

Ácido benzoico y un producto basado en especies de *Bacillus* para proteger la productividad de los lechones y al ambiente

Benzoic acid and a product based on *Bacillus* species to protect piglet productivity and the environment

María Alejandra Pérez Alvarado^a, Jorge Cervantes López^b, Diego Braña Varela^c, Gerardo Mariscal Landín^{a,c}, José Antonio Cuarón Ibarquengoytia^{a,c}

RESUMEN

Se indagó la compatibilidad del ácido benzoico (ABZ) y especies de *Bacillus* (BAC), en la productividad de lechones y su impacto ambiental. En el Ensayo 1, se usaron 180 lechones, durante 42 días. El ABZ (0 ó 5 kg/t) y BAC (0 ó 0.5 kg/t) fueron incluidos en la dieta en un arreglo factorial 2x2 en dos bloques de un diseño de bloques completos al azar. Semanalmente se registró el consumo y peso de los lechones y se colectaron aguas residuales para medir pH, N, NH₃, coliformes, BAC y gasto de agua. En el Ensayo 2, en una granja comercial, se registró la productividad de 384 lechones en 2 tratamientos: un programa de medicación tradicional y otro simplificado por el uso de ABZ y BAC. En el Ensayo 1, se tuvo respuesta al ABZ en la ganancia de peso y eficiencia (13 y 9.5 %; $P < 0.005$); en las aguas residuales bajó ($P < 0.001$) el pH y los coliformes totales. El ABZ no impidió la germinación de BAC, y su uso combinado interactuó ($P < 0.08$) aumentando la fijación del NH₃. El uso de BAC se justifica además, por la reducción en gasto de agua ($P < 0.001$). En el Ensayo 2, ABZ y BAC igualaron la respuesta productiva a la de los antimicrobianos ($P > 0.15$). El ABZ es un recurso para proteger el crecimiento de lechones al destete y reducir la variación en la engorda; es entonces una alternativa al uso indiscriminado de antibióticos, ya que en combinación con BAC, reduce la producción de NH₃ y el gasto de agua.

PALABRAS CLAVE: Crecimiento, Protección ambiental, Antibióticos, Gasto de agua, Amoniaco, Cerdos.

ABSTRACT

The compatibility of benzoic acid (ABZ) and *Bacillus* species (BAC), in productive response of weaned piglets, and environmental impact was examined. In Assay 1, 180 weaned piglets were used during 42 d. Treatments resulted from the factorial arrangement (2x2) of ABZ (0 or 5 kg/kg) and BAC (0 or 0.50 kg/t) in a randomized complete block design. Feed intake and weight gain were recorded weekly, and wastewater was collected to measure pH, N, NH₃, coliforms, BAC, and water waste. In the Assay 2, in a commercial farm, productive performance was recorded from 384 weaned piglets in two treatments: a program of traditional medication, and a simplified, reduced antibiotics, program with the use of ABZ and BAC. The results from Assay 1 showed ABZ effects on body weight gain and feed efficiency (13 and 9.5 %; $P < 0.005$); in waste water reduced ($P < 0.001$) pH and the total coliforms count. The ABZ didn't hindered BAC germination, and their combined use interacted ($P < 0.08$) increasing the capture of NH₃. The use of BAC is also justified given the reduction ($P < 0.001$) in water consumption. In Essay 2, ABZ and BAC reached the same ($P > 0.15$) productive response than the obtained with the antibiotics. Benzoic acid is a resource to protect weaned piglets growth and to reduce body weight variation during finishing; being then an alternative to the indiscriminate use of antibiotics, in combination with BAC reduces NH₃ production and the consumption of water.

KEY WORDS: Growth, Environmental protection, Antibiotics, Water consumption, Ammonia, Pigs.

Recibido el 19 de marzo de 2013. Aceptado el 7 de mayo de 2013.

^a Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y la Salud Animal, Facultad de Estudios Superiores – Cuautitlán, UNAM. México.

^b DSM Nutritional Products México S.A. de C.V. México.

^c Centro Nacional de Investigación en Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP. Km 1 Carretera a Colón, 76280, Ajuchitlán, Colón, Oro. México. brana.diego@inifap.gob.mx. Correspondencia al tercer autor.

INTRODUCCIÓN

El uso irracional de los antimicrobianos como profilácticos en los alimentos para animales, es un cofactor en el desarrollo de patógenos resistentes a los antibióticos^(1,2,3), lo que es una grave preocupación en salud humana y veterinaria^(4,5,6), pero además hay repercusiones ambientales al arrastrarse los fármacos en las excretas^(7,8). Por estas razones, se han buscado alternativas para limitar su uso, por ejemplo, mediante la acidificación de los alimentos con ácidos orgánicos^(9,10) se pueden lograr bloqueos al crecimiento de la microbiota enterotoxigénica⁽¹¹⁾, pero la efectividad es variable dependiendo de sus constantes de disociación (pKa)^(9,12), tanto como de la composición de las dietas⁽¹¹⁾, su capacidad buffer y de las secuelas en la digestibilidad de los nutrientes⁽¹²⁾.

Aun cuando existen pocas citas en la literatura científica sobre el uso del ácido benzoico (o sus sales) aplicado a la producción y salud de los cerdos, se ha mostrado su efectividad por los efectos antibacterianos o antifúngicos⁽¹³⁾, en analogía a su uso casi universal en la conservación de alimentos. Pero su valor profiláctico no está en el poder de acidificación de la ingesta⁽¹⁴⁾ y parece residir en una lenta absorción a nivel intestinal⁽¹⁵⁾, con su posterior transformación metabólica, donde el hígado lo conjuga con glicina para producir ácido hipúrico, que se excreta cuantitativamente en la orina^(15,16). Por lo que, el ácido benzoico puede modificar la microbiota intestinal⁽¹³⁾ y actuar efectivamente para el control clínico de patógenos entéricos^(17,18).

La reducción del pH de la orina por el ácido hipúrico⁽¹⁶⁾, es de interés para la protección ambiental al prevenir la volatilización del amoníaco (NH₃), porque en solución y a un pH ácido, el NH₃ se mantiene en su forma protonada como amonio (NH₄⁺); a menor gasificación, el riesgo de irritar las mucosas de los animales y de sus manejadores se reduce⁽¹⁴⁾, pero el impacto ambiental más grave, la eutrofización, sólo se podrá evitar

INTRODUCTION

The irrational use of antimicrobials as prophylactic additives to animal feed is a cofactor in the development of pathogens resistance to antibiotics^(1,2,3), which is of great worry in human and veterinary health^(4,5,6), furthermore, there are environmental repercussions as a result of the dragging of such drugs in feces^(7,8). It is for this reason, that alternatives have been sought aimed to limit their use and, by acidification of fodders with organic acids^(9,10), for instance, it is possible to block the growth of enterotoxigenic microbiota⁽¹¹⁾. However, this has proved variable in effectiveness depending on the dissociation constant (pKa)^(9,12), the diet composition⁽¹¹⁾, their buffer capacity, and nutrient digestibility effects⁽¹²⁾.

Nonetheless the few references in scientific literature applied to swine health and production, the benzoic acid (or its salts) has proved a peculiar effectiveness given its antibacterial and antifungal properties⁽¹³⁾ in its almost universal analogy to food preservation. Its prophylactic value, though, is not in its acidification of the ingesta⁽¹⁴⁾, but seems to be in the slow intestinal absorption⁽¹⁷⁾ and the posterior metabolic transformation of the molecule at the liver, where is conjugated with glycine to hippuric acid, which is eliminated quantitatively in the urine^(17,18). This way, benzoic acid is able to modify the intestinal microbiota⁽¹³⁾ and act effectively in the clinical control of enteric pathogens^(19,20).

Urine pH reduction by hippuric acid⁽¹⁸⁾ is of interest for environmental protection purposes, at preventing volatilizing of ammonia (NH₃). This is because NH₃ in solution and in an acid pH, it is kept in its protonated form as ammonium (NH₄⁺); at a lower gasification, the risk of irritating workers' and animals' mucosa is reduced⁽¹⁴⁾. But the more severe environmental impact, eutrophication, may only be prevented whenever the NH₄⁺ is kept in solution or bonded to other forms of nitrogen

cuando se mantenga al NH_4^+ en solución, o se ligue a otras formas de nitrógeno con menor solubilidad. En este contexto, existe un producto basado en esporas viables de cultivos específicos de *Bacillus* (BAC), el que se adiciona a la dieta como recurso de inoculación continua para la degradación de las excretas, con la ventaja de que estas especies usan el nitrógeno no proteico para la síntesis de su proteína y reducen las emisiones de NH_3 ⁽¹⁹⁾, pero no hay evidencia de la posible interacción con el ácido benzoico.

Este trabajo se condujo con la hipótesis de que el ácido benzoico, como recurso para reducir el uso de antibióticos en alimentos para lechones al destete, puede aumentar la fijación del nitrógeno soluble en las excretas, particularmente durante la fermentación, y que la adición de los cultivos de *Bacillus* podría potenciar esta función. Así, los objetivos de este trabajo fueron reducir la carga de antimicrobianos en los alimentos por el uso del ácido benzoico, y medir la interacción al adicionar los cultivos de BAC en el comportamiento productivo de lechones, en las características de las excretas y de las aguas residuales, como recursos para proteger la productividad animal y al ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos ensayos, un experimento en condiciones de granja experimental y la validación de los resultados en el ambiente de una granja comercial con problemas infecciosos. El trabajo de investigación (Ensayo 1) se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP, situado a 20°41'42" N y 100°00'54" O y 1,969 msnm, mientras que el trabajo de validación (Ensayo 2) se llevó a cabo en una granja del estado de Guanajuato (20°36'56" N y 100°58'25" O y 1,744 msnm).

Ensayo 1

Se usaron un total 180 lechones en 36 unidades experimentales (UE), divididas en dos bloques

with lower solubility. In this context, there is a product based on viable spores from *Bacillus* (BAC) specific cultures; this product is added to the diet as a resource for a continuous inoculation, aimed to have degradation of feces, with the advantage that such species use the non-protein nitrogen in the synthesis of their protein, reducing the NH_3 emissions⁽²¹⁾, but there is no evidence of possible interaction between it and the benzoic acid.

This study was performed under the hypothesis that the benzoic acid, as source for the reduction in the use of antibiotics in feed intended for weaning piglets, may increase the fixation of the soluble nitrogen from the feces, particularly during the fermentation, and the addition of *Bacillus* cultures may enhance that function. In this way, the objectives of the study were to reduce the antibiotics load in feed replaced by benzoic acid, and to measure the interaction at the addition of BAC cultures in the productive behavior of piglets, in the characteristics of the feces, and on waste water, as a resource aimed to protect the animal productivity and the environment.

MATERIALS AND METHODS

Two assays are presented: One experiment was carried out under experimental farm conditions while the validation of results was performed under a commercial farmstead with infectious problems. The research work (Assay 1) was carried out in the facilities of the INIFAP National Disciplinary Research Center for Physiology and Animal Improvement, located at 20°41'42" N and 100°00'54" W, and 1,969 m asl, while the validation work (Assay 2) was carried out in a farm in the State of Guanajuato (20°36'56" N and 100°58'25" W, and 1,744 m asl).

Assay 1

A total of 180 piglets in 36 experimental units (EU) were used, divided in two blocks (consecutive groups at weaning), with 20 EU in the first block and 16 EU in the second; each

(grupos consecutivos al destete), siendo 20 UE en el primer bloque y 16 en el segundo; la UE fue una jaula o corral con cinco lechones (tres machos castrados y dos hembras o tres hembras y dos machos, equilibrado entre tratamientos). En ambos bloques, los lechones se pesaron un día antes del destete y, con base en grupos contingentes por camada de origen, sexo y peso corporal, se aleatorizaron conforme a un diseño de bloques completos al azar, asignándose a los tratamientos y jaulas. La edad y peso promedio de los lechones al destete, al inicio del experimento, fue de 21 ± 1.6 días y 6.1 ± 1.17 kg.

El experimento se condujo durante las seis semanas posteriores al destete y se dividió en dos etapas, cada una de 21 días, con objeto de crear dos situaciones de estrés, por el destete y por el cambio de alojamiento, manejo ambiental y alimentación. En la primera etapa, los lechones se alojaron en una sala de ambiente controlado por un calentador de gas y ventilación natural. El edificio tiene 24 jaulas elevadas con piso de rejilla de plástico, para una superficie total de 1.63 m^2 y efectiva de 1.36 m^2 , cada jaula cuenta con un comedero tipo tolva con seis bocas de alimentación y un bebedero de chupón al lado opuesto. Los lechones recién destetados se recibieron a una temperatura promedio del termostato de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y cada semana se disminuyó en $4 \text{ }^\circ\text{C}$, hasta alcanzar un promedio de $22 \text{ }^\circ\text{C}$ en la tercera semana posdestete. Los últimos 21 días del ensayo se condujeron en un edificio de tipo frente abierto, sin más control ambiental que el uso de cortinas. El edificio tiene 24 corrales con piso sólido de concreto, para una superficie total de 6.19 m^2 y efectiva de 5.40 m^2 . Cada corral cuenta con un comedero húmedo con tolva, que incluye un bebedero de chupón en el plato de consumo y un bebedero de chupón adicional, al lado opuesto del comedero. Al pasar de la sala de destete al edificio de frente abierto, se mantuvo la secuencia e identidad de las UE.

Se partió de un programa comercial de "preiniciadores" (Unión Ganadera Regional de

EU consisted in a cage with five piglets (3 castrated males and 2 sows, or 3 sows and 2 males, balanced among treatments). In both blocks, piglets were weighed the day before weaning and, based on equivalent groups of litter of origin, sex and body weight, they were randomly allotted according to a randomized complete block design, assigning them to treatments and pens. The average age and weight of the weaning piglets at the beginning of the experiment was 21 ± 1.6 d and 6.1 ± 1.17 kg.

The experiment was performed within 6 wk after weaning and was divided in two stages, 21 d each, in order to create two stressful situations, one due to weaning and the other due to the change of housing, environmental management and feeding. During the first stage, piglets were housed in a room under controlled environment with gas heater and natural ventilation. The building had 24 elevated cages with plastic grid floor, for a total surface of 1.63 m^2 and effective surface of 1.36 m^2 ; each cage counted with a hopper type feeder with a through capacity of six feed gullets and a nipple drinker on the opposite side. Newly weaned piglets were received at an average thermostat temperature of $30 \text{ }^\circ\text{C}$ and each week this temperature was reduced in $4 \text{ }^\circ\text{C}$ until reaching an average temperature of $22 \text{ }^\circ\text{C}$ at the third week post weaning. The last 21 d of the assay, pigs were conducted to a building of open front type, with a control of environment no greater than by the use of curtains. The building had 24 pens with concrete solid floor for a total surface of 6.19 m^2 and an effective surface of 5.40 m^2 . Each pen counted with a wet type feeder with hopper; the pen included a nipple drinker at the through and an additional nipple drinker at the opposite side of the through. At taken the animals from the weaning room to the open front building, the sequence and identity of the EUs were kept.

Feeding was based on a commercial program with "pre-starters" (Guanajuato Regional Livestock Union of Swine Producers, Union

Porcicultores de Guanajuato, Irapuato, Gto.), con tres fases de alimentación durante el experimento: Fase 1, primera semana posdestete; Fase 2, semanas 2 y 3 posdestete y Fase 3 durante las tres últimas semanas del ensayo. Normalmente estos alimentos incluyen antibióticos para controlar problemas digestivos y respiratorios, pero sólo se incluyeron los dirigidos al control de afecciones respiratorias diagnosticadas y prevalentes en la granja: se usaron 200 ppm de hidrato de amoxicilina (Amoxicoll[®], Collins División Veterinaria, S. A. de C. V.) en todos los tratamientos de las primeras dos fases de alimentación y 100 ppm de fumarato hidrogenado de tiamulina y 300 ppm de Clortetraciclina (Denagard CTC[®], Novartis Salud Animal, México) en los alimentos de la Fase 3. Por lo demás, los aditivos se manejaron estrictamente como en el programa de alimentación comercial. Todos los alimentos se ofrecieron como pellet, de 2 mm en las fases 1 y 2, cambiando a 3 mm en la Fase 3.

En el Cuadro 1 se detallan los ingredientes y la composición de los alimentos. En las dietas se determinó la materia seca (MS), proteína cruda (PC), calcio (Ca) y fósforo (P) conforme a los procedimientos del AOAC⁽²⁰⁾. Los niveles calculados de energía metabolizable (EM) fueron de 3.45, 3.42 y 3.36 Mcal/kg, para las fases 1 a 3 y de lisina digestible (digestibilidad ileal estandarizada), en la misma secuencia, de 1.35, 1.32 y 1.28 %; con el resto de los aminoácidos limitantes, se mantuvo un perfil de proteína ideal⁽²¹⁾. Con la finalidad de estimular el consumo, los lechones se alimentaron en la sala de destete cuatro veces al día (0800, 1200, 1600 y 2000 h); pasados los primeros 21 días, al cambiar a los corrales en piso e iniciar con el alimento de Fase 3, se sirvió alimento sólo una vez al día (0800 h).

Los tratamientos resultaron del arreglo factorial (2 × 2) de dos niveles de ácido benzoico (ABZ, VevoVital[®], DSM Nutritional Products México), la inclusión o no de 5 kg/t, y dos niveles de una premezcla con esporas viables de tres cepas específicas, dos de *Bacillus subtilis* y una de

Ganadera Regional de Porcicultores Guanajuato, by its name in Spanish, at Irapuato, Guanajuato State), with three feeding Phases along the experiment: Phase 1, first wk post-weaning; Phase 2, wk 2 and 3 post-weaning; and Phase 3 during the last 3 wk of the assay. Normally, feeds included antibiotics aimed to control digestive and respiratory problems, but only those intended for diagnosis and prevalent respiratory affections were included, using 200 ppm of amoxicillin hydrate (Amoxicoll[®], Collins Division Veterinaria, S. A. de C. V.) in all treatments of the first two feeding phases; and 100 ppm of tiamulin hydrogenated fumarate and 300 ppm of chlortetracycline (Denagard CTC[®], Novartis Salud Animal, Mexico) in feeds of Phase 3. For the rest, additives were managed strictly as in a conventional feeding program. All feeds were in form of 2 mm pellets during Phases 1 and 2, changing to 3 mm pellets for Phase 3. The ingredients and the analyzed composition of feeds are detailed in Table 3. The dry matter (DM), crude protein (CP), calcium (Ca), and phosphorus (P) were determined in the diets according to the AOAC procedures (1990). The calculated levels of metabolizable energy (ME) were 3.45, 3.42, and 3.36 Mcal/kg for Phases 1 to 3, respectively; in the case of digestible lysine (standardized ileal digestible) the calculated levels in the same sequence were 1.35, 1.32, and 1.28 %, respectively; while the rest of limiting amino acids were kept at an ideal protein profile (NRC, 2012). In order to stimulate intake, piglets were fed four times a day in the weaning room (0800, 1200, 1600, and 2000 h); after the first 21 d, at changing animals to floored pens and started with the Phase 3 feed, animals were fed just once a day (0800 h).

Treatments resulted from the factorial arrangement (2 × 2) of two levels of benzoic acid (ABZ, VevoVital[®], DSM Nutritional Products Mexico) the inclusion or not of 5 kg/t, and two of a premix with viable spores from three specific strains of *Bacillus subtilis* (2) and one of *Bacillus licheniformis* (BAC, MicroSource[®] S, DSM Nutritional Products Mexico) at 0 or 0.500

Cuadro 1. Composición y análisis de las dietas experimentales

Table 1. Composition and analysis of experimental diets

Ingredient, kg-t ⁻¹	Phase 1 ^{a,b}	Phase 2 ^{a,b}	Phase 3 ^{a,b}	Phase 4	Phase 5	Phase 6	Phase 7
Whey (milk), whole dried	200.00	101.00	---	---	---	---	---
Corn yellow, grain	180.00	200.00	200.00	200.00	150.00	90.00	---
Soybean, meal	150.00	160.00	218.00	136.00	103.60	103.20	55.60
Sorghum, grain	115.70	124.70	393.90	561.82	635.98	679.94	799.38
Oat grain, whole	65.00	50.00	---	---	---	---	---
Egg, whole dried	60.00	60.00	60.00	---	---	---	---
Fish, meal (sardine)	42.00	30.00	---	---	---	---	---
Tallow, clarified	48.00	24.00	22.00	14.00	6.00	6.00	6.00
Wheat, grain	40.00	140.00	30.00	---	---	---	---
Maltodextrins	40.00	40.00	---	---	---	---	---
Canola, meal	20.00	35.00	40.00	60.00	80.00	100.00	120.00
Mono and dicalcium phosphate	12.00	8.00	8.00	4.10	2.80	2.40	1.50
L-Lisine HCL	5.18	6.28	5.94	4.52	4.32	2.97	3.00
Zinc oxide	4.20	---	---	---	---	---	---
Iodized Salt	4.00	4.00	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60
Calcium carbonate	3.50	5.50	8.50	9.50	7.90	7.70	6.80
Vitamins, premix ^c	2.40	2.40	2.20	2.20	2.10	2.00	2.00
Biosaf [®] (<i>Sacch. cerevisiae</i>) ^d	2.00	2.00	1.00	0.50	0.50	---	---
L-Threonine	1.50	2.00	1.90	1.51	1.38	0.89	0.82
L-Tryptophan	0.17	0.32	0.06	0.23	0.15	---	---
Trace minerals, premix ^e	1.00	1.00	1.00	0.90	0.80	0.80	0.80
Butyric acid	1.00	1.00	---	---	---	---	---
DL-Methionine	0.95	1.40	1.45	0.62	0.37	---	---
Amoxicoll [®] ^f	1.00	1.00	---	---	---	---	---
Ronozyme-P5000 (CT) [®] ^g	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Ronozyme-VP [®] ^h	0.20	0.20	0.25	0.30	0.30	0.30	0.30
Denagard-CTC [®] ⁱ	---	---	2.00	---	---	---	---
Total	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Some nutrients content:							
ME, Mcal·kg ⁻¹ ^j	3.45	3.42	3.36	3.30	3.24	3.23	3.22
CP, % ^k	19.31	19.71	19.76	15.49	14.85	15.20	14.03
Digestible lysine, % ^j	1.35	1.32	1.28	0.90	0.84	0.76	0.68
Calcium, % ^k	0.63	0.64	0.64	0.53	0.45	0.44	0.37
Phosphorus, % ^k	0.51	0.51	0.51	0.40	0.38	0.39	0.35

^a Benzoic acid added or not at rate of 5 kg-t⁻¹, at sorghum's expense.

^b *Bacillus* added or not at rate of 0.5 kg-t⁻¹, at sorghum's expense.

^c The vitamin premix contributed the next concentrations of ingredients per kg: Vitamin A, 4,250 UI·g⁻¹; Vitamin D₃, 800 UI·g⁻¹; Vitamin E, 32 UI·g⁻¹; Menadione, 1.5 g·kg⁻¹; Biotin, 120 g·kg⁻¹; Cyanocobalamin, 16 g·kg⁻¹; Choline, 250 g·kg⁻¹; Folic acid, 800 g·kg⁻¹; Niacin, 15 g·kg⁻¹; Pantothenic acid, 13 g·kg⁻¹; Pyridoxine, 2.5 g·kg⁻¹; Riboflavin 5 g·kg⁻¹; Thiamine, 1.25 g·kg⁻¹.

^d Biosaf[®], concentrate of viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* (Sc47, 1 × 10¹⁰ cfu·kg⁻¹), Lesaffre Feed Additives, Safmex, S. A. de C. V.

^e The trace mineral premix contained the next quantities per kg: Co, 0.60 mg; Cu, 14 mg; Fe, 100 mg; I, 0.80 mg; Mn, 40 mg; Se, 0.25 mg; Zn, 120 mg.

^f Amoxicoll[®], Amoxicilin hydrate, equivalent to 200 ppm·kg⁻¹.

^g Ronozyme-P5000 (CT)[®], Covered phytase, 5000 FYT·g⁻¹.

^h Ronozyme-VP[®], Enzymatic complex (α-glucanase, pentanase, hemicellulose, pectinase).

ⁱ Denagard-CTC[®], Tiamulin hydrogen fumarate equivalente to 100 ppm·kg⁻¹ and Clortetracycline equivalente to 300 ppm·kg⁻¹.

^j Calculated composition.

^k Analyzed composition.

Bacillus licheniformis (BAC, MicroSource® S, DSM Nutritional Products México), 0 ó 0.5 kg por tonelada, para resultar en la adición o no de 7.36×10^{10} ufc/t de alimento terminado. Ambos aditivos se incluyeron sustituyendo una cantidad igual de grano de sorgo.

Los lechones se pesaron al inicio (al destete) y semanalmente hasta el día 42 posdestete. Diariamente se registró el alimento ofrecido por UE y al final de cada semana se retiraron y pesaron los remanentes para calcular por diferencia el consumo. El peso de los lechones y el consumo de alimento se registraron desde el inicio y cada semana, para calcular la ganancia diaria de peso (GDP), el consumo diario de alimento (CDA) y la eficiencia alimenticia, expresada ésta como la ganancia en función del consumo (GxC). Diariamente, enseguida de la primera oferta de alimento se realizó una inspección visual de cada una de las UE para calificar la consistencia promedio de las excretas con el uso de una escala de calificación del 1 al 5⁽²²⁾, en donde: 1= secas y duras, 2= normales, 3= pastosas, 4= semilíquidas y 5= líquidas; simultáneamente se llevó un registro de excepciones y observaciones clínicas.

Durante la estancia en el destete, y sólo con el primer bloque, cada semana se instaló un contenedor de plástico afín de una fosa anegada durante 24 h, para coleccionar una muestra de las aguas de desecho (o residuales). El contenido de cada uno de los contenedores se pesó, registrando el volumen y homogeneizando antes de tomar dos muestras, la primera de 1 L para estudios bacteriológicos y la determinación del pH, sólidos totales, nitrógeno total (N), nitrógeno amoniacal (NH₃), nitratos y nitritos, conforme a las Normas Mexicanas (NMX) o las Normas Oficiales Mexicanas (NOM). La segunda muestra fue una alícuota del 4 % del total de la fosa, que se agregó a una jarra Nalgene® que se mantuvo cerrada (excepto por el momento en que se añadieron las otras muestras semanales) por 21 días después de agregar la última muestra (día 21 del

kg per ton, in order to get an addition or not of 7.36×10^{10} cfu/t of finished feed. Both additives were included substituting the same quantity of sorghum.

Piglets were weighed at the beginning (at weaning) and weekly up to d 42 post-weaning. The feed provided per EU was recorded daily and at the end of each week, leftovers were removed and weighed in order to do the calculation by difference of intake. Piglets weights and feed intake were recorded from the beginning and each week for the calculation of the daily weight gain (ADG), daily feed intake (ADF), and the feed efficiency, expressed as gain in function of intake (GF). Every day, right after the first feeding, a visual inspection of each one of the EU was carried out for the scoring of the average feces consistency with the use of a rating qualification from 1 to 5 (modified from Montagne *et al.*, 2004), where: 1= dry and hard, 2= normal, 3= doughy/thick, 4= semiliquid, and 5= liquid;. Simultaneously, records of exceptions and clinical observations were kept.

During their staying in weaning, and just with the first block, each week a plastic container, suitable for a septic tank, was installed for 24 h for the collection of waste water (or residual water). The content of each one of such containers was weighed, recording the volume and homogenizing it before collecting two samples. The first sample of 1 L was destined to bacteriological studies and for the determination of pH, total solids, total nitrogen (N), ammonia nitrogen (NH₃), nitrates and nitrites, according to Official Mexican Standards (NMX) or Mexican Standards (NOM). The second sample was an aliquot of the 4 % of the total septic tank, which was poured to a Nalgene® jar that was kept closed (excepting at the time of adding other samples) for 21 d after adding the last sample (d 21 of the experiment), in order to allow fermentation, which emulated the function of septic tanks for 21 d more (maximum fermentation time was 35 d). The jars were kept in the nurseries, creating then

experimento), para permitir la fermentación, emulando el trabajo de fosas anegadas por 21 días más (tiempo máximo de fermentación 35 días). Las jarras se mantuvieron en las salas de destete, creando entonces condiciones anaerobias similares a las fosas en granjas convencionales. El pH se determinó al momento de la toma de muestras con un electrodo conectado a un potenciómetro (Thermo®, Orion 230A). Los sólidos totales se determinaron con el procedimiento descrito en la NMX⁽²³⁾. La determinación de nitrógeno total se realizó conforme a la NMX⁽²⁴⁾ (N de Kjeldahl), usando un sistema Kjeltex (FOSS 2300). La determinación de nitrógeno amoniacal siguió las indicaciones del AOAC, método 973.49⁽²⁰⁾. La determinación de nitratos y nitritos se realizó como lo marcan las NMX correspondientes^(25,26).

Se determinaron las bacterias coliformes totales por el método de conteo de colonias en placa descrito en la NOM⁽²⁷⁾; para detectar salmonella se inoculó un caldo tetraciónato, incubando a 36 °C/18 h, sembrando en agar McConkey y procediendo al conteo luego de 36 h de incubación. Para constatar la presencia y viabilidad de BAC, se realizaron conteos bacterianos (ufc) de los géneros de BAC tanto en el alimento, como en las aguas residuales luego de incubar por 48 h en agar TSA (Tryptic-Soy-AGAR), distinguiéndose morfológicamente y confirmando las cepas por la formación de un halo de hidrolisis de almidón. Las cuentas de ufc se presentan como log₁₀ por mililitro.

Al finalizar la estancia en la sala de destete (21 días posdestete), los lechones se transfirieron por UE a las instalaciones de crecimiento con piso sólido de concreto en un edificio de frente abierto. Inmediatamente, al desocupar la sala de destete, ésta fue lavada completamente con una máquina hidrolavadora a presión con un motor de 5.5 caballos de fuerza. El lavado se hizo detalladamente en cada una de las jaulas cronometrando el tiempo y, para estimar el gasto de agua, se conectó la manguera fuente de la hidrolavadora para aplicar el método volumétrico⁽²⁸⁾, que en lo particular consistió

similar anaerobic conditions to those of septic tanks in conventional farms. The pH was determined at the moment of sampling with an electrode connected to a potentiometer (Thermo®, Orion 230A). Total solid were determined as described by NMX⁽²⁵⁾. Total nitrogen determination was performed according to NMX⁽²⁶⁾ N of Kjeldahl, using a Kjeltex system (FOSS 2300). Ammonia nitrogen determination followed the AOAC indications, method 973.49⁽²²⁾. Nitrites and nitrates determination was carried out as indicated by the correspondent NMX^(27,28).

Total coliform bacteria were determined by the method of colony plate count described on NOM⁽²⁹⁾; for *Salmonella* detection, a tetrathionate broth was inoculated, incubated at 36 °C/18 h, seeded on McConkey agar, and then counted after 36 h incubation. The bacterial counting (cfu) of BAC genus was done after incubation for 48 h in TSA agar (Tryptic-Soy-AGAR), making the identification morphologically and confirming the strains by the halo forming by starch hydrolysis. The cfu are presented as log₁₀ from the count per milliliter.

At the end of their staying in the weaning room (21 d post-weaning), piglets were transferred by EU, to growing facilities with solid concrete floor and open front type building. Immediately, at leaving the weaning room, the facility was completely washed with a pressure hydro washer machine with a motor of 5.5 horse power. The washing was done thoroughly in each one of the cages measuring the time invested and, in order to estimate the consumption of water, the hydro washer source hose was connected for applying the volumetric method⁽³⁰⁾, which consisted in filling (every sampling day) 25 containers of 20 L, where the filling time was measured, calculating then the water flow, which resulted in 17 ± 0.485 L/min. The consumption of water was calculated for the water flow and washing time. In addition, during the staying in growing area, partial washings (only dirty areas) were carried out in

en llenar (en cada día de muestreo) 25 recipientes de 20 L, en los que se cronometró el tiempo para ser llenados, estimando entonces el flujo de agua, que fue de 17 ± 0.485 L/min; con el flujo de agua y el tiempo de lavado, se calculó el gasto. Así mismo, durante la estancia en el área de crecimiento, semanalmente se realizaron lavados parciales (sólo el área sucia) a cada uno de los corrales para aliviar la carga de excretas. Para ello, simplemente se lavó con el chorro de una manguera conectada a una toma de agua (*i.e.*, no se usó la hidrolavadora) y al finalizar el experimento (42 días postdestete) los cerdos se movieron a otra área, y los corrales fueron lavados completamente con la misma hidrolavadora usada en el destete. Se registró el tiempo de lavado de cada uno de los corrales y, al igual que en la sala de destete, se cuantificó el tiempo de lavado para calcular el gasto de agua, que fue de 15 ± 0.921 L/min.

Al final del experimento (después de 42 días, a los 63 días de edad), los cerdos se reagruparon por tamaño, independientemente de tratamientos, a corrales (superficie total de 18.51 m^2 y efectiva de 17.20 m^2) de 12 a 16 animales, en los que se alimentaron a libertad con una misma dieta libre de antibióticos, de ABZ o de BAC, en forma de harina y en cuatro fases consecutivas (cada una de 21 días para cubrir los requerimientos de la población, Cuadro 1), siguiendo el crecimiento al pesar individualmente a los cerdos en intervalos de 42 días hasta los 147 días de edad, cuando se extrajeron los primeros cerdos para el mercado y se evaluó el coeficiente de variación en el peso vivo, considerando los efectos mayores de tratamiento.

El análisis estadístico de los datos se condujo con las restricciones de un diseño de bloques completos al azar, distinguiendo los efectos mayores de ABZ y de BAC, así como de su interacción. Se usaron los procedimientos GLM, MIXED, REG y CORR de SAS v.9.2⁽²⁹⁾ con las rutinas de Littell *et al*⁽³⁰⁾. Las variables del comportamiento productivo se presentan, como

each pen to reduce the load of feces weekly. In this procedure, the washing was done only with the jet of water from a hose connected to a hydrant (*e.g.*, the pressure hydro washer machine was not used); and at the end of the experiment (42 d post-weaning), pigs were moved to a different area and pens were completely washed with the same pressure hydro washer machine used at weaning. The washing time of each pen was recorded, in a similar way as for the weaning room; the washing time was quantified for the calculation of the consumption of water, which was 15 ± 0.921 L/min.

At the end of the experiment (after 4 d, at 63 d of age), pigs were regrouped by size, independently from treatment, to 12 to 16 animals pens (total surface of 18.51 m^2 and effective surface of 17.20 m^2), where pigs were fed *ad libitum* the same diet free of antibiotics, ABZ, or BAC, in meal form and in four consecutive Phases (21 d each) for meeting the requirements of the population, monitoring the growth by weighing individually the pigs at intervals of 42 d until 147 d of age, when the first pigs for the market were taken, and the body weight coefficient of variation was evaluated considering the mayor effects of treatment.

The data statistical analysis was done with the restrictions of a randomized complete block design, differentiating it from the major effects of ABZ and BAC, as well as their interaction. The procedures *GLM*, *MIXED*, *REG*, and *CORR* of SAS v.9.2⁽³¹⁾ were used with the routines of Littell *et al*⁽³²⁾. The variables of the productivity behavior are shown on Table 2, including the least square means at the end of the first week and the responses accumulated at 21 and 42 d, as well as the consumption of water at washing. Feces scores and variables of wastewater sampling (microbiological and water quality) were analyzed as independent non-connected samples. For wastewater because of the sampling method, the response at 35 d results from the dynamics of accumulation, plus the

las medias de mínimos cuadrados, al final de la primera semana y de las respuestas acumuladas a 21 y 42 días, así como el gasto de agua de lavado a 21 y 42 días. La calificación del excremento y las variables del muestreo de las aguas residuales (microbiológicos y calidad de agua), se analizaron como muestras independientes no concatenadas. Al analizar las características de las aguas residuales, debido al proceso utilizado, la respuesta al día 35, resultó de la dinámica de acumulación, más la actividad microbiológica en el tiempo (alícuotas vertidas en las jarras), en las que se permitió la fermentación por una media ponderada de 28 días.

Ensayo 2

Se buscaron granjas con problemas infecciosos, habiéndose elegido una en el estado de Guanajuato, con antecedentes de PRRS y circovirus, que a la inspección previa, al inicio del ensayo, mostró signos de problemas respiratorios, cuadro que se juzgó agravado por hacinamiento y fallas en el manejo de la ventilación. Se optó por esta granja porque la infraestructura y la actitud de los manejadores permitía la comparación de la respuesta de los lechones a dos alimentos (tratamientos), en este caso el uso intensivo de antibióticos (del programa comercial decidido por el veterinario de la granja) y por la reducción de la carga de antibióticos al remover los de curso entérico por el uso de ABZ.

Se recabaron los datos de 384 lechones en 20 unidades experimentales (UE). Cada UE, consistió en dos corrales adjuntos, compartiendo un mismo comedero; en cada corral se tuvieron 8 ó 12 animales, lo que resultó en 40 corrales. El ensayo se realizó con un diseño de bloques completos al azar, donde cada bloque estuvo conformado por lechones nacidos en tres grupos consecutivos de parición. Se tuvieron tres bloques, en dos diferentes tipos de edificios: dos bloques en sendos edificios con 6 UE (12 corrales), cada una de 16 lechones (8 por corral) y un bloque con 8 UE (16 corrales) de 24

microbiological activity along the period (aliquot poured in jars), where fermentation was permitted, by a pondered mean of 28 d.

Assay 2

Farms with infectious problems were sought, and one in the State of Guanajuato with PRRS and circovirus prevalence background was chosen, which at the inspection, previous to the Assay, showed respiratory signs that seemed more severe as result of overcrowd and failures in ventilation management. This farm was chosen given its infrastructure and the attitude of the workers in charge of handling the animals, which allowed the comparison of piglets response to both feeds (treatments) that for this farm included intensive use of antibiotics (corresponding to the commercial program assigned by the veterinarian of the farm) and by the reduction of the antibiotics load at removing those of enteric purposes and replaced by the use of ABZ.

Data was collected from 384 piglets in 20 experimental units (EU). Each EU, consisted on two adjacent pens, shearing a feeder; in each pen there were 8 or 12 animals, for a total of 40 pens. The assay was conducted under a randomized complete block design; there were three blocks (consecutive parity groups) that were allotted in two arrangements of the buildings; two blocks in buildings of 6 EU (12 pens), 16 piglets each (8 per pen) and a block with 8 EU (16 pens) with 24 animals each (12 per pen). Piglets were weaned at 23 ± 1.2 d and approximately 8 % of animals of lower weight in each group were taken to an intensive care room (*i.e.*, those were not used in the assay), with the purpose of the personnel of the farm to follow their conventional practices, housing the animals in pens homogenous by size, not paying attention to the litter of origin or sex.

Treatments (2) were approached based on a modification of time in the use of the feeding

animales (12 por corral). Los lechones se destetaron a los 23 ± 1.2 días y aproximadamente el 8 % de los animales de menor peso en cada grupo se destinaron a una sala de cuidados intensivos (*i.e.*, no se usaron para el ensayo), para que el personal de la granja, siguiendo sus prácticas convencionales, alojara a los animales en corrales homogéneos por tamaño, sin poner atención a la camada de origen o al sexo.

Los tratamientos (2) se plantearon con base en una modificación del tiempo de uso del Programa de alimentación comercial de la Unión Ganadera Regional de Porcicultores de Guanajuato: Fase 1 de 7 días; Fase 2 de 21 días y Fase 3 de 21 días. El programa de alimentación comercial (testigo), incluyó el uso rutinario de antibióticos indicados contra problemas respiratorios y digestivos, Fases 1 y 2, 200 ppm de hidrato de amoxicilina, 10 ppm de enramicina (Enradin[®] F 80, MSD Salud Animal México), 44 ppm de clorhidrato de lincomicina y 44 ppm de sulfato de espectinomicina (Linco-Spectin[®], premezcla, Zoetis, México); Fase 3, fumarato hidrogenado de tiamulina, 100 ppm y clorotetraciclina, 300 ppm. En el segundo tratamiento (ABZ+BAC), se eliminaron parcialmente los antibióticos, sólo se incluyeron: Fases 1 y 2, 200 ppm de hidrato de amoxicilina; Fase 3 fumarato hidrogenado de tiamulina, 100 ppm y clorotetraciclina, 300 ppm, más la inclusión de ABZ a 5 kg/t y BAC, 0.5 kg/t.

Considerando el uso de los antimicrobianos o del ABZ y BAC, las dietas fueron las mismas que se describen en el Cuadro 1 y su preparación por la adición de los antibióticos, ABZ y BAC fue con los procedimientos que ya se describieron (Ensayo 1).

Los cerdos se pesaron individualmente al inicio, ya en las UE y dentro de las primeras 4 h después de su remoción a las salas de destete, y luego en los días 7, 28 y 49 posdestete (32, 53 y 74 de edad), mientras que el consumo se calculó semanalmente al registrar la cantidad

program designed by the Guanajuato Regional Livestock Union of Swine Producers [Unión Ganadera Regional de Porcicultores Guanajuato, by its name in Spanish] as follows: Phase 1, 7 d; Phase 2, 21 d; and Phase 3, 21 d. The commercial feeding program (Control) included the traditional use of antibiotics indicated against respiratory and intestinal diseases: Phases 1 and 2, 200 ppm of amoxicillin hydrate, 10 ppm of enramycin (Enradin[®] F80, MSD Salud Animal Mexico) 44 ppm of lincomycin hydrochloride and 44 ppm of spectinomycin sulphate (Linco-Spectin[®], premix, Zoetis, Mexico); Phase 3, tiamulin hydrogenated fumarate, 100 ppm and chlortetracycline, 300 ppm. For the second treatment (ABZ+BAC), antibiotics were partially eliminated, with the exception of 200 ppm amoxicillin hydrate (Phases 1 and 2), and the 100 ppm tiamulin hydrogenated fumarate and 300 ppm chlortetracycline (Phase 3), including instead ABZ at 5 kg/t and BAC at 0.5 kg/t.

Considering or not the use of antibiotics or ABZ and BAC, diets were the same as described on Table 1; and the addition of antibiotics, ABZ and BAC was according to the procedures described in Assay 1.

Pigs were weighed individually at the beginning, once in the EU, and within the first 4 h after removing from the nurseries, and then at d 7, 28 and 49 post-weaning (32, 53 and 74 d of age), while the intake was calculated weekly recording the fed quantity and the leftovers at the beginning of the next week. The assay was conducted during the staying of the animals in the nurseries (for 49 d), where starting temperature was 30 °C by control of convection stoves and manual use of curtains, reducing gradually the temperature in 2 °C each week.

Results are shown as least square means of the accumulated responses at 7, 28 and 49 d of the assay, after a variance analysis with General Linear Models (GLM) of SAS (v. 9.2), using the sum squares Type III, and the options lsmeans and pdiff⁽³¹⁾.

servida y los remanentes al inicio de la siguiente semana. El ensayo se condujo durante la estancia de los animales en las salas de destete (por 49 días, en las que se inició con una temperatura de 30 °C por el control de estufas de convección y el manejo manual de cortinas, reduciendo gradualmente la temperatura en 2 °C cada semana.

Los resultados se presentan como las medias de mínimos cuadrados de las respuestas acumuladas a los 7, 28 y 49 días del ensayo, luego de un análisis de varianza con los modelos lineales generales (GLM) de SAS (v. 9.2), usando las sumas de cuadrados tipo III y las opciones lsmeans y pdiff.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo 1

Durante los meses del experimento (noviembre y diciembre) la temperatura ambiental promedio fue de 12.1 °C, con un rango de -7.9 a 27.6 °C y humedad relativa promedio de 37.8 %. En general el estado de salud de los animales fue bueno en ambos bloques; sin embargo, en el bloque 1, a partir del día 6 posdestete se notó en todas las UE una caída en el consumo de alimento, que se mantuvo hasta el día 12. Desde

RESULTS AND DISCUSSION

Assay 1

During the months of the experiment (November and December) room temperature was 12.1 °C, within a range of -7.9 to 27.6 °C and an average humidity of 37.8 %. In general, the health status of the animals was good in both blocks. However, in block 1, from d 6 post-weaning, in all EU a drop in the feed intake was observed, which was kept until d 12. From d 9 post-weaning, 60 % of pigs were observed with an evident loss in feces consistency feces consistency (scores between 4 and 5). The severity of diarrheas, which were evident in all cages, demanded a clinical intervention by injecting to piglets ceftiofur hydrochloride (3 mg/kg live weight) for three days. The improvement in health (by consistency of feces) was observed from the second day under therapy and it is important to mention that it was within this period (d 7 a 14 post-weaning) the only moment where and effect from the ABZ ($P<0.02$) was observed in this response criterion (Table 2).

For piglets in the block 2, at 6 d post-weaning some respiratory signs were observed (wet coughing, sneezing, sluggishness, bristly fur, reduction in food intake), which justified the

Cuadro 2. Valores subjetivos^a de la consistencia de las excretas en corrales con cinco lechones, alimentados con o sin ácido benzoico y *Bacillus*, del destete hasta los 42 días de edad

Table 2. Subjective feces consistency score^a from pens with five piglets fed with or without benzoic acid and *Bacillus*, from weaning and up to 42 d

Benzoic acid (ABZ), kg·t ⁻¹	0	0	5	5		ABZ ^c	BAC	ABZ*BAC
<i>Bacillus</i> (BAC), kg·t ⁻¹	0	0.5	0	0.5	SD ^b	<i>P</i> <	<i>P</i> <	<i>P</i> <
Observations, (pens)	9	9	9	9				
Feces score at weaning	2.78	2.22	2.33	2.33	0.698	0.47	0.24	0.24
Feces score at 7 d	2.37	2.43	2.48	2.07	0.473	0.42	0.28	0.14
Feces score at 14 d	2.63	2.66	2.40	2.14	0.453	0.02	0.44	0.32
Feces score at 21 d	2.47	2.56	2.56	2.26	0.520	0.54	0.54	0.27
Feces score at 21 to 42 d	2.52	2.51	2.32	2.18	0.459	0.10	0.63	0.68

^a Rating qualification from 1 to 5 (modified from Montagne et al., 2004), where: 1= dry and hard, 2= normal, 3 = doughy/thick, 4= semiliquid, and 5= liquid.

^b SD = Standard deviation: squared root of the mean square error.

^c Probability values for the main effect of ABZ; Bacillus or their interaction.

el día 9 posdestete, en el 60 % de los cerdos se notó una pérdida ostensible en la consistencia de las excretas (calificaciones entre 4 y 5), la severidad de las diarreas, que fueron evidentes en todas las jaulas, demandó una intervención clínica, inyectando a todos los lechones con clorhidrato de ceftiofur (3 mg/kg de peso vivo) durante tres días. La mejoría (en la consistencia de las excretas), se notó desde el segundo día de terapia y debe hacerse notar que fue en este período (día 7 a 14 posdestete) el único momento en el que se detectó un efecto del ABZ ($P < 0.02$) en este criterio de respuesta (Cuadro 2).

Con los lechones del bloque 2, a los seis días posdestete se notaron algunos signos respiratorios (tos húmeda, estornudos, aletargamiento, pelo hirsuto, disminución en el

generalized use of ceftiofur hydrochloride, similar to that in the block 1. Signs like before were reduced quickly. In no block, clinical problems arose again during the experimental period. Even though the signs in block 1 were mainly of enteric nature, the response to cephalosporin and the nature of the clinical picture suggested a respiratory origin of the affection. With the exception of diarrheas, maybe given the prompt intervention in block 2, the disease picture in both cases happened to meet the loss of immunity by seroconversion, and suggested an opportunistic attack by *Pasteurella spp.*, a microorganism in the background of the farm.

For the piglet's productive response, there were no interactions ($P > 0.17$) for any of the observed parameters, so only mayor treatment effects

Cuadro 3. Comportamiento productivo y uso de agua para limpiar el corral (jaulas elevadas con piso de plástico, a los 21 días posdestete; o piso sólido de concreto a los 42 días posdestete) con cinco lechones en cada uno. Los lechones se alimentaron con o sin ácido benzoico y *Bacillus* hasta 42 días posdestete^a

Table 3. Growth performance and water used to clean the pen (elevated cages with plastic grid floor at 21 d post weaning; or a concrete solid floor pen at 42 d post weaning) with five pigs in each. Piglets were fed with or without benzoic acid and *Bacillus* up 42 d post weaning^a

Benzoic acid (ABZ), kg·t ⁻¹	0	0	5	5		ABZ	BAC	ABZ*BAC
<i>Bacillus</i> (BAC), kg·t ⁻¹	0	0.5	0	0.5	SD ^b	<i>P</i> <	<i>P</i> <	<i>P</i> <
Observations, pens	9	9	9	9				
Initial BW (weaning), kg	6.02	6.24	6.04	6.14	1.095	0.92	0.67	0.87
BW at 21 d post weaning, kg	10.31	10.48	11.04	11.26	1.524	0.15	0.71	0.95
BW at 42 d post weaning, kg	21.40	21.48	23.28	23.62	2.653	0.03	0.82	0.88
Avg. Feed Intake, 7 d, kg·d ⁻¹	0.14	0.13	0.14	0.16	0.028	0.21	0.69	0.17
Avg. Feed Intake, 21 d, kg·d ⁻¹	0.29	0.27	0.30	0.29	0.041	0.26	0.39	0.79
Avg. Feed Intake, 42 d, kg·d ⁻¹	0.54	0.54	0.55	0.56	0.066	0.43	0.86	0.80
Avg. BW gain, 7d, kg·d ⁻¹	0.08	0.08	0.15	0.14	0.054	0.001	0.93	0.87
Avg. BW gain, 21d, kg·d ⁻¹	0.20	0.20	0.24	0.24	0.037	0.004	0.89	0.73
Avg. BW gain, 42d, kg·d ⁻¹	0.37	0.36	0.41	0.42	0.043	0.002	0.93	0.75
Gain/Feed, 7 d	0.56	0.63	1.01	0.88	0.374	0.008	0.83	0.44
Gain/Feed, 21 d	0.72	0.76	0.80	0.85	0.122	0.04	0.25	0.95
Gain/Feed, 42 d	0.69	0.68	0.74	0.75	0.056	0.002	0.96	0.88
Waste water, d 21, L·pen ⁻¹ ·d ⁻¹	171	134	162	138	21.06	0.71	0.001	0.36
Waste water, d 42, L·pen ⁻¹ ·d ⁻¹	230	192	230	207	17.04	0.19	0.001	0.20

^a Body weight = BW.

^b SD = Standard deviation: squared root of the mean square error.

consumo de alimento), lo que justificó el uso generalizado de clorhidrato de ceftiofur como se hizo en el bloque 1. Los signos, como antes, cedieron rápidamente. En ninguno de los bloques se volvieron a presentar problemas clínicos durante el transcurso del experimento. Aun cuando los signos en el bloque 1 fueron predominante-mente entéricos, la respuesta a las cefalosporinas y el cuadro mismo sugieren un origen respiratorio de la afección. Exceptuando las diarreas, quizá por la rapidez de intervención en el bloque 2, el cuadro de enfermedad en ambos casos coincide con la pérdida de inmunidad por seroconversión y sugiere un ataque oportunista de *Pasteurella spp.*, de la que hay antecedentes en la granja.

En los parámetros de la respuesta productiva de los lechones (Cuadro 3), no se observaron interacciones ($P>0.17$) en ninguna de las variables analizadas, por lo que sólo se discuten los efectos mayores de tratamiento. Las únicas diferencias en comportamiento productivo, fueron aquéllas provocadas por el uso de ABZ, lo cual concuerda con lo esperado, ya que no se espera ningún efecto directo de BAC sobre el consumo de alimento o la ganancia diaria de peso de los lechones⁽¹⁹⁾. Así mismo, y según lo esperado⁽¹⁶⁾, el consumo diario de alimento ya sea a los 7, 21 ó 42 días no fue diferente ($P>0.21$) entre tratamientos.

Por efecto de la variación, el peso de los lechones sólo difirió ($P<0.03$) a los 42 días posdestete, cuando los lechones que recibieron ABZ pesaron 9 % más que los que no lo recibieron. Esto fue consecuencia de una mayor GDP, 73 % mayor ($P<0.001$) en la primera semana posdestete; luego de la cual, la diferencia ($P<0.004$) se fue haciendo menor, 18 % a los 21 días y 13 % a los 42 días. Como resultado de la mayor GDP, la eficiencia en el uso del alimento (GxC), siempre fue mayor (10 %; $P<0.04$) cuando las dietas incluyeron ABZ, lo cual concuerda con observaciones previas^(11,13).

El efecto del ABZ en el patrón de la respuesta durante los primeros 21 días es difícil de explicar, pero no se puede atribuir completamente a un

are discussed. As expected, the only differences in growth performance were those related to the use of ABZ, since no direct effect of BAC was anticipated on feed intake, or piglets average daily gain⁽²¹⁾. Also as expected⁽¹⁸⁾, daily feed intake at 7, 21, or 42 d was not different ($P>0.21$) between treatments.

Because of variation, piglets body weight were different ($P<0.03$) only at 42 d post weaning, when those eating ABZ weighed 9 % over those who not. This was consequence of higher average daily gain (GDP), which during the first week post-weaning was 73 % higher ($P<0.001$); after that, the difference ($P<0.004$) was reduced to 18 % by d 21, and 13 % by d 42. As a result of a higher GDP, feed use efficiency (GXC) was always higher (10 %; $P<0.04$) when diets included ABZ, which agree with previous observations^(11,13).

The ABZ effect in the pattern of response for the first 21 d is difficult to explain, but it cannot be completely attributed to an antimicrobial effect in the gut, since the enteric problems were quite located and were attributed as a sequel of a respiratory problem. It cannot be inferred either, the physiological consequences given that the food intake was practically the same^(17,18). In addition, whenever antibiotics are used as growth promoters, for instance, beyond their therapeutic effects, the typical response of susceptible animals is higher than those that are resistant, which result in some improvements in the coefficients of variation (CV); in this experiment, The CV behavior was practically the same. Then, the only explanation of the response to the ABZ may be in the animal welfare and it is suggested a probable involvement of the membrane immunity, potentially given the diminishing of the consequences of the inflammatory response^(33,34).

It was corroborated the identity of the treatments by cfu of microorganisms in BAC (Table 4), both in feeds (subjected to germination conditions/72 h) and in wastewater

efecto antimicrobiano intestinal, ya que los problemas entéricos fueron muy localizados y se atribuyeron como secuela de un problema respiratorio. Tampoco se pueden inferir consecuencias fisiológicas, porque el consumo de alimento fue prácticamente el mismo^(15,16). Adicionalmente, cuando se usan por ejemplo antibióticos como promotores del crecimiento, más allá de sus efectos terapéuticos, típicamente la respuesta de los animales susceptibles es mayor a la de los resistentes, con lo que se logran algunas mejoras en los coeficientes de variación (CV); en este experimento, el comportamiento de los CV fue prácticamente igual. Entonces, la única explicación de la respuesta al ABZ resta en el bienestar de los animales, y se sugiere la posibilidad de que la inmunidad de membranas esté involucrada, potencialmente al disminuir las consecuencias de la respuesta inflamatoria^(31,32).

Tanto en los alimentos, como en las aguas residuales se corroboró ($P < 0.001$) la identidad de los tratamientos por las ufc de los microorganismos en BAC (Cuadro 4), ya que mientras se encontraron altas concentraciones de BAC en los alimentos adicionados y en las aguas residuales de quienes los consumieron, no fue posible distinguirlos en los alimentos sin BAC. El producto intacto ofrece $1.472 \times$

($P < 0.001$), and were not detected on those without BAC. The intact product offers a 1.47×10^8 cfu/g, when feed was given conditions adequate for germination of BAC spores, there where 3.83×10^4 cfu/g suggesting 46 % germination (7.36×10^4 cfu/g of complete feed), and in the residual water, 3.19×10^4 cfu/ml suggesting that BAC was present in the feeds, and that the *Bacillus* was able to germinate after the intestinal tract, and that the number of Bacilli in waste water was much more than those added on to the feeds.

Bacillum concentrations in feed as in residual water were not affected by ABZ ($P > 0.10$), and with time, the concentrations of BAC were kept relatively constant in solution. This makes sense, since ABZ did not acidify the feed⁽¹⁴⁾ and so, no effect was expected on the spores viability. Since ABZ is absorbed at the anterior intestinal tract⁽¹⁷⁾, it shouldn't interfere with BAC germination, since it mainly occurs in the final portion of the intestine⁽³³⁾.

By using total coliform counts as indicators of microbiological contamination of enteric origin in residual water, as a way to qualify the possibility that additives reduced microbiological load (Table 4), there were effects of ABZ in the residual water at the second week (12 %;

Cuadro 4. Coliformes totales y cuentas de *Bacillus* en aguas de desecho, de corrales con lechones alimentados con o sin ácido benzoico y *Bacillus*. Observaciones de diferentes días de colecta después del destete

Table 4. Total coliform and *Bacillus* counts in wastewater, from pens with piglets fed with or without benzoic acid and *Bacillus*. Observations from different collection days after weaning

Benzoic acid (ABZ), kg·t ⁻¹	0	0	5	5		ABZ	BAC	ABZ*BAC
<i>Bacillus</i> (BAC), kg·t ⁻¹	0	0.5	0	0.5	SD	P<	P<	P<
Observations, pens	9	9	9	9				
<i>Bacillus</i> , log ₁₀ cfu/ml, 7 d	ND	4.75	ND	4.81	0.041	0.13	0.001	0.13
<i>Bacillus</i> , log ₁₀ cfu/ml, 35 d	ND	4.00	ND	4.01	1.586	0.99	0.001	0.99
Coliforms ^c , log ₁₀ cfu/ml, 7 d	6.69	6.45	6.57	6.44	0.527	0.80	0.44	0.82
Coliforms, log ₁₀ cfu/ml, 14 d	6.77	6.54	5.97	6.00	0.524	0.01	0.68	0.59
Coliforms, log ₁₀ cfu/ml, 21 d	6.83	6.51	6.26	6.37	0.436	0.09	0.62	0.31
Coliforms, log ₁₀ cfu/ml, 35 d	6.21	6.14	5.41	5.21	0.431	0.001	0.50	0.75

SD = Standard deviation: Squared root of the mean square error.

ND = Not detected.

10^8 ufc/g; cuando el alimento fue sometido a condiciones adecuadas para la germinación de las esporas de BAC, se encontraron 3.83×10^4 ufc/g, lo que sugiere un 46 % de germinación (7.36×10^4 ufc/g de alimento terminado), y en las aguas residuales, se hallaron 3.19×10^4 ufc/ml, lo que indica que el bacilo estuvo presente en los alimentos adicionados, y que fue capaz de germinar luego de su paso en el tracto digestivo, ya que el número de bacilos recuperados en las aguas residuales, fue mucho mayor del adicionado en el alimento.

Las concentraciones de BAC, tanto en el alimento, como en las aguas residuales no se afectaron por la adición de ABZ ($P > 0.10$), y al paso del tiempo se mantuvieron relativamente constantes en solución. Esto hace sentido, ya que el ABZ no acidifica el alimento⁽¹⁴⁾ y por lo tanto, no se espera un efecto en la viabilidad de las esporas de BAC. Además, debido a que ABZ se absorbe en el tracto digestivo anterior⁽¹⁵⁾, no debería interferir con la germinación de BAC, que ocurre mayoritariamente en la porción terminal de intestino⁽³¹⁾.

Al usar los coliformes totales como indicadores de la contaminación microbiológica de origen entérico en las aguas residuales, a fin de calificar la posibilidad de que los aditivos redujeran la carga microbiana (Cuadro 4), se tuvieron efectos del ABZ en las aguas residuales de la segunda semana (12 %; $P < 0.02$), de la tercera (5.6 %; $P < 0.09$) y al final del período de fermentación (20 %; $P < 0.001$). El ABZ reduce las poblaciones bacterianas en el intestino⁽¹³⁾, lo que explica la razón de haber encontrado un menor número de coliformes totales. Aun cuando el conteo de coliformes no difirió en la primera semana, la ganancia y la eficiencia sí mejoraron en respuesta a ABZ. La falta de diferencias en las ufc a la primera semana probablemente se deba a que los cambios en microbiota son paulatinos⁽¹⁰⁾. Lo que sí se modificó ($P < 0.001$) desde la primera semana de consumo fue el pH de las aguas, por lo que pudiera considerarse que los efectos

$P < 0.02$), in the third (5.6 %; $P < 0.09$) and at the end of the fermentation period (20 %; $P < 0.001$). Benzoic acid reduce bacterial populations on the intestine⁽¹³⁾, this can explain why there where a lower amount of total coliforms. Even when the counting of coliforms didn't differ during the first week, daily gain and feed efficiency did improved in response to ABZ. The lack of differences in cfu during the first week was probably related to the fact that changes in microbiota are normally gradual⁽¹⁰⁾. What changed ($P < 0.001$) during the first week, was water pH, so it should be considered that the effects of ABZ may be associated also, with urine acidification, and not only to an antimicrobial response in the gut^(17,18), which coincides with the idea of involving the ABZ effects with the mucosa immunity and with the maintenance of the intestinal ecology.

As part of the measures of productivity, the consumption of water was included (Table 3), where BAC ($P < 0.001$) reduced the water demand for washing in around 18 %, which is an important impact, especially when adding in the calculation the consumption of energy and hand labor time. In none of these parameters, an interaction with ABZ was found, suggesting that the benzoic acid does not interfere with the microbial activity of BAC.

Analyzing total nitrogen concentration in residual water, it incremented (5 %; $P < 0.03$) only in response to ABZ. Instead, regarding the ammoniacal N (Table 5), there was an interaction between BAC and ABZ ($P < 0.07$). Apparently, the effects of both were additive, which makes sense, since the benzoic acid, at reducing the pH ($P < 0.001$), retains the disassociated ammoniacal N (NH_4^+)⁽¹⁴⁾; while the activated BAC incorporates this N and other forms to their protein synthesis^(1,14). Even when nitrates and nitrites were analyzed, no effects were found. In the residual water, nitrates were 8.81 mg/L and nitrites were 0.47 mg/L, both within normal values^(26,27) and similar to those obtained in drinking water (nitrates 7.24 mg/L, and nitrites, 0.34 mg/L).

Cuadro 5. Mediciones del pH, nitrógeno total y NH₃ soluble en aguas de desecho, derivadas de corrales con lechones alimentados o no con ácido benzoico y *Bacillus*. Las muestras se colectaron de vasos de nalgano, donde a las aguas de desecho se les permitió fermentar^a

Table 5. Measures of pH, total nitrogen and soluble NH₃ in wastewater, from pens with piglets fed with or without benzoic acid and *Bacillus*. Samples were collected from Nalgene jars were wastewaters were allowed to ferment^a

Benzoic acid (ABZ), kg·t ⁻¹	0	0	5	5		ABZ	BAC	ABZ*BAC
<i>Bacillus</i> (BAC), kg·t ⁻¹	0	0.5	0	0.5	SD	<i>P</i> <	<i>P</i> <	<i>P</i> <
Observations, Pens	9	9	9	9				
pH, 7 d	7.30	7.20	6.68	6.74	0.236	0.001	0.84	0.44
pH, 14 d	7.50	7.44	6.27	6.22	0.245	0.001	0.64	0.96
pH, 21 d	7.73	7.66	5.64	5.68	0.200	0.001	0.87	0.56
pH, 35 d	8.04	7.96	5.46	5.50	0.110	0.001	0.62	0.25
Total N 7 d, mg·L ⁻¹	6.89	7.11	7.46	7.34	0.285	0.007	0.72	0.20
Total N 14 d, mg·L ⁻¹	8.97	9.30	9.58	9.59	0.416	0.03	0.39	0.40
Total N 21 d, mg·L ⁻¹	14.44	14.72	15.43	15.30	0.659	0.02	0.80	0.51
Total N 35 d, mg·L ⁻¹	15.17	15.55	16.11	16.06	0.627	0.02	0.56	0.46
Ammonia N 7 d, mg·L ⁻¹	4.14	3.27	3.47	2.90	0.173	0.001	0.001	0.07
Ammonia N 14 d, mg·L ⁻¹	5.38	4.26	4.44	3.80	0.258	0.001	0.001	0.06
Ammonia N 21 d, mg·L ⁻¹	8.67	6.72	7.17	6.05	0.409	0.001	0.001	0.04
Ammonia N 35 d, mg/L	9.46	8.33	8.66	8.00	0.352	0.003	0.001	0.16

^a Data were analyzed for covariance, using the corresponding recovered volume as covariable.

SD = Standard deviation: squared root of the mean squared error.

del ABZ también se asociaron a la acidificación de la orina, y no sólo a una respuesta antimicrobiana en el intestino^(15,16), lo que coincide en la idea de involucrar los efectos del ABZ con la inmunidad de mucosas y con el mantenimiento de la ecología intestinal^(32,33).

Como parte de las mediciones de productividad se incluyó al gasto de agua (Cuadro 3), en el que BAC (*P*<0.001) redujo la demanda de agua de lavado en cerca del 18 %, que es de un impacto importante, en especial si se cuantifica sumando el ahorro en el gasto energético y el tiempo de labor. La falta de interacción (*P*>0.2) entre ABZ y BAC sugiere que el ácido benzoico no interfiere con la actividad microbiana del BAC.

Al analizar la concentración total de nitrógeno en las aguas de desecho, éste se incrementó (5 %; *P*<0.03) sólo en respuesta a la inclusión de ABZ. En cambio, en el N amoniacal (Cuadro 5), ABZ y BAC interactuaron (*P*<0.07). Aparente-

After concluding Assay 1, at monitoring the pigs growth up to harvest the first day of sale at 147 d of age (after 84 d of finishing the experimental phase), as expected, pigs that received ABZ were heavier (*P*<0.11): 94.2 ± 9.57 vs. 91.3 ± 12.41 kg (Figure 1). The higher CV (13.6 vs 10.2 %) in control pigs is shown graphically (Figure 1), and is explained by the minimal weight in the range (52.6 to 115.2 kg) and the frequency of case under one standard deviation (-1S) of the mean, which was lower in pigs that were fed ABZ (74.43 to 115.7 kg); but also in the incidence of pigs suitable for the market, the survival, and those that reached a weight above 95 kg at 24 wk of age, which was superior when pigs were fed ABZ (92.4 vs 87.5 %). With these results, it may be inferred that the ABZ effect was in protecting the productivity of animals more susceptible to stress factors, those factors that resulted in growth delay.

mente los efectos de ambos son aditivos, lo que hace sentido porque el ácido benzoico, al reducir el pH ($P < 0.001$) retiene al N amoniacal disociado (NH_4^+)⁽¹⁴⁾, mientras que el BAC activado incorpora este N y otras formas a la síntesis de su proteína^(1,14). Aun cuando se analizaron nitratos y nitritos, no se encontraron efectos. En las aguas residuales los nitritos fueron 0.47 mg/L y los nitratos 8.81 mg/L, ambos dentro de norma^(24,25) y similares a lo obtenido en el agua de bebida (nitratos 7.24 mg/L y nitritos, 0.34 mg/L).

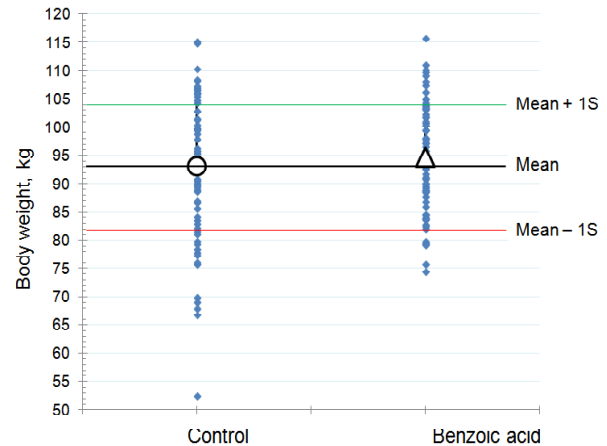
Habiendo concluido el Ensayo 1, al seguir el crecimiento de los cerdos hasta la cosecha de los primeros a la venta, a los 147 días de vida (después de 84 días de haber terminado la fase experimental), como se esperaba, la ventaja lograda por ABZ al día 42 postdestete se mantuvo hasta el final de la engorda ($P < 0.11$): 94.2 ± 9.57 vs 91.3 ± 12.41 kg (Figura 1).

El mayor coeficiente de variación (13.6 vs 10.2 %) en el peso de los cerdos sin ABZ, se presenta gráficamente (Figura 1) y se explica por el peso mínimo en el rango (52.6 a 115.2 kg) y la frecuencia de casos por debajo de una desviación estándar (-1S) de la media, que fue menor con los cerdos que recibieron ABZ (74.43 a 115.7 kg), pero también en la incidencia de cerdos aptos para el mercado, los sobrevivientes y los que alcanzarían un peso superior a 95 kg a las 24 semanas de vida, que fue superior cuando los cerdos se alimentaron con ABZ (92.4 vs 87.5 %). Con estos resultados, se puede inferir que el efecto del ABZ, fue para proteger la productividad de los animales más susceptibles a los factores de estrés, que provocaron retraso en el crecimiento.

Los resultados de este primer ensayo indican que el ABZ es un recurso efectivo para proteger el crecimiento de los lechones al destete. Es probable que con este recurso se logre racionalizar el uso de los antibióticos, disminuyendo su carga en los alimentos pero, claramente, no como un sustituto de los

Figura 1. Dispersión del peso de los cerdos a los 147 días de edad en la granja experimental. Sólo se consideraron los efectos del consumo del ácido benzoico desde el destete y hasta 42 d postdestete

Figure 1. Body weight scattering at 147 d of age at the experimental farm. Only the effect of benzoic acid consumption from weaning and up to 42 d post weaning was considered



Each dot represents one pig, the middle line represents the overall mean and others one standard deviation (S) over or under the mean.

The results of this first Assay indicate that the ABZ is an effective resource for the protection of growth of piglet at weaning. It is probable that this resource may help in rationalization of antibiotics use, reducing their load in feeds, but clearly, not as a substitute of therapeutic antimicrobial drugs. Feeding BAC enhances the ABZ effects in preventing the NH_3 emissions and there are improvements in the feces management; for the case, the facilities washing time and the consumption of water were reduced.

Assay 2

The results from reducing the antibiotics load in feed intended for piglets, the assay in the commercial farm and in presence of respiratory syndrome are summarized on Table 7. In general, no differences were found ($P > 0.15$) in none of the response criteria, and then the use

antimicrobianos terapéuticos. Con BAC se potencian los efectos del ABZ para evitar las emisiones de NH₃ y se logran mejoras en el manejo de las excretas; en este caso se redujo el tiempo de lavado de las instalaciones y el gasto de agua.

Ensayo 2

Los resultados de reducir la carga de antibióticos en los alimentos para lechones (ensayo en la granja comercial en presencia de enfermedades del síndrome respiratorio), se resumen en el Cuadro 6. En general, no se encontraron diferencias ($P>0.15$) en ninguno de los criterios de respuesta, por lo que el uso de enramicina, lincomicina y sulfato de espectinomicina, en exceso del hidrato de amoxicilina en los alimentos de las fases 1 y 2, se puede obviar en esta granja al usar ABZ. Entonces, el ABZ parece un recurso efectivo para el control de problemas infecciosos (“oportunistas”) de curso intestinal. Sin embargo, la inferencia debe acotarse en este caso, a la necesaria efectividad del diagnóstico de los problemas de cada explotación y a la decisión del uso de los antimicrobianos terapéuticos efectivos.

Con la mezcla de los cuatro antibióticos (testigo), se redujeron las cuentas de coliformes totales, tanto como con el ABZ y BAC en presencia del hidrato de amoxicilina, lo que sugiere que el ABZ interviene tan efectivamente como la mezcla de antimicrobianos en el control de la proliferación de la microbiota intestinal^(10,17). Sin embargo, esta inferencia está confundida al no haber conseguido observaciones de un tratamiento sin antibióticos, o sólo con amoxicilina sin ABZ.

En el mejor de los casos, es probable que el ABZ haya mediado en la respuesta y, evidentemente, estos resultados sugieren la necesidad de indagar las posibles interacciones entre ABZ y la microbiota intestinal, saprófita y enterotoxigénica, al tiempo que es imposible

of enramycin, lincomycin and spectinomycin sulphate, in excess of amoxicillin hydrate in Phases 1 and Phase 2 feeds could have been discarded in this farm with the use of ABZ. Therefore, the ABZ seems to be an effective resource for the control of infectious problems (“opportunistic”) of intestinal course. However, the inference should be limited to the necessary effectiveness of the diagnosis of the problems found in each farm and the decision of using effective therapeutic antimicrobial drugs.

Cuadro 6. Comportamiento productivo y bacterias fecales de lechones, en diferentes edades posdestete, alimentados con dietas tradicionales con inclusión de ácido benzoico y especies de *Bacillus*^a

Table 6. Growth performance, and fecal bacteria from piglets at different times after weaning, fed a traditional diet and by the inclusion of benzoic acid and species of *Bacillus*^a

Variable	Control	ABZ+BAC	SEM
Observations, EU	20	20	
Initial BW, kg	6.06	5.86	0.522
Avg. Feed Intake, 7 d, kg·d ⁻¹	0.13	0.14	0.012
Avg. Feed Intake, 28 d, kg·d ⁻¹	0.37	0.36	0.013
Avg. Feed Intake, 49 d, kg·d ⁻¹	0.48	0.47	0.016
Avg. BW gain, 7 d, kg·d ⁻¹	0.11	0.11	0.021
Avg. BW gain, 28 d, kg·d ⁻¹	0.33	0.34	0.015
Avg. BW gain, kg·d ⁻¹	0.38	0.38	0.053
Gain/Feed, 7 d ⁻¹	0.77	0.72	0.166
Gain/Feed, 28 d ⁻¹	0.88	0.97	0.040
Gain/Feed, 49 d ⁻¹	0.80	0.84	0.049
Mortality rate at 49 d, %	4.98	2.60	1.592
Coliforms, log ₁₀ cfu·g ⁻¹ , 7 d	9.03	9.13	0.221
Coliforms, log ₁₀ cfu·g ⁻¹ , 28 d	5.53	6.77	0.657
Coliforms, log ₁₀ cfu·g ⁻¹ , 49 d	5.88	5.90	0.292
Bacillus, log ₁₀ cfu·g ⁻¹ , 7 d	ND	4.27	0.031
Bacillus, log ₁₀ cfu·g ⁻¹ , 28 d	ND	4.73	0.088
Bacillus, log ₁₀ cfu·g ⁻¹ , 49 d	ND	4.89	0.055

^a The piglets were feeding in one of two programs: Control: Therapeutic program with intensive use of antibiotics. ABZ+BAC: Program with reduced use of antibiotics, added with benzoic acid (5 kg·t⁻¹) and *Bacillus* (0.5 kg·t⁻¹). There were no differences between treatments ($P>0.15$).

BW= Body weight; ABZ= Benzoic acid; BAC= Bacillus product; ABZ*BAC= ABZ by BAC interaction.

ND= not detected.

inferir la posibilidad de efectos aditivos entre ABZ y amoxicilina u otros antibióticos^(11,13). Cuando más, es aparente que el uso de estos dos fármacos es compatible, y que el ABZ puede moderar las consecuencias de alteración de la microbiota por los antimicrobianos.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Los resultados indican que el ABZ es un recurso efectivo para proteger el crecimiento de los lechones al destete y reducir la variación en el peso vivo de los cerdos al final de la engorda; además de representar una alternativa al uso de antibióticos. Sin embargo, se requiere investigación que sustente su modo de acción, siendo posible, entre otros, la modificación de la microbiota intestinal, aunque también se sugiere la posibilidad de explorar sus efectos en la inmunidad de mucosas. El ácido benzoico previene las emisiones de NH₃ y los BAC protegen al ambiente y se justifican económicamente por la reducción en el gasto de agua. El ABZ no impidió la germinación de BAC, y además tuvo una interacción positiva entre con los BAC en la captura del NH₃; los efectos fueron aditivos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el auspicio de la Unión Ganadera Regional de Porcicultores Guanajuato en especial al Dr. José Luis Gallardo Nieto (Q.E.P.D) y al MVZ Jesús Aboytes por su invaluable apoyo, así como a Nutrix, S. A. de C.V. MC. Emigdio Santiago García y MVZ. Josué Peñaflor Siller, por su apreciable colaboración. También agradecen al Dr. Alejandro Enríquez Vásquez y a la Q.F.B. Rosalba Breña Hernández del Laboratorio de Patología Animal del Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria de Querétaro S.C, por su apoyo en el trabajo de laboratorio.

With the mix of four antibiotics (Control), total coliform count was reduced, as much as with the ABZ+BAC in presence of amoxicillin hydrate, which suggests that the ABZ intervened as effectively as the antibiotic mix in the control of intestinal microbiota proliferation^(10,17). However, this inference is somehow confounded since no observations have been taken from a treatment with no antibiotics, or only with amoxicillin without ABZ.

In the best scenario, it is probable that the ABZ has worked as a mediator in the response, and, evidently, these results suggest the necessity of investigate the possible interaction between the ABZ and the intestinal, saprophyte, and enterotoxigenic microbiota. At the same time that is impossible infer the probable additive effects between the ABZ and the amoxicillin or any other antibiotic^(11,13). It is apparent, at least, that the use of these two drugs is compatible and that the ABZ may moderate the consequences of the antibiotic alteration of the microbiota.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Results indicate that benzoic acid is an effective resource to protect the growth of piglets at weaning, and to reduce variation in live body weight at the end of finishing period. Besides, ABZ is an alternative to the use of antibiotics; however, more research is needed to sustain the mode of action, being possible, among others, the modification of the intestinal microbiota and it is suggested the possibility of exploring the mucosa immunity. The benzoic acid is a resource for the protection of the environment since it prevents the NH₃ emissions. BAC is also a resource in the improvement of the environmental quality, and it is economically justified given the reduction in the consumption of water. The ABZ didn't hindered BAC germination, there was also a positive interaction between the benzoic acid and BAC in the capture of NH₃, whose effects are additive.

LITERATURA CITADA

- Jensen LB, Sengeløv G, Andersen JS, Bolada SB, Halling-Sørensen B, Agersø Y. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environment International* 2003;28:587-595.
- Álvarez JA, Otero L, Lema JM, Omil F. The effect and fate of antibiotics during the anaerobic digestion of pig manure. *Bioresource Tech* 2010;101:8581-8586.
- Mangalappalli-Illathu A, Duriez P, Masson L, Diarra MS, Scott A, Tien YC, Zhang Y, Topp E. Dynamics of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* during swine manure storage. *Canadian J Microbiol* 2010;56:638-691.
- Van Den Bogaard AE, Stobbering EE. Antibiotic usage in animals. Impact on bacterial resistance and public health. *Drugs* 1999;58:589-607.
- Valenzuela AS, Omar NB, Abriouel H, López RL, Veljovick K, Cañamero MM, Topisrovick MKL, Gálvez A. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan food of animal origin. *Food Control* 2009;20:381-385.
- Collignon P. Antibiotic resistance in human *Salmonella* isolates are related to animal strains. *Proc Royal Soc B: Biol Sci* 2012;279:2922-2923.
- Létourneau V, Duchaine C, Côte C, Letellier A, Topp E. Presence of zoonotic pathogens in physico-chemically characterized manures from hog finishing houses using different production systems. *Bioresource Tech* 2010;101:4048-4055.
- Varel VH, Wells JE, Shelver WL, Rice CP, Armstrong DL, Parker DB. Effect of anaerobic digestion temperature on odor, coliforms and chlorotetracycline in swine manure or monensin in cattle manure. *J Applied Microbiol* 2012;112:705-715.
- Partanen KH, Mroz Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr Res Rev* 1999;12:117-145.
- Walsh MC, Sholly DM, Hinson RB, Saddoris KL, Sutton AL, Radcliffe JS, Odgaard R, Richert BT. Effects of water and diet acidification with and without antibiotics on weanling pig growth and microbial shedding. *J Anim Sci* 2007;85:1799-1808.
- Walsh MC, Rostagno MH, Gardiner GE, Sutton AL, Richert BT, Radcliffe JS. Controlling *Salmonella* infection in weanling pigs through water delivery of direct-fed microbials or organic acids. Part I: Effects on growth performance, microbial populations, and immune status. *J Anim Sci* 2012;90:261-271.
- Gerritsen R, van Dijk AJ, Rethy K, Bikker P. The effect of blends of organic acids on apparent fecal digestibility in piglets. *Livestock Sci* 2010;134:246-248.
- Guggenbuhl P, Séon A, Piñón-Quintana A, Simões-Nunes C. Effects of dietary supplementation with benzoic acid (VevoVital[®]) on the zootechnical performance, the gastrointestinal microflora and the ileal digestibility of the young pig. *Livestock Sci* 2007;108:218-221.
- Mroz Z, Jongbloed AW, Partanen KH, Vreman K, Kemme PA, Kogut J. The effects of calcium benzoate in diets with or without organic acids on dietary buffering capacity, apparent digestibility, retention of nutrients, and manure characteristics in swine. *J Anim Sci* 2000;78:2622-2632.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the auspice of the Guanajuato Regional Livestock Union of Swine Producers [Union Ganadera Regional de Porcicultores Guanajuato, by its name in Spanish], especially to Doctor Jose Luis Gallardo Nieto (Q.E.P.D) and MVZ. Jesus Aboytes for his invaluable support; as well as Nutrix, S. A. de C.V. especially to Emigdio Santiago Garcia MSc. and MVZ. Josue Penaflor Siller due to their considerable collaboration. The authors also thank to Doctor Alejandro Enriquez Vasquez and Q.F.B. Rosalba Brena Hernandez, from the Laboratory of Animal Pathology from the Queretaro State Committee for Livestock Production Promotion and Protection [Comite Estatal para el Fomento y Proteccion Pecuaría de Queretaro S.C, by its name in Spanish] for their help in the performing of the laboratory testing.

End of english version

-
- Kristensen NB, Nørgaard JV, Wamberg S, Engbaek M, Fernández JA, Zacho HD, Poulsen HD. Absorption and metabolism of benzoic acid in growing pigs. *J Anim Sci* 2009;87:2815-2822.
 - Bridges JW, French MR, Smith RL, Williams RT. The fate of benzoic acid in various species. *Biochem J* 1970;118:47-51.
 - Martínez AA, López J, Merino B, Cervantes J, Cuarón JA. Benzoic acid as feed additive for growing pigs naturally infected with *Salmonella choleraesuis*. *J Anim Sci* 2007;85(Suppl 1):516.
 - Paulus C, Wiemann M, Valientes R. Benzoic acid and salmonella. *Pig Progress*. 2011;27:2-4. <http://www.pigprogress.net/background/benzoic-acid-and-salmonella-the-latest-knowledge-7491.html> Consultado 13 nov, 2012.
 - Davis ME, Parrott T, Brown DC, de Rodas BZ, Johnson ZB, Maxwell CV, Rehberger T. Effect of a *Bacillus*-based direct-fed microbial feed supplement on growth performance and pen cleaning characteristics of growing-finishing pigs. *J Anim Sci* 2008;86:1459-1467.
 - AOAC. Official Methods of Analysis. 15th Ed. Association of Official Analytical Chemist, Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemist. 1990.
 - NRC Nutrient Requirement of Swine. National Research Council. 11th ed. Washington, DC, USA: Natl Acad Press; 2012.
 - Montagne L, Cavaney FS, Hampson DJ, Lallès JP, Pluske JR. Effect of diet composition on post weaning colibacillosis in piglets. *J Anim Sci* 2004;82:2364-2374.

23. Norma Mexicana. NMX-AA-034-SCFI-2001. "Análisis del agua. Determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba". Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 2001.
24. Norma Mexicana. NMX-AA-026-SCFI-2001. "Análisis de agua. Determinación de nitrógeno total Kjeldahl en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba". Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. 2001.
25. Norma Mexicana. NMX-AA-099-SCFI-2006. "Análisis de agua. Determinación de nitrógeno de nitritos en aguas naturales y residuales. Métodos de prueba". Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. 2006.
26. Norma Mexicana. NMX-AA-079-SCFI-2001. "Determinación de nitrógeno de nitratos en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas. Método de prueba". Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. 2001.
27. Norma Oficial Mexicana. NOM-113-SSA1-1994. "Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa". Secretaria de Salud. 1994.
28. CNA. Comisión Nacional del Agua. Ochoa AL. Serie autodidáctica de medición del agua. Métodos y sistemas de medición. Comisión Nacional del Agua. <http://www.conagua.gob.mx> Consultado 3 de nov, 2011.
29. SAS User's Guide. Statistics (Version 9.2, 2nd Ed.). Cary NC, USA: SAS Inst. Inc. 2009.
30. Littell PC, Henry PR, Ammerman CB. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J Anim Sci* 1998;76:1216-1231.
31. Casula G, Cutting SM. Bacillus probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(5):2344-2352.
32. Brahmachari S, Jana A, Pahan K. Sodium benzoate, a metabolite of cinnamon and food additive, reduces microglial and astroglial inflammatory responses. *J Immunol* 2009;183:5917-5927.
33. Maier E, Kurz K, Jenny M, Schennach H, Ueberall F, Fuchs D. Food preservatives sodium benzoate and propionic acid and colorant curcumin suppress Th1-type immune response *in vitro*. *Food Chem Toxicol* 2010;48:1950-1956.