

## SULFITREDUCIRAJUĆE KLOSTRIDIJE - ZAGAĐIVAČI KRMNIH SMJESA

## SULPHITE REDUCING CLOSTRIDIA - CONTAMINANTS OF FEED COMPONENTS AND FEED

**Estella Prukner-Radovčić**

Izvorni znanstveni članak  
UDK:636.085.3.33.  
Primljeno: 15. studeni 1993.

### SAŽETAK

Opisan je nalaz sulfitreducirajućih klostridija u 6.055 pretraženih uzoraka krmiva i krmnih smjesa. Uspoređen je s nalazom bakterija roda *Clostridium* u 92.090 bakteriološki pretraženih organa uginule peradi.

Između izdvojenih 516 ili 8,5% pozitivnih uzoraka na sulfitnom agaru, svega su 24 sadržavala bakterije roda *Clostridium* (0,4%). Najčešće su pozitivna krmiva animalnog podrijetla (riblje brašno), a od krmnih smjesa, hrana za purane. Utvrđeno je 10 rodova sulfitreducirajućih bakterija različitih od klostridija, a najčešće rod *Bacillus* (29,4% u krmivima i 26,7% u krmnim smjesama). Slijede rodovi *Bacteroides* i *Bifidobacterium*. Rod *Clostridium* zastupljen je u svega 6,9% krmiva i 3,8% krmnih smjesa, a identificirano ih je sedam vrsta od kojih je *C. perfringens* najučestaliji.

Usporedno, pretraživani su i organi uginule peradi i u prosječno 0,2% izdvojene su klostridije. Identificirano je 16 vrsta, najčešće *C. perfringens*.

Rezultati upućuju na rijedak nalaz klostridija. Samo pojedine od njih obligatno su patogene.

### UVOD

Procjena higijenske ispravnosti krmiva i krmnih smjesa namjenjenih hranidbi domaćih životinja, znači i peradi, temelji se na laboratorijskim pretragama. Pri tome nastoji se ustanoviti stupanj kontaminacije različitim mikroorganizmima. Znatna pažnja se, pored toga, posvećuje pretrazi na prisutnost štetnih metaboličkih produkata tih mikroorganizama. Takvi su primjerice različiti toksini gljivica i bakterija ili druge tvari što mogu nepovoljno djelovati na zdravlje životinja i umanjiti gospodarski uspjeh stočarske proizvodnje. Opisano štetno djelovanje jednako se odražava i na zdravlje čovjeka. Tako procjena higijenske ispravnosti krmiva i krmnih smjesa postaje još značajnija. U tom smislu za perad svih dobnih i proizvodnih kategorija štetnim označuje se i nalaz sulfitreducirajućih klostridija (Morillon i Yalcin, 1966;

Cottureau, 1967; Katitch i Voukitchevitch, 1969; Chakrabarty i sur., 1979; Milanović i sur., 1981; Popović i Latinović, 1981; Greenham i sur., 1987; Pupavac i Lalić, 1990).

Bakterije roda *Clostridium* prisutne su obično u tlu, prašini, mulju, te u probavnom sustavu ljudi i životinja. Često ih je moguće izdvojiti iz jetre i drugih parenhimskih organa i tkiva za bakterijemije, a nakon uginuća zbog prodora iz crijeva ili okoliša. Bez obzira na rasprostranjenost ove bakterije, u ptica klinički oblici klostridioza rijetka su pojava. One ne rastu u aerobnim uvjetima, pa su zdrava tkiva otporna na njihovo djelovanje. Bolest se

---

Dr. sc. Estella Prukner-Radovčić, dipl. vet., viši znanstveni suradnik, Zavod za patologiju peradi Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, 41000 Zagreb, Heinzelova 55, Hrvatska-Croatia.

javlja tek kad su oštećena drugim infekcijama, pri dis-bakterizmu u probavnom sustavu, kad broj klostridija višestruko porasta, ili kad je imunost sustav životinje oslabljen. Kao zasebne nosološke jedinice u peradi javljaju se: ulcerozni enteritis, nekrotični enteritis, nekrotični dermatitis, tetanus i botulizam (Berkhoff, 1991; Dohms, 1991; Ficken, 1991; Kohler, 1992). Pojavi bolesti pogoduju brojni čimbenici, jednako mikrobnim, tehnologijski, kao i mikroklimatski, a sigurno su vrlo značajni oni vezani uz hranidbu peradi, jer uključuju veliki broj bakterijskih, tehnoloških i drugih što slabe opću otpornost životinja (Barnes i Goldberger, 1962; Barnes i sur., 1972; Salanitro i sur., 1978; Dutta i Devriese, 1980; Dutta i sur., 1983).

Nalaz sulfitreducirajućih klostridija u praksi poistovjećuje se s nalazom svih sulfitreducirajućih anaerobnih gram-pozitivnih bakterija. Ova i prije spomenute činjenice ponukale su na detaljnije istraživanje učestalosti nalaza sulfitreducirajućih bakterija kao zagađivača pojedinih krmiva ili krmnih smjesa. Također, nastojalo se ustanoviti u kojoj mjeri nalaz sulfitreducirajućih bakterija dokazuje istodobno i nalaz klostridija, te koje su to vrste klostridija što najčešće zagađuju hranu za perad. Činjenica je da sve nisu jednako štetne za zdravlje peradi. Nastojalo se konačno ukazati da je procjena higijenske ispravnosti krmiva ili krmnih smjesa, temeljem nalaza klostridija prema postojećim Pravilnicima (NN 4/92; NN 25/91) nedostatna.

## MATERIJAL I METODE

Pretraženo je 6.055 krmiva i krmnih smjesa namijenjenih hranidbi peradi na prisutnost sulfitreducirajućih klostridija. Uzorci su pristizali iz peradarskih farmi, tvornica stočne hrane, veterinarskih stanica i od inspeksijskih službi. Usporedo je bakteriološki pretraženo 92.090 organa uginule peradi u kojih je patomorfološki nalaz ukazivao na infekciju klostridijama. Sve pretrage obavljene su u razdoblju godina 1983-1991 na Veterinarskom fakultetu, Centru za peradarstvo, Zagreb.

Sulfitreducirajuće bakterije izdvajane su postupkom prema Pravilniku (NN 25/91), tako što je u bakteriološke epruvete stavljano po 1 ml istraživog uzorka u razrjeđenju 1:1000 i grijano u vodenoj kupelji 10 minuta pri 80°C te na to naslojen, ohlađeni na 55°C, sulfitrni agar. Tako naciyepljeno hranilište inkubirano je pri 37 °C od tri do pet dana. Rast karakterističnih crnih kolonija ili difuzno crnjenje cijele podloge uz moguću prisutnost plina, ocijenjeno je pozitivnim nalazom. Ove sulfitreducirajuće kolonije bakterija, te

organe uginule peradi, uobičajenim postupcima, naciyeplili bi se nadalje u tekuće hranilište (bilo jetreni bujon ili PGY bujon - "plasma glucosa yeast broth"), a zatim ih subkultivirali na krvni agar s 5% konjske krvi (BLGY-a, horse-blood-glucose-yeast agar), ili "Anaerobi agar po Breweru" (Merck) s 8% konjske krvi. Anaerobni uvjeti postizani su u McIntoshevu loncu pomoću vrećica "Gas Generating box H<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>" (Bio Merieux). Ploče s hranilištima inkubirane su u termostatu pri 37 °C 24 i 72 sata. Usporedno su isti uzorci naciyepljeni aerobno na BLGY-agar i briljant zeleni agar. Poraslim sojevima bakterija istražene su biokemijske osobitosti i identificirani su postupcima što ih opisuju Berkhoff i sur. (1974 b), Willis (1977), te Holdeman i sur. (1977).

## REZULTATI

Rezultati bakteriološke pretrage, zapravo nalaz 103 ili više sulfitreducirajućih bakterija u 1 g različitih krmiva i krmnih smjesa namijenjenih hranidbi peradi prikazani su na šest tablica (Tablice 1-6).

Od 6.055 uzoraka, 516 ili 8,5% bilo je pozitivnih na sulfitrnom agaru, a iz svega 24 identificirane su bakterije roda Clostridium (Tablica 1). Najčešće su bila pozitivna krmiva animalnog porijekla (riblje brašno, mesno brašno, brašno otpadaka peradi), dok sačma uljane repice, suncokretova sačma i ječam nisu sadržavali klostridije. Među smjesama najčešće je pozitivna hrana za purane, zatim nesilice, tovne piliće, te za pilenke (Tablice 2 i 3). Iz krmiva i krmnih smjesa izdvojeno je 10 rodova bakterija različitih od klostridija (Tablice 4 i 5, te Slike 1 i 2). Najučestalije su bakterije roda Bacillus (29,4% u krmivima i 26,7% u krmnim smjesama), zatim slijede rodovi Bacteroides i Bifidobacterium, dok je udio ostalih znatno manji. Rod Clostridium u krmivima zastupljen je sa 6,9%, a u krmnim smjesama s 3,8%. Determinirano je sedam različitih vrsta klostridija (Tablica 6) od sveukupno 24 izdvojene. Broj je nedovoljan da bi se sa sigurnošću mogla prikazati učestalost pojedinih vrsta, no ipak C. perfringens je s obzirom na broj najčešći.

Usporedno je na anaerobne bakterije pretraženo i 92.090 organa peradi. Nalaz je prikazan tablicama 7 i 8.

Klostridije, jednako kao u krmivima i krmnim smjesama, vrlo su rijedak nalaz (prosječno 0,2%), međutim broj različitih vrsta je znatan (čak 16). Također najčešće je izdvojen C. perfringens (47,7%) dok su ostale vrste znatno rjeđe.

**Tablica 1 - Prisutnost sulfitreducirajućih bakterija u pretraženim krmivima i krmnim smjesama za perad**

**Table 1 - Presence of sulphite reducing bacteria in examined samples of feed components and poultry feed (n=6.055)**

| Vrsta uzoraka<br>Samples | Broj pretraženih uzoraka<br>Number of examined samples | Nalaz sulfitreducirajućih bakterija<br>Fainding of sulphite reducing bacteria |      |                        |     |                                 |     |
|--------------------------|--|---|------|------------------------|-----|---------------------------------|-----|
|                          |  | Ukupno Total  |      | Klostridije Clostridia |     | Ostale bakterije Other bacteria |     |
|                          |  | Br. No.   | %    | Br. No.                | %   | Br. No.                         | %   |
| Krmiva Feed components   | 2.427  | 143   | 5,9  | 10                     | 0,4 | 133                             | 5,5 |
| Krmne smjese Feed        | 3.628  | 373   | 10,3 | 14                     | 0,4 | 359                             | 9,9 |
| Ukupno Total             | 6.055  | 516   | 8,5  | 24                     | 0,4 | 492                             | 8,1 |

**Tablica 3 - Nalaz sulfitreducirajućih bakterija u krmnim smjesama namijenjenim hranidbi peradi**

**Table 3 - Fainding of sulphite reducing bacteria in poultry (n=3.628)**

| Vrsta krmne smjese<br>Sort of feed | Broj uzoraka<br>Number of samples | Nalaz bakterija u sulfitnom agaru<br>Fainding of bacteria in sulphite agar |      |                        |     |                                 |      |
|------------------------------------|-----------------------------------|--|------|------------------------|-----|---------------------------------|------|
|                                    |                                   | Ukupno Total   |      | Klostridije Clostridia |     | Ostale bakterije Other bacteria |      |
|                                    |                                   | Br. No.  | %    | Br. No.                | %   | Br. No.                         | %    |
| Za purane For turkey               | 36                                | 7  | 19,4 | -                      | -   | 7                               | 19,4 |
| Za nesilice For laying hens        | 836                               | 132  | 15,8 | 4                      | 0,5 | 128                             | 15,3 |
| Za tovne piliće For broilers       | 2075                              | 191  | 9,2  | 8                      | 0,4 | 183                             | 8,8  |
| Za pilenke For replacement         | 681                               | 43   | 6,3  | 2                      | 0,3 | 41                              | 6,0  |
| Ukupno Total                       | 3628                              | 373  | 10,3 | 14                     | 0,4 | 359                             | 9,9  |

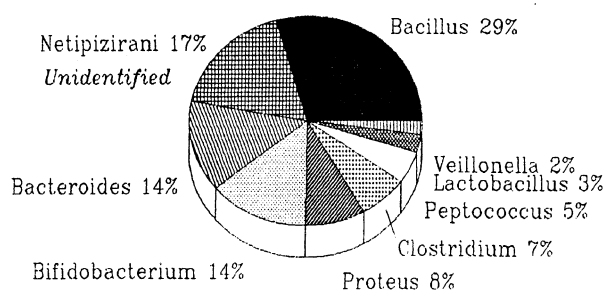
**Tablica 2 - Nalaz sulfitreducirajućih bakterija u krmivima**

**Table 2 - Fainding of sulphite reducing bacteria in feed components (n=2.427)**

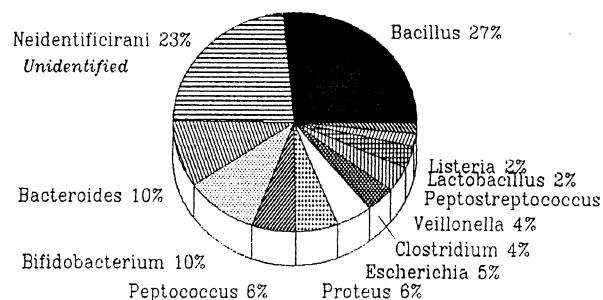
| Vrsta krmiva<br>Sort of feed components         | Broj uzoraka<br>Number of samples | Nalaz sulfitreducirajućih bakterija<br>Fainding of sulphite reducing bacteria |      |                        |     |                                 |      |
|---|-----------------------------------|---|------|------------------------|-----|---------------------------------|------|
|   |                                   | Ukupno Total  |      | Klostridije Clostridia |     | Ostale bakterije Other bacteria |      |
|   |                                   | Br. No.   | %    | Br. No.                | %   | Br. No.                         | %    |
| Riblje brašno Fish meal                         | 257                               | 36  | 14,0 | 3                      | 1,2 | 33                              | 12,8 |
| Mesno brašno Meat meal                          | 123                               | 17  | 13,8 | 1                      | 0,8 | 16                              | 13,0 |
| Brašno otpad. peradi Rendered poultry byproduct | 461                               | 31  | 6,7  | 2                      | 0,4 | 29                              | 6,3  |
| Sojina sačma Soybean meal                       | 61                                | 4   | 6,5  | -                      | -   | 4                               | 6,6  |
| Suncokretova sačma Sunflower meal               | 223                               | 12  | 5,4  | 1                      | 0,4 | 11                              | 4,9  |
| Ječam Barley                                    | 46                                | 2   | 4,3  | -                      | -   | 2                               | 4,3  |
| Kukuruz Maize                                   | 884                               | 31  | 3,5  | 3                      | 0,3 | 28                              | 3,2  |
| Sačma uljane repice Rapeseed meal               | 58                                | 1   | 1,7  | -                      | -   | 1                               | 1,7  |
| Ostalo Others                                   | 312                               | 9   | 2,9  | -                      | -   | 9                               | 2,9  |
| Ukupno Total                                    | 2427                              | 143   | 5,9  | 10                     | 0,4 | 133                             | 5,5  |

**Tablica 4 - Učestalost različitih rodova sulfitreducirajućih bakterija izdvojenih iz krmiva**  
**Table 4 - Frequency of different genera of sulphite reducing bacteria examined from feed**  
**(n=142)**

| Rodovi bakterija<br>Genera of bacteria | Riblje brašno<br>Fish meal |             | Mesno brašno<br>Meat meal |             | Brašno otpad. per.<br>Rendered poultry byproduct |             | Kukuruz<br>Maize |             | Ječam<br>Barley |            | Sojina sačma<br>Soybean meal |            | Suncokretova sačma<br>Sunflower meal |            | Ostalo<br>Others |            | Ukupno<br>Total |              |
|--|----------------------------|-------------|---------------------------|-------------|--|-------------|------------------|-------------|-----------------|------------|------------------------------|------------|--------------------------------------|------------|------------------|------------|-----------------|--------------|
|  | Br. No.                    | %           | Br. No.                   | %           | Br. No.  | %           | Br. No.          | %           | Br. No.         | %          | Br. No.                      | %          | Br. No.                              | %          | Br. No.          | %          | Br. No.         | %            |
| Bacillus                               | 11                         | 30.5        | 5                         | 29.4        | 8  | 25.8        | 10               | 32.3        | 1               | 50.0       | 4                            | 33.3       | 2                                    | 50.0       | 1                | 10.0       | 42              | 29.4         |
| Bacteroides                            | 8                          | 22.2        | 1                         | 5.9         | 5  | 16.1        | 3                | 9.7         | -               | -          | 1                            | 8.3        | -                                    | -          | 2                | 20.0       | 20              | 14.0         |
| Bifidobacterium                        | 4                          | 11.1        | 3                         | 17.6        | 3  | 9.7         | 6                | 19.4        | -               | -          | 2                            | 16.7       | -                                    | -          | 1                | 10.0       | 20              | 14.0         |
| Proteus                                | 1                          | 2.8         | 1                         | 5.9         | 6  | 19.4        | 1                | 3.2         | -               | -          | 1                            | 8.3        | -                                    | -          | 2                | 20.0       | 12              | 8.4          |
| Clostridium                            | 3                          | 8.3         | 1                         | 5.9         | 2  | 6.5         | 3                | 9.7         | -               | -          | 1                            | 8.3        | -                                    | -          | -                | -          | 10              | 6.9          |
| Peptococcus                            | 1                          | 2.8         | 1                         | 5.9         | 2  | 6.5         | 2                | 6.5         | -               | -          | -                            | -          | -                                    | -          | 1                | 10.0       | 7               | 4.9          |
| Lactobacillus                          | 3                          | 8.3         | -                         | -           | 1  | 3.2         | -                | -           | -               | -          | -                            | -          | -                                    | -          | -                | -          | 4               | 2.8          |
| Veillonella                            | 1                          | 2.8         | -                         | -           | -  | -           | 2                | 6.5         | -               | -          | -                            | -          | -                                    | -          | -                | -          | 3               | 2.1          |
| Netipizirani<br>Unidentified           | 4                          | 11.1        | 5                         | 29.4        | 4  | 12.9        | 4                | 12.9        | -               | -          | 3                            | 25.0       | 2                                    | 50.0       | 3                | 30.0       | 25              | 17.5         |
| <b>Ukupno<br/>Total</b>                | <b>36</b>                  | <b>25.2</b> | <b>17</b>                 | <b>11.9</b> | <b>31</b>  | <b>21.4</b> | <b>31</b>        | <b>21.4</b> | <b>1</b>        | <b>1.4</b> | <b>12</b>                    | <b>8.4</b> | <b>4</b>                             | <b>2.8</b> | <b>10</b>        | <b>7.0</b> | <b>143</b>      | <b>100.0</b> |



**Slika 1. Učestalost različitih rodova sulfitreducirajućih bakterija izdvojenih iz krmiva**  
**Graph. 1 Frequency of different genera of sulphite reducing bacteria examined from feed components**



**Slika 2. Učestalost različitih rodova sulfitreducirajućih bakterija izdvojenih iz krmnih smjesa za perad**  
**Graph. 2. Frequency of genera of sulphite reducing bacteria examined from poultry feed**

**Tablica 5 - Učestalost rodova sulfitreducirajućih bakterija izdvojenih iz krmnih smjesa za perad**  
**Table 5 - Frequency of genera of sulphite reducing bacteria isolated from poultry feed**  
**(n=373)**

| Rodovi bakterija<br>Genera of bacteria | Tovni pilići<br>Broilers |             | Pilenke<br>Replacement |             | Nesilice<br>Laying hens |             | Purani<br>Turkey |            | Ukupno<br>Total |              |
|--|--------------------------|-------------|------------------------|-------------|-------------------------|-------------|------------------|------------|-----------------|--------------|
|  | Br.<br>No.               | %<br>%      | Br.<br>No.             | %<br>%      | Br.<br>No.              | %<br>%      | Br.<br>No.       | %<br>%     | Br.<br>No.      | %<br>%       |
| Bacillus                               | 43                       | 22,5        | 10                     | 23,3        | 42                      | 31,8        | 3                | 42,9       | 98              | 26,7         |
| Bacteroides                            | 18                       | 9,4         | 5                      | 11,6        | 13                      | 9,9         | 1                | 14,3       | 37              | 9,9          |
| Bifidobacterium                        | 20                       | 10,5        | 5                      | 11,6        | 11                      | 8,3         | 1                | 14,3       | 37              | 9,9          |
| Peptococcus                            | 13                       | 6,8         | 3                      | 7,0         | 5                       | 3,8         | 1                | 14,3       | 22              | 5,9          |
| Proteus                                | 12                       | 6,3         | -                      | -           | 8                       | 6,1         | 1                | 14,3       | 21              | 5,6          |
| Escherichia                            | 10                       | 5,2         | 3                      | 7,0         | 5                       | 3,8         | -                | -          | 18              | 4,8          |
| Clostridium                            | 8                        | 4,2         | 2                      | 4,6         | 4                       | 3,0         | -                | -          | 14              | 3,8          |
| Veillonella                            | 8                        | 4,2         | 3                      | 7,0         | 3                       | 2,3         | -                | -          | 14              | 3,8          |
| Peptostreptococcus                     | 6                        | 3,1         | 1                      | 2,3         | 5                       | 3,8         | -                | -          | 12              | 3,2          |
| Lactobacillus                          | 2                        | 1,0         | 1                      | 2,3         | 4                       | 3,0         | -                | -          | 7               | 1,9          |
| Listeria                               | 4                        | 2,1         | -                      | -           | 2                       | 1,5         | -                | -          | 6               | 1,6          |
| Neidentificirani Unidentified          | 47                       | 24,6        | 10                     | 23,3        | 30                      | 22,7        | -                | -          | 87              | 23,3         |
| <b>Ukupno Total</b>                    | <b>191</b>               | <b>51,2</b> | <b>43</b>              | <b>11,5</b> | <b>132</b>              | <b>39,4</b> | <b>7</b>         | <b>1,9</b> | <b>373</b>      | <b>100,0</b> |

**Tablica 6 - Vrste klostridija izdvojenih iz krmiva i krmnih smjesa**  
**Table 6 - Strains of clostridia isolated from feed components and feed**  
**(n=24)**

| Vrsta klostridija<br>Strains of clostridia | Broj<br>Number | %<br>%       |
|--|----------------|--------------|
| Clostridium spp.                           | 8              | 33,3         |
| C. perfringens                             | 6              | 25,0         |
| C. subterminale                            | 3              | 12,5         |
| C. sporogenes                              | 2              | 8,3          |
| C. difficile                               | 2              | 8,3          |
| C. butyricum                               | 1              | 4,2          |
| C. paraputrificum                          | 1              | 4,2          |
| C. tertium                                 | 1              | 4,2          |
| <b>Ukupno Total</b>                        | <b>24</b>      | <b>100,0</b> |

**Tablica 7 - Broj bakterioloških pretraga i nalaz klostridija iz organa uginule peradi tijekom devet godina**  
**Table 7 - Number of bacteriological controls and finding of clostridia from dead poultry during nine years**  
**(n=92.090)**

| Godina<br>Years     | Broj pretraženih materijala<br>Number of examined materials | Nalaz klostridija<br>Finding of clostridia |            |
|---------------------|---|--|------------|
|                     |   | Broj<br>Number                             | %<br>%     |
| 1983.               | 7.084   | 15   | 0,2        |
| 1984.               | 11.403  | 30   | 0,3        |
| 1985.               | 13.026  | 35   | 0,3        |
| 1986.               | 15.932  | 33   | 0,2        |
| 1987.               | 18.601  | 21   | 0,1        |
| 1988.               | 8.968   | 9  | 0,1        |
| 1989.               | 7.570   | 19   | 0,3        |
| 1990.               | 6.989   | 24   | 0,4        |
| 1991.               | 3.247   | 11   | 0,3        |
| <b>Ukupno Total</b> | <b>92.090</b>   | <b>197</b>                                 | <b>0,2</b> |

**Tablica 8 - Rezultati identifikacije klostridija iz organa uginule peradi**  
**Table 8 - Results of identification of clostridia from dead poultry**  
**(n=197)**

| Vrste klostridija<br>Strains of clostridia | Nalaz u organima Finding in organs |                |              |                 |               |                  |                   | Ukupno Total |      |
|--|------------------------------------|----------------|--------------|-----------------|---------------|------------------|-------------------|--------------|------|
|  | Crijevo<br>Intestine               | Jetra<br>Liver | Koža<br>Skin | Mišić<br>Muscle | Srce<br>Heart | Bubreg<br>Kidney | Slezena<br>Spleen | Ukupno Total |      |
|  |                                    |                |              |                 |               |                  |                   | Br. No.      | %    |
| <i>C. perfringens</i>                      | 34                                 | 44             | 11           | 3               | 2             | -                | -                 | 94           | 47.7 |
| <i>C. chauvoei</i>                         | -                                  | 13             | 2            | -               | -             | -                | 1                 | 16           | 8.1  |
| <i>C. sphenoides</i>                       | -                                  | 5              | 3            | -               | -             | 1                | -                 | 9            | 4.6  |
| <i>C. ramosum</i>                          | 3                                  | 4              | 2            | -               | -             | -                | -                 | 9            | 4.6  |
| <i>C. glycolicum</i>                       | -                                  | 1              | -            | 1               | 3             | -                | -                 | 5            | 2.5  |
| <i>C. sordellii</i>                        | 1                                  | 1              | -            | 2               | -             | -                | -                 | 4            | 2.0  |
| <i>C. tertium</i>                          | -                                  | 4              | -            | -               | -             | -                | -                 | 4            | 2.0  |
| <i>C. innocuum</i>                         | 3                                  | -              | -            | -               | -             | -                | -                 | 3            | 1.5  |
| <i>C. haemolyticum</i>                     | 2                                  | 1              | -            | -               | -             | -                | -                 | 3            | 1.5  |
| <i>C. tetani</i>                           | -                                  | 1              | -            | -               | -             | -                | -                 | 1            | 0.5  |
| <i>C. novyi A.</i>                         | -                                  | 1              | -            | -               | -             | -                | -                 | 1            | 0.5  |
| <i>C. septicum</i>                         | -                                  | 1              | -            | -               | -             | -                | -                 | 1            | 0.5  |
| <i>C. scatalogenes</i>                     | 1                                  | -              | -            | -               | -             | -                | -                 | 1            | 0.5  |
| <i>C. sporogenes</i>                       | -                                  | -              | 1            | -               | -             | -                | -                 | 1            | 0.5  |
| <i>C. putrefaciens</i>                     | -                                  | 1              | -            | -               | -             | -                | -                 | 1            | 0.5  |
| <i>C. cochlearium</i>                      | -                                  | 1              | -            | -               | -             | -                | -                 | 1            | 0.5  |
| <i>Clostridium spp.</i>                    | 21                                 | 20             | 2            | -               | -             | -                | -                 | 43           | 21.8 |
| <b>Ukupno Total</b>                        | <b>65</b>                          | <b>98</b>      | <b>21</b>    | <b>6</b>        | <b>5</b>      | <b>1</b>         | <b>1</b>          | <b>197</b>   |      |

## DISKUSIJA

Kao izazivači bolesti peradi spominju se samo neki rodovi sulfitreducirajućih bakterija, a jednako i klostridija. Teško je razlučiti da li u pojavi bolesti djeluju samostalno ili, kako se to često navodi (Rosenberger i sur., 1975; Al Sheikhly i Al Saieg, 1980; Cullen i Pattison, 1980; Sterne, 1981) dio su etiološkog kompleksa bolesti multi-kauzalne etiologije. Osnovu nesporazuma predstavlja poteškoća u razlikovanju obligatnih izazivača bolesti i onih uvjetno patogenih ili sasvim apatogenih, ali čestih obitavaoca u okolišu životinja ili probavnom sustavu (Hanak i Konečný, 1971; Lengauer i Lew 1981; Popović i Latinović, 1981; Von Flatscher i Willinger, 1981).

Tijekom istraživanja, sulfitreducirajuće bakterije nađene su u 8,5% krmiva i krmnih smjesa namjenjenim hranidbi peradi. Od toga svega je 0,4% klostridija. Ostale su svrstane u 10 rodova, različitih od klostridija. Slične rezultate istraživanja dobili su i drugi autori (Angelotti i sur., 1962; Knap i Francetić, 1970; Konečný i Mičkova, 1979; Milanović i sur., 1981). Ovim bakteri-

jama zajedničko je svojstvo jedino redukcija sulfita u agaru (tvorba željezo-sulfida) što izaziva crno obojenje. Rezultati (Tablica 2) ukazuju na to da su krmiva animalnog podrijetla znatno češće kontaminirana sulfitreducirajućim bakterijama, pa i klostridijama, ali i osim ribljeg brašna, uvijek ih je manje od 1%. Biljna krmiva rjeđe su zagađena (jedino je iz kukuruza izdvojeno 0,3% klostridija). Sačme, bilo uljane repice, soje ili suncokreta, najvjerojatnije zbog povišene temperature što se koristi u tehnološkom postupku izdvajanja ulja, gotovo su slobodne od klostridija.

Rijedak nalaz klostridija pripisuje se i preporučenom postupku izdvajanja. Njime se ishodišni materijal razrijeđi 1000 puta. Nadalje, prema Pravilniku, uzorak se zagrijava pri 80 °C čime su uklanjaju neke saprofitske termolabilne bakterije, a dokazuju termostabilne. Postupak tako isključuje dokaz nekih patogenih ili bar uvjetno patogenih termolabilnih bakterija što ih se drugim načinima može izdvojiti (Mossel i Waart, 1968; Knap i Francetić, 1970; Popović i Latinović, 1981).

U krmivima i krmnim smjesama dokazano je ukupno

sedam vrsta klostridija od kojih *C. perfringens*, *C. difficile* i *C. sporogenes* mogu samostalno ili uz sudjelovanje drugih bakterija izazvati bolest.

Ostale, spominju se kao apatogene i slučajan su nalaz uglavnom na tjelesnim površinama, u izmetu ili u tkivima gdje su aerobne bakterije stvorile temeljne uvjete za rast i razmnožavanje klostridija. Ne postoji tako (Berkhoff, 1991; Ficken, 1991; Dohms, 1991; Kohler, 1992) objektivni dokaz da su ostale klostridije što su izdvojene izazivači bolesti.

Nalaz klostridija u 92.090 pretraženih organa peradi tijekom razdoblja devet godina ukazuje da su, kao i u hrani za perad, relativno rijetka pojava. Zbog nedovoljno anamnestičkih podataka nije na žalost moguće ustanoviti izvor zaraze. Nalaz se međutim ne smije zanemariti, jer neki od izdvojenih sojeva obilgatno izazivaju bolest (*C. perfringens*, *C. septicum*, *C. tetani*), dok su drugi uvjetno patogeni za perad (*C. novyi*, *C. sporogenes*, *C. butyricum*, *C. sordellii*, *C. chauvoei*) (Kohler, 1992). Klostridije iziskuju pažnju i kao mogući zagađivači stočne hrane, jer zbog svojstva termorezistencije ostaju aktivni i nakon kafilerijskih sirovina (klaonički otpaci, lešine peradi). Tako se zaokružuje put kontaminacije.

Sprovedeno istraživanje na ukupno 6.055 krmiva i krmnih smjesa, ukazuje na potrebu strogog razlikovanja nalaza sulfitreducirajućih bakterija od nalaza patogenih ili uvjetno patogenih klostridija. U dijagnostičkoj praksi, vrlo često higijenski neispravnim proglašavaju se krmiva i krmne smjese što, prema objektivnom nalazu klostridija, ne bi trebalo činiti, ili naprotiv zbog lošeg preporučenog načina pretrage proglašava se higijenski ispravna hrana koja npr. sadrži termolabilne ali patogene klostridije. Valja imati na umu da su u mnoštvu sulfitreducirajućih bakterija uz patogene klostridije identificirani i rodovi poput: *Listeria*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*. Kako mnogi navode (Hanak i Konečný, 1971; Berkhoff i Redenbarger, 1977; Biberstein i Hirsh, 1979; Konečný i Mičkova, 1979; Goldberg, 1980; Wilkins i West, 1983) i ove bakterije u patološkim procesima mogu komplicirati kliničku sliku bolesti u peradi. Prema tome, u postupku dokazivanja klostridija u krmivima i krmnim smjesama nije dovoljno opisati nalaz sulfitreducirajućih bakterija, već ih nužno treba do kraja identificirati.

#### LITERATURA

1. Al Sheikhly, F., A. Al Saieg (1980): Role of coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. *Avian Dis.* 24, 324-333.
2. Angelotti, R., H. E. Hall, M. J. Foter, K. H. Lewis (1962): Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. *Appl. Microbiol.* 10, 193-199.
3. Barnes, E. M., H. S., Goldberger (1962): The isolation of anaerobic gram-negative bacteria from poultry reared with and without antibiotic supplements. *J. appl. Bact.* 25, 94-106.
4. Barnes, E. M., G. C. Mead, D. A. Barnum (1972): The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. *Br. Poult. Sci.* 13, 311-326.
5. Berkhoff, H. A. (1991): Ulcerative enteritis (Quail Disease). In: *Diseases of poultry*, 9th ed. (B. W. Calnek) 258-264. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
6. Berkhoff, G. A., J. L. Redenbarger (1977): Isolation and identification of anaerobes in the veterinary diagnostic laboratory. *Am. J. Vet. Res.* 38, 1069-1074.
7. Berkhoff, G. A.; S. G. Campbell, H. B. Naylor, L. D. S. Smith (1974): Etiology and pathogenesis of ulcerative enteritis ("Quail disease"). Characterization of the causative anaerobe. *Avian Dis.* 18, 195-204.
8. Biberstein, E. L., D. C. Hirsh (1979): Diseases caused by *Bacteroides* and *Fusobacterium* species. In: *Handbook Series in Zoonoses* (J. H. Stelle, Ed.). Section A: Bacterial, Rickettsial and Mycotic Diseases, vol 1. CRC Press inc., Boca Raton, Florida.
9. Chakrabarty, A. K., B. R. Boro, A. K. Sarmah (1979): Assessment of sanitary quality of animal feeds in Assam. *Vetcol, India* 19, 13-18.
10. Cottureau, P. H. (1967): Toxi-infections provoquées par des aliments infectés par des germes anaérobies notamment par *W. perfringens* et *W. agni*. *Bull. Off. int. Epiz.* 67, 1293-1306.
11. Cullen, G. A., M. Pattison (1980): Priorities in poultry disease research. *World's Poult. Sci. J.* 36, 7-24.
12. Dohms, J. E. (1991): Botulism. In: *Diseases of poultry*, 9th ed. (B. W. Calnek), 271-276. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
13. Dutta, G. N., L. A. Devriese (1980): Susceptibility of *Clostridium perfringens* of animal origin to fifteen antimicrobial agents. *J. Vet. Pharm. Therap.* 3, 227-236.
14. Dutta, G. N., L. Devriese, P. F. Van Assche (1983): Susceptibility of *Clostridia* from farm animals to 21 antimicrobial agents including some used for growth promotion. *J. Antimicrob. Chemother.* 12, 347-356.
15. Ficken, M. D. (1991): Necrotic enteritis and Gangrenous dermatitis. In: *Diseases of poultry*, 9th ed. (B. W. Calnek), 264-270. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
16. Goldberg, H. S. (1980): Aspects of anaerobic infections in animals. *Infection* 8 (Suppl. 2), S131-S133.
17. Greenham, L. W., C. Harber, E. Lewis, F. T. Scullion (1987): *Clostridium perfringens* in pelleted feed. *Vet. Rec.* 120, 557.
18. Hanak, J., S. Konečný (1971): Vhodnost nekterych sulfitredučních medii pro stanovení zarodku rodu *Clostridium*. *Vet. Med.* 16, 457-460.
19. Holdeman, L. V., E. P. Cato, W. E. C. Moore, Eds (1977): *Anaerobe laboratory manual*, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia.
20. Katitch, R. V., Z. Voukitchevitch (1969): Resultats se nos recherches sur l'infection des aliments concentres avec les germes *W. perfringens-agni*. *Bull. Off. int. Eiz.* 72, 1097-1112.
21. Kohler, B. (1992): Clostridiosen: Allgemeines, Nekrotisierende Enteritis, Ulzerative Enteritis, Gasodemerkrankungen. In: *Krankheiten des Wirtschaftesgefluegels*, Band II: Spezial

- ler Teil 2 (G. Heider, G. Monreal, J. Meszaros), 195-234. Gustav Fischer Verlag Jena. Stuttgart.
22. Knap, K., M. Francetić (1970): Poredbena istraživanja prikladnosti Wilson-Blairovog agara i njegove modifikacije po Mosselu za kvantitativno određivanje *Clostridium perfringens* u hrani. RIM 5, 19-22.
  23. Konečný, S., V. Mičková (1979): Proužiti selektivni sulfitreduktivni medija pro izolaci *Clostridium perfringens*. Vet. Med. 24, 691-697.
  24. Lengauer, E., H. Lew (1981): Über den mikrobiellen Zustand Wirtschaftseigener Futtermittel. Wien. tierarztl. Mschr. 68, 288-298.
  25. Milanović, A., A. H. Beganović, F. Čaklović (1981): Sulfitreducirajuće klostridije u krmivima i krmnim smjesama. Vet. glasnik 35, 237-244.
  26. Moraillon, P., N. Yalcin (1966): Formes nouvelles de gastro-entero-hepatotoxemies et role etiologique des aliments du betail. Rec. Med. Vet. 142, 935-947.
  27. Mossel, D. A. A., J. Waart (1968): The enumeration of clostridia in foods and feeds. Ann. Inst. Pasteur-Lille 19, 11- 13.
  28. Popović, M., V. Latinović (1981): Osobine termorezistentnih sojeva *Cl. perfringens* izolovanih iz krmiva i njihov odnos prema antibiosenzibilitetu i toksinogenezi. Vet. glasnik 35, 225-231.
  29. Pupavac, V., M. Lalić (1990): Uticaj kontaminacije stočne hrane na zdravlje životinja. Krmiva 32, 215-219.
  30. Rosenberger, J. K., S. Klopp, R. J. Eckroad, W. C. Krauss (1975): The role of the infectious bursal agent and several avian adenoviruses in the hemorrhagic-aplastic-anemia syndrome and gangrenous dermatitis. Avian Dis. 19, 717-729.
  31. Salanitro, J. P., I. G. Blake, P. A. Muirhead, M. Maglio, J. R. Goodman (1978): Bacteria isolated from the duodenum, ileum and cecum of young chicks. Appl. Environ. Microbiol. 35, 782-790.
  32. Sterne, M. (1981): Clostridial infections. Br. Vet. J. 137, 443-454.
  33. Von Flatscher, J., H. Willinger (1981): Bakterien und Pilzkeim-zahlen in Futtermitteln. Wien. tierarztl. Mschr. 68, 282-284.
  34. Wilkins, T. D., S. E. H. West (1983): Therapy of anaerobic infection. Infection 11 (Suppl. 2), S105-S108.
  35. Willis, A. T. (1977): Anaerobic bacteriology: Clinical and laboratory practice, 3<sup>rd</sup> ed. Butterworths and Co. Ltd. London.
    - \* (NN 4/92) Pravilnik o najvećim količinama štetnih tvari i sastojaka u stočnoj hrani.
    - \*\* (SL 25/80 i NN 25/91) Pravilnik o metodama obavljanja mikrobioloških analiza i superanaliza živežnih namirnica.

## SUMMARY

The finding of sulphite reducing Clostridia in 6.055 bacteriologically examined samples of feed components and feed is described. It is compared with the finding of bacteria of genus Clostridia in 92.090 bacteriologically examined organs of dead poultry.

Among 516 (8.5%) isolations positive on sulphite agar, only 24 contained bacteria of genus Clostridium (0.1%). The most frequently positive were animal origin feed components (fish meal), and among feed that for turkeys. Ten among sulphite reducing bacteria were determined as different from Clostridia, most of them being of genus Bacillus (29.4% in feed components and 26.7% in feed). They were followed by genera Bacteroides and Bifidobacterium. Genus Clostridium was found in only 6.9% of feed components and 3.8% of feed. Seven different species of genus Clostridium were identified, among which *C. perfringens* was the most frequent.

Concomitantly the organs of dead poultry were examined and Clostridia isolated in 0.2% of cases at an average. Sixteen species were identified, the most frequent among them being *C. perfringens*.

According to the results obtained the incidence of Clostridia was comparatively rare. Only some of the Clostridia were obligatory pathogenic.