

# Evaluación del suministro de agua residual tratada por separación-sedimentación-filtración en la salud de cerdos destetados

## The effect of using separation/sedimentation/filtration-treated wastewater on the health of weaning pigs

Abigail Bravo Alcántara<sup>a</sup>, Aldo Mejía Ramos<sup>a</sup>, Gerardo Ramírez Hernández<sup>a</sup>, Marco Antonio Herradora Lozano<sup>a</sup>, José Luis Pablos Hach<sup>b</sup>, Roberto Martínez Gamba<sup>a</sup>

### RESUMEN

Los objetivos fueron la cuantificación de enterobacterias (Ent) y la identificación de *Salmonella* spp en agua residual obtenida a partir de un tratamiento de separación-sedimentación-filtración y evaluar su efecto en la salud de cerdos destetados. En la etapa 1 se obtuvieron dos muestras de la fosa de sedimentación y de tres filtros, por cinco semanas, dando un total de 40 muestras. En la etapa 2 se emplearon 24 cerdos sujetos a 3 tratamientos: (T1= agua filtrada y clorada; T2= agua filtrada; T3= agua potable). Se evaluaron las variables: consumo diario de alimento, consumo total de alimento, consumo diario y total de agua, conversión alimenticia, temperatura corporal, ganancia de peso y estado clínico. En la etapa 1 Ent no mostró diferencias ( $P>0.05$ ) entre los elementos del sistema de tratamiento, y se aisló *S. entérica* en 15 % de las muestras. En la etapa 2 el consumo diario de alimento presentó diferencias ( $P<0.05$ ) del día 4 al 9 en T2, con respecto a T1 y T3; el consumo total de alimento fue mayor ( $P<0.05$ ) en T1. La temperatura corporal fue mayor en T2 ( $P<0.05$ ) los días 3 y 4, y se observaron diferencias para estado clínico ( $P<0.05$ ) entre los tratamientos, los días 4, 5, 8 y 11. Se reaisló *S. entérica* a partir de válvula ileocecal (VI) e hígado en dos cerdos de T1, y de VI en uno de T2. Este tipo de tratamiento no garantiza su uso como agua de bebida, pudiendo ser empleada con otros fines.

**PALABRAS CLAVE:** Aguas residuales, Cerdos destetados, *Salmonella* spp.

### ABSTRACT

The purpose of this study was quantifying enterobacteria and identifying *Salmonella* spp in wastewater treated by separation/sedimentation/filtration, and evaluating its effect on nursery pigs. In Stage 1, a total of 40 samples were collected (i.e.: 2 weekly samples at each of four points [sedimentation pit and three filters] for 5 wk). In Stage 2, 24 pigs were assigned to three treatment groups (T1= filtered/chlorinated water; T2=filtered water; T3=potable water). The following variables were studied: daily feed intake, total feed intake, daily water intake, total water intake, feed conversion rate, body temperature, body weight gain, and clinical conditions. In Stage 1 no differences ( $P>0.05$ ) were found in enterobacteria among water treatment stages, but *S. enterica* was isolated from 15 % of the samples. During Stage 2, daily feed intake differences ( $P<0.05$ ) were found from day 4 to day 9 in T2 as compared to T1 and T3. Total feed intake was higher ( $P<0.05$ ) in T1. Body temperature was higher ( $P<0.05$ ) in T2 on d 3 and 4. Clinical condition differences ( $P<0.05$ ) were found among treatments on d 4, 5, 8 and 11. *S. enterica* was re-isolated from the iliocecal valve and the liver of two T1 pigs, and from the iliocecal valve of one T2 pig. This treatment type does not warrant the use of this water as drinking water. Therefore it should be used for other purposes.

**KEY WORDS:** Waste water, Weaning pigs, *Salmonella* spp.

La porcicultura como principal actividad ganadera a nivel mundial, tiene un impacto negativo en la

Despite of being a major animal agriculture activity worldwide, the swine industry has a negative impact

Recibido el 9 de febrero de 2007. Aceptado para su publicación el 21 de enero de 2008.

<sup>a</sup> Departamento de Producción Animal: Cerdos. Circuito Exterior de Ciudad Universitaria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 04510 México, DF. Tel. 56 22 58 69 al 71: robertom@servidor.unam.mx. Correspondencia al sexto autor.

<sup>b</sup> Comisión Nacional del Agua.

Este trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIIT-UNAM número INI223903.

calidad del aire, agua y suelo<sup>(1,2)</sup>. De estos efectos, la contaminación del agua es el más preocupante, pues es un recurso limitado en muchas regiones del mundo<sup>(3)</sup>. En el caso de la porcicultura esto es importante si se toma en cuenta que cada cerdo requiere de 0.12 a 0.22 L de agua, por kilogramo de peso vivo, lo que representa en una unidad de 100 hembras un gasto entre 7,500 y 10,000 L de agua diarios, equivalentes a 225,000 L de agua al mes. Aproximadamente el 82 % del agua que ingresa a las granjas sale como agua residual acompañada de heces, orina, alimento desperdiciado y otros materiales que se arrastran a través de los drenajes, desperdiciándose<sup>(2,4,5)</sup>.

Lo anterior origina que la carga orgánica en el agua residual de una granja porcina sea mayor que la de residuos municipales, con una cantidad de sólidos suspendidos totales (SST) de 23.013 mg/L y una demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de 7.238 mg/L, parámetros que se encuentran muy por arriba de los establecidos por algunas normas ambientales<sup>(2)</sup>. De ahí la necesidad de implementar sistemas de tratamiento<sup>(6)</sup>.

El grado en que esta contaminación afecta a las fuentes de agua depende de la cantidad de agua usada, de la separación de sólidos que se realice y del manejo dado a los residuales, de los cuales tanto el efluente líquido como la fracción sólida de las excretas, contienen gran cantidad de microorganismos patógenos, mismos que pueden sobrevivir por largos periodos de almacenamiento. Entre las bacterias que se pueden encontrar en los efluentes líquidos están *Salmonella* spp., *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, *Brucella* spp., *Leptospira* spp., *Brachyspira hyodysenteriae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* y *Clostridium perfringens*; parásitos como *Cryptosporidium parvum*; y virus semejantes a los enterovirus<sup>(7)</sup>.

Las granjas porcinas industriales en la actualidad usan sistemas de tipo primario que consisten en un separador de sólidos-líquidos, sedimentadores y grandes lagunas de almacenaje los cuales no aportan mucho en la disminución de microorganismos, ya que la cantidad de enterobacterias presentes en

on the quality of air, water, and soil<sup>(1,2)</sup>. Water pollution is the most concerning of these effects, since it is a limited resource in most world's regions<sup>(3)</sup>. Water is particularly important in the swine industry, since each pig requires 0.12 to 0.22 L water/kg live weight. This means that for every 100 sows, 7,500 to 10,000 L water are used per day, equivalent to 225,000 L water per month. Approximately 82 % of the water entering a farm comes out as waste water accompanied by feces, urine, wasted feed, and other materials that runoff in the sewer slurry to be wasted<sup>(2,4,5)</sup>.

The organic load of swine wastewater is higher than that of municipal wastewater, resulting in 23.013 mg/L total solids suspended (TSS), and a biochemical oxygen demand (BOD) of 7.238 mg/L, seriously exceeding the limits established by some environmental standards<sup>(2)</sup>. Therefore, wastewater treatment systems need to be implemented<sup>(6)</sup>.

The magnitude in which this pollution affects water sources depends on the amount of water used, solid separation, and residue management. Both effluent fluids and solids contain large amounts of pathogenic organisms which can survive for long periods of time during wastewater storage. Bacteria found in liquid effluents include *Salmonella* spp., *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, *Brucella* spp., *Leptospira* spp., *Brachyspira hyodysenteriae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Clostridium perfringens*, in addition to parasites such as *Cryptosporidium parvum* and enterovirus-like viruses<sup>(7)</sup>.

The swine industry is currently using primary water treatment systems, which consist of a solid/liquid separator, sedimentation devices, and large storage lagoons. This treatment does not decrease greatly the microbial population, since the amount of enterobacteria present in some wastewater primary treatment systems is  $9 \times 10^6$  colony-forming units (CFU)/g<sup>(8)</sup>, which can cause disease in swine and even public health problems<sup>(3,5)</sup>. Due to their high cost, these systems are only used by industrial-scale swine operations, and they generally do not allow for water to be recycled. These systems can

algunos de los sistemas de tratamiento primario de agua residual es de  $9 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC/g)<sup>(8)</sup>, esta carga bacteriana, puede ocasionar cuadros clínicos en los cerdos e incluso problemas de salud pública<sup>(3,5)</sup>. Estos sistemas debido a su alto costo, sólo han podido ser empleados por los poricultores industriales y de manera general no permiten el reciclaje del agua, por lo que difícilmente se emplean en las granjas medianas y pequeñas; estas últimas en la mayor parte de los casos no tienen ningún sistema de tratamiento y en su conjunto pueden contaminar igual o más que las grandes<sup>(2)</sup>.

Una alternativa desarrollada para pequeños productores es la combinación de métodos como la separación de sólidos, la sedimentación y la filtración. Esta combinación permite tratar el agua para cumplir con las normas ambientales respectivas. La incorporación de los sistemas de filtración ayuda a reducir los niveles de DBO, DBQ, sólidos totales, sólidos sedimentables y la turbidez del agua, y abre la posibilidad de reciclar el agua a bajo costo, lo que es muy importante en este tipo de operaciones<sup>(1,2)</sup>. Sin embargo, en este último caso se mantiene el riesgo de la recirculación de patógenos hacia la granja y el desarrollo de enfermedades en los animales. De ahí que el objetivo del presente estudio, fuera llevar a cabo una evaluación de tipo bacteriológico de las diferentes partes de un sistema de tratamiento de aguas residuales, para una operación de 100 hembras reproductoras, y comprobar el efecto de recircular el agua obtenida a partir del sistema en animales susceptibles. El trabajo se llevó a cabo en dos etapas:

#### *ETAPA 1*

Se llevó a cabo en una granja porcina productora de lechones con 100 hembras reproductoras ubicada a 100 km al NE de la Ciudad de México. La granja tiene un sistema de tratamiento de aguas residuales de tipo primario, específicamente diseñado a las condiciones medio ambientales y de volumen de material residual de la granja, basado en un diseño de columnas de percolación en el cual se establece, con base en sus características, una biocapa que reduce parámetros físico-químicos.

be hardly used by medium or small size farms. The latter typically do not have any water treatment systems at all, so that altogether small farms can be even more pollutant than larger operations<sup>(2)</sup>.

One alternative developed for small porcine farms is a combination method including solid separation, sedimentation, and filtration. The resulting water complies with environmental standards. Incorporating filtration systems aids in reducing BOD, COD (chemical oxygen demand), TSS, sedimentable solids and water turbidity levels, and opens up the possibility of low-cost water recycling, which would be extremely important for this type of operations<sup>(1,2)</sup>. Nevertheless, the risk of pathogens returning back to the farm exists, potentially resulting in disease. Therefore, the purpose of this study was performing a bacteriological evaluation at different points within a wastewater treatment system in a 100 breeder sow farm, and testing the effect of recycling the water so obtained in susceptible animals. The study included two stages:

#### *STAGE 1*

Stage 1 was conducted in a 100-sow farm located 100 km NE from Mexico City. This operation has a primary type wastewater treatment system, specifically designed for the environmental conditions and wastewater volumes of this particular farm, using percolation columns which traits result in a biolayer with decreased physicochemical parameters. The entire system consists of collecting farm slurry in a collection basin (2.34 m wide x 3.06 m long x 5 m central deep) where slurry remains for 48 h. After this, effluent is taken to a mechanical solid separation cylinder, then to a sedimentation pit (1.66 m wide x 1.95 m long x 2.43 m deep). Fluids remain here for additional 48 h before passing through a 3-filter series (1.50 m long x 2 m deep), for a residence time of 24 h per filter. Filters include three 0.40 m porous volcanic stone layers. Stone sizes decrease in each filter, for a total of 1.20 m filtering material. Filtered water finally goes to a storage system, to be re-used. The entire process from entering the collection basin to exiting the filters lasts 7 d.

El sistema completo consiste en la recolección de las excretas hacia un cárcamo de colección (CC), de 2.34 m de ancho, 3.06 m de largo y 5 m de profundidad al centro, en donde permanece 48 h; posteriormente las excretas pasan por un separador mecánico de sólidos tipo cilíndrico, en donde el líquido generado es transportado a una fosa de sedimentación de 1.66 m de ancho, 1.95 m de largo y 2.43 m de profundidad. El agua permanece aquí otras 48 h, para después pasar a través de tres filtros de 3 m de ancho, 1.50 m de largo y 2 m de profundidad, siendo la permanencia en cada uno de los filtros de 24 h. Los filtros cuentan con tres capas de piedra de tezontle de 0.40 m, y en cada una de éstas, el tamaño de las piedras es diferente, dando un total de 1.20 m de material filtrante. Finalmente el agua filtrada se deposita en una cisterna, para su posterior uso. El proceso de tratamiento, desde la entrada al CC hasta la salida de los tres filtros, tiene una duración de siete días.

#### Muestreo

Se realizó en la fosa de sedimentación, con agua obtenida de los tres filtros. Las muestras se obtuvieron semanalmente durante cinco semanas, obteniendo dos muestras finales por semana de cada punto de muestreo, o sea un total de 10 muestras por punto de muestreo.

Antes de obtener las muestras, el líquido de cada fosa o punto de muestreo fue homogeneizado durante 5 min con el empleo de una bomba hidráulica. En cada punto de muestreo y en cada semana se obtuvieron cinco sub-muestras iniciales de 200 ml de agua cada minuto, utilizando el mismo dispositivo hidráulico hasta completar un litro de muestra final.

Las muestras se colocaron en frascos de vidrio previamente esterilizados, rotulados y se les tomó la temperatura y el pH antes de cerrarlos; posteriormente fueron colocados en cajas de poliuretano con refrigerantes para su traslado al laboratorio, mismo que duró 2 h.

El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de bacteriología del Departamento de Producción Animal: Cerdos (DPAC), de la Facultad

#### Sampling

A total of 40 samples were collected (i.e.: 2 weekly samples at each of four points [sedimentation pit and each of the three filters] for 5 wk; or ten total samples per point).

Prior to sampling, the fluid in each pit or sampling point was mixed for 5 min using a hydraulic pump. Each week, five 200-ml initial sub-samples were collected at each sampling point per minute, using the same hydraulic pump, for a total final sample of 1 L.

Samples were collected in labeled, sterilized glass bottles. Temperature and pH were measured prior to closing the lid. Bottles were placed in polyurethane containers including cool packs, for a 2-h transportation period to the laboratory.

Samples were analyzed by the Bacteriology Laboratory, Swine Production Department, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, The Autonomous University of Mexico (DPAC, FMVZ, UNAM) (ISO 9001:2000 Certificate RSGC 24b).

#### *Enterobacteria counts*

Each sample was subjected to a series of ten-fold dilutions ( $10^{-1}$  -  $10^{-10}$ ) then analyzed using the plate count technique. One ml per dilution was seeded in MacConkey agar and incubated at 37 °C for 24 h. Counts were recorded as CFU/ml<sup>(9,10)</sup>.

#### *Salmonella spp. isolation and identification*

Five ml per sample were inoculated into 45 ml peptone water and set aside for 24 h. Ten ml of this solution were transferred to 90 ml sodium selenite broth and tetrathionate broth, then incubated at 37 °C for 24 h. Samples were seeded in both Salmonella-Shigella (SS) agar and brilliant green (BG) agar at 24, 48, and 72 h, then re-seeded in both SS and BG. Third passage reading was considered as conclusive for the presence or absence of the organism<sup>(11)</sup>. Plates were examined daily and *Salmonella* spp-suspicious colonies were selected and smeared. All isolates with Gram-negative smears were re-seeded in SS plates and

de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (Certificado ISO 9001:2000 RSGC 24b).

#### *Conteo de Enterobacterias*

Se realizó la técnica de conteo en placa, con diluciones décuples seriadas de cada muestra ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ). A partir de cada dilución se tomó 1 ml y se sembró en agar MacConkey y se incubó a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se registró el número de UFC/ml<sup>(9,10)</sup>.

#### *Aislamiento e identificación de Salmonella spp*

De cada muestra se tomaron 5 ml de líquido y se inocularon en 45 ml de agua peptonada, dejando reposar por 24 h; posteriormente se transfirieron 10 ml de esta solución a 90 ml de caldo selenito de sodio, así como en caldo tetrionato, y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se resembró en cajas de agar Salmonella-Shigella y verde brillante, a las 24, 48 y 72 h, para posteriormente hacer una resiembra en SS y VB. Al tercer pase se dio por concluida la presencia o no del agente<sup>(11)</sup>. Las cajas se examinaron diariamente y se seleccionaron las colonias sospechosas de *Salmonella* y se les realizó un frotis; aquéllas que resultaron ser bacterias Gram negativas, se resembraron en una placa de agar SS. Posteriormente, a las 24 h se examinaron las cajas de agar y una vez purificadas las colonias se realizó su identificación por pruebas bioquímicas, sembrándolas en agar hierro tres azúcares (TSI), medio de SIM, agar citrato de Simmons, en urea, malonato y en azúcares como ramnosa, arabinosa y trealosa, incubándose durante 24 h a 37 °C<sup>(11)</sup>.

Posteriormente se corroboró el serogrupo por medio de antisueros, colocando 50 ml de antisuero polivalente de *Salmonella* grupo somático O (*Salmonella* O Antiserum Poly A-I & Vi) en una placa de vidrio; para ello se tomaron colonias de SS o VB con un asa bacteriológica y se homogeneizaron durante 3 min; en el caso de positividad, se observó aglutinación<sup>(9)</sup>.

Una vez identificada *Salmonella* se colocaron 50 ml de los siguientes antisueros, uno del grupo C

24 h later plates were examined. Purified colonies were identified using biochemical tests by seeding in triple sugar iron (TSI), SIM medium, Simmons' citrate agar, urea, malonate, and several sugars including rannose, arabinose and threalose, then incubated for 24 h at 37 °C<sup>(11)</sup>.

Serogroup was then corroborated using antisera. Fifty microliters (50 ml) somatic group O *Salmonella* polyvalent antiserum (*Salmonella* O Antiserum Poly A-I & Vi) were placed on a glass plate, and bacterial colonies from SS or BG were added and homogenized for 3 min, using a bacteriological loop. Agglutination was considered as a positive result<sup>(9)</sup>.

All isolates identified as *Salmonella* spp., were faced on a glass plate to 50 ml each of the following antisera: one group C *Salmonella*, somatic group O antiserum (*Salmonella* O Group C1, factors 6, 7) (Becton Dickinson de México. Cat. 229491) and one serum containing group D1 factors 1, 9, 12 (Becton Dickinson de México. Cat. 229491). All *Salmonella* spp. isolates were seeded on SS or BG plates. Colonies were taken, added, and homogenized with a loop. Agglutination within 3 min was considered as a positive result<sup>(9,11)</sup>.

#### *Statistical analysis*

CFU counts were transformed to log 10. Transformed data showed normality by the Shapiro-Wilk's test ( $P > 0.05$ )<sup>(12)</sup>. An analysis of variance was then performed using the following equation:

$$\gamma_{ijk\lambda} = \mu + A_i + e_{ijk\lambda}$$

where:  $\gamma_{ijk\lambda}$  = response variable;  $\mu$  = general mean;  $A_i$  = effect of sample type (1 = sedimentation pit; 2 = fluid after Filter 1; 3 = fluid after Filter 2; 4 = fluid after Filter 3);  $i = 1, 2, 3, 4$ ;  $e_{ijk\lambda}$  = experimental error.

Differences among means were determined by Tukey's test using the JMP statistical software<sup>(13)</sup>.

#### *Stage 2*

Stage 2 was conducted in DPAC's isolation pens. For this stage, water from Filter #3 was drawn by

de *Salmonella* grupo somático O (*Salmonella* O Grupo C1, factores 6, 7) (Becton Dickinson de México. Cat. 229491) y otro que contenía el grupo D1, factores 1, 9, 12 (Becton Dickinson de México. Cat. 229491), en una placa de vidrio. Posteriormente con un asa bacteriológica se tomaron colonias de agar SS o VB previamente sembrado con *Salmonella* y se homogeneizaron con la misma asa bacteriológica, considerándose como positivo si se presentaba aglutinación durante los tres primeros minutos<sup>(9,11)</sup>.

#### *Análisis estadístico*

Los resultados de las UFC, se transformaron para obtener el logaritmo base 10; los datos transformados demostraron normalidad por la prueba de Shapiro-Wilk ( $P > 0.05$ )<sup>(12)</sup>. Posteriormente se realizó un análisis de varianza con el siguiente modelo:

$$\gamma_{ijk\lambda} = \mu + A_i + e_{ijk\lambda} \quad \text{donde:}$$

$\gamma_{ijk\lambda}$  = variable de respuesta;  $\mu$  = media general;  $A_i$  = efecto del tipo de muestra (1 = fosa de sedimentación, 2 = líquido después del primer filtro, 3 = líquido después del segundo filtro, 4 = líquido después del tercer filtro),  $i = 1, 2, 3, 4$ ;  $e_{ijk\lambda}$  = error experimental.

Las diferencias entre medias se determinaron con la prueba de Tukey, por medio del paquete estadístico JMP<sup>(13)</sup>.

#### *ETAPA 2*

Esta fase se realizó en los corrales de la unidad de aislamientos del DPAC. Para esta etapa se empleó agua del tercer filtro, obtenida con ayuda de un dispositivo hidráulico y se depositó en contenedores de plástico, los cuales fueron trasladados desde la granja al DPAC, manteniéndolos a temperatura ambiente para igualar las condiciones en las que esta agua permanece en la granja.

Se utilizaron 27 cerdos híbridos de 35 días de edad sin antecedentes clínicos de enfermedad entérica. Al inicio de la prueba se sacrificó al 10 % de los animales (3 cerdos), para verificar la ausencia o presencia de enterobacterias, para ello los cerdos

hidráulico pumping into plastic containers then taken to the DPAC farm. Containers were kept at ambient temperature as to mimic farm conditions.

Twenty seven 35-d old hybrid pigs with no clinical history of enteric disease were used. Ten percent of these animals (three pigs) were killed at test start for the presence or absence of enterobacteria. For this purpose, pigs were first tranquilized with azaperone (Sural, Laboratorios Chinoín Productos Farmacéuticos, SA de CV) at a dose rate of 2 mg/kg/IM, then anesthetized with a tiletamine-zolazepam combination (Zoletil, Laboratorios Virbac México, SA de CV) at a dose rate of 0.15 to 0.5 mg/kg/IM then killed by decollation. At posting, ileocecal valve, liver, liver including gall bladder (Li/Gb), mesenteric lymph nodes, stomach and duodenum samples were collected and submitted to the DPAC laboratory for bacteriological analysis.

The remaining 24 pigs were randomly housed in three washed/disinfected isolation units. Each isolation unit is accessed directly from outdoors through separate dressing rooms, and is provided with a separate sewer and a security gate, with a boot pad embedded in a synthetic phenol-based broad-spectrum disinfectant (Ambientrol, Novartis Salud Animal SA de CV). Throughout the experiment, each unit was managed by a different person. These units have two 6 x 4 m pens with 33 % slatted plastic floors and 66 % solid floors. Wooden walls were used to divide the pens, for a total 12 pens. Two pigs were housed per pen. Originally, pigs remained in the pens for a 6-d adaptation period, and they were fed a commercial nursery feed<sup>(14)</sup> *ad libitum*. Hydraulic net water was provided for drinking.

Three treatment groups were used, i.e.: T1 = water from the swine farm filtration system treated with chlorine. This water was set aside for 24 h prior to being offered to the pigs; T2 = water from the swine farm filtration system; T3 = potable water from DPAC hydraulic net.

Each treatment group was housed per isolator. Facilities were adapted as to have a total of four pens per treatment. One plastic feeder and one 8 L piglet nipple drinker were placed in each pen.

fueron tranquilizados con Azaperona (Sural, Laboratorios Chinoin Productos Farmacéuticos, SA de CV) a una dosis de 2 mg/kg/IM, posteriormente se anestesiaron con Tiletamina-Zolazepam (Zoletil, Laboratorios Virbac Mexico, SA de CV) a una dosis de 0.15 a 0.5 mg/kg/IM; una vez anestesiados fueron sacrificados por degüello. A la necropsia se tomaron muestras de válvula ileocecal (VI), hígado (Hi), hígado incluyendo vesícula biliar (Hi/V), linfonodos mesentéricos (Lm), estómago y duodeno (E/D), estas muestras se analizaron en el laboratorio de bacteriología del DPAC.

Los 24 cerdos restantes se distribuyeron al azar en tres unidades de aislamiento, previamente lavadas y desinfectadas; cada unidad tiene un acceso directo del exterior y un vestidor diferente, drenajes separados y una puerta de seguridad con un tapete sanitario con desinfectante de amplio espectro a base de fenoles sintéticos (Ambietrol, Novartis Salud Animal SA de CV); cada unidad fue operada durante el experimento por una persona diferente. Estas unidades tienen dos corrales de 6 x 4 m, con piso de rejilla plástica (33 %) y sólido (66 %). Los corrales se dividieron con una pared de madera para hacer un total de 12 corrales, con capacidad para dos animales. Los animales permanecieron en adaptación durante seis días, se les alimentó a voluntad con un alimento comercial que cubrió las necesidades correspondientes a la etapa de destete<sup>(14)</sup>, y se les proporcionó agua de la red hidráulica como agua de bebida.

Se establecieron tres tratamientos, T1=agua proveniente del sistema de filtración de la granja porcina, con un tratamiento a base de cloración (FC), la cual se dejó reposar 24 h antes de darla a tomar a los cerdos; T2=agua proveniente del sistema de filtración de la granja porcina (F); T3=agua proveniente de la red hidráulica propia del DPAC y considerada como potable (P).

Para cada tratamiento se utilizó una unidad de aislamiento. Los locales fueron adaptados para tener un total de cuatro corrales por tratamiento, en cada corral se colocó un comedero de plástico y un bebedero de chupón para lechones con capacidad de 8 L.

On the day when test started, pigs were weighed and randomly allotted to the different treatment groups. Two pigs were housed per pen, for a total of 8 replicates per treatment. All variables were individually evaluated in each pig. All pigs were water-fasted for 3 h for them to drink their corresponding treatment water at test start. Feed and water were then offered *ad libitum* and intake was recorded. Clinical inspections were performed every 12 h for scours and fever. Rectal temperatures were individually recorded every 24 h using a digital thermometer, for 13 d. On d 14 all 24 animals were killed and necropsied. Iliocecal valve, liver, and mesenteric lymph node samples were collected. Bacteriological analytical procedures were the same as those described for Stage 1.

#### *Variables evaluated*

Per-pen response variables included daily feed intake, total feed intake, daily water intake, and total water intake. Per-pig response variables included: per-test-day average body temperature, per-test-day clinical condition including the following category variables: feces (0=normal; 1=watery; 2=pasty), and weight gain. Finally, animals were killed at test end, and iliocaecal valve, liver/gall bladder, and mesenteric lymph node samples were collected for bacterial isolation.

#### *Statistical analysis*

Daily feed intake, total feed intake, daily water intake, total water intake, weight gain, and feed conversion rate data were subjected to analysis of variance (ANOVA). Body temperatures were plotted on a parallel profile graph which was then used for the ANOVA of each daily temperature record. Per-day/per-treatment group categorical clinical condition data was analyzed using the Kruskal-Wallis' test. Bacterial isolates were subjected to a descriptive analysis. Analyses were performed using the JMP software<sup>(13)</sup>.

#### *Stage 1*

No enterobacteria differences ( $P > 0.05$ ) were found, but a trend existed for counts to decrease as the effluent progresses through the treatment system

El día en que inició la prueba los cerdos fueron pesados y distribuidos al azar en los distintos tratamientos, en cada corral se alojaron dos cerdos, teniendo ocho repeticiones por tratamiento y evaluar en cada cerdo todas las variables contempladas. A los cerdos se les restringió por 3 h el acceso al agua, para que una vez empezada la prueba ingirieran el agua del tratamiento correspondiente. Posteriormente se les proporcionó agua y alimento *ad libitum* registrando la cantidad. Cada 12 h se hizo la inspección clínica, la cual consistió en observar si alguno de los animales presentaba fiebre y diarrea. Cada 24 h se hizo la toma de temperatura rectal de cada cerdo con un termómetro digital por 13 días, y el día 14 se llevó a cabo la necropsia de los 24 cerdos y se tomaron muestras de VI, Hi y Lm. Los procedimientos para los análisis bacteriológicos fueron iguales a los descritos en la Fase 1.

*Variables a evaluar*

Las variables de respuesta por corral fueron: consumo diario de alimento (CDAI), consumo total de alimento (CTAI), consumo diario de agua (CDAg) y consumo total de agua (CTAg). Las variables de respuesta por cerdo fueron: promedio de temperatura corporal por día de prueba (TC), estado clínico (EC) por día considerando las siguientes variables categóricas (0= heces normales; 1= heces acuosas, 2= heces pastosas) y ganancia de peso (GP). Finalmente, al terminar la prueba se sacrificaron los animales y se obtuvieron muestras de VI, Hi/V y Lm para el realizar el aislamiento.

(Table 1). Sedimentation pit values exceeded those reported in other 10 farms in central Mexico with systems including solid separation and effluent sedimentation ( $3.9 \times 10^5$  CFU/ml)<sup>(11)</sup>. A different study reported counts of  $9.0 \times 10^6$  CFU/ml in the sedimentation pits of farms with separation/sedimentation systems<sup>(8)</sup>. Nevertheless, these values were lower than those reported in a different paper after 10, 14, and 18 d of residence in the sedimentation pit, with counts ranging from  $2.11 \times 10^9$  CFU (10 d) to  $2.87 \times 10^7$  CFU (18 d)<sup>(15)</sup>. Our findings are explained by the rather short (7-d) residence time in the system that we evaluated.

*Salmonella* spp. was isolated from 6 (15 %) of the 40 samples analyzed (One sedimentation pit sample [10 %]), two Filter #1 samples [20 %], one Filter #2 sample [10 %], and two Filter #3 samples [20 %]). All (100 %) of these isolates were typified as *S. enterica*.

These results differ from those reported by García<sup>(8)</sup>, where the bacterium was isolated from 30 % of the samples analyzed. We must remember that different factors affect the presence of enterobacteria such as aerobic/anaerobic fermentation or degradation, volatile fatty acid concentrations (since these acids have inhibitory or bactericidal activities), decreased pH, or constant removal of slurry from the sedimentation pit<sup>(15)</sup>.

The general evaluation of the separation/sedimentation/filtration treatment showed no differences in enterobacterial counts from entrance

Cuadro 1. Promedio de unidades formadoras de colonias para la fosa de sedimentación y los tres filtros, y porcentajes de reducción entre etapas

Table 1. Average number of colony-forming units (CFU/ml) in the sedimentation pit and all 3 filters, including per-stage percentage reductions

System phase	N	CFU/ml	Standard error	Reduction (%)
Sedimentation Pit	10	$1.48 \times 10^7$	$2.46 \times 10^7$	-
Filter #1	10	$2.31 \times 10^6$	$1.56 \times 10^7$	14.0
Filter #2	10	$6.9 \times 10^5$	$3.15 \times 10^6$	22.0
Filter #3	10	$8.8 \times 10^5$	$2.17 \times 10^7$	19.9

( $P > 0.05$ ).



*Análisis estadístico*

El análisis de CDAI, CTAI, CDAg, CTAg, GP y CA se efectuó por medio de un análisis de varianza; para TC se empleó una gráfica de perfiles paralelos y a partir de ésta se decidió realizar un ANDEVA para cada uno de los registros diarios de temperatura. Para el EC por día y tratamiento, los datos categóricos se analizaron por medio de una prueba de Kruskal-Wallis; y para el aislamiento bacteriológico se realizó un análisis descriptivo. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico JMP<sup>(13)</sup>.

*Etapa 1*

No se observaron diferencias en la cantidad de enterobacterias ( $P > 0.05$ ), pero sí una tendencia a la reducción del conteo a medida que el líquido avanza por el sistema de tratamiento (Cuadro 1). Los valores obtenidos a partir de la FS fueron mayores a los reportados en 10 granjas en la región central de México, en las que se tenían implementados sistemas de tratamiento con base en la separación de sólidos y sedimentación de la fracción líquida, encontraron  $3.9 \times 10^5$  UFC/ml<sup>(11)</sup>; en otro trabajo se obtuvo un conteo de  $9.0 \times 10^6$  UFC/ml en la fosa de sedimentación de granjas con un sistema de tratamiento a base de separación y sedimentación<sup>(8)</sup>. Sin embargo, estos valores fueron inferiores a lo reportado en un trabajo que al realizar muestreos de la fosa de sedimentación con 10, 14 y 18 días de retención del material, encontraron valores de  $2.11 \times 10^9$  UFC (10 días) a  $2.87 \times 10^7$  UFC (18 días)<sup>(15)</sup>; lo anterior se explica por el corto tiempo de retención con el cual opera el sistema evaluado, que fue de siete días.

Respecto al aislamiento de *Salmonella*, de las 40 muestras analizadas se logró el aislamiento en seis (15 %). De las muestras positivas una correspondió a FS (10 %), dos al primer filtro (20 %), una al segundo filtro (10 %) y dos al tercero (20 %). Al realizar la tipificación de *Salmonella* spp, se comprobó que el 100 % pertenecieron al grupo *S. enterica*.

Estos resultados difieren a un reporte en el que lograron aislar el agente en un 30 % de las muestras analizadas<sup>(8)</sup>. Por lo anterior cabe señalar que existen

to exit from Filter #3. This information is consistent with that reported by Westerman<sup>(16)</sup>, who evaluated enterobacteria and *Salmonella* spp in the effluent using a similar system.

Regarding the effect of the three gravel/sand filters (percolation columns) on enterobacterial counts, no differences were found in the pit, which is consistent with a trial reported elsewhere, evaluating the reduction of enterobacteria in the fluid fraction of a swine farm effluent before and after treatment with a flocculating polymer plus two sand filters. In such study, total coliform counts were  $6.17 \times 10^6$  CFU/ml prior to treatment, but after every step within the system, a consistent trend to decrease pathogen numbers (0.5 to 1 log<sup>10</sup>) was observed<sup>(7)</sup>.

Nevertheless, total bacterial counts in the samples taken at the end of the system greatly exceed the number of coliforms necessary to cause disease ( $1 \times 10^2$ )<sup>(17)</sup>, while the official Mexican Standard (NOM) for water to be considered as potable is 2 CFU coliforms/ml<sup>(18)</sup>. Based on the statements above, it can be concluded that even though a percolation column system with a biolayer can actually decrease physicochemical parameters and smells, the final bacterial load does not comply with the regulations, and it can be a bacterial infection hazard for other farms, human populations, and even for the farm of origin, in the event that effluents are recycled.

*Stage 2*

In the bacteriological analysis of the different water types employed as drinking water for each treatment group, T1 showed a bacterial load of  $4 \times 10^5$  CFU enterobacteria/ml, matching Stage 1 results, while cultures of water samples from T2 and T3 (filter/chlorinated and potable water, respectively) yielded no enterobacterial growth, but small amounts ( $< 2 \times 10^2$  CFU/ml) of other germ types were found. Therefore, full bacterial destruction was not achieved by filtration/chlorination, despite of the fact that the dose of chlorine used (0.18 %) fulfills the recommendation of 20 mg/L<sup>(19)</sup>.

*E. coli* was isolated from the stomach and duodenum of the three animals killed at test start. Iliocaecal

una serie de factores que afectan la presencia de enterobacterias, como es la fermentación o degradación, ya sea anaeróbica o aeróbica, concentraciones de ácidos grasos volátiles que tienen una actividad inhibitoria o bactericida, la disminución del pH y por último, la remoción constante del material que se encuentra en la fosa de sedimentación<sup>(15)</sup>.

La evaluación global del tratamiento separación-sedimentación-filtración, no mostró diferencias en el conteo de enterobacterias desde que el agua ingresa al sistema, hasta que sale por el tercer filtro; lo que coincide con lo reportado por Westerman<sup>(16)</sup>, quien al evaluar un sistema semejante observó reducciones similares de enterobacterias y *Salmonella* en el efluente.

En cuanto al efecto de los tres filtros de grava y arena (columnas de percolación) sobre la cantidad de enterobacterias, no se detectaron diferencias respecto a la FS, esto concuerda con un trabajo en el que se evaluó la reducción de enterobacterias en la fracción líquida de los desechos porcinos, antes y después de pasar por un sistema de tratamiento a base de un polímero floculante y el uso de dos filtros de arena. En dicho estudio los coliformes totales antes del tratamiento fueron de  $6.17 \times 10^6$  UFC/ml, logrando en cada paso en el sistema de tratamiento una tendencia constante en la reducción de los patógenos de un 0.5 a 1 log<sup>10</sup><sup>(7)</sup>.

Sin embargo, la carga bacteriana encontrada en la muestra final del sistema supera por mucho la

valve, liver/gall bladder, and mesenteric lymph node samples were negative to enterobacteria. Therefore, these animals were considered as negative to *Salmonella* spp. The isolation of *E. coli* means that these animals might have been experiencing a sub-clinical post-weaning infection with no clinical signs. This means that these animals might have experienced some GI defense mechanism upset, which is not unusual in nursery pigs<sup>(20)</sup>.

Regarding clinical conditions, even though statistical differences were found in the number of animals with normal, watery, or pasty feces among treatment groups on d 4, 5, 8, and 11, results were not consistent, since more animals with pasty feces were found in T2 and T1 as compared to T3, while animals with watery feces were only found in T1 (Table 2). Nevertheless, animals in T1 with pasty feces on d 5 and 8 post-treatment showed no depression or increased body temperature that could be associated with an infectious process. T1 pigs showed watery feces only on d 11 of the experiment, but given that no increased body temperature was observed, a potential infections problem was ruled out. Watery feces can be attributed to intestinal flora alterations due to chlorine water treatment, since the excessive intake of chlorine can be deleterious for the normal GI microflora, resulting in digestion/absorption alterations in both the stomach and the intestine<sup>(21,22)</sup>.

T3 pigs never showed pasty feces, but this alteration was found in T1 and T2 pigs during the first week

Cuadro 2. Número de animales con heces normales (0), pastosas (1) y acuosas (2) por tratamiento y día posinoculación  
Table 2. Per-treatment/per post-inoculation day number of animals with normal (0), pasty (1) or watery (2) feces

Day	Filtered/chlorinated water			Filtered water			Potable water			P
	0	1	2	0	1	2	0	1	2	
4	8	0	0	2	6	0	8	0	0	0.0001
5	4	4	0	2	6	0	8	0	0	0.001
6	8	0	0	6	2	0	8	0	0	0.09
8	5	5	0	8	0	0	8	0	0	0.023
11	7	0	1	2	2	0	8	0	0	0.014

P = Probability.

Only data of animal days with diarrhea is shown.

cantidad de coliformes que se considera necesaria para producir enfermedad, que es de  $1 \times 10^2$ <sup>(17)</sup> mientras, que el dato que marca la NOM para considerar el agua potable es de 2 UFC/ml de coliformes<sup>(18)</sup> Con base en lo anterior se puede concluir que si bien un sistema de columnas de percolación con biocapa puede ser indicado para reducir parámetros físico-químicos y olores, la carga bacteriana final no cumple con las normas, y puede ser un riesgo de infección bacteriana para otras granjas, poblaciones humanas e incluso para la misma granja en caso de reciclaje.

### Etapa 2

Con el análisis bacteriológico de los diferentes tipos de agua empleados como agua de bebida en cada tratamiento, se encontró en T1 una carga de  $4 \times 10^5$  UFC/ml de enterobacterias, lo que coincide con los resultados de la fase 1 del estudio; mientras que en el agua suministrada en T2 y T3 FC y P, no se detectó crecimiento de enterobacterias, pero sí otro tipo de gérmenes en cantidades pequeñas ( $< 2 \times 10^2$  UFC/ml). Lo anterior permite establecer que en el caso de FC, no se logró una completa destrucción de las bacterias a pesar de que la dosis de cloro empleada (0.18 %) cumple con la recomendación de dosificación de 20 mg/L<sup>(19)</sup>.

Con respecto a los tres animales sacrificados al inicio de la prueba para verificar la ausencia o presencia de enterobacterias, sólo se detectó *E. coli* a partir de estómago y duodeno; las muestras VB, Hi/V y Lm, fueron negativas a enterobacterias y por lo tanto se consideraron negativas a *Salmonella*. El hecho de detectar *E. coli*, indica la posibilidad de que estos animales estuvieran sufriendo una infección post-destete, la cual si bien no les causó signos clínicos, sí indica que los animales tendrían alguna dificultad con los mecanismos de defensa del tracto digestivo, lo cual no es raro en animales recién destetados<sup>(20)</sup>.

Aunque se observaron diferencias estadísticas en el número de animales (EC) con heces normales, acuosas y pastosas entre los tratamientos, los días 4, 5, 8 y 11, los resultados fueron inconsistentes, ya que se observó una mayor cantidad de animales con heces pastosas en T2 y en T1 respecto a T3;

of water intake, which could possibly mean a digestive upset caused by *E. coli*, associated with the isolation of this particular organism from the stomach and duodenum of the animals killed at test start.

T2 pigs had pasty feces for more days than T1 pigs, but both cases were different from T3, meaning that both filtered water and filtered/chlorinated water had elements that can alter homeostasis in the GI tract. This can be related with the bacteriological results obtained from filtered water samples early in the test, when the presence of enterobacteria was confirmed.

These findings are consistent with another experiment<sup>(23)</sup> which reported that 3-wk-old pigs infected with *Salmonella typhi* at the high dose of  $1 \times 10^{10}$  CFU/ml passed totally asymptomatic, but differ from other reports<sup>(24,25)</sup> showing that the oral challenge with *S. typhimurium* and *S. choleraesuis* ( $1 \times 10^9$  CFU/ml), resulted in 100 % diarrhea, even though these authors reported that when the challenge dose was decreased to  $1 \times 10^6$ , animals showed no diarrhea.

Similarly, the presence of diarrhea and 100 % infection in 14-d-old weaning pigs infected orally with *S. choleraesuis* at a dose of  $8 \times 10^9$  CFU/ml was reported, while  $8 \times 10^4$  and  $8 \times 10^6$  CFU caused infection expressions only in 10 % and 40 % of inoculated animals, respectively<sup>(26,27)</sup>.

Regarding daily water intake, differences ( $P < 0.05$ ) were found among treatments on d 1, 10, and 13, while total water intake was similar for T1 (77.40 L), T2 (85.39 L) and T3 (77.44 L) (Table 3). The average water intake per pig during the experiment exceeded the recommendations for pigs of this age and weight<sup>(14)</sup>. Interestingly, on two of the three days where water intake differences were found among treatment groups, the smallest water intake occurred in T1, which can be associated with the taste and/or smell of chlorinated water, particularly on d 1, even though Anderson *et al*<sup>(22)</sup> stated that the administration of chlorine ions in the water does not affect water intake in weaning pigs.

Contrary to our expectations, the highest total water intake occurred in T2, which can be explained by

mientras que animales con de heces acuosas sólo se observaron en T1 (Cuadro 2). Sin embargo, los animales de T1 que presentaron heces pastosas los días 5 y 8 postratamiento, no mostraron un cuadro clínico de decaimiento, o incluso un incremento en la temperatura corporal que pudiera asociarse a un trastorno infeccioso. Los cerdos de este tratamiento presentaron heces de tipo acuoso exclusivamente el día 11 después de haber iniciado el experimento, pero tampoco se asocia con un incremento de la temperatura corporal, por lo que se descarta un problema infeccioso. En este último caso se puede pensar que la presencia de heces acuosas puede deberse a alteraciones en el contenido de la flora intestinal, lo cual coincide con el consumo de cloro en el agua, ya que un exceso en el consumo de esta sustancia puede ser nocivo para la flora normal del tracto digestivo, generando con ello deficiencias en los procesos de digestión y absorción, tanto en estómago como en intestino<sup>(21,22)</sup>.

Respecto a la presentación de heces pastosas, los cerdos de T3 siempre estuvieron libres de éstas, mientras que en algunos animales de T1 y T2 se presentaron heces pastosas durante la primera semana del suministro de agua, esto puede indicar la posibilidad de un trastorno de tipo digestivo, el cual puede deberse a un problema infeccioso causado por *E. coli*, lo que estaría justificando el aislamiento a partir de estómago y duodeno de los cerdos sacrificados al inicio de la prueba.

Los cerdos de T2 presentaron heces pastosas durante un mayor número de días en comparación a T1; sin embargo, en ambos casos se estableció diferencia con los cerdos de T3, lo que indica que F y FC tienen elementos que pueden alterar la homeostasis del tracto digestivo; lo anterior puede estar asociado con los resultados bacteriológicos de F al inicio de la prueba, en donde se confirma la presencia de enterobacterias.

Estos hallazgos concuerdan con un trabajo donde se reporta que cerdos de tres semanas de edad infectados con *Salmonella typhi*, incluso a una dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC/ml son totalmente asintomáticos<sup>(23)</sup>, pero difieren de los trabajos de diversos autores quienes señalan que el desafío por vía oral con *S.*

Cuadro 3. Promedio del consumo de agua diario y total, para los diferentes tratamientos (L)

Table 3. Average daily water intake and total water intake, in the different treatment groups (L)

Day	T1	T2	T3	SE
1	3.21 <sup>b</sup>	4.87 <sup>ab</sup>	5.01 <sup>a</sup>	0.44
7	4.98 <sup>a</sup>	7.23 <sup>b</sup>	6.73 <sup>ab</sup>	0.48
10	7.00 <sup>a</sup>	8.68 <sup>b</sup>	7.60 <sup>ab</sup>	0.41
13	7.95 <sup>ab</sup>	9.02 <sup>a</sup>	6.67 <sup>b</sup>	0.45
total	77.40	85.39	77.44	4.18

T1= Filtered/chlorinated water; T2= filtered water; T3= Potable water; SE= Standard error.

<sup>ab</sup> Different superscripts within a line mean significant differences ( $P < 0.05$ ).

Only data of days with statistical differences is shown.

the fact that animals with scours or body temperature changes require larger amounts of water than health animals of the same age<sup>(28,29)</sup>.

Differences ( $P < 0.05$ ) were found in daily feed intake from d 4 to 9 of the experiment in T2, as compared with T1 and T3. Differences ( $P < 0.01$ ) were also found in total feed intake with larger intakes in T1 (16.14 kg), followed by T3 (15.95 kg) and T2 (15.33 kg). Nonetheless, no differences were found in weight gain and feed conversion rate (Table 4). T2 pigs had the lowest daily feed intake throughout the test, which can be explained by a sub-clinical infection, since as stated by Balaji *et al*, signs such as scours and fever can result in reduced feed intake<sup>(24)</sup>. These signs were not very evident in our study, but they did exist. For example, T2 pigs showed higher body temperature on d 3 and 4 after starting to drink the water, and even though such temperatures were not too high, they can be considered as fever in animals of that age<sup>(20)</sup>. Water intake is important since it has an impact on voluntary feed intake, animal performance, health status, and body temperature.

Decreased feed intake in T2 as compared to T1 and T3, was seen on d 4 to 9 of the test, but it recovered and reached the same level as that in the

*typhimurium* y *S. choleraesuis* con dosis de  $1 \times 10^9$  UFC/ml, causan un 100 % de animales afectados con diarrea<sup>(24,25)</sup>, aunque los últimos autores reportan que al disminuir la dosis a  $1 \times 10^6$  los animales no presentaron signos de diarrea.

De la misma manera se reporta la presencia de diarrea y un 100 % de infección en cerdos destetados de 14 días de edad, infectados oralmente con *S. choleraesuis*, a dosis de  $8 \times 10^9$  UFC/ml; mientras que a dosis de  $8 \times 10^4$  y  $8 \times 10^6$  UFC la infección se manifiesta sólo en el 10 y 40 % de los animales inoculados, respectivamente<sup>(26,27)</sup>.

En cuanto al CDAg se encontraron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos los días 1, 10 y 13; mientras que el consumo total de agua fue similar para T1=77.40 L, T2 =85.39 L y T3=77.44 L (Cuadro 3). El consumo de agua promedio por cerdo durante el experimento fue superior a lo recomendado para cerdos de esa edad y peso<sup>(14)</sup>. Es interesante notar que en dos de los tres días donde se observaron diferencias entre tratamientos para el consumo de agua, el menor consumo fue en T1, lo que puede asociarse al sabor o al olor del agua clorada, especialmente en el primer día, aunque por el contrario, se mencionan que el suministro de iones de cloro en el agua no afecta el consumo de ésta en cerdos destetados<sup>(22)</sup>.

Contrario a lo esperado, en el presente trabajo el mayor consumo total de agua se dio en T2, lo que puede explicarse con base en que animales con cuadros de diarrea o cambios en la temperatura corporal, requieren mayor cantidad de agua, en comparación con animales sanos de la misma edad<sup>(28,29)</sup>.

En el CDAI se observaron diferencias ( $P < 0.05$ ) del día 4 al 9 de experimentación entre T2, con respecto a T1 y T3; también se observaron diferencias ( $P < 0.01$ ) en el CTAI, con mayores consumos en T1 (16.14 kg), seguido por T3 (15.95 kg) y por último T2 (15.33 kg). Sin embargo, no se observaron diferencias para GP y CA (Cuadro 4). El menor consumo diario de alimento y durante toda la prueba fue observado en los cerdos de T2, lo cual puede explicarse por la presentación

Cuadro 4. Promedio (kg) del consumo de alimento diario y total (TFI), ganancia de peso total (TWG) y conversión alimenticia (FCR), por tratamiento

Table 4. Average (kg) daily and total feed intake (TFI), total weight gain (TWG), and feed conversion rate (FCR), per treatment

Day	T1	T2	T3	SE
4	1.000 <sup>a</sup>	0.910 <sup>b</sup>	1.000 <sup>a</sup>	0.022
5	0.947 <sup>a</sup>	0.792 <sup>b</sup>	0.935 <sup>a</sup>	0.017
6	0.950 <sup>a</sup>	0.795 <sup>b</sup>	0.950 <sup>a</sup>	0.016
7	1.251 <sup>a</sup>	1.189 <sup>b</sup>	1.232 <sup>a</sup>	0.006
8	1.340 <sup>a</sup>	1.286 <sup>b</sup>	1.325 <sup>a</sup>	0.004
9	1.430 <sup>a</sup>	1.384 <sup>b</sup>	1.419 <sup>a</sup>	0.004
11	1.610 <sup>a</sup>	1.578 <sup>b</sup>	1.607 <sup>ab</sup>	0.007
TFI	16.137 <sup>a</sup>	15.327 <sup>b</sup>	15.945 <sup>b</sup>	0.074
TWG	11.38	11.63	14.38	1.11
FCR	1.43	1.39	1.11	0.112

T1= Filtered/chlorinated water; T2= filtered water); T3= potable water; SE= Standard error.

ab Different superscripts within a line mean significant differences ( $P < 0.05$ ).

Only data of days with statistical differences is shown.

other treatment groups on d 12 and 13, in agreement with Balaji *et al*<sup>(24)</sup>, who stated that feed intake returns to normality between 120 and 144 h (5 to 6 d) after the presentation of the clinical signs caused by *S. typhimurium*, showing maximum depression at 48 h after starting to drink the water. This matches the first appearance of pasty feces and the mild increase in body temperature observed in this study.

Body temperature differences ( $P < 0.05$ ) were only found on d 3 and 4; being higher in T2 (39.4 °C and 39.3 °C), than in T3 (38.6 °C and 38.9 °C) and T1 (38.8 °C and 39.0 °C). The highest body temperatures were seen in T2 on d 3 and 4 of the experiment, while per-group mean temperatures in T3 and T1 remained within the normal range for weaning pigs, even though they had a minor temperature increase on d 3 and 4 after test start.

This matches the results obtained by Jeffrey *et al*<sup>(30)</sup>, who exposed pigs intranasally to  $1 \times 10^9$  CFU *S. choleraesuis*, with animals showing fever

subclínica de un problema de tipo infeccioso, ya que se señala que la presentación de signos como diarrea y fiebre originan una disminución del consumo de alimento<sup>(24)</sup>; en el caso de este trabajo esos signos no fueron tan manifiestos, pero sí se presentaron. Por ejemplo, los cerdos de T2 presentaron una mayor temperatura corporal durante los días 3 y 4 después de iniciar el consumo de agua, dichas temperaturas si bien no fueron muy elevadas, pueden considerarse como fiebre en animales de esa edad<sup>(20)</sup>. Es importante señalar el nivel de consumo de agua, ya que afecta el consumo voluntario de alimento, el comportamiento productivo, el estado de salud y la temperatura corporal.

La disminución del consumo de alimento de T2 con respecto a los tratamientos T1 y T3 se presentó del día 4 al día 9 de la prueba, llegando a recuperarse e igualarse con los otros tratamientos los días 12 y 13, esta recuperación coincide con lo citado por Balaji et al<sup>(24)</sup>, quienes señalan que la ingestión de alimento retorna a niveles normales entre las 120 y 144 h (5 y 6 días) después de la presentación de los signos clínicos originados por *S. typhimurium* y teniendo la máxima depresión a las 48 h de iniciado el consumo de agua, lo que concuerda con las primeras heces pastosas y el ligero incremento en la temperatura corporal observado en este estudio.

En TC sólo se presentaron diferencias ( $P < 0.05$ ) los días 3 y 4; siendo ésta mayor en T2 (39.4 °C y 39.3 °C), respecto a T3 (38.6 °C y 38.9 °C) y T1 (38.8 °C y 39.0 °C). En cuanto a la temperatura corporal las más altas se presentaron en T2 durante los días 3 y 4 de la prueba; mientras que en T3 y T1, las temperaturas promedio registradas por grupo, se encontraron dentro del rango normal para cerdos destetados, aunque también se vieron ligeramente incrementadas en los días tres y cuatro posteriores al inicio de la prueba.

Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos al exponer por vía intranasal a cerdos con  $1 \times 10^9$  UFC de *S. choleraesuis*, donde los animales presentaron una respuesta febril a las 48 h, que duró por dos semanas post-inoculación,

at 48 h, which lasted for 4 wk post-inoculation, while animals challenged with only  $1 \times 10^6$  CFU had a mild fever (40.8 °C) towards the 3rd day<sup>(30)</sup>.

In agreement with our study, Metcalf et al<sup>(23)</sup> after inoculating 3-wk-old pigs with  $1 \times 10^{10}$  CFU *S. typhi*, found non-statistical body temperature fluctuations and no clinical signs such as lethargy, depression or abnormal postures, despite of the strong challenge.

Finally, *Salmonella enterica* was isolated from the ileocecal valve and the liver/gall bladder of two T1 pigs, and from the ileocecal valve of one T2 pig, which shows the presence of the bacterium in these two treatment groups, but this does not necessarily mean that the source of infection in T1 was the drinking water, since T2 remained enterobacteria free at all times. Even though the suspicion exists for the fomite transmission of this organism, it is unlikely because of the sound experimental unit design and the stringent management practices used throughout the experiment. This was confirmed by the fact of not finding the organism in T3.

One possible explanation is that animals could have entered the test as carriers, passing unadverted because of the reduced sample size of animals killed at the beginning of the experiment. The presence of this organism only in a few animals can be explained by the results published elsewhere, documenting variable percentage isolations from carriers. For example, *S. choleraesuis* was isolated from the ilion. colon, spleen, liver and tonsils of 2 of 3 infected pigs, while *S. typhi* was isolated from the tonsils of 3 of 6 infected pigs<sup>(31)</sup>.

Similar findings were reported by Gray et al<sup>(25)</sup>, who isolated *S. choleraesuis* from the tonsils, lungs, liver, ileocecal valve, ileocecal lymph nodes, cecum, cecal content, and colon of pigs at 6 and 15 weeks after inoculation with  $1 \times 10^9$  CFU, while the organism was only isolated from the ileocecal lymph nodes of pigs infected 6 wk earlier with  $1 \times 10^6$  CFU.

It is concluded that the water treatment system did not reduce the amount of enterobacteria or the presence of *Salmonella spp.* The separation/

mientras que los desafiados con solo  $1 \times 10^6$  UFC tuvieron una respuesta febril leve ( $40.8^\circ\text{C}$ ) hacia el tercer día<sup>(30)</sup>.

En concordancia con el presente estudio se reporta que al inocular cerdos de tres semanas de edad con *S. typhi* con una dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC, se encontraron fluctuaciones en la temperatura corporal sin la presencia de variación estadística y concluyeron que a pesar de la dosis empleada, no se produjeron signos clínicos de enfermedad como letargia, decaimiento o posturas anormales<sup>(23)</sup>.

Finalmente, se aisló *Salmonella entérica* en VI e Hi/V correspondientes a dos cerdos de T1 y en VI en un cerdo de T2, lo que indica la presencia de la bacteria en estas dos poblaciones; sin embargo, no quiere decir que la fuente o el origen de infección haya sido el agua de bebida en el caso de T1, ya que ésta siempre se encontró libre de enterobacterias; si bien de la anterior afirmación se abre la sospecha que la transmisión del agente se haya realizado a través de fomites, esto es difícil por el diseño de las unidades y el manejo sanitario realizado durante la prueba, lo que se confirma al no encontrar la bacteria en los animales de T3.

Una posibilidad es que los animales llegaran a la prueba en calidad de portadores y no hayan sido detectados con el tamaño de muestra de animales que se sacrificaron al inicio del experimento. La presencia de esta bacteria sólo en algunos de los animales puede explicarse con los resultados presentados por diversos autores, en los cuales se documenta un porcentaje variable en los aislamientos de animales portadores. Por ejemplo, se reportan aislamientos de *S. choleraesuis* a partir de ileon, colon, bazo, hígado y tonsilas en 2 de 3 cerdos infectados, y *S. typhi* a partir de tonsilas en 3 de 6 cerdos infectados<sup>(31)</sup>.

Lo mismo señalaron Gray *et al*<sup>(25)</sup>, quienes lograron el aislamiento de *S. choleraesuis* a partir de tonsilas, pulmón, hígado, conexión ileocecal, nódulos linfáticos ileocecales, ciego, contenido cecal y colon, en cerdos inoculados con  $1 \times 10^9$  UFC con 6 y 15 semanas de infección; mientras que en cerdos inoculados con  $1 \times 10^6$  UFC sólo se logró el aislamiento de *S. choleraesuis* a las seis semanas

sedimentation/filtration (percolation columns) waste water treatment does not suffice to assure the innocuousness of this water after the recycling process. This study demonstrated that drinking the water treated this way by weaning pigs results in increased body temperatures, higher water intake, and lower feed intake, even though weight gain and feed conversion rates were not affected. Drinking water treated by filtration is of public interest, since the intake of wastewater –common in swine production units– without a tertiary treatment such as chlorination, and with large amounts of enterobacteria, can result in the presence of *S. enterica*-infected, healthy carriers.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by the PAPIIT-UNAM number INI223903.

*End of english version*

---

de infección a partir de nódulos linfáticos ileocecales.

Se concluye que el sistema de tratamiento no disminuyó la cantidad de enterobacterias, ni la presencia de *Salmonella* spp. El tratamiento de aguas residuales de granja a base separación, sedimentación y filtración (columnas de percolación), no es suficiente para asegurar la inocuidad de éstas en un proceso de reciclaje, demostrándose con este estudio que el consumo de agua tratada de esa forma en cerdos destetados, causa un incremento en la temperatura corporal y en el consumo de agua; mientras que en el consumo de alimento se observa un efecto negativo, sin que por ello los cerdos se vean afectados en su ganancia de peso y conversión alimenticia. El consumo de agua tratada a base de filtración es de interés público, ya que la ingesta de agua residual común en algunos sistemas de producción, sin un tratamiento terciario como es la cloración y con gran cantidad de enterobacterias, puede generar la

presencia de portadores sanos infectados con *S. entérica*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT-UNAM número INI223903.

## LITERATURA CITADA

1. Pérez ER. Porcicultura y medio ambiente. Memorias del segundo Seminario sobre manejo y reciclaje de residuales porcinos. Querétaro, México DF. Consejo Mexicano de Porcicultura. A.C. e Instituto de Investigaciones Económicas Universidad Nacional Autónoma de México;1997:10-12.
2. Pérez ER. El costo ambiental en granjas porcinas de La Piedad, Michoacán. Estudios agrarios. Revista de la porcicultura agraria 2002;(21):99-145.
3. Jiménez CBE. La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. Colegio de ingenieros ambientales de México AC. Instituto de Ingeniería de la UNAM, FEMISCA. México: Limusa; 2001.
4. Iñigo DC, Aitana AS, Soto AC, Alcaino HC. Caracterización bacteriológica y parasitológica del desecho fecal porcino en Chile. Avances en Ciencias Veterinarias 1991;(1):23-28.
5. Taiganides EP, Pérez ER, Girón SE. Manual para el manejo y control de aguas residuales y excretas porcinas en México. Consejo Mexicano de Porcicultura, AC. 1996.
6. López RR. Aguas residuales municipales y bio-sólidos. Primera ed. México D F: Universidad Nacional Autónoma de México; 2002.
7. Vanotti BM, Millner DP, Hunt GP, Ellison QA. Removal of pathogen and indicator microorganisms, from liquid swine manure in multi-step biological and chemical treatment. Bioresource Technol 2005;96:209-214.
8. García DM. Caracterización de enterobacterias a partir de un sistema de tratamiento de aguas residuales de granja porcina a pequeña escala [tesis licenciatura]. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 2005.
9. Martínez GR, Pradal RP, Castrejón PF, Herradora LM, Galván E, Mercado C. Persistent of *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, Aujeszky's disease virus and Blue Eye disease virus in ensilages base on the solid fraction of pig faeces. J Appl Microbiol 2001;91:750-758.
10. Moeller CHG. Ferat TC. Manual de practicas de Microbiología Sanitaria. DEFFI, Facultad de ingeniería, División de estudios de Posgrado, UNAM, 1993.
11. Ramírez G, Martínez R, Herradora M, Castrejón F, Galvan E. Isolation of *Salmonella* spp. from liquid and solid excreta prior to and following ensilage in ten swine farms located in central Mexico. Bioresource Tech 2005;96:587-595.
12. Leach C. Fundamentos de estadística. Enfoque no paramétrico para ciencias sociales. México DF: Limusa; 1982.
13. JMP. SAS/STAT User Guide 4<sup>th</sup> ed. SAS Inst.Inc. Cary NC. 2000.
14. Nutrients Requirements of swine, National Research Council, 10<sup>th</sup> rev. ed. USA. 1988.
15. Mateau A, Mata-Alvarez J, Parés, R. Enterobacterial and viral decay experimental models for anaerobic digestion of piggery waste. App Mic Bio 1992;38:291-296.
16. Westernman, P. The development of alternative technologies for the processing and use of animal waste. In Animal waste management. Research Triangle Park, NC, USA. NC State University. 2005.
17. Seoáñez CM, Bellas VE, Seoáñez OP. Manual del tratamiento, reciclado, aprovechamiento y gestión de las aguas residuales de las industrias agroalimentarias. Madrid, España: Ed. Mundi-Pensa; 2003.
18. Norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud Ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización". Secretaría de Salud. 1994.
19. United States Environmental Protection Agency. Folleto informativo de tecnología de aguas residuales: desinfección con cloro [en línea] [www.epa.gov/owm/mtb/cs-99-062-pdf](http://www.epa.gov/owm/mtb/cs-99-062-pdf). Consultado 18 de sep 1999.
20. Bertschinger HU, Fairbrother JM. *Escherichia coli* infections. In Straw EB, Sylvie D, Mengeling LW, Taylor JD. Disease of swine. 8<sup>a</sup> ed. Ames Iowa, USA: Iowa State Press; 1999.
21. Pluske JR, Hampson DJ, Williams IH. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. Livest Prod Sci 1997;51:215-236.