de comunidades ruminales (Newbold et al. 2015), que el papel de los protozoos del rumen en la formación de la estructura y función de la comunidad microbiana es importante para entender perfiles de fermentación ruminales, y que los protozoos pueden variar en cantidad y proporción en las diferentes especies, razas, regiones geográficas y de acuerdo al tipo de alimentación recibida (Kišidayová et al. 2021), el objetivo del presente trabajo fue identificar, caracterizar y cuantificar protozoos en el líquido ruminal de un novillo Braford alimentado con heno de alfalfa y bagazo de limón.

Materiales y Métodos

Material biológico analizado

Se trabajó con líquido ruminal obtenido de un novillo fistulado raza Braford de 7 años de edad y 536 Kg del Campo Experimental "Francisco Cantos" de la EEA INTA Santiago del Estero. El novillo fue alimentado con heno de alfalfa (*Medicago sativa*, 88% MS, 14% PB, 47% FDN) y bagazo de limón (81,7% MS, 8,1% PB, 37,1% FDN, 27,4% FDA) en una proporción 60:40 (pH 6,78). Con 7 días de diferencia, se realizaron dos muestreos. El fluido ruminal fue recolectado manualmente desde el centro, saco craneal, saco ventral, saco caudal, saco dorsal del rumen 4 horas post alimentación. Se depositaron las 5 porciones en un recipiente, las cuales sumaron aproximadamente 500 ml, se mezclaron, filtraron con gasa doble y almacenaron en condiciones anaeróbicas a 37°C hasta su traslado a los Laboratorios de Producción y Reproducción Animal del INBIONATEC, donde fueron analizadas.

Identificación y caracterización

Se realizó la identificación y caracterización utilizando el microscopio óptico invertido y el electrónico de barrido. Para la evaluación con microscopio óptico las muestras fueron fijadas en partes iguales (v/v) con solución de formol al 10% y coloreadas con verde de metilo ó lugol para identificar núcleos y placas esqueléticas respectivamente (Dehority 1993). Posteriormente se colocaron 5 μL de la muestra fijada y coloreada en un portaobjetos, se agregó un cubreobjetos y los protozoos fueron visualizados en un microscopio óptico invertido DMIL Led. La evaluación mediante microscopía de barrido electrónico se realizó en muestras fijadas con solución de Karnovsky con el equipo Phenom World-Phenon ProX (ThermoFisher). A partir de 1000 μL de líquido ruminal fresco se realizaron centrifugaciones a 200 y 500 $\times g$ y el pellet obtenido fue resuspendido con 1000 μL de solución fijadora de Karnovsky. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con agua destilada y deshidratadas con soluciones crecientes de alcohol (50, 70, 85, 96 y 100%) por 1 hora en cada solución a temperatura ambiente. Las muestras fueron criofracturadas en nitrógeno líquido, y se realizaron dos pasos por acetona al 100% durante media hora. Luego las muestras fueron secadas a punto crítico usando CO_2 y fueron montadas en un holder y metalizadas con oro. Finalmente, las muestras fueron visualizadas en el microscopio de barrido y las imágenes fueron obtenidas con 5 y 10 kV de aceleración del haz de electrones y un tamaño de haz de 3,3 nm con un tiempo de exposición de 26 segundos.

Posteriormente se realizó la identificación en imágenes tomadas con la cámara CCD DFC7000 T con el software Leica Application Suite X (Leica) en el microscopio óptico y software ProSuite de Phenom World (ThermoFisher) en microscopio electrónico de barrido. Se utilizó como criterio el número y ubicación de las áreas ciliares, forma y tamaño de las células, ubicación, número y tamaño de las placas esqueléticas.

Estructuras comunes como el macronúcleo, micronúcleo, vacuolas (contráctil, de concreción y alimenticia), vestíbulo o citostoma y citopigio permiten identificar los integrantes de las dos familias de protozoos. En este sentido, el tamaño y la forma del protozoario fueron claves taxonómicas importantes para la identificación, al igual que el número y posición de las zonas ciliares. Posteriormente se realizó la caracterización de los protozoos determinando el largo, ancho y la relación entre estos dos parámetros.

Cuantificación

Se evaluó la concentración de protozoos mediante conteo en microscopio óptico invertido utilizando una cámara de recuento de 25 campos (1 cm²) diseñada en el laboratorio. Para el conteo se utilizó una alícuota de 5 µL de una solución que contiene líquido ruminal, formaldehído al 10% y lugol (100:100:10) (Dehority 1993). La cuantificación se realizó por triplicado en ambas muestras. El recuento de los protozoos se realizó siguiendo una guarda griega, teniendo en cuenta que los protozoos sobre las líneas de división se contaron como uno.

Resultados y Discusión

El objetivo de este trabajo fue caracterizar e identificar los diferentes géneros de protozoos presentes en el líquido ruminal de un novillo alimentado con heno de alfalfa y bagazo de limón con dos técnicas de microscopía. Las muestras analizadas permitieron identificar a protozoarios de la familia *Isotrichidae* (Holótricos) (géneros *Isotricha* y *Dasytricha*) y de la familia *Ophryoscolecidae* (*Entodiniomorpha*) (géneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium* y *Ophryoscolex*) (Figuras 1 y 2). Los ciliados del orden *Entodiniomorpha* se caracterizan por tener 1, 2 ó 3 zonas ciliares. A su vez dentro de este orden es posible diferenciar géneros según la presencia y cantidad de placas esqueléticas. Las mismas están ausentes en los géneros *Entodinium* y *Diplodinium* y presentes en los demás géneros con 1 (*Eudiplodinium*), 2 (*Metadinium*), (*Epidinium*), 4 (*Elytroplastron*) o 5 (*Polyplastron*) (Zapata-Salas y Polanco-Echeverry 2010).

Se debe destacar, que las imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de barrido permitieron la visualización de la ultraestructura con mayor detalle al obtenido con el microscopio óptico, permitiendo identificar el número y la posición de las zonas ciliares. Sin embargo, las placas esqueléticas y núcleos pueden visualizarse únicamente con éste último. Por lo tanto, ambas microscopias fueron complementarias en la identificación y caracterización de los protozoarios. De forma similar, Stefanut *et al.* (2005) describieron la presencia de los mismos géneros en vacas alimentadas con concentrado y heno. A su vez, estos autores pudieron identificar los géneros *Eudiplodinium* y *Polyplastron*. Asimismo, mediante microscopía fue posible identificar previamente las diferentes morfo-especies pre-

sentes en el líquido ruminal de bisontes, cabras y ovejas (Ştefănuţ *et al.* 2015; Gürelli 2017; Kişidayová *et al.* 2021).

A su vez, se realizó la caracterización de los protozoos pertenecientes a ambas familias, determinando el largo, ancho y la relación entre estos dos parámetros. Previamente se ha descrito que estos microorganismos tienen un tamaño que varía entre 15-250 µm de largo y 20-200 µm de ancho (Dehority 2003). En este sentido, las medidas obtenidas para los diferentes individuos de cada género y/o familia son similares a los descritos previamente en rumiantes (Baraka 2012; Ştefănuţ *et al.* 2015) (Tabla 1). Se debe resaltar, que los desvíos estándar obtenidos fueron elevados porque se realizó la caracterización teniendo en cuenta el género o la subfamilia dentro de cada familia.

El recuento total de protozoos promedio fue 1,57 x 10⁵/ml de líquido ruminal, de acuerdo con lo reportado en la bibliografía (10⁴ a 10⁶ células/ml) (Gruninger *et al.* 2019). Aproximadamente el 97% estuvo compuesto por protozoos de la familia *Ophryoscolecidae*, y la mayoría de estos son de la subfamilia de *Entodiniinae*, seguidos por *Diplodiniinae* y *Ophryoscolecinae*. El 3% restante de los protozoos pertenecieron a la familia *Isotrichidae*, dentro de los cuales predomina el género *Dasytricha* seguido por *Isotricha*.

La bibliografía sugiere que los protozoos predominantes pertenecen al orden *Entodiniomorpha*, dentro de la cual se encuentra la familia *Ophryoscolecidae* (Scorcione Turcato 2013) y que la segunda familia en cuanto a su abundancia corresponde a *Isotrichidae*. En este contexto, los valores determinados por Ştefănuţ *et al.* (2015) en vacas alimentadas con concentrado y heno, indican que el 87% de los individuos encontrados corresponden a protozoos de los géneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Polyplastron*, *Epidinium* y *Ophryoscolex* y el 13% a los géneros *Dasytricha* e *Isotricha*. A su vez, los valores descriptos en cabras y ovejas con el mismo tipo de alimentación fueron del 92% y 97% para la familia *Ophryoscolecidae* y del 8% y 3% para la familia *Isotrichida*, respectivamente. Por otro lado, en trabajos realizados en machos y hembras bisonte, las familias más abundantes fueron *Ophryoscolecidae* (85%) e *Isotrichida* (15%) (Kişidayová *et al.* 2021). Se debe resaltar que este autor trabaja con muestras obtenidas 1 a 3 horas post- mortem e indica la temporada de muestreo, pero no la dieta de los animales. En este sentido, los resultados obtenidos permiten sugerir que la alimentación con heno de alfalfa y bagazo de limón genera poblaciones de protozoos con una estructura, a nivel familia, similar a la descrita en la bibliografía en cuanto a número y conformación. Si bien hay variaciones en los géneros encontrados, las mismas podrían deberse a las especies estudiadas, el tipo de alimentación consumido, el ambiente en el que se encuentran, como también a la condición fisiológica de los individuos en el momento del muestreo (Gürelli 2017).

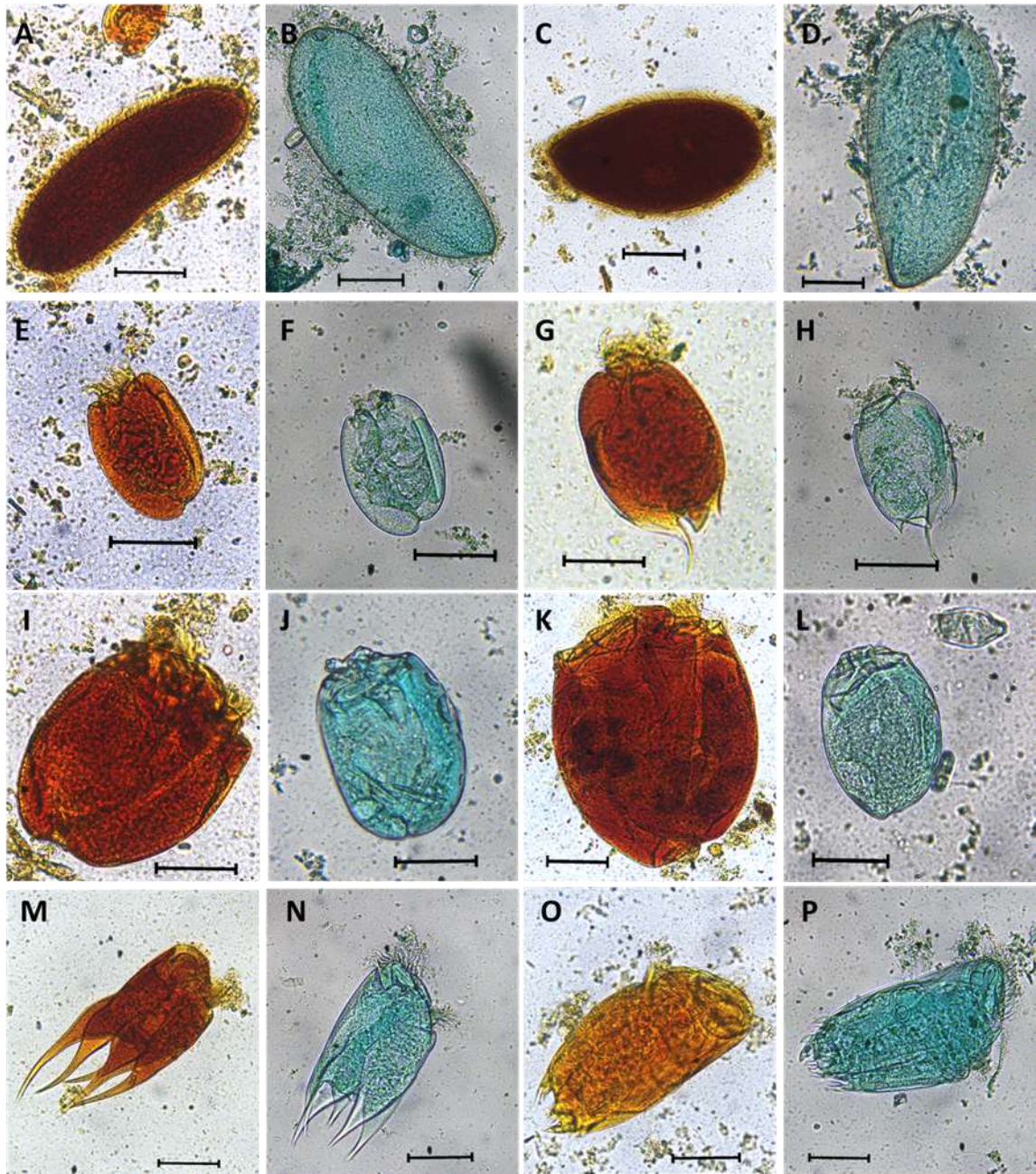


Figura 1. Microfotografías de protozoarios presentes en rumen de un novillo Braford alimentado con heno de alfalfa y bagazo de limón (60:40). Se identifican protozoos del género *Isotricha* (A-B), *Dasytricha* (C-D), y de las subfamilias Entodiniinae (E-H), Diplodiniinae (I-L) y Ophryoscolecinae (M-P). Las muestras fueron teñidas con soluciones de lugol (A, C, E, G, I, K, M y O) y verde de metilo (B, D, F, H, J, L, N y P) y visualizadas en microscopio óptico invertido. Las barras indican 50 μm en todas las imágenes.

Figure 1. Microphotographs of protozoa present in the rumen of a Braford steer feed with alfalfa hay and lemon bagasse (60:40). Protozoa of the genus *Isotricha* (A-B), *Dasytricha* (C-D), and the subfamilies Entodiniinae (E-H), Diplodiniinae (I-L) and Ophryoscolecinae (M-P) are identified. The samples were stained with (A, C, E, G, I, K, M and O) and methyl green solutions (B, D, F, H, J, L, N and P) and viewed under an inverted microscope. The bars indicate 50 μm in all images.

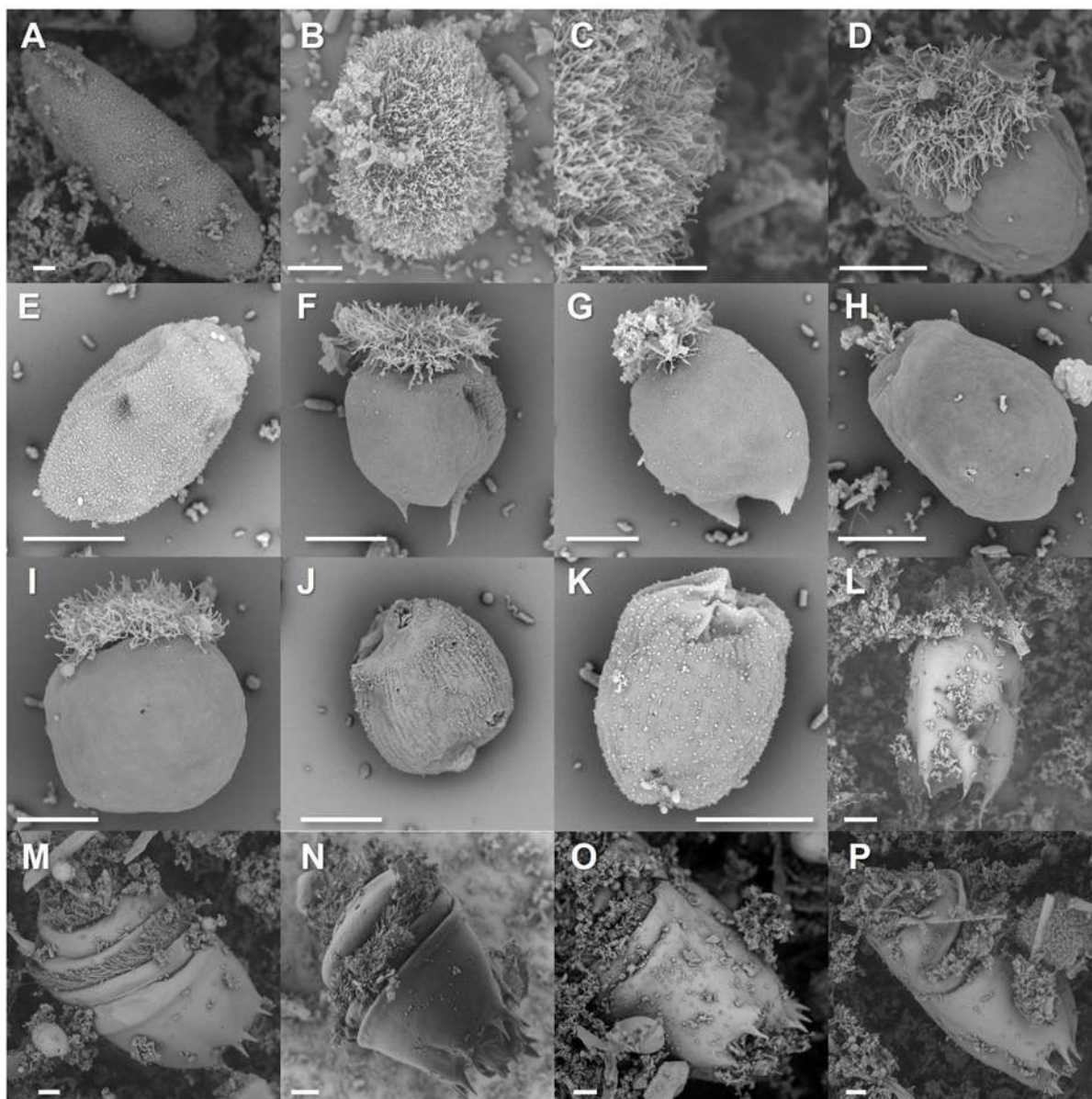


Figura 2. Microfotografías de protozoarios identificados en el rumen de un novillo Braford alimentado con heno de alfalfa y bagazo de limón (60:40) mediante microscopía electrónica de barrido. Se identifican protozoos del género *Isotricha* (A), *Dasytricha* (B-C), y de las subfamilias *Entodiniinae* (D, F-I), *Diplodiniinae* (E, J-K) y *Ophryoscolecinae* (L-P). Las barras indican 10 µm en todas las imágenes.

Figure 2. Micrographs of protozoa identified in the rumen of a Braford steer feed alfalfa hay and lemon bagasse (60:40) by scanning electron microscopy. Protozoa of the genus *Isotricha* (A), *Dasytricha* (B-C), and of the subfamilies *Entodiniinae* (D, F-I), *Diplodiniinae* (E, J-K) and *Ophryoscolecinae* (L-P) are identified. The bars indicate 10 µm in all images.

Tabla 1. Medidas de largo, ancho y porcentaje de composición de protozoos ruminales en un novillo Braford alimentado con heno de alfalfa y bagazo de limón (60:40) (media ± desvío estándar).

Table 1. Measurements of length, width, and percentage of composition of ruminal protozoa in Braford steer feed alfalfa hay and lemon bagasse (60:40) (average ± standard deviation).

Familia	<i>Isotrichidae</i>		<i>Ophryoscolecidae</i>		
Género	<i>Dasytricha</i>	<i>Isotricha</i>	<i>Entodiniinae</i>	<i>Diplodiniinae</i>	<i>Ophryoscolecinae</i>
Variable					
Largo (L) (µm)	73,74 ± 9,84	196,36 ± 38,47	46,65 ± 9,23	102,74 ± 42,63	177,63 ± 24,23
Ancho (A) (µm)	32,76 ± 4,34	96,3 ± 24,18	30,45 ± 8,26	68,34 ± 30,52	89,06 ± 17,56
L/A	2,28 ± 0,35	2,10 ± 0,44	1,58 ± 0,28	1,54 ± 0,19	2,06 ± 0,48
Composición (%)	1,73	1,06	93,35	2,13	1,73

Conclusiones

A nuestro conocimiento, este es el primer estudio que describe la población de protozoos en el líquido ruminal en un novillo Braford del noroeste argentino alimentado con heno de alfalfa y bagazo de limón. Si bien es un estudio exploratorio, se realizó la caracterización y cuantificación de los protozoos ruminales de las familias *Ophryoscolecidae* e *Isotrichidae* predominantes en el bovino estudiado. En este sentido, los resultados obtenidos contribuyen al estudio de la diversidad ecológica de los protozoarios presentes en el rumen. La población ruminal de protozoos en las condiciones de alimentación evaluadas son similares a las descritas en la bibliografía, sugiriendo que este subproducto podría evaluarse en la formulación de raciones. Asimismo, este estudio exploratorio no solo representa un paso inicial en la comprensión de las poblaciones de protozoos ruminales y su respuesta a diferentes dietas, sino que también establece las bases para investigaciones más profundas que podrían tener un impacto significativo en la nutrición animal y la producción ganadera sostenible.

Contribuciones de los autores

Nieto RA, Uñates Pellene FA: ejecución de experimentos, procesamiento de datos y análisis de resultados. Juárez Sequeira AV: análisis de resultados, diseño de experimentos. López A: diseño de experimentos, obtención de muestras. Gómez Rojas JR: obtención de datos. Palma GA: diseño de experimentos, procesamiento de datos, financiamiento, responsabilidad por la integridad y coherencia del artículo. Coria MS: implementación de la investigación, interpretación de resultados, responsabilidad por la integridad y coherencia del artículo.

Consideraciones de ética y bienestar animal

Se trabajó con un novillo fistulado según el aval del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) del INTA-Centro Regional Tucumán- Santiago del Estero/IIACS Leales ID-CICUAE 02-2019 y la toma de muestras se realizó de acuerdo al aval ID-CICUAE 02-2022.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer al Dr. Eduardo Alberto Parellada por su asistencia técnica en las determinaciones realizadas en el laboratorio, al Mg. Olegario Hernández y al técnico de Laboratorio INTA Héctor Fissolo por su colaboración en el muestreo y a la Dra. María Esperanza Cerón por su colaboración en la identificación de protozoos. El presente trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación [PICT 2020 00062 y PICT 2020 00695].

Bibliografía

Baraka TA (2012) 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* **8**, 448-462.
Bastos MPV, Carvalho GGPD, Pires AJV, Silva RRD, Carvalho BMAD, Brandão KC, Maranhão CMDA (2015) Impact of

total substitution of corn for soybean hulls in diets for lambs. *Revista Brasileira de Zootecnia* **44**, 83-91.
Bittner CJ, Nuttelman BL, Scheider CJ, Burken DB, Klopfenstein TJ, Erickson GE (2013) Effects of feeding increasing levels of soyhulls in finishing diets with WDGS. *Nebraska Beef Cattle Report* 88-89.
Dehority BA (2003) *Rumen Microbiology*. Thrumpton: Nottingham University Press.
Dehority BA (1993) *Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa*. CRC Press.
Gouvêa VN, Batistel F, Souza J, Chagas LJ, Sitta C, Campanili PRB, Galvani DB, Pires AV, Owens FN, Santos FAP (2016) Flint corn grain processing and citrus pulp level in finishing diets for feedlot cattle. *Journal of Animal Science* **94**, 665-677.
Gruninger RJ, Ribeiro GO, Cameron A, McAllister TA (2019) Invited review: Application of meta-omics to understand the dynamic nature of the rumen microbiome and how it responds to diet in ruminants. *Animal* **13**, 1843-1854.
Gürelli G (2017) Rumen ciliate fauna of domestic sheep (*Ovis aries*) in Izmir, Turkey and scanning electron microscopic observations. *Zootaxa* **4286**, 545-554.
Kišidayová S, Durkaj D, Mihaliková K, Váradyová Z, Puchalska J, Szumacher-Strabel M, Cieślak A, Gizejewski Z (2021) Rumen ciliated protozoa of the free-living european ison (*Bison bonasus*, Linnaeus). *Frontiers in Microbiology* **12**, 658448.
López A, Arroquy JI, Juárez Sequeira AV, García M, Nazareno M, Coria H, Distel RA (2014) Effect of protein supplementation on tropical grass hay utilization by beef steers drinking saline water. *Journal of Animal Science* **92**, 2152-2160.
Newbold CJ, De La Fuente G, Belanche A, Ramos-Morales E, McEwan NR (2015) The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology* **6**, 1313.
Solomon R, Wein T, Levy B, Eshed S, Dror R, Reiss V, Zehavi T, Furman O, Mizrahi I, Jami, E (2022) Protozoa populations are ecosystem engineers that shape prokaryotic community structure and function of the rumen microbial ecosystem. *The ISME Journal* **16**, 1187-1197.
Scorcione Turcato MC (2013) *Uso de compuestos bioactivos de origen vegetal para disminuir la metanogénesis ruminal*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
Ștefănuț LC, Ognean L, Niculescu Ș, Bolfă P (2015) Morphological particularities of population of rumen protozoa in domestic ruminants. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca* **72**, 67-74.
Villarreal M, Cochran RC, Rojas-Bourrillon A, Murrillo O, Munoz H, Poore M (2006) Effect of supplementation with pellet citrus pulp on digestibility and intake in beef cattle fed a tropical grass-based diet. *Animal Feed Science and Technology* **125**, 163-173.
Wright ADG, Klieve AV (2011) Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? *Animal Feed Science and Technology* **166-167**, 248-253.
Zapata-Salas R, Polanco-Echeverry D (2010) Structures of rumen ciliate protozoa relevant to the morphological characterization. *Hechos Microbiológicos* **1**, 67-69.