

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra speciální zootechniky**

**VÝZKUMNÝ ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ VÝROBY, v.v.i. V PRAZE**  
**UHŘÍNĚVSI**

**Oddělení fyziologie výživy a jakosti produkce**

**MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE VAJEC**  
**Z KLECOVÉHO A PODESTÝLKOVÉHO CHOVU**

**TŮMOVÁ, E., ENGLMAIEROVÁ, M., LEDVINKA, Z., DLOUHÁ, G.**

**CERTIFIKOVANÁ METODIKA**

**Výstup z řešení výzkumného záměru MŠMT MSM 604 607 0901 a výzkumného záměru**

**MZe 0002701404**

**2010**

**Katedra speciální zootechniky, FAPPZ, ČZU v Praze**  
**Oddělení fyziologie výživy a jakosti produkce, VÚŽV, v.v.i. v Praze**  
**Uhřetěvesi**

**prof. Ing. Eva Tůmová, CSc.**  
**Ing. Michaela Englmaierová**  
**doc. Ing. Zdeněk Ledvinka, CSc.**  
**Ing. Gabriela Dlouhá, Ph.D.**

**Kontaktní adresa:**

Katedra speciální zootechniky, ČZU v Praze;

Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbátka;

Tel.: +420 224 383 048

e-mail: tumova@af.czu.cz

**Oponenti:** Prof. MVDr. Ing. Pavel Suchý, CSc., VFU Brno

Ing. František Sládek, CSc., MZe ČR

Certifikovaná metodika

„Mikrobiální kontaminace vajec z klecového a podestýlkového chovu“

byla **schválena a doporučena** pro využití v zemědělské praxi

Ministerstvem zemědělství ČR **pod číslem jednacím 33530/2010-13090**

© ČZU v Praze

ISBN 978-80-213-2107-6

## 1. Cíl metodiky

Systém ustájení ovlivňuje kvalitu vajec a má vliv i na mikrobiální kontaminaci skořápky vajec. Nejvíce znečištěna bývají vejce z alternativních systémů ustájení a nejméně z klecí. Čím vejce vykazují vyšší znečištění skořápky, tím se dá předpokládat zvýšení průniku mikroorganismů do obsahu vejce přes kutikulu, skořápku a podskořápečné blány. To vše může ovlivnit skladování vajec, ale především bezpečnost produkce. Záleží zejména na použité teplotě a vlhkosti.

Cílem práce bylo posouzení rozdílů v úrovni mikrobiální kontaminace skořápky a v penetraci mikroorganismů do vejce na úroveň podskořápečných blan a bílku při ustájení nosnic v konvenční kleci a na podestýlce a ve vztahu k délce skladování (0, 2, 7 a 14 dní) vajec.

## 2. Vlastní popis metodiky

### 2.1. Současný stav sledované problematiky

Jedním z ukazatelů kvality vajec je mikrobiální znečištění vaječné skořápky. Ihned po snesení je povrch i obsah vajec (Mayes a Takeballi, 1983) u zdravých nosnic většinou sterilní. Pak ale dochází k rychlé kontaminaci povrchu skořápky bakteriemi přítomnými ve výkalech, prachu nebo na zařízení hal. Některé z těchto bakterií mohou být patogenní pro lidi a schopné kontaminovat vaječný obsah (Board a Tranter, 1995).

Mikrobiální znečištění vaječné skořápky hlavně závisí na systému ustájení, který je používán při chovu nosnic a jež předurčuje prostředí, do jakého je vejce sneseno. Záleží na úrovni znečištění prostředí a to jak povrchu vybavení hal, tak i peří a běháků samotných nosnic, ale také i na koncentraci mikroorganismů nebo prachu ve vzduchu. Bakterie tvoří jen malý podíl z částic nesených vzduchem, ale mohou negativně ovlivnit počáteční bakteriální kontaminaci vaječné skořápky (De Reu *et al.*, 2005a; 2008a). Quarles *et al.* (1970) zjistili průkazné rozdíly v kontaminaci vzduchu mezi ustájením na podestýlce ( $3,97 \log \text{KTJ/m}^3$ ) a v klecích ( $3,03 \log \text{KTJ/m}^3$ ), z čehož vyplývá přibližně 9krát vyšší kontaminace vzduchu bakteriemi při chovu na podestýlce. De Reu *et al.* (2005a) ve svém experimentu zjistili pozitivní korelaci  $r = 0,66$  ( $P < 0,001$ ) mezi koncentrací aerobních bakterií ve vzduchu hal a počáteční bakteriální kontaminací skořápek vajec. Vyšší hodnoty kontaminace vzduchu mikroorganismy byly stanoveny ve voliéře ( $5,3 \log \text{KTJ/m}^3$ ) v porovnání s konvenčními ( $4,3 \log \text{KTJ/m}^3$ ) a obohacenými klecemi ( $4,4 \log \text{KTJ/m}^3$ ). Mimoto v tomto pokusu nebyly zjištěny korelace mezi kontaminací skořápky a teplotou nebo vlhkostí vzduchu měřenými

v halách. Stupeň mikrobiálního znečištění vaječné skořápky se též odvíjí od množství vlhkosti produkované zvířaty a od teploty, které jsou vejce vystavena. Vlhkost produkovaná zvířaty může přímo zvyšovat mikrobiální kontaminaci vaječné skořápky a následkem toho roste i nebezpečí mikrobiální kontaminace vnitřního obsahu zdánlivě čistých vajec (Smith *et al.*, 2000).

Bakteriální kontaminace vaječné skořápky souvisí se zvoleným systémem ustájení. Počet bakterií na vejci je výsledkem kontaminace bakteriemi přítomnými v prostředí, kde jsou vejce snesena (Harry, 1963). Board a Tranter (1995) uvádějí, že vnější kontaminace skořápek násadových vajec byla v rozmezí od 2 do 7 log (od  $10^2$  do  $10^7$ ) kolonií tvořících jednotku (KTJ). Skořápky konzumních vajec dosahují maximální bakteriální kontaminace 6 log KTJ/skořápka (De Reu *et al.*, 2005b). Harry (1963), Quarles *et al.* (1970), Vadehra a Baker (1973), De Reu *et al.* (2005a; 2006a; 2008b) porovnávali různé systémy ustájení a jejich vliv na bakteriální kontaminaci skořápky. Ve všech případech byla vejce z klecí vyhodnocena jako nejméně kontaminovaná. Do výhod klecových systémů pro produkci vajec s ohledem na bezpečnost produktů patří malý nebo žádný kontakt zvířete s výkaly a hygiena poskytovaná zvířatům a vejcím, což je umožněno konstrukcí klece. Přispívá tomu i nízká koncentrace prachu a kontaminantů ve vzduchu vyplývající ze způsobu chovu (Dunn, 1997). Slepice chované ve voliérách a na podestýlce jsou ve styku s kontaminovaným i potenciálně kontaminujícím materiálem a to se odráží i na úrovni znečištění skořápky vajec mikroorganismy.

V obou klecových systémech, jak v konvenčních, tak i obohacených klecích, je nízká úroveň bakteriální kontaminace skořápky. Nebyly zjištěny žádné průkazné rozdíly v kontaminaci celkovým počtem aerobních bakterií mezi těmito systémy (4,0–4,5 log KTJ/skořápka). Také u gramnegativních bakterií nebyly zaznamenány rozdíly (cca 3,0 log KTJ/skořápka). Typ podestýlkového materiálu používaný ve snáškových boxech obohacených klecí signifikantně neovlivnil bakteriální kontaminaci skořápky (De Reu *et al.*, 2005a). Porovnáním úrovně bakteriálního znečištění skořápky vajec z konvenčních a obohacených klecí se také zabývali Mallet *et al.* (2006). Ti naopak zjistili, že provedení klecí průkazně ( $P < 0,001$ ) ovlivnilo bakteriální kontaminaci povrchu skořápek, která byla hodnocena na základě celkového počtu mezofilních aerobních bakterií a počtu enterokoků. Vyšší bakteriální zatížení zaznamenali u vajec snesených v obohacených klecích ( $2,86 \pm 0,03$  log KTJ/cm<sup>2</sup> pro celkový počet bakterií a  $1,06 \pm 0,05$  log KTJ/cm<sup>2</sup> pro enterokoky) v porovnání s konvenčními klecemi ( $2,52 \pm 0,04$  log KTJ/cm<sup>2</sup> pro celkový počet bakterií a  $0,77 \pm 0,07$  log KTJ/cm<sup>2</sup> pro enterokoky). Mimoto bylo u obohacených klecí, bez ohledu

na konstrukci obohacené klece, stanoveno více bakterií (celkový počet bakterií a počet enterokoků) na vejcích snesených mimo snáškové hnízdo. Vliv systému ustájení na bakteriální kontaminaci vaječné skořápky vyjádřený pomocí celkového počtu mikroorganismů, gramnegativních bakterií a Enterobacteriaceae byl studován De Reu *et al.* (2008b) v pokusných halách pro nosnice a za faremních podmínek. V pokusné studii nebyly zjištěny rozdíly mezi konvenční a obohacenou klecí. Kontaminace celkovým počtem mikroorganismů byla průkazně vyšší ( $> 1,0$  log) na vejcích z voliéry v porovnání s oběma klecovými systémy. Není tomu tak ale v případě gramnegativních bakterií. V druhém pokusu ve faremních podmínkách byly zjištěny silné ( $P < 0,001$ ) rozdíly v průměrné kontaminaci skořápky celkovým počtem mikroorganismů mezi šesti obohacenými klecemi, ale i mezi sedmi neklecovými systémy. Hodnoty se u obohacených klecí pohybovaly v rozmezí od 4,24 do 5,22 log KTJ/skořápka a u alternativních systémů od 4,35 do 5,51 log KTJ/skořápka. Průměrná kontaminace vaječné skořápky celkovým počtem aerobních bakterií ve čtyřech podestýlkových systémech ustájení (5,00 log KTJ/skořápka) nebyla průkazně odlišná ( $P > 0,05$ ) od průměrné kontaminace ve třech voliérách (4,95 log KTJ/skořápka). Na druhé straně byly zjištěny průkazné ( $P < 0,001$ ) rozdíly mezi průměrnou kontaminací skořápky celkovým počtem mikroorganismů u vajec z obohacených klecí v porovnání s vejci z neklecových systémů. Průměrně nižší úroveň kontaminací celkovým počtem mikroorganismů byly stanoveny na skořápkách vajec z obohacených klecí (4,75 *versus* 4,98 log KTJ/skořápka). Pro enterobakterie nebyly zjištěny žádné rozdíly v kontaminacích vaječné skořápky mezi obohacenými klecemi a neklecovými systémy. Mimoto 88 %, resp. 94 % skořápek vajec mělo na svém povrchu  $< 10$  KTJ Enterobacteriaceae. Tato studie ukázala, že v praxi, tedy za faremních podmínek, byly průměrné rozdíly u bakteriální kontaminace vajec mezi oběma systémy méně zřetelné. Protais *et al.* (2003) uvádějí vyšší bakteriální kontaminaci ve voliéře v porovnání s konvenčními klecemi. Kontaminace o více než 1 log KTJ celkového počtu aerobních bakterií vyšší na skořápce vajec z voliéry oproti klecovému ustájení je zřejmá také z pokusů De Reu *et al.* (2005a). K obdobným závěrům ve své práci došli i De Reu *et al.* (2006a) při porovnávání počáteční kontaminace vajec sbíraných v halách. Shledali průkazně ( $P < 0,001$ ) vyšší kontaminaci skořápky celkovým počtem aerobních bakterií u vajec z alternativního systému ustájení (5,46 log KTJ/skořápka) v porovnání s klecemi (5,08 log KTJ/skořápka). Nicméně počáteční kontaminace skořápky celkovým počtem gramnegativních bakterií byla nižší ( $P < 0,001$ ) v alternativních systémech (3,31 log KTJ/skořápka) oproti klecovému ustájení (3,85 log KTJ/skořápka). K podobnému

zjištění dospěli i Schwarz *et al.* (1999). Vyšší procento gramnegativních bakterií a nepravidelně nesporulujících tyčinek zaznamenali na vejcích z klecí, kdežto vejce z alternativního systému měla naopak na skořápce vyšší podíl Micrococcaceae. Mimoto ještě uvádějí průkazně ( $P \leq 0,001$ ) vyšší počet mikroorganismů o  $10^1$  KTJ/cm<sup>2</sup> na skořápkách vajec z alternativního ustájení (3,2 – 4,3 log KTJ/cm<sup>2</sup>) v porovnání s klecemi (2,3 – 3,9 log KTJ/cm<sup>2</sup>). Kromě toho Quarles *et al.* (1970) vysledovali 20 – 30krát vyšší kontaminaci skořápky celkovým počtem aerobních bakterií u vajec z podestýlkových chovů než je tomu u vajec z klecí. V jiném experimentu Harry (1963) zjistil, že skořápky vajec z hluboké podestýlky obsahovaly průměrně 15krát více bakterií a měly vyšší zastoupení potencionálně škodlivých organismů než skořápky vajec z klecí.

Vliv systému ustájení na kontaminaci vaječné skořápky určitými skupinami bakterií je variabilní (De Reu *et al.*, 2008a). De Reu *et al.* (2006b; 2006c; 2007a) zjistili, že v přirozené kontaminaci vaječné skořápky konzumních vajec dominoval grampozitivní *Staphylococcus* spp.. *Staphylococcus* se zdá být také nejvíce dominujícím druhem ve vzduchu hal (De Reu *et al.*, 2007a). Grampozitivní bakterie pocházející z prachu, podestýlky nebo výkalů dominují ve flóře na skořápkách vajec pravděpodobně díky jejich vyšší toleranci k sušším podmínkám (Board a Tranter, 1995). Vyšší počáteční kontaminace vajec z alternativních systémů ustájení grampozitivními bakteriemi pravděpodobně znesnadňuje adhezi gramnegativních bakterií (De Reu *et al.*, 2005b).

Dále pak je mikrobiální kontaminace skořápek ovlivněna způsobem manipulace s vejci po snesení. Některá zjištění (Quarles *et al.*, 1970) také ukazují, že vysoké teploty by mohly vést ke zvýšení kontaminace skořápek vajec mikroorganismy. Z výsledků skladování konzumních vajec, jak v chladniče, tak i mimo ni, vyplynul signifikantní pokles bakteriální kontaminace skořápky celkovým počtem aerobních bakterií stejně tak i gramnegativními bakteriemi (De Reu *et al.*, 2008a). Celkový počet gramnegativních bakterií ve srovnání s celkovým počtem aerobních bakterií statisticky průkazně poklesl během skladování při pokojové teplotě (ze 4,04 na 3,23 log KTJ/skořápka), ale v prostředí chladničky snížení nebylo až tak výrazné (ze 4,04 na 3,66 KTJ/skořápka). To bylo pravděpodobně způsobeno nižší vlhkostí při skladování za pokojové teploty. Během skladování 14 dnů neprůkazně klesl celkový počet aerobních bakterií při pokojové teplotě a atmosférické vlhkosti 50 % (z 5,44 na 5,22 log KTJ/skořápka) i v chladniče (5 °C) a atmosférické vlhkosti 85 % (z 5,44 na 5,33 log KTJ/skořápka, De Reu *et al.*, 2005b). Přestože byla zjištěna vyšší počáteční kontaminace vaječné skořápky celkovým počtem aerobních bakterií u vajec z neklecových systémů v porovnání s klecovými systémy, na konci řetězce, tj. v obchodech, si byla průměrná

kontaminace v obou systémech podobná (De Reu *et al.*, 2008a). Gentry a Quarles (1972) nezaznamenali výrazné rozdíly v počtu životaschopných mikroorganismů po 1 dni skladování čerstvých vajec při teplotě 4 °C.

Jsou známy dva způsoby mikrobiální kontaminace vajec. Méně častá je kontaminace endogenního původu. V tomto případě je zdrojem kontaminace nemocná nosnice a krevní cestou je infikováno i vejce. Naopak převážná část kontaminací vaječného obsahu mikroorganismy je způsobena cestou exogenní. Tedy penetrací mikroorganismů z vnějšího prostředí přes přirozené mechanismy ochrany vajec. Vaječný obsah je chráněn před exogenní kontaminací mikroorganismy několika bariérami. Za první bariéru je považována vrstva kutikuly na povrchu skořápky, dalším ochranným mechanismem je samotná skořápka s vnější a vnitřní podskořápečnou blánou. Dokonce i některé proteiny bílku mají inhibiční funkci vůči bakteriím.

K průniku mikroorganismů do vejce exogenní cestou dochází nejprve po kontaminaci povrchu skořápky. Pravděpodobnost penetrace bakterií do vejce je ovlivňována mnoha různými faktory. Mezi vnější faktory patří vliv druhu bakterie, počet mikroorganismů, teplota, vlhkost a podmínky skladování.

Nejčastěji pronikají do vaječného obsahu gramnegativní pohyblivé a neshlukující se bakterie. Jako první *Pseudomonas* sp. (60 %) a *Alcaligenes* sp. (58 %) dále pak následovala *Salmonella* Enteritidis (43 %). Všechny vybrané mikroorganismy byly schopné penetrovat, nejvyšší výskyt penetrací byl zaznamenán po 4 – 5 dnech (De Reu *et al.*, 2006d). Pohyb bakterií nemá vztah k jejich schopnosti penetrovat do vejce (Williams *et al.*, 1968). De Reu *et al.* (2007a) zjistili, že hlavními kontaminanty vaječného obsahu jsou gramnegativní bakterie jako *Escherichia coli*, *Salmonella* a *Alcaligenes* sp. a grampozitivní bakterie jako *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus xylosus* a *Bacillus* sp.. Grijspeerdt (2001) ve své práci popisuje model penetrace salmonely do vajec. Model je založen na simulaci transportu a růstu bakterií ve třech základních částech (zónách) vejce: vaječném žloutku, bílku a vaječné skořápečce. Vývoj koncentrace bakterií uvnitř vejce je funkcí času. *Salmonella* proniká vaječnou skořápkou a vstupuje do bílku asi po 100 hodinách. Přibližně po 200 hodinách začíná její šíření a rychlé množení ve žloutku. Ve žloutku je růst koncentrace rychlejší než v bílku. Ke kontaminaci celého vejce dochází asi po 400 hodinách. Na výsledky mají prokazatelný vliv úroveň koncentrací bakterií na povrchu skořápky. Mimoto uvádí, že by mohlo být prospěšné udržovat skořápu vajec čistou jak jen to je možné.

Z řady studií je patrné, že vyšší počet mikroorganismů na skořápečce je zaznamenán v alternativních systémech ustájení. Kontaminace vaječného obsahu byla 1,9 % (5 z 269



vajec) u obohacených klecí v porovnání s 2,3 % (10 z 432 vajec) u neklecových systémů ustájení (De Reu *et al.*, 2007a; 2007b). Smeltzer *et al.* (1979) vysledovali, že vejce snesená na podlahu byla více vystavena vnitřní bakteriální kontaminaci. U těchto vajec byl podíl kontaminovaných 15,3 % oproti sneseným do snáškových hnízd (10,5 %).

Penetraci mikroorganismů do vejce napomáhá vhodná teplota a vlhkost. Podíl vajec, do kterých penetrovaly mikroorganismy, se zvyšuje i s časem skladování. Vliv skladování ve své práci zohlednili De Reu *et al.* (2007a), kteří zaznamenali kontaminaci vaječného obsahu mikroorganismy u 2,7 % (15 z 554 vajec) vajec ihned po snesení a u 3,4 % (18 z 532 vajec) u vajec po 21 dnech skladování při pokojové teplotě. Také Wang a Slavík (1998) uvádějí, že se vzrůstajícím časem roste i podíl vajec penetrovaných bakteriemi. Dále ale dodávají, že různé teploty skladování nezpůsobily průkazné rozdíly v bakteriální penetraci během 21denního intervalu.

Byl studován také vliv věku nosnic na průnik mikroorganismů do vaječného obsahu. Berrang *et al.* (1999a) sledovali penetraci salmonely podskořápečnou blánou pomocí laserového mikroskopu a zjistili, že čas nutný k penetraci se s věkem nosnic zvyšuje. Zatímco Nascimento *et al.* (1992) uvádějí prokazatelný růst bakteriální penetrace s věkem nosnic z 12,9 % (na začátku snášky) na 25,0 % na konci snášky. Bruce a Johnson (1978), kteří porovnávali násadová vejce, vysledovali také zvýšení kontaminace vajec od starších jedinců.

Do vnitřních faktorů ovlivňujících pravděpodobnost penetrace bakterií do vejce spadá přítomnost kutikuly, charakteristiky skořápky, tj. kvalita skořápky, pórovitost, vady skořápky, a podskořápečné blány (Messens *et al.*, 2005b). Přirozené ochranné mechanismy vejce nejsou dostačující jako ochrana před bakteriemi (Berrang *et al.*, 1999b). Podle Smeltzera *et al.* (1979) jsou vejce nejvíce ohrožena průnikem bakterií v prvních 30 až 60 sekundách po snesení, tzn. před tím než je kutikula zcela zpevněná a účinně překrývá póry. Berrang *et al.* (1999b) uvádějí jako nejvhodnější oblast na vejci, kterou mohou bakterie penetrovat do vejce, póry ve skořápce na tupém konci vejce. Také Haigh a Betts (1991) a Messens *et al.* (2005a) zjistili, že bakteriální penetrace byla vyšší na tupém konci vejce v porovnání s ostrým koncem. Ačkoliv zaznamenali vyšší pórovitost na tupém konci, nezjistili však vliv počtu pórů na penetraci bakterií skořápkou (Messens *et al.*, 2005a; Nascimento *et al.*, 1992).

Williams *et al.* (1968), Messens *et al.* (2005a) a De Reu *et al.* (2006d) zjistili, že tloušťka skořápky a počet pórů významně neovlivnily bakteriální penetraci skořápky. To je v rozporu s údaji, které publikovali Orel (1959) a Sauter a Petersen (1974). Mnohem důležitější než tloušťka skořápky je přítomnost kutikuly, jejíž funkcí je zakrýt póry ve skořápce a omezit tak napadení obsahu vajec mikroorganismy. Dále pak Lifshitz *et al.*

(1964) poukazují na to, že samotná vnitřní podskořápečná blána je mnohem účinnější bariérou proti průniku bakterií než vnější podskořápečná blána nebo skořápka.

Dobrym indikátorem mikrobiální kontaminace je kyselina jantarová. Je vhodnější než použití kyseliny mléčné, která kolísá (Dušek, 2004). Zvýšení tvorby organických sloučenin, jako je kyselina jantarová, je tedy jedním ze znaků stárnutí vajec (Littmann *et al.*, 1982). Dle Vyhlášky 200/2003 *Sb.* může vaječný výrobek obsahovat maximálně 25 mg kyseliny jantarové v kilogramu sušiny neupraveného vaječného výrobku. Průměrný obsah kyseliny jantarové v čerstvém vejci je 2 mg.kg<sup>-1</sup> sušiny. Hodnoty kyseliny jantarové se během skladování neporušených skořápkových vajec výrazně nemění a zůstávají na úrovni čerstvých vajec, a to i při skladování při 30 °C, jejich hodnoty se zvyšují pouze v případě mikrobiálního znehodnocení (Littmann *et al.*, 1982).

## 2.2. Materiál a metody

V rámci řešení problematiky mikrobiální kontaminace vaječné skořápky byly nosnice ISA Brown ve věku od 20. do 60. týdne ustájeny v konvenčních klecích (72 kusů; 550 cm<sup>2</sup>/nosnici) a na podestýlce (60 kusů; 7 nosnic na m<sup>2</sup>). V průběhu pokusu byly zachovány standardní mikroklimatické a technologické podmínky pro daného hybrida dle technologického postupu a v souladu se směrnicí 74/1999 EK a vyhláškou MZe 208/2004. Slepice byly krmeny komerčním typem krmných směsí N1 a N2. U slepic ve věku od 20 do 40 týdnů byla použita krmná směs N1, která obsahovala 166,6 g.kg<sup>-1</sup> dusíkatých látek a 11,4 MJ.kg<sup>-1</sup> metabolizovatelné energie. Nosnice ve věku od 41 do 60 týdnů dostávaly krmnou směs N2 obsahující 153,7 g.kg<sup>-1</sup> dusíkatých látek a 11,4 MJ.kg<sup>-1</sup> metabolizovatelné energie. Teplota v halách byla udržována v rozmezí 20 až 22 °C. Krmení i voda byla podávána *ad libitum*. V halách se používal světelný den s 15 hodinami světla (intenzita osvětlení cca 10 lx).

Vejce pro stanovení mikrobiální kontaminace skořápky a penetrace mikroorganismů do vaječného obsahu byla sbírána v intervalu 28 dnů vždy v 7 hodin. Mikrobiologická analýza povrchu skořápky, podskořápečných blan nebo řídkého bílku se uskutečnila u čerstvých a 2, 7 a 14 dní skladovaných vajec na čisté proložce při pokojové teplotě 20 – 22 °C a relativní vlhkosti 55 – 60 %. Stanovení množství životaschopných bakterií bylo prováděno standardními plotnovými metodami. Rozbor zahrnoval zjištění celkového počtu mikroorganismů (CPM) pomocí Standard plate count agaru (Oxoid), počtu *Escherichia coli* za použití Mac Conkey agaru (Oxoid) a počtu enterokoků na Slanetz Bartley agaru (Oxoid). Po inkubaci se počítaly typické kolonie na Petriho miskách a vypočítaly se kolonie tvořící

jednotku (KTJ) na skořápce vejce. Navíc bylo dopočítáno procentuální zastoupení vajec, do jejichž obsahu (podskořápečné blány a řídký bílek) penetrovaly mikroorganismy. Celkem bylo takto zanalyzováno 300 skořápek a 189 vaječných obsahů.

Vyšetření obsahu vajec na přítomnost kyseliny jantarové se používá jako indikátor kontaminace vaječného obsahu mikroorganismy. Vejce byla sbírána ve 4 obdobích: 27., 39., 49. a 63. týdnů věku slepic. Po 14 dnech skladování při pokojové teplotě 20 – 22 °C a relativní vlhkosti 55 – 60 % následovala chemická analýza, tj. zjištění obsahu kyseliny jantarové ve vejcích metodou plynové chromatografie. Analýza byla provedena na 40 ks vajec.

Zjištěné hodnoty byly statisticky zpracovány metodou analýzy rozptylu (ANOVA) pomocí general linear modelu (GLM) programu SAS (SAS Institute, 2003). Jednofaktoriální ANOVou byl zjišťován vliv hlavních faktorů (systém ustájení a délka skladování) a dvoufaktoriální ANOVou interakce mezi těmito faktory. Pravděpodobnost menší než 0,05 byla považována za průkaznou. Výsledky v tabulce jsou uvedeny jako průměry se SEM (střední chyba průměru) hodnotami.

### 2.3. Výsledky

Pokus navazuje na předešlé výsledky, které byly zveřejněny mimo jiné i v metodice pro praxi (Ledvinka et al., 2008) shodně se zabývající mikrobiální kontaminací skořápek vajec z konvenční a obohacené klece, voliéry a podestýlky. Na povrchu vajec z alternativních systémů ustájení bylo zjištěno 100krát více bakterií než na vejcích nosnic chovaných v klecích. Mikroflóře skořápek vajec z podestýlky dominoval *Enterococcus*, zatímco nejvíce *Escherichia coli* bylo na vejcích z voliéry.

Tabulka 1 popisuje změny v mikrobiální kontaminaci povrchu skořápek vajec z konvenční klece a podestýlky v průběhu 14 denního skladování při pokojové teplotě. Vyšší ( $P \leq 0,001$ ) kontaminace povrchu vajec *Escherichia coli*, enterokoky a celkovým počtem bakterií byla stanovena v případě ustájení na podestýlce než v kleci. Skořápky čerstvých vajec byly 1 000krát více kontaminovány než povrch vajec po 14 denním skladování.

Tabulka 1. Mikrobiální kontaminace vaječné skořápky během skladování při pokojové teplotě

Ukazatel	SKL (dny)	Systém ustájení		SEM	Průkaznost		
		Konvenční klec	Podestýlka		SU	SKL	SU * SKL
<i>Escherichia coli</i> (KTJ/skořápka)	0	5 643 <sup>b</sup>	3 380 186 <sup>a</sup>	198 770	0,001	0,004	0,005
	2	3 115 <sup>b</sup>	1 278 741 <sup>b</sup>				
	7	746 <sup>b</sup>	336 393 <sup>b</sup>				
	14	440 <sup>b</sup>	292 673 <sup>b</sup>				
<i>Enterococcus</i> (KTJ/skořápka)	0	439	162 434	9 936	0,001	NS	NS
	2	665	85 426				
	7	53	46 267				
	14	19	82 767				
Celkový počet mikroorganismů (KTJ/skořápka)	0	63 491 <sup>b</sup>	11 414 528 <sup>a</sup>	642 569	0,001	0,003	0,003
	2	9 330 <sup>b</sup>	7 794 734 <sup>a</sup>				
	7	4 706 <sup>b</sup>	1 356 118 <sup>b</sup>				
	14	2 808 <sup>b</sup>	1 446 414 <sup>b</sup>				

<sup>ab</sup> číslo na stejném řádku označené jiným písmem než předchozí se průkazně liší; NS = neprůkazný  
SU = systém ustájení; SKL = skladování; KTJ = kolonie tvořící jednotku

S dobou skladování se počet bakterií na vejcích 10krát snížil. K významnému poklesu dochází během několika prvních dnů. Celkový počet mikroorganismů na povrchu vajec z konvenční klece se průkazně ( $P \leq 0,003$ ) snížil z 63 491 na 2 808 KTJ a u vajec z podestýlkového chovu tomu bylo obdobně z 11 414 528 na 1 446 414 KTJ. Prokazatelné ( $P \leq 0,004$ ) snížení bylo zaznamenáno i u *Escherichia coli*.

U celkového počtu mikroorganismů ( $P \leq 0,003$ ) a počtu *Escherichia coli* ( $P \leq 0,005$ ) na skořápkách vajec byla zaznamenána průkazná interakce systému ustájení a doby skladování. Nejvyšší hodnota celkového počtu mikroorganismů byla zaznamenána na povrchu čerstvých (11 414 528 KTJ/skořápka) a 2 dny skladovaných (7 794 734 KTJ/skořápka) vajec z podestýlky oproti vejším z podestýlky skladovaným 7 (1 356 118 KTJ/skořápka) a 14 (1 446 414 KTJ/skořápka) dnů nebo z konvenční klece (63 491, 9 330, 4 706 a 2 808 KTJ/skořápka). Kontaminace skořápek *Escherichia coli* byla nejvyšší u čerstvých vajec z podestýlky (3 380 186 KTJ) ve srovnání s vejci z tohoto systému ustájení skladovanými 2 (1 278 741 KTJ), 7 (336 393 KTJ) a 14 (292 673 KTJ) dnů nebo z klece (5 643, 3 115, 746 a 440 KTJ).

Vyšší kontaminace skořápky mikroorganismy v alternativních systémech ustájení může zvýšit riziko průniku mikroorganismů do vejce. V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky části pokusu zabývajícího se vlivem systému ustájení a délky skladování vajec při pokojové teplotě na penetraci mikroorganismů do vaječného obsahu. Systém ustájení ani doba skladování průkazně neovlivnily penetraci mikroorganismů do vejce. Průnik *Escherichia coli* do vejce přes podskořápečné blány nastal během 2 dnů skladování, zatímco vyšší výskyt enterokoků na blanách byl zaznamenán po 7 dnech skladování.

Tabulka 2. Penetrace mikroorganismů do vaječného obsahu

Skladování (dny)	Systém ustájení	Penetrace (%)					
		Podskořápečná blána			Bílek		
		<i>EC</i>	<i>E</i>	CPM	<i>EC</i>	<i>E</i>	CPM
2	Konvenční klec	3,23	-	1,61	2,42	-	3,23
	Podestýlka	5,65	0,81	10,49	2,42	-	-
7	Konvenční klec	-	1,39	1,39	0,70	-	1,39
	Podestýlka	0,70	3,48	4,17	1,39	-	0,70
14	Konvenční klec	0,91	-	4,55	1,82	-	1,82
	Podestýlka	2,73	0,91	6,37	0,91	-	0,91

*EC Escherichia coli*, *E Enterococcus*, CPM celkový počet mikroorganismů

Neprůkazně vyšší podíl vajec, která měla kontaminované podskořápečné blány mikroorganismy byl zjištěn při ustájení na podestýlce a to jak ve druhém, sedmém i čtrnáctém dni skladování. Vyšší podíl kontaminací na úrovni blan u vajec z podestýlky může souviset s nižší kvalitou skořápky a vyšším počtem mikroorganismů na povrchu vajec (tabulka 1). Zatímco podíl vajec s detekovanou kontaminací bílku byl vyšší u klecového chovu oproti podestýlce.

Jako indikátor mikrobiální kontaminace vajec byla stanovována kyselina jantarová. V žádném ze vzorků vajec 14 dní skladovaných při pokojové teplotě nebyla kyselina jantarová detekována. Shodně Dušek (2004) naměřil nižší množství kyseliny jantarové ve vejcích než je limit stanovený vyhláškou 200/2003 *Sb.* a uvádí, že legislativní požadavek v případě kyseliny jantarové není optimálně nastaven.

### 3. Srovnání novosti postupů

Variabilita v systémech ustájení pro slepice nosného typu představuje různé alternativy produkce a také možnosti pro spotřebitele. Rozsáhlý výzkum zaměřený na porovnávání různých systémů ustájení ukazuje rozdíly v užitkovosti a kvalitě vajec a následně i

skladovatelnost vajec. Tyto faktory jsou podrobně popsány ve vědecké literatuře i ve dvou certifikovaných metodikách. Z předchozích sledování vyplynulo, že v alternativních systémech ustájení jsou vejce více než sto násobně kontaminovaná ve srovnání s klecemi. Doposud ale bylo málo informací o penetraci těchto mikroorganismů do vejce přes všechny obrané mechanismy. Tato metodika ukazuje, že se sice počet mikroorganismů na skořápce během skladování snižuje, ale to neznamena, že tyto mikroorganismy nepronikají do vejce. Nový přínos metodiky je v tom, že na základě mikrobiálního rozboru lze zjistit kontaminaci vajec podstatně přesněji než na základě stanovení kyseliny jantarové, která je vyhláškou stanovena jako ukazatel mikrobiální kontaminace. Z výsledků této metodiky je patrné, že koncentrace kyseliny jantarové ve vejci nebyla ovlivněna ani v případě zvýšené penetrace mikroorganismů do vajec z podestýlky, a to jak *E. coli*, tak i enterokoků. Dalším novým poznatkem je i rozdílná doba průniku mikroorganismů do vejce, kdy zejména v prvních dnech skladování je vnitřek vejce kontaminován *E. coli*, zatímco po týdnu skladování penetrují do vajec enterokoky. Tato zjištění jsou důležitá především z hlediska bezpečnosti produkce vajec.

#### **4. Popis uplatnění certifikované metodiky**

V metodice jsou popsány nové postupy hodnocení kvality vajec ze dvou rozdílných systémů ustájení, které reprezentují dvě skupiny, a to klece a alternativní chov. Mikrobiální kvalita vajec není příliš často posuzována, a proto výsledky jsou nové a doposud nepublikované. Je patrné, že například ukazatel mikrobiální kontaminace vajec uváděný ve vyhlášce, kterým je kyselina jantarová, je podstatně méně přesný než mikrobiální analýza. Výsledky této metodiky spolu s dvěma předchozími umožňují hodnotit různé systémy ustájení slepic nosného typu jak z hlediska producenta, tak především hodnotí kvalitu vajec z hlediska bezpečnosti. Výsledky metodiky mohou být využívány především ve státní správě, výzkumu a vzdělávání, ale poskytují důležité informace pro chovatele. Metodika bude využívána zejména Českomoravskou drůbežářskou unií, o.s.

#### **5. Seznam použité literatury**

**Berrang, M.E., Frank, J.F., Buhr, R.J., Bailey, J.S., Cox, N.A. (1999a):** Eggshell membrane structure and penetration by *Salmonella Typhimurium*. Journal of Food Protection, 62(1), 73–76.

- Berrang, M.E., Cox, N.A., Frank, J.F., Buhr, R.J. (1999b):** Bacterial penetration of the eggshell membranes of the chicken hatching egg: A review. *Journal of Applied Poultry Research*, 8(4), 499–504.
- Board, R.G., Tranter, H.S. (1995):** The microbiology of eggs. In: Stadelman W. J. a Cotterill O. J.: *Egg Science and Technology*. Haworth Food Products Press, New York and London, s. 81–104.
- Bruce, J., Johnson, A.L. (1978):** The bacterial flora of unhatched eggs. *British Poultry Science*, 19, 681–689.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Heyndrickx, M., Zoons, J., De Baere, K., Uyttendaele, M., Debevere, J., Herman, L. (2005a):** Bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages and aviary housing systems for laying hens. *British Poultry Science*, 46(2), 149–155.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M., Herman, L. (2005b):** The use of total aerobic and Gram-negative flora for quality assurance in the production chain of consumption eggs. *Food Control*, 16, 147–155.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M., Debevere, J., Herman, L. (2006a):** Bacterial shell contamination in the egg collection chains of different housing systems for laying hens. *British Poultry Science*, 47(2), 163–172.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Herman, L., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M., Debevere, J., Putirulan, F.F., Bolder, N.M. (2006b):** The effect of commercial UV disinfection system on the bacterial load of shell eggs. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 144–148.
- De Reu, K., Heyndrickx, M., Grijspeerdt, K., Rodenburg, B., Tuytens, F., Uyttendaele, M., Debevere, J., Herman, L. (2006c):** Assessment of the vertical and horizontal aerobic bacterial infection of shell eggs. *World's Poultry Science Journal*, 62 (supplement), 564.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Messens, W., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M., Debevere, J., Herman, L. (2006d):** Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella Enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 112(3), 253–260.
- De Reu, K., Heyndrickx, M., Grijspeerdt, K., Rodenburg, B., Tuytens, F., Uyttendaele, M., Debevere, J., Herman, L. (2007a):** Estimation of the vertical and horizontal bacterial infection of hen's table eggs. In: Book of abstracts „XVIII<sup>th</sup> European

- symposium on the quality of poultry meat and XII<sup>th</sup> European symposium on the quality of eggs and egg products“, Prague, Czech Republic, 55–56.
- De Reu, K., Rodenburg, B., Grijspeerdt, K., Heyndrickx, M., Tuytens, F., Zoons, J., Herman L. (2007b):** Bacteriological contamination of eggs and eggshell quality in furnished cages and non-cage systems for laying hens: an international on-farm comparison. In: Book of abstracts „XVIII<sup>th</sup> European symposium on the quality of poultry meat and XII<sup>th</sup> European symposium on the quality of eggs and egg products“, Prague, Czech Republic, 46–47.
- De Reu, K., Messens, W., Heyndrickx, M., Rodenburg, B., Uyttendaele, M., Herman, L. (2008a):** Bacterial contamination of table eggs and the influence of housing systems. *World's Poultry Science Journal*, 64, 5–19.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Rodenburg, B., Tuytens, F., Heyndrickx, M., Zoons, J., Herman L. (2008b):** Bacteriological eggshell contamination in cage and non-cage housing systems for laying hens: experimental studies facing an international on-farm comparison. In: Book of abstracts „XXIII<sup>th</sup> World's poultry congress“, Brisbane, Australia, (CD).
- Dunn, N. (1997):** European cage critics find no better system. *World Poultry-Misset*, 13(9), 32–39.
- Dušek, M. (2004):** Využití kapilární elektroforézy v analýze potravin, Disertační práce, VŠCHT.
- Gentry, R.F., Quarles, C.L. (1972):** The measurement of bacterial contamination on eggshells. *Poultry Science*, 51, 930–933.
- Grijspeerdt, K. (2001):** Modelling the penetration and growth of bacteria in eggs. *Food Control*, 12(1), 7–11.
- Haigh, T., Betts, W.B. (1991):** Microbial barrier properties of hen egg shells. *Microbios*, 68, 137–146.
- Haines, R.H. (1938):** Observation on the bacterial flora of the hen's egg with a description of new species of *Proteus* and *Pseudomonas* causing rot in eggs. *Journal of Hygiene Cambridge* 38, 338–355.
- Harry, E.G. (1963):** The relationship between egg spoilage and the environment of the egg when laid. *British Poultry Science*, 4, 91–100.
- Ledvinka, Z., Tůmová, E., Štolc, L. (2008):** Užítkovost nosnic a kvalita vajec v různých systémech chovu. *Metodika pro praxi, ČZU v Praze*, vydání 1., 24 s, ISBN 978-80-213-1831-1



- Lifshitz, A., Baker, R.C., Naylor, H.B. (1964):** The relative importance of chicken egg exterior structures in resisting bacterial penetration. *Journal of Food Science*, 29, 94–99.
- Littmann, S., Schulte, E., Acker, L. (1982):** Beurteilung des hygienischen Zustands von Eiprodukten vor der Pasteurisierung über das Muster der organischen Säuren I. Gaschromatographische Methode zur gleichzeitigen Bestimmung der organischen Säuren des Hühnereis, *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 175, 101–105; II. Das Säuremuster in Eiprodukten in Abhängigkeit von der hygienischen Situation, *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 175, 106–112.
- Mallet, S., Guesdon, V., Ahmed, A.M.H., Nys, Y. (2006):** Comparison of eggshell hygiene in two housing systems: Standard and furnished cages. *British Poultry Science*, 47(1), 30–35.
- Mayes, F.J., Takeballi, M.A. (1983):** Microbial contamination of the hen's egg: A review. *Journal of Food Protection*, 46(12), 1092–1098.
- Messens, W., Grijspeerdt, K., Herman, L. (2005a):** Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica serovar Enteritidis* through the production period of a layer flock. *British Poultry Science*, 46(6), 694–700.
- Messens, W., Grijspeerdt, K., Herman, L. (2005b):** Eggshell penetration by *Salmonella*: a review. *World's Poultry Science Journal*, 61, 71–85.
- Nascimento, V.P., Cranstoun, S., Solomon, S.E. (1992):** Relationship between shell structure and movement of *Salmonella Enteritidis* across the eggshell wall. *British Poultry Science*, 33, 37–48.
- Orel, V. (1959):** The *Pseudomonas* spoilage of eggs laid by individual hens. *Poultry Science*, 38, 8–12.
- Protais, J., Queguiner, S., Boscher, E., Piquet, J.-C., Nagard, B., Salvat, G. (2003):** Effect of housing system on the bacterial flora in the air and on egg shells. In: Book of abstracts „X<sup>th</sup> European symposium on the quality of eggs and egg products, Saint-Brieuc, Ploufragan, France, 142–149.
- Quarles, C.L., Gentry, R.F., Bressler, G.O. (1970):** Bacterial contamination in poultry houses and its relationship to egg hatchability. *Poultry Science*, 49, 60–66.
- SAS (2003):** The SAS System for Windows. Release 9.1.3. SAS Institute Inc.
- Sauter, E.A., Petersen, C.F. (1974):** Effect of egg shell quality on penetration by various salmonellae. *Poultry Science*, 53, 2159–2162.

- Schwarz, G., Kobe, A., Fries, R. (1999):** Microflora on egg shells from different housing systems. *Archiv für Geflügelkunde*, 63(5), 220–224.
- Smeltzer, T.I., Orange, K., Peel, B., Runge, G. (1979):** Bacterial penetration in floor and nest box eggs from meat and layer birds. *Australian Veterinary Journal*, 55, 592–593.
- Směrnice Rady Evropy 1999/74/EC,** Úřední list Evropských společenství, č. L 203/53, 1999, s. 53–57.
- Smith, A., Rose, S.P., Wells, R.G., Pirgozliev, V. (2000):** The effect of changing the excreta moisture of caged hens on the excreta and microbial contamination. *British Poultry Science*, 41(2), 168–173.
- Vadehra, D.V., Baker, R.C. (1973):** Effect of egg shell sweating on microbial spoilage of chicken eggs. *Journal of Milk and Food Technology*, 36(6), 321–322.
- Vyhláška MZe č. 200/2003 Sb.,** o veterinárních požadavcích na vaječné výrobky. Sbíрка zákonů, 2003, částka 72.
- Vyhláška MZe č. 208/2004 Sb.,** o minimálních standardech pro ochranu hospodářských zvířat. Sbíрка zákonů, 2004, částka 69.
- Wang, H., Slavik, M.F. (1998):** Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times. *Journal of Food Protection*, 61(3), 276–279.
- Williams, J.E., Dillard, L.H., Hall, G.O. (1968):** The penetration patterns of *Salmonella Typhimurium* through the outer structures of chicken eggs. *Avian Diseases*, 12, 445–466.

## **6. Seznam publikací, které předcházely metodice**

- Tůmová E., Englmaierová M.:** Systém ustájení slepic nosného typu a mikrobiální znečištění vaječné skořápky. *Agromagazín*, 2006, roč. 7, č. 6, s. 38 – 39.
- Englmaierová M., Tůmová E.:** Kvalita vajec v závislosti na systému ustájení. *Náš chov*, 2007, roč. 67, č. 7, s. 76 – 80.
- Ledvinka Z., Tůmová E., Štolc L.:** Užítkovost nosnic a kvalita vajec v různých systémech chovu. *Metodika pro praxi, ČZU v Praze*, 2008, vydání 1., 24 s., ISBN 978-80-213-1831-1
- Tůmová E., Englmaierová M., Zita L.:** Penetrace mikroorganismů do vejce v závislosti na ustájení, kvalitě skořápky a době skladování. In.: *Sborník z mezinárodní konference*

„POULTRY-Techagro 2008: Možnosti zvyšování kvality vajec a drůbežího masa“, 2008, Brno, s. 56 – 59.

**Tůmová E., Englmaierová M., Voříšek K., Zita L.:** The effect of housing system, eggshell quality, egg contamination and storage on egg quality. In.: Book of abstracts „XXIII. world's poultry congress“, 2008, Brisbane, Australia, 4 p (CD), Worlds Poultry Science Journal, 64, supplement 2, p. 521.

**Tůmová E., Skřivan M., Englmaierová M., Zita L.:** The effect of genotype, housing system and egg collection on egg quality in egg type hens. Czech Journal of Animal Science, 2009, 54(1), 17 – 23.

**Charvátová V., Tůmová E., Englmaierová M.:** Penetrace mikroorganismů do vajec v závislosti na délce jejich skladování, systému ustájení a fázi snáškového cyklu nosnic. Veterinářství, 2010, 60(4), 211 – 212.

**Englmaierová M., Tůmová E., Charvátová V.:** Penetrace mikroorganismů do vaječného obsahu v závislosti na fázi snáškového cyklu, systému ustájení a kvalitě skořápky. Veterinářství, 2010, 60(4), 213 – 215.

**Tůmová E., Englmaierová M., Charvátová V.:** Vliv systému ustájení na kontaminaci vajec. Veterinářství, 2010, 60(4), 216 – 218.

**Englmaierová M., Tůmová E., Charvátová V.:** The effect of short-term and long-term storage on quality of eggs from different housings systems. In.: CD of proceedings of the 13th European Poultry Conference, Tours, France, 23-27 August 2010.

**Englmaierová, M.:** Faktory bezpečnosti produkce konzumních vajec. Doktorská disertační práce, ČZU v Praze, 2010, 73s.