



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Influencia del aceite de eucaliptol en los componentes químicos, producción de gas y de degradabilidad del rastrojo de sorgo y bagazo de caña de azúcar

(Influence of eucalyptus oil on chemical constituents, gas production and degradability of sorghum straw and sugarcane bagasse)

**ARTICULO ESPECIALIZADO PARA
PUBLICAR EN REVISTA INDIZADA**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ERICK XICHEL GOMEZ TAGLE CASTAÑEDA

Asesores:

DR. ABDELFATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM

DRA. MONA MOHAMED MOHAMED YASSEEN ELGHANDOUR



Toluca, Estado de México, Enero de 2018

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. REVISIÓN LITERARIA.....	4
2.1 ACEITES ESENCIALES COMO ADITIVO.....	4
2.1.1 PLANTAS QUE CONTIENEN ACEITES ESENCIALES.....	4
2.1.2 EUCALIPTO COMO ACEITE ESENCIAL.....	4-5
2.2 PRODUCCIÓN DE GAS RUMINAL Y ACEITES ESENCIALES.....	5
2.3 DEGRADABILIDAD DE FORRAJE Y ACEITES ESENCIALES.....	5-6
2.4 FISIOLÓGÍA DIGESTIVA DE LOS RUMIANTES.....	6
2.5 FERMENTACIÓN RUMINAL.....	6-7
2.6 MICROORGANISMOS RUMINALES.....	7
2.6.1 HONGOS.....	7
2.6.2 BACTERIAS.....	7-8
2.6.3 PROTOZOOARIOS.....	8
2.6.4 VIRUS.....	9
2.7 DIGESTIÓN DE CARBOHIDRATOS.....	9
2.8 ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV).....	9
3. JUSTIFICACION.....	10
4. HIPOTESIS.....	11
5. OBJETIVOS.....	12
6. METODOLOGÍA.....	13
7. RESULTADOS.....	14-27
8. LÍMITE DE ESPACIO Y TIEMPO	28

1. INTRODUCCION

La industria de producción pecuaria sufre un aumento en el costo de los granos y forrajes de calidad. Al mismo tiempo, hay grandes cantidades de residuos de cultivos y subproductos asociados con la producción de cultivos en el campo. Dichos residuos pueden tener importantes impactos económicos y ambientales como alimento en la dieta de los rumiantes después de mejorar su valor nutritivo (Kholif et al., 2014; Elghandour et al., 2016) La paja de sorgo y el bagazo de caña tienen un valor nutricional a sus bajos contenidos de nitrógeno y alto contenido de fibra (Abdel-Aziz et al., 2015; Elghandour et al., 2016). En general, el uso de residuos fibrosos crudos como alimento para animales dentro de la granja es limitado debido a su alto contenido de fibra, bajo contenido de proteína cruda (CP), mala palatabilidad y baja digestibilidad de nutrientes (Khattab et al., 2013; Togtokhbayar et al. , 2015), que invariablemente reduce la eficiencia de la utilización digestiva (Khattab et al., 2013; Rojo et al., 2015). Por lo tanto, para una mejor utilización como alimento para los rumiantes, es muy importante mejorar el valor nutritivo de estos alimentos antes de alimentar a los animales, utilizando diferentes estrategias. Una de las estrategias más efectivas y seguras es el uso de aditivos para piensos, incluidos los aceites esenciales y crudos (Hernandez et al., 2017).

Los experimentos sugieren que algunos aceites crudos y esenciales tienen propiedades estimulantes del apetito, efectos antibacterianos y funciones antioxidantes (Bodas et al., 2012; Smeti et al., 2015). Se ha informado que los aceites crudos y esenciales mejoraron la utilización del alimento debido a su capacidad para alterar la fermentación ruminal y aumentar la digestibilidad de la dieta (Bodas et al., 2012).

El aceite de eucalipto tiene fuertes propiedades antibacterianas debido a su contenido de taninos, compuestos fenólicos, flavonoides y aceites volátiles (Elansary et al., 2017; Elaissi et al., 2012). Además, Thao et al. Informaron sobre actividades biológicas tales como bacteriostática, fungistática, antiinflamatoria, características de fermentación ruminal modificadoras, anti-protozoos y mitigación de CH₄. (2014).

2.REVISION LITERARIA

2.1 Aceites esenciales como aditivo

Se ha comprobado que los efectos de extractos de plantas y aceites esenciales sobre la modulación de la fermentación ruminal por su mecanismo de acción contribuyendo a la disminución de la metanogénesis ruminal. Un estudio in vitro realizado por la Society of Chemical Industry muestra unos resultados significativos en la reducción de la producción de metano. En él se probaron diversos aditivos, en los que se observó una reducción de un 40% (Fernández, 2014).

Uno de los estudios fue el de la influencia del tipo de dieta (pequeño rumiante de leche / de carne) en la eficacia del aceite de ajo y el cinamaldehído sobre la fermentación ruminal y la producción de metano. Ambos componentes se encuentran entre los que se perfilan con más opciones posibles para su aplicación en rumiantes (aceite de ajo, cinamaldehído, eugenol, anetol, y la capsaicina). En este estudio, se concluye que la eficacia de modificar la fermentación ruminal depende del tipo de dieta (Fernández, 2014).

Por lo tanto se conoce que los extractos de plantas son metabolitos secundarios que cuentan con la capacidad de modificar la actividad microbiana. Entre estos metabolitos secundarios se incluyen, entre otros, saponinas, taninos y aceites esenciales (principalmente terpenoides y fenilpropanoides) (Calsamiglia, 2007).

2.1.1 Plantas que contienen aceites esenciales

El 1% de las plantas conocidas contienen aceites esenciales, estos son las fragancias naturales de las plantas aromáticas. Existen muchos tipos de aceites esenciales, los podemos encontrar en flores, maderas, raíces y frutas. Algunas de las plantas son ajo, jengibre, albahaca, manzanilla, canela, clavo, cilantro, apio, lavanda, malvavisco entre otras (Botanical, 2017).

Los Aceites Esenciales de plantas, son mezclas de principios activos, muy complejas, poseyendo algunos de ellos más de 200 componentes (ejemplo típico los de eucaliptos) (Botanical, 2017).

2.1.2 Eucalipto como aceite esencial

Por la rapidez de crecimiento, se puede encontrar cultivado en muchas regiones del mundo para la producción de madera, fabricación de pulpa de papel y obtención de aceite esencial (Botanical, 2017).

Es reconocido como un potente antiséptico y descongestionante, el principal componente que le otorga tales propiedades es el cineol, también llamado eucaliptol, que es, al mismo tiempo, el componente más abundante del aceite esencial, y el que le proporciona sus propiedades antisépticas (Botanical, 2017).

Los beneficios que promueve este aceite esencial es mejorar la integridad intestinal del animal, estabilizar la microbiota ruminal y por consiguiente mejora la digestibilidad de las proteínas y nutrientes que adquiere el ganado, esto se traduce en animales más sanos y por consecuencia en una mayor producción de leche y carne, y una considerable disminución del gasto de los antibióticos (Botanical, 2017).

2.2 Producción de gas ruminal y aceites esenciales

Los resultados en los que se ha evaluado la mitigación del metano como objetivo de la inclusión en las dietas de aceites esenciales son pocos e inconsistentes, y en algunos casos sólo se ha estimado la producción de metano en el rumen en base a la relación que tiene éste con el descenso en la producción total de AGV (Polín et al., 2014).

Se ha observado que el timol, mayor componente derivado del *Thymus v.* y *Origanum v.*, a dosis de 400 mg/L inhibe consistentemente el metano in vitro, pero las concentraciones de acetato y propionato también decrecen. En otros trabajos in vitro también con timol a dosis de 900 mg/L, observaron una mitigación en la producción del metano hasta un 99 % en relación con el tratamiento testigo. También se han reportado disminución en la producción de metano con el anetol en dosis de 20 mg/L. Otros Aceites Esenciales que disminuyen la metanogénesis son el de vallas de enebro y el de canela en dosis de 20 y 250 mg/L respectivamente, y aceite de menta con dosis de hasta 0.3, 1 y 2 ml/L de medio de cultivo ruminal (Polín et al., 2014).

El principal componente activo del aceite de canela es el cinemaldehído, el cual a dosis de 660 mg/L disminuye la producción de metano hasta en un 94 %. Los extractos de hinojo y clavo también inhiben la producción de metano in vitro. El aceite de eucalipto inhibe la producción de metano en un 58 % con dosis de 1.66 ml/L, 90.3 % a 2 ml/L, y 70 % a 330 mg/L el aceite α -ciclodextrina-eucalipto. Son varios los componentes identificados en el aceite de eucalipto, sin embargo el componente del aceite de eucalipto que más disminuye la producción de metano in vitro es el p-cimeno (Polín et al., 2014).

2.3 Degradabilidad de forraje y aceites esenciales

Los efectos positivos de la inclusión de aceites esenciales sobre la digestibilidad del alimento se dan por dos razones principalmente; primero, se reducen la degradación de la proteína en el rumen al inhibir la proliferación de bacterias productoras de nitrógeno amoniacal o proteolíticas, y segundo, se reduce la degradación de almidones como respuesta a la inhibición de

microorganismos amilolíticos, favoreciendo en cantidad el flujo de estos dos nutrientes al intestino (Polín et al., 2014).

En muchos de los estudios la digestibilidad del alimento no se modificó por Aceites Esenciales. Sin embargo otros estudios muestran que dosis de 500 mg de aceite de orégano en ovinos repercute en una alta concentración de proteína a nivel ruminal, pero por otro lado se afectó la digestibilidad total de nutrientes. Reportes in vivo en vacas lecheras con dosis de aceite esencial de enebro de 2 g/d, mostraron un aumento en la digestibilidad de la materia seca en un 13 % utilizando dietas con 40:60 forraje-concentrado; estos investigadores explican que el efecto puede ser debido a que se incrementó la digestibilidad de la proteína de manera significativa en un 11 %, pero también puede deberse a un ligero incremento de digestibilidad de otros nutrientes. Sin embargo dosis altas de aceites esenciales decrecen la digestibilidad de MS, atribuible esto a la disminución de la digestibilidad de la fibra a nivel ruminal (Polín et al., 2014).

2.4 Fisiología digestiva de los rumiantes

Los rumiantes se caracterizan por su capacidad para alimentarse de pasto o forraje. Esta característica se basa en la posibilidad de poder degradar los hidratos de carbono estructurales del forraje, como celulosa, hemicelulosa y pectina, muy poco digestibles para las especies de estómago simple o no-rumiantes (Reeling y Mattioli, 2003).

La degradación del alimento se realiza mayoritariamente por digestión fermentativa y no por acción de enzimas digestivas, y los procesos fermentativos los realizan diferentes tipos de microorganismos a los que el rumiante aloja en sus divertículos estomacales (Reeling y Mattioli, 2003).

Se dividen en cuatro cavidades: el retículo (red o redecilla), el rumen (panza), el omaso (librillo) y el abomaso (cuajar). Solo este último es glandular y funcionalmente análogo al estómago de no-rumiantes, mientras que los anteriores están cubiertos por un epitelio queratinizado y carecen de glándulas. (Reeling y Mattioli, 2003).

2.5 Fermentación Ruminal

El rumen es el sitio donde se lleva a cabo la fermentación del alimento que es ingerido por el animal. Cabe señalar que el rumen no es un órgano glandular por lo que no secreta enzimas digestivas de manera que la actividad digestiva depende de las enzimas producidas por las bacterias, protozoarios y hongos ruminales (Ángeles, 2014).

El término fermentación se refiere al metabolismo microbiano en ausencia de oxígeno que convierte a los carbohidratos en productos orgánicos como los ácidos grasos volátiles (AGV), ácido láctico y etanol. Estos productos retienen la mayor parte de la energía original en el

sustrato, una consecuencia de la falta de oxígeno para su oxidación completa a bióxido de carbono (CO₂) y agua (Ángeles, 2014).

Los rumiantes son herbívoros cuyo principal alimento son las plantas que contienen carbohidratos fibrosos; sin embargo, estos animales no poseen enzimas que puedan digerirlos y son los microorganismos presentes en el rumen, tales como bacterias, protozoarios y hongos, los que al fermentar el alimento permiten al rumiante: digerir polisacáridos complejos como la celulosa, aprovechar además de proteínas, fuentes de nitrógeno no proteico (NNP), para su conversión en proteína microbiana y finalmente sintetizar vitaminas hidrosolubles. El rumiante aprovecha los productos finales de la fermentación, particularmente los ácidos grasos volátiles (AGV) y los nutrientes contenidos en los cuerpos celulares de los microorganismos, que son aprovechados al digerirse en el abomaso e intestino delgado (Nava y Díaz, 2001).

La producción de AGV se relaciona con la producción de metano en el rumen y debe mantenerse el balance fermentativo en todo momento; debido a que el metano y el propionato sirven como captosres del exceso de equivalentes reductores que se producen a nivel ruminal (Merino, 2013).

2.6 Microorganismos Ruminales

El sistema microbiano ruminal es un activo proceso regulado mediante complejos mecanismos bioquímicos. En el rumen existe una fase gaseosa donde podemos encontrar metano (CH₄) y CO₂, y otra acuosa que tiene dos estratos: estrato ventral (90 % agua y 10 % MS), donde están las partículas de alimento de mayor densidad y de forraje con más de 12 horas de digestión; estrato superior (80 % agua y 20% MS) conformado por un manto de forraje de baja densidad (Díaz et al., 2008).

2.6.1 Hongos

Los flagelados poseen zoosporas móviles y colonizan regiones dañadas de los tejidos vegetales en las dos horas de la ingestión, en respuesta a materiales solubles. En las 22 horas más del 30% de las partículas mayores se ven invadidas por rizoides. Su función principal es facilitar la desaparición de la pared celular de la célula vegetal. Se han identificado especies de cuatro géneros: Neocallimastix, Caecomyces (formalmente Sphaeromona), Pyromyces (formalmente Phyromonas) y Orpinomyces (Montalbetti, 2000).

Los hongos liberan un complejo celulósico más soluble que el de las bacterias y atacan partículas rugosas a las que fermentan más rápidamente que las bacterias. Los hongos producen AGV, gases y trazas de etanol y lactato (Montalbetti, 2000).

2.6.2 Bacterias

El número total de bacterias en el rumen varía entre 10⁸ y 10¹¹ Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ ml del contenido ruminal; el espectro de bacterias del rumen se compone de numerosos géneros y especies, siendo la mayoría de los gérmenes dominantes anaerobios no esporulados. Las bacterias del rumen llegan al mismo con el consumo de alimentos fibrosos, concentrados y otros componentes de la dieta en las primeras etapas de desarrollo. Están adaptadas o son capaces de vivir en condiciones de anaerobiosis con una fase gaseosa compuesta de CO₂, metano y nitrógeno (Brock, 1998).

Se desarrollan a pH de 6,5 a 6,8 y medio muy reductor, temperatura de 39°C (Brock, 1998).

Brock (1998) dio a conocer un ordenamiento funcional agrupando a las bacterias de acuerdo con el lugar que ocupan en los sistemas de fermentación del rumen en:

- Bacterias celulolíticas.
- Bacterias hemicelulolíticas
- Bacterias amilolíticas
- Bacterias proteolíticas
- Bacterias lipolíticas
- Bacterias que utilizan azúcares
- Bacterias que utilizan ácidos
- Bacterias que utilizan amoníaco
- Bacterias que producen amoníaco
- Bacterias que producen metano
- Bacterias que sintetizan vitaminas.

2.6.3 Protozoarios

Los protozoos comparten con las bacterias el hábitat del rumen, estableciendo relaciones simbióticas muy estrechas. Llegan al rumen cuando el animal es joven, procedentes de los animales adultos por el contacto, estableciéndose y alcanzando cantidades de 10⁶/g de contenido ruminal (Brock, 1998).

Participan junto a las bacterias en los procesos degradativos y fermentativos con producción de Ácidos Grasos Volátiles (AGV) y contribuyen al desarrollo y distensión de la pared del rumen, hasta alcanzar volúmenes fijos con el consumo de forrajes. Tienen los protozoos como fuente de alimentación fundamental las bacterias, a la vez factores de tipo bacteriano son esenciales para su crecimiento y desarrollo. Aunque los protozoos no tienen un papel predominante en el rumen como las bacterias, si contribuyen a la digestión de la celulosa, alimentos proteicos, polisacáridos, almacenando muchos de éstos en su citoplasma, los cuales son aprovechados en los siguientes procesos metabólicos del animal. Participan además en la síntesis de proteína protozoaria con un alto valor biológico y alta digestibilidad (Brock, 1998).

Brock (1998) identificó tres grupos fundamentales en base a sus caracteres morfológicos y predominio para determinados sustratos:

Ciliados holotricos: *Isotrichia prostoma*, I. intestinales, *Dasytricha rumiantium*.

Ciliados oligotricos: Géneros *Metanidium* y *Diplodium*

Ciliados oligotricos (más pequeños): Género *Endodinium*

2.6.4 Virus

También pueden ser detectados a nivel ruminal virus (bacteriófagos) principalmente en *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Eubacteria*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Selenomonas*, *Streptococcus*; siendo su función principal disminuir la concentración y actividad de bacterias ruminales (Díaz et al., 2008).

2.7 Digestión de Carbohidratos

Con la microbiota ruminal los carbohidratos fibrosos como la celulosa y hemicelulosa pueden representar la fuente más importante de energía para los rumiantes. Las raciones carentes de fibra pueden conducir a desórdenes de la digestión. Estos carbohidratos fibrosos además son necesarios para: estimular la rumia (la cual mejora la fermentación), aumentar el flujo de saliva hacia el rumen y estimular las contracciones ruminales (Nava y Díaz, 2001).

Cuando los carbohidratos de la dieta entran al rumen son hidrolizados por enzimas extracelulares de origen microbiano. En el caso de los carbohidratos fibrosos, el ataque requiere de una unión física de las bacterias a la superficie de la partícula vegetal, la acción de las enzimas bacterianas libera principalmente glucosa y oligosacáridos hacia el líquido ruminal por fuera de los cuerpos celulares microbianos. Estos productos no son aprovechados por el rumiante, en su lugar, son rápidamente metabolizados por la microbiota ruminal (Nava y Díaz, 2001).

2.8 Ácidos Grasos Volátiles (AGV)

Los AGV son de suma importancia ya que representan más del 70% del suministro de energía al rumiante. Virtualmente todo ácido acético, propiónico y el ácido butírico son absorbidos por el epitelio del rumen y transportados vía porta al hígado. La absorción de AGV no sólo es importante para mantener su distribución en las células animales, sino para prevenir cantidades excesivas que puedan alterar el pH ruminal (Nava y Díaz, 2001).

}

3. JUSTIFICACION

Los costos de las dietas han aumentado, además que los residuos de las cosechas de cultivos como lo es: el sorgo y caña de azúcar son demasiado por lo que una buena utilización de sus subproductos de ellos sería mejorar su valor nutritivo mediante la adición del aceite esencial de eucalipto para alimentar al ganado bovino.

4. HIPOTESIS

El aceite esencial de eucalipto mejora la degradación in vitro de la fibra ruminal y aumenta la producción de gas durante la fermentación, lo que da como resultado un mayor valor nutritivo y la utilización de los subproductos estudiados.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Demostrar el efecto de incluir el aceite de eucalipto en la producción de gas in vitro y la digestibilidad de nutrientes de dos subproductos de alimentos fibrosos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Registrar la producción de gas a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 y 72 horas de incubación.
- Analizar las muestras de alimento para comprobar su valor nutritivo.
- Determinar qué nivel de eucalipto agregado fue mejor para la digestibilidad de los nutrientes y su producción de gas.

6. METODOLOGÍA

Se utilizaron dos subproductos de forraje: rastrojo de sorgo y bagazo de caña de azúcar como sustratos de incubación. Las muestras de sustratos se secaron a 65 ° C durante 72 h en un horno de aire forzado y luego se molieron en un molino Wiley para pasar un tamiz de 1 mm y se almacenaron en bolsas de plástico para la posterior determinación de la composición química y la incubación in vitro.

Se recogió el líquido ruminal de dos vacas suizas con cánula ruminal permanente. Directamente después de la recolección, el contenido del rumen obtenido se enjuagó con CO₂, se mezcló y se filtró a través de cuatro capas de estopilla en un matraz con espacio libre de O₂. El fluido ruminal filtrado fue transportado inmediatamente al laboratorio donde se mezcló en una proporción de 1: 4. Se añadió fluido de rumen diluido (50 ml que contenía 10 ml de licor de rumen) a cada botella de incubación.

Las muestras de alimento (0,5 g de MS) se pesaron en botellas de 120 ml con la adición apropiada de aceites. El aceite esencial de eucalipto se incluyó en (por litro de medio de incubación): 30 mg, 60 mg, 90 mg y 180 mg (igual a 0, 1.2, 3.6 y 7.2 mg / g de sustrato de DM). Las botellas se inocularon dentro de cada ciclo de incubación, tres botellas como blancos (es decir, solo fluido ruminal, sin sustrato). Después de llenar todas las botellas, se cerraron inmediatamente con tapones de goma, se agitaron y se colocaron en un baño de agua a 39 ° C. El volumen de gas producido se registró a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 y 72 h de incubación usando un transductor de presión (Extech Instruments, Waltham, EE. UU.) Siguiendo la técnica de Theodorou et al. (1994).

Después de 72 h de incubación, se abrieron las botellas y se midió el pH usando un pH-metro (Conductronic pH15, Puebla, México). El contenido de cada botella se filtró al vacío a través de crisoles de vidrio sinterizado (porosidad gruesa n° 1, tamaño de poro de 100 a 160 µm, Pyrex, Stone, Reino Unido). Los residuos de incubación se secaron luego a 105 ° C durante la noche para estimar la degradabilidad aparente de la MS. Se determinó la Fibra Neutro Detergente (FND) y Fibra Ácido Detergente (FAD) en los residuos secos para la estimación de la degradabilidad de

las mismas. Se usaron espacios en blanco para corregir la contaminación del sustrato del fluido ruminal.

7. RESULTADOS

From: Italian Journal of Animal Science <onbehalf@manuscriptcentral.com> To: asalem70@yahoo.com Cc: asalem70@yahoo.com Sent: Wednesday, 24 January 2018, 11:17 Subject: Italian Journal of Animal Science - Manuscript ID TJAS-2018-0041 has been submitted online

24-Jan-2018

Dear Professor Salem:

Your manuscript entitled "Influence of eucalyptus oil on chemical constituents, gas production and degradability of sorghum straw and sugarcane bagasse" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Italian Journal of Animal Science.

Your manuscript ID is TJAS-2018-0041.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or email address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/tjas> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/tjas>.

Thank you for submitting your manuscript to Italian Journal of Animal Science.

Sincerely, Italian Journal of Animal Science

Influence of eucalyptus oil on chemical constituents, gas production and degradability of sorghum straw and sugarcane bagasse

Abstract

The effects of eucalyptus oils on ruminal fermentation of two products sorghum straw, and sugarcane bagasse), were studied using the *in vitro* gas production (GP) technique. Eucalyptus oil was added at 0, 30, 90, and 180 mg/L of incubation medium (equal to 0, 1.2, 3.6, and 7.2 mg/g DM substrate). Gas volumes were recorded at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 and 72 h of incubation, and substrate DM, neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) degradabilities were determined at 72 h of incubation. Eucalyptus oil inclusion increased ($P<0.05$) the rates of GP of sorghum straw and sugarcane bagasse. Eucalyptus oil decreased fermentation pH ($P<0.05$) of sorghum straw. The inclusion eucalyptus oil increased ($P<0.05$) DM degradability of sorghum straw and sugarcane bagasse. Eucalyptus oil decreased NDF degradability of sugarcane bagasse, with weak effects on NDF degradabilities of sorghum. It can conclude that the application of eucalyptus oil positively affected rumen fermentation of the two agro-industry byproducts as

roughage feeds. Increasing the dose of oil inclusion, enhanced the fermentation parameters; where the dose 180 mg oil/L increased GP, while the doses 30 and 90 mg oil/L increased nutrients digestibility.

Keywords: Degradability, eucalyptus oil, fibrous feed, gas production.

1. Introduction

Livestock production industry suffers from increasing cost of grains and quality forages. At the same time, there are large quantities of crop residues and by-products associated with the production of crops in the field. Such residues may have important economic and environmental impacts as feed in the diet of ruminants after upgrading their nutritive value (Kholif et al. 2014; Elghandour et al., 2016) Sorghum straw, and sugarcane bagasse have a poor nutritional value as animal feeds due to their low nitrogen and high fiber contents (Abdel-Aziz et al., 2015; Elghandour et al., 2016). Generally, the using of the raw fibrous residues as animal feeds within the farm is limited because their high fiber content, low crude protein (CP) content, poor palatability, and low nutrient digestibility (Khattab et al., 2013; Togtokhbayar et al., 2015), which invariably lowers the efficiency of digestive utilization (Khattab et al., 2013; Rojo et al., 2015). Thus for better utilization as feeds for ruminant, improving the nutritive value of these feeds before feeding to animal, using different strategies is very important. One of the most effective and safe strategies is the using of feed additives, including essential and crude oils (Hernandez et al., 2017).

Experiments suggest that some crude and essential oils have appetite stimulating properties, anti-bacterial effects, and antioxidant functions (Bodas et al., 2012; Smeti et al., 2015). It has been reported that crude and essential oils improved feed utilization because of their ability to alter rumen fermentation and increase dietary digestibility (Bodas et al., 2012).

Eucalyptus (*Eucalyptus robusta*) is a common plant grows in many parts of the world and used to produce oils for medicinal and pharmaceutical purposes (Liu et al., 2014; Sartorelli et al., 2007). α -pinene, 1,8-cineole, spathulenol, globulol, viridiflorol were the main component the essential oil of dried leaved of *E. robusta* from China (Liu et al., 2014), α -pinene from fresh leaves of *E. robusta* grown in Brazil (Sartorelli et al., 2007). Besides, Elaissi et al. (2012) reported that the main components of eucalyptus oil are: 1,8-cineole, cryptone, α -pinene, *p*-cymene, and α -terpineol. 1,8-cineole, linalool, spathulenol, α -pinene and α -terpineol were the main components in essential oils of different species of *Eucalyptus* (El-Baha et al., 2017; Hussein et al., 2017; Luís et al. 2016; Salem et al., 2016; Harkat-Madouri et al. 2015; Salem 2015a).

The eucalyptus oil has strong antibacterial properties due to its content of tannins, phenolics, flavonoids and volatile oils (Elansary et al., 2017; Elaissi et al., 2012). Moreover, biological activities such as bacteriostatic, fungistatic, anti-inflammatory, modifying ruminal fermentation characteristics, anti-protozoal and CH₄ mitigation were reported by Thao et al. (2014). For example, The *E. robusta* oil presented good inhibition to the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* (Sartorelli et al., 2007).

Our hypothesis was that eucalyptus essential oil, with their active compounds, would improve in vitro ruminal fiber degradation, and increase gas production during fermentation resulting higher nutritive value and feed utilization of the studied agro-industry byproducts. Therefore, the objective of the present study was to determine the effect of including eucalyptus oil on in vitro gas production and nutrient digestibility of two byproducts fibrous feeds.

2. Materials and Methods

2.1. Agro-industry byproducts as substrates

Two roughages byproducts, namely sorghum straw, and sugarcane bagasse were used as incubation substrates. Samples of substrates were dried at 65°C for 72 h in a forced air oven, and then ground in a Wiley mill to pass a 1 mm sieve and stored in plastic bags for subsequent determination of chemical composition and *in vitro* incubation. Chemical composition of the fibrous feeds is shown in Table 1.

2.2. Essential oil extraction and GC identification of *E. robusta* leaf

Fresh leaves of *E. robusta* were collected, cut into small pieces (100 g) and then extracted by hydrodistillation with 500 mL distilled water for 3 h in a Clevenger type apparatus (Salem et al., 2013). The oil was dried over anhydrous Na₂SO₄, and measured with respect to fresh weight of leaves sample. The oil was kept dry in sealed Eppendorf tubes and stored at 4°C prior to use for GC–MS analysis and laboratory tests.

The GC Ultra/Mass spectrophotometer ISQ (Thermo Scientific) a trace instrument equipped with FID and DB-5 narrow bore column (length 10 m × 0.1 mm ID, 0.17µm film thickness; Agilent, Palo Alto, CA, USA) was used. Helium was used as the carrier gas with a flow rate of 1 mL/min, and the oven temperature program was: 45 to 165°C (4°C/min) and 165 to 280°C (15°C/min) with post run (off) at 280°C. Samples (1 µL) were injected at 250°C, with split/split-less injector (50:1 split ratio) in the splitless mode flow with 10 mL/min. The GC-MS was equipped with a ZB-5MS Zebron capillary column (length 30 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness; Agilent). Helium (average velocity 39 cm/s) was used as the carrier gas and the oven temperature was held at 45°C for 2 min then increased from 45 to 165°C (4 °C/min), and 165 to 280°C (15°C/min). All mass spectra were recorded in the electron impact ionization (EI) at 70 electron volts. The mass spectrometer was scanned from *m/z* 50-500 at five scans per second. Peak area percent was used for obtaining quantitative data with the GC with HP-ChemStation software (Agilent

Technologies) without using correction factors. Identification of the constituents was performed based on MS library search (NIST and Wiley).

2.4. *In vitro* incubations

Rumen inoculum was collected before morning feeding from from two Brown Swiss cow (400 kg body weight) fitted with permanent rumen cannula and fed *ad libitum* a total mixed ration made up of 1:1 concentrate and alfalfa hay, formulated to cover their nutrient requirements (NRC 2001). Cows had free access to fresh water at all times during the experiment. Straightway after collection, the rumen contents obtained were flushed with CO₂, mixed and strained through four layers of cheesecloth into a flask with O₂ free headspace. Filtered rumen fluid was immediately transported to the laboratory where it was mixed in a 1:4 (v/v) proportion with the buffer solution described by Goering and Van Soest (1970), with no trypticase added. Diluted rumen fluid (50 ml containing 10 ml of rumen liquor) was added to each incubation bottle.

Feed samples (0.5 g DM) were weighed into 120 ml bottles with appropriate addition of oils. Eucalyptus essential oil were included at (per liter of incubation medium): 30 mg, 60 mg, 90 mg and 180 mg (equal to 0, 1.2, 3.6, and 7.2 mg/g DM substrate). Bottles were inoculated within each incubation run, three bottles as blanks (i.e., rumen fluid only, with no substrate). After filling all bottles, they were immediately closed with rubber stoppers, shaken and placed in a water bath at 39°C. The volume of gas produced was recorded at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 and 72 h of incubation using a pressure transducer (Extech Instruments, Waltham, USA) following the technique of Theodorou et al. (1994).

After 72 h of incubation, bottles were opened, and the pH was measured using a pH meter (Conductronic pH15, Puebla, Mexico). The contents of each bottle were filtered under vacuum through sintered glass crucibles (coarse porosity no. 1, pore size 100 to 160 µm; Pyrex, Stone,

UK). The incubation residues were dried then at 105°C overnight to estimate apparent DM degradability (DMD). Neutral (NDF) and acid detergent fiber (ADF) were determined in the dried residues for estimation of NDF degradability (NDFD) and ADF degradability (ADFD). Blanks were used to correct for substrate contamination from ruminal fluid.

2.5. Chemical analyses

Samples of the feeds were analyzed for DM (#934.01), ash (#942.05), nitrogen (#954.01) and ether extract (#920.39) using AOAC (1997) official methods. The NDF (Van Soest et al., 1991) and ADF (AOAC #973.18) contents in feeds and incubation residues were determined using an ANKOM200 Fiber Analyzer Unit (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, USA). The NDF analysis was done with sodium sulfite, but without α -amylase. Both NDF and ADF were expressed without residual ash.

3. Results

3.1. Chemical composition of agro-industry byproducts

The two byproducts roughages differed in their chemical composition. The NDF concentrations ranged between 459 g for sugarcane bagasse to 614 g for sorghum straw. Sugarcane bagasse contained the highest NSC (489 g), while sorghum straw contained the lowest (261 g) NSC concentration (Table 1).

Eighteen compounds were identified in the eucalyptus oil. The GC/MS analysis showed that the principal compounds of the oil were eucalyptol, α -pinene, spathulenol, terpinen-4-ol and 4-terpineol.

3.2. Gas production and degradability

For oil × oil dose interactions were observed for fermentation pH ($P=0.002$) and degradabilities ($P\leq 0.009$) of DM, NDF and ADF. Increasing the dose of eucalyptus oil increased (linear effect, $P=0.019$; quadratic effect, $P<0.001$) the asymptotic GP and GP ($P<0.05$), without affecting ($P>0.05$) the rate of GP or the lag time of GP were observed with the addition of eucalyptus oil at different hours of incubation. Fermentation pH ($P<0.001$). Lower pH values were observed (linear effect, $P=0.027$; quadratic effect, $P=0.003$) with the addition of the oil. Greater DM degradabilities (linear effect, $P=0.008$; quadratic effect, $P=0.002$), NDF degradabilities (linear effect, $P=0.004$; quadratic effect, $P<0.001$) and lower ADF degradabilities (linear effect, $P=0.048$) were observed in eucalyptus.

For sorghum straw, oil dose interactions were observed ($P<0.05$) for GP at different incubation hours, fermentation pH and degradabilities of DM, NDF and ADF.

4. Discussion

The GP technique is a simple, sensitive and powerful screening method to evaluate fermentation of feeds and test efficacy of feed additives before in vivo evaluation (Getachew et al., 2005). The close relationship between rumen fermentation and GP has been recognized. Menke et al. (1979) reported a high correlation between in vitro GP and in vivo apparent digestibility. However, results and conclusions obtained in vitro are not always representative of what occurs in vivo due to different condition including the lack of nutrients absorption, differences in fluid and particle dilution rates, feed intake relative to rumen volume, homogeneity of the compartment (Hristov et al., 2012).

4.1. Agro-industry byproducts and effects of eucalyptus oil

Gas production kinetics and nutrients degradability differed between eucalyptus oil as a result of differed chemical composition. In ruminant nutrition, the inclusion of crude and essential oils can

alter microbial populations, digestion and fermentation of diets based on their chemical composition (Bodas et al., 2012). Wide types of essential oils produced by different plant species and vary in chemical structures, stereochemistry and bioactive activities (Burt, 2004). In the present experiment, a oil chemical structure and stereochemistrice were evaluated for their efficacy to affect fermentation and GP of two fibrous substrates using the in vitro GP technique.

Eucalyptus oil contained eucalyptol (423.2 mg/g), α -pinene (236 mg/g), spathulenol (87.7 mg/g), terpinen-4-ol (42.4 mg/g) and 4-terpineol (26.8 mg/g). α -pinene (23.9%), p-cymene (23.2%) and 1,8-cineole (14.5%) were the major components in the oil (Traoré et al., 2010). Additionally, α -pinene was the main constituent of *E. robusta* oil (Thiolali and Von Wandruzka, 1985). α -, β -pinene and limonene were found with high amount in *E. robusta* oil and could be responsible for the highest activity against the microbial growth (Janssen, 1989). In addition, it was reported that the oil possessed strong repellency to *Blattella germanica* (Liu et al., 2011), larvicidal activity against *Aedes aegypti* (Lucia et al., 2012), and antimicrobial activities (Sartorelli et al., 2007; Cimanga et al., 2002). Even that the major component is 1,8-cineole, but the main contributor for the oil bioactivity was resulted from α -terpineol and its isomers (4-terpineol and terpinen-4-ol) (Inouye et al., 2001).

The chemical composition of incubated roughages differed, and was quite consistent with that reported in other studies (Elghandour et al., 2016). Variation between plants in the chemical composition is mainly due to different cultivars and genotype of the plants, growing environments factors such as climate, the soil and agronomic practice, harvest conditions, post harvesting treatments, and morphological (stalk, stem, leaf, husk, chaff) fractions of the samples (Welch, 1995). Different chemical composition of substrates greatly affects the fermentation kinetics and parameters (Elghandour et al., 2016; Kholif et al., 2017). Generally, fermentation kinetics appeared

to be related to the chemical composition, in particular to the fiber content of the substrates (Elghandour et al., 2015; Kholif et al., 2017). Fermentation is generally index with degradation yielding short chain fatty acids and various gases, principally CO₂, hydrogen (H₂), CH₄, and nitrous oxide. Increasing the level fiber (structural carbohydrates) is paralleled with decreasing fermentation efficiency and GP (Elghandour et al., 2016; Kholif et al., 2017). Higher proportions non-structural carbohydrates in the substrate indicate a better nutrient availability for rumen microorganisms resulting in stimulated nutrients degradability (Elghandour et al., 2015). In the contrary, higher fiber content will surprise and negatively affect the microbial growth and fermentation (Elghandour et al. 2015, 2016).

4.2. Gas production kinetics

Eucalyptus oil increased GP of sorghum straw and sugarcane bagasse. Different fermentation kinetics are mainly due to different chemical composition of the incubated substrates (Elghandour et al., 2015; Kholif et al., 2017). The greater GP with eucalyptus oil at all doses reveals that the investigated levels of eucalyptus oil were within range acceptable and tolerant for ruminal microbial activity and growth. The increased GP is a result of improved ruminal fermentation with the inclusion of eucalyptus oil, which contains some biologically active compounds including α -pinene, b- cymene, γ -terpinene, and 1.8-cineole (Pierre 2008). However, Manh et al. (2012) observed that the inclusion of eucalyptus leaf powder at increasing levels up to 6% of incubated substrate decreased GP *in vitro*. It is clear that the tested doses of eucalyptus oil in their experiments are very greater than those used in the present experiment, which explain the conflicted results. Eucalyptus oil contains volatile oils, which may exert an inhibitory effect on

microbial activity at high levels of inclusion. However, at low and moderate levels of the phenolics, tannins and other secondary metabolites of plants, the microbial activity was improved (Cedillo et al., 2014) due to the ability of rumen microorganisms to degrade and use them as energy source (Varel et al., 1991).

The inclusion of eucalyptus oil increased the rates of GP of sorghum straw and sugarcane bagasse without affecting, indicating the great effect of the chemical composition of the incubated substrates. Greater rate of GP with the inclusion of the eucalyptus oil may be related to the ability of eucalyptus active compounds to the antioxidant activity and its ability to remove free radicals from the fermentation medium, making the fermentation condition more appropriate for microbial activity. (Chung, 2006; Elaissi et al., 2012).

4.3. Fermentation pH and nutrient degradability

Eucalyptus oil decreased fermentation pH of sorghum straw. The values for all roughages ranged between 6.41 to 6.85, which are within the acceptable range for fiber digestion (Ørskov and Ryle, 1990). The inclusion of oils in the diets of animals is known to decrease ruminal pH due to increased dietary energy density with the inclusion of oils. Lower pH with oil versus control was expected in view of the probable altered total ruminal volatile fatty acids concentrations that occur with oil addition (Busquet et al., 2005).

Lowering the pH fermentation may be responsible about the inconsistency between the present results of enhanced fermentation kinetics, and the other experiments showed negative effects or weak effects with the inclusion of essential oils in ruminant diets. At low pH, ruminal microorganisms are more susceptible to the effects of essential oils (Skandamis and Nychas,

2000), with more positive effect due to the inclusion of essential oils in diet of ruminants (Mirzaei-Aghsaghali and Maheri-Sis, 2011).

Gas production is an indicator of DM digestibility. Eucalyptus oil decreased NDF degradability of sugarcane bagasse, with weak effects on NDF degradabilities of sorghum straw, indicating the effect of incubated substrates chemical composition. Sugarcane bagasse have lower NDF and greater NSC concentrations compared with sorghum straw. Lower degradability could be due to a reduced number of cellulolytic bacteria (McSweeney et al., 2001), and/or impaired bacterial adhesion to substrate and fibrolytic activity of rumen microbes (Bento et al., 2005). Manh et al. (2012) reported a decreased in vitro degradability with the inclusion of eucalyptus leaf powder at increasing levels up to 6% of incubated substrate. The inconstant results may be related to the level and type of eucalyptus sources and incubated substrates. However, eucalyptus oil decreased NDF degradability, it increased GP revealing that the increased GP was a result of the fermentation of other feed nutrient such as non-structural carbohydrates.

5. Conclusions

The inclusion of eucalyptus oil improved rumen fermentation (GP and nutrients degradability) of the two agro- industry byproducts (sorghum straw, and sugarcane bagasse) in different manner depending on the chemical composition of each feed. Increasing the dose of eucalyptus oil enhanced the fermentation parameters, with greater effect with the dose 180 mg oil/L of incubation medium. Further research should, however, be conducted to establish the efficacy of eucalyptus oil in vivo trials.

Table 1.

Chemical composition of the fibrous feeds (g/kg DM).

	Sorghum straw	Sugarcane bagasse
Dry matter	943	925
Organic matter	930	982
Crude protein	43	27
Ether extract	12	7
Non-structural carbohydrates	261	489
Neutral detergent fiber	614	459
Acid detergent fiber	386	324
Lignin	71	121
Cellulose	315	203
Hemicellulose	228	135

Table 2.

In vitro rumen gas kinetics of sorghum straw as affected by the addition of eucalyptus essential oil (mg/L incubation medium).

Oil	Gas production parameters ¹			Gas production at:										Degradability ²			
	<i>A</i>	<i>c</i>	<i>Lag</i>	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	pH	DM	NDF	ADF
Control	320	0.019	3.45	11	22	32	42	51	60	108	146	176	220	6.81	493	604	397
Eucalyptus oil																	
30	322	0.021	3.19	13	25	36	48	58	68	121	162	194	240	6.79	489	633	432
90	340	0.030	4.27	20	39	56	73	88	103	173	222	256	297	6.78	520	605	435
180	379	0.028	4.39	16	32	47	62	76	90	163	223	271	342	6.79	549	582	425
SEM	21.1	0.0032	1.481	1.5	2.8	4.0	5.0	5.9	6.6	9.3	9.7	9.2	7.8	0.011	37.6	18.8	12.5
Oil dose																	
P Linear	0.365	0.031	0.669	0.005	0.004	0.003	0.003	0.002	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.002	0.010	0.630
P Quadratic	<0.001	0.180	0.134	0.104	0.077	0.058	0.042	0.030	0.021	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.006	0.397	0.100	0.061

¹*A* is the asymptotic gas production (mL/g DM); *c* is the rate of gas production (h); *Lag* is the initial delay before gas production begins (h).

²ADF, acid detergent fiber; degradability DM, dry matter degradability; NDF, neutral detergent fiber degradability

Table 3.

In vitro rumen gas kinetics of sugarcane bagasse as affected by the addition of eucalyptus essential oil (mg/L incubation medium).

Oil	Gas production parameters ¹			Gas production at:										Degradability ²			
	<i>A</i>	<i>c</i>	<i>Lag</i>	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	pH	DM	NDF	ADF
Control	383	0.015	3.53	11	22	32	42	51	60	110	151	185	237	6.76	477	652	468
Eucalyptus oil																	
30	396	0.024	4.29	16	30	44	58	70	82	143	189	223	271	6.71	523	437	389
90	398	0.027	2.93	20	39	56	72	86	100	162	202	229	262	6.85	524	457	389
180	453	0.013	4.24	11	22	32	42	52	62	115	161	200	263	6.85	522	435	391
SEM	26.5	0.0052	0.639	2.7	5.0	7.0	8.7	10.2	11.5	16.5	18.8	19.9	20.7	0.0	22.5	21.3	13.6
Oil dose																	
P Linear	0.055	0.004	0.361	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006	0.001	0.003	0.009	0.047	0.924	0.005	0.993	0.064
P Quadratic	0.116	0.845	0.190	0.566	0.540	0.511	0.485	0.457	0.435	0.312	0.232	0.182	0.125	0.587	0.050	0.845	0.515

¹*A* is the asymptotic gas production (mL/g DM); *c* is the rate of gas production (h); *Lag* is the initial delay before gas production begins (h).

²ADF, acid detergent fiber; degradability DM, dry matter degradability; NDF, neutral detergent fiber degradability

8. LÍMITE DE ESPACIO Y TIEMPO

Límite de espacio

El presente estudio fue realizado dentro del Laboratorio de Bromatología, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, ubicada en el Campus el Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México.

Límite de tiempo

El tiempo en la realización del experimento y la redacción del mismo fue a partir de Junio-Diciembre del 2017.

9. REFERENCIAS

- Abdel-Aziz, N.A., Salem, A.Z.M., El-Adawy, M.M., Camacho, L.M., Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Borhami, B.E., 2015. Biological treatments as a mean to improve feed utilization in agriculture animals-An overview. *Journal of Integrative Agriculture*. 14, 534–543.
- Adams, R.P., 2001. *Essential Oil Components by Quadrupole GC/MS*, Allured, Carol Stream, IL, USA, p. 456.
- AOAC., 1997. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist*, Vol. 1, 16th edn. Washington, D.C., USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Bento, M.H.L., Acamovic, T., Makkar, H.P.S., 2005. The influence of tannin, pectin, and polyethylene glycol on attachment of ¹⁵Nlabeled rumen microorganisms to cellulose. *Anim. Feed Sci. Tech.* 122, 41-57.
- Block, E., 1992. The organosulfur chemistry of the genus *Allium* – implications for organic sulfur chemistry. *Angewandte Chemie. Inter. Ed.* 140, 1158–1203.
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., López, S., 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176, 78-93.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P.W., Kamel, C., 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 88, 2508-2516.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., *et al.* 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharm.* 79, 213-220.
- Elaissi, A., Rouis, Z., Salem, N.A.B., Mabrouk, S., ben Salem, Y., Salah, K.B.H., Aouni, M., Farhat, F., Chemli, R., Harzallah-Skhiri, F., Khouja, M.L., 2012. Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their

antibacterial, antifungal and antiviral activities. BMC complementary and alternative medicine, 12(1), p.1.

- Elansary, H.O., Salem, M.Z.M., Ashmawy, N.A., Yessoufou, K., El-Settawy, A.A., 2017. *In vitro* antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of Eucalyptus spp. leaf extracts related to phenolic composition. Nat. Prod. Res.. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1303698>
- El-Baha, A.M., El-Sherbiny, A.A., Salem, M.Z.M., Sharrawy, N.M.M., Mohamed, N.H., 2017. Toxicity of essential oils extracted from *Corymbia citriodora* and *Eucalyptus camaldulensis* leaves against *Meloidogyne incognita* under laboratory conditions. Pakistan Journal of Nematology. 35, 93-104.
- Elghandour, M.M.M.Y., Kholif, A.E., Bastida, A.Z., Martínez, D.L.P., Salem, A.Z.M., 2015. *In vitro* gas production of five rations of different maize silage and concentrate ratios influenced by increasing levels of chemically characterized extract of *Salix babylonica*. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 39, 186-194.
- Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Hernández, J., Mariezcurrena, M.D., López, S., Camacho, L.M., Márquez, O. and Salem, A.Z.M., 2016. Influence of the addition of exogenous xylanase with or without pre-incubation on the *in vitro* ruminal fermentation of three fibrous feeds. Czech Journal of Animal Science. 61, 262-272.
- Feldberg, K.S., Chang, S.C., Kotik, A.N., Nadler, M., Neuwirth, Z., Sundstrom, D.C., Thompson, N.H., 1988. *In vitro* mechanism of inhibition of bacterial cell growth by Allicin. Antimicrob. Agents Chemother. 32, 1763-1768.
- France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., Lopez, S., Bannink, A., 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. Br. J. Nutr. 83, 143–150.
- Getachew, G., Depeters, E.J., Robinson, P.H., Fadel, J.G., 2005. Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and impact on fermentation production products. Anim. Feed Sci. Technol. 123-124, 547-559.

- Goering, M.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage fibre analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agriculture Handbook, No 379. Agricultural Research Service, USDA, Washington, USA.
- Harkat-Madouri, L., As, B., Madani, K., Bey-Ould Si Said, Z., Rigou, P., Grenier, D., Allalou, H., Remini, H., Adjaoud, A., Boulekbache-Makhlouf, L., 2015. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. Ind. Crop. Prod., 148–153.
- Hristov, A.N., Lee, C., Hristov, R., Huhtanen, P., Firkins, J.L., 2012. A meta-analysis of variability in continuous-culture ruminal fermentation and digestibility data. J. Dairy Sci. 95, 5299-5307.
- Hussein, H.S., Salem, M.Z.M., Soliman, A.M., 2017. Repellent, attractive, and insecticidal effects of essential oils from *Schinus terebinthifolius* fruits and *Corymbia citriodora* leaves on two whitefly species, *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes ricini*. Scientia Horticulturae. 216, 111-119.
- Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, H., 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. J. Antimicrobial Chemother. 47, 565-573.
- Janssen, A.M., 1989. Antimicrobial Activities of Essential Oils – A Pharmacognostical Study. PhD thesis. Leiden University, the Netherlands.
- Johnson, O.O., Ayoola, G.A., Adenipekun, T., 2013. Antimicrobial Activity and the Chemical Composition of the Volatile Oil Blend from *Allium sativum* (Garlic Clove) and *Citrus reticulata* (Tangerine Fruit). Inter. J. Pharmaceut. Sci. Drug Res. 5, 187–193.
- Kamra, D.N., Agarwal, N., Sakthivel, P.C., Chaudhary, L.C., 2012. Garlic as a rumen modifier for eco-friendly and economic livestock production. J. Appl. Anim. Res. 40, 90-96.
- Khatab, H.M., Gado, H.M., Salem, A.Z.M., Camacho, L.M., El-Sayed, M.M., Kholif, A.M., Elshewy, A.A., Kholif, A.E., 2013. Chemical Composition and *in vitro* digestibility of *Pleurotus ostreatus* spent rice straw. Animal Nutrition and Feed Technology. 13, 507-516.

- Kholif, A.E., Khattab, H.M., El-Shewy, A.A., Salem, A.Z.M., Kholif, A.M., El-Sayed, M.M., Gado, H.M., Mariezcurrena, M.D., 2014. Nutrient digestibility, ruminal fermentation activities, serum parameters and milk production and composition of lactating goats fed diets containing rice straw treated with *Pleurotus ostreatus*. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 27, 357-364.
- Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Barbabosa, A., Márquez, O., Odongo, N.E., 2017. The effects of three total mixed rations with different concentrate to maize silage ratios and different levels of microalgae *Chlorella vulgaris* on *in vitro* total gas, methane and carbon dioxide production. *J. Agr. Sci.* 155, 494-507.
- Liu, X.C., Liu, Q.Z., Shi, W.P., Liu, Z.L., 2014. Evaluation of insecticidal activity of the essential oil of *Eucalyptus robusta* Smith leaves and its constituent compound against overwintering *Cacopsylla chinensis* (Yang et Li) (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies.* 2, 27-31.
- Liu, Z.L., Yu, M., Li, X.M., Wan, T., Chu, S.S., 2011. Repellent activity of eight essential oils of Chinese medicinal herbs to *Blattella germanica* L. *Rec. Nat. Prod.* 5, 176-183.
- Lucia, A., Juan, L.W., Zerba, E.N., Harrand, L., Marco, M., Masuh, H.M., 2012. Validation of models to estimate the fumigant and larvicidal activity of *Eucalyptus* essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 110, 1675-1686.
- Luís, Â., Duarte, A., Gominho, J., Domingues, F., Duarte, A.P., 2016. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Ind. Crop. Prod.* 79, 274–282.
- Manh, N.S., Hung L.V., Long N.T., Don N.V., Huyen N.T., 2012. Effects of eucalyptus (*E. Camaldulensis*) leaf powder (ELP) on rumen fermentation, feed digestibility and methane production in ruminants by using *in vitro* gas production technique." In *Proceedings of International Conference Livestock-Based Farming Systems, Renewable Resources and the Environment.* (Ed. R. Preston and S. Southavong) pp, pp. 6-9.
- McSweeney, C.S., Palmer, B., Bunch, R., Krause, D.O., 2001. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *J. Appl. Microbiol.* 90, 78-88.

- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., Scheider, W., 1979. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci.* 93, 217-222.
- Mirzaei-Aghsaghali, A., Maheri-Sis, N., 2011. Factors affecting mitigation of methane emission from ruminants I: Feeding strategies. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 6, 888-908.
- NRC., 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, 7th revised ed. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Ørskov, E.R., Ryle, R., 1990. *Energy Nutrition in Ruminants*. Elsevier Science Publishers, New York.
- Patra, A.K., Kamra, D.N., Agarwal, N., 2010. Effects of extracts of spices on rumen methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feeds *in vitro*. *J. Sci. Food Agr.* 90, 511-520.
- Pierre, M.J.D., 2008. Antifungal Potential of *Eucalyptus Saligna* and *Eucalyptus Camaldulensis* essential Oils from Cameroon against *Phaeoramularia Angolensis*. *Eur. J. Sci. Res.* 24, 348-357.
- Rojo, R., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., Elghandour, M.M.Y., Odongo, N., Montes de Oca, R., Rivero, N., Alonso, M.U., 2015. Influence of cellulase addition to dairy goat diets on digestion and fermentation, milk production and fatty acid content. *J. Agri. Sci.* 153(8), 1514 – 1523.
- Roland, N., Nugon-Baudon, L., Andrieux, C., Szylit, O., 1995. Comparative study of the fermentative characteristics of inulin and different types of fibre in rats inoculated with a human whole faecal flora. *Br. J. Nutr.* 74, 239-249.
- Salem, M.Z.M., Zidan, Y.E., Mansour, M.M.A., El Hadidi, N.M.N., Abo Elgat, W.A.A., 2016. Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three commercial woods deteriorated by five common mold fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 106, 88–96.
- Salem, M.Z.M., Ashmawy, N.A., Elansary, H.O., El-Settawy, A.A., 2015a. Chemotyping of diverse *Eucalyptus* species grown in Egypt and antioxidant and antibacterial activities of its respective essential oils. *Nat. Prod. Res.* 29, 681-685.

- Salem, M.Z.M., Zeidler, A., Böhm, M., Mohamed, M.E.A., Ali, H.M., 2015b. GC/MS Analysis of Oil Extractives from Wood and Bark of *Pinus sylvestris*, *Abies alba*, *Picea abies*, and *Larix decidua*. *BioResources* 10, 7725-7737.
- Salem, M.Z.M., Ali, H.M., El-Shanhorey, N.A., Abdel-Megeed, A., 2013. Evaluation of extracts and essential oil from *Callistemon viminalis* leaves: Antibacterial and antioxidant activities, total phenolic and flavonoid contents. *Asian Pacific J. Trop. Med.* 6, 785-791.
- Sartorelli, P., Marquiroeto, A.D., Amaral-Baroli, A., Lima, M.E.L., Moreno, P.R.H., 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. *Phytother. Res.* 21, 231–233.
- SAS (2004). *Statistical Analysis Systems*. Version 9.2. Cary, NC, USA: SAS Institute.
- Skandamis, P.N., Nychas, G.J.E. 2000. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. *Applied Environ. Microbiol.* 66, 1646-1653.
- Smeti, S., Joy, M., Hajji, H., Alabart, J.L., Muñoz, F., Mahouachi, M., Atti, N., 2015. Effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils supplementation on digestion, colostrum production of dairy ewes and lamb mortality and growth. *Anim. Sci. J.* 86, 679-688.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., Dickey, D.A., 1997. Principles and Procedures of Statistics. In: A biometrical approach, 3rd Ed. McGraw Hill Book Co, New York, USA.
- Thao, N.T., Wanapat, M., Cherdthong, A., Kang, S. 2014. Effects of eucalyptus crude oils supplementation on rumen fermentation, microorganism and nutrient digestibility in swamp buffaloes. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 27, 46-54.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., Mcallan, A.B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185-197.
- Thiolali, N., Von Wandruzka, R.M.A., 1985. Essential oils of South African *Eucalyptus* species. *S. Afr. J. Chem.* 39, 95-100.

- Togtokhbayar, N., Cerrillo, S.M.A., Rodríguez, G.B., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Urankhaich, C., Jigjidpurev, S., Odongo, N.E., Kholif, A.E., 2015. Effect of exogenous xylanase on rumen *in vitro* gas production and degradability of wheat straw. Anim. Sci. J. 86, 765-71.
- Traoré, N., Sidibé, L., Figuéredo, G., Chalchat, J.-C., 2010. Chemical Composition of Five Essential Oils of Eucalyptus Species from Mali: *E. houseana* F.V. Fitzg. Ex Maiden, *E. citriodora* Hook., *E. raveretiana* F. Muell., *E. robusta* Smith and *E. urophylla* S.T. Blake. J. Essent. Oil Res. 22, 510-513.
- Udén, P., Robinson, P.H., Mateos, G.G., Blank, R., 2012. Use of replicates in statistical analyses in papers submitted for publication in Animal Feed Science and Technology. Anim. Feed Sci. Technol. 171, 11–15.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583-3597.
- Varel, V.H., Jung, H.G., Krumholz, L.R., 1991. Degradation of cellulose and forage fibre fractions by ruminal cellulolytic bacteria alone and in coculture with phenolic monomer-degrading bacteria. J. Anim. Sci. 69, 4993-5000.
- Welch, R.W., 1995. The chemical composition of oats. In: The oat crop: Production and utilization, Chapman and Hall, 279-320.