

Universidad Autónoma de Sinaloa

Colegio de Ciencias Agropecuarias

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



TESIS:

**EFEECTO DE LA ADICIÓN DE EXTRACTO DE TANINOS HIDROLIZABLES Y
CONDENSADOS EN LA CANTIDAD DE *Escherichia coli*, EN HECES DE
BOVINOS EN ENGORDA.**

Que para obtener el grado de Doctora en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

TERESA DE JESÚS HERAS SIERRA

DIRECTOR DE TESIS: DR. RUBÉN BARAJAS CRUZ

CO-DIRECTORA: DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO; A NOVIEMBRE DE 2017.

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

DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR (A) DR. RUBÉN BARAJAS CRUZ

CO-DIRECTOR (A) DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

ASESOR (A) DR. JAVIER ALONSO ROMO RUBIO

ASESOR (A) DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

CULIACÁN, SINALOA, A NOVIEMBRE DE 2017.



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

CORREO ELECTRÓNICO: tete852609@gmail.com
CURP: HEST850926MSLRRR01



UAS- Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir Igual, 4.0 Internacional.

DEDICATORIA

Este Trabajo lo dedico a mi Director de Tesis por ser un ejemplo de excelencia y dedicación hacia su profesión y por depositar en mí, su confianza, paciencia y dedicación todo este tiempo; por transmitirme conocimientos nuevos y porque ha estado ahí cada vez que lo necesité.

A mis asesores que me apoyaron en todo este tiempo inclusive desde mis estudios de maestría, así como sus enseñanzas para conmigo.

A mi esposo por su apoyo incondicional para que yo me desarrollara como profesional.

A mis padres por ser una de las principales razones de mis ganas para superarme como persona, por su apoyo y amor que me motiva día a día.

A mi hija, que es para mí, la mención honorífica que pudiera obtener de todo este esfuerzo y proceso de aprendizaje.

A aquellas personas que han sido participes en mi proceso de estudios y de los cuales he recibido apoyo moral y laboral.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios primero que nada por prestarme la vida para poder vivir todos y cada una de las vivencias que me ha permitido sentir.

A mi director de Tesis por darse el tiempo para atenderme y dedicar parte de su tiempo a enseñarme y formarme en estas áreas del conocimiento; así como también le agradezco la oportunidad que él me dio para que realizara mi estancia doctoral en IRSTEA.

A mi esposo y a mis padres por todo su apoyo y amor.

Al CONACYT por darme el apoyo económico para que yo pudiera realizar mis estudios.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por darme la oportunidad de estudiar y realizarme como profesional.

Al Dr. José Martínez por abrirme las puertas de IRSTEA y a Marie-Noelle su asistente que me apoyaron cuando estuve allá.

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
1.2.1 Generalidades de <i>Escherichia coli</i> .	2
1.2.2. Subespecies de <i>Escherichia coli</i> .	3
1.2.3. Métodos de control de <i>Escherichia coli</i>	4
1.2.4. Generalidades de los taninos	4
1.2.5. Taninos hidrolizables	5
1.2.6. Taninos condensados	6
1.2.7. Utilización <i>in vitro</i> de taninos y su efecto antimicrobiano	8
1.2.8. Utilización de taninos en la alimentación de los animales y su efecto antimicrobiano	8
1.3. CONCLUSIONES	9
1.4. LITERATURA CITADA	10
CAPÍTULO 2. Comportamiento de <i>E. coli</i> en heces de vacas, adicionadas con taninos hidrolizables	15
2.1. INTRODUCCIÓN	16
2.2. MATERIAL Y MÉTODOS	17
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
2.4. CONCLUSIONES	20
2.5. LITERATURA CITADA	21
CAPÍTULO 3. Evaluation of source and method of administration of tannins extract in the amount of <i>E. coli</i> , present in faeces of feedlot cattle	25

3.1. INTRODUCTION	26
3.2. MATERIALS AND METHODS	27
3.3. RESULTS AND DISCUSSION	31
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES GENERALES	45
CAPÍTULO 5. LITERATURA CITADA	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Comportamiento de <i>Escherichia coli</i> en heces de vacas en respuesta a la adición de dos niveles de taninos a tres valores de pH y el cultivo a 7 diferentes tiempos	19
2	Composition of diets used in Experiments 1 and 2	36
3	Influence of tannins extract addition to feedlot cattle faeces and exposition time to the environment on presence of <i>Escherichia coli</i> expressed as log ₁₀ CFU/g of faeces	38
4	Influence of tannins extract supplementation on presence of <i>Escherichia coli</i> in faeces of feedlot cattle (value are expressed as log ₁₀ CFU/g faeces)	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Estructura química del ácido gálico	5
2	Estructura química de la catequina	7
3	Interacción taninos hidrolizables × pH en el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en heces de vacas	20

RESUMEN

Efecto de la inclusión de extracto de taninos hidrolizables y condensados, en la cantidad de *Escherichia coli* presente en heces de bovinos

Teresa de Jesús Heras Sierra

Con el objetivo de evaluar el efecto de taninos hidrolizables (TH) y taninos condensados (TC), en el comportamiento de *Escherichia coli* en heces de los bovinos, se llevaron a cabo tres experimentos. En el experimento 1 se tomaron alícuotas de 100 g de heces y se asignaron de manera aleatoria a uno de dos niveles de TH (0 y 10%) y a uno de tres valores de pH en las heces (5.2, 6.5 y 8.3); cada uno de los tratamientos se cultivaron a: 0, 2, 6, 9, 15, 22 y 30 días. La adición de TH indujo un mayor crecimiento ($P < 0.01$) de *E. coli* comparadas con las que no se les agregaron TH (Log_{10} 5.071 vs. Log_{10} 4.401). Las heces con pH 6.5 tuvieron valores menores ($P < 0.01$) de *E. coli* (Log_{10} 4.525) vs. pH de 5.2 (Log_{10} 4.866) y pH 8.3 (Log_{10} 4.816). En los experimentos 2 y 3 se evaluó la influencia de los extractos de TH y TC, en la presencia de *E. coli* en heces de bovinos en engorda. Experimento 1; muestras de heces de 20 bovinos en finalización (415.63 ± 53.78 kg) fueron divididas en 3 sub-muestras y asignadas de manera aleatoria a tres tratamientos: 1) Heces sin la adición de extractos de taninos (Testigo), 2) Heces más la adición de 0.6% de TC y 3) Heces más la adición de 0.6% de TH; los tratamientos fueron expuestos al medio ambiente durante 0, 24, 48 o 72 horas y se cultivaron en un medio selectivo para *E. coli* (24 h; 37 °C); se contabilizaron las colonias y se transformaron a log_{10} de UFC/g y se analizaron por ANDEVA para un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3×4. Experimento 3. Treinta becerros de 230.78 ± 12.72 kg, se asignaron de manera aleatoria a tres tratamientos 1) Dieta de crecimiento sin la adición de extractos de taninos (Testigo), 2) Dieta de crecimiento más la adición de 0.6% de TC y 3) Dieta de crecimiento más la adición de 0.6% de TH. Los días 0 y 28, muestras de heces fueron cultivadas en un medio selectivo para *E. coli* (24 h; 37° C); las colonias de *E. coli* fueron contabilizadas y transformadas a log_{10} de UFC/g y los resultados fueron analizados por ANDEVA para un diseño completamente al azar. En el experimento 2, en las primeras 24 horas los valores de *E. coli* fueron similares entre los tratamientos con taninos ($P= 0.20$), sin embargo a partir de las 48 h de exposición las heces con TC tuvieron menos UFC/g de *E. coli* ($P= 0.08$), en relación con el tratamiento testigo. Los resultados del experimento 3 mostraron que la suplementación de extracto de taninos no tuvo efecto sobre la cantidad de *E. coli* en las heces de los bovinos. Los resultados de ambos experimentos sugieren que los taninos condensados disminuyen la cantidad de *E. coli* en heces de bovinos cuando estos son adicionados directamente en las heces, sin embargo cuando los taninos son adicionados a la dieta de los bovinos, estos no afectan la presencia de la bacteria en las heces.

Palabras clave: Extracto de taninos, *Escherichia coli*, heces, bovinos.

ABSTRACT

Effect of tannins inclusion of hydrolysable and condensed tannins extract in the amount *E.coli* in the faeces of bovines

Teresa de Jesús Heras Sierra

Three experiments were performed with the objective of evaluate the effect of hydrolysable (HT) and condensed tannins (CT), on behaviour of *Escherichia coli* in faeces of bovines. In the experiment 1, aliquots of 100 g of faeces were taken and randomly assigned to one of two hydrolysable tannins levels (0 and 10%), and one of three values of pH (5.2, 6.5 y 8.3); each treatment was cultivated during 0, 2, 6, 9, 15, 22, and 30 days. The HT of addition induced a higher growth ($P < 0.01$) of *E. coli* compared with those did not received HT (Log_{10} 5.071 vs. Log_{10} 4.401). faeces with pH value of 6.5 had lower values ($P < 0.01$) of *E. coli* (Log_{10} 4.525) vs. pH of 5.2 (Log_{10} 4.866), and pH of 8.3 (Log_{10} 4.816). In the experiment 2 and 3, were performed to evaluate the influence of hydrolysable and condensed tannins extract on the presence of *E. coli* in the faeces of feedlot cattle. Experiment 2, faecal samples from 20 finishing cattle (415.63 ± 53.78 kg) were divided in three sub-samples and randomly assigned to three treatments: 1) faeces without addition of tannins (Control), 2) Faeces plus addition of 0.6% of condensed tannins, and 3) faeces plus addition of 0.6% of hydrolysable tannins. All treatments were exposed to surrounding during 0, 24, 48 or 72 hours, and were cultivated in a selective medium for *E. coli* (24 h; 37°C), were accounted and transformed to log_{10} of CFU/g and analysed by ANDEVA for a completely randomised design with a 3x4 factorial arrangement. Experiments 3, thirty calves of 230.78 ± 12.72 kg, were randomised assigned to three treatments: 1) Growing diet without tannins addition (Control), 2) Growing diet plus 0.06% of CT addition, and 3) growing diet plus 0.6 of HT addition. Days 0 and 28 faecal samples were cultivated in a selective *E. coli* medium (24 h; 37 °C), the *E. coli* colonies were accounted and transformed to log_{10} of CFU/g, and results were analysed for analysed by ANDEVA for a completely randomised design. In experiment 2, during first 24 hours *E. coli* values were similar across treatments ($P = 0.20$), however from 48 h of environment exposition faeces with condensed tannins had lower CFU/g of *E. coli* ($P = 0.08$) in relationship to Control treatment. Results of experiment 3, shown that tannins extract supplementation had no effect on amount of *E. coli* in faeces of bovines. Results of both experiments suggest that condensed tannins diminishing the amount of *E. coli* in faeces of bovines when are directly added in the faeces, however when tannins are added in the diet, this did not affect the presence of the bacteria in the faeces.

Key words: Tannins extract, *Escherichia coli*, faeces, bovines.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. INTRODUCCIÓN

El estiércol de los bovinos representa una fuente importante de contaminación fecal al medio ambiente (Van Kessel *et al.*, 2007;), porque contiene gran cantidad de microorganismos patógenos, como *Escherichia coli*, representando el 95% de los coliformes presentes en las heces de los bovinos; siendo el principal indicador de contaminación fecal en el agua y los alimentos (Lejeune y Wetzel 2007; Dungan, 2010). Aunque esta bacteria es un habitante normal del intestino del bovino y de otros mamíferos, existen algunas cepas severamente patógenas que pueden provocar infecciones graves en los animales y las personas (Callaway *et al.*, 2009). Grandes cantidades de excremento procedente de la producción bovina se producen continuamente en el mundo (Weinberg *et al.*, 2011), estimándose una producción anual de 9×10^9 kg de estiércol de bovino (He *et al.*, 2016). Ante la importancia de reducir la contaminación causada por las excretas procedentes de los bovinos (Setia *et al.*, 2009), es necesario investigar alternativas para contribuir a mitigar la contaminación que estos provocan (Callaway *et al.*, 2009). Sustancias naturales como los taninos han sido reconocidos por su efecto antimicrobiano y pueden disminuir las poblaciones de microorganismos patógenos (Villalba *et al.*, 2010), estos compuestos se encuentran en plantas y se clasifican en taninos hidrolizables y taninos condensados (Frutos *et al.*, 2004). Investigaciones *in vitro* han encontrado a los taninos capaces de matar bacterias como *Escherichia coli* O157:H7 en el estiércol (Wells *et al.*, 2005; Castaño *et al.*, 2010). Kamijo *et al.* (2008), observaron una inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* al utilizar

taninos hidrolizables, en muestras de alimentos inoculadas con estas bacterias. La actividad antimicrobiana de los taninos se deriva de su capacidad para modular la estructura física de las membranas citoplasmáticas de las bacterias, lo que conduce a la muerte de las misma (Taylor *et al.*, 2005). Sin embargo no existe evidencia clara de la actividad de estos compuestos, utilizados directamente en las heces, así como su utilización en las dietas de los bovinos para disminuir el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*; por lo tanto el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de los taninos hidrolizables y condensados, sobre la presencia de *Escherichia coli* en heces de bovinos en engorda.

1.2. REVISIÓN DE LITERATURA

Los bovinos son los principales productores de estiércol en el mundo (Ingham *et al.*, 2004). La población mundial de bovinos estimada hasta el 2015 fue de 809, 372 000 millones de cabezas, con una producción anual de 9×10^9 kg de estiércol (He *et al.*, 2016). El estiércol de bovino es fuente importante de micro y macronutrientes para el suelo agrícola, por lo que su uso como fertilizante es un importante método de eliminación, sin embargo el estiércol es también una fuente de bacterias patógenas y su uso en tierras agrícolas incrementa la contaminación de vegetales y otros cultivos (Ingham *et al.*, 2004; Montes *et al.*, 2013). Además, el estiércol que no es utilizado como fertilizante agrícola, permanece en los sistemas de producción por largos periodos de tiempo, provocando diseminación de microorganismos patógenos hacia el aire, agua y personas (Dungan, 2010). Algunos de los patógenos más comunes en las heces son *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, y *Campilobacter* spp (Callaway *et al.*, 2009); se ha encontrado que *Escherichia coli* tiene la capacidad de sobrevivir por más de 90 días en los suelos que han sido fertilizados con estiércol, manteniendo así la capacidad para provocar enfermedades (Gyles, 2007). *Escherichia coli* en particular, se encuentra en altas concentraciones en el estiércol de bovino, estimándose un promedio de 10^5 a 10^7 UFC/g y cabe mencionar que esta bacteria se

utiliza como indicador de contaminación fecal en el agua y los alimentos; (Satoshi *et al.*, 2005; Gyles, 2007; Callaway *et al.*, 2009).

1.2.1 Generalidades de *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria anaerobia facultativa en forma de bacilo del grupo de bacterias Gram-negativas perteneciente a la familia de las enterobacterias, aislada comúnmente del tracto gastrointestinal de los mamíferos; es necesaria para el buen funcionamiento del proceso digestivo, además de producir la vitamina B y K (Wells *et al.*, 2014). Se caracteriza por ser una bacteria mesófila que se desarrolla a temperaturas de 35-43 °C, no forma esporas, es fermentadora de glucosa y lactosa con producción de gas (Farfán-García *et al.*, 2016). Su estructura antigénica consta de un antígeno capsular llamado antígeno “K”, antígeno somático (antígeno “O”) y un antígeno flagelar llamado antígeno “H”; además contiene antígenos menores como proteínas de membrana externa y fimbrias (Vidal *et al.*, 2007).

Esta bacteria es uno de los microorganismos más relevantes en el hombre, debido a que causa infecciones gastrointestinales, así como en otros sistemas (urinario, sanguíneo y nervioso) (Durso y Keen, 2007; Callaway *et al.*, 2009). La bacteria coloniza el tracto digestivo de los mamíferos a las pocas horas de nacer y se mantiene como un comensal en el organismo, donde su mayor concentración se puede observar en la parte final de intestino grueso con valores de 10^5 a 10^7 UFC por gramo de heces (Callaway *et al.*, 2009; Wells *et al.*, 2014) y es un indicador de contaminación fecal en el agua y los alimentos (Alonso *et al.*, 1999).

Los métodos para el aislamiento de *E. coli* consiste en coprocultivos, los cuales pueden ser realizados en medios de cultivos generales y selectivos (medios MacConkey y EMB), además existen las pruebas bioquímicas como la prueba de indol positiva que se utiliza como prueba confirmatoria (Farfán-García *et al.*, 2016); sin embargo existen otras técnicas que permiten identificar el material genético de la bacteria, factores de adhesión, entre otras características y dentro de estas pruebas están la tipificación serológica, técnicas de recombinación genética y técnica de reacción en cadena de la polimerasa (Vidal *et al.*, 2007).

La caracterización de serotipos es la primera técnica que ha permite diferenciar las cepas patógenas de las comensales (Wells *et al.*, 2014), se realiza mediante el

estudio de las propiedades de virulencia ligadas directamente a la capacidad patogénica de *E. coli*, como son los factores de adhesión, determinados por la presencia de fimbrias que proporcionan a la célula la capacidad de fijarse de forma específica a un receptor celular; dicha adhesión está determinada a su vez por una proteína de la membrana externa denominada intimina (Farfán-García *et al.*, 2016), que se adhiere primeramente a una célula intestinal blanco uniéndose a un receptor llamado receptor traslocador de intimina (TIR), situado en la membrana epitelial de la célula huésped (Vidal *et al.*, 2007).

1.2.2. Subespecies de *Escherichia coli*

Las cepas de *Escherichia coli* se clasifican según su potencial para causar infección y dentro de estas cepas se encuentran: *Escherichia coli* enteroagregativa, caracterizada por provocar un proceso de apilado de células de descamación en los sitios colonizados por la bacteria; por otro lado la cepa de *E. coli* difuso-adherente coloniza un área local de la mucosa intestinal (Callaway *et al.*, 2009); mientras estas dos cepas se caracterizan por transmitirse entre personas, existen tres cepas de *E. coli* que pueden causar infecciones gastrointestinales en el humano pero también pueden infectar animales. Estas cepas son *E. coli* enterotoxigénica, que produce una diarrea no invasiva con producción de toxinas que llegan al torrente sanguíneo y causan severos cuadros de infección; *E. coli* entero-patogénica que produce unión de células intestinales en el huésped provocando una diarrea difusa, y *Escherichia coli* entero-hemorrágica que se caracteriza por su capacidad de producir toxinas *Shiga* y causa síndrome urémico hemolítico, que puede desencadenar la muerte del huésped (Terrance *et al.*, 2013; Wells *et al.*, 2014). Cada año más de 73,000 personas en EUA, son afectadas por *E. coli* O157:H7, de las cuales mueren 60, estimándose un costo para su economía de más de 1 billón de dólares por año (Omisakin *et al.*, 2003; Callaway *et al.*, 2009).

Aunque *Escherichia coli* productora de toxina *Shiga* (STEC) se ha aislado en diferentes animales, la prevalencia es mucho más alta en los rumiantes (Hussein, 2007). Se ha informado que la prevalencia de STEC en las heces y pieles de ganado bovino es considerablemente alta. Elder *et al.* (2000) observaron una prevalencia del 0.7 a 27.3%; de STEC en bovinos pastoreados en praderas de riego, mientras que

en bovinos pastoreados en forrajes de temporal la prevalencia fue de 0.9 a 6.9%; estos hallazgos sugieren que existe un alto potencial para la infección y reinfección de ganado con *E. coli* O157:H7 (STEC) durante el pastoreo (Hussein, 2007). La prevalencia de *E. coli* O157: H7 varía de 4.6 a 55.9% en bovinos en engorda, mientras que en bovinos en pastoreo la prevalencia va de 4.7 a 44.8%, sin embargo en ambos casos la prevalencia aumenta al momento del sacrificio a una tasa del 70.1% (Hussein, 2007). Se ha observado que las pieles de los bovinos muestran altas concentraciones de STEC con una prevalencia del 60.6% (Elder *et al.*, 2000). Durante el proceso de separación de piel y vísceras de los bovinos sacrificados, la contaminación por esta bacteria hacia los productos cárnicos suele ser alta. Bollinger y Hussein (2005) observaron una prevalencia de 0.01 a 43.4% en las plantas de empacado, 0.1 a 54.2% en carne molida, 0.1 a 4.4% en salchichas, 1.1 a 36.9% en cortes de carne y 0.01 a 43.4% en canales enteras. Fuertes brotes de enfermedades de origen alimentario en humanos, por consumir carne molida contaminada y otros productos cárnicos con STEC, han sido reportadas (Hussein, 2007); por lo tanto cada año se incrementa el interés por mejorar la seguridad y calidad en la producción de carne de bovino (Riley *et al.*, 1983; Wells *et al.*, 2014).

1.2.3. Métodos de control de *Escherichia coli*

Diferentes métodos de control microbiológico, tienen como objetivo modificar el medio ambiente gastrointestinal en los bovinos, y controlar las poblaciones de ciertas bacterias, teniendo como estrategia el sustituir estos microorganismos por bacterias benéficas en el tracto gastrointestinal; y la mayoría de estos métodos incluye la manipulación de la dieta, con el uso de probióticos, prebióticos y agentes de exclusión competitiva (Fu *et al.*, 2003; Lejeune y Wetzel, 2007). Se ha utilizado por ejemplo el cambio drástico de la dieta en el ganado de engorda, sustituyendo las altas cantidades de grano utilizadas, por heno, sin embargo esto no suele ser viable desde el punto vista productivo (Wells *et al.*, 2005). Los taninos por su parte se han utilizado para inhibir bacterias como *E. coli* y *Salmonella spp* en el estiércol utilizado para fertilizar tierras agrícolas y en muestras (Terrance *et al.*, 2013); sin embargo no existe información sobre el uso de estos compuestos en la alimentación de los bovinos y su actividad antimicrobiana contra *E. coli* en las heces.

1.2.4. Generalidades de los Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos de origen natural que se encuentran en diversas partes de las plantas como las cortezas, hojas, frutos y tallos (Frutos *et al.*, 2004). Se caracterizan por su capacidad para formar complejos fuertes con macromoléculas (proteínas, celulosa y almidón, entre otros) y minerales, causando su precipitación (Rodríguez-Duran *et al.*, 2010). Estos compuestos poseen también propiedades antimicrobianas, antivirales, antiparasitarias y antioxidantes (Delgado *et al.*, 2012; Aguilar-Gálvez *et al.*, 2014). La capacidad antioxidante que contienen los taninos es caracterizada por actuar a diferentes niveles en la secuencia oxidativa de las moléculas lipídicas, disminuyendo la concentración de oxígeno, lo que previene la reacción de un radical hidroxilo, secuestrar metales y degradar los productos de oxidación primarios a compuestos estables (Fischer *et al.*, 2011).

Los taninos difieren en todos los vegetales, ya que tienen algunas diferencias en su composición y propiedades químicas según la especie botánica de la que proceden; su principal función química está representada por un grupo hidroxilo unido a un núcleo bencénico que posee un ácido débil y con base en su estructura química los taninos se clasifican en taninos condensados y taninos hidrolizables (Khanbabaei y Van Ree, 2001; Frutos *et al.*, 2004).

1.2.5. Taninos hidrolizables

Son polímeros de ácidos esterificados como el ácido gálico y elálgico formados por una molécula central de glucosa y un fenol, con un peso molecular que varía entre los 500 a 3000 Dalton (Min *et al.*, 2003). Éstos pueden subdividirse en galotaninos y elagitaninos (Daglia, 2012) y se derivan del metabolismo del ácido símico a partir de ácido gálico, el cual es seguido de varias esterificaciones y reacciones oxidativas (Haslam, 1996). Los galotaninos están formados por unidades galoil o di-galoil esterificadas a un núcleo de glucosa u otro alcohol polivalente. Por su parte los elagitaninos son ésteres del ácido hexahidroxifenico (HHDP); después de la hidrólisis de los elagitaninos, el grupo HHDP; se deshidrata y lactoniza espontáneamente formando ácido elálgico (Rodríguez- Durán *et al.*, 2010). Los taninos de castaño se

han clasificado dentro del grupo de elagitaninos por presentar mayoritariamente ésteres del ácido elágico. Su estructura básica, se presenta en la figura 1.

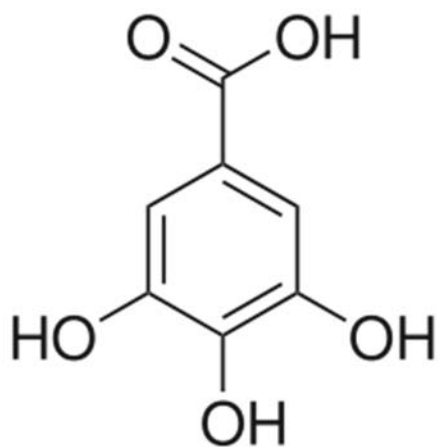


Figura 1. Estructura química del ácido gálico.

Los elagitaninos simples son ésteres del ácido hexahidroxidifenoico que evoluciona a la forma lactona o ácido elágico en solución acuosa. Los enlaces intramoleculares para formar el ácido hexahidroxidifenoico son normalmente C4-C6, C2-C4 y C1-C6. A diferencia de los taninos condensados, los taninos hidrolizables pueden presentar reacciones diversas en función del disolvente empleado, así por ejemplo, una disolución acuosa de tanino a 60 °C es suficiente para liberar ácido gálico y a 100 °C los elagitaninos se pueden descomponer dando lugar al ácido elágico (Nishimuta *et al.*, 1974).

La actividad de los taninos hidrolizables es conocida; por ejemplo, los elagitaninos del género *Rubus* y *Fragaria* (Raspberry, Cloudberry y Strawberry) muestran inhibición del crecimiento de bacterias intestinales Gram negativas como *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Helicobacter*, *E. coli*, *Clostridium*, *Campilobacter* y *Bacillus* (Daglia, 2012). Kim *et al.* (2009), observaron que los taninos hidrolizables que contiene la uva (*Vitis vinífera* L.) muestran actividad bactericida contra bacterias Gram negativas y Gram positivas. La actividad de los taninos hidrolizables puede atribuirse a la fuerte afinidad que estos compuestos tienen con el hierro, lo que a su vez se relaciona con la inactivación de proteínas ligadas a la membrana; ya que el hierro es un mineral

esencial para la multiplicación de las bacterias, sobre todo para *E. coli* y, que al formar complejos con los taninos, la bacteria queda desprovista de dicho mineral por lo que se da la muerte celular por falta de nutrientes (Khanbabaee y Ree, 2001).

1.2.6. Taninos condensados

También llamados proantocianidinas oligoméricas y poliméricas, que consisten en unidades de flavan-3-ol (catequina) o flavan-3-4-ol unidas entre sí por enlaces C-C; también existen taninos más complejos que se constituyen por una unidad de galotanino o elagitanino y una de catequina (Scalbert, 1991; Belmares *et al.*, 2004); El peso molecular de los taninos condensados varía entre los 3000 y los 20 000 Da.

Las estructuras básicas que componen los taninos condensados están unidas unas con otras mediante enlaces C4-C6 y C4-C8 (Jones *et al.*, 1994). Algunos autores mencionan como mecanismo de condensación flavonoide, en medio ligeramente ácido, la protonación del hidroxilo en la posición 4 del compuesto flavan-3,4-diol, con la pérdida inmediata de una molécula de agua y la posterior formación del carbocatión en este sitio, al cual se unen las unidades flavonoides por los centros nucleofílicos disponibles 6 y 8 (Can *et al.*, 2013). De acuerdo a las estructuras básicas, encontradas habitualmente en los extracto de taninos que difieren en el grupo hidroxilo que presentan en el anillo A y B, se pueden clasificar de la siguiente manera:

Profisetidina, compuesta de resorcinol como anillo A y catecol como anillo B.

Prorobinetidina, con resorcinol en el anillo A y en el B pirogalol.

Procianidina, compuesto por fluoroglucinol y catecol en los anillos A y B respectivamente.

Prodelfinidina, compuesto por fluoroglucinol en el anillo A y pirogalol en el B.

Estas diferencias en la estructura de los taninos, les confieren comportamientos característicos bien definidos. Así, por ejemplo se ha comprobado que los taninos con estructuras profisetindina y prorobinetidina son menos reactivos que los procianidina y prodelfinidina (Can *et al.*, 2013).

El extracto de quebracho presenta unidades principalmente de profisetidina/prorobitenidina con elevada proporción de anillos B tipo catecol.

Algunos autores sugieren que estos compuestos modulan la estructura física de las

membranas celulares además de generar peróxido de hidrógeno sobre la superficie de las mismas, causándoles la muerte celular (Taylor *et al.*, 2005). Durante años los taninos se han utilizado para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, ya que poseen propiedades antimicrobianas y dichas propiedades se deben a su capacidad para alterar la membrana citoplasmática de las bacterias, reduciendo la tolerancia de la bacteria y provocar la muerte de la misma (Lacombe *et al.*, 2010). En la figura 2, se presenta la estructura básica de un tanino condensado.

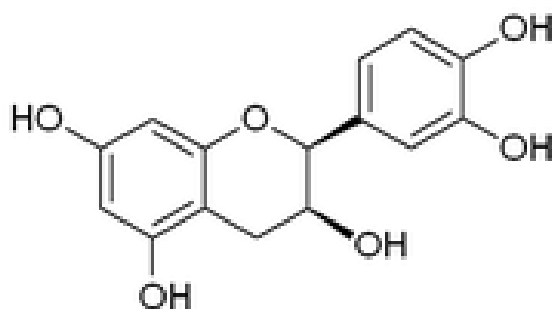


Figura. 2. Estructura química de la catequina.

1.2.7. Utilización *in vitro* de taninos y su efecto antimicrobiano

Desde tiempos ancestrales los taninos han sido utilizados en la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas (Anesini y Pérez, 1993). Algunos estudios reportan el uso *in vitro* de los taninos por poseer actividad bacteriostática y bactericida contra diversas bacterias como *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella thyphimurium* (Tian *et al.*, 2009). Por ejemplo, la cáscara de la granada, que es rica en taninos hidrolizables, tiene actividad bactericida ya que inhibe el crecimiento de *S. aureus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* (Wu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014). En este sentido Pinheiro *et al.* (2014), encontraron que los taninos condensados, a partir de *Acacia karroo*, mostraban un efecto bacteriostático contra *Listeria monocytogenes*. Se ha observado que las proantocianidinas o taninos condensados derivados de gran variedad de bayas o frutos, inhiben el crecimiento de bacterias patógenas como *Escherichia coli* uropatógena, *S. mutans* y *S. aureus*, incluyendo algunas de estas

bacterias, cepas que presentan resistencia a algunos antibióticos (Coté *et al.*, 2010). Los mecanismos de acción de las proantocianidinas se encuentran relacionados con la desestabilización de la membrana citoplásmica, la permeabilización de la membrana celular, inhibición de las enzimas microbianas y por la acción directa en el metabolismo microbiano, que causa la privación de los sustratos que la bacteria requiere para su crecimiento, principalmente hierro y zinc (Daglia, 2012). Fuentes *et al.* (2006), observaron una desestabilización del ADN en las células bacterianas de *E. coli*, al utilizar taninos condensados a partir de *Pinus caribaea*.

1.2.8. Efecto de taninos en la alimentación de los animales y su efecto antimicrobiano

En los animales también se han estudiado las propiedades que estos compuestos tienen. Min *et al.* (2007), observaron una disminución de *Escherichia coli* a nivel ruminal, al utilizar taninos hidrolizables de Castaño a razón de 15 g por animal en las dietas de bovinos canulados intrarrumilamente. Algunos ácidos fenólicos como el ácido gálico, caféico y ácido felúrico tienen actividad antibacteriana contra Gram positivas como *S. aureus* y *Listeria monocytogenes* y bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; los cuales muestran ser más eficientes que los antibióticos convencionales (Savendra *et al.*, 2010; Fuentes *et al.*, 2013). Wells *et al.* (2005) observaron una disminución de bacterias como *E. coli* en las heces de bovinos alimentados con ácidos fenólicos.

La actividad antimicrobiana *in vitro* de los taninos se ha documentado ampliamente, este efecto se atribuye a la acción directa en los microorganismos (Cruz-Gálvez *et al.*, 2013), sin embargo sería de interés investigar su acción en experimento *in vivo* y por lo tanto su relevancia en relación a tratar infecciones en humanos y animales (Khanbabaee y Ree, 2001; Akhtar *et al.*, 2015). debido a que existe poca información acerca del uso de taninos y su efecto antimicrobiano en investigaciones *in vivo*, por lo que este trabajo estuvo dirigido a investigar el efecto de extractos de taninos condensados de quebracho y taninos hidrolizables de castaño, en el comportamiento de *Escherichia coli* en heces de bovinos en engorda.

1.3. CONCLUSIONES

Los taninos muestran actividad antimicrobiana, sin embargo factores como el tipo de taninos, su estructura química y la bacteria a estudiar, son de importancia y determinan el grado de actividad que estos compuestos pueden presentar.

1.4. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Gálvez, A., G. Noratto, F. Chambi, F. Debaste, D. Campos. 2014. Potential tara (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins and hydrolysates as natural antibacterial compounds. *Food Chem.* (156): 301-304.
- Akhtar, S., T. Ismail, D. Fraternali, P. Sestile. 2015. Pomegranate peel and peel extracts: chemistry and food features. *Food Chemistry* (174): 417-425.
- Alonso, J. L., A. Soriano, O. Carbajo, I. Amoros, H. Garelick. 1999. *Appl. Environ. Microbiol* (65): 3746-3749.
- Anesini, C., C. Pérez. 1993. Screening of plants used in Argentine folk medicine and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* (39): 119-128.
- Belmares, R., J.C. Contreras-Esquivel, R. Rodríguez-Herrera A. Ramírez Coronel, C. N. Aguilar. 2004. Microbial production of tannase an enzyme with potential use in food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 37 (8): 857-864.
- Bollinger, L. M., H. S. Hussein, T. Sakuma, M. R. Hall, and E. R. Atwill. 2005. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from beef cattle. Abstract # Z-024 in Abstracts on the 105th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol (CD Edition) Am. Soc. Microbiol., Washington, DC.
- Callaway, T. R., M. A. Carr, T. S. Edrington, R. C. Anderson, D. J. Nisbet. 2009. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle. *Mol. Biol.* (11): 67-80.
- Can, M., E. Bulut, A. Ornek, M. Ozacar. 2013. Synthesis and characterization of valonea tannin resin and its interaction with palladium (II) rhodium (III) chlorine complexes. *Chem. Eng. J.* (221): 146-158.
- Castaño, P. H. I., G. G. Ciro, M. J. E., Zapata, R. S. L. Jiménez. 2010. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Vitae Revista de la Facultad de Química Farmacéutica.* 17 (2):149-154.
- Coté, J., S. Calliet G. Doyon, J. F. Silvain, M. Lacroix, 2010. Bioactive compounds in cranberries and their biological properties. *Crit Rev Food Sci. Nutr.* (50):666-679.
- Cruz-Gálvez, A. M., C. A. Gómez-Aldapa, J. R. Villagómez-Ibarra, N. Echavarría-Hernández, J. Rodríguez-Baños, E. Rangel-Vargas, J. Castro-rojas. 2013. Antibacterial effect against foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in central Mexico: Studies *in vitro* and in raw beef. *Food Control* (32): 289-295.
- Daglia, M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Sci. Direct.* (23):174-181.

- Delgado, A. J., E. G. Samino, E. V. Sánchez, D. G. Gómez. 2012. *In vitro* estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity aqueous extracts of grape-seeds (*Vitis vinifera* L.) Food Control (24): 136-141.
- Dungan, R. S. 2010. Fate and transport of bioaerosols associated with livestock operations and manures. J. Anim. Sci. (88): 3693-3706.
- Durso, L. M. and KJ. E. Keen. 2007. Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 and non-Shiga-toxigenic *E. coli* O157 respond differently to culture and isolation from naturally contaminated bovine faeces. J. Appl. Microbiol. (103): 2457-2464.
- Elder, R. O., J. E. Keen, G. R. Siragusa, G. A. Barcoy-Gallagher, M. Koohmaraie, and W. W. Laegreid. 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides and carcasses of beef cattle during processing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:2999-3003.
- Farfán-jarcia, A. E., S. C. Ariza-Rojas, A. A. Vargas-Cardenas, L. V. Vargas-Remolina. 2016. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. Rev. Chilena Infectol (33): 438-450.
- Fischer, U. A., R. Carle, D. R. Kammerer. 2011. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.), peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. Food Chem. (127): 807-821.
- Frutos, P., G. Hervás, F. J. Giraldez, A. R. Mantecón. 2004. Tannins and ruminant nutrition. Span. J. Agric. Res. (2):191-202.
- Fu, C. J., J. H. Porter, E. E. D. Felton, J. W. Lemhkuhler, M. S. Kerley. 2003. Pre-harvest factors influencing the acid resistance of *E. coli* and *E. coli* O157: H7. J. Anim. Sci. (81): 1080-1087.
- Fuentes, A. R., M R. Talavera, J. N. Vázquez, E. V. Soriano, A. C. Gutiérrez. 2013. Presencia de integrones clase I en *Escherichia coli* aislada de productos cárnicos en plantas Tipo Inspección Federal (TIF) en el Estado de México. Vet. Méx. (44): 26-30.
- Fuentes, J. L., M. Vernhe, E. B. Cuétara, A. Sánchez-Lamar, J. L. Snatana, M. Llagostera. 2006. Tannins from barks of *Pinus caribaea*, protect *Escherichia coli* cells against DNA damage induced by γ - rays. Fitoterapia (77): 116-120.
- Gyles, C. L. 2007. Shiga toxin-producing *E. coli*. J. Anim. Sci. (85):45-62.
- Haslam, E. 1996. Natural polyphenols (vegetables tannins), as drugs: possible modes of action. J. Nat. prod. (59): 205-215.
- He, Z., P. H. Pagliari, H. M. Waldrip. 2016. Applied and Environmental Chemistry of Animal Manure: a review. Pedosphere (26): 779-816.
- Hussein, H. S. 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. J. Anim. Sci. (85): 63-72.
- Ingham, S. C., J. A. Losinski, M. P. Andrews, J. E. Breuer, J. R. Breuer, T. M. Wood, T. H. Wright. 2004. *Escherichia coli* contamination of vegetables grown in soils fertilized with noncomposted bovine manure: Garden-scale studies. Appl. Environ. Microbiol. (70): 6420-6427.

- Jones, J. A., T. A. McAllister, A. D. Muir, J. K. Cheng. 1994. Effects of Sainfoin (*Onobrychis Viciifolia* Scop.) Condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied and environmental microbiology*. Apr. (60): 1374-1378.
- 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.
- Khanbabaee, K. and T. V. Ree. 2001. Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* (18): 641-649.
- Kim, T. J., J. L. Silva, Y. S. Yung. 2009. Antibacterial activity of fresh and processed red muscadine juice and the role of their polar compounds on *Escherichia coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol.* (107): 533-539.
- Lacombe, A., V. C. H. Wu, S. Tyler, K. Edwards. 2010. Antimicrobial action of the American cranberry constituents, phenolics anthocyanins and organic acids against *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* (139):102-107.
- Lejeune, J. T. and Wetzel, A. N. 2007. Preharvest control of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J. Anim. Sci.* (85): 73-80.
- Li, G., X. Yunfeng, X. Wang Z. Baigang, C. Shi, W. Zhang, W. and X. Xia. 2014. Tannin-rich fraction from pomegranate rind damages membrane of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.* 11, 313-319.
- Min, B. R. and Hart S. P. 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *J. Anim. Sci.* (81): 102-109.
- Min, B. R., Pinchak W. E., Anderson R. C. and Callaway T. R. 2007. Effect of tannins on of the *in vitro* growth *Escherichia coli* O157:H7 and *in vivo* growth of generic *Escherichia coli* excreted from steers. *J. Food Protect.* (70):543-550.
- Montes, F., R. Meinen, C. Dell, A. Rotz, A. N. Hristov, J. Oh, G. waghorn, P. J. Gerber, B. Henderson, H. P. S. Pakkar and J. Dijkstra. 2013. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: II a review of manure management mitigation options. *J. Anim. Sci.* (91): 5070-5094.
- Nishimuta, J. F., D. G. Ely and J. A. Boling. 1974. Ruminal bypass of dietary soybean protein treated with heat formalin and tannic acid. *J. Anim. Sci.* (39): 952-957.
- Omisakin, F., M. MacRae, I.D. Ogden, N. J. Strachan. 2003. Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. *Appl. Environ. Microbiol.* (69):2444-2447.
- Pinheiro, P. A. C., S. H. Silvestre, S. S. Mello, B. P. L. Manique, V. C. R. Werneck, M. Maraschin, F. S. R. Salvador and J. M. Block. 2014. Effects of extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extract of pecan nut (*Carya illinoensis*). *Ind. Crops Prod.* (52):552-561.
- Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Well, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargret, P. A. Blake, and M. L.

- Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. (308): 681-685.
- Rodríguez-Duran, L. V., B. Valdivia-Urdiales, J. C. Contreras-Esquivel, R. Rodríguez-Herrera, C. N. Aguilar. 2010. Química y Biotecnología de la Tanasa (2): 1-10.
- Satoshi, I., W. B. Ksoll., R. E. Hicks., M. J. Sadowsky. 2005. Presence and Growth of Naturalized *Escherichia coli* in Temperate Soils from Lake Superior Watersheds. Appl. Environ. Microbiol. (72): 612–621.
- Savedra, M.J., A. Borges, C. Dias, A. Aires, R. N. Bennett, E. S. Rosa, M. Simoes. 2010. Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. Med. Chem. (6): 174-183.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. (30). 12:3375-3883.
- Setia, A., S. K. Bhandari, J. D. House, C. M. Nyachoti, 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.
- Taylor, P. A., J. M. T. Hamilton-Miller, P. D. Stapleton. 2005. Antimicrobial properties of green tea catechins. Food Sci. Technol. bull. (2): 71-81.
- Terrance, M. A., R. Ahmed, M. Chase-Topping, N. Kalchayanand, J. W. Schmidt, J. L. Bono. 2013. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from supershedding cattle. Appl. Environ. Microbiol. (79): 4294-4303.
- Tian, F., B. Li, B. Ji, G. Zhang, and Y. Luo. 2009. Identification and structure-activity relationship of gallotannins separated from *galla chinensis*. LWT-Food Sci. and Technol. 42(7) 1289-1295.
- Van Kessel, J. S., Y. A. Shelton, J. S. Karns. 2007. Survival of *Escherichia coli* in cowpats in pasture and in laboratory conditions. J. Appl. Microbiol. (103): 1122-1127.
- Vidal, J. E., A. Canizález-Román, J. Gutiérrez-Jiménez, F. Navarro-García. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Salud Pública México (49):376-386.
- Villalba, J. J., F. D. Provenza, J. O. Hall, L. D. Lisonbee. 2010. Selection of tannins by sheep in response to gastrointestinal nematode infection. J. Anim. Sci. (88): 2189-2198.
- Weinberg, Z., Y. Chen, P. Khanal, R. Pinto V. Zakin S. Sela. 2011. The effect of cattle manure cultivation on moisture content and survival of *Escherichia coli*. J. Anim. Sci. (89): 874-881.
- Wells, J. E., E. D. Berry, V. H. Varel, 2005. Effects of common forage phenolic acids on *Escherichia coli* O157:H7 viability in bovine feces. Appl. Environ. Microbiol (72): 7974–7979.

- Wells, J. E., M. Kim, J. L. Bono, L. A. Kuehn, A. K. Benson. 2014. *Escherichia coli* O157:H7, diet and fecal microbiome in beef cattle. *J. Anim. Sci.* (92): 1345-1355.
- Wu, V. C.H., X. Qiu, B. G. de los Reyes, C-S Lin, Y. Pan. 2009. Application of cranberry concentrate (*Vaccinium macrocarpon*) to control *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and its antimicrobial mechanism related to the down regulated *slp*, *hdeA*, and *cfa*. *Food Microbiol.* (26):32-38.

CAPÍTULO 2. COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* EN HECES DE VACAS, ADICIONADAS CON TANINOS HIDROLIZABLES

Este capítulo se publicó en la Revista Abanico Veterinario Vol. 6 (3) 47-54. Diciembre de 2016.

2.1. RESUMEN

Para evaluar el comportamiento de *E. coli* en heces de vacas lecheras adicionadas con taninos hidrolizables, se llevó a cabo un experimento en el que alícuotas de 100 g de heces fueron asignadas de manera aleatoria a uno de dos niveles de taninos hidrolizables (0 y 10%), uno de tres valores de pH: 5.2, 6.5 y 8.3 y cultivados a: 0, 2, 6, 9, 15, 22 y 30 días una vez adicionados los taninos. Las heces adicionadas con 10% de TH presentaron mayor crecimiento ($P < 0.01$) de *E. coli* comparadas con las que no se les agregó TH (Log_{10} 5.071 vs. Log_{10} 4.401). Las heces con pH 6.5 tuvieron valores menores ($P < 0.01$) de *E. coli* (Log_{10} 4.525) vs. pH de 5.2 (Log_{10} 4.866) y pH 8.3 (Log_{10} 4.816). En todos los casos el crecimiento de *E. coli* disminuyó ($P < 0.01$) conforme se incrementaron los días (Log_{10} = 5.51 el día 0; Log_{10} = 3.36 en el día 30). Los resultados sugieren que los TH no inhiben el crecimiento de *E. coli* en las heces de las vacas, sin embargo a valores de pH cercanos a la neutralidad el crecimiento de *E. coli* en heces disminuye.

Palabras clave: *Escherichia coli*, taninos hidrolizables, vacas, pH.

ABSTRACT

To evaluate behavior of *E. coli* in feces of dairy cows added with hydrolysable tannins, an experiment was conducted, in which aliquots of 100 g were randomly assigned to two hydrolysable tannins levels (0 or 10%), three values of pH 5.2, 6.5 and 8.3, and cultured at 0, 2, 6, 9, 15, 22, and 30 days after tannins addition. Feces added with HT 10% shown the highest *E. coli* growth ($P < 0.01$) compared those did no received HT (Log_{10} 5.071 vs. Log_{10} 4.401). Feces with 6.5 pH value had lower

values ($P < 0.01$) of *E. coli* (Log_{10} 4.525) vs. pH 5.2 (Log_{10} 4.866), and pH 8.3 (Log_{10} 4.816). In all cases the *E. coli* growth diminished ($P < 0.01$) as increased days number (Log_{10} = 5.51 day 0; Log_{10} = 3.36 at day 30). The results suggest that HT did not inhibit *E. coli* growth in feces of cows, however, at pH values close to neutrality the *E. coli* growth decreases.

Key words: *Escherichia coli*, hydrolysable tannins, cows, pH

2.2. INTRODUCCIÓN

En el mundo se generan grandes cantidades de excremento procedente de la producción intensiva de los bovinos, en Estados Unidos se estima en más de 100 billones de kilogramos al día (Weinberg *et al.*; 2011), y en Europa se calcula en 200 millones de toneladas por año (Mawdsley *et al.*; 1995). El estiércol del ganado bovino contiene grandes cantidades de microorganismos potencialmente patógenos como bacterias, virus y parásitos (Dungan, 2010). Aunque *Escherichia coli* es un habitante normal del tracto gastrointestinal del bovino, esta bacteria es un indicador de contaminación fecal en el agua y los alimentos; algunas de sus cepas como la *E. coli* entero-hemorrágica son patógenas y causa severas infecciones en las personas con cuadros epidémicos caracterizados por diarreas hemorrágicas, colitis y síndrome urémico hemolítico (Asakura *et al.*, 2008; Callaway *et al.*, 2009). Ante la importancia de reducir la contaminación que causan las excretas procedentes de los bovinos (Callaway *et al.*, 2009; Setia *et al.*, 2009), es necesario investigar sustancias naturales como los taninos que se han reconocido por su efecto benéfico sobre la salud de los animales y personas (Kumar *et al.*, 2005; Villalba *et al.*, 2010), estos compuestos son encontrados en plantas y se clasifican en hidrolizables y condensados (Frutos *et al.*; 2004). Existe evidencia que sugiere a los taninos como agentes antimicrobianos por su capacidad de modular la estructura física de las membranas celulares de los microorganismos como las bacterias lo que puede conducir a la muerte de la misma (Taylor *et al.*; 2005). Algunas investigaciones *in vitro* sugieren que los taninos pueden matar bacterias como *Escherichia coli* O157:H7 en el estiércol (Wells *et al.*, 2005; Gutiérrez-Bañuelos *et al.*, 2011). Sin embargo los resultados no son concluyentes, debido a que en otros trabajos no se ha observado evidencia de actividad de los taninos en el crecimiento de *E. coli* (Pinheiro *et al.*;

2014). Por lo tanto el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del 10% de taninos hidrolizables en el crecimiento de *E. coli* en heces de vacas lecheras.

2.3. MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología del Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour L'environnement et L'agriculture (IRSTEA), Rennes, Francia.

Recolección de muestras

Las muestras de heces fueron obtenidas a partir de pilas de almacenamiento de estiércol de vacas en producción de leche en un establo ubicado en Gevezé Bretaña, Francia; para las muestras de heces se utilizaron dos contenedores de plástico estéril con capacidad para 15 litros. Cada contenedor fue debidamente identificado y transportado al IRSTEA para su almacenamiento a 4 °C. De cada uno de los contenedores se tomó una muestra compuesta (250 g) que se utilizó para determinar el contenido de materia seca de las heces (AOAC, 1990).

Diseño Experimental y Tratamientos

En un experimento completamente al azar con arreglo factorial 2 x 3 x 7, alícuotas de 100 g de heces (base húmeda) fueron asignadas de manera aleatoria a recibir la combinación de uno de dos niveles de taninos hidrolizables: 0 y 10% en base seca; con uno de tres valores de pH: 5.2, 6.5 y 8.3 y cultivados a siete diferentes tiempos de duración: 0, 2, 6, 9, 15, 22 y 30 días después de haber adicionado los taninos. Los taninos hidrolizables fueron adicionados en forma de extracto de taninos de castaño (*Castanea sativa*) NutriP (Silvateam; San Michele Mondavi, Italy). Los distintos valores de pH se obtuvieron por la adición de cantidades crecientes de ácido fórmico al 80% a las heces cuyo pH original fue de 8.3 tal cual fue obtenido en la granja. En cajas de Petri, se realizaron cultivos bacterianos de *E. coli* utilizando medio de cultivo TBX (Tryptona, Bilis-X Glucoronido); se sembraron 1 mL de cada triplicado por tratamiento con el método de extensión en placa y todos los cultivos se incubaron a 44 °C por 24 horas (Cruz *et al*; 2013).

Análisis estadístico

Todos los tratamientos se realizaron por triplicados. La población bacteriana se reportó como Log_{10} de UFC/g para normalizar los datos y se les aplicó un análisis de varianza para un diseño completamente al azar con arreglo factorial $2 \times 3 \times 7$ (Hicks, 1973). La separación de medias se llevó a cabo por la prueba de diferencia mínima significativa (Berry *et al.*, 2006; Varel *et al.*, 2006). Todos los cálculos estadísticos fueron realizados con la Versión 9 del paquete computacional Statistix 2007.

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El comportamiento de *Escherichia coli* en heces de vacas en respuesta a la adición de dos niveles de taninos, a tres valores de pH y el cultivo a 7 diferentes tiempos, se muestra en el Cuadro 1. En general, en las heces a las que se les adicionó 10% de TH se observó un mayor crecimiento ($P < 0.01$) de *E. coli* en comparación con las que no se les agregaron TH (Log_{10} 5.071 vs. Log_{10} 4.401). Si bien se sabe que los taninos tiene actividad antibacteriana, este efecto puede variar dependiendo del tipo de taninos y la bacteria estudiada ya que existe evidencia científica que encuentran a estos compuestos, ser más activos contra bacterias Gram positivas debido a la composición menos compleja de la membrana celular que posee dicho grupo de bacterias (Shen *et al.*; 2014). En este sentido Pinheiro *et al.* (2014) observaron que compuestos como el ácido gálico y ácido elágico inhibieron el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, en tanto que ese mismo efecto no se observó en bacterias como *E. coli* y hongos como *A. niger*. En los resultados obtenidos de esta investigación las heces con pH 6.5 se apreció un menor crecimiento ($P < 0.01$) de *E. coli* (Log_{10} 4.525) en comparación con los tratamientos con pH de 5.2 (Log_{10} 4.866) y 8.3 (Log_{10} 4.816). En condiciones de pH cercanos a la neutralidad, los taninos pueden formar complejos con las proteínas en el exterior de la membrana celular de las bacterias anteponiendo los sistemas para reducir la tolerancia de la bacteria en un ambiente osmótico bajo que causa la muerte de ésta (Frutos *et al.*, 2004), sin embargo las bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* poseen flujos de salida que actúan como primera defensa para excluir de forma selectiva algunos compuestos fenólicos para protegerse a sí misma de la toxicidad de estos compuestos (Shen *et al.*, 2014). Por otro lado algunos microorganismos

como bacterias y hongos producen enzimas llamadas tanasas las cuales degradan a los taninos por lo que estos compuestos les sirven como fuente de carbono y les permite seguir multiplicándose (Pinheiro *et al.*, 2014; Goel *et al.*, 2011). Se ha reportado que algunas bacterias como *E. faecalis* y hongos como *Aspergillus niger* aumentaron su crecimiento cuando se adicionó ácido tánico en muestras de heces de cabras (Goel *et al.*; 2011). Además valores de pH en rangos de pH de 5 a 7, aumenta la actividad de estas enzimas ya que algunas investigaciones mencionan que las tanasas mantiene una actividad óptima a pH de 6, lo que coincide con los resultados de este experimento.

Se encontró una interacción Taninos x pH ($P < 0.01$). En la Figura 3 se presenta gráficamente la interacción TH x pH en el crecimiento de *Escherichia coli* en heces de vacas. Se observaron interacciones ($P < 0.01$), Taninos x Día, y Taninos x pH x Día; el crecimiento de *E. coli* disminuyó ($P < 0.01$) a medida que se incrementó la cantidad de días desde valores de $\text{Log}_{10} = 5.51$ el tiempo 0, hasta valores de $\text{Log}_{10} = 3.36$ en el día 30; lo que puede explicarse debido al crecimiento exponencial normal que presentan las bacterias (Cruz *et al.*; 2013).

Cuadro 1. Comportamiento de *Escherichia coli* en heces de vacas en respuesta a la adición de dos niveles de tainos a tres valores de pH y el cultivo a 7 diferentes tiempos.

Extracto de taninos	0%			10%			EEM
	8.3	6.5	5.2	8.3	6.5	5.2	
Días							
0	5.877 ^{abc}	5.474 ^{bcde}	5.435 ^{cdef}	5.944 ^{ab}	5.431 ^{cdef}	4.910 ^{ghi}	0.088
2	5.922 ^{ab}	5.435 ^{cdef}	5.882 ^{abc}	6.234 ^a	5.432 ^{cdef}	4.959 ^{fghi}	0.102
6	4.907 ^{ghi}	4.089 ^{klm}	5.065 ^{defgh}	6.263 ^a	6.261 ^a	4.967 ^{fghi}	0.199
9	4.607 ^{hij}	3.819 ^{lm}	4.766 ^{ghi}	5.520 ^{bcd}	6.076 ^a	4.851 ^{ghi}	0.175

15	5.040 ^{ghij}	2.932 ^{op}	4.279 ^{ikl}	4.642 ^{ghij}	3.613 ^{mn}	5.117 ^{mn}	0.191
22	3.267 ^{no}	3.054 ^{op}	4.245 ^{ikl}	4.538 ^{ijk}	5.016 ^{efghi}	4.884 ^{ghi}	0.186
30	1.696 ^q	2.724 ^p	3.901 ^{lm}	2.966 ^{op}	3.910 ^{lm}	4.865 ^{ghi}	0.250

a, b, c,.....q Literales distintas indican diferencia estadística ($P < 0.01$)

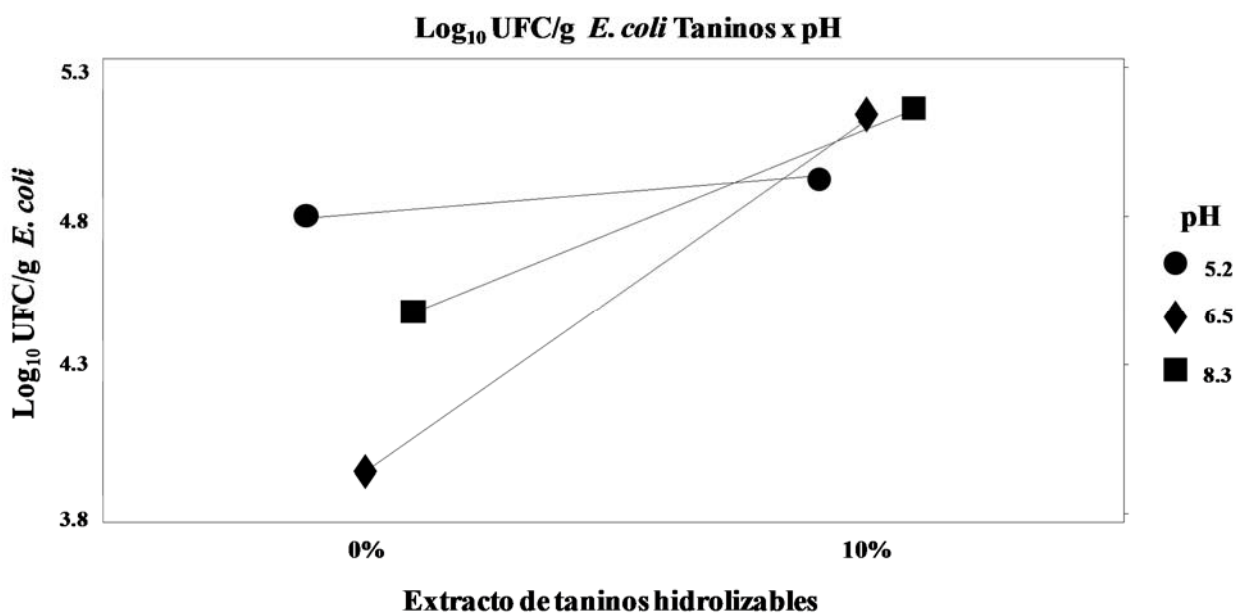


Figura 3. Interacción taninos hidrolizables x pH en el crecimiento de *Escherichia coli* en heces de vacas.

2.5. CONCLUSIÓN

Los resultados sugieren que los taninos hidrolizables no poseen actividad para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* en las heces de las vacas, en tanto que a valores de pH cercanos a la neutralidad contribuyen a disminuir el crecimiento de *Escherichia coli* en las heces de las vacas.

2.6. LITERATURA CITADA

- AOAC. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA. 1990. ISBN 0-935584-42-0.
- Asakura, H., K. Kawamoto, Y. Haishima, S. Igimi, S. Yamamoto, S. Makino. 2008. Differential expression of the outer membrane protein w (ompw) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Research in Microbiology* (159): 709-717.
- Berry, E.D., J. L. Wells, S. L. Archibeque, C. L. Farrel, 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, D. J. Nisbet. 2009. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle. *Mol. Biol.* (11): 67-80.
- Cruz, A. M., C. A. Gómez, J. R. Villagómez, N. Chavarría, J. Rodríguez, E. R. Vargas, R. Castro. 2013. Antibacterial effect against foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in central México: studies in vivo and in raw beef. *Food Control.* (32). 289-295.
- Dungan, R. S. 2010. Fate and transport of bioaerosols associated with livestock operations and manures. *J. Anim. Sci.* (88): 3693-3706.
- Frutos, P, G. Hervás, F. J. Giraldez, A. R. Mantecón. 2004. Tannins and ruminant nutrition. *Span. J. Agric. Res.* (2):191-202.
- Goel, G, A. Kumar, V. Beniwal, M. Raghav, A. K. Puniya, K. Singh. 2011. Degradation of tannic acid and purification and characterization of tannase from *Enterococcus faecalis*. *International Biodeterioration and Biodegradation.* (65): 1061-1065.
- Gutierrez-Bañuelos, H., W. E. Pinchak, B. R. Min, G. E. Carstens, R. C. Anderson, L. O. Tedeschi, W. K. Krueger, N. A. Krueger, P. A. Lancaster and R. R. Gomez. 2011. Effects of feed-supplementation and hide-spray application of two sources of tannins on enteric and hide bacteria of feedlot cattle. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* (46): 360-365.
- Hicks, CR. *Fundamental Concepts in the Design of Experiments.* Holt, Rinehart and Winston, New York. 1973. ISBN 003080132X
- Kumar, M, Nair M, Vasudevan P, Venkitanarayanan K. 2005. Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food control.* (16):395-398.

- Mawdsley, J.L., Bardgett R.D., Merry R.J., Pain B.F., Theodorou M.K. 1995. Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environmental pollution. *Applied Soil Ecology*. (2): 1-15.
- Pinheiro, P. A. C., S. H. Silvestre S. S. Mello B. P. L. Manique, V. C. R. Werneck., M. Maraschin F. S. R. Salvador and J. M. Block. 2014. Effects of extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extract of pecan nut (*Carya illinoensis*). *Ind. Crops Prod.* (52):552-561.
- Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Well, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L.M. Johnson, N. T. Hargret, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* (308): 681-685.
- Rodríguez, V. M. J., P. A. F. Aredes, N. M. C. Manca. 2011. Effect of phenolic compound mixtures on the viability of *Listeria monocytogenes* in meat model. *Food Technol. Biotechnol.* (49): 83-88.
- Rodríguez-Duran, L. V., B. Valdivia-Urdiales, J. C. Contreras-Esquivel, R. Rodríguez-Herrera, C. N. Aguilar. 2010. *Química y Biotecnología de la Tana* (2): 1-10.
- Sanz, M., Cadahia, E., Esteruelas, E., Muñoz, A. MA., Fernández, B., Hernández, T. and Estrella, I. 2010. Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) heartwood. Effect of toasting at cooperage. *J. Agric. and Food Chem.* (58): 9631-9640.
- Satoshi, I., W. B. Ksoll., R. E. Hicks., M. J. Sadowsky. 2005. Presence and Growth of Naturalized *Escherichia coli* in Temperate Soils from Lake Superior Watersheds. *Appl. Environ. Microbiol.* (72): 612–621.
- Savedra, M. J., A. Borges, C. Dias, A. Aires, R. N. Bennett, E. S. Rosa, M. Simoes. 2010. Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. *Med. Chem.* (6): 174-183.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. (30). 12:3375-3883.
- Setia, A, Bhandari S. K, House J. D, Nyachoti C. M, Krause D. O. 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.
- Shen, X., Sun X. H, Xie Q, Lui H, Zhao Y, Pan Y, Hwang CH, Wu V. CH. 2014. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *Food Control.* (35): 159-165.
- Statistix User's Manual, Release 9.0. Analytical Software, Tallahassee, FL. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.040>

- Taylor, P. A, Hamilton-Miller J. M. T, Stapleton P. D. 2005. Antimicrobial properties of green tea catechins. Food Sci. Technol. bull. (2): 71-81.
- Varel, V. H., Miller, D. N. and Berry, E. D. 2006. Incorporation of thymol into corncob granules for reduction of odor and pathogens in feedlot cattle waste. J. Anim. Sci. (84): 481-487.
- Villalba, J. J, Provenza F. D, Hall J. O, Lisonbee L. D. 2010. Selection of tannins by sheep in response to gastrointestinal nematode infection. J. Anim. Sci. (88): 2189-2198.
- Weinberg, Z, Chen Y, Khanal P, Pinto R, Zakin V, Sela S. 2011. The effect of cattle manure cultivation on moisture content and survival of *Escherichia coli*. J. Anim. Sci. (89): 874-881.
- Wells, J. E, Berry E. D, Varel V. H. 2005. Effects of common forage phenolic acids on *Escherichia coli* O157:H7 viability in bovine feces. Appl. Environ. Microbiol (72): 7974–7979.

CAPÍTULO 3. EVALUATION OF SOURCE AND METHOD OF ADMINISTRATION OF TANNINS EXTRACT IN THE AMOUNT OF *ESCHERICHIA COLI* PRESENT IN FAECES OF FEEDLOT CATTLE

Este capítulo se envió para su revisión a la Revista Waste Management, Enero de 2018.

3.1. ABSTRACT

Two experiments were conducted to evaluate the influence of tannins in the concentration of *Escherichia coli* in faeces of feedlot cattle. In the Experiment 1, faecal samples from 20 finishing bullocks (415.63 ± 53.78 kg) were pooled, divided in three sub-samples and randomly assigned to three treatments as follows: 1) negative control, no tannins added (CTRL); 2) mixture of 0.6% of condensed tannins extract DM basis (CT); or 3) mixture of 0.6% of hydrolysable tannins extract DM basis (HT). Faeces were exposed to feedlot environment condition during 0, 24, 48 or 72 h. Aliquots (1 g) were inoculated onto selective agar plates for *E. coli* and viable counts per gram of faeces (CFU/g) of *E. coli* were obtained 24 h post-incubation. Data were log transformed and then analysed by ANOVA for a completely randomized design with a 3 × 4 factorial arrangement. Whereas we observed a trend of viable counts decrease ($p = 0.08$) in those samples treated with tannins for 24 h, compared to the untreated control, *E. coli* counts were similar at longer exposure time ($p > 0.20$), including at 48 and 72 h. In experiment 2, 30 bull-calves (230.78 ± 12.72 kg) were randomly assigned to three treatments as follows: 1) fed a corn silage growing diet (CTRL); 2) CTRL supplemented with 0.6% DM basis of condensed tannins extract (CT); or 3) CTRL supplemented with 0.6% DM basis of hydrolysable tannins extract (HT). Faecal samples were collected from each bull-calf before and after 28 d receiving treatments. Faeces (1 g) were processed as above to obtain viable counts of *E. coli* and analysed by ANOVA for a completely randomized design. Neither CT nor HT decreased viable counts of *E. coli* ($p = 0.20$) compared to untreated animals. Thus condensed tannins decreased *E. coli* viable counts when faeces were treated but had no effect on *E. coli* counts when condensed tannins were supplemented in the diet fed.

Key words: Bovines, *Escherichia coli*, faeces, Tannins.

3.2. INTRODUCTION

Tannins are natural polyphenolic compounds produced by secondary metabolism of a wide variety of plants that can be separate in two structural groups, (Frutos *et al.*, 2004; Kardel *et al.*, 2013). Hydrolysable tannins (molecular weight = 500 to 3000 Da) includes both gallotannins and elaggitannins (Khanbabaee and Ree, 2001); gallotannins consist in a central glucose core esterified with gallic and hexahydroxydiphenic acids (Min *et al.*, 2007). Ellaggitannins are more complex and derived from pentagalloylglucose by oxidative reaction (Smith *et al.*, 2003; Akhtar *et*

al., 2015). Condensed tannins, or proanthocyanidins (molecular weight = 1000 to 20000 da), consist of flavan-3-ol (catechin) units condensed into polymers through C-C bounds (Pasch *et al.* 2001; Smith *et al.*, 2003; Duval and Averous, 2016). The biological role in plants of tannins is related to protect against infection, insects or animal herbivorous (Khanbabaee and Ree, 2001; Duval and Averous, 2016). Their antimicrobial activity has been the focus of research in several fields such as pharmacology and animal nutrition (Smith *et al.*, 2003). In several *in vitro* studies (Chung *et al.*, 1998; Hoshino *et al.*, 1999), both condensed and hydrolysable tannins inhibit *Escherichia coli* growth. Some researcher considered of interest explore the possibility of a reduction of *E. coli* presence in the faeces of bovines through the use of tannins (Wells *et al.*, 2005; Min *et al.*, 2007; Gutierrez-Bañuelos *et al.*, 2011), due to that *E. coli* is regular inhabitant of bovines digestive tract (Callaway *et al.*, 2009), and there are a high concentration of bovines confined in intensive feedlot and dairy farms, which produce mean high amounts of manure (Lejeune and Wetzel, 2007; Dungan 2010; Weinberg *et al.*, 2011) and they represent a risk of spread to environment large amount of potentially pathogen bacteria as *E. coli* (Callaway *et al.* 2010; Hartmann *et al.*, 2012). However, few experiments has been conducted to determine the effect of tannins extract on *E. coli* population when is directly added to faeces of bovines (Wells *et al.*, 2005) or fed to bovines (Min *et al.*, 2007; Gutierrez-Bañuelos *et al.*, 2011).

The objective of this study was to evaluate the influence of hydrolysable tannins and condensed tannins extract on presence of *Escherichia coli* in faeces of feedlot cattle.

3.3. MATERIAL AND METHODS

All the animals used in this study were treated according to the Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching (FASS, 2010).

3.2.1. Study location

Two experiments were conducted in the Experimental Station for Beef Cattle in Dry Tropic, placed inside facilities of the commercial feedlot yard “Ganadera Los Migueles, S.A. de C.V.”; and in the laboratories of Parasitology, and Animal Nutrition

Research of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the Universidad Autónoma de Sinaloa in Culiacán, Sinaloa, México (24° 51' N, 107° 26' W, 57 m a.s.l.).

3.2.2. Experiment 1

Twenty finishing bullocks (415.63 ± 53.78 kg), in groups of five were placed in four 6 x 12 m dirt floor pen provided with 24 m² of central metal ceiling that provides 4.8 m² of shade/bullock, pen were fitted with 2.4 m of lineal concrete build feed bunk, and permanent access of animals to clean and fresh drink water was guarantee with 0.6 m of automatic waters built-in. Bullocks were feed *ad libitum* with a 90:10 concentrate: roughage finishing-diet that contained 69 % of cracked corn (Table 2); after 50 days consuming the diet, faecal samples were taken directly from the rectum of each bullock, faeces obtained in a same pen were blended to obtain a composited sample per each pen. Faecal pH was determined on fresh samples using 2 grams of faeces from each composite sample which were placed in a 100 mL beaker; then, faeces were dissolved in 2 g of distillate water (Wheller and Noller, 1977) and pH was recorded using a portable pH meter (HI99193 membrane pH-meter; Hanna Instruments, USA). Then the pen-composite samples were split into three sub-samples of 80 g and randomly assigned to three treatments as follows: 1) Faecal sample without tannins extract addition (Control); 2) Control plus 0.6 % dry matter basis of hydrolysable tannins extract (HT); and 3) Control plus 0.6 % dry matter basis of condensed tannins extract (CT). Hydrolysable tannins extract from chestnut (*Castanea sativa*) was delivery as NutriP (Silvateam; San Michele Mondavi, Italy); and condensed tannins extract from quebracho tree (*Schinopsis balansae*) was provided as Bypro (Indunor, S. A.; Buenos Aires, Argentina). Faces and tannins in each treatment were thoroughly mixed, then were placed directly on the soil of the cattle management aisle sited in the back side of its respective pens, this is an area of 4 × 48 m that is only used when cattle is moved outside of pens, then during experiment works as exclusion area protected by a metal-pipe (0.10 m inside diameter) constructed fence that prevent the disturb of faecal sample by people or cattle traffic. The three faecal sample from each pen were fitted 2 m length from the closed back door of its respective pen; next step was covered each faecal sample with 12 metal-network box (0.40×0.40 × 0.25 m) that prevent access of birds, flies,

mosquitoes or another animals to faeces; but permits free gas interchange with the environment. Each metal-box was identified with the corresponding treatment inside.

3.2.3. Microbial Analyses

Aliquots of 1 g de faeces of each repetition (3 treatments by 4 pens) were taken at 0, 24, 48 and 72 h of exposure to the environment. Each aliquot was placed in a sterile plastic bag and transported immediately to laboratory, where 1 g of faeces was placed in a culture tube and diluted in 9 mL of buffered peptone water (DPW; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD), were thoroughly mixed, and 1 mL of primary dilution was taken and dissolved again in 9 ml of buffered peptone water (Wells *et al.*, 2005; Varel *et al.*, 2008). Then 100 μ L of the decimally diluted sample were spread by the extension method in Petri dishes contains a selective culture medium for faecal coliforms (CHROMagar™ ECC; Dr. A. Rambach; Paris, France), this procedure was performed by duplicate for each treatment. The planted Petri dishes were incubated at 44 °C during 24 h. Once complete the incubation time, the blue stained colonies indicative of *E. coli* presence were accounted, the mean of duplicate determination for each sample was recorded as *E. coli* colony forming units per g of faeces (CFU/g faeces).

3.2.4. Experiment 2

Thirty bull-calves *Bos indicus* (230.8 \pm 12.7 kg), in groups of five were placed in six pens as described in Experiment 1. Bull-calves were fed *ad libitum* a growing-diet (71:29 of roughage: concentrate) that contained 46% of corn silage (Table 2); and adapted during 21 days to accommodation, diet and handling. After 21 days period of adaptation to facilities, diets and handling, faecal samples were taken directly from the recto of each bull- calf. Two grams of faeces were taken from each bull-calf sample for pH determination, in a 100 mL beaker faeces were dissolved in 2 g of distillate water (Wheller and Noller, 1977) and pH was recorded using a portable pH meter (HI99193 membrane pH-meter; Hanna Instruments, USA). Faecal samples were placed in identified sterile plastic bags and transported immediately to laboratory, were *E. coli* colony forming units per g of faeces (CFU/g) was determined with a similar process as described in Experiment 1. Results were used as baseline to each steer previous to receive the assigned treatment.

Once obtained faecal samples, bull-calves were randomly assigned to three treatments as follows: 1) Growing corn silage diet without tannins extract addition (Control); 2) Control plus 0.6% dry matter basis of hydrolysable tannins extract (HT); and 3) Control plus 0.6% dry matter basis of condensed tannins extract (CT). Hydrolysable tannins extract from chestnut (*Castanea sativa*) was delivered as NutriP (Silvateam; San Michele Mondavi, Italy); and condensed tannins extract from quebracho tree (*Schinopsis balansae*) was provided as Bypro (Indunor, S. A.; Buenos Aires, Argentina).

Daily the corresponding dosage of HT, and CT by each pen in agreement of assigned treatment, was mixed in 1000 g of dry-ground corn. Then was thoroughly hand mixed during five minutes inside of a new clear plastic bag (tagged with the number of corresponding pen), looking for a homogenous blend; the procedure was performed each feeding time by each pen during every days of experiment. The 1000 g of ground corn-supplemental mineral sources blend, were delivered agree with top dress procedure in the feed bunk at feeding time. Bull-calves in Control treatment received daily 1000 g of dry-ground corn by pen to equalize feeding management and energy intake with remainder feedlot cattle involved in the experiment. Bull-calves were fed during 28 days with its respective treatments; and at day 28 faecal samples were taken again from each bull-calf, and *E. coli* CFU/g of faeces was measured as described previously.

3.2.5. Statistical analyses

All incubations were performed in duplicate for each faecal collection or treatment, and the coefficients of variation for duplicate pairs were < 10%. Prior of statistical analysis in both experiments the results of CFU/g faeces were transformed to \log_{10} of CFU/g faeces.

Data of Experiment 1 were analysed by ANOVA for a completely randomized design (Hicks, 1973) with a 3×4 factorial arrangement of treatments (3 tannins schedule \times 4 times of exposure to environment). The mathematical model was: $Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + H_j + TH_k + \varepsilon_{ijkl}$

Where: Y_{ijkl} is the response variable, μ is the overall mean, τ_i is the tannins effect, H_j is the time effect, TH_k is the interaction of the tannins factor by time factor, ε_{ijkl} is the

residual error. Pen was the experimental unit, and mean separation was performed using the LSD test (Berry *et al.*, 2006; Varel *et al.*, 2006).

Experiment 2 data were analysed by ANOVA for a completely randomized design (Hicks, 1973). The mathematical model was: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$

Where: Y_{ij} is the response variable, μ is the overall mean, τ_i is the treatment effect, ε_{ij} is the residual error. Each bull-calf constituted the experimental unit, and mean separation was performed using the LSD test (Berry *et al.*, 2006; Varel *et al.*, 2006). All statistical calculations were performed with version 9 of software package Statistix (2007).

3.4. RESULTS AND DISCUSSION

3.4.1. Experiment 1

The results of the influence of tannins extract addition to feedlot cattle faeces and exposition time to the environment on presence of *E. coli* are shown in Table 3. There were a trend of interaction ($P = 0.08$) of tannins \times exposition time during first 24 h of exposition the *E. coli* log₁₀ CFU/g account was similar across treatments ($P > 0.20$); however, beyond 24 h of exposition, the response to condensed tannins extract addition shift, and at 48 and 72 h the amount of *E. coli* log₁₀ CFU/g was lower ($P = 0.08$) in bovine faeces that were blended with equivalent to 0.6% of condensed tannins extract compared with controls. The addition of hydrolysable tannins to bovine faeces did no induced ($P > 0.10$) change on *E. coli* growth account. The mean pH value of faeces was 6.31 ± 0.16 and was similar across treatments ($P > 0.20$).

3.4.2. Experiment 2

The results of the influence of tannins extract supplementation on presence of *E. coli* in the faeces of feedlot cattle is shown in Table 4. Source of tannins did not affect faecal *E. coli* population ($P > 0.20$). Similarly, the faecal pH was similar across treatments ($P = 0.20$) averaging 7.03 ± 0.33 .

3.4.3. Experiment 1

Reduction of *E. coli* in faeces by addition of condensed tannins observed in the present experiment corroborates the antimicrobial effect attributed to this kind of compounds (Maikai, 2009; Shen *et al.*, 2014). The mechanism for antimicrobial

activity remains unclear (Wells *et al.*, 2005). A possible pathway is the ability of CT have to form complex with proteins under moderately acid pH conditions prevalent in the ending portion of small intestine of bovines (Wheller and Noller, 1977; Frutos *et al.*, 2004), when CT form stable complexes with membrane cell proteins induces hydrophobic effects, modifying the Na^+ / H^+ ion exchange that can result in death of the bacteria (Haslam, 1996). The mean faecal pH 6.31 of actual experiment could provide condition for it. Based on results obtained *in vitro* (Chung *et al.*, 1998; Hoshino *et al.*, 1999), the deprivation of some key minerals to bacterial growth is another option, polyphenols forming strong complexes with several mineral ions (Haslam, 1996; Smith *et al.* 2003); catechine-Cu (II) complex showed *in vitro* bactericidal activity against *Escherichia coli* (Hoshino *et al.*, 1999; Hoshino *et al.*, 2000). Human infection by *Escherichia coli* is inhibited by the iron-chelating lactoferrin present in milk (Haslam, 1996); Chung *et al.* (1998) appreciate a reduction of *Escherichia coli* growth when added tannic acid in culture media, after removed tannic acid-iron precipitate complex and when added iron again the *E. coli* growth was restored. Smith *et al.* (2003) suggest that condensed tannins extract from quebracho are toxic to *E. coli* under aerobic conditions because they generate H_2O_2 . Min *et al.*, (2007) observed an *in vitro* bacteriostatic effect of both hydrolysable (chestnut) and condensed (mimosa) tannins; they attributed the toxic effect to hydroxylation grade of tannins molecule. Opposite results were found by Gutierrez-Bañuelos *et al.*, (2011) when spread in hide of steers before slaughter water solution containing either condensed tannins from mimosa (*Acacia mearnsii*) or hydrolysable tannins from chestnut; after 24 h neither mimosa or chestnut tannins modifies *E. coli* account. In actual experiment despite that chestnut, tannins were ineffective to reduce *E. coli* presence as observed by Gutierrez-Bañuelos *et al.* (2011), condensed tannins from quebracho decreased it. Difference in response regardless of both quebracho and mimosa are considered as condensed tannins source, should be that the tannins composition and structure it is some distinct (Kardel *et al.*, 2013); mimosa tannins (1284 to 3200 Da) is predominantly composed of prorobinetidins and the structure of mimosa tannin is heavily branched, while quebracho tannins (939 to 2800 Da) is predominantly

composed of profisetinidins, its structure is almost completely linear, and is more easily hydrolysable than mimosa tannin (Pasch *et al.*, 2001; Kardel *et al.*, 2013).

There are few experiments where tannin was added directly to faeces; Wells *et al.* (2005) observed that death rate of *E. coli* O157:H7 inoculated to faeces, was increased when *trans*-cinnamic acid and *p*-cumaric acid were added to faeces of cattle fed either corn silage or cracked corn based-diets.

The impact of hydrolysable tannins from chestnut on *E. coli* growth in faeces is a not expected result, and opposite of reported by Min *et al.* (2007), who found higher *in vitro* inhibitory effect of chestnut hydrolysable tannins on *E. coli* growth compared to condensed tannins (Min *et al.*, 2007). Several researches have documented that activity of hydrolysable tannins against *E. coli* bacteria (Chung *et al.*, 1998; Hoshino *et al.*, 1999; Akhtar *et al.*, 2015). The chestnut extract was choose to be used in this research as hydrolysable tannins source, due to contains around 33 hydrolysable tannin compounds (Sanz *et al.*, 2010), in chestnut tannins elaggitannins constituted 80 % of total hydrolysable tannins. Elaggitannins have the ability of chelating iron and transition metal (Akhtar *et al.*, 2015). Iron is an essential mineral for *E. coli* (Haslam, 1996), and chelating iron in the culture media adding tannic acid inhibited *E. coli* growth (Chung *et al.*, 1998).

Results suggest that tannins extract from quebracho tree looks as candidate to be evaluate as alternative strategy for helps to decreases participation of *E. coli* from bovine manure in contamination of food and water (Callaway *et al.*, 2009; Dungan, 2010); some possible application in pre-harvest feedlot cattle area (Gutierrez-Bañuelos *et al.*, 2011), and manure utilized for land fertilization where pathogenic *E. coli* strains as O157:H7 has survived from 9 weeks (Oliveira *et al.*, 2012) to more than 5 months (Islam *et al.*, 2004) after fertilization with contaminated compost, or oxyiminocephalosporin antibiotic resistant strains that were recovered from farm soil 1 year after last application of bovine manure (Hartmann *et al.*, 2012).

3.4.4. Experiment 2

Mean *E. coli* population was 6.6 log₁₀ CFU/g of faeces, it is agreeing with the value 6.3 log₁₀ CFU/g *E. coli* faeces observed by Archivaque *et al.* (2007) when fed containing corn silage-dry dolled corn diets to feedlot cattle.

The lack effect observed of tannins on *E. coli* shedding, could be partially explained with base in pH dependence tannins to expresses or not its ability to link proteins; when tannins are ingested, insoluble tannin-protein complexes are formed; these are stable over the pH range from 3.5 to 7.0 but are dissociate in the abomasum and anterior duodenum (Jones *et al.*, 1994; Frutos *et al.*, 2004), where pH in beef cattle is usually < 3.0 (Wheller and Noller, 1977; Wheller *et al.*, 1981); however in the last part of small intestine of beef cattle pH values turns to slightly alkaline (Christiansen and Webb, 1990). The faecal pH = 7.03 found in the faeces of bull-calves indicate that large intestine pH of these animal was close to neutrality. Wheller and Noller (1977) observed that pH values in colon and faeces of cattle were similar when they were fed different grain sources and buffering agents, then it can be assumed that in actual experiment, pH conditions in the last part of small intestine and along large intestine were close to neutrality. Under neutral pH intestinal conditions, it is feasible that tannins formed newly stable-complexes with undigested component from the diet, and with endogenous proteins from digestive secretions and tissue abrasion (Frutos *et al.*, 2004), in this way when tannins flows to large intestine they were already linked and unable to forms new bonds with proteins from bacteria cell membrane. Wells *et al.* (2005) added phenolic acids to faeces of steers to evaluate their influence on *E. coli* O157:H7 death rate, and observed that lower faecal pH were associated with higher *E. coli* death rates. In the same experiment Wells *et al.* (2005), the activity against *E. coli* of phenolic acids was lower in faeces from cattle fed corn silage diet than those consumed cracked corn diet; these result suggest that diet composition may modulate susceptibility of *E. coli* to phenolic compounds. The faeces from steers fed corn silage diet in the experiment of Wells *et al.* (2005) varies from 5.9 to 6.3, values some lower than pH 7.03 observed in faeces of the bull-calves participants in actual experiment. In 82 to 127 days old pigs (Brus *et al.*, 2013), joint supplementation of chestnut tannin (0.19 % of diet) and organic acids (0.65 %; lactic acid, citric acid, formic acid, fumaric acid and ammonium formate) decreased *E. coli* count in faeces in relationship to pigs that were no tannins neither organic acid supplemented; in those experiment tannins alone was no tested, and organic acid did no modified faecal *E. coli* count.

It is little available information of experimental results where phenolic compounds have been proportionate directly to bovines in way to evaluate its activity on *E. coli* shedding. Min *et al.* (2007), infused intraruminally to steers fed Bermuda grass, either hydrolysable tannins solution (chestnut) or condensed tannins solution (mimosa; *Acacia mearnsii*), the tannins dose of was 1.5 % of DM (2.5 times higher than actual experiment), both kind of infused tannins reduced generic *E. coli* shedding from gastrointestinal tract of steers; faecal pH was no reported, and the *E. coli* shedding of control steers was $< 3 \log_{10}$ CFU some lower than value $6.7 \log_{10}$ CFU observed in actual experiment. In a first moment, it is possible think that tannins dose used in actual experiment (0.6 % of diet DM) could be not enough to reduce *E. coli* population; however Smith and Mackie (2004) feeding to rats crescents doses of condensed tannins from *Acacia angustissima* (0, 0.7 and 2 % of diet DM), they observed that *E. coli* shedding increases as tannins dose was augmented. Feeding steers with a finishing diet (91:9 concentrate: forage) containing 63 % of cracked corn, Gutierrez-Bañuelos *et al.* (2011), found that inclusion of 1.5 % of condensed tannin from mimosa increased *E. coli* shedding compared with no tannin supplemented steers, whereas *E. coli* shedding from steers fed chestnut tannins was similar to observed in steers that did not received any tannin supplementation, same response that obtained in actual experiment.

3.4.5. Comparison of two experiments

Opposite response of *E. coli* population to tannins appreciated between results of experiment 1 and experiment 2, could be due both to interaction of tannins with the type of diet used as well to differences in environmental oxygen availability. Wells *et al.* (2005), found that most prominent effect of phenolic acids against *E. coli* was observed in the faeces from cattle fed cracked corn diets (as used in Experiment 1) than in faeces from animals fed corn silage diets (as used in Experiment 2). In another way, Smith *et al.* (2003) observed that *E. coli* growth was inhibited by tannins only when they were exposed to oxygen, in Experiment 1, tannins were added to faeces and exposed to environment with predominant aerobic conditions; while in Experiment 2, tannins were fed to bull-calves, and in the gastrointestinal tract of ruminants the environment is anaerobic predominately; then the low availability of

oxygen could modulate the activity of tannins against *E. coli*. It is probable that combined modification in both kind of diet and environmental oxygen availability were responsible of the distinct response of *E. coli* growth to tannins when were added directly in to the faeces or when were fed to bull-calves. However, the pH variation influence across digestive tract cannot be discarded, the idea that tannins can actuate forming protein-tannin complexes under slightly acid conditions in rumen (Jones *et al.*, 1994; Frutos *et al.*, 2004), then dissociate in the acid pH of abomasum, and in the last portion of small intestine tannins forms newly stable-complexes with undigested component from the diet, and with endogenous proteins from digestive secretions and tissue abrasion (Frutos *et al.*, 2004), that inabilities tannins to interacting with *E. coli* in large intestine, is supported with results obtained by Gutierrez-Bañuelos *et al.* (2011), who found that supplementing 1.5 % of hydrolysable tannins from chestnut in the diet of finishing steers, decreased *E. coli* population in rumen, but had no effect on faecal *E. coli* shedding.

Table 2. Composition of diets used in Experiments 1 and 2

Ingredients	Proportion in diet dry matter, %	
	Experiment 1	Experiment 2
Corn silage	-	46.1
Corn straw	10.1	25.3
Cracked corn	69.1	-
Canola meal	7.1	-
Soybean meal	-	16.3
Sugar cane molasses	6.7	8.3
Fat	4.4	-
Vitamin and mineral premix*	2.7	2.6
Buffer agent blend†	-	1.4
Total	100 %	100 %

Calculated analyses DM basis‡

Crude protein, g/kg	132	152
NE maintenance MJ/kg	8.7	5.7
NE gain, MJ/ kg	5.9	3.3

*Containing: I₂ = 20 mg/kg; Se = 8 mg/kg; Co = 4 mg/kg; Cu = 160 mg/kg; Zn = 2000 mg/kg; Mn = 1200 mg/kg; Fe = 800 mg/kg; S = 0.18 %; P = 0.80 %; Ca = 21.3 %; Na = 4.7 %; Cl₂ = 7.3 %; Vitamin A = 64 000 IU/kg; Vitamin E = 20 000 IU/kg; Vitamin D = 300 IU/kg; CP (NPN from urea) = 67.7 %, and 1 g/kg of sodium monensin from Rumensin 200 (Elanco Animal Health).

†Containing: sodium bicarbonate, magnesium oxide, and others buffering agents.

‡Calculated from tabular values (NRC, 2000).

Table 3. Influence of tannins extract addition to feedlot cattle faeces and exposition time to the environment on presence of *Escherichia coli* expressed as log₁₀ CFU/g of faeces

Exposure time	Treatments			Contrasts	
	Control no tannin	Hydrolysable tannin	Condensed tannin	Control vs. HT	Control vs. CT
0 h	4.9 ± 1.11	4.9 ± 0.94	4.6 ± 0.83	0.91	0.90
24 h	3.7 ± 0.41	4.3 ± 0.54	4.3 ± 0.77	0.27	0.34
48 h	4.1 ± 0.32	3.8 ± 2.06	2.7 ± 1.78	0.22	0.06
72 h	4.7 ± 1.00	4.9 ± 2.77	3.6 ± 2.31	0.28	0.08

*Standard error of the mean

Table 4. Influence of tannins extract supplementation on presence of *Escherichia coli* in faeces of feedlot cattle (value are expressed as log₁₀ CFU/g faeces)

Item	Treatments			P value
	Control 0 %	Hydrolysable tannin 0.6 %	Condensed tannin 0.6 %	
Bullocks	10	10	10	
<i>E. coli</i> , log ₁₀ CFU/g faeces				
Day 0	6.7 ± 5.82	6.7 ± 5.94	6.9 ± 6.18	0.20
Day 28	6.7 ± 5.83	6.7 ± 5.94	6.9 ± 6.18	0.20

*Standard error of the mean

3.5. CONCLUSIONES

The results suggests that condensed tannins from quebracho is able to decrease *E. coli* CFU account when is added directly in bovine faeces, but spend more than 24 h to be evident its effect; however, when condensed tannins is fed to bull-calves, the presence of *E. coli* in faeces is not modified. The methodology of actual research is unable to provide some explanation about mechanism involved in the differential response of *E. coli* growth to tannins under variable environmental conditions; and agreeing with Wells *et al.* (2005) and Min *et al.* (2007) it is clear that future studies will need to determine the potential value of tannins for reducing pathogenic bacteria populations in feedlot cattle by an oral delivery system.

3.5. LITERATURA CITADA

- Akhtar, S., T. Ismail, D. Fraternali and P. Sestili. 2015. Pomegranate peel and peel extracts: chemistry and food features. *Food Chem.* (174): 417-425.
- Archivaque, S. L., D. N. Miller, H. C. Freetly, E. D. Berry C. L. Ferrel. 2007. The influence of oscillating dietary protein concentration on finishing cattle. I. Feedlot performance and odorous compound production. *J. Anim. Sci.* (85): 1487-1495.
- Berry, E. D, J. L. Wells, S. L. Archibeque, C. L. Farrel, 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.
- Brus, M., J. Dolinšek, A. Cencič. D. Škorjanc. 2013. Effect of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood tannins and organic acids on growth performance and faecal microbiota of pigs from 23 to 127 days of age. *Bulgarian J. Agric. Sci.* (19): 841-847.
- Callaway, T. R, Carr M. A, Edrington T. S, Anderson R. C, Nisbet D. J. 2009. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle. *Mol. Biol.* (11): 67-80.
- Callaway, T. R., S. E. Dowd, T. S. Edrington, R. C. Anderson, N. Krueger, N. Bauer, P. J. Kononoff, D. J. Nisbet. 2010. Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed using different levels of dried distiller's grains with soluble using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyro sequencing. *J. Anim. Sci.* (88): 3977-3983.
- Chung, K. T., Z. Lu, and M. W. Chou. 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and relate compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food Chem. Toxicol.* (36): 1053-1060.
- Dungan, R. S. 2010. Fate and transport of bioaerosols associated with livestock operations and manures. *J. Anim. Sci.* (88): 3693-3706.
- FASS 2010. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching. Third edition. Federation of Animal Science Societies. Champaign, IL.
- Frutos, P., G. Hervás, F. J. Giraldez, A. R. Mantecón. 2004. Tannins and ruminant nutrition. *Spa. J. Agric. Res.* (2):191-202.
- Gutierrez-Bañuelos, H., Pinchak, W. E., Min, B. R. Carstens, G. E. Anderson, R. C., Tedeschi, L. O, Krueger, W. K., Krueger, N. A. Lancaster, P. A., Gomez, R. R., 2011. Effects of feed-supplementation and hide-spray application of two sources of tannins on enteric and hide bacteria of feedlot cattle. *J. Environ. Sci. Health, Part B:* (46): 360-365.

- Hartmann, A., Locatelli, A., Amoureux, L., Depret, G., Jolivet, C. Gueneau, E. Neuwirth, C. 2012. Occurrence of CTX-M producing *Escherichia coli* in soils, cattle, and farm environment in France (Burgundy region). *Frontiers in Microbiology* doi: 10.3389/fmicb.2012.00083
- Haslam, E. 1996. Natural polyphenols (vegetables tannins), as drugs: possible modes of action. *J. Nat Prod.* (59): 205-215.
- Hicks CR. *Fundamental Concepts in the Design of Experiments*. Holt, Rinehart and Winston, New York.1973. ISBN 003080132X
- Hoshino, N., T. Kimura, F. Hayakawa, A. Yamaji and T. Ando. 2000. Bactericidal activity of catechin-copper (II) complexes against *Staphylococcus aureus* compared with *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* (31): 213–217.
- Hoshino, N., T. Kimura, A. Yamaji and T. Ando. 1999. Damage to the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by catechin-copper (II) complexes. *Free Radical Biology and Medical* (27): 1245–1250.
- Islam, M., M. P. Doyle, S. C. Phatak, P. Millner and X. Jiang. 2004. Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigated water. *J. Food Protect.* (67): 1365-1370.
- Jones, J. A., T. A. McAllister, A. D. Muir, J. K. Cheng. 1994. Effects of Sainfoin (*Onobrychis Viciifolia* Scop.) Condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol. Apr.* (60): 1374-1378.
- Kardel, M., F. Taube, H. Schultz and M. Gierus. 2013. Different approaches to evaluate tannin content and structure of selected plants extracts – review and new aspects. *J. Appl. Botany and Food Quality* (86): 154-166.
- Khanbabaee K. and T. V. Ree. 2001. Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* (18): 641-649.
- Lejeune, J. T. and A. N. Wetzel. 2007. Preharvest control of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J. Anim. Sci.* (85): 73-80.
- Maikai, V. A. 2009. Antimicrobial properties of stem bark extracts of *Ximenia americana*. *Journal of Agricultural Science* (1): 30-34.
- Min, B. R. and S. P. Hart. 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *J. Anim. Sci.* (81): 102-109.
- Min, B. R., W. E. Pinchak, R. C. Anderson and T. R. Callaway. 2007. Effect of tannins on of the *in vitro* growth *Escherichia coli* O157:H7 and *in vivo* growth of generic *Escherichia coli* excreted from steers. *J. Food Protect.* (70):543-550.
- NRC 2000. *Nutrient Requirements of Beef cattle*. (7th Revised edition). National Academy Press. Washington D. C.

- Oliveira, M., I. Viñas, J. Usall, M. Anguera and M. Abadias. 2012. Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *International Journal of Food Microbiology* (156): 133-140.
- Pasch, H., A. Pizzi, and A. Rode. 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of polyflavonoid tannins. *Polymers* (42): 7531-7539.
- Sanz, M., E. Cadahia, E. Esteruelas, A. Muñoz, M. A. Fernández, T. Hernández, and I. Estrella. 2010. Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) heartwood. Effect of toasting at cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (58): 9631-9640.
- Shen, X., XH. Sun, Q. Xie, H. Lui, Y. Zhao, Y. Pan, CH. Hwang, VCH. Wu. 2014. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *Food Control*. (35): 159-165.
- Smith, A. H. and R. I. Mackie. 2004. Effect of condensed tannins on bacterial diversity and metabolic activity in the rat gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* (70): 1104-1115.
- Smith, A. H., J.A. Imlay and R.I. Mackie. 2003. Increasing the oxidative stress response allows *Escherichia coli* to overcome inhibitory effects of condensed tannins. *Applied and Environmental Microbiology* (69): 3406-3411.
- Statistix User's Manual, Release 9.0. Analytical Software, Tallahassee, FL. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.040>
- Taylor PA, Hamilton-Miller JMT, Stapleton PD. 2005. Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Sci. Technol. bull.* (2): 71-81.
- Varel, V. H., D. N. Miller and 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.
- Varel, V. H., J. E. Wells, E. D. Berry, M. J. Spiels, D. N. Miller and C. L. Ferrell. 2008. Odorant production and persistence of *Escherichia coli* in manure slurries from cattle fed zero, twenty, forty, or sixty percent wet distillers grains with soluble. *Journal of Animal Science* (86): 3617-3627.
- Villalba, JJ, F. D. Provenza, J. O. Hall, L. D. Lisonbee. 2010. Selection of tannins by sheep in response to gastrointestinal nematode infection. *J. Anim. Sci.* (88): 2189-2198.
- Weinberg, Z., Y. Chen, P. Khanal, R. Pinto, V. Zakin, S. Sela. 2011. The effect of cattle manure cultivation on moisture content and survival of *Escherichia coli*. *J. Anim. Sci.* (89): 874-881.

- Wells J. E., E. D. Berry, V. H. Varel. 2005. Effects of common forage phenolic acids on *Escherichia coli* O157:H7 viability in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol* (72): 7974–7979.
- Wheller, W. E. and C. H. Noller. 1977. Gastrointestinal tract pH and starch in feces of ruminants. *Journal of Animal Science* (44): 131-135.
- Wheller, W. E., C. H. Noller and J. L. White. 1981. Effect of calcium and sodium bicarbonate in high concentrate diets on performance and nutrient utilization by beef cattle. *Journal of Animal Science* (53): 499-513.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES GENERALES

La adición de taninos hidrolizables no disminuye la cantidad de *E. coli* en las heces de los bovinos. Cuando los taninos condensados son adicionados directamente a las heces, después de 24 h disminuyen la cantidad de *E. coli* en tanto que la alimentación de extracto de taninos tanto condensados como hidrolizables no modifican la cantidad de *E. coli* excretada en las heces de los bovinos en engorda.

CAPÍTULO 5. LITERATURA CITADA.

- Aguilar-Gálvez A., G. Noratto, F. Chambi, F. Debaste, D. Campos. 2014. Potential tara (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins and hydrolysates as natural antibacterial compounds. *Food Chemistry* (156): 301-304.
- Akhtar, S., T. Ismail, D. Fraternali, P. Sestile. 2015. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chemistry* (174): 417-425.
- Alonso, J. L., A. Soriano, O. Carbajo, I. Amoros, H. Garelick. 1999. *Appl. Environ. Microbiol* (65): 3746-3749.
- Anesini, C., C. Pérez. 1993. Screening of plants used in Argentine folk medicine and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* (39): 119-128.
- AOAC. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA. 1990. ISBN 0-935584-42-0
- Archivaque, S. L., D. N. Miller, H. C. Freetly, E. D. Berry and C. L. Ferrel. 2007. The influence of oscillating dietary protein concentration on finishing cattle. I. Feedlot performance and odorous compound production. *J. Anim. Sci.* (85): 1487-1495.
- Asakura, H., K. Kawamoto, Y. Haishima, S. Igimi, S. Yamamoto, S. Makino. 2008. Differential expression of the outer membrane protein w (ompw) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Research in Microbiology.* (159): 709-717.
- Bae, H. D., T. A. McAllister, J. Y. K.-J. Cheng, A. D. Muir. 1993. Effect of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied and environmental Microbiology.* (57): 2132-2138.
- Belmares, R., J.C. Contreras-Esquivel, R. Rodríguez-Herrera, A. Ramírez Coronel, C. N. Aguilar. 2004. Microbial production of tannase an enzyme with potential use in food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 37 (8): 857-864.
- Berry, ED., JL. Wells, SL. Archibeque, CL. Farrel, HC, Freetly, DN. 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.
- Bollinger, L. M., H. S. Hussein, T. Sakuma, M. R. Hall, and E. R. Atwill. 2005. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from beef cattle. Abstract # Z-024 in Abstracts on the 105th Gen. Meet. Am. Soc. Microbial (CD Edition) Am. Soc. Microbial., Whashington, DC.
- Brus, M., J. Dolinšek, A. Cencič and D. Škorjanc. 2013. Effect of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood tannins and organic acids on growth performance and faecal microbiota of pigs from 23 to 127 days of age. *Bulgarian J. Agric. Sci.* (19): 841-847.

- Callaway, T. R., S. E. Dowd, T. S. Edrington, R. C. Anderson, N. Krueger, N. Bauer, P. J. Kononoff and D. J. Nisbet. 2010. Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed using different levels of dried distiller's grains with soluble using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyro sequencing. *Journal of Animal Science* (88): 3977-3983.
- Callaway, TR., MA. Carr, TS. Edrington, RC. Anderson, DJ. Nisbet. 2009. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle. *Mol. Biol.* (11): 67-80.
- Can, M., E. Bulut, A. Ornek, M. Ozacar. 2013. Synthesis and characterization of valonea tannin resin and its interaction with palladium (II) rodhium (III) chcloro complexes. *Chemical Engineering Journal.* (221): 146-158.
- Castaño P. H. I., G. G. Ciro, M. J. E., Zapata, R. S. L. Jiménez. 2010. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Vitae Revista de la Facultad de Química Farmacéutica.* 17 (2):149-154.
- Christiansen, M. L. and K. E. JR. Webb. 1990. Intestinal acid flow, dry matter, starch and protein digestibility and amino acid absorption in beef cattle fed high-concentrate diet with defluorinated rock phosphate, limestone or magnesium oxide. *Journal of Animal Science* (68): 2105-2118.
- Chung, K. T., Z. Lu and M. W, Chou. 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and relate compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food Chem. Toxicol.* (36): 1053-1060.
- Coté, J., S. Calliet, G. Doyon, JF. Silvain, M. Lacroix. 2010. Bioactive compounds in cranberries and their biological properties. *Crit Rev Food Sci. Nutr.* (50):666-679.
- Cruz-Gálvez, A. M., C. A. Gómez-Aldapa, J. R. Villagómez-Ibarra, N. Echavarría-Hernández, J. Rodríguez-Baños, E. Rangel-Vargas, J. Castro-rojas. 2013. Antibacterial effect against foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in central Mexico: Studios *in vitro* an in raw beef. *Food Control* (32): 289-295.
- Daglia, M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Sci. Direct.* (23):174-181.
- Delgado, A. J., E. G. Samino, E. V. Sánchez, D. G. Gómez. 2012. In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity aqueous extracts of grape-seeds (*Vitis vinifera* L.) *Food Control* (24): 136-141.
- Dungan, R. S. 2010. Fate and transport of bioaerosols associated with livestock operations and manures. *J. Anim. Sci.* (88): 3693-3706.
- Duval, A. and L. Averous. 2016. Characterization and physicochemical properties of condensed tannins from *Acacia catechu*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (64): 1751-1760.

- Elder, R. O., J. E. Keen, G. R. Siragusa, G. A. Barcoy-Gallagher, M. Koohmaraie, and W. W. Laegreid. 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides and carcasses of beef cattle during processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:2999-3003.
- Farfán-jarcia, A. E., S. C. Ariza-Rojas, A. A. Vargas-Cardenas, L. V. Vargas-Remolina. 2016. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev. Chilena Infectol* (33): 438-450.
- FASS 2010. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching. Third edition. Federation of Animal Science Societies. Champaign, IL.
- Fischer, U. A., R. Carle, D. R. Kammerer. 2011. Identification and quantification of phenolic compounds from promeganate (*Punica granatum* L.), peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. *Food Chem.* (127): 807-821.
- Frutos, P., G. Hervás, FJ. Giraldez, AR. Mantecón. 2004. Tannins and ruminant nutrition. *Span. J. Agric. Res.* (2):191-202.
- Fu, C. J., J. H. Porter, E. E. D. Felton, J. W. Lemhkuhler, M. S. Kerley. 2003. Pre-harvest factors influencing the acid resistance of *E. coli* and *E. coli* O157: H7. *J. Anim. Sci.* (81): 1080-1087.
- Fuentes, A. R., M R. Talavera, J. N. Vázquez, E. V. Soriano, A. C. Gutiérrez. 2013. Presencia de integrones clase I en *Escherichia coli* aislada de productos cárnicos en plantas Tipo Inspección Federal (TIF) en el Estado de México. *Vet. Méx.* (44): 26-30.
- Fuentes, J. L., M. Vernhe, E. B. Cuétara, A. Sánchez-Lamar, J. L. Snatana, M. Llagostera. 2006. Tannins from barks of *Pinus caribaea*, protect *Escherichia coli* cells against DNA damage induced by γ - rays. *Fitoterapia* (77): 116-120.
- Goel, G., A. Kumar, V. Beniwal, M. Raghav, AK. Puniya, K. Singh. 2011. Degradation of tannic acid and purification and characterization of tannase from *Enterococcus faecalis*. *International Biodeterioration and Biodegradation.* (65): 1061-1065.
- Gutierrez-Bañuelos, H., W. E. Pinchak, B. R. Min, G. E. Carstens, R. C. Anderson, L. O. Tedeschi, W. K. Krueger, N. A. Krueger, P. A. Lancaster and R. R. Gomez. 2011. Effects of feed-supplementation and hide-spray application of two sources of tannins on enteric and hide bacteria of feedlot cattle. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* (46): 360-365.
- Gyawali, R. and S. A. Ibrahim. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food control.* (46): 412-429.
- Gyles, C. L. 2007. Shiga toxin-producing *Echerichia coli*. *J. Anim. Sci.* (85):45-62.
- Hartmann, A., A. Locatelli, L. Amoureux, G. Depret, C. Jolivet, E. Gueneau, C. Neuwirth. 2012. Occurrence of CTX-M producing *Escherichia coli* in soils,

- cattle, and farm environment in France (Burgundy region). *Frontiers in Microbiology* doi: 10.3389/fmicb.2012.00083
- Haslam, E. 1996. Natural polyphenols (vegetables tannins), as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products* (59): 205-215.
- He Z., P. H. Pagliari, H. M. Waldrip. 2016. Applied and Environmental Chemistry of Animal Manure: a review. *Pedosphere* (26): 779-816.
- Hicks CR. *Fundamental Concepts in the Design of Experiments*. Holt, Rinehart and Winston, New York. 1973. ISBN 003080132X
- Hoshino, N., T. Kimura, A. Yamaji and T. Ando. 1999. Damage to the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by catechin-copper (II) complexes. *Free Radical Biology and Medical* (27): 1245–1250.
- Hoshino, N., T. Kimura, F. Hayakawa, A. Yamaji and T. Ando. 2000. Bactericidal activity of catechin-copper (II) complexes against *Staphylococcus aureus* compared with *Escherichia coli*. *Letters Applied Microbiology* (31): 213–217.
- Hussein, H. S. 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *Journal of animal science*. (85): 63-72.
- Ingham, S. C., J. A. Losinski, M. P. Andrews, J. E. Breuer, J. R. Breuer, T. M. Wood, T. H. Wright. 2004. *Escherichia coli* contamination of vegetables grown in soils fertilized with noncomposted bovine manure: Garden-scale studies. *Appl. Environ. Microbiol.* (70): 6420-6427.
- Islam, M., M. P. Doyle, S. C. Phatak, P. Millner and X. Jiang. 2004. Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigated water. *J. Food Protect.* (67): 1365-1370.
- Jones, G. A., Mcallister, T. A., Muir, A. D. and Cheng, K. J. 1994. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* (60):1374-1378.
- Jones, J. A., T. A. McAllister, A. D. Muir, J. K. Cheng. 1994. Effects of Sainfoin (*Onobrychis Viciifolia* Scop.) Condensed tannins on growth and proteolysisby four strains of ruminal bacteria. *Applied and environmental microbiology*. Apr. (60): 1374-1378.
- 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.

- Kardel, M., Taube, F., Schultz, H. and Gierus, M. 2013. Different approaches to evaluate tannin content and structure of selected plants extracts – review and new aspects. *Journal of Applied Botany and Food Quality* (86): 154-166.
- Khanbabaee, K. and T. V. Ree. 2001. Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* (18): 641-649.
- Khanbabaee, K. and Van Ree, T. 2001. Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* (18): 641-649
- Kim, T. J., J. L. Silva, Y. S. Yung. 2009. Antibacterial activity of fresh and processed red muscadine juice and the role of their polar compounds on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology.* (107): 533-539.
- Kumar, M., M. Nair, P. Vasudevan, K. Venkitanarayanan. 2005. Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food control.* (16):395-398.
- Lacombe A., V. C. H. Wu, S. Tyler, K. Edwards. 2010. Antimicrobial action of the American cranberry constituents, phenolics anthocyanins and organic acids against *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* (139):102-107.
- Lejeune, J. T. and A. N. Wetzel. 2007. Preharvest control of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J. Anim. Sci.* (85): 73-80.
- Li, G., X. Yunfeng, X. Wang Z. Baigang, C. Shi, W. Zhang, W. and X. Xia. 2014. Tannin-rich fraction from pomegranate rind damages membrane of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.* (11), 313-319.
- Maikai, V. A. 2009. Antimicrobial properties of stem bark extracts of *Ximenia americana*. *Journal of Agricultural Science* (1): 30-34.
- Mawdsley, J.L., R.D. Bardgett, R.J. Merry, B.F. Pain, M.K. Theodorou. 1995. Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environmental pollution. *Applied soil Ecology.* (2): 1-15.
- Min, B. R. and S. P. Hart. 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *J. Anim. Sci.* (81): 102-109.
- Min, B. R., W. E. Pinchak, R. C. Anderson and T. R. Callaway. 2007. Effect of tannins on the *in vitro* growth *Escherichia coli* O157:H7 and *in vivo* growth of generic *Escherichia coli* excreted from steers. *J. Food Protect.* (70):543-550.
- Montes F., R. Meinen, C. Dell, A. Rotz, A. N. Hristov, J. Oh, G. Waghorn, P. J. Gerber, B. Henderson, H. P. S. Pakkar and J. Dijkstra. 2013. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: II a review of manure management mitigation options. *J. Anim. Sci.* (91): 5070-5094.
- Nishimuta J. F., D. G. Ely and J. A. Boling. 1974. Ruminal bypass of dietary soybean protein treated with heat formalin and tannic acid. *Journal of animal science.* (39): 952-957.

- NRC 2000. Nutrient Requirements of Beef cattle. (7th Revised edition). National Academy Press. Washington D. C.
- Oliveira, M., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M. and Abadias, M. 2012. Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *International Journal of Food Microbiology* (156): 133-140.
- Omisakin, F., M. MacRae, ID. Ogden, NJ. Strachan. 2003. Concentration and prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle feces at slaughter. *Applied Environ. Microbiol.* (69):2444-2447.
- Pasch, H., A. Pizzi, and A. Rode. 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of polyflavonoid tannins. *Polymers* (42): 7531-7539.
- Pinheiro P. A. C., S. H. Silvestre, S. S. Mello, B. P. L. Manique, V. C. R. Werneck., M. Maraschin F. S. R. Salvador and J. M. Block. 2014. Effects of extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extract of pecan nut (*Carya illinoensis*). *Ind. Crops Prod.* (52):552-561.
- Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Well, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L.M. Johnson, N. T. Hargret, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* (308): 681-685.
- Rodríguez, V. M. J., P. A. F. Aredes, N. M. C. Manca. 2011. Effect of phenolic compound mixtures on the viability of *Listeria monocytogenes* in meat model. *Food Technol. Biotechnol.* (49): 83-88.
- Rodríguez-Duran, L. V., B. Valdivia-Urdiales, J. C. Contreras-Esquivel, R. Rodríguez-Herrera, C. N. Aguilar. 2010. *Química y Biotecnología de la Tanasa* (2): 1-10.
- Sanz, M., E. Cadahia, E. Esteruelas, A. M. Muñoz, B. Fernández de Simón, T. Hernández, I. Estrella. 2010. Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* mill) heartwood. Effect of roasting and cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (58): 9631-9640.
- Satoshi I., W. B. Ksoll., R. E. Hicks., M. J. Sadowsky. 2005. Presence and Growth of Naturalized *Escherichia coli* in Temperate Soils from Lake Superior Watersheds. *Appl. Environ. Microbiol.* (72): 612-621.
- Savedra, MJ., A. Borges, C. Dias, A. Aires, RN. Bennett, ES. Rosa, M. Simoes. 2010. Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. *Med. Chem.* (6): 174-183.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry.* (30). 12:3375-3883.

- Setia, A., SK. Bhandari, JD. House, CM. Nyachoti, DO. 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.
- Shen, X., XH. Sun, Q. Xie, H. Lui, Y. Zhao, Y. Pan, CH. Hwang, VCH. Wu. 2014. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *Food Control.* (35): 159-165.
- Smith, A. H. and R. I. Mackie. 2004. Effect of condensed tannins on bacterial diversity and metabolic activity in the rat gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* (70): 1104-1115.
- Smith, A. H., J. A. Imlay and R. I. Mackie. 2003. Increasing the oxidative stress response allows *Escherichia coli* to overcome inhibitory effects of condensed tannins. *Applied and Environmental Microbiology* (69): 3406-3411.
- Statistix User's Manual, Release 9.0. Analytical Software, Tallahassee, FL. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.040>
- Taylor, P. A., JMT. Hamilton-Miller, PD. Stapleton. 2005. Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Sci. Technol. bull.* (2): 71-81.
- Terrance, M. A., R. Ahmed, M. Chase-Topping, N. Kalchayanand, J. W. Schmidt, J. L. Bono. 2013. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from supershedding cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* (79): 4294-4303.
- Tian F., B. Li, B. Ji, G. Zhang and Y. Luo. 2009. Identification and structure-activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis*. *LWT-Food Science and Technology.* 42(7) 1289-1295.
- Van Kessel J. S., Y. A. Shelton, J. S. Karns. 2007. Survival of *Escherichia coli* in cowpats in pasture and in laboratory conditions. *Journal of applied Microbiology* (103): 1122-1127.
- Varel, V. H., D. N. Miller and 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.
- Varel, V. H., Wells, J. E., Berry, E. D., Spiehs, M. J., Miller, D. N. and Ferrell, C. L. 2008. Odorant production and persistence of *Escherichia coli* in manure slurries from cattle fed zero, twenty, forty, or sixty percent wet distillers grains with soluble. *Journal of Animal Science* (86): 3617-3627.
- Vidal, J. E., A. Canizález-Román, J. Gutiérrez-Jiménez, F. Navarro-García. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública México* (49):376-386.

- Villalba, J.J., F.D. Provenza, J.O. Hall, L.D. Lisonbee. 2010. Selection of tannins by sheep in response to gastrointestinal nematode infection. *J. Anim. Sci.* (88): 2189-2198.
- Weinberg, Z., Y. Chen P. Khanal, R. Pinto, V. Zakin, S. Sela. 2010. The effect of cattle manure cultivation on moisture content and survival of *Escherichia coli*. *J. Anim. Sci.* (89): 874-881.
- Wells, J. E., E.D. Berry, V.H. Varel. 2005. Effects of common forage phenolic acids on *Escherichia coli* O157:H7 viability in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol* (72): 7974–7979.
- Wells, J. E., M. Kim, J. L. Bono, L. A. Kuehn, A. K. Benson. 2014. *Escherichia coli* O157:H7, diet and fecal microbiome in beef cattle. *Journal of Animal Science*. (92): 1345-1355.
- Wheller, W. E. and C. H. Noller. 1977. Gastrointestinal tract pH and starch in feces of ruminants. *Journal of Animal Science* (44): 131-135.
- Wheller, W. E., C. H. Noller and J. L. White. 1981. Effect of calcium and sodium bicarbonate in high concentrate diets on performance and nutrient utilization by beef cattle. *Journal of Animal Science* (53): 499-513.
- Wu, V. C.H, X. Qiu, B. G. de los Reyes, C-S Lin, Y. Pan. 2009. Application of cranberry concentrate (*Vaccinium macrocarpon*) to control *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and its antimicrobial mechanism related to the down regulated *slp*, *hdeA*, and *cfa*. *Food Microbiology* (26):32-38.