

Artículo Original. Septiembre-Diciembre 2016; 6(3):47-54. Recibido: 11/10/2016. Aceptado: 27/11/2016.

<http://dx.doi.org/10.21929/abavet2016.63.4>

Comportamiento de *Escherichia coli* en heces de vacas adicionadas con taninos hidrolizables

Behaviour of *Escherichia coli* in cow feces added with of hydrolysable tannins

Heras-Sierra Teresa¹ tete852609@gmail.com Enríquez-Verdugo Idalia¹
idaliaenver@yahoo.com.mx Gaxiola-Camacho Soila¹ soilagaxiola2@gmail.com Romo-
Rubio Javier¹ romo60@uas.edu.mx Anne-Marie Pourcher² anne-marie.pourcher@irstea.fr
Barajas-Cruz Rubén^{*1} rubar@uas.edu.mx

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, México.
²Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour L'environnement et L'agriculture, Rennes, Francia. *Autor responsable y de correspondencia: Barajas-Cruz Rubén. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa; Boulevard San Ángel s/n, Colonia San Benito, Culiacán, Sinaloa, México, CP 80246.

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 (0 y 10%) de taninos hidrolizables (TH), 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 to those that did not 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.

INTRODUCCION

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 (Callaway *et al.*, 2009; Asakura *et al.*, 2008).

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 *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.*, 2013). 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.

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 l; cada contenedor fue debidamente identificado y transportado a 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 (Tripton, Bilis-X Glucorónido), se realizaron diluciones a la -1, -2, -3, -4 y -5, de cada dilución 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 Log₁₀ 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 x 3 x 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.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El comportamiento de *E. 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 (Log₁₀ 5.071 vs. Log₁₀ 4.401). Sí bien se sabe que los taninos tiene actividad antibacteriana, este efecto puede variar dependiendo el 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.* (2013) observó que compuestos como el ácido gálico y ácido eláxico inhibieron el crecimiento de *L. monocytogenes* y *S. aureus*; en tanto que ese mismo efecto no se observó en bacterias como *E. coli* y hongos como *Aspergillus 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 esta (Frutos *et al.*, 2004); sin embargo las bacterias Gram negativas como *E. 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.*, 2013; Goel *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Comportamiento de *E. 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.

Extracto de taninos	0%			10%			EE ¹	
	pH	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 ^{jkl}	4.642 ^{ghij}	3.613 ^{mn}	5.117 ^{mn}	0.191
22		3.267 ^{no}	3.054 ^{op}	4.245 ^{jkl}	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 ($P < 0.01$).

¹ Error estándar de la media.

Se ha reportado que algunas bacterias como *E. faecalis* y hongos como *A. 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 taninas mantiene una actividad óptima a pH de 6, lo que coincide con los resultados de este experimento, en el cual se apreció un mayor crecimiento de *E. coli* cuando existieron taninos en su medio de cultivo, lo que sugiere que las cepas de *E. coli* obtenidas de las heces de las vacas, no solamente soportaron la presencia de los TH, sino que de alguna manera los utilizaron como sustrato para soportar incluso un mayor crecimiento.

Se encontró una interacción taninos x pH ($P < 0.01$), en la que se observa que en presencia de taninos hidrolizables, el crecimiento de *E. coli* fue similar ($P > 0.10$) entre los valores de pH; sin embargo, en ausencia de taninos el crecimiento de *E. coli* fue menor cuando el medio presentó un valor de pH 6.5 ($P < 0.01$) en comparación con el observado con valores de pH fueron de 5.2 y 8.3, respectivamente.

En la Figura 1 se presenta gráficamente la interacción entre los taninos hidrolizables y el pH en el crecimiento de *E. 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).

CONCLUSION

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

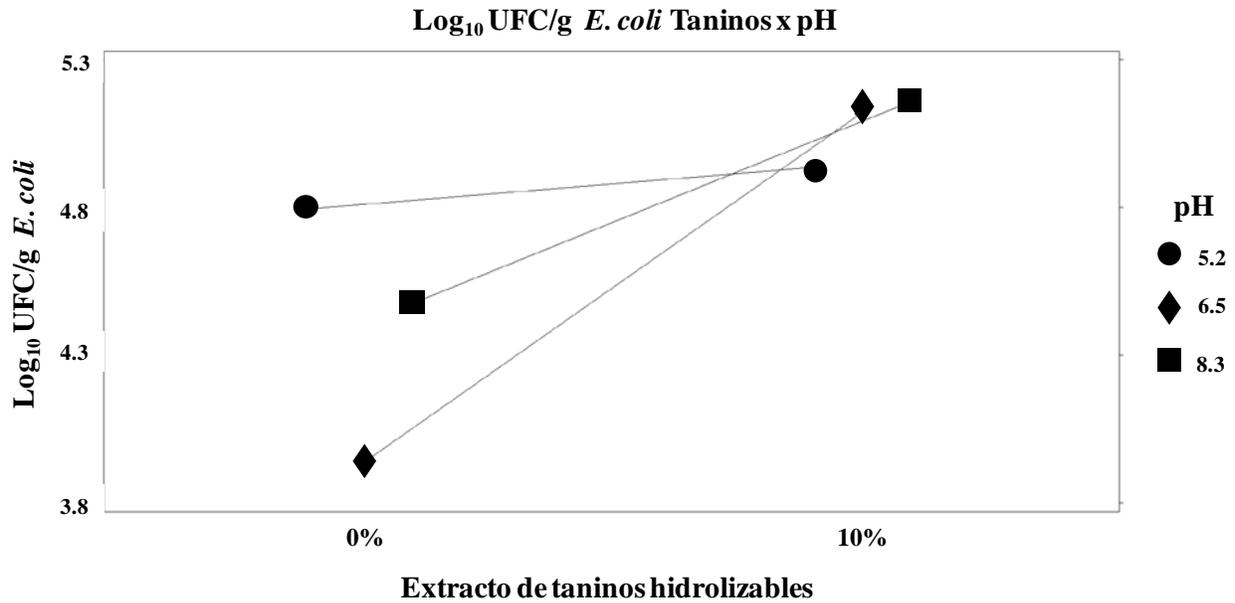


Figura 1. Interacción taninos hidrolizables x pH en el crecimiento de *E. coli* en heces de vacas.

LITERATURA CITADA

AOAC. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA. 1990. ISBN 0-935584-42-0

ASAKURA H, Kawamoto K, Haishima Y, Igimi S, Yamamoto S, Makino S. 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*. 2008; 159, 709-717. doi:10.1016/j.resmic.2008.08.005

BERRY ED, Wells JL, Archibeque SL, Farrel CL, Freetly HC, Miller DN. Influence of genotype and diet on steer performance, manure odor, and carriage of pathogenic and other fecal bacteria. II. Pathogenic and other fecal bacteria. *Journal of Animal Science*. 2006; 84, 2523-2532. DOI:[10.2527/jas.2005-747](https://doi.org/10.2527/jas.2005-747)

CALLAWAY TR, Carr MA, Edrington TS, Anderson RC, Nisbet DJ. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle. *Molecular Biology*. 2009; 11, 67-80. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19351974>

CRUZ AM, Gómez CA, Villagómez JR, Chavarría N, Rodríguez J, Vargas ER, Castro R. antibacterial effect againts foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in

central México: studies in vivo and in raw beef. *Food Control*. 2013; 32, 289-295. <https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/producto.php?producto=5315>

DUNGAN RS. Fate and transport of bioaerosols associated with livestock operations and manures. *Journal of Animal Science*. 2010; 88, 3693-3706. DOI:[10.2527/jas.2010-3094](https://doi.org/10.2527/jas.2010-3094)

FRUTOS P, Hervás G, Giraldez FJ, Mantecón AR. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2004; 2,191-202. <http://revistas.inia.es/index.php/sjar/article/view/73/0>

GOEL G, Kumar A, Beniwal V, Raghav M, Puniya AK, Singh K. Degradation of tannic acid and purification and characterization of tannase from *Enterococcus faecalis*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2011; 65, 1061-1065. doi:[10.1016/j.ibiod.2011.08.006](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.08.006)

GUTIERREZ H, Pinchak WE, Min BR, Carstens GE, Anderson RC, Tedeschi LO, Krueger WK, Krueger NA, Lancaster PA, Gomez RR. 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*. 2011; 46, 360-365. DOI:[10.1080/03601234.2011.559419](https://doi.org/10.1080/03601234.2011.559419)

HICKS CR. *Fundamental Concepts in the Design of Experiments*. Holt, Reinhardt and Wiston, New York. 1973. ISBN 003080132x

KUMAR M, Nair M, Vasudevan P, Venkitanarayan K. Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2005; 16, 395-398. Doi:[10.1016/j.foodcont.2004.04.006](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.04.006)

MAWDSLEY JL, Bardgett RD, Merry RJ, Pain BF, Theodorou MK. Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environmental pollution. *Applied Soil Ecology*. 1995; 2, 1-15. [10.1016/0929-1393\(94\)00039-a](https://doi.org/10.1016/0929-1393(94)00039-a)

PINHEIRO AC, Silvestre H, Mello S, Manique PL, Werneck CR, Maraschin M, Salvador SR, Block JM. Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecan nut. *Industrial Crops and Products*. 2014; 52, 552-561. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.031>

SETIA A, Bhandari SK, House JD, Nyachoti CM, Krause DO. Development and in vitro evaluation of an *Escherichia coli* probiotic able to inhibit the growth of pathogenic *Escherichia coli* K88. *J Anim. Sci*. 200; 87:2005-2012. DOI:[10.2527/jas.2008-1400](https://doi.org/10.2527/jas.2008-1400)

SHEN X, Sun XH, Xie Q, Lui H, Zhao Y, Pan Y, Hwang CH, Wu VCH. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *Food Control*. 2014; 35, 159-165.

STATISTIX. 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. Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Science Technology bull.* 2005; 2, 71-81. <http://pubmedcentralcanada.ca/pmcc/articles/PMC2763290/pdf/nihms-1032.pdf>

VAREL VH, Miller DN, Berry ED. Incorporation of thymol into corncob granules for reduction of odor and pathogens in feedlot cattle waste. *Journal of Animal Science*. 2006; 84,481-487. <http://naldc.nal.usda.gov/download/7926/PDF>

VILLALBA JJ, Provenza FD, Hall JO, Lisonbee LD. Selection of tannins by sheep in response to gastrointestinal nematode infection. *Journal of Animal Science*. 2010; 88, 2189-2198. doi:10.2527/jas.2009-2272

WEINBERG Z, Chen Y, Khanal P, Pinto R, Zakin V, Sela S. The effect of cattle manure cultivation on moisture content and survival of *Escherichia coli*. *Journal of Animal Science*. 2011; 89, 874-881. doi:10.2527/jas.2010-3272

WELLS JE, Berry ED, Varel VH. Effects of common forage phenolic acids on *Escherichia coli* O157:H7 viability in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005; 72, 7974–7979. doi:10.1128/AEM.71.12.7974–7979.2005