UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS

INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE EXTRACTO DE TANINOS EN LA PRESENCIA DE *Escherichia coli*, EN LAS HECES DE BOVINOS EN ENGORDA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

TERESA DE JESÚS HERAS SIERRA

DIRECTOR DE TESIS

DR. RUBÉN BARAJAS CRUZ

CO-DIRECTOR

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

ASESORES

DR. JAVIER ALONSO ROMO RUBIO

MC. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

CULIACAN, SINALOA, AGOSTO DE 2013

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR TERESA DE JESÚS HERAS SIERRA, BAJO LA DIRECCION DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA; Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR DE TESIS

DR. RUBÉN BARAJAS CRUZ

CO-DIRECTOR DE TESIS

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

ASESOR

DR. JAVIER ALONSO ROMO RUBIO

ASESOR

MC. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

ASESOR

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

CULIACAN, SINALOA, AGOSTO DE 2013

DR. JAVIER ALONSO ROMO RUBIO
PRESIDENTE
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
PRESENTE.-

Los abajo firmantes, miembros del Jurado de Grado, hacemos constar que la Tesis:

"Influencia de la adición de extracto de taninos en la presencia de *Escherichia coli*, en las heces de bovinos en engorda"

Presentada como requisito parcial para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Agropecuarias por la:

C. TERESA DE JESÚS HERAS SIERRA

Ha sido revisada y considerando que cumple con los requisitos necesarios, se otorga el VOTO APROBATORIO, para ser impresa y defendida en el Examen de Grado en la fecha que la Universidad asigne para ello.

A t e n t a m e n t e

Culiacán, Sinaloa; a 5 de Agosto de 2013.

Dr. Javier Alonso Romo Rubio
Presidente

M.C. Nohemí Castro del Campo
Secretaria

Dr. Rubén Barajas Cruz
Vocal A

Dra. Idalia Enríquez Verdugo
Vocal B

Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho
Vocal C

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 20 de enero del año 2020, la que suscribe Teresa de Jesús Heras Sierra, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 1217-3, de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dr. Rubén Barajas Cruz y cede los derechos del trabajo titulado "Efecto de la adición de Extracto de Taninos Hidrolizables y Condensados en la cantidad de *Escherichia coli*, en heces de bovinos en engorda ", a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor. La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE

Teresa de Jesús Heras Sierra

DOMICILIO: Calle la lima # 2463, Fracc. Valle Alto. Culiacán,Sinaloa,México.
TELÉFONO: 667-2 03 72 56
CORREO ELECTRÓNICO: tete852609@gmail.com
CURP: HEST850926MSLRRR01

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A Dios por prestarme la vida para crecer como persona y realizar mis metas.

A mis padres por su amor, su confianza y apoyo moral.

A mi esposo por su amor, apoyo y paciencia para la realización de mis trabajos.

A mi director de tesis por su ejemplo, confianza y apoyo para la realización de mi trabajo.

A todos mis maestros y asesores que dedicaron horas de su tiempo para darme clases y atenderme.

Al CONACYT por su apoyo económico.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS …….. iii

ÍNDICE DE FIGURAS …… iv

RESUMEN …….. v

ABSTRACT …….. vi

I. INTRODUCCIÓN ……. 1

II. REVISION DE LITERATURA ……... 2

2.1.Coliformes fecales ……... 2

2.2.Generalidades de *E.coli* …….. 3

2.3.Cepas de *E.coli* …… 3

2.4.Propiedades de los taninos …… 5

2.5.Taninos condensados ……. 5

2.6.Taninos hidrolizables …….. 5

III. HIPÓTESIS ……... 7

IV. OBJETIVOS …….. 8

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS …… 8

VI. MATERIAL Y MÉTODOS …… 9

6.1.Ubicación geográfica…… 9

6.2.Animales experimentales…… 9

6.3. Experimento 1. Influencia del nivel de extracto de taninos……. 10

6.3.1. Obtención de muestras…….. 10

6.3.2. Procesamiento de las muestras…… 10

6.3.3. Medio de cultivo …….. 12

6.3.4. Extensión de la muestra en placa con CHROMagar ECC……... 13

6.3.5. Lectura de UFC/g de heces..... 13

6.4. Experimento 2. Influencia del tiempo de preservación en laboratorio……..... 14

6.5. Análisis estadístico ……. 14
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN…….. 18
VIII. CONCLUSIONES ……... 27
IX. LITERATURA CITADA……. 28

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1	Composición de la dieta ofrecida a los toros durante el experimento ……...	17
2	Influencia del nivel de inclusión de extracto de taninos en la presencia de *E.coli*, en heces de bovinos en finalización después de 48 de preservación …….	22
3	Influencia de la adición de extracto de taninos y el tiempo de preservación de las heces en el laboratorio en la presencia de *E. coli* en heces de bovinos en finalización...	24

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Concentración de *E.coli* por cada tratamiento en 48 horas de preservación ……	23
2	Influencia del tiempo de preservación de las muestras en la presencia de *E. coli* en heces de bovino …….	25
3	Interacción entre el nivel de taninos y el tiempo de preservación de las muestras en la presencia de *E. coli* en heces de bovino …….	26

RESUMEN

Influencia de la adición de Extracto de Taninos en la cantidad de *Escherichia coli* en las heces de bovinos en engorda

Teresa de Jesús Heras Sierra

Para determinar la influencia de la adición de extractos de taninos en la cantidad de *Escherichia coli* en heces de bovinos en engorda se realizaron dos experimentos. Experimento 1. Se utilizaron cuatro muestras compuestas de heces obtenidas cada una del ellas de cinco bovinos en finalización. Cada muestra compuesta se dividió en seis sub-muestras de heces y asignadas aleatoriamente a recibir uno de seis niveles de extracto de taninos en que consistieron los tratamientos 0, 1.2, 2.4, 3.6, 4.8 y 6.0% de ET en base seca. Las heces fueron preservadas durante 48 horas y luego sembradas por triplicado en un medio selectivo para *E. coli* e incubadas 24 h a 45°C. Experimento 2. En un arreglo factorial 3 x 2, muestras de heces con 0 ó 4.8% de ET (BS) fueron preservadas durante 0, 24 o 48 h y luego incubadas 24 h a 45°C. En el Experimento 1, se observó un crecimiento nulo de *E. coli* en el grupo testigo (0% ET), en tanto que los demás tratamientos si presentaron crecimiento de la bacteria ($P < 0.01$), sin embargo el grupo con 2.4% de ET, presentó una disminución de UFC/g de heces de 23%, comparado con el resto de los grupos con ET ($P < 0.01$). En el Experimento 2, el tiempo de preservación previo a la incubación afectó negativamente ($P < 0.01$) el crecimiento de *E. coli*, con un descenso de 36% en las UFC/g de heces a las 48 horas en relación al tiempo 0 h en el grupo testigo. Los resultados sugieren que el tiempo de preservación de las muestras de heces en el laboratorio puede afectar negativamente la cantidad de UFC de *E. coli* , y que la adición de un extracto de taninos condensados e hidrolizables, puede disminuir la presencia de *E. coli*, aunque la proporción de la disminución es modesta.

Palabras clave: Bovinos en engorda, *Escherichia coli,* Taninos.

ABSTRACT

Influence of the addition of tannin extract on the amount *Escherichia coli* in feces of finishing beef cattle

Teresa de Jesús Heras Sierra

To determine the influence of the addition of tannin extract on the amount of *Escherichia coli* in feces of finishing beef cattle two experiment were performed. Experiment 1. Four composed sample of feces obtained each of them from five finishing beef cattle were used. Each composed feces sample was divided in six sub-samples and randomly assigned to receiving one of six levels of tannin extract in that consisted the treatments 0, 1.2, 2.4, 3.6, 4.8 and 6.0% of TE dry matter basis. Feces were preserved during 48 h and them were plated by triplicate in a selective medium for *E.coli* and were incubated for 24 hours at 45° C. Experiment 2. In a factorial arrangement 3 x 2, feces samples with 0 or 4.8% of TE (DMB) were preserved during 0, 24 or 48 h, and then incubated 24 h at 45 °C. In the Experiment 1, a null growth of E. coli was observed in Control treatment (0% TE), while remainder treatments growth of this bacteria was observed ($P < 0.01$), however in the 2.4% TE group a 23% decrement in the amount of UFC/g was observed in relationship to reminder treatment receiving TE ($P < 0.01$). In Experiment 2, the preservation time before incubation, affected negatively ($P < 0.01$) the E. coli growth with a decrement of 36% in the UFC/g at 48 h in relationship to time 0 h in Control group. Results suggest that the time of preservation of fecal samples in the laboratory before its incubation can affect negatively the amount of UFC/g of E. coli, and that addition of condensed and hydrolysable tannins, can diminishing the presence of E. coli, despite that the proportion of diminishing is modest.

Key words: Beef cattle, Escherichia *coli*, Tannin

I. INTRODUCCION

El incremento en el tamaño de las explotaciones pecuarias, conlleva a que una gran cantidad de animales estén concentrados en un espacio reducido, así como el creciente desarrollo de la población en las zonas urbanas en áreas cercanas a las explotaciones ganaderas, incrementan el riesgo de contaminación por excretas del ganado hacia los humanos (Weinberg *et al.,* 2011; Callaway *et al.,* 2009). Entre los animales domésticos, los bovinos figuran como los principales productores de estiércol (Dungan, 2010). El ganado bovino es hospedero de una variedad de bacterias patógenas, virus y parásitos, algunos de los cuales representan un riesgo para otros animales y seres humanos (Acha *et al.,* 2003). La *Escherichia coli* es reconocida como el principal indicador de contaminación fecal en agua y alimentos (Dungan, 2010); el estiércol de los bovinos es la principal fuente de contaminación por *E. coli* hacia el medio ambiente y alimentos (Lejune *et al*., 2007; Callaway *et al.,* 2009). Ante la creciente presión mundial para reducir el uso de antibióticos en la alimentación animal (Callaway *et al.*, 2009; Setia *et al.,* 2009), se vuelve de interés el explorar el uso sustancias naturales como los extractos de taninos en la concentración de *E. coli* en las heces de los bovinos. Los taninos son producto del metabolismo secundario de las plantas (Min *et al*., 2003), que en algunos estudios in vitro han mostrado efecto bactericida incluso en ciertas cepas de *E. coli* (Chung *et al*., 1998; Wells *et al*., 2005; Kamijo *et al*., 2008).

Este trabajo se llevó a cabo con el objetivo de determinar la influencia de la adición de extracto de taninos en las heces de bovinos en engorda en la cantidad de *Escherichia coli* presentes en las mismas.

II. REVISION DE LITERATURA

Grandes cantidades de excremento procedente de la producción bovina son producidas continuamente en todo el mundo; se estima que más de 100 mil millones de kilogramos de excretas de bovino se producen diariamente en Estados Unidos (Weinberg *et al.,* 2011).

El ganado bovino es el principal productor de estos desechos, seguido por los pollos y los cerdos; las excretas de ganado bovino contienen gran cantidad de microorganismos patógenos, como bacterias, virus, parásitos y hongos (Dungan, 2010).

Debido a la amplia diseminación de materia fecal procedente de animales en el medio ambiente, las bacterias pueden estar presentes en áreas que se utilizan para la producción de alimentos; por ejemplo *Echerichia coli* se puede encontrar en estiércol de animales y aguas residuales hasta su transformación en composta destinados a áreas agrícolas (Callaway *et al.,* 2009). El estiércol de bovino es una fuente importante de contaminación por *E. coli* hacia el medio ambiente y alimentos (Lejune *et al*., 2007).

2.1. Coliformes fecales.

Los coliformes fecales en particular *Escherichia coli*, se han seleccionado como indicadores de contaminación fecal debido a su relación con el grupo tifoide-paratifoide y a su alta concentración en diferentes tipos de muestras; los coliformes fecales son un subgrupo de las coliformes totales, capaces de fermentar lactosa a 44.5ºC, aproximadamente el 95% del grupo de los coliformes presentes en heces están formados por *E. coli* y ciertas especies de *Klebsiella*; ya que los coliformes fecales se encuentran casi exclusivamente en las heces de animales de sangre caliente, se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal (Gyles, 2007; Callaway *et al.,* 2009).

2.2. Generalidades de *Escherichia coli.*

Escherichia coli, es una bacteria anaerobia Gram-negativa que se encuentra comúnmente en el sistema digestivo de los seres humanos y animales de sangre caliente (mamíferos); existe una variedad de estas bacterias las cuales son más agresivas y se distinguen de otras *E. coli* por su capacidad para provocar graves enfermedades como resultado de su información genética para la producción de toxinas, capacidad de adhesión e invasión de células huéspedes, interferencia con el metabolismo celular y destrucción de tejidos *(*Acha *et al.,* 2003*).*

2.3. Cepas de *Escherichia. coli*

Dentro de estas variedades encontramos diversas cepas según su poder patógeno: *Escherichia coli* entero patógena (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escheric*hia *coli* entero invasiva (EIEC), *Escherichia coli* entero hemorrágica (EHEC) y *Escherichi*a *coli* entero agregativa (EAEC) (Dungan, 2010).

Las *E. coli* patógenas son excretadas en las heces de huéspedes enfermos o sanos, los rumiantes y animales silvestres suelen ser los principales reservorios de *Escherichia* entero hemorrágica (Callaway *et al.,* 2009).

Esta bacteria causa infecciones intestinales y extra intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía; los brotes se producen a menudo cuando la bacteria llega a los alimentos destinados al consumo humano (Callaway *et al.,* 2009). La carne de ganado bovino es la principal fuente de infección, sobre todo la carne picada y que no se cocina lo suficiente. El microorganismo también puede encontrarse en las ubres de las vacas y llegar a la leche que no esté pasteurizada *(*Acha *et al.,* 2003*).*

Los vegetales crudos que han sido cultivados o lavados con agua contaminada o hayan entrado en contacto con heces de animales infectados (o bien con

fertilizantes naturales) pueden también ser portadores de la bacteria (Gyles, 2007). Las excretas de bovino puede albergar *E. coli O157:H7* a temperatura ambiente, alrededor de 49 días; las heces acumuladas en la piel del ganado pueden estar contaminadas con esta bacteria (Acha *et al.,* 2003).

De la misma forma las aguas residuales de la producción ganadera pueden ser utilizadas en el riego de cultivos lo que puede ocasionar una contaminación fecal del producto final como hortaliza o algunos otros. Cada año más de 60 personas mueren y 73,000 personas son afectadas por *E. coli O157:H7*, en los Estados Unidos, estimándose un costo para su economía, de más de 1 billón de dólares por año (Callaway *et al.,* 2009).

Algunas estrategias que reducen el contagio entre animales vivos ofrecen métodos para reducir las poblaciones de agentes patógenos en animales destinados a la alimentación antes de que ingresen a la cadena alimentaria, por ejemplo, se ha demostrado que cambiar drásticamente la alimentación del ganado de una ración alta en granos a una dieta basada en heno de alta calidad reduce la cantidad de *E. coli* genérica y las poblaciones de *E. coli* O157:H7, sin embargo, es posible que no sea práctico cambiar la dieta del ganado de corrales de engorde basada en granos a una basada en heno antes del sacrificio; por otro lado, se ha demostrado la efectividad de la ingesta de probióticos lactobacilos acidófilos y se ha adoptado para el control de la *E. coli* O157:H7 como manejo previo al sacrificio (Callaway *et al.*, 2009; Setia *et al.,*2009).

Woerner *et al.* (2006), observaron que cuando los corrales del ganado bovino tenían una tasa de incidencia fecal de >20%, el porcentaje de *E. coli* O157: H7 en las pieles del ganado al momento del sacrificio aumentaba en un 26%; sin embargo cuando la tasa de incidencia era de <20% la contaminación se reducía a 5%.

Se ha demostrado que los taninos son capaces de inhibir el crecimiento microbiano (Wells *et al*., 2005).

2.4. Propiedades de los Taninos.

Los taninos son un grupo de compuestos fenólicos presentes en casi todas las plantas, pero particularmente en las leguminosas, influyen en el valor nutricional de una amplia variedad de forrajes y plantas consumidas por los rumiantes; clasificados en taninos condensados e hidrolizables (Reed, 1995; Frutos *et al.,* 2004).

2.5. Taninos condesados.

Son macromoléculas constituidas por flavonoides llamados proantocianidinas como la catequina, epicatequina, galocatequina; encontradas comúnmente en forrajes, leguminosas, árboles y arbustos (Min *et al*., 2003).

2.6. Taninos hidrolizables.

Son polímeros de ácidos esterificados como el acido gálico, ácido elágico, formados con una molécula central de glucosa y fenoles (Min *et al*., 2003).

A través del tiempo en el mundo, los taninos han tenido diversos usos como curtidores de piel, producción de tinta utilizada para teñir algunas telas como la seda así como también tinta para escribir, en la alimentación de rumiantes y como inhibidores del crecimiento bacteriano (Nogueira, 2011).

Algunos estudios han demostrado que los efectos de la alimentación con forraje, en la cantidad de *E.coli* O157: H7, se debe a concentraciones de taninos y ácidos fenólicos contenidos en los forrajes (Callaway *et al.,* 2004).

Es conocido que los taninos hidrolizables tienen efecto antibacterial, Kamijo *et al.* (2008), encontraron que los pétalos de rosa rugosa inhibían el crecimiento de *Staphylococus aureus, Escherichia coli*, y *Salmonella spp,* en muestras tomadas de un centro regional de procesamiento de alimentos en Japón.

Recientes investigaciones *in vitro* han encontrado que los taninos son capaces de matar bacterias como *E. coli* O157:H7 en el estiércol (Wells *et al*., 2005). Otros trabajos refieren el uso de taninos condensados como una estrategia para reducir

el número de parásitos gastrointestinales en los ovinos y cabras (Min *et al*., 2003). Sin embargo en otros trabajos con más anterioridad se han realizado investigaciones sobre estos compuestos. Scalbert (1991), observó un efecto bacteriostático y bactericida de los taninos, en ensayos *in vitro* para una amplia variedad de baterías patógenas incluyendo entre ellas *Enterobacterias* como *E. coli* y Salmonella *Spp.*

III. HIPÓTESIS

La adición de extractos de taninos en las heces de bovinos en engorda, disminuyen la cantidad de *Escherichia coli* presentes en el excremento.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la influencia de la adición de extracto de taninos en las heces de bovinos en engorda en la cantidad de *Escherichia coli* presentes en las mismas.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.1. Medir la influencia de la adición de extracto de taninos en las heces de bovinos en engorda en la cantidad de coliformes fecales presentes en las heces.

5.2. Determinar el nivel de extracto de taninos necesario para disminuir la presencia de *Escherichia coli* en las heces de bovinos en engorda.

5.3. Medir la influencia del tiempo de preservación de las muestras de excremento, en la cantidad de *Escherichia coli* en las heces de bovinos en engorda.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Ubicación geográfica

La presente investigación estuvo constituida por dos experimentos y se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Nutrición y Producción Animal de la FMVZ, situado en el Km. 3.5 de la carretera federal No. 15 (salida sur), ubicada en Culiacán Sinaloa. Geográficamente se localiza a 24º 46’ 13” de latitud Norte y 107º 21’ 14” longitud Oeste, a una altura de 80 msnm, clima regional semiseco muy cálido (Bs1(h’)), con temperatura media anual de 25.4 ºC y una precipitación pluvial promedio anual de 670.9mm (INEGI, 2000).

Las muestras de excremento que se utilizaron en los dos experimento fueron de bovinos en finalización en las instalaciones de Ganadera Los Migueles SA de CV, ubicada en el km 4 de la carretera federal México, tramo Culiacán- Los Mochis, en Culiacán, Sinaloa, con la siguiente localización geográfica: 24º51’ de latitud Norte, 107º26’ de longitud Oeste, 57msnm, temperatura media anual de 24.8 ºC y mínima extrema 33.3ºC y mínima 16.3 ºC; máxima extrema 44.5 ºC y mínima extrema de 1.5 ºC, precipitación pluvial media anual de 665.6 mm, predominando el clima tropical seco (García, 1981; INEGI, 2009).

6.2. Animales experimentales

Todos los animales que se utilizaron en este experimento fueron tratados de acuerdo con las recomendaciones de la *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching* (Consortium, 1988).

Se utilizaron 20 toros *Bos indicus* de 320 ± (DE) 6 kg, al inicio del experimento, los becerros se identificaron con arete de plástico numerado, se desparasitaron con albendazol (Albendaphorte, Salud y Bienestar Animal), se les colocó un implante anabólico en el tercio medio de la oreja (Component TES; Elanco Animal Health), se inmunizaron contra *clostridia* (Ultrabac 7; Pfizer) y contra *Manheimia*

haemolitica (OneShot; Pfizer) y se aplicaron de vitaminas A, D y E (Vitafluid; Virbac).

6.3. Experimento 1. Influencia del nivel de extracto de taninos.

6.3.1. Obtención de muestras

Después de 56 días de estar consumiendo la dieta de finalización, los 5 animales de cada uno de los 4 corrales, se condujeron a una manga de manejo y se sujetaron en una prensa ganadera, una vez inmovilizados, se tomó una muestra de heces por cada animal directamente del recto (Berry *et al*., 2006), la muestra fecal fue tomada con guante de plástico. Inmediatamente después, el guante fue cerrado con doble nudo para evitar la contaminación de la muestra por otros microorganismos presentes en el medio circundante. El guante fue identificado con el número de arete del animal del cual procedía la muestra, el número de corral en que estaba alojado y la fecha en que se recolectó la muestra. Enseguida las muestras fueron transportadas al laboratorio para su procesamiento.

6.3.2. Procesamiento de las muestras

En el laboratorio, se conjuntaron las muestras de heces de los cinco animales de un mismo corral y se integró una muestra común, la cual fue homogenizada en una licuadora con vaso de vidrio previamente esterilizado; el tiempo de homogenización fue de 1 minuto por muestra (Varel *et al*., 2006). La muestra compuesta se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL a la cual se le colocó un tapón de hule y se dejó a temperatura ambiente por una hora (Varel *et al*., 2006).

Determinación de materia seca. De la muestra compuesta de heces se tomaron por triplicado submuestras de 15 g (Varel *et al*., 2006) que se colocaron en vasos de precipitados de 100 mL numerados y previamente pesados; los vasos fueron colocados en estufa de aire forzado a 110 °C durante 24 horas (AOAC, 1995), una vez completado ese tiempo, se enfriaron en desecador y se pesaron en balanza analítica.

El procedimiento descrito anteriormente, también se realizó 14 días antes de la toma de muestra que se utilizó en las mediciones, con la finalidad de contar con una aproximación previa del contenido de materia seca de las heces y con base a ello establecer la proporción de heces en fresco y extracto de taninos que constituirían los tratamientos.

De acuerdo a un diseño completamente al azar (Hicks, 1973), las muestras fueron asignadas a uno de los siguientes tratamientos:

1). Heces sin la adición de extracto de taninos (testigo)

2). Adición de 1.2% de extracto de taninos como proporción de la materia seca de las heces

3). Adición de 2.4% de extracto de taninos como proporción de la materia seca de las heces

4). Adición de 3.6% de extracto de taninos como proporción de la materia seca de las heces

5). Adición de 4.8% de extracto de taninos como proporción de la materia seca de las heces

6). Adición de 6% de extracto de taninos como proporción de la materia seca de las heces

La dosis de 1.2% de extracto de taninos se estableció como el equivalente a la cantidad teórica de taninos que estaría presente en las heces de un bovino en finalización al que se le hubiese proporcionado 0.3% de extracto de tanino en la dieta, atribuyendo una digestibilidad teórica de 75% a la materia seca de las dietas de finalización (0.3/0.25 = 1.2); los demás tratamientos fueron constituidos por múltiplos de esta proporción. La dosis equivalente a proporcionar 0.3 de ET en la

dieta se eligió como representativa del un nivel de ET que produce una mejora en la respuesta productiva de los bovinos en engorda intensiva (Barajas *et al*., 2011; Barajas *et al*., 2012: Montoya *et a*l., 2013).

El extracto de taninos fue proporcionado a partir de ByPRO ® (Silva Team–INUDOR, S.A.; Buenos Aires, Argentina), mezcla de extractos de taninos constituida en su mayor parte por taninos condensados obtenidos del árbol quebracho y una pequeña proporción de taninos hidrolizables obtenidos de castaño.

De cada muestra inicial representada por cada corral, se pesaron seis porciones de 30 gramos de excremento para mezclarse con cada tratamiento de extracto de taninos; cada muestra se colocó en vasos de precipitado, identificados con el número de corral, nivel de extracto de taninos y fecha. Ya preparadas las muestras se almacenaron a temperatura ambiente dentro de una campana en el laboratorio, durante 48 horas.

6.3.3. Medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó para determinar la presencia de *E. Coli* fue CHROMagar™ ECC el cual es un medio selectivo que permite la detección y diferenciación simultanea entre coliformes y *E.coli;* por lo cual tiñe de color azul-verde las colonias de *Escherichia coli* .

El día previo a la siembra de muestras, se pesaron 32.8 g de medio en balanza analítica y se añadieron a un frasco de vidrio esterilizado con 1000 mL de agua destilada estéril, el medio fue colocado en una placa de calentamiento a una temperatura de 350 ºC y una velocidad de 2000 rpm; hasta llegar a punto de ebullición; enseguida se dejó enfriar fuera de la placa de calentamiento durante 40 minutos. Enseguida se vació el medio en cajas de Petri y se esperó 30 minutos para que el contenido de las cajas coagulara; después las cajas de Petri fueron guardadas en bolsas herméticas estériles en refrigeración (4 °C).

6.3.4. Extensión de la muestra en placa con CHROMagar ECC.

De cada muestra se tomaron 25 g de excremento los cuales se mezclaron con 225 mL de buffer de fosfato con un pH de 7.3 en bolsas herméticas y se homogenizaron las muestras. En seguida se colocaron las gradillas con tubos de ensayo estériles que contenían 9 mL de buffer del mencionado anteriormente; entonces se procedió a hacer las diluciones necesarias para realizar el extendido en las placas con el medio de cultivo, la cual fue a la -1, que se derivó de la muestra de 25 g y que de la misma se tomó con una pipeta 1mL y se colocó en el tubo con 9 mL de buffer, este se homogenizo en un Vortex y se tomaron 100 µL con una micropipeta y se colocó en el medio para su extensión, haciendo movimientos semicirculares con una varilla estéril de vidrio en forma de L.

Este procedimiento se hizo por triplicado para cada sub-muestra, bajo condiciones de esterilidad, lo que implicó el uso de una campana de flujo laminar equipada con luz ultravioleta y todo el material que se utilizó fue esterilizado para su uso.

Ya realizadas las extensiones las 72 cajas identificadas individualmente, fueron colocadas en forma invertida en el interior de la incubadora donde se mantuvieron a una temperatura de 45 ºC por 24 horas.

6.3.5. Lectura de UFC/g de heces.

Transcurridas las 24 horas de incubación, las cajas fueron extraídas de la incubadora y se llevó a cabo el conteo de colonias. Enseguida se obtuvo un promedio de colonias por cada triplicado correspondiente a cada tratamiento para hacer el cálculo con el cual se obtienen las unidades formadoras de colonias por gramo de heces (UFC/g).

$$\text{UFC/g de heces} = \frac{\text{(promedio de colonias contables) (peso de muestras)}}{\text{(Dilución usada) (Porción de la dilución extendida)}}$$

6.4. Experimento 2. Influencia del tiempo de preservación en laboratorio.

Con un procedimiento similar al descrito para el Experimento 1, se colectaron nuevamente muestras de heces en los mismos animales utilizados en el experimento anterior, las que fueron utilizadas en un experimento completamente al azar con arreglo factorial 3 x 2 (Steel y Torrie, 1988), en el que se probaron tres niveles de tiempo de preservación de las muestras en el laboratorio (0, 24 o 48 horas) y la adición de 0 (Testigo) o 4.8% de ET en base seca.

La dosis de 4.8% de ET en base seca, fue seleccionada con base en los resultados del Experimento 1, como representativa de la respuesta promedio de los diferentes niveles de inclusión de ET.

A partir de la muestra compuesta, esta se dividió en seis porciones de 30 g; 3 sub-muestras asignadas al tratamiento testigo (sin adición de taninos) y 3 muestras a las que se les adicionó 4.8% de ET en base seca. De manera aleatoria una sub-muestra de cada uno de los dos tratamientos fueron asignadas a uno de tres tiempos de preservación en el laboratorio antes de proceder a su incubación (0, 24 o 48 horas). Una vez cumplido su tiempo de preservación en el laboratorio, las heces fueron cultivadas en la misma manera que se describió para el Experimento 1.

6.5. Análisis estadístico

Antes de proceder al análisis estadístico, en los dos experimentos los resultados de Ufc/g de muestra se transformaron a Log_{10} de Ufc/g de heces.

Los resultados del Experimento 1, fueron analizados por Análisis de Varianza para un diseño completamente al Azar (Hicks, 1973) y adicionalmente la probabilidad de un comportamiento, lineal, cuadrático o cubico fue explorada con el uso de polinomios ortogonales (Steel y Torrie, 1988).

Los resultados del Experimento 2, fueron analizados por Análisis de Varianza para un diseño completamente al Azar (Hicks, 1973), con un arreglo factorial 3 x 2

(Steel y Torrie, 1988) de los tratamientos (3 niveles del factor tiempo x 2 niveles del factor ET).

En los caso donde existió diferencia estadística ($P \leq 0.05$), la separación de medias se llevó a cabo con la prueba de la Diferencia Mínima Significativa (Berry *et al.,* 2006; Varel *et al*., 2006). Todos los cálculos estadísticos fueron desarrollados con la versión 9 del paquete computacional Statistix® (2007).

Modelo matemático diseño completamente al azar (Wayne, 2011)

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y = la variable de respuesta

μ = El promedio general

τ_i = El efecto del tratamiento

ε_{ij} = El error experimental

Modelo matemático del arreglo factorial (Wayne, 2011)

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \tau_j + (\tau_i \times \tau_j) + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y = la variable de respuesta

μ = El promedio general

τ_i = Efecto del i-esimo nivel del factor tiempo

τ_j = Efecto del j-esimo nivel del factor ET

$(\tau_i \times \tau_j)$ = Efecto de la interacción Tiempo x ET

ε_{ijk} = El error experimental

Cuadro 1. Composición de la dieta ofrecida a los toros durante el experimento.

Variable	Proporción en la material seca de la dieta, %
Ingredientes:	
Paja de maíz	11.09
Maíz molido	71.61
Harinolina	5.55
Melaza de caña	6.72
Sebo	2.22
Premezcla de vitaminas y minerales	2.80
Análisis calculado: [1]	
Materia seca, %	89.23
Proteina cruda, %	13.31
Energía neta de mantenimiento, Mcal/kg	2.032
Energía neta de ganancia, Mcal/kg	1.373
Calcio,%	0.85
Fósforo, %	0.36
Monensina%	28.01

[1] Calculado con base en valores publicados (NRC, 2000)

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1.

Los resultados de la influencia del nivel de inclusión de extracto de taninos en la presencia de *E. coli* en heces de bovinos en finalización después de 48 horas de incubación se presenta en el Cuadro 2.

En este experimento se observó que después de 48 horas de incubadas las muestras de heces, el tratamiento testigo presentó un crecimiento nulo de *E. coli*, mientras que en los tratamientos con extracto de taninos si hubo crecimiento de *E. coli* ($P < 0.01$). Este es un resultado no esperado, partiendo del supuesto de que la presencia de *E. coli* en las heces de los bovinos es un acontecimiento común *(*Acha *et al.,* 2003; Callaway *et al*., 2009*),* además en las pruebas de estandarización de las técnicas llevadas a cabo antes del inicio de este experimento, se encontró la presencia de esta bacteria en las heces de los bovinos que estuvieron consumiendo las mismas dietas. El contenido de 28.01 mg de monensina/kg de MS de la dieta, no se considera un factor de disminución y menos de eliminación de la presencia de *E. coli,* de acuerdo a los resultados publicados por Paddock *et al.* (2011), quienes señalan que monensina a una concentración de 44 mg/kg de MS puede reducir el conteo de *E. coli* en las heces de bovinos en engorda, pero que dosis de 33 mg/kg de MS o menores no tienen efecto alguno en la presencia de *E. coli*.

Sin embargo, entre los tratamientos que recibieron alguna cantidad de extracto de taninos, el grupo con 2.4% de ET (BS), el crecimiento de *E. coli* fue un 23% menor ($P < 0.01$) con relación al resto de los grupos con ET, mientras que los tratamientos de 1.2, 3.6, 4.8, 6.0% de ET fueron iguales entre sí ($P > 0.20$). El análisis de polinomios ortogonales entre los grupos que recibieron alguna cantidad de ET mostró un comportamiento cuadrático ($P < 0.001$).

La disminución en la cantidad de *E. coli* encontrada con la adición de 2.4% de ET, corresponde en cierta manera con los hallazgos de Wells *et al.* (2005), quienes observaron una disminución en la cantidad de *E. coli* O157:H7, cuando inocularon esta bacteria en heces de bovinos en crecimiento y les adicionaron diferentes tipos de ácidos fenólicos. En ese mismo sentido varios autores han comentado el efecto inhibitorio de los taninos en el crecimiento de *E. coli* (Scalbert, 1991; Callaway *et al.,* 2004). La diferencia en sensibilidad de esta bacteria a los diferentes niveles de inclusión de ET, sugiere que el nivel de interacción entre los grupos hidroxilo de los múltiples sustituyentes fenólicos que integran a los taninos, pueden actuar de manera aun no clara con los componentes de la membrana celular de las bacterias Gram negativas como *E. coli* y que la respuesta puede variar con la concentración y tipo de taninos, presencia de sustancias interactuantes como minerales, así como el tipo de condiciones de cultivo aerobios o anaerobias (Smith *et al*., 2005).

La combinación de resultados en los que el tratamiento testigo careció de crecimiento de *E. coli*, aunado con que en todos los tratamientos que recibieron ET existió algún crecimiento de *E. coli*, pero con un descenso en el tratamiento que recibió 2.4% de ET, describen el comportamiento general del crecimiento de *E. coli* en las heces de bovino en finalización como una respuesta cúbica ($P < 0.001$), la cual se presenta de manera gráfica en la Figura 1.

Experimento 2.

Los resultados de la Influencia de la adición de extracto de taninos y el tiempo de preservación de las heces en el laboratorio en la presencia de *E. coli* en heces de bovinos en finalización se presentan en el Cuadro 3.

En el segundo experimento, el análisis factorial indicó que el tiempo de preservación de la muestra en el laboratorio afectó negativamente ($P < 0.01$) el número de unidades formadoras de colonias de *E. coli* / g de heces (BS). En el grupo testigo se apreció un descenso de 36% ($P < 0.05$) en las UFC/g a las 48

horas con relación al valor encontrado con tiempo cero. En la mitad de las cajas de Petri de las heces preservadas 48 h en el laboratorio asignadas al tratamiento testigo (sin adición de ET), la cantidad de UFC/g fue cero. Este resultado explica de alguna manera, que en el Experimento 1, no se hayan encontrado UFC en el tratamiento testigo después de 48 h de preservación en el laboratorio antes de proceder a su cultivo.

La dificultad para lograr que la preservación de las muestras en el laboratorio permita reflejar los fenómenos observados en campo ha sido enfrentada por varios autores. Smith *et al*. (2003) al incubar muestras de heces con *E. coli* y varios niveles de extracto de taninos, observaron un aumento en la cantidad de UFC a medida que se incrementó el tiempo; en tanto que Smith y Mackie (2004) después de alimentar ratas con y sin la adición de taninos, encontraron un aumento en la cantidad de bacterias Gram negativas resistentes a taninos excretadas en las heces, pero no observaron cambios en la cantidad de bacterias Gram negativas cultivables obtenidas a partir de las heces de los mismos animales.

Se encontró una interacción (P = 0.03) entre el tiempo de preservación en el laboratorio y la adición de taninos, en el desglose del efecto de los tratamientos de manera individual, se apreció que en las heces que fueron cultivadas inmediatamente después de su arribo al laboratorio (tiempo cero), la cantidad de UFC/g de heces fue un 17.3% menor ($P < 0.05$) en las que fueron adicionadas con ET en relación a las del grupo testigo, aunque en las muestras de heces preservadas por 24 o 48 horas antes de su cultivo no se encontró diferencia ($P > 0.10$) entre los tratamientos. Aunque los valores encontrados en el grupo testigo fueron menores a las 48 horas que a las 0 y 24 ($P < 0.05$), en tanto que dentro del grupo que recibieron ET, los valores fueron similares ($P > 0.10$) en todos los tiempo de preservación estudiados en este experimento. En las Figuras 2 y 3, se muestran en forma gráfica los resultados de la influencia del tiempo de incubación en la presencia de *E. coli* en heces de bovino así como de la interacción entre el nivel de taninos y el tiempo de incubación en la presencia de *E. coli* en heces de bovino, respectivamente.

Estos resultados indican que si bien existe inicialmente un efecto inhibidor del ET ($P < 0.05$), este efecto no se incrementa durante el tiempo de contacto del ET con las heces, sino que se mantiene constante a través del tiempo, lo que sugiere que las cepas de *E. coli* que pudieran haber sido afectadas por el contacto inicial con los taninos, son las únicas susceptibles a ellos. En estudios previos se ha mencionado que sí bien los taninos condesados tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de algunas cepas de *E. coli*, (Chung *et al*., 1998) también existen cepas de esta bacteria resistentes a la presencia de taninos, especialmente a los taninos condensados (Smith *et al.,* 2003)

Los resultados conjuntos de los dos experimentos, indican que el tiempo de preservación de las muestras de heces en el laboratorio puede afectar negativamente la cantidad de *E coli*. Que la adición de un extracto de taninos condensados e hidrolizables, puede disminuir la presencia de *E. coli*, aunque la proporción de la disminución se puede considerar como baja.

El tratamiento con la inclusión de 2.4% de ET en la que se apreció un reducción en la concentración de *E. coli* en las heces que recibieron alguna cantidad de taninos, equivale a la concentración teórica en heces de animales que hubiesen recibido 0.6% de ET en su dieta, esta dosis es el doble de la recomendada para mejorar la respuesta productiva de los bovinos (Barajas *et al*., 2011; Barajas *et al*., 2012: Montoya *et al.*, 2013). Recientemente Rivera *et al*., (2013) encontraron que dosis entre 0.2 y 0.4 de ET en la dieta mejoran la respuesta productiva de los bovinos, pero que la adición de 0.6% de ET a la dieta es similar a la respuesta de bovinos en finalización que no hayan recibido taninos suplementarios.

Cuadro 2. Influencia del nivel de inclusión de extracto de taninos en la presencia de *E. coli* en heces de bovinos en finalización, después de 48 horas de preservación (Experimento 1).

Variables	Proporción de Extracto de Taninos adicionados a la heces en BS, %						EEM[1]	Valor de *P*	Polinomios[2]
	0	1.2	2.4	3.6	4.8	6.0			
Animales	20	20	20	20	20	20			
Corrales	4	4	4	4	4	4			
Muestra final de heces, g									
Base húmeda	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00			
Base seca	8.18	8.18	8.18	8.18	8.18	8.18			
Extracto de taninos									
Adicionados, g/muestra	0.00	0.1008	0.2016	0.3024	0.4032	0.5040			
Proporción en base seca, %	0.00	1.23	2.46	3.70	4.93	6.16			
E. coli Log^{10}UFC/g heces BH	0.00c	3.803a	2.876b	3.964a	4.011a	3.861a	0.197	< 0.01	C < 0.001
E. coli Log^{10}UFC/g heces BS	0.00c	4.367a	3.440b	4.530a	4.576a	4.425a	0.197	< 0.01	C < 0.001

[1] Error estándar de la media
[2] Polinomios: L= lineal; Q= cuadrático; C= Cúbico

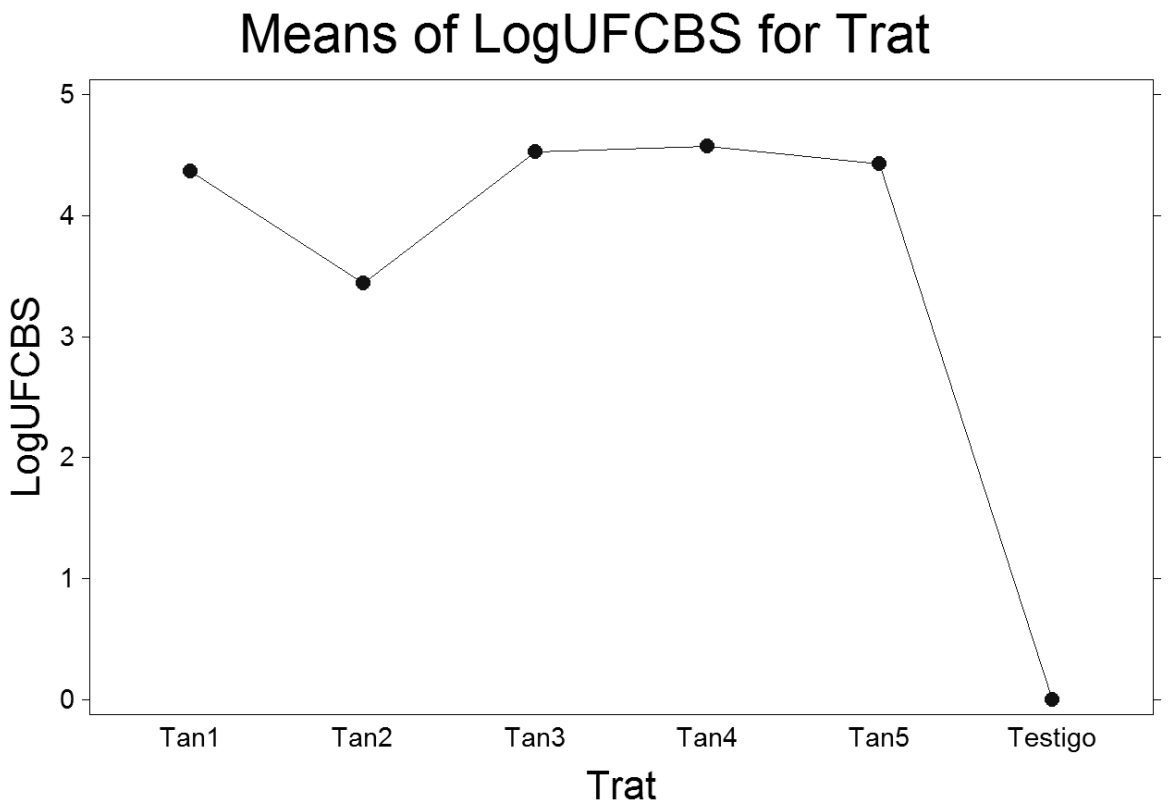

Figura 1. Concentración de *E. coli* por cada tratamiento en 48 horas de preservación (Experimento 1).

Cuadro 3. Influencia de la adición de extracto de taninos y el tiempo de preservación de las heces en el laboratorio en la presencia de *E. coli* en heces de bovinos en finalización (experimento 2).

Variable	Tratamientos						EEM[1]	Valor de *P*	Efectos principales		
	ET 0%			ET 4.8%					Tan	Horas	T x H
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h					
Muestra final de heces, g											
Base húmeda	30	30	30	30	30	30					
Base seca	8.18	8.18	8.18	8.18	8.18	8.18					
Extracto de taninos											
Adicionados, g/muestra	0	0	0	0.4032	0.4032	0.4032					
Proporción en base seca, %	0	0	0	4.93	4.93	4.93					
E. coli Log^{10}UFC/g heces BH	3.47^{a}	3.34^{a}	2.00^{c}	2.77^{b}	3.10^{ab}	2.60^{bc}	0.162	0.05	0.36	< 0.01	0.03
E. coli Log^{10}UFC/g heces BS	4.05^{a}	3.92^{a}	2.58^{c}	3.35^{b}	3.68^{ab}	3.18^{bc}	0.162	0.05	0.36	< 0.01	0.03

[1] Error estándar de la media

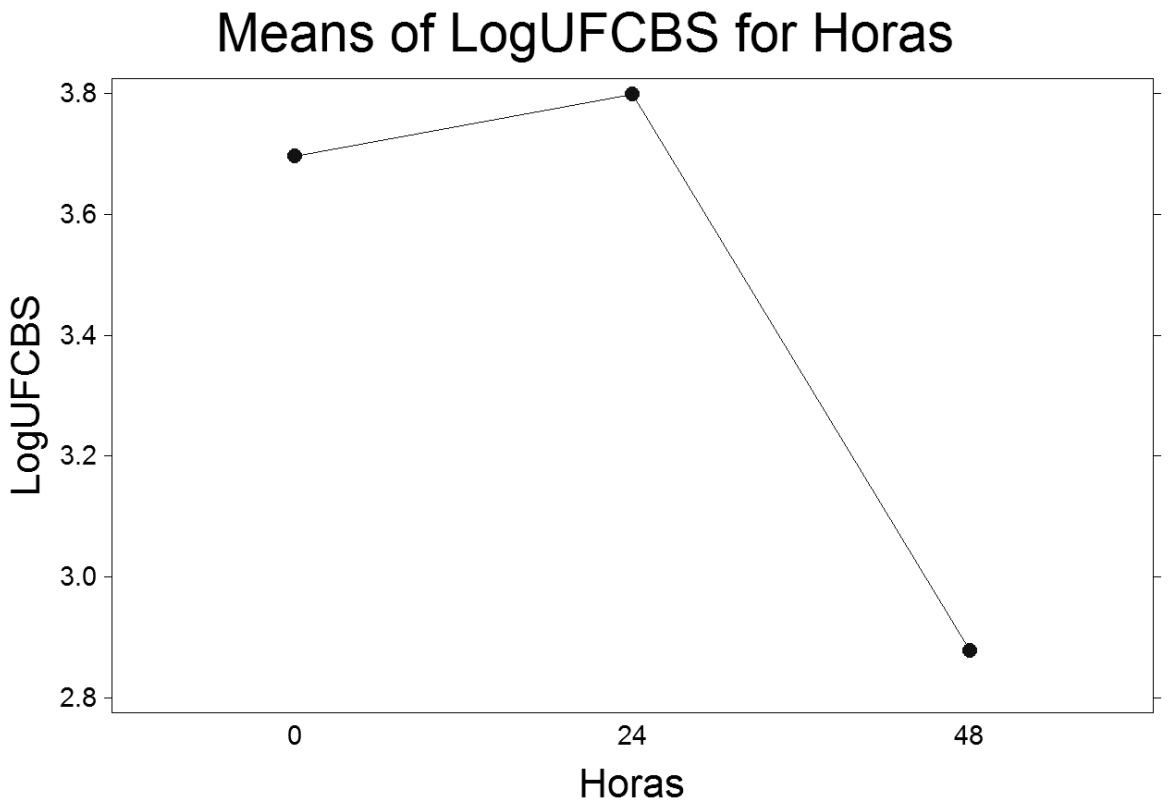

Figura 2. Influencia del tiempo de preservación de las muestras en la presencia de *E. coli* en heces de bovino (Experimento 2).

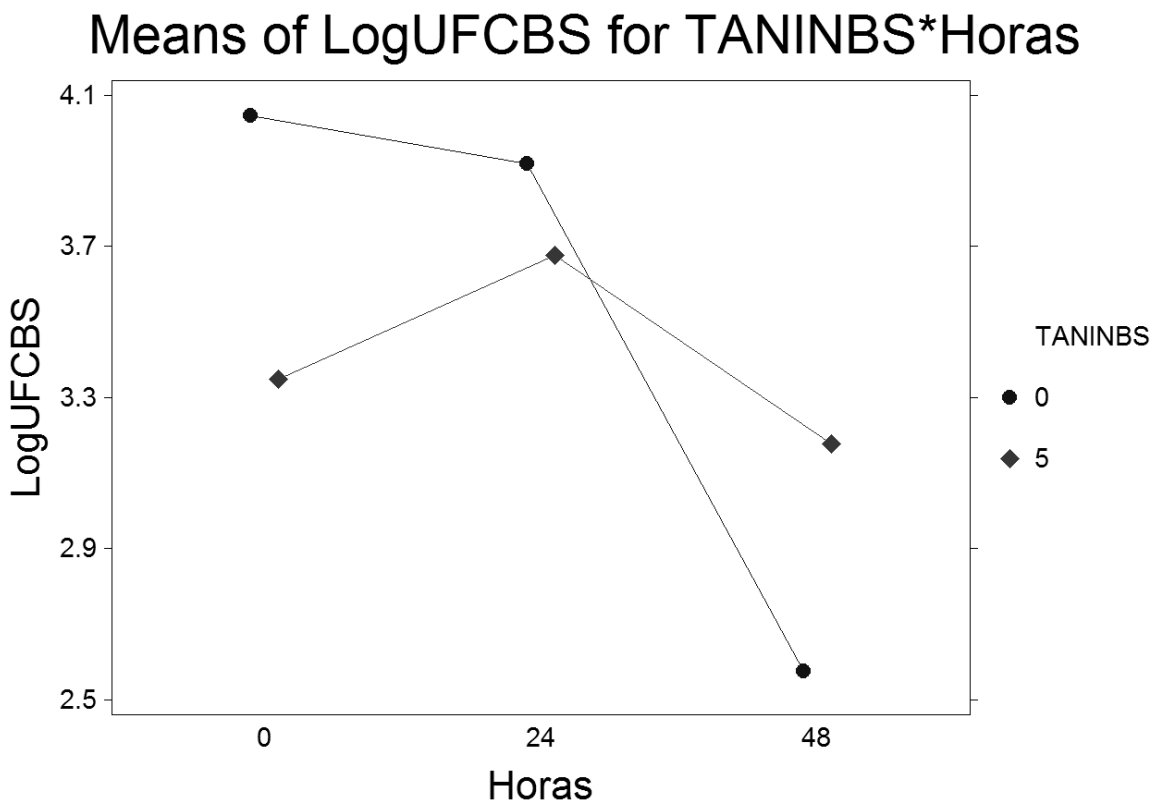

Figura 3. Interacción entre el nivel de taninos y el tiempo de preservación de las muestras en la presencia de *E. coli* en heces de bovino (Experimento 2).

VIII. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos sugieren que el tiempo de preservación de las muestras de heces en el laboratorio, puede afectar negativamente la cantidad de *E. coli*. Que la adición de un extracto de taninos condensados e hidrolizables, puede disminuir la presencia de *E. coli*, aunque la proporción de la disminución se puede considerar como baja.

IX. LITERATURA CITADA

Acha P. N., B. Szyfres. 2003. Zoonosis Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. Tercera edición, Vol. 1. Organización Panamericana de la Salud. Washington, DC.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis 15th ed. Association of Official Analytical Chemist. Washington, DC.

Barajas, R., B. J. Cervantes, M.A. Espino, A. Camacho, M. Verdugo, L.R. Flores, J.J. Lomeli, and J.A. Romo. 2012. Effect of tannins extract supplementation on feedlot performance and plasma urea nitrogen of yearling bulls fed dry-ground corn-based diets containing corn-DDG and cane molasses. J. Anim. Sci. Vol. 90 (Suppl. 3):600 (abstract)

Barajas, R., B.J. Cervantes, A. Camacho, M. Verdugo, M.A. Espino, L.R. Flores, J.A. Romo, E.A. Velazquez, and J.J. Lomeli. 2011. Influence of addition of tannins-extract in low concentration of dietary dry matter on feedlot-performance of bulls. J. Anim. Sci. Vol. 89 (E-Suppl.1): 615 (abstract).

Berry. E. D., J.L. Wells, S. L. Archibeque, C. L. Ferrel, H. C. Freetly, D.N. Miller. 2006. Influence of genotype and diet on steer performance, manure odor, and carriage of pathogenic and other fecal bacteria. II. Pathogenic and other fecal bacteria. J. Anim. Sci. 84:2523-2532.

Callaway T. R., M. A. Carr, T. S. Edrington, R. C. Anderson, and D. J. Nisbet. 2009. Review. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and Cattle. Mol. Biol. 11:67-80.

Callaway, T.R., R.C. Anderson, T.S. Edrington, K. J. Genovese, R.B. Harvey, T. L. Poole and D. J. Nisbet. 2004. Recent pre-harvest supplementation strategies to reduce carriage and shedding of zoonotic enteric bacterial pathogens in food animals. Anim. Health Res. Rev. 5:35-47.

Chung, K. T., Z. Lu, and M. W. Chou. 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and relate d compounds on the growth of intestinal bacteria. Food Chem. Toxicol. 36:1053-1060.

Consortium. 1988. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching. Consortium for Developing a Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching. Champaign, IL.

Dungan, R. S. 2010. Review. Fate and transport of bioaerosols associated with livestock operations and manures. J. Anim. Sci. 88: 3693-3706.

Frutos, P. G. Hervás, F. J. Giradles, and A. R. Mantecón, A.R. 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. Spanish Journal of Agricultural Research. 2:191-202.

García, E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. 3ª ed. Mexico DF.

Gyles, C. L. 2007. Shiga toxin-producing *Echerichia coli.* J. Anim. Sci. 85:45-62

Hicks, C.R. 1973. Fundamental Concepts in the Design of Experiments. Holt, Rinehart and Winston, New York.

INEGI, 2000. Anuario Estadístico del Estado de Sinaloa. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e informática. Aguascalientes, Ags. México.

INEGI, 2009. Anuario Estadístico del Estado de Sinaloa. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e informática. Aguascalientes, Ags. México.

Kamijo, M., T. Kanazawa, M. Funaki, M. Nishizawa, and T. Yamagishi. 2008. Effects of *Rosa rugosa* petals on intestinal bacteria. Biosci. Biotechnol Biochem. 72:773-777.

Lejeune, J.T. and A.N. Wetzel. 2007. Preharvest control of *Escherichia coli* O157 in cattle J. Anim. Sci. 85:E73-E80.

Min, B. R. and S. P. Hart. 2003. Tannins for suppression of internal parasites. J. Animal Sci. 81:102-109.

Montoya, A., J. J. Bermudez, and R. Barajas. 2013. Influence of tannins extract and organic chromium supplementation on feedlot performance. J. Anim. Sci. Vol. 91 (E-Suppl. 2):7-8.

Nogueira, S.C. 2011. Suplementación con mezcla comercial de taninos de quebracho y castaños en vacas lecheras. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina (fecha de consulta Octubre de 2012). http:/bibliotecadigital.uca.ar/respiratorio/tesis/suplementacion-mezcla-comercial-taninos-quebracho.pdf.

NRC. 2000. Nutrient Requeriments of Beef cattle. (7th Revised ed.) National academy Press. Washington DC.

Paddock, Z. D., C. E. Walker, J. S. Drouillard, and T.G. Nagaraja. 2011. Dietary monensin level, supplemental urea, and ractopamine on fecal shedding of Escherichia coli O157:H7 in fecal feedlot cattle. J. Anim. Sci. 89:2829-2835.

Reed, J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenoles in forage legumes. J. Anim. Sci. 73:1516–1528.

Rivera, C., A. Plascencia, N. Torrentera, and R.A. Zinn. 2013. Effect of level and source of supplemental tannin on growth-performance of Holstein steers during the late finishing phase. J. Anim. Sci. Vol. 91 (E-Suppl. 2):9.

Scalbert. A. 1991. Antimicrobial properties of Tannins. Phytochemistry. 30:3875-3883.

Setia, A., S. K. Bhandari, J. D. House, C. M. Nyachoti, and D. O. Krause. 2009. Development and *in vitro* evaluation of an *Escherichia coli* probiotic able to inhibit the growth of pathogenic *Escherichia coli* K88. J. Anim. Sci. 87:2005-2012.

Smith, A. H., J. A. Imlay, and R. Mackie. 2003. Increasing the oxidative Stress response allows *Escherichia* coli to overcome inhibitory effects of condensed tannins. Applied and Environmental Microbiology, 69:3406-3411.

Smith, H. A. and Roderick I. M. 2004. Effect of condensed tannins on bacterial diversity and metabolic activity in the rat gastrointestinal tract. Applied and Enviromental Microbiology, 70:1104-1115.

Statistix. 2007. Statistix User´s Manual, Release 9.0. Analytical Software, Tallahassee, FL.

Steel G. D. y H.J. Torrie. 1988. Bioestadística, Principios y Procedimientos (2 edición). Editorial McGraw-Hill. México, D.F.

Varel, V.H., D. N. Miller, E. D. Berry. 2006. Incorporation of thymol into corncob granules for reduction of odor and pathogens in feedlot cattle waste. J. Anim. Sci. 84:481-487.

Wayne, W. D. 2011. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud (4 edición). Editorial LIMUSA -Wiley & Sons Inc. Mexico, D.F.

Weinberg, Z., Y. Chen, P. Khanal, R. Pinto, V. Zakin and S. Sela. 2011. The effect of cattle manure cultivation on moisture content and survival of *Escherichia coli.* J. Anim. Sci. 89:874-881.

Woerner, D.R., J.R. Ransom, J. N. Sofos, B. A. Dewell, G.C. Smith, M.D. Salman, and K. E. Belk. 2006. Determining the prevalence of Escherichia coli O157: H7 in cattle and beef from the feedlot to the cooler. J. Food Prot. 69:2824-2827.