

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra speciální zootechniky

**Vliv systému ustájení na vlastnosti skořápky a vnitřní kvalitu
vaječ**

.....
doktorská disertační práce

Autor: **Ing. Jana Vlčková**

Školitel: **prof. Ing. Eva Tůmová, CSc.**

Praha 2016

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma: **Vliv systému ustájení na vlastnosti skořápky a vnitřní kvalitu vajec** vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Praze dne

.....

podpis doktoranda

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé disertační práce prof. Ing. Evě Tůmové, CSc. za pomoc, cenné rady a trpělivost při vyhotovení této práce. Moje poděkování patří i zaměstnancům katedry speciální zootechniky Ing. Darině Chodové PhD., Ing. Monice Okrouhlé PhD. a Ing. Ludmile Klesalové za pomoc při realizaci experimentů. V neposlední řadě bych chtěla také poděkovat své rodině za podporu a poskytnuté zázemí.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	LITERÁRNÍ REŠERŠE	8
2.1	Systémy ustájení nosnic	8
2.2	Vliv systému ustájení na hmotnost vajec a kvalitu skořápky	10
2.3	Vliv systému ustájení na mikrobiální kontaminaci vajec	12
2.4	Způsoby mikrobiální kontaminace vajec	15
2.4.1	Vertikální přenos.....	15
2.4.2	Horizontální přenos.....	17
2.5	Fyzikální ochrana vajec.....	18
2.6	Chemická ochrana vajec	20
2.7	Vnější faktory ovlivňující mikrobiální kontaminaci	21
2.7.1	Druh bakterie	21
2.7.2	Množství mikroorganismů.....	22
2.7.3	Způsob a podmínky skladování	22
2.7.4	Vliv světla na kvalitu skořápky a mikrobiální kontaminaci	23
2.8	Vnitřní faktory ovlivňující mikrobiální kontaminaci.....	25
2.8.1	Kvalita skořápky	25
2.8.2	Pórovitost skořápky	26
3	HYPOTÉZA	28
4	CÍL PRÁCE	28
5	MATERIÁL A METODIKA	29
5.1	Pokus 1	29
5.2	Pokus 2.....	30
5.3	Pokus 3.....	34
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
6.1	Pokus 1	36
6.1.1	Produkční ukazatele	36
6.1.2	Mikrobiální kontaminace vzduchu	37
6.1.3	Mikrobiální kontaminace skořápky	38
6.1.4	Shrnutí výsledků pokusu 1.....	38
6.2	Pokus 2.....	41

6.2.1	Produkční ukazatele a ukazatele kvality skořápky	41
6.2.2	Mikrobiální kontaminace skořápky a její změny během skladování.....	43
6.2.3	Penetrace mikroorganismů do vejce	44
6.2.4	Změny v technologické hodnotě vajec v průběhu skladování	45
6.2.4.1	Hmotnost a index tvaru vejce.....	45
6.2.4.2	Ukazatele kvality bílku	46
6.2.4.3	Ukazatele kvality žloutku.....	48
6.2.5	Shrnutí výsledků pokusu 2.....	48
6.3	Pokus 3	53
6.3.1	Kvalita skořápky	53
6.3.1.1	Technologické ukazatele kvality skořápky	53
6.3.1.2	Pórovitost skořápky.....	54
6.3.2	Mikrobiální kontaminace skořápky	54
6.3.2.1	Mikrobiální kontaminace čerstvých vajec	54
6.3.2.2	Mikrobiální kontaminace v průběhu skladování.....	55
6.3.3	Penetrace mikroorganismů do vejce	57
6.3.4	Změny v technologické hodnotě vajec v průběhu skladování.....	57
6.3.4.1	Hmotnost vejce a ukazatele kvality bílku	57
6.3.4.2	Ukazatele kvality žloutku.....	60
6.3.5	Obsah bílkovin.....	60
6.3.6	Shrnutí výsledků pokusu 3.....	62
7	ZÁVĚR	67
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	70

1 ÚVOD

Současné intenzivní chovy drůbeže, nabízejí stále nová technologická řešení, která usnadňují práci a zvyšují produktivitu. Nicméně, tyto systémy ne vždy odpovídají přirozeným potřebám ptáků. Ignorování vhodných životních podmínek zvířat není jen etický problém, ale i praktický, neboť pohoda a komfort ustájení se promítají do vyšších přírůstků, zdraví a produkce zvířat. V Evropské unii a ve světě jsou v současnosti vejce produkována v intenzivních systémech, zejména v obohacených klecích, donedávna to byly ještě také klece konvenční, a na podestýlce. Každý způsob systému ustájení a technologického řešení je spojen s určitými výhodami, ale i problémy. Klecové systémy jsou v současné době ekonomicky nejvýhodnějším systémem ustájení. Jejich předností je zejména vysoká produkce vajec na m² podlahové plochy, vysoká produktivita práce, lepší zdravotní stav nosnic, nízké procento znečištěných vajec a vysoká hygiena chovu. Na druhou stranu v neobohacených klecích však nosnice mají pouze omezenou možnost projevit své přirozené a komfortní chování a je zde vyšší podíl vajec s porušenou skořápkou. Obohacené klece představují spojení výhod konvenčních klecí, jako je chov v menších skupinách, díky kterým je předcházeno stresu ze sociální hierarchie a navíc je zde nosnicím umožněno projevit své přirozené vzorce chování díky hřadům, snáškovým hnízdům, popelišti a zařízením na obrus drápů, kterými jsou tyto klece vybaveny. Výhodou alternativních systémů ustájení je především v možnosti volného pohybu a projevu svých vrozených instinktů, ale i možnosti úniku při napadení jiným jedincem. Naproti tomu jsou zde slepice v přímém kontaktu s trusem, v halách je vyšší prašnost a produkce amoniaku. V těchto systémech také není možné, aby nosnice vytvořily skupiny se stabilním sociálním pořádkem, a tak dochází k častým střetům. Pohyb slepic a nižší teplota rovněž zvyšují spotřebu krmiva. Proto zajištění optimálních podmínek v chovu vyžaduje vysokou odbornou úroveň ošetřovatelů.

Se zvyšujícím se povědomím spotřebitelů o otázkách bezpečnosti potravin se změnilo i vnímání kvalitního vejce, a to od čistoty skořápky, fyzikálních vlastností až po bakteriální kontaminaci. Rovněž převažuje zájem o vejce produkovaná v systémech, které jsou ke slepicím šetrnější. S příchodem nové směrnice EK 74/1999, která vešla v platnost v roce 2012 a nařizuje nahrazení konvenčních klecí klecemi obohacenými, nebo alternativním typem ustájení, se objevilo mnoho prací, které sledovaly vliv různých systémů ustájení na kvalitu vajec.

Vejce představuje ideální potravinu, neboť je plnohodnotným zdrojem mastných kyselin, vitamínů, minerálních látek a samozřejmě bílkovin, které obsahují všechny esenciální

aminokyseliny. Kritéria pro kvalitní vejce zahrnují takové různorodé a důležité aspekty jakými jsou bezpečnost, nutriční a organoleptické vlastnosti, z nichž všechny musí být kontrolovány od výrobce až ke spotřebiteli. Pro chovatele slepic, zemědělce, potravinářský průmysl, třídírny vajec a marketingové společnosti je hlavní prioritou dodávat bezpečný a kvalitní produkt, který je akceptován spotřebiteli.

Kvalita vaječné skořápky je jeden z důležitých parametrů kvality vajec a má velmi významný vliv na skladování a manipulaci. Porušená a znečištěná skořápka také představuje vysoké riziko mikrobiální kontaminace vaječného obsahu. Vejce kontaminovaná mikroorganismy pak hrají v chovech drůbeže důležitou roli jak v patologii, tak i v šíření chorob. Mikroorganismy mohou způsobit zvýšení embryonální mortality, snížení líhivosti, zvýšení mortality u čerstvě vylíhlých kuřat a ani infekce u lidí způsobené např. salmonelami nejsou neobvyklé.

2 LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 Systémy ustájení nosnic

Chov nosnic se v současné době realizuje zejména v intenzivních podmínkách. Za intenzivní způsob ustájení nosnic se považují obohacené, donedávna ještě také neobohacené, klecové systémy, což je z hlediska ekonomiky nejvýhodnější systém ustájení. Mimo to je v tomto typu ustájení docílen lepší zdravotní stav nosnic a je zde vysoká produktivita práce. Z dalších intenzivních chovů jsou to pak alternativní systémy ustájení, což jsou voliéry, podestýlka nebo volný výběh (Tůmová, 2007).

Neobohacené klece poskytovaly slepicím jen omezený prostor, kde nemohly plnohodnotně projevit své přirozené vzorce chování, a díky velkému zájmu veřejnosti byl prostor pro slepice zvýšen. V Evropské unii se tento systém ustájení od 1. ledna 2003 již nesměl uvádět do provozu a od 1. ledna 2012 dle směrnice Evropské komise 74/1999 byl zcela zakázán. Klece byly vybaveny krmítkem, napáječkami, systémem sběru vajec a odklizem trusu. Minimální plocha pro jednu slepici musela být alespoň 550 cm². Předpisy dále stanovily pro každou slepici alespoň 10 cm délky krmítka, v dosahu každé nosnice alespoň dvě kapátkové nebo kalíškové napáječky. Výška klece musela být nejméně 40 cm nad 65 % plochy klece a v žádném místě nesměla být menší než 35 cm. Podlahy klecí byly zkonstruovány tak, aby poskytovaly přiměřenou oporu každému z dopředu směřujících drápků obou běháků. Sklon podlahy nesměl překročit 14 % nebo 8° (Tauson, 2005). Ve světě jsou neobohacené klece stále nejvíce rozšířeným způsobem ustájení slepic nosného typu.

Obohacené klece představují spojení výhod konvenčních klecí a zároveň poskytují slepicím možnost přirozeného druhového chování. Tyto klece jsou vybaveny hřady, snáškovými hnízdy, popelištěm a zařízením na obrušování drápků. Minimální prostor na jednu nosnici se zvýšil na 750 cm², z toho 600 cm² využitelných. Žádná klec nesmí mít celkovou plochu menší než 2000 cm² s minimální výškou 45 cm. Sklon podlahy nemá přesáhnout 14 % a na jednu slepici musí být minimální krmný prostor 12 cm. Při napájení kapátkovými nebo kalíškovými napáječkami musí mít každá nosnice v dosahu alespoň dvě napáječky. Dalším vybavením jsou hřady v délce 15 cm na slepici. Pro usnadnění kontroly, instalace a snížení počtu nosnic musí být mezi řadami klecí ulička o minimální šířce 90 cm a mezi podlahou budovy a spodní řadou klecí musí být ponechána mezera alespoň 35 cm (Anonym, 1999).

Alternativní systémy zahrnují všechny systémy mimo klecí a jsou považovány za méně intenzivní. Umožňují slepicím volný pohyb, popelení, běhání a létání, avšak mezi

nevýhody alternativních systémů patří to, že nosnice jsou více stresovány sociálním složením hejna, přístupem ke krmivu a vodě. Mezi alternativní systémy ustájení patří voliéry, ustájení na podestýlce a výběhy. V současnosti je v těchto systémech povoleno umístit 9 ks/m² podlahové plochy, při použití řetězových krmítek musí na 1 slepici připadat krmný prostor minimálně 10 cm a u talířových krmítek 4 cm. Na 1 kapátkovou nebo kalíškovou napáječku může připadat maximálně 10 nosnic. Snáškové hnízdo se počítá minimálně pro 7 slepic. V hale musí být hřady, 15 cm na slepici, se vzdáleností řad 20 cm (Tůmová, 2007). Voliéry byly vyvinuty v 70. letech minulého století ve Velké Británii jako systém vycházející z klecí, ale umožňující slepicím volný pohyb. V tomto systému mají slepice přístup na podestýlku z několika etáží s drátěnou podlahou. Krmítka jsou umístěna ve 2 spodních patrech, napáječky ve všech třech. Hřady jsou umístěny přes horní etáže. Pod každou drátěnou etáží je umístěn nekonečný pás na odkliz trusu. Snášková hnízda jsou mezi jednotlivými řadami. Podle současných požadavků má ve voliérách být 18 ks/m² podlahové plochy haly, tj. pod 9 ks/m² v každé etáži (Anonym, 1999).

Ustájení na podestýlce je tradičním způsobem chovu slepic. Hřady jsou v hale rovnoměrně rozmístěné, aby nedocházelo ke koncentraci trusu v některých částech. Snášková hnízda jsou obvykle podél stěn haly, popřípadě uprostřed. Podestýlkový systém bez hřadů nesmí být používán v Evropské unii od roku 2006. Ustájení na podestýlce poskytuje zvířatům dostatečný prostor pro projev celé šíře repertoáru chování (Tauson, 2005).

Výběhové systémy umožňují přístup slepicím mimo halu a dovolují projevit celý repertoár chování. V hale jsou umístěna krmítka, napáječky a snášková hnízda, současně haly poskytují i úkryt. Ve výběhu je třeba zajistit úkryty a ochranu proti slunci a také vlastní výběh, ve kterém by nemělo docházet k přenosu parazitů. Otvory umožňujících přímý přístup do venkovního prostoru, musí být alespoň 35 cm vysoké a 40 cm široké a táhnoucí se podél budovy po celé její délce. V každém případě musí být na skupinu čítající 1 000 nosnic dostupných celkem 2 m otvorů (Anonym, 1999). Výběhové chovy jsou z alternativních systémů ustájení nejnáročnější. Jsou zde vysoké investiční náklady, nízká snáška, vyšší spotřeba krmiva, horší hygienické podmínky. Vybavení haly je stejné jako při ustájení slepic na podestýlce (Tůmová, 2007).

2.2 Vliv systému ustájení na hmotnost vajec a kvalitu skořápky

Způsob chovu nosnic má značný vliv na kvalitu vajec, včetně jejich fyzikálně-chemických vlastností, což je doloženo mnoha studiemi (Trziszka et al., 2004; Giannenas et al., 2009; Matt et al., 2009).

Mezi základní fyzikální ukazatele kvality vajec patří jejich hmotnost. Ta může být ovlivněna mimo jiné i systémem ustájení. Vyšší hmotnost vajec v klecích oproti alternativnímu způsobu ustájení zaznamenalo ve svých studiích několik autorů (Moorthy et al., 2000; Leyendecker et al., 2001; Dukić-Stojčić et al., 2009; Lewko a Gornowicz, 2011). Guesdon a Faure (2004) porovnávali hmotnost vajec z obohacených a konvenčních klecí. Z výsledků je patrné, že nenašli mezi těmito dvěma typy žádný významný rozdíl. Podobně také Tanaka a Hurnik (1992) neshledali rozdíly v hmotnosti vejce mezi voliérou a konvenční klecí. Avšak Abrahamsson et al. (1996) zaznamenali vyšší hmotnost vejce z klecových systémů oproti vejším z voliéry. U vajec z volného výběhu byla detekována v průměru vyšší hmotnost oproti obohaceným a konvenčním klecím (Hidalgo et al., 2008). Dukić-Stojčić et al. (2009) srovnávali kvalitu vajec v klecových systémech a ve volném výběhu a zjistili, že těžší vejce (66,74 g) byla snesena od nosnic ustájených v klecích. Tyto výsledky korespondují s výsledky Lewko a Gornowicz (2011), kteří zaznamenali v průměru o 4,71 g těžší vejce v klecích oproti podestýlce a o 3,13 g v porovnání s volným výběhem. Výsledky Pištěkové et al. (2006) však ukázaly, že těžší vejce s vyšší hmotností bílku a žloutku byla od nosnic z podestýlky. Van den Brand et al. (2004) uvádějí, že nosnice ve volném výběhu snášejí těžší vejce v porovnání s těmi z neobohacených klecí.

Kvalita vaječné skořápky je jedna z nejdůležitějších vlastností vajec, která byla sledována již po dlouhou dobu pro účely selekce. Vejce s nízkou kvalitou skořápky přispívají ke ztrátám v produkci konzumních vajec. Nestandardní vejce představují 3 až 12 % z celkové produkce (Jelínek, 1996). Kvalita skořápky je charakterizována mnoha ukazateli, a to hmotností, měrnou hmotností, podílem, tloušťkou, deformací, pevností, ale i barvou. K dalším kvalitativním ukazatelům skořápky lze také zařadit podíl poškozených vajec, míru znečištění skořápky a její mikrobiální kontaminaci.

Někteří autoři (Roland a Gordon, 1997; Van den Brand et al., 2004) uvádějí, že lepší kvalitu vaječné skořápky, a to zejména pevnost a tloušťku, mají vejce z klecí. Tanaka a Hurnik (1992) srovnávali konvenční klece a voliéry a nezjistili žádné rozdíly v deformaci skořápky. Při srovnání kvality skořápky vajec z konvenčních klecí a voliérových systémů, měla ta z voliér větší tloušťku, nižší deformaci, vyšší hmotnost skořápky a větší procentuální

podíl skořápky (Abrahamsson et al., 1996). Naproti tomu Hidalgo et al. (2008) detekovali vyšší procentuální podíl skořápky a vyšší pevnost u vajec z klecí oproti ostatním sledovaným alternativním systémům (volný výběh, podestýlka a ekologický chov). Guesdon a Faure (2004) nenašli signifikantní rozdíly mezi obohacenými a neobohacenými klecemi v pevnosti skořápky. Ve studii, kde srovnávali konvenční klece a výběh zjistili, že kvalita skořápky se v klecích s věkem snižovala, ale u vajec z výběhu zůstala po celou dobu konstantní nebo se mírně zlepšovala (Van den Brand et al., 2004). Mertens et al. (2006) sledovali vliv různého systému ustájení (konvenční klece, obohacené klece, voliéry a výběhy) na kvalitu vajec a zjistili, že největší pevnost skořápky byla u vajec z voliér, zatímco nejslabší z výběhu. Ledvinka et al. (2012) zaznamenali vyšší pevnost skořápky u vajec z klecového systému ($P \leq 0,035$) naproti tomu tloušťka skořápky byla průkazně ($P \leq 0,029$) vyšší na podestýlce. Van den Brand et al. (2004) dodávají, že tloušťku skořápky by bylo možné ve vztahu k systému ustájení využít jako bioindikátor zdraví nosnic nebo produkce. Englmaierová a Tůmová (2009) ve své studii zjistily signifikantní vliv systému ustájení na kvalitu skořápky, která byla charakterizována její hmotností, tloušťkou a povrchem. Vyšší kvalita skořápky byla detekována u vajec z alternativního systému ustájení, podestýlky. Hidalgo et al. (2008) zjistili nejmenší procentuální podíl skořápky u největších vajec, a to u vajec z výběhu a z ekologického chovu. Tloušťka skořápky byla nejmenší u vajec od nosnic ustájených v klecích, zatímco nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u vajec z podestýlky a z výběhu. Protichůdné výsledky dostupné v literatuře nepotvrzují jasný vliv systému ustájení na tloušťku skořápky. Jako třeba ve studii Pavlovski et al. (2001), kteří porovnávali voliéry, podestýlku, výběh a klecový systém, kde zjistili silnější skořápku na podestýlce a naopak tenčí u skořápek z výběhu, zatímco Leyendecker et al. (2001) pozorovali silnější skořápku ve výběhu. Nejtenčí skořápka v klecích ve studii Hidalgo et al. (2008) nekoresponduje s nejvyšším indexem skořápky a celkovou odolností skořápky, potvrzenou tlakovým testem. Tento výsledek lze vysvětlit nízkou průměrnou hmotností těchto vajec, tedy nepřímou korelací mezi hmotností vejce a pevností skořápky, která byla popsána Casiraghi et al. (2005). Navíc tenčí skořápky, jako ty u vajec z klecí zjištěné v práci Hidalgo et al. (2008), mohou naopak vykazovat lepší ultrastrukturální vlastnosti, které pak přispívají k vyšší pevnosti (Roberts et al., 1995).

Na trh mohou být uváděna pouze vejce s neporušenou skořápkou. Jejich obsahy pak mohou být zpracovány pasterizací nebo sušením. Pokud však byla porušena podskořápečná blána, vejce se již pro lidskou spotřebu používat nesmí, což je hlavně z důvodu zvýšeného rizika mikrobiální kontaminace vaječného obsahu (Holt et al., 2011).

Bylo zpracováno mnoho studií, zabývající se výskytem křapů v různých systémech ustájení nosnic. Wall et al. (2002) a Guesdon a Faure (2004) zjistili, že množství vajec s prasklou skořápkou bylo vyšší v obohacených klecích oproti klecím konvenčním. V obohacených klecích je hnízdní plocha malá a vejce tak do sebe mohou více narážet. Proto navrhují zvolit jiný design snáškových hnízd, kterým lze omezit počet prasklin na vejcích, jako je třeba prodloužení závěsu ve snáškovém hnízdě (Wall a Tauson, 2002). Naproti tomu Leyendecker (2003) zaznamenal nižší podíl prasklých vajec v obohacených klecích oproti klecím neobohaceným. Kromě toho, různé sklony podlah v klecích mohou ovlivnit počet křapů (Valkonen et al., 2008). Podobně také studie De Reu et al. (2009) potvrdila vyšší procento prasklých vajec ($P \leq 0,01$) v obohacených klecích (7,8 %) v porovnání s alternativními způsoby ustájení (4,1 %). Guesdon et al. (2006) zjistili, že podíl vlasových trhlin a prasklých vajec byl v obohacených klecích vyšší (15,4 - 19,6 %) ve srovnání s konvenčními klecemi (8,1 - 12,2 %). Hidalgo et al. (2008) však žádné rozdíly mezi klecemi, výběhem a ekologickým chovem v podílu poškozených skořápek nenašli. Abrahamsson a Tauson (1995) ve své studii sledovali rozdíl mezi voliérovým a klecovým systémem ustájení. Z výsledků je patrné, že vyšší počet prasklých vajec byl nalezen ve voliérách ve srovnání s klecemi. Podobné výsledky uvádějí i Abrahamsson et al. (1996). V další studii Tauson et al. (1999) porovnávali procento prasklých vajec ve voliérách, konvenčních klecích a na podestýlce. Vyšší podíl prasklin byl zaznamenán ve voliérách a konvenčních klecových systémech. Mertens et al. (2006) prokázali vyšší procento prasklin v konvenčních a obohacených klecích, menší podíl křapů byl pak detekován ve voliérách a v podestýlkovém systému.

2.3 Vliv systému ustájení na mikrobiální kontaminaci vajec

V některých studiích, byl sledován rozdíl v bakteriální kontaminaci mezi různými systémy ustájení a to zejména mezi podestýlkou a klecovým systémem. Harry (1963) zjistil, že skořápka vajec z hluboké podestýlky měla 15 krát více bakterií a vyšší podíl potencionálních organismů způsobujících zkažení vejce než skořápka vajec z klecí. Podobně také Quarles et al. (1970) zaznamenali, že na podestýlce bylo v průměru 9 krát více bakterií ve vzduchu a 20 až 30 krát více aerobních bakterií na skořápce, než v klecovém systému ustájení. Konvenční klecové systémy pro nosnice jsou od roku 2012 v Evropské unii zakázány směrnicí Evropské komise 1999/74 (Anonym, 1999). Počínaje rokem 2012 jsou povoleny pouze obohacené klece a neklecové alternativní systémy jako jsou voliéry,

podestýlka nebo výběhové systémy. V současnosti je proto věnována větší pozornost vlivu systému ustájení na hygienu vajec. Vývoj směrem k obohaceným klecím a alternativním systémům ustájení může mít důsledky na kvalitu vajec a to zvýšeným výskytem popraskaných a špinavých vajec (Wall a Tauson, 2002), což se může odrazit i na zvýšené bakteriální kontaminaci skořápky (De Reu et al., 2005a; Mallet et al., 2006).

Fiks-van Niekerk (2005) poukázal na vyšší kontaminaci vaječné skořápky v alternativním ustájení stejně jako na pozitivní korelaci mezi celkovým množstvím aerobních bakterií v hale a počáteční kontaminací skořápky, což podobně uvádějí Protais et al. (2003). De Reu et al. (2005b) zaznamenali pozitivní korelaci mezi koncentrací bakterií ve vzduchu hal a počáteční kontaminací skořápky. Tato studie také popisuje, že vejce z podlahy mají mnohem větší bakteriální zátěž ve srovnání s vejci snesenými v hnízdech, a že pásový dopravník je klíčovým bodem pro kontaminaci zde nahromaděných vajec. Podobně i v další práci De Reu et al. (2006a) zjistili významně vyšší průměrnou kontaminaci skořápky ($P < 0,001$) aerobními bakteriemi u vajec pocházejících z alternativního systému ustájení ve srovnání s těmi z konvenčních klecí (5,46 versus 5,08 log ktj/skořápka). De Reu et al. (2006b) a Messens et al. (2007) zaznamenali, že vyšší kontaminace vaječné skořápky vede k možné větší penetraci mikroorganismů a následné kontaminaci vaječného obsahu.

Jednou z výhod konvenčních klecí bylo, že nosnice byly odděleny od trusu, a to velmi efektivním způsobem. V obohacených klecích může přítomnost hřadů zhoršit účinné propadávání trusu přes drátěné dno (Abrahamsson a Tauson, 1993). Kromě toho hřady, podlahová plocha a hnízda společně ovlivňují hygienu prostředí klece a vajec (Mallet et al., 2006). Ve studii Wall et al. (2008) zaznamenali podíl špinavých vajec v obohacených (4,2 %) a konvenčních klecích (5,4 %). Jejich výsledky a další publikované studie v poslední době ukazují na to, že u dobře navržených obohacených klecí lze dosáhnout podobných výsledků v podílech špinavých vajec jako v konvenčních klecích (Mallet et al., 2006; Wall a Tauson, 2007). De Reu et al. (2005a) srovnávali mikrobiální kontaminaci vaječné skořápky u vajec snesených v konvenční kleci s vejci snesenými ve snáškových hnízdech obohacených klecí. Mezi těmito dvěma typy nebyly nalezeny průkazné rozdíly v kontaminaci skořápky aerobními bakteriemi, která se pohybovala v rozmezí od 4,0 do 4,5 log ktj/skořápka a stejně tak tomu bylo i u gram-negativních bakterií (3 log ktj/skořápka u obou typů klecí). Také Mallet et al. (2006) při analýze vizuálně čistých vajec pozorovali, že vejce snesená v hnízdech obohacených klecí měla podobné množství bakterií jako vejce z klecí konvenčních. V jejich studii byla hnízda jen částečně vystlána umělým povrchem, zatímco v přední části hnízda se nacházela standardní pletivová podlaha (Guesdon et al., 2006). Naproti tomu Mallet et al.

(2006) detekovali signifikantní rozdíly v kontaminaci celkovým počtem aerobních bakterií u vajec z obohacených klecí (4,83 log ktj/skořápka) ve srovnání s těmi z konvenčních klecí (4,56 log ktj/skořápka). Ke stejným závěrům došli ve své práci také Wall et al. (2008), kde signifikantně ($P < 0,001$) vyšší bakteriální zatížení bylo u obohacených klecí oproti klecím konvenčním, a to jak u rodu *Enterococcus* tak i celkového počtu aerobních bakterií.

V dalších experimentech bylo zjištěno, že vejce z voliéry byla kontaminována vyšším počtem aerobních bakterií než vejce z klecí (Protais, et al., 2003; De Reu et al., 2005a). Rozdíly byly více než 1 log (a to od 5,1 až do 6,0 log ktj/skořápka), s mnohem vyšším počtem bakterií u vajec snesených na podlaze voliér (až 7 log ktj/skořápka). Co se týká gram-negativních bakterií, nebyly nalezeny žádné průkazné rozdíly mezi klecemi a alternativními typy ustájení (De Reu et al., 2005a). Ve studii De Reu et al. (2009) našli značné rozdíly mezi kontaminací celkovým množstvím aerobních bakterií u vajec z obohacených klecí (v rozmezí od 4,24 do 5,22 log ktj/skořápka) a z neklecových systémů (v rozmezí od 4,35 do 5,51 log ktj/skořápka). Byly zde dále sledovány i rozdíly v rámci neklecového systému ustájení, kde průměrná kontaminace skořápky aerobními bakteriemi ve čtyřech podlahových systémech byla 5 log ktj/skořápka a velikost kontaminace ve třech voliérových systémech se od ní nijak signifikantně nelišila (4,95 log ktj/skořápka). Huneau - Salaün et al. (2010) nezaznamenali významné rozdíly mezi kontaminací vajec z výběhu a z ekologického chovu. De Reu et al. (2007), kteří sledovali velikost penetrace do vaječného obsahu, konstatují, že kontaminace vaječného obsahu byla u vajec z obohacené klece 1,9 % (5/269 vajec) a 2,3 % (10/432 vajec) z neklecových chovů.

Bakteriální kontaminace vaječné skořápky může být ovlivněna několika faktory, jako jsou koncentrace bakterií ve vzduchu haly (De Reu et al., 2005a) či krmivo (Smith et al., 2000). Díky krmivu může docházet ke zvyšování vlhkosti trusu a následně k vyšší míře trusem kontaminovaných vajec, ale také ke zvýšené mikrobiální kontaminaci zdánlivě čistých vajec (Smith et al., 2000).

V některých studiích byl celkový počet aerobních bakterií ve vzduchu hal v pozitivní korelaci s počáteční kontaminací vaječné skořápky (Protais et al., 2003; De Reu et al., 2005a). V průměru 4 log ktj/m³ vzduchu bylo zaznamenáno v obohacených i konvenčních klecích ve srovnání se 100 krát vyššími hodnotami (> 6 log ktj/m³) z voliérových systémů (Protais et al., 2003).

Monitoring poletujícího prachu ukázal, že koncentrace prachu byla vyšší u podestýlkových systémů oproti konvenčním klecím (Huneau - Salaün et al., 2010). Stejně tak

i Takai et al. (1998), Ellen et al. (2000) a Guillam et al. (2007) pozorovali vyšší koncentraci prachu jak na podestýlce, tak i ve voliérách ve srovnání s klecovým systémem ustájení.

Vzhledem k tomu, že prach obsahuje bakterie, je pravděpodobné, že v podlahových systémech bude zaznamenána výrazněji vyšší koncentrace oproti konvenčním klecím (Protais et al., 2003; De Reu et al., 2005a). Tato nižší mikrobiální kvalita vzduchu v alternativních systémech může ovlivnit množství bakterií na vejci (Quaerles et al., 1970). Huneau - Salaün et al. (2010) uvádějí, že hlavním faktorem ovlivňujícím množství polétavého prachu v podlahových typech ustájení bylo přidání slámy nebo písku na podestýlkovou plochu na začátku snáškového období. Také přidání substrátu pro popelení vedlo ke zvýšenému množství polétavého prachu ulpívajícího na vejcích. Některé výsledky Quarlese et al. (1970) poukazují na to, že vyšší teploty mohou mít vliv na zvýšení bakteriální kontaminace vaječné skořápky. Stejně tak i Takai et al. (1998) zaznamenali sezónní vliv na koncentraci prachu v halách. De Reu et al. (2005a) zjistili, že velikost kontaminace vaječné skořápky, jak celkovým počtem aerobních bakterií tak i gram-negativními bakteriemi, se významně snížila během zimního období (až o $> 0,5 \log \text{ ktj/skořápka}$; $P < 0,05$).

2.4 Způsoby mikrobiální kontaminace vajec

Existují dva možné způsoby bakteriální kontaminace vajec, a to vertikální a horizontální. K vertikálnímu přenosu dochází v reprodukčních orgánech nakažených slepic a to zejména z infekce vaječníků pomocí systémové infekce, nebo vzestupnou infekcí z kontaminované kloaky do pochvy a dolní části vejcovodu (Keller et al., 1995; Miyamoto et al., 1997). Žloutek, bílek nebo podskořápečné blány jsou transovariální cestou (vertikálním přenosem) přímo kontaminované v důsledku bakteriální infekce pohlavních orgánů (vaječniku nebo tkáň vejcovodu) dřív, než jsou obaleny vaječnou skořápkou (Messens et al., 2005a). Horizontální přenos nastane tehdy, když je vejce vystaveno kontaminovanému prostředí a mikroorganismy penetrují přes vaječnou skořápkou. Studie provedená Barrowem a Lowellem (1991) naznačuje, že většina kontaminací je zapříčiněna právě horizontálním přenosem, ačkoliv Humphrey (1994) s těmito výsledky nesouhlasí.

2.4.1 Vertikální přenos

Pro některé druhy bakterií a sérotypů může být transovariální a oviduktální kontaminace důležitá (Barnhart et al., 1991; Gast et al., 1992; Bäumlér et al., 2000; Ricke et

al., 2001). Tímto způsobem může být vejce kontaminováno bakteriemi, jako je rod *Salmonella* nebo *Campylobacter*. Pro většinu sérotypů salmonely je přenos přes skořápku pravděpodobně nejdůležitější cestou kontaminace. V případě *Salmonella* Enteritidis tomu tak ale zřejmě není. *Salmonella* Enteritidis byla izolována z vaječného obsahu, ale ne z vaječné skořápky či ze vzorků slepičího trusu. Mnoho autorů uvádí, že právě *Salmonella* Enteritidis je dominantní sérotyp izolovaný z vaječného obsahu (Paul a Batchelor, 1988; Perales a Audicana, 1988; Humphrey, 1989; Mawer et al., 1989). Přítomnost salmonely uvnitř vejce je tedy pravděpodobně důsledkem kolonizace reprodukční tkáně infikovaných nosnic (Keller et al., 1995; Methner et al., 1995; Gast a Holt, 2000). Cox et al. (1999; 2000) zveřejnili molekulární důkazy přenosu bakterií rodu *Campylobacter* od slepic na potomstvo prostřednictvím oplozeného vejce. Nicméně Cox et al. (2004) našli významnější důkazy o tom, že *Campylobacter* je šířen transovariálně nebo přes tkáň vejcovodu. Bylo zaznamenáno, že bakterie tohoto rodu kontaminovaly 11,6 % nezralých a 25,7 % zralých folikulů na vaječnicích.

Obecně se předpokládá, že kolonizace reprodukčních orgánů je důsledkem systémového šíření salmonely ze střev (Vazquez-Torres et al., 1999). Napadení střevního epitelu vyvolá pronikání imunitních buněk, především makrofágů, což vede k tomu, že bakterie jsou jimi absorbovány. Vzhledem ke své schopnosti přežít a replikovat se v imunitních buňkách se bakterie šíří v hostiteli, což má za následek kolonizaci reprodukčních orgánů (Keller et al., 1995; Miyamoto et al., 1997; Okamura et al., 2001; Gast et al., 2007; Gantois et al., 2008).

Systémová infekce *Salmonella* Enteritidis u nosnic může vést ke kolonizaci vaječniku nebo vejcovodu (Keller et al., 1995; Miyamoto et al., 1997; Okamura et al., 2001; De Buck et al., 2004a). Oba orgány mohou být infikovány nezávisle na sobě (Kinde et al., 2000), ve stejnou dobu nebo jeden po druhém. Rozsáhlá propustnost cévního endotelu pozorovaná ve vaječniku může přispívat k vysoké rychlosti kolonizace (Griffin et al., 1984). Ve většině experimentálních studií s nosnicemi byla zaznamenána vyšší frekvence kolonizace vaječniku ve srovnání s kolonizací vejcovodu (De Buck et al., 2004b; Gantois et al., 2006; Gast et al., 2007). Z toho důvodu je předpokládáno, že *Salmonella* Enteritidis musí vykazovat interakci s buněčnými složkami preovulačních folikulů. Vyšší počet bakterií v membránách preovulačních folikulů, na rozdíl od samotných žloutků, naznačuje, že při transovariálním přenosu zůstává *Salmonella* Enteritidis ve vitelinní membráně žloutku. Také předchozí studie poukazují na to, že kontaminace žloutku je mnohem více spojována s vitelinní membránou žloutku než se samotným obsahem (Gast and Beard, 1990; Gast a Holt, 2000). Navzdory

tomu, že někteří autoři označují jako místo nejčastěji kontaminované salmonelou vitelinní membránu (Bichler et al., 1996; Gast a Holt, 2000; Gast et al., 2002), v dalších studiích autoři označují bílek jako hlavní místo kontaminace (Shivaprasad et al., 1990; Humphrey et al., 1991; Keller et al., 1995) což naznačuje, že *Salmonella* Enteritidis kolonizuje tkáň vejcovodu. Miyamoto et al. (1997) zjistili, že vejce vyvíjející se ve vysoce kontaminovaném vejcovodu bude pravděpodobně pozitivní na přítomnost salmonely. Kolonizace reprodukčního traktu může být výsledkem vzestupné infekce z kloaky (Reiber et al., 1995; Miyamoto et al., 1997), sestupující infekce z vaječníku (Keller et al., 1995) anebo systémového šíření. V závislosti na místě kontaminace (pochva, krček nebo bílkotvorné kličky) může být salmonela obsažena buď ve vaječné skořápce, podskořápečných blanách nebo bílku.

2.4.2 Horizontální přenos

Přítomnost mnoha různých druhů bakterií na povrchu skořápky představuje potencionální riziko kontaminace obsahu vejce. Znečištění povrchu vejce však může být zapříčiněno infekcí dolní části reprodukčního traktu nebo fekálním znečištěním. Avšak u zdravé nosnice je nepravděpodobné, že k fekálnímu znečištění dojde během kladení vejce, neboť část pochvy se otočí naruby mimo intestinální trakt a tím je chráněno proti fekálnímu znečištění. Mimo to protažením vnitřní epitelální vrstvy kloaky doje k vytvoření jen malé štěrbin v intestinálním traktu, což dále omezuje možnost kontaminace vaječné skořápky. To vysvětluje skutečnost, proč vejce od zdravé nosnice nejsou po snesení znečištěná trusem (De Buck et al., 2004a). I přesto, že vejce je většinou v době snášky mikrobiálně sterilní, vlastní kontaminace může nastat ihned po opuštění vejcovodu (Board a Tranter, 1995). Po snesení má vejce okolo 42 °C, což je zpravidla víc než okolní vzduch. Vejce mohou být kontaminována právě v této době, kdy rozdíl teplot je poměrně vysoký. Během chladnutí se uvnitř vejce vytváří podtlak, který může vtáhnout různý materiál do pórů. Výsledkem je, že vejce pak mohou být potencionálně kontaminována z jakéhokoliv povrchu, s nímž přijdou do kontaktu. Zdrojem bakterií tak může být vybavení klece, hnízdní materiál, voda, ruce ošetřovatele, rozbitá vejce, krev a hmyz. Dopravníky, půda a trus jsou pravděpodobně nejdůležitějším zdrojem mikroorganismů (Board a Tranter, 1995; Ricke et al., 2001; Davies a Breslin, 2003). Rozsah této kontaminace je pak přímo úměrný čistotě těchto ploch (Board a Tranter, 1995). Smeltzer et al. (1979) zjistili, že vejce snesená na podlaze vykazují větší vnitřní bakteriální kontaminaci, než vejce snesená ve snáškových hnízdech. Také Padron (1990) zaznamenal, že vejce, která byla umístěna na salmonelou kontaminované snáškové

hnízdo po dobu 10 minut, vykazovala přítomnost této bakterie na skořápce a v podskořápečných blanách v 59 % případů.

2.5 Fyzikální ochrana vajec

Vejsce jsou vybavena několika ochrannými prvky, kterými se mohou bránit proti mikroorganismům, a to i přesto, že proniknou přes skořápku a přes podskořápečné blány. Fyzikální ochranu proti bakteriální kontaminaci vejci poskytuje kutikula, skořápka, vnitřní a vnější podskořápečná blána (Mayes a Takeballi, 1983; Solomon, 1991). Kutikula je 0,01 mm silná proteinová vrstva na povrchu vaječné skořápky a tvoří se poslední 1 - 1,5 hodiny před snesením (Baker a Balch, 1962). Ochranu poskytuje hned dvěma způsoby. Jednak tím, že zvyšuje tloušťku skořápky a tím i její pevnost. Druhý a důležitější způsob ochrany je, že zabraňuje pronikání vody, bakterií či jiných materiálů přes vaječné póry (Musgrove, 2004). I přesto, že kutikula umožňuje výměnu plynů přes skořápku, zdá se, že póry účinně překrývá (Bruce a Drysdale, 1994). Nicméně tato ochrana není dokonalá, protože malé procento vajec je sneseno bez kutikuly a tato vejce pak mohou být snadno kontaminovaná vodou nebo prachem (Board a Halls, 1973). Ptáci jako jsou např. pelikáni či plameňáci, kteří žijí ve vlhkém a pravděpodobně i více mikrobiologicky náročnějším prostředí, se na tyto podmínky adaptovali mnohem silnější kutikulou, než je třeba u slepic nebo křepelk (Kusuda et al., 2011). Sparks (1987) dodává, že během prvních pár minut po snesení, kdy kutikula ještě není zcela zaschlá, nepředstavuje efektivní ochranu proti bakteriím.

De Reu et al. (2006b) a Messens et al. (2007) konstatují, že při absenci kutikuly je zaznamenána mnohem častější penetrace do vaječného obsahu. Avšak někteří autoři (Nascimento et al., 1992; Messens et al., 2005b) nenašli žádný vztah mezi přítomností kutikuly a velikostí penetrace salmonely přes vaječnou skořápku. Bain et al. (2013), zabývající se penetrací mikroorganismů, poprvé poukázali na přímou závislost mezi systémem ustájení a ukládáním kutikuly. Do vajec, která měla slabší kutikulu, byla zaznamenána častější penetrace, ve srovnání s vejci se silnější kutikulou, kde penetrace nebyla vůbec zaznamenána. Podobné výsledky uvádí také studie Samiullah et al. (2014), avšak v obou pracích není vysvětleno, jakým způsobem systém ustájení ukládání kutikuly ovlivňuje. Pomocí subjektivního posouzení při speciálním barvení vaječné skořápky, bylo zjištěno, že existují velké rozdíly v ukládání kutikuly u vajec snesených od jednotlivých slepic ale také mezi různými plemeny (Ball et al., 1975; Sparks 1994). Další genotypové rozdíly v ukládání kutikuly byly zjištěny i mezi hnědými a bílými vejci, kde hnědá vejce mají silnější

kutikulu (Simons, 1971; Board and Hall, 1973). Je tedy možné, že může existovat genetická souvislost mezi přítomností pigmentu a ukládáním kutikuly.

Vaječná skořápka je další a velmi důležitou bariérou proti vstupu mikroorganismů. Tvorba skořápky probíhá v děloze, v další části vejcovodu, kde setrvává nejdelší dobu (20 hodin). Skořápka se skládá z uhličitanu vápenatého, organických sloučenin, uhličitanu hořečnatého a fosfátu. Mamily jsou struktury vytvořené v mamilární vrstvě poskytující základ pro uhličitan vápenatý. Nepravidelné tvary vápenných krystalů vytváří houbovitou vrstvu. Tou pak prostupuje několik tisíc pórů a spojují volné prostory v mamilární vrstvě s povrchem skořápky (Musgrove, 2004). Tloušťka skořápky se pohybuje od 241 do 371 μm (Solomon, 1991).

Třetí účinnou bariérou jsou podskořápečné blány. Existují dvě, které jsou spolu těsně spojeny, až na tupý konec vejce, kde je vzduchová komůrka (Romanoff a Romanoff, 1949; Solomon, 1991). Vnitřní podskořápečná blána přisedá na bílek a vnější je připojena ke skořápce. Podskořápečné blány jsou tvořeny ze tří různých vrstev, a to vnitřní a vnější, které se skládají ze sítě náhodně orientovaných vláken a třetí homogenní vrstvy tvořící hustou síť (Bruce a Drysdale, 1994). Wong Liong (1997) popisuje třetí homogenní vrstvu, jako vrstvu z hustého materiálu nazývanou též hraniční, která se spíše prolíná s vlákny vnitřní podskořápečné blány, než že by tvořila samostatnou a zřetelnou vrstvu. Většina výzkumných prací odhaduje tloušťku obou podskořápečných blan přibližně na 80 μm . Předpokládá se, že tyto podskořápečné blány slouží jako bakteriální filtr (Garibaldi a Stokes, 1958; Kraft et al., 1958). Doba potřebná pro penetraci bakterií přes vnitřní a vnější podskořápečnou blánu nesouvisí s velikostí volného prostoru mezi vlákny na vnějším povrchu vnější membrány (Berrang et al., 1999). Porovnáme-li všechny dostupné bariéry proti vstupu bakterií do vejce, je vnitřní podskořápečná blána jednou z neúčinnější, protože vytváří mnohem hustší síť oproti bláně vnější (Lifshitz et al., 1964).

Kromě těchto fyzikálních ochranných mechanismů i bílek přispívá k ochraně proti mikroorganismům. Ta je zajištěna zejména viskozitou a strukturou vnějšího tuhého bílku. Tato ochranná funkce spočívá v tom, že viskozita bílku omezuje pohyb bakterií, které penetrovaly podskořápečné blány a zamezí tak jejich průchod ke žloutku. Vnější tuhý bílek čerstvých vajec přispívá k centrálnímu uložení žloutku, čímž ho udržuje v dostatečné vzdálenosti od nečistot, které jsou zachyceny v podskořápečných blanách.

2.6 Chemická ochrana vajec

Kromě své funkce jako fyzikální bariéry, skořápka a podskořápečné blány působí i jako bariéra chemická. I přesto, že antibakteriální bílkoviny byly identifikovány převážně v bílku, jsou rovněž spojovány i se skořápkou a podskořápečnými blanami (Gantois et al., 2009). V bílku existuje hned několik přirozeně se vyskytujících antimikrobiálních látek. Ovotransferin je schopen tvořit cheláty s kovovými ionty zejména se železem (Stadelman a Cotterill, 1995). Tato bílkovina byla také detekována v podskořápečných blanách a bazální kalcifikované vrstvě skořápky (Gautron et al., 2001). Ovotransferin se zdá být jednou z hlavních bílkovin zajišťující ochranu vejce proti mikrobiální infekci a hnilobě tím, že znemožňuje přístup Fe^{3+} bakteriím. Zabraňuje množení mikroorganismů v teplotním rozmezí od 0 do 35 °C, kdy většina mikroorganismů, včetně *Escherichia coli* zaniká vlivem nedostatku železa (Stadelman a Cotterill, 1995). Ovomukoid zajišťuje ochranu tím, že inhibuje trypsin, kdy některé bílkoviny disponují účinnými proteázami (např. *Pseudomonas*), které poškozují hostitelské tkáně. Tato bílkovina má schopnost tyto proteázy inhibovat a tím plní antimikrobiální ochranu obsahu vejce (Van Delden a Iglewski, 1998). Lysozym způsobuje hydrolýzu β -1,4 glykosidické vazby v peptidoglykenech (Musgrove, 2004). Ten se hojně vyskytuje v podskořápečných blanách, v matrix vaječné skořápky a v kutikule (Hincke et al., 2000). Ovoinhibitor inaktivuje několik proteáz, ovoflavoprotein tvoří cheláty s riboflavinem a avidin váže biotin (Stadelman a Cotterill, 1995; Musgrove, 2004). V nedávné době byla nově objevena ve vaječné skořápce a v podskořápečných blanách bílkovina ovocalyxin-36 (Gautron et al., 2006). Všechny tyto bílkoviny se účastní antimikrobiální ochrany, a proto se předpokládá, že i ovocalyxin-36 má také podíl na udržení vejce bez patogenů. Hincke a Wellman-Labadie (2008) odebrali bílkovinné extrakty z kutikuly a z vaječné skořápky a prokázali tak jejich antimikrobiální vliv proti gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím.

Mimo to, pH vaječného bílku se pohybuje v alkalických hodnotách. Bezprostředně po snesení vejce se hodnoty pH pohybují v rozmezí od 7,6 až po 7,9, ale během skladování dochází k postupnému zvyšování těchto hodnot. Z vejce postupně uniká oxid uhličitý, čímž se hodnota pH pomalu zvyšuje až na více než 9, což je nad rámec tolerance většiny mikroorganismů. Lysozym, ovotransferin a pH jsou považovány za nejdůležitější antimikrobiální faktory přirozeně se vyskytující v bílku (Mayes a Takeballi, 1983).

2.7 Vnější faktory ovlivňující mikrobiální kontaminaci

Existuje několik faktorů, které mají vliv na rozsah mikrobiální kontaminace vajec. Tyto faktory mohou být rozděleny na vnější a vnitřní. Mezi vnější faktory patří druh bakterie, množství mikroorganismů, způsob a podmínky skladování.

2.7.1 Druh bakterie

Gram-pozitivní bakterie jsou na povrchu skořápky přítomny jako dominantní mikroorganismy, a to pravděpodobně pro jejich toleranci k suchým podmínkám. Naproti tomu gram-negativní bakterie jsou hlavními viníky zkažených vajec (Stadelman a Cotterill, 1995; De Reu et al., 2006b). Zkažená vejce obvykle obsahují gram-negativní bakterie a příležitostně je přítomno i několik gram-pozitivních organismů. Mezi nejčastěji se vyskytující rody patří *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* a *Escherichia* (Stadelman a Cotterill, 1995). De Reu et al. (2007) ve své studii objevili jako dominantní bakterii na přirozeně kontaminované vaječné skořápce gram-pozitivní *Staphylococcus* spp. (*S. equorum* subsp. *linens*, *S. equorum*, *S. lentus* and *S. xylosus*). Board a Tranter (1995) také uvádějí, že z důvodu tolerance k suchu, mikroflóra vaječné skořápky dominují převážně gram-pozitivní bakterie, které pocházejí většinou z prachu, půdy nebo trusu, a že *Staphylococcus* představuje hojně zastoupený druh bakterie ve vzduchu hal. Podle studie De Reu et al. (2007), mezi nejčastěji se vyskytující gram-negativní bakterie patří *Escherichia coli*, *Salmonella* a *Alcaligenes* spp. a z gram-pozitivních bakterií je to pak *Staphylococcus lentus*, *Styphylococcus xylosus* a *Bacillus* sp.. Mayes a Takeballi (1983) a Board a Tranter (1995) zjistili, že zkažená vejce obsahují smíšenou kontaminaci gram-negativních a několika gram-pozitivních bakterií. Nejčastěji to byly členové rodu *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Proteus* a *Aeromonas*. Studie De Reu et al. (2006b) sledovala procentuální podíl penetrací přes vaječnou skořápku u několika druhů bakterií po 21 dnech inkubace. Zjistili, že přes skořápku nejčastěji pronikly bakterie rodu *Pseudomonas* sp. (60 %), *Alcaligenes* sp. (58 %) a *Salmonella* Enteritidis (43 %). Obsah celých vajec byl nejvíce kontaminován *Salmonella* Enteritidis (33 %) a *Carnobacterium* sp. (17,5 %).

2.7.2 Množství mikroorganismů

Existují velké rozdíly v úrovni kontaminace vaječné skořápky. Messens et al. (2005b) a De Reu et al. (2006a) konstatují, že s vyšším počtem mikroorganismů na povrchu skořápky se přímo úměrně zvyšuje i riziko mikrobiální penetrace a následně kontaminace vaječného obsahu. Množství bakterií na skořápce se tak může pohybovat od nuly přes stovky až po několik milionů (Mayes a Takeballi, 1983; Board a Tranter, 1995). Rozsah kontaminace násadových vajec byl Boardem a Tranterem (1995) vymezen v rozmezí od 10^2 do 10^7 ktj/skořápka. Průměrný počet mikroorganismů na povrchu skořápky u nemytých a neošetřených vajec je kolem 100 000 (Board, 1966). Englmaierová (2010) porovnávala množství mikroorganismů na povrchu vajec ze 4 různých systémů ustájení a zaznamenala významné rozdíly ve velikosti mikrobiální kontaminace. Na vejcích z konvenční klece byl celkový počet mikroorganismů 22 213, z obohacené klece 30 895, z voliéry 3 172 167 a z podestýlky 8 472 860 ktj/skořápka.

2.7.3 Způsob a podmínky skladování

Mezi další vnější faktory, které ovlivňují velikost kontaminace a mikrobiální penetrace do vejce, je také způsob a doba skladování. Teplota je důležitým činitelem, který ovlivňuje penetraci. Při vytvoření teplotního rozdílu mezi teplým vejcem a chladnou bakteriální suspenzí je pozorována rychlejší penetrace (Mayes a Takeballi, 1983; Bruce a Drysdale, 1994). Předpokládá se, že teplotní rozdíl v kombinaci s vlhkostí poskytují bakteriím ideální podmínky pro penetraci přes vaječnou skořápku (Bruce a Drysdale, 1994; Berrang, 1999). Z toho důvodu je velice riskantní, jsou-li vejce přemístěna z chladného skladu do prostoru s pokojovou teplotou, kde může následně dojít ke kondenzaci vodních kapek na povrchu skořápky (Bruce a Drysdale, 1994).

Studie De Reu et al. (2005b), která sledovala vliv doby, teploty a vlhkosti vzduchu při skladování na bakteriální kontaminaci skořápky, ukázala, že celkový počet aerobních bakterií se během 14 ti dnů skladování významně snižovala, to jak při pokojové teplotě a vlhkosti vzduchu 50 % (5,44 až 5,22 log ktj/skořápka) tak i při skladování v chladničce (5 °C) a vlhkosti vzduchu 85 % (5,44 až 5,33 log ktj/skořápka). Gentry a Quarles (1972) nezjistili žádné významné rozdíly v počtu mikroorganismů po jednom dnu skladování čerstvých vajec při teplotě 4°C. Na rozdíl od celkového počtu aerobních bakterií, celkový počet gram-negativních bakterií se při pokojové teplotě statisticky snížil (ze 4,04 na 3,23 log

ktj/skořápka), ne však při skladování v nízkých teplotách (ze 4,04 na 3,66 log ktj/skořápka). To bylo způsobeno zřejmě nízkou vlhkostí vzduchu při pokojové teplotě.

De Reu et al. (2007) ve své studii sledovali vliv doby skladování na množství kontaminovaných vajec. Ihned po snesení (den 0) byla kontaminace 2,7 % (15/554 vajec) a 3,4 % (18/352 vajec) po 21 dnech skladování. De Reu et al. (2006b) studovali vliv doby skladování na penetraci různých druhů bakterií. Nezávisle na sledovaném druhu, penetrace přes vaječnou skořápku byla nejčastěji zaznamenána po 4. až 5. dnu. Po 6 dnech dosáhla penetrace 80 % a po 14 dnech 95 %. Braun et al. (1999) sledovali *Salmonella* Enteritidis během skladování při různých teplotách a vlhkostí vzduchu. Ta byla zjištěna ve vaječném obsahu již po 3 dnech skladování při teplotách vyšší jak 15 °C, avšak v jiné studii se vliv teploty skladování na *Salmonella* Enteritidis nepodařilo prokázat (Wang a Slavik, 1998). Při teplotě 10 °C byla první penetrace zaznamenána po 15 dnech skladování. Avšak ve studii Radkowskoho (2002) nebyla *Salmonella* Enteritidis ve vaječném obsahu nalezena ani po 21 dnech skladování bez ohledu na skladovací teplotu (2 - 30 °C) a relativní vlhkost (normální nebo zvýšená).

2.7.4 Vliv světla na kvalitu skořápky a mikrobiální kontaminaci

Světlo je důležitým aspektem v chovu drůbeže. Ptáci reagují na světlo mnoha různými způsoby, kromě růstu a reprodukce, je klíčové pro zahájení mnoha fyziologických procesů v těle zvířete. Barva světla pak ovlivňuje zejména chování zvířete, jako je třeba příjem krmiva, z fyziologických procesů pak rychlost růstu, či celkovou kondici i stres (Vigh et al, 2002). V současné době je k dispozici široká škála světelných programů a zařízení, z nichž každý má v chovu drůbeže svou vlastní charakteristiku a použitelnost. Umělé osvětlení (délka a intenzita světla) je proto také úspěšně využíváno ke zvýšení reprodukční výkonnosti nosnic v moderních drůbežárnách (Er et al., 2007). Fyziologicky světlo působí tak, že vjem je přes oko převeden do nervových impulsů, které jsou odeslány do mozku. Mozek koordinuje podněty, které dále ovlivňují hypofýzu, a ta začne vylučovat potřebné hormony např. k ovulaci (Lewis a Morris, 2000).

Na rozdíl od lidí je drůbež schopna vnímat světlo jak očima, tak dalšími tělesnými strukturami uloženými mimo oko. Vidění zvířete je závislé na strukturách v oku, které absorbují světlo. Tyto struktury se nazývají fotoreceptory. Různé typy fotoreceptorů absorbují různé typy (vlnové délky) světla. Z toho důvodu, pokud zvíře specifický fotoreceptor pro určitou vlnovou délku světla nemá, nebude toto světlo vnímat (Jácome et al., 2014). Oko

kuřete je oproti jiným hospodářským zvířatům dokonalejší a dovede lépe rozlišovat širší část světelného spektra ve srovnání s lidmi (380 – 760 nm; Prescott a Watches, 1999). Kuřata jsou např. schopna reagovat i na ultrafialové záření. Je proto důležité si uvědomit, že existují různé fotoreceptory selektivně citlivé na různé barvy světla (vlnové délky), ale stejně tak i existují rozdílně citlivé fotoreceptory na jeho intenzitu. Schopnost vnímat různou intenzitu světla v prostředí není však tolik závislá na typu, jako na počtu fotoreceptorů (Jácome et al., 2014). Lewis a Morris (2000) uvádějí, že lidé i drůbež mohou vnímat modrou barvu. Oproti lidem má však drůbež více fotoreceptorů pro tuto barvu, a je ji tak schopna v prostředí vnímat až 12 krát více.

Drůbež, stejně jako mnoho jiných obratlovců světlo vnímá pomocí fotoreceptorů (Menaker a Underwood, 1976; Lewis a Morris, 2000). Jedním z nich je i epifyza, která stimuluje mozek a následně může vyvolat fyziologickou odezvu a ovlivnit chování zvířete. Tento typ lehké stimulace by neměl být přehlížen, zvláště při sestavování světelných programů pro drůbež, neboť to může mít významný vliv na produkci a následně na ziskovost. Lewis a Morris (2000) konstatují, že modré světlo v halách snižuje stres u ptáků. Tato reakce na světlo může zvýšit imunitní odpověď, což může následně snížit riziko a náklady na léčbu infekcí u některých onemocnění. Bylo prokázáno, že některé hluboko uložené fotoreceptory v mozku ptáka jsou stimulovány pouze velmi specifickými barvami světla. Stimulace těchto fotoreceptorů je důležitá, protože ovlivňují produkci a uvolňování určitých hormonů, které jsou zodpovědné za pohlavní vývoj, agresivní chování či za produkci vajec (Foster a Soni, 1998; Er et al., 2007; El Halawani, 2013; Huber-Eicher et al., 2013).

Produkce a kvalita vajec může být ovlivněna viditelným spektrem vyzařovaným světelným zdrojem a některé barvy mohou být více stimulující než jiné (Nicholls et al., 1988). Woodard et al. (1969) a Pyrzak et al. (1987) zaznamenali, že červené světlo stimuluje vývoj gonád. Studie El Halawaniho (2009) a Huber-Eichera et al. (2013) potvrzují také významný vliv světla na vaječnou produkci, kde ji červené světlo o vlnové délce 630 nm významně zvýšilo. Modré světlo zlepšuje růst (Lewis a Morris, 2000) a snižuje aktivitu (Rodenboog, 2001). Studie El Halawaniho (2013) naznačuje, že spojení vhodné barvy a intenzity světla může mít zásadní vliv na produkci vajec. Vyšší počet vajec byl zaznamenán ve skupině nosnic ustájených pod červeným světlem a vejce snesená pod modrým nebo zeleným světlem byla soustavně těžší, než ta pod červeným. Pevnost skořápky byla u vajec snesených pod zeleným světlem vyšší než pod ostatními barvami světla (Pyrzak et al., 1987). Naproti tomu výsledky studie Woodarda et al. (1969) u křepelek a Rozenboima et al. (1998) u slepic naznačují, že hmotnost vajec nebyla ovlivněna barvou světla. Pyrzak a Siopes (1986)

nezaznamenali žádné rozdíly v dospívání kuřic nebo v produkci vajec u slepic chovaných pod modrým nebo červeným světlem ve srovnání s klasickým osvětlením pomocí žárovek (Kim Min et al., 2012). V souvislosti se světlem nejsou v literatuře informace o vlivu barvy světla na mikrobiální kontaminaci vajec.

2.8 Vnitřní faktory ovlivňující mikrobiální kontaminaci

Mezi vnitřní faktory, které ovlivňují velikost bakteriální penetrace do vajec, patří přítomnost kutikuly, skořápky a podskořápečných blan. U skořápky je pak důležitá zejména její kvalita a pórovitost.

2.8.1 Kvalita skořápky

Kvalita vaječné skořápky je nejčastěji definována měrnou hmotností skořápky, hmotností skořápky nebo tloušťkou skořápky (Messens et al., 2005a). Vejce s nízkou měrnou hmotností a tudíž i tenčí vaječnou skořápkou vykazovala vyšší penetraci salmonely (Sauter a Petersen, 1974) a *Pseudomonas* (Orel, 1959). Naopak Kraft et al. (1958), Williams et al. (1968) a Smeltzer et al. (1979) nezaznamenali vliv tloušťky skořápky na schopnost bakterií penetrovat. Také Messens et al. (2005b) studovali vliv kvality skořápky na penetraci *Salmonella* Enteritidis a neprokázali souvislost mezi tloušťkou skořápky a průnikem těchto bakterií. Podobné výsledky zjistili také De Reu et al. (2006b), kteří sledovali 7 vybraných druhů bakterií. Ve svých závěrech uvádějí, že velikost vaječné skořápky či tloušťka nemají žádný významný vliv na penetraci. Dalším důležitým aspektem je i struktura skořápky (Roberts a Brackpool, 1994). Nascimento a Solomon (1991) zjistili, že vizuálně horší kvalita vaječné skořápky souvisela s vyšší penetrací *Salmonella* Enteritidis. K největší změně ultrastruktury došlo v mamilární vrstvě. Byly popsány i různé abnormality. Nicméně Nascimento et al. (1992) dodává, že některé z těchto abnormalit snižovaly, zatímco jiné naopak zvyšovaly odolnost skořápky proti pronikání bakterií.

Bylo zjištěno mnoho faktorů ovlivňujících kvalitu skořápky: věk slepic, plemeno, teplota prostředí, výživa, stres, choroby a chemické látky (Roberts a Brackpool, 1994).

Věk slepice je jedním nejdůležitějších faktorů ovlivňujících kvalitu skořápky. Vejce na začátku a na konci snášky mívají silnější skořápku oproti vejcům uprostřed snáškového období (Mayes a Takeballi, 1983). Bakteriální kontaminace skořápky, vzduchové komůrky a obsahu vejce byla častější u vajec od starších slepic (Jones et al., 2002). Nascimento et al.

(1992) zjistili rostoucí penetraci *Salmonella* Enteritidis přes skořápku, a to z 12,9 % na začátku snášky na 25 % na konci snášky. Naproti tomu De Reu et al. (2006b) zjistili, že velikost penetrace po celou dobu snášky zůstala téměř konstantní. Ve 34., 46., 60., 69. a 74. týdnu procentuální penetrace pro vybrané druhy činila 30, 39, 41, 33 a 37 %. Kontaminace vaječné skořápky se s věkem mírně zvýšila, a to 13, 13 a 15 % ve 34., 46. a 60. týdnu na 26 a 20 % v 69. a 74. týdnu věku. Kontaminace vaječné skořápky se s věkem slepic významně zvyšuje, a to jak v klecových tak i v alternativních systémech ustájení (Huneau – Salaün et al., 2010). Mallet et al. (2003) naopak zjistili, že kontaminace vajec od slepic chovaných v obohacených i neobohacených klecích s věkem nosnic klesá. Autoři však toto snížení přisuzují sezonnímu vlivu. Také Wall et al. (2008) zjistili, že věk nosnic neovlivnil celkový počet mikroorganismů ani přítomnost *Enterococcus*. Na druhé straně Kretzshmar-McCluskey et al. (2009) zjistili, že množství mikroflóry na povrchu vejce se s věkem nosnic zvyšovalo.

Genetická selekce na vyšší produkci vajec a větší hmotnost vajec má tendenci vést ke zhoršení kvality vaječné skořápky (Roberts a Brackpool, 1994), které jsou pak méně odolné vůči kontaminaci, na co poukazuje práce Jonese et al. (2002). Ve své studii našli rozdíly i mezi jednotlivými genotypy. U kontrolního genotypu byla zjištěna nižší úroveň kontaminace u obou sledovaných druhů bakterií (*Salmonella* Enteritidis a *Pseudomonas fluorescens*). Konečné výsledky této práce naznačují, že genetická selekce změnila schopnost vajec odolávat mikrobiální kontaminaci prostřednictvím kvality vaječné skořápky, a že testování na mikrobiální integritu by mělo být považováno jako součást selekčního procesu v chovech nosnic.

2.8.2 Pórovitost skořápky

Vaječná skořápka obsahuje četné množství pórů, jejichž počet se odhaduje v rozmezí od 7 000 do 17 000 na vejce (Mayes a Takeballi, 1983), které jsou překryty organickým materiálem, kutikulou (Board, 1980). Dokonce i u vajec, která mají nepoškozenou kutikulu, se vyskytuje alespoň 10 až 20 pórů, které nejsou překryty kutikulou. Tyto nekryté, také někdy označované jako "volné" póry, mohou představovat bránu pro vstup mikroorganismů do vaječného obsahu (Kraft et al., 1958; Board a Tranter, 1995). Mimo to, u starších vajec dochází k dehydrataci kutikuly, což vede jejímu smrštění a některé póry tak mohou být obnaženy a vystaveny bakteriální penetraci (Mayes a Takeballi, 1983). Současné údaje naznačují, že i přesto, že póry představují primární bránu pro vstup mikroorganismů, tak se strukturální vady, které se vyskytují u mnoha vajec, zdají být snazší cestou přenosu (Solomon,

1997). Větší množství pórů bylo nalezeno v ekvatoriální oblasti a na tupém konci vejce. Průměr póru se pohybuje v rozmezí od 9 do 35 μm a směrem nahoru se rozšiřují. Některé póry jsou zdeformované, ale většina jich vede od vnějšího povrchu podskořápečné blány (Musgrove, 2004). Ve studii Messense et al. (2005b) byla zjištěna vyšší bakteriální penetrace na tupém konci vejce oproti ostrému. Z celkových 155 analyzovaných vaječných skořápek, byl v 72,9 % zaznamenán průnik na tupém konci vejce a v 52 % na ostrém. Počet pórů byl signifikantně vyšší na tupém konci vejce, a to v průměru 32 ± 22 pórů/ cm^2 ve srovnání s ostrým koncem, kde bylo v průměru 26 ± 19 pórů/ cm^2 . Tyto výsledky částečně potvrzuje i dřívější studie Haigha a Bettsa (1991), kde sice zaznamenali vyšší počet pórů na tupém konci, avšak nenalezli vztah mezi pórovitostí a velikostí penetrace. Fromm a Monroe (1960) a Board a Halls (1973) korelaci mezi pórovitostí a bakteriální penetrací našli, Hartung a Stadelman (1963), Reinke a Baker (1966) a Nascimento et al. (1992) však toto nepotvrdili. Ani De Reu et al. (2006b) nenašli korelaci mezi počtem pórů a bakteriální penetrací přes vaječnou skořápku. Skutečnost, že některé póry neprocházejí přes celou tloušťku skořápky (Silyn-Roberts, 1983), a že je často přítomná kutikulární ochrana, která brání mikrobiální penetraci (Board a Halls, 1973), může přispět k těmto protichůdným názorům.

3 HYPOTÉZA

Z literatury je zřejmé, že systém ustájení ovlivňuje užitek i kvalitu vajec. Lze předpokládat, že ovlivňuje i vlastnosti skořápky a její strukturu. Systém ustájení ovlivňuje i mikrobiální kontaminaci vajec. Je pravděpodobné, že kontaminace vajec a struktura skořápky budou mít vliv na penetraci mikroorganismů do vejce a i na vnitřní kvalitu vajec během skladování. V souvislosti s ustájením slepic je také otázkou, jaký vliv na kvalitu skořápky a mikrobiální kontaminaci má barva světla.

4 CÍL PRÁCE

Cílem disertační práce je zjistit vliv systému ustájení na strukturu skořápky, mikrobiální kontaminaci a následně její vliv na penetraci mikroorganismů do vejce, na změny kvality během skladování. Posoudit vliv barvy světla na kvalitu skořápky a mikrobiální kontaminaci.

5 MATERIÁL A METODIKA

V rámci této disertační práce byly realizovány tři pokusy. Ty byly zaměřeny na různé aspekty spojené s kvalitou skořápky, mikrobiální kontaminaci vajec a jejich skladovatelností.

5.1 Pokus 1

Experiment byl zaměřen na zjištění vlivu barvy světla na kvalitu vzduchu v hale, produkci nosnic a mikrobiální kontaminaci vaječné skořápky v provozních podmínkách. V pokusu byly použity nosnice genotypu ISA hnědá ve věku od 22. do 75. týdne věku. Slepice byly umístěny ve 4 halách s barevnými světly (14 400 nosnic na halu) se shodnými podmínkami prostředí. Nosnice byly umístěny v třítážových obohacených klecích (20 nosnic na klec, 750 cm²/nosnici). Byly použity následující barvy světla: modrá, zelená, červená a žlutá. Jako světelný zdroj byly použity světelné diody (LED) umístěné nad řetězovým krmítkem po celé délce klece. Denní světelný režim se skládal z 15 hodin světla a intenzita světla byla 10 lx. Nosnice byly krmeny standardní krmnou směsí, N1 od 20. do 40. týdne a N2 od 41. týdne věku. Krmení i voda byly podávány *ad libitum*. Mikroklimatické podmínky odpovídaly standardním požadavkům pro chov nosnic.

Produkce vajec a mortalita byly denně zaznamenávány. Hmotnost vajec byla hodnocena ve 4 týdenních intervalech, kdy bylo při každém sběru z každé skupiny odebráno 1000 vajec.

Mikrobiální složení vzduchu bylo měřeno přístrojem Air Sampler MAS - 100 Eco (MBV AG, Stäfa, Switzerland) umístěném na úrovni střední etáže. Byl sledován celkový počet mikroorganismů (CPM), *Escherichia coli* (EC) a *Enterococcus* (E) na metr kubický vzduchu. Vzorky vzduchu byly odebírány ve 4 týdenních intervalech v průběhu celého snáškového cyklu. Výsledný proud vzduchu byl přenesen na standardní Petriho misku obsahující agar. Pro detekci CPM byl použit Standard plate count agar (Oxoid), pro EC MacConkey agar (Oxoid) a pro E Slanetz Bartley agar (Oxoid). Petriho misky byly inkubovány 120 hodin při 30°C (CPM) a 48 hodin při 37°C (EC a E).

Vejsce pro analýzu mikrobiální kontaminace vaječné skořápky byla sbírána ve 4 týdenních intervalech. V jednom sběru bylo odebráno 6 vajec od každého světla (2 vejce z horní etáže, 2 vejce ze střední etáže a 2 vejce ze spodní etáže). Celkem tak bylo zanalyzováno 120 vajec. Mikrobiální analýza povrchu skořápky byla provedena na čerstvých

vejcích podle Englmaierové et al. (2014). Vejce pro analýzu kontaminace vaječné skořápky byla umístěna (sterilními rukavicemi) do sterilních plastových sáčků s 10 ml sterilní peptonové vody (9 g chloridu sodného, 1 g peptonu, 1000 ml destilované vody), v kterých byla vejce důkladně promývána. Ředící řada pro každé vejce byla vytvořena přidáním 1 ml roztoku (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Mikrobiální analýza byla provedena pomocí standardních agarových metod. U vajec podobně jako ve vzduchu byl sledován celkový počet mikroorganismů, *Escherichia coli* a *Enterococcus*. Počet *Escherichia coli* byl monitorován pomocí Mac-Conkey agaru (Oxoid), počet *Enterococcus* pomocí Slanetz Bartley agaru (Oxoid) a celkový počet mikroorganismů Standard plate count agarem (Oxoid). Petriho misky s Mac-Conkey agarem a Slanetz Bartley agarem byly inkubovány 48 hodin při inkubační teplotě 37 °C. Standard plate count agar byl inkubován 120 hodin při teplotě 30 °C. Typické kolonie tvořící jednotku (ktj) byly na Petriho miskách spočítány a následně převedeny na logaritmus po inkubaci podle vzorce:

$$\text{ktj (vejce)} = \frac{N_1 + N_2}{2} * D * K$$

(N_1 - počet kolonií na 1. Petriho misce; N_2 - počet kolonií na 2. Petriho misce; D - stupeň ředění (10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 nebo 10^5); K - koeficient 10 (CPM) nebo 100 (*Escherichia coli* a *Enterococcus*))

Data pro produkční ukazatele a pro mikrobiální kontaminaci vzduchu byla statisticky zhodnocena programem SAS (SAS Institute Inc., 2003) za použití jednoduché analýzy variance (ANOVA), procedurou GLM. Průkazné rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny pomocí Duncanova testu. Výsledky mikrobiální kontaminace vajec byly zpracovány dvojnásobnou analýzou variance (ANOVA) s interakcí etáž a barva světla. Hodnota $P < 0,05$ byla považována za významnou pro všechna měření a je označen různými písmeny.

5.2 Pokus 2

Cílem pokusu 2 bylo sledování vlivu systému ustájení, úrovně výživy na technologické ukazatele kvality vajec, na rozsah mikrobiální kontaminace vaječné skořápky a penetrace mikroorganismů do vaječného obsahu a na skladovatelnost vajec.

Pokus byl realizován se 172 nosnicemi ISA hnědá od 20. do 69. týdne věku. Slepice byly rozděleny do 3 skupin podle systému ustájení, 72 slepic v konvenční kleci (550 cm²/nosnici), 60 slepic na podestýlce (7 nosnic/m²) a 40 slepic ve voliéře (15 nosnic/m²). Každá skupina byla dále rozdělena dle obsahu vápníku na podskupinu pokusnou (Ca 3 %) a na kontrolní (Ca 3,5 %). Celkem tedy bylo sledováno 6 skupin. Během sledování byly slepice krmeny obchodní krmnou směsí N1P, N1K, N2P a N2K, kdy od 20. do 40. týdne věku byla použita krmná směs N1P a N1K. Nosnice ve věku od 41. do 69. týdne věku dostávaly krmnou směs N2P a N2K. Složení krmných směsí je uvedeno v tabulkách 1, 2 a 3. Napájení a podávání krmné směsi bylo *ad libitum*. Podmínky vnějšího prostředí odpovídaly běžným požadavkům pro chov nosnic. Světelný režim odpovídal požadavkům pro hybrida ISA hnědá (světelný den s 15 hodinami světla).

V tomto pokusu byla sledována užítkovost slepic prostřednictvím počtu snesených vajec a denní spotřeby krmiva (g/slepici).

Vejsce k rozborům technologické hodnoty byla odebírána ve 28 denním intervalu, vždy 2 dny po sobě, z různých systémů ustájení a ze skupin s různými úrovněmi výživy vápníku. Kvalitativní ukazatele skořápky a hmotnost vajec byly sledovány ze všech tří systémů ustájení. Hmotnost vejce, index tvaru vejce, kvalitativní ukazatele bílku a žloutku byly sledovány i v rámci různé doby skladování, a to u čerstvých, 7, 14 a 21 dní skladovaných vajec pouze z konvenční klece a z podestýlky. Vejce byla skladována při pokojové teplotě 20 - 22 °C a relativní vlhkosti 55 - 60 %. Z každé doby skladování, z každého systému ustájení a z každé úrovně výživy vápníkem bylo zanalyzováno 160 vajec. Celkem tak bylo zhodnoceno 640 vajec.

Hmotnost každého vejce byla zjišťována na standardních laboratorních vahách Ohaus (TSS, York, England). Index tvaru vejce byl spočítán jako maximální šířka (mm) / maximální délka (mm) x 100, kde délka a šířka byla měřena posuvným měřítkem (Anderson, 2004). Z ukazatelů kvality bílku byly sledovány Haughovy jednotky byly měřeny přístrojem QCH (TSS, York, England), index bílku, který byl vypočítán jako (výška bílku (mm) / [délka bílku (mm) + šířka bílku (mm) / 2] x 100), kde výška tuhého bílku byla změřená mikrometrickou hlavicí QCH (TSS, York, England). Šířka a délka tuhého bílku byla měřena kolmo na sebe posuvným měřítkem. Dále byl sledován podíl bílku, který byl vypočítán z rozdílu hmotností vejce, žloutku a skořápky a pH bílku bylo zaznamenáno pomocí pH-metru (pH 330i WTW, Weilheim, Germany).

Žloutek byl hodnocen na základě indexu žloutku (výška žloutku (mm) / diametr žloutku (mm) x 100), kde výška žloutku byla změřena pomocí mikrometrické hlavičky QCH

(TSS, York, England) a šířka žloutku byla měřena kolmo na sebe posuvným měřítkem. Podíl žloutku byl stanoven z rozdílu hmotností vejce, žloutku a skořápky. Barva žloutku byla stanovena pomocí kolorimetru QCC (TSS, York, England).

Z charakteristik kvality skořápky byla sledována hmotnost skořápky, která byla zvážena po vysušení. Dále byla sledována tloušťka skořápky v ekvatoriální rovině po odstranění podskořápečných blan, a to pomocí mikrometru QCT (TSS, York, England). Pevnost skořápky byla sledována na zařízení QC - SPA (TSS, York, England). Podíl skořápky byl vypočítán z hmotností vejce a skořápky.

Vejce pro analýzu mikrobiální kontaminace vaječné skořápky byla sbírána z konvenční klece a z podestýlky. Provedení této analýzy bylo shodné s pokusem 1. Vejce byla odebírána ve 28 denním intervalu, vždy 3 vejce (rozbor ve dni sběru) + 3 x 2 vejce (rozbor po 2, 7 a 14 dnech skladování na čisté proložce při pokojové teplotě 20 - 22 °C a relativní vlhkosti 55 - 60 %) z každé ze 4 skupin (konvenční klec + krmná směs se 3,5 % a 3 % vápníku, podestýlka + krmná směs se 3,5 % a 3 % vápníku). V jednom rozboru bylo pro stanovení mikrobiální kontaminace zhodnoceno 36 vajec a celkem 300 vajec za celé sledované období. U vajec, která byla skladována 2, 7 a 14 dní, byla dále provedena také mikrobiální analýza vaječného obsahu, a to podskořápečných blan a bílku. Vejce pro tuto analýzu byla omyta pod tekoucí vodou, očištěna desinfekčním roztokem a znovu omyta. Vaječná skořápka byla narušena sterilním skalpelem a vaječný obsah byl vylit na sterilní Petriho misku. Podskořápečná blána byla odstraněna sterilní pinzetou a řídký bílek byl odebrán sterilní injekční stříkačkou. Poté byly podskořápečné blány umístěny do 10 ml sterilního peptonového roztoku (ředění 10^0) a vaječný bílek do prázdné zkumavky (ředění 10^0). Po vytvoření ředících řad bylo stanovení mikroorganismů provedeno standardními plotnovými metodami, jako tomu bylo při stanovení mikrobiální kontaminace vaječné skořápky a vypočítány kolonie tvořící jednotku (ktj). Dále bylo dopočítáno procentuální zastoupení vajec, do jejichž obsahu penetrovaly mikroorganismy.

Výsledky produkčních ukazatelů a ukazatelů kvality vaječné skořápky byly statisticky zpracovány programem SAS (SAS Institute Inc., 2003) dvojnásobnou analýzou variance (ANOVA) s interakcí systém ustájení a obsah vápníku u mikrobiální kontaminace s interakcí systém ustájení a doba skladování. Data týkající se technologické hodnoty vajec byla hodnocena trojnásobnou analýzou variance s interakcí systém ustájení, doba skladování a obsah vápníku. Hodnota $P < 0,05$ byla považována za významnou pro všechna měření a je označena různými písmeny.

Tabulka 1 Složení krmné směsi pro nosnice N1K, N1P

Komponent	směs (%)	
	N1 K	N1 P
Pšenice	34,38	34,38
Kukuřice	28,30	29,80
Sojový extrahovaný šrot	17,50	17,50
Rybí moučka	1,50	1,50
Kvasnice	1,50	1,50
Pšeničné otruby	2,00	2,00
Sušená vojtěška	2,00	2,00
Řepkový olej	3,00	3,00
Mletý vápenec	8,00	6,50
Dikalciumpfosfát	1,00	1,00
Krmná sůl	0,20	0,20
Aminovitan SK	0,50	0,50
Methionin 50	0,12	0,12

Tabulka 2 Složení krmné směsi pro nosnice N2K, N2P

Komponent	směs (%)	
	N2 K	N2 P
Pšenice	35,50	35,00
Kukuřice	30,30	31,00
Sojový extrahovaný šrot	15,50	15,50
Rybí moučka	1,50	1,50
Pšeničné otruby	2,50	2,50
Sušená vojtěška	2,00	3,00
Řepkový olej	3,00	3,00
Mletý vápenec	8,00	6,80
Dikalciumpfosfát	1,00	1,00
Krmná sůl	0,20	0,20
Aminovitan SK	0,50	0,50

Tabulka 3 Kalkulovaný obsah živin

Komponent	směs (%)			
	N1 K	N1 P	N2 K	N2 P
Sušina (%)	88,3	88,7	88,9	88,6
N látky (%)	18,7	18,6	15,3	15,4
Tuk po hydrolýze (%)	2,5	2,3	2,3	2,4
ME (MJ)	11,5	11,4	11,4	11,5
Vápník (%)	3,5	3,0	3,5	3,0
Fosfor celkový (%)	0,54	0,54	0,5	0,5

5.3 Pokus 3

Pokus byl zaměřen na zjištění vlivu systému ustájení na kvalitu vaječné skořápky, její mikrobiální kontaminaci a následně penetraci do vaječného obsahu, dále na technologickou hodnotu vajec a na obsah bílkovin ve vaječném bílku v průběhu skladování.

Sledování bylo realizováno u vajec slepic ISA hnědá ustájených v obohacených klecích (750 cm²/nosnici) a ve výběhu (9 ks/m²). Podmínky ustájení a krmení odpovídaly běžným požadavkům nosných slepic uvedených v pokusu 2.

Vejsce pro stanovení technologické hodnoty byla sbírána mezi 20. a 60. týdnem věku slepic ve 28 denním intervalu. Hmotnost vejce, kvalitativní ukazatele bílku a žloutku byly navíc sledovány u vajec čerstvých a skladovaných 2, 7, 14 a 21 dnů. Uskladněna byla při pokojové teplotě 20 - 22 °C a relativní vlhkosti 55 - 60 %. Celkem tak bylo zanalyzováno 900 vajec, z toho vždy 150 vajec z jednoho systému ustájení v jednom sběru a tedy 30 vajec na každý den skladování. Z ukazatelů kvality bílku byly hodnoceny Haughovy jednotky, index, podíl a pH bílku. Kvalita žloutku byla vyjádřena indexem, podílem a barvou. Z ukazatelů kvality skořápky byla v tomto pokusu sledována hmotnost, tloušťka, pevnost a podíl skořápky. Stanovení jednotlivých ukazatelů odpovídalo pokusu 2. Oproti experimentu 2 byla navíc v tomto pokusu stanovena také deformace skořápky, a to pomocí zařízení QC - SPA (TSS, York, England), dále barva skořápky, která byla měřena QCR reflektometrem, který pracuje jako procentuální vyjádření mezi bílou a černou barvou, kde čistě bílá má 100 % a černá 0 %. Povrch skořápky byl hodnocen na základě vzorce uváděného Thomsonem et al. (1985): $4,67 \times \text{hmotnost vejce}^{2/3}$. Nakonec byl stanoven i index skořápky, který byl vypočítán jako $\text{hmotnost skořápky/povrch} \times 100$.

Vejsce pro stanovení mikrobiální kontaminaci vaječné skořápky a penetraci mikroorganismů do vaječného obsahu byla sbírána v 28 denním intervalu. Pro každou analýzu bylo sebráno vždy 6 vajec z každého systému ustájení a z každé doby skladování. Celkem tak bylo zanalyzováno 180 vajec. Vejsce pro mikrobiální rozbor byla skladována 0, 2, 7, 14 a 21 dní při pokojové teplotě 20 - 22 °C a relativní vlhkosti 55 - 60 %. Mikrobiální stanovení bylo shodné s pokusem 1. Při statistickém vyhodnocení výsledků byla zvlášť stanovena mikrobiální kontaminace povrchu čerstvých vajec.

U těchto vajec bylo dále ve skořápce stanovováno i množství pórů. Počet pórů byl stanoven dle metodiky Peeblese a McDaniela (2004), kdy se vaječné skořápky povařily 15 minut v 5 % NaOH, aby došlo k odstranění podskořápečných blan a veškerých zbytků bílku. Poté byly skořápky opláchnuty 3 krát v destilované vodě. Po osušení v sušárně při 50 °C byl

vnitřní povrch skořápky obarven methylenovou modří (roztok byl připraven jako 0,5 g 89 % methylenové modří v jednom litru 70 % etanolu). Póry se objevily jako modrý bod na vnějším povrchu skořápky v důsledku kapilárního vztlínání. Počty pórů byly zjišťovány zvlášť z ostrého konce, tupého konce a z ekvatoriální roviny.

Koncentrace bílkovin ve vaječném bílku byla stanovena za použití metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie RP-HPLC/PDA, kde došlo k identifikaci chromatografických píků pomocí referenčních proteinů a ke kvantifikaci vybraných proteinů. Jako referenční proteiny byly použity lysozym (Sigma - Aldrich Chemical Corporation, kat. č. 62970), ovotransferin (Sigma - Aldrich Chemical Corporation, kat. č. C0755) a ovoalbumin (Sigma - Aldrich Chemical Corporation, kat. č. S7951). Pro stanovení byl použit vzorek 5 bílků, z každého sběru vždy od čerstvých, 7, 14 a 21 dní skladovaných vajec při pokojové teplotě 20 - 22 °C a relativní vlhkosti 55 - 60 % a od každého systému ustájení. 20 mg zhomogenizovaného usušeného bílku bylo rozpuštěno v 0,8 % roztoku chloridu sodného a doplněno v 10 ml odměrné baňce po rysku. Takto připravené roztoky vaječného bílku byly zfiltrány do vialky. Pro stanovení byla použita kolona C4 kolona Supelcosil™ LC-304 (250 x 4,6 mm, 5 µm, 300 Å) s kompatibilní předklonkou Supelcosil™ LC-304 Supelguard™ Cartridge (20 x 4,0 mm, 5 µm). Složení mobilní fáze: A - 0,025 % TFA (pH ~2,50) a B - 70 % CH₃CN, 0,025 % TFA (pH ~2,50). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a nastříkovaný objem na kolonu 20 µl. Teplota kolony během chromatografické separace činila 60 °C. Detekční vlnová délka byla 214 nm.

Gradient mobilní fáze:

čas [min]	průtok [ml/min]	A [%]	B [%]
0	1,00	65	35
5	1,00	0	100
7	1,00	0	100
10	1,00	65	35

Výsledky pokusu byly zhodnoceny programem SAS (SAS Institute INC., 2003), kde hodnoty ukazatelů kvality skořápky, počty pórů a mikrobiální kontaminace byly vyhodnoceny za použití jednoduché analýzy variance (ANOVA), procedurou GLM. Průkazné rozdíly mezi skupinami byly testovány pomocí Duncanova testu. Výsledky technologické hodnoty vajec, mikrobiální kontaminace a obsahu bílkovin ve vaječném bílku byly hodnoceny na základě dvojnásobné analýzy variance (ANOVA) s interakcí systém ustájení a doba skladování. Hodnota $P < 0,05$ byla považována za významnou pro všechna měření.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Pokus 1

Cílem pokusu 1 bylo zhodnotit užitkovost nosnic, kvalitu vzduchu a mikrobiální kontaminaci vajec při použití různé barvy světla v halách.

6.1.1 Produkční ukazatele

V tabulce 4 jsou uvedeny výsledky týkající se vlivu barvy světla na užitkovost nosnic. Z výsledků je patrné, že denní produkce vajec se pohybovala od 83,90 % při zeleném osvětlení do 87,01 % při červeném. Zde nebyly zaznamenány průkazné rozdíly mezi jednotlivými barvami světla. Tyto výsledky jsou v souladu s Pyrzakem a Siopes (1986), kteří také nezaznamenali žádný vliv barvy světla na produkci vajec. Avšak, v další práci Pyrzak et al. (1987) zjistili, že signifikantně vyšší produkci vajec u nosnic ustájených při červeném světle a naopak nižší byla u slepic ustájených při modrém světle. Podobně také Kim Min et al. (2012) našli průkazně nejvyšší snášku u nosnic chovaných při červeném světle, zatímco Borille et al. (2013) při bílém. Hassan et al. (2013) uvádějí, že produkce vajec byla podobná jak v bílém, zeleném tak i v modrém světle. To je v souladu s Lewisem a Morrisem (2000) kteří uvádějí, že pronikání vlnové délky červeného světla více stimuluje hypotalamus oproti vlnové délce zeleného nebo modrého světla. Důvodem pozitivního efektu červeného světla na snášku lze vysvětlit tím, že světlo delších vlnových délek (směrem k oranžovo-červenému spektru) proniká efektivněji přes kůži a přes lebku, což vede ke zlepšení reprodukčních schopností slepic (Solangi et al., 2004). Hassan et al. (2013) uvádějí, že zvyšující se průměrnou produkci vajec při použití červeného světla lze přičíst tomu, že dojde ke zvýšení koncentrace FSH a koncentrace luteinizačního hormonu, při kterém nastane zvýšení počtu ovariálních folikulů.

Nejnižší mortalita byla zaznamenána u nosnic ustájených při červeném světle (12,65 %), naopak nejvyšší byla detekována při modrém světle (14,30 %). Mohammed et al. (2010) ve své práci zjistili, že modré světlo u nosnic zvyšuje aktivitu, a to chůzi, ozobávání peří a agresí. Savory a Mann (1999) poznamenali, že vyšší pravděpodobnost výskytu ozobávání a kanibalismu může být ve skupinách, kde je úroveň aktivity vyšší. Je možné, že slepice tak hledají způsob, jak kompenzovat tento deficit. To může být v souvislosti s vyšší mortalitou u slepic ustájených při modré barvě. Dále bylo zjištěno, že se u nosnic ustájených

při červeném světle vyskytuje méně kanibalismus, oproti světlu zelenému nebo bílému (Bowlby, 1957; Schumaier et al., 1968), a to pravděpodobně proto, že ptáci nemohou při červeném světle vidět krevní stimulant. Nicméně, toto chování není normálně pozorováno u masných kuřat. Huber-Eichet et al. (2013) také uvádějí, že oproti bílému světlu červené snižuje agresivitu (zelená byla oproti těmto dvěma barvám neutrální).

Hodnoty týkající se hmotnosti vajec se ve všech barvách světla pohybovaly mezi 58,86 a 58,89 g a nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami. Tyto výsledky jsou v souladu s Woodardem et al. (1969), kteří tento vliv sledovali u japonských křepelek a Rozenboimem et al. (1998) kteří zjistili, že barva světla neměla u nosnic vliv na průměrnou hmotnost vajec v průběhu snášky. Výsledky uvedené v této práci také odpovídají studii Freitas et al. (2010) a Borilleho et al. (2013), kteří nepozorovali vliv barvy světla na hmotnost vejce. Nicméně, Pyrzak a Siopes (1986) uvádějí, že krůty chované při červeném světle produkovaly těžší vejce, oproti jiným barvám světla. Naopak Pyrzak et al. (1987) konstatují, že vejce snesená při modrém světle byla větší oproti těm snesených při červeném světle. Ve studii Era et al. (2007) pozorovali, že hmotnost vejce byla nižší v červeném světle ve srovnání s modrým. Avšak Borille et al. (2013) dodávají, že hmotnost vejce závisí především na věku slepice a na nutričních faktorech než na barvě světla.

6.1.2 Mikrobiální kontaminace vzduchu

Výsledky mikrobiálního znečištění vzduchu v rámci různé barvy osvětlení jsou uvedeny v tabulce 5. Barva světla neměla žádný významný vliv na mikrobiální znečištění vzduchu. Všechna měření celkového počtu mikroorganismů, *Escherichia coli* a *Enterococcus* měla nízkou proměnlivost. O vlivu barvy světla na mikrobiální kontaminaci vzduchu nejsou v literatuře k dispozici žádné informace. Nicméně se přepokládá, že početně vyšší hodnota celkového počtu mikroorganismů v modrém světle by mohla souviset se zvýšenou prašností, která byla pravděpodobně způsobena vyšší aktivitou nosnic v této barvě světla. Dostupná data jsou zejména o vlivu systému ustájení na kontaminaci vzduchu. Monitoring poletujícího prachu ukázal, že jeho koncentrace byla vyšší v podlahových systémech ustájení ve srovnání s klecemi (Huneau-Salaün et al., 2010). Tato špatná mikrobiální kvalita vzduchu v alternativních systémech může mít vliv na koncentraci bakterií na vejcích (Quarles et al., 1970). Zhoršená kvalita vzduchu v alternativních systémech ustájení může být způsobena přítomností podestýlky a vyšší aktivitou slepic (chůze, létání, hrabání). Mimo to, přirozené

větrací systémy v alternativních systémech ustájení mohou vést, na rozdíl od dynamických ventilačních systémů v halách s klecemi, k nižší rychlosti větrání a tím i k vyšší míře koncentrace prachu (Takai et al., 1998; Radon et al., 2001).

6.1.3 Mikrobiální kontaminace skořápky

Mikrobiální kontaminace povrchu skořápky byla hodnocena v každé barvě světla a v každé etáži (tabulka 6). Byla zde zaznamenána průkazná interakce mezi etážemi a barvou světla u *Escherichia coli* ($P < 0,042$) a *Enterococcus* ($P < 0,019$). Nejvyšší kontaminace *Escherichia coli* byl detekován ve střední etáži při žluté barvě světla, zatímco nejnižší byla rovněž při žlutém světle, ale v horní etáži (3,30 log ktj/skořápka). Co se týče bakterií rodu *Enterococcus*, byla zaznamenána průkazně nejvyšší kontaminace také při žluté barvě ve střední etáži, avšak nejnižší při modrém světle v horní etáži. V tomto pokusu byl zjištěn signifikantní vliv ($P < 0,001$) etáže na celkový počet mikroorganismů, na počet *Escherichia coli* i na počet bakterií rodu *Enterococcus*. Nejvyšší kontaminace skořápky byla nalezena ve střední etáži, zatímco nejnižší v horní. Barva světla neměla žádný významný vliv na kontaminaci skořápky. Jako dobře známý a zdokumentovaný je zatím pouze vliv ultrafialového záření (vlnová délka 254 nm), které se využívá pro likvidaci různých druhů mikroorganismů, jako jsou bakterie, kvasinky, plísně, houby a viry (Chavez et al., 1999; Coufal et al., 2003). Výrazně vyšší kontaminace vaječné skořápky ve střední etáži by mohla být zapříčiněna vyšší koncentrací prachu v této úrovni. Kontaminace skořápky je závislá na čistotě povrchů, na kterých je vejce sneseno (Harry, 1963), a usazování prachu a nečistot na klecích během snáškového období pravděpodobně snižuje čistotu skořápky a zvyšuje bakteriální zatížení. Kromě toho bylo zjištěno, že koncentrace prachu v ovzduší roste v průběhu snáškového období, což je zřejmě v důsledku hromadění prachu v halách (Huneau-Salaün et al., 2010).

6.1.4 Shrnutí výsledků pokusu 1

Výsledky z pokusu 1 naznačují, že barva světla neměla významný vliv na produkci vajec ani na jejich hmotnost, přesto však neprůkazně vyšší intenzita snášky byla pozorována při červeném světle naopak nejméně vajec bylo sneseno nosnicemi ustájenými při světle zeleném. Co se týče mortality nosnic, ta byla nejnižší při ustájení v červeném světle, naproti

tomu nejvíce nosnic uhynulo při modrém světle. Stejně jako produkční ukazatele, tak ani mikrobiální kontaminaci vzduchu v halách barva světla průkazně neovlivnila. Na druhou stranu, byla zaznamenána průkazná interakce u mikrobiální kontaminace povrchu vajec, a to mezi etáží a barvou světla u *Escherichia coli* a *Enterococcus*, kde nejvyšší množství *Escherichia coli* bylo ve střední etáži pod žlutou barvou světla, naopak nejnižší v horní etáži pod stejnou barvou osvětlení. U bakterií rodu *Enterococcus* bylo průkazně nejvyšší množství zaznamenáno u vajec ze střední etáže při žlutém světle, ve srovnání s horní etáží při modrém světle, kde byla kontaminace nejnižší. Během tohoto sledování byl také nalezen průkazný vliv etáže na množství mikroorganismů na vaječné skořápce. Vyšší kontaminace povrchu vejce byla zjištěna ve střední etáži oproti horní a dolní.

Tabulka 4 Vliv barvy světla na produkční ukazatele nosnic (pokus 1)

Barva světla	Ukazatel		
	Intenzita snášky (%)	Mortalita (%)	Hmotnost vejce (g)
modrá	84,8	14,3	58,9
zelená	83,9	13,2	59,0
červená	87,0	12,7	58,9
žlutá	86,8	13,0	58,9
SEM	9,4	-	2,6
Průkaznost			
	NS	-	NS

NS neprůkazný

Tabulka 5 Vliv barvy světla na mikrobiální kontaminaci vzduchu (pokus 1)

Barva světla	log ktj/m ³		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus</i>	Celkový počet mikroorganismů
modrá	4,78	4,09	5,20
zelená	4,98	3,97	5,08
červená	4,94	4,09	5,15
žlutá	4,97	3,99	5,06
SEM	0,44	0,25	0,34
Průkaznost			
	NS	NS	NS

ktj kolonie tvořící jednotku

NS neprůkazný

Tabulka 6 Vliv umístění etáže a barvy světla na mikrobiální kontaminaci vaječné skořápky (pokus 1)

Etáž	Barva světla	log ktj/skořápka		
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus</i>	Celkový počet mikroorganismů
horní	modrá	5,08 ^{ab}	2,45 ^c	4,91
	zelená	4,88 ^b	4,02 ^{abc}	5,90
	červená	4,85 ^b	4,07 ^{abc}	5,58
	žlutá	3,30 ^c	3,01 ^c	5,39
střední	modrá	5,90 ^{ab}	5,02 ^{ab}	6,14
	zelená	5,44 ^{ab}	4,72 ^{ab}	5,94
	červená	5,76 ^{ab}	4,96 ^{ab}	6,04
	žlutá	6,06 ^a	5,26 ^a	6,61
dolní	modrá	5,77 ^{ab}	5,01 ^{ab}	6,25
	zelená	5,47 ^{ab}	4,84 ^b	6,03
	červená	4,74 ^b	3,38 ^c	6,00
	žlutá	5,72 ^{ab}	5,07 ^{ab}	6,06
SEM		1,18	1,27	0,76
Průkaznost				
etáž		< 0,001	< 0,001	< 0,001
barva světla		NS	NS	NS
etáž x barva světla		0,042	0,019	NS

^{a-c} číslo ve stejném sloupci označené jiným písmenem než předchozí se průkazně liší

ktj kolonie tvořící jednotku

NS neprůkazný

6.2 Pokus 2

V pokusu 2 bylo cílem porovnat vliv systému ustájení a různé hladiny vápníku v krmné směsi na produkční ukazatele, fyzikální ukazatele vajec, jejich mikrobiální kontaminaci a na velikost mikrobiální penetrace do vaječného obsahu vajec v průběhu skladování.

6.2.1 Produkční ukazatele a ukazatele kvality skořápky

Vliv systému ustájení a obsahu vápníku na počet snesených vajec na počáteční stav, denní spotřebu krmiva, hmotnost vejce a jednotlivé charakteristiky kvality skořápky uvádí tabulka 7. Průkazně nejvyšší ($P < 0,001$) počet snesených vajec byl zjištěn u slepic ustájených v konvenční kleci, naproti tomu nejnižší snáška byla u slepic z voliéry. Produkce vajec u nosnic ustájených v alternativních systémech je obecně nižší oproti klecovým systémům. S tím se shoduje i řada autorů (Tauson et al., 1999; Vits et al., 2005; Hulzebosch 2006; Voslářová et al., 2006; Gerzilov et al., 2012). Obsah vápníku v krmné směsi v rámci tohoto pokusu snášku neovlivnil. Podobné výsledky zaznamenali i Castillo et al. (2004) a Cufadar et al. (2011). Naproti tomu Narváez-Solarte et al. (2006) zjistili zvyšující se vaječnou produkci s roztoucím obsahem vápníku v krmivu (při 2,6 % vápníku 77,59 %; při 4,2 % vápníku 80,06 %). Také Safaa et al. (2008) pozorovali průkazně vyšší produkci vajec u slepic krmených 4 % vápníku (74,9 %) ve srovnání s 3,5 % (71,2 %). Vliv obsahu vápníku na vaječnou produkci potvrzuje i Valkonen et al. (2010). Rovněž Bar et al. (2002) udávají zvyšující se vaječnou produkci s rostoucí dávkou vápníku, kde při množství vápníku 24 g/kg byla vaječná produkce 0,79 vajec/slepici/den a při 36 a 49 g/kg se produkce zvýšila na 0,85 a 0,86 vajec/slepici/den. Lichovnicková a Zeman (2008) se domnívají, že vzhledem k tomu, že systém ustájení ovlivňuje produkci vajec, měly by být v různých systémech i různé požadavky na živiny, včetně vápníku. Vits et al. (2005) ve své studii konstatuje, že slepice, které snesou vyšší počet vajec, mohou mít k dispozici méně vápníku pro formování skořápky, a to by následně mohlo vést ke zhoršení její kvality.

Dále je zřejmé, že denní spotřeba krmiva byla ovlivněna pouze systémem ustájení. Průkazně nejvyšší ($P < 0,001$) byla zjištěna u slepic ustájených ve voliéře ve srovnání s klecí a podestýlkou. Tauson et al. (1999) ve své studii, kde porovnávali dva nosné hybridy a tři systémy ustájení, detekovali nejvyšší spotřebu krmiva u slepic z podestýlky a následně z voliéry ve srovnání s klecí, kde byla spotřeba průkazně nejnižší. Ahammed et al. (2014)

shodně uvádějí vyšší spotřebu krmiva ve voliére a na podestýlce v porovnání s konvenční klecí, což jak dodávají, je zapříčiněno vyšší aktivitou nosnic v těchto systémech. Narváez-Solarte et al. (2006) navíc u toho ukazatele zjistili také vliv obsahu vápníku v krmné směsi, kdy se zvyšujícím se obsahem vápníku se denní spotřeba postupně snižovala (z 115,55 g/slepice/den při 2,60 % vápníku na 112,14 g/slepice/den při 4,20 % vápníku). S tím souhlasí i práce Castillo et al. (2004). Lichovníková a Zeman (2008) konstatují, že příjem krmiva byl v jejich studii průkazně vyšší v neobohacené kleci ve srovnání s klecí obohacenou. V důsledku toho byl také i příjem vápníku významně vyšší.

U hmotnosti vejce byla nalezena signifikantní interakce ($P < 0,002$) mezi systémem ustájení a obsahem vápníku. Nejtěžší vejce byla snesena nosnicemi ve voliére a krmenými směsí se 3 % vápníku (62,2 g) a vejce na podestýlce ve skupině se 3,5 % vápníku (62,1 g), zatímco nejlehčí bylo v konvenční kleci se 3 % vápníku (60,4 g). Hmotnost vejce byla průkazně ($P < 0,002$) ovlivněna systémem ustájení s nejvyššími hodnotami u vajec z podestýlky. To je v souladu s prací Tůmová a Ebeid (2005), kteří zaznamenali vyšší hmotnost vajec z podestýlky oproti konvenční kleci. Na druhou stranu Lewko a Gornowicz (2011) detekovali nejvyšší hmotnost vejce v obohacené kleci. Gerzilov et al. (2012) pozorovali nejtěžší vejce v obohacené kleci (58,10 g), následně u konvenčních klecí (56,42 g) a nakonec na podestýlce (55,5 g). Obsah vápníku v krmné směsi v tomto pokusu neovlivnil hmotnost vejce. Podobně i Narváez-Solarte et al. (2006) ve své práci sledovali, zdali má obsah vápníku v krmivu pro nosnice vliv na hmotnost vajec. Z výsledků však vyplývá, že tento efekt nebyl nalezen. Naproti tomu průkazný rozdíl v hmotnosti vejce při různé hladině vápníku v krmivu byl zaznamenán v práci Bar et al. (2002), kde vyšší hmotnost (66,6 g) byla detekována u vajec při dávce 35 g/kg oproti 48 g/kg (65,5 g).

Jak je dále patrná u pevnosti skořápky ($P < 0,001$), podílu skořápky ($P < 0,001$) a hmotnosti skořápky ($P \leq 0,002$) průkazná interakce mezi systémem ustájení a obsahem vápníku. Nejpevnější skořápku měla vejce z klece, a to při 3,5 % vápníku v krmné směsi (4893 g/cm^2) a při stejné hladině vápníku také vejce z voliéry (4799 g/cm^2). Podobně byl podíl skořápky průkazně nejvyšší u vajec z klece při 3,5 % vápníku v krmivu (12,3 %). Hmotnost skořápky byla ve všech systémech ustájení relativně vyrovnaná, avšak signifikantně nejlehčí skořápka byla v kleci ve skupině se 3 % vápníku v krmivu (6 g), což odhalila průkazná interakce systému ustájení a vápníku. Pevnost a podíl skořápky byly signifikantně ($P < 0,001$) ovlivněny také systémem ustájení, kde vejce z klecí dosáhla vyšší kvality ve srovnání s ostatními systémy. Podobné výsledky našli také Pištěková et al. (2006), kteří porovnávali klec s podestýlkou. Rovněž i ve studii Lichovníkové a Zemana (2008)

zjistili vyšší pevnost skořápky u vajec z klecí oproti podlahovému systému nebo Englmaierová et al. (2014) ve srovnání s podestýlkou či voliérou. Na pevnost a podíl skořápky měl průkazný vliv také obsah vápníku v krmivu s vyššími hodnotami ve 3,5 % vápníku v kleci a ve voliére a korespondují s prací Safaa et al. (2008), kteří ve své studii uvádějí, že při zvýšené dávce vápníku (3 % vs. 4 %) byl detekován průkazně vyšší podíl skořápky (9,98 % vs. 10,20 %). Naproti tomu Cufadar et al. (2011) vliv obsahu vápníku na kvalitu skořápky nezjistili. Podle výsledků studie Lichovnickové a Zemana (2008) byl vápník v klecových systémech ustájení efektivněji využit pro produkci skořápky a její kvalitu ve srovnání s podlahovými systémy. Autoři uvádějí, že nejvyšší požadavky na obsah vápníku v krmné směsi byly u slepic z neobohacených klecí. To bylo zapříčiněno vyšší produkcí skořápky v tomto typu ustájení, a také proto, že kvalita skořápky zde byla nejvyšší. To je v souladu i s našimi výsledky, kde vyšší počet snesených vajec byl právě v klecovém systému, z čehož vyplývá i vyšší produkce skořápky. Dále byla v tomto typu ustájení vyšší pevnost a podíl skořápky. Lichovnicková a Zeman (2008) se domnívají, že při stanovení správného množství vápníku v krmné směsi pro nosnice je důležité brát v úvahu i systém ustájení, a že i přes podobný příjem vápníku u slepic v obohacených klecích a podlahových systémech, byl do vaječných skořápek vajec z podlahového systému uložen nižší podíl vápníku. Naproti tomu dále uvádějí, že byla u těchto nosnic detekována vyšší pevnost holenní kosti, což může pravděpodobně souviset s nižší produkcí skořápky. To koresponduje s Leyendecker et al. (2001), kteří uvádějí, že mezi pevností skořápky a pevností kostí je negativní korelace. Nosnice potřebuje pro udržení kvality skořápky denně přijmout cca 4 g vápníku. Pro samotnou tvorbu skořápky pak spotřebuje v průměru 2 g (Gilbert, 1983). Nejdůležitějším zdrojem vápníku pro tvorbu skořápky, která probíhá zejména odpoledne a v noci, je především střešní absorpce, při které je využitelnost vápníku zhruba 72 %. Zbylý vápník je pro potřebu tvorby skořápky získáván resorpcí z medulárních kostí (Clunies a Leeson, 1994).

6.2.2 Mikrobiální kontaminace skořápky a její změny během skladování

V rámci pokusu 2 bylo sledováno množství mikroorganismů na povrchu vejce ve dvou různých systémech ustájení a během různé doby skladování (tabulka 8). Je patrné, že průkazná interakce ($P < 0,008$) mezi systémem ustájení a dobou skladování byla zjištěna u celkového počtu mikroorganismů. Nejvyšší kontaminace skořápky byla detekována u

čerstvých vajec z podestýlky (7,15 log ktj/skořápka) naopak nejnižší hodnoty byly u vajec snesených v klecích po 7 dnech skladování (3,67 log ktj/skořápka). Systém ustájení měl signifikantní ($P < 0,001$) vliv na množství bakterií rodu *Enterococcus* a na celkový počet mikroorganismů. V obou případech byly výrazně vyšší hodnoty u vajec z podestýlky. Literatura se shoduje na tom, že z hlediska čistoty vajec je nejvýhodnějším ustájením klec (Abrahamsson a Tauson, 1995; De Reu et al., 2005a; Sekeroglu et al., 2008; Vučemilo et al., 2010). S tím pravděpodobně souvisí i vyšší kontaminace vajec mikroorganismy v méně intenzivních systémech ustájení, což ve svých studiích pozorovali De Reu et al. (2005a; 2006a; 2007) a Singh et al. (2009). Bylo zjištěno, že u podlahového systému ustájení je 10 krát více bakterií ve vzduchu a 20 až 30 krát více bakterií na skořápce vajec ve srovnání s klecovými systémy (De Reu et al, 2005a). Slepice, které mají v alternativních systémech umožněn volný pohyb, víří prach z podestýlky, který obsahuje řadu mikroorganismů a endotoxinů, a ty pak ulpívají na povrchu skořápky (Hartung, 1994; Wathes, 1994). Fiks-van Niekerk (2005) poukázal na vysokou kontaminaci skořápky v alternativním systému, stejně jako na pozitivní korelace mezi celkovým množstvím bakterií ve vzduchu hal.

S dobou skladování se mikrobiální kontaminace vajec v obou systémech ustájení průkazně ($P < 0,008$) snižovala pouze u celkového počtu mikroorganismů, neprůkazný pokles byl však patrný i u ostatních sledovaných bakterií. Podobné výsledky zjistili také De Reu et al. (2005b) ve své práci, kde sledovali vliv doby skladování při pokojové teplotě na počet gramnegativních bakterií na povrchu skořápky u vajec po 14 dnech skladování zjistili, že se počet mikroorganismů významně snižoval, a to ze 4,04 log ktj/skořápka na 3,23 log ktj/skořápka.

6.2.3 Penetrace mikroorganismů do vejce

Výsledky penetrace mikroorganismů do vaječného obsahu u vajec snesených nosnicemi ustájenými v kleci a na podestýlce a krmenými dvěma různými obsahy vápníku, jsou uvedeny v tabulce 9. Z uvedených výsledků je patrné, že výrazně vyšší penetrace *Escherichia coli* a celkového množství mikroorganismů na podskořápečné blány byla u vajec z podestýlky oproti kleci, a to ve všech dnech skladování. Podobné výsledky byly zaznamenány i u enterokoků, zde však hodnoty nebyly tak vysoké. Penetrace enterokoků do vaječného bílku nebyla zaznamenána vůbec. Messens et al. (2005b) a De Reu et al. (2006a) uvádějí, že riziko mikrobiální penetrace je přímo úměrné počtu mikroorganismů na povrchu skořápky. To je v souladu s výsledky uvedenými v tabulce 8, kde výrazně vyšší mikrobiální

kontaminace povrchu byla u vajec z podestýlky oproti klecím. Jedná-li se o vliv doby skladování, po 2 dnech *Escherichia coli* nejvíce penetrovala na podskořápečné blány a naopak 7. den nejméně. Penetrace enterokoků na podskořápečné blány byla nejvyšší 7. den skladování. Průnik celkového počtu mikroorganismů na podskořápečné blány nebyl dobou skladování nijak významně ovlivněn. Podobně Radkowski (2002) nezaznamenali průnik *Salmonella Enteritidis* ani po 21 dnech skladování bez ohledu na skladovací teplotu a relativní vlhkost.

Také obsah vápníku ovlivnil penetraci mikroorganismů. Po 2. a 7. dne skladování byla u vajec z podestýlky ze skupiny s 3,5 % vápníku v krmné směsi zaznamenána vyšší penetrace na podskořápečné blány u všech sledovaných mikroorganismů oproti 3 % vápníku. 14. den skladování tomu však bylo naopak. To by mohlo souviset s pevností skořápky u vajec z podestýlky při 3,5 % vápníku. Je tedy možné se domnívat, že rozdílná pevnost, a tím pravděpodobně pozměněná i struktura skořápky, mohou mít vliv na velikost penetrace přes vaječnou skořápku do vaječného obsahu. Tento vztah však popisují dřívější studie (Orel, 1959; Sauter a Petersen, 1974) kde zaznamenali, že vejce s nízkou měrnou hmotností, vykazovala vyšší penetraci salmonely. Na druhou stranu Kraft et al. (1958), Williams et al. (1968), Smeltzer et al. (1979), Messens et al. (2005b) a De Reu et al. (2006a) nenašli vliv tloušťky skořápky na schopnost bakterií penetrovat do vaječného obsahu.

6.2.4 Změny v technologické hodnotě vajec v průběhu skladování

6.2.4.1 Hmotnost a index tvaru vejce

Hmotnost vejce (tabulka 10) byla průkazně ($P < 0,001$) ovlivněna systémem ustájení. Těžší vejce byla zaznamenána u vajec z podestýlky ve srovnání s klecemi. Výsledky tak kopírují hodnoty z první části pokusu. Na druhou stranu v literatuře jsou výsledky hmotnosti vajec ve vztahu k systému ustájení značně variabilní. V klecovém systému ustájení našli Moorthy et al. (2000), Leyendecker et al. (2001), Jenderal et al. (2004), Dukić - Stojčić et al. (2009) a Lewko a Gornowicz (2011) vyšší hmotnost, naopak Ledvinka et al. (2004), Tůmová a Ebeid (2005) a Pištěková et al. (2006) konstatují, že těžší vejce byla snesena na podestýlce. Je tedy pravděpodobné, že tyto rozdíly mohou být ovlivněny celou řadou dalších vlivů, jako je třeba rozdílný genotyp či intenzita snášky. Co se týče doby skladování, ta signifikantně ($P < 0,001$) snížila hmotnost vejce. Ztráta hmotnosti během skladování je zapříčiněna

plynulým odpařování obsahu vejce přes vaječné obaly. Její rozsah je pak ovlivněn podmínkami během skladování, a to zejména teplotou a relativní vlhkostí. Vliv doby skladování popisuje i studie Samliho et al. (2005), kteří zaznamenali průkaznou ztrátu hmotnosti vejce po 10 denním skladování. Podobně tento vliv pozorovali také Nedomová a Simeonovová (2007). Naproti tomu Jin et al. (2011) nenašli během stejné doby skladování při pokojové teplotě průkazné snížení hmotnosti vejce. Jak je dále z výsledků v tabulce 10 zřejmé, hmotnost vejce nebyla průkazně ovlivněna obsahem vápníku v krmné směsi. To koresponduje s i řadou prací (Castillo et al., 2004; Narváez-Solarte et al., 2006; Cufadar et al., 2011), ve kterých také nezaznamenali průkazné rozdíly v hmotnosti vejce při různých hladinách vápníku.

6.2.4.2 Ukazatele kvality bílku

Z ukazatelů kvality bílku byly sledovány Haughovy jednotky, index, podíl a pH bílku (tabulka 11). Ze statistického zhodnocení vyplývá, že u Haughových jednotek a indexu bílku byla nalezena průkazná interakce mezi systémem ustájení, dobou skladování a obsahem vápníku v krmné směsi. Nejvyšší Haughovy jednotky byly společně i s indexem bílku u čerstvých vajec z klece a 3 % vápníku v krmné směsi. Naopak nejnižší byly zjištěny ve stejném typu utájení a při stejném obsahu vápníku v krmivu po 21 dnech skladování. U žádného ze sledovaných ukazatelů kvality bílku nebyl zaznamenán vliv systému ustájení. To je v souladu s výzkumem Wanga et al. (2009) a Englmaierové a Tůmové (2009), kteří také nezaznamenali vliv systému ustájení na kvalitu vaječného bílku. Stejně tak Hidalgo et al. (2008), kteří porovnávali vejce z italských obchodů, shledali podobné hodnoty jak u vajec z volného výběhu, z klece tak i z podestýlky. Singh et al. (2009) ve své studii zjistili vyšší hodnoty výšky bílku u vajec z klecí oproti podestýlce. Možnou příčinu vysvětluje Roberts (2004) tím, že na podestýlce jsou vejce vystavena vyšší koncentraci amoniaku, který ovlivňuje kvalitu bílku. Jones et al. (2014) však našli u výšky bílku a Haughových jednotek signifikantní rozdíly mezi obohacenými a konvenčními klecemi, kde vyšší kvalita bílku byla u vajec snesených v konvenční kleci. Pištěková et al. (2006) uvádějí vyšší podíl a hmotnost bílku u vajec z podestýlky v porovnání s klecemi. Haughovy jednotky byly průkazně ($P < 0,001$) ovlivněny i dobou skladování. Tento ukazatel kvality bílku je považován za jeden z nejdůležitějších a za relativně snadno měřitelné kritérium kvality a stáří vajec. Za čerstvá vejce nejvyšší jakosti se považují vejce s hodnotou Haughových jednotek kolem 80, u starších

vajec se kvalita snižuje (Caner, 2005; Yüceer a Caner, 2014). Jak je patrné z výsledků, s dobou skladování se Haughovy jednotky výrazně snižovaly, což je v souladu s prací Canera a Yüceera (2015). Rovněž Jones et al. (2014) zjistili průkazné snížení Haughových jednotek během 12 týdnů z 84,62 na 66,21. Tento pokles jednotek je dále ve shodě i s dalšími studiemi (Caner, 2005; Jones a Musgrove, 2005; Yüceer a Caner, 2014). Obsah vápníku v krmné směsi výšku Haughových jednotek signifikantně neovlivnil. Podobně i Safaa et al. (2008) a Valkonen et al. (2010) ve svých studiích, které se zabývaly porovnáváním dvou hladin vápníku v krmné směsi, nenašli u Haughových jednotek žádné průkazné rozdíly.

Podobně i další z ukazatelů kvality bílku, index bílku, během skladování signifikantně ($P < 0,001$) klesal. Stevens (1996) uvádí, že pokles výšky bílku během postupující doby skladování je zapříčiněn proteolýzou ovomucinu (který má tvar vláken), štěpením disulfidových můstků, interakcí s lysozymem a změnami v interakci mezi α a β ovomucinem. U čerstvých vajec je velká část ovomucinu v bílkovinném vaku. Stářím vejce se z tuhého bílku obsah mucinu ztrácí, což způsobuje zvětšování části řídkého bílku. Rozklad bílkovinného vaku je spojen s rostoucími hodnotami pH a vyvolané zvýšené alkalitě bílku. Při nedostatku oxidu uhličitého je struktura sítě ovomucinových vláken narušená a rozpadá se. Také Akyurek a Okur (2009) sledovali snižování hodnot indexu bílku během 14 denního skladování při pokojové teplotě. Index bílku byl dále průkazně ($P < 0,008$) ovlivněn také obsahem vápníku v krmné směsi s vyššími hodnotami ve skupině se 3 % u čerstvých vajec. Naopak po 21 dnech skladování byly hodnoty u této skupiny nižší než u vajec s 3,5 % vápníku, což pravděpodobně souvisí s průkaznou interakcí ($P < 0,004$) mezi systémem ustájení, dobou skladování a obsahem vápníku v krmné směsi.

Podíl bílku se průkazně snižoval ($P < 0,001$) s dobou skladování a výsledky korespondovaly se Scott a Silversides (2000), kteří pozorovali signifikantní snížení podílu bílku během 10 dnů. Jak uvádí Heath (1977), podíl jednotlivých částí, včetně bílku, úzce souvisí s hmotností vejce. Snížení hmotnosti bílku a tedy i jeho podílu je zapříčiněno přestupem vody a aminokyselin z bílku přes vitelinní membránu žloutku. Působením osmotického tlaku přechází z bílku do žloutku voda. Tento proces započne již při tvorbě vejce ve vejcovodu, pokračuje i po snášce a je tím rychlejší, čím vyšší je teplota prostředí, v němž je vejce uloženo. Tímto přechodem se mění podíl bílku a žloutku (Heath, 1977).

Posledním sledovaným ukazatelem kvality bílku byly hodnoty pH, kterými lze dobře sledovat již malé změny jeho kvality (tabulka 11). Hodnoty pH se s dobou skladování průkazně ($P < 0,001$) zvyšovaly. Zvýšení hodnot pH během skladování uvádějí i Caner a Yüceer (2015), kde čerstvá vejce měla hodnotu 7,5 a po 5 týdnech skladování bylo pH na

hodnotě 9,56. Silversides a Villeneuve (1994) uvádějí, že pH je velmi užitečným prostředkem pro popis změn, které nastávají ve vaječném bílku v průběhu skladování. Nicméně pH bílku není věkem ani genotypem významně ovlivněno, jako tomu je např. u výšky bílku, a proto je tak lepším ukazatelem pro posouzení čerstvosti vejce. Růst těchto hodnot je spojen s pohybem vody mezi bílkem a žloutkem a ztrátou oxidu uhličitého z vejce (Silversides a Scott, 2001). pH bílku bylo průkazně ($P < 0,018$) ovlivněno také obsahem vápníku v krmné směsi. Vyšší hodnoty pH byly detekovány ve skupině nosnic, které byly krmeny směsí se 3 % vápníku.

6.2.4.3 Ukazatele kvality žloutku

Index žloutku se s dobou skladování průkazně ($P < 0,001$) snižoval (tabulka 12). Kirunda a McKee (2000) uvádějí, že pevnost vitelinní membrány žloutku významně souvisí s indexem žloutku i Haughovými jednotkami. Její pevnost a elasticita je velice důležitým aspektem z důvodu kvality vejce. Ta se snižuje se zvyšující se dobou skladování tím, že se zvětšuje objem žloutku pronikáním vody z bílku, a membrána se neustále napíná. Tak může dojít k tomu, že živiny obsažené ve žloutku se mohou stát dostupné pro mikroorganismy, které jsou přítomny v bílku (Messens et al., 2005a). Sekeroglu et al. (2008) ve svých výsledcích konstatují, že ačkoliv index žloutku ukázal během skladování určité kolísání hodnot, byl na jeho konci pozorován obecný pokles (44,2 % 1. den a 41,6 % ve 20 dnech skladování). Caner a Yüceer (2015) ve své současné práci potvrdili postupné snižování indexu žloutku během skladování.

Hodnoty podílu žloutku se signifikantně ($P < 0,001$) s dobou skladování zvyšovaly, a to v rozmezí od 26,4 % - 27,2 % u čerstvých vajec na 29,7 % - 30,6 % u 21 denních vajec. Tento vzestupný trend potvrzuje i práce Scotta a Silversidese (2000).

6.2.5 Shrnutí výsledků pokusu 2

System ustájení a obsah vápníku v krmné směsi ovlivnily zejména hmotnost vejce, pevnost, podíl a hmotnost skořápky, a to prostřednictvím vzájemné průkazné interakce. System ustájení signifikantně ovlivnil počet snesených vajec, denní spotřebu krmiva, hmotnost vajec a některé z ukazatelů kvality skořápky. V konvenční kleci byl snesen vyšší počet vajec v porovnání s podestýlkou a voliérou, ve které byla snáška nejnižší. Naproti tomu vyšší spotřeba krmiva byla ve voliére a těžší vejce byla sledována u nosnic ustájených na

podestýlce. Obsah vápníku v krmné směsi průkazně ovlivnil pouze pevnost a podíl skořápky, s vyššími hodnotami ve skupině ustájené v kleci, což se týče pevnosti tak i ve voliéře a krmenou 3,5 % vápníku.

V rámci mikrobiální analýzy vajec byla zjištěna interakce mezi systémem ustájení a dobou skladování, a to u kontaminace skořápky celkovým počtem mikroorganismů, kde nejsilnější kontaminace byla sledována u čerstvých vajec z výběhu, naproti tomu nejnižší po 14 dnech skladování u vajec z konvenční klece. Průkazně vyšší mikrobiální znečištění *Escherichia coli* a celkovým počtem mikroorganismů v rámci systému ustájení bylo u vajec z podestýlky. V průběhu skladování se signifikantně snižoval celkový počet mikroorganismů.

Vyšší penetrace *Escherichia coli* a celkového počtu mikroorganismů na podskořápečné blány byla zaznamenána u vajec z podestýlky, což korespondovalo s výrazně vyšší kontaminací povrchu vejce v tomto ustájení. V průběhu skladování *Escherichia coli* na podskořápečné blány penetrovala nejvíce po dvou dnech, zatímco enterokoky 7. den. Do vaječného bílku pak penetrovalo menší množství *Escherichia coli* a celkového počtu mikroorganismů ve srovnání s podskořápečnými blanami a což se týče enterokoků, ty do vaječného bílku nepronikly vůbec. Vliv obsahu vápníku v krmivu na velikost penetrace byl patrný v průběhu skladování, a to během 2. a 7. dne, kdy byla u vajec z podestýlky ze skupiny krmené 3,5 % vápníku výrazně vyšší penetrace na podskořápečné blány, a to u všech sledovaných mikroorganismů.

Co se týče vlivu systému ustájení, doby skladování a obsahu vápníku v krmné směsi na kvalitu vajec, byla zde pozorována průkazná interakce, a to u Haughových jednotek a indexu bílku. Systém ustájení ovlivnil pouze hmotnost vejce, index tvaru vejce a barvu žloutku. V průběhu skladování se průkazně změnila hmotnost vejce, která se snižovala a také všechny ukazatele kvality bílku a žloutku, na jejichž základě docházelo ke zhoršení kvality vajec. Vliv různé hladiny vápníku v krmné směsi byl patrný u indexu tvaru vejce, indexu bílku a pH bílku.

Tabulka 7 Vliv systému ustájení a obsahu vápníku v krmné směsi na produkční ukazatele a kvalitu skořápky (pokus 2)

Ukazatel	Ca (%)	Systém ustájení			Průkaznost		
		klec	podestýlka	voliéra	systém ustájení	Ca	ustájení x Ca
Počet snesených vajec na počáteční stav	3,0	211,3	195,3	182,3	<0,001	NS	NS
	3,5	216,3	200,6	181,5			
Denní spotřeba krmiva (g/slepici)	3,0	114	144	150	<0,001	NS	NS
	3,5	115	146	150			
Hmotnost vejce (g)	3,0	60,4 ^d	61,1 ^{bcd}	62,2 ^{ab}	0,002	NS	0,002
	3,5	60,7 ^{cd}	62,1 ^{ab}	60,6 ^{cd}			
Tloušťka skořápky (mm)	3,0	0,431	0,363	0,365	NS	NS	NS
	3,5	0,370	0,359	0,367			
Pevnost skořápky (g/cm ²)	3,0	4651 ^b	4638 ^b	4606 ^b	<0,001	0,001	<0,001
	3,5	4893 ^a	4563 ^b	4799 ^a			
Podíl skořápky (%)	3,0	12,2 ^{ab}	12,1 ^b	11,6 ^d	<0,001	0,022	<0,001
	3,5	12,3 ^a	11,8 ^c	12,2 ^{ab}			
Hmotnost skořápky (g)	3,0	6,0 ^b	6,2 ^a	6,2 ^a	NS	NS	0,002
	3,5	6,2 ^a	6,1 ^{ab}	6,2 ^a			

^{a-d} číslo na stejném řádku označené jiným písmenem než předchozí se průkazně liší

NS neprůkazný

Tabulka 8 Mikrobiální kontaminace vaječné skořápky v klecích a na podestýlce v průběhu skladování (pokus 2)

Systém ustájení	Doba skladování (dny)	log (ktj/skořápka)		
		EC	ENT	CPM
Klec	0	3,91	2,99	4,88 ^c
	2	3,68	2,82	4,09 ^c
	7	3,00	1,72	3,67 ^c
	14	2,64	1,85	3,71 ^c
Podestýlka	0	7,05	5,34	7,15 ^a
	2	6,27	5,08	6,89 ^b
	7	5,51	4,80	6,13 ^c
	14	5,73	4,92	6,49 ^{bc}
Průkaznost				
systém ustájení		NS	< 0,001	< 0,001
doba skladování		NS	NS	0,007
systém ustájení x doba skladování		NS	NS	0,008

^{a-c} číslo ve stejném sloupci označené jiným písmenem než předchozí se průkazně liší

EC *Escherichia coli*; ENT *Enterococcus*; CPM celkový počet mikroorganismů

ktj kolonie tvořící jednotku

NS neprůkazný

Tabulka 9 Vliv systému ustájení, doby skladování a obsahu vápníku v krmné směsi na penetraci mikroorganismů do vaječného obsahu (pokus 2)

den skladování	systém ustájení + Ca (%)	penetrace (%)					
		Podskořápečná blána			Bílek		
		EC	ENT	CPM	EC	ENT	CPM
2. den	klec + 3 %	4,84	-	1,61	3,23	-	4,84
	klec + 3,5 %	1,61	-	1,61	1,61	-	1,61
	podestýlka + 3 %	4,84	-	9,68	4,84	-	-
	podestýlka + 3,5 %	6,45	1,61	11,29	-	-	-
7. den	klec + 3 %	-	1,39	1,39	1,39	-	1,39
	klec + 3,5 %	-	1,39	1,39	-	-	1,39
	podestýlka + 3 %	-	2,78	1,39	1,39	-	1,39
	podestýlka + 3,5 %	1,39	4,17	6,94	1,39	-	-
14. den	klec + 3 %	1,82	-	5,45	3,64	-	1,82
	klec + 3,5 %	-	-	3,64	-	-	1,82
	podestýlka + 3 %	3,64	1,82	10,91	1,82	-	-
	podestýlka + 3,5 %	1,82	-	1,82	-	-	1,82

EC *Escherichia coli*; ENT *Enterococcus*; CPM celkový počet mikroorganismů

Tabulka 10 Vliv systému ustájení, doby skladování a obsahu vápníku v krmné směsi na hmotnost vejce a index tvaru vejce (pokus 2)

Ukazatel	DS (den)	Systém ustájení				Průkaznost			
		klec		podestýlka		U	DS	Ca	U x DS x Ca
		3	3,5	3	3,5				
hmotnost vejce (g)	0.	63,7	62,8	64,3	64,7	< 0,001	< 0,001	NS	NS
	7.	61,5	61,7	64,1	63				
	14.	61,4	60,9	63,9	63,4				
	21.	60,8	59,3	61	61,3				
index tvaru vejce (%)	0.	75,7	76,5	77,6	78,5	< 0,001	NS	0,039	NS
	7.	76,3	77,2	78,4	78,2				
	14.	76,5	76,4	78,1	77,2				
	21.	76,8	77,4	77,3	78,8				

U systém ustájení; DS doba skladování

NS neprůkazný

Tabulka 11 Vliv systému ustájení, doby skladování a obsahu vápníku v krmné směsi na ukazatele kvality bílku (pokus 2)

Ukazatel	DS (den)	Systém ustájení				Průkaznost			
		klec		podestýlka		U	DS	Ca	U x DS x Ca
		3	3,5	3	3,5				
Haughovy jednotky	0.	89,5 ^a	80,5 ^b	87,2 ^a	87,1 ^a	NS	< 0,001	NS	0,031
	7.	61,4 ^c	57,7 ^c	59,5 ^c	60,2 ^c				
	14.	47,5 ^{de}	45,4 ^e	50,4 ^d	45,5 ^e				
	21.	41,9 ^e	46,4 ^{de}	42,2 ^e	46,0 ^e				
index bílku (%)	0.	10,55 ^a	8,49 ^b	10,05 ^a	9,93 ^a	NS	< 0,001	0,008	0,004
	7.	4,63 ^c	4,17 ^c	4,39 ^c	4,45 ^c				
	14.	3,10 ^{de}	3,00 ^{de}	3,50 ^d	3,06 ^{de}				
	21.	2,64 ^e	2,91 ^{de}	2,68 ^e	3,03 ^{de}				
podíl bílku (%)	0.	60,4	60,7	62	61,3	NS	< 0,001	NS	NS
	7.	60	59,2	59	59,3				
	14.	58,9	58,9	59,6	59,1				
	21.	57,7	58,4	58,4	58,1				
pH bílku	0.	8,36	8,31	8,35	8,30	NS	< 0,001	0,018	NS
	7.	9,24	9,20	9,21	9,20				
	14.	9,32	9,28	9,29	9,28				
	21.	9,29	9,29	9,27	9,26				

^{a-e} číslo ve stejném sloupci označené jiným písmenem než předchozí se průkazně liší

U systém ustájení; DS doba skladování

NS neprůkazný

Tabulka 12 Vliv systému ustájení, doby skladování a obsahu vápníku v krmné směsi ukazatele kvality žloutku (pokus 2)

Ukazatel	DS (den)	Systém ustájení				Průkaznost			
		klec		podestýlka		U	DS	Ca	U x DS x Ca
		3	3,5	3	3,5				
index žloutku (%)	0.	45,2	43,3	43,7	43,2	NS	< 0,001	NS	NS
	7.	37,9	38	38,3	39,6				
	14.	31,4	30,6	30,9	31,3				
	21.	25,6	25,7	26,5	26,4				
podíl žloutku (%)	0.	27,2	27,2	26,4	27	NS	< 0,001	NS	NS
	7.	28,4	29,4	29,3	29,3				
	14.	29,9	29,3	28,7	29,6				
	21.	30,6	29,7	29,8	30,2				
barva žloutku	0.	6,0	5,8	5,9	6,0	0,050	< 0,001	NS	NS
	7.	5,2	5,3	5,1	5,1				
	14.	5,3	5,5	5,3	5,2				
	21.	5,6	5,5	5,2	5,2				

U systém ustájení; DS doba skladování

NS neprůkazný

6.3 Pokus 3

Cílem třetího pokusu bylo sledovat vliv systému ustájení na kvalitu vaječné skořápky, její mikrobiální kontaminaci a následně penetraci do vaječného obsahu, na technologickou hodnotu vajec a na obsah bílkovin ve vaječném bílku v průběhu skladování.

6.3.1 Kvalita skořápky

6.3.1.1 Technologické ukazatele kvality skořápky

Tabulka 13 dokumentuje kvalitativní parametry skořápky u vajec z obohacených klecí a výběhu. Je patrné, že většina ukazatelů, s výjimkou povrchu skořápky, byla vysoce průkazně ovlivněna systémem ustájení. Lepší kvalita skořápky z pohledu těchto ukazatelů byla u vajec snesených v obohacené kleci. V pokusu 2 byly z ukazatelů skořápky systémem ustájení průkazně ovlivněny pouze pevnost a podíl skořápky, s vyššími hodnotami v konvenční kleci ve srovnání s podestýlkou a voliérou. Z výsledků je tedy zřejmé, že v obou pokusech byla vyšší kvalita skořápky shodně detekována v klecích, a to jak v obohacených tak i neobohacených ve srovnání s alternativními typy ustájení. Vliv systému ustájení na kvalitu skořápky, zejména na tloušťku a pevnost skořápky, popisuje i řada autorů. Silnější skořápku u vajec z obohacené klece zaznamenali Lewko a Gornowicz (2011), z konvenční klece pak Lichovníková a Zeman (2008). Naproti tomu Layendecker (2001) a Hidalgo et al. (2008) našli vyšší hodnoty tloušťky skořápky u vajec z výběhu, Pavlovski et al. (2001), Englmaierová a Tůmová (2009) a Ledvinka et al. (2012) na podestýlce. Co se týče pevnosti skořápky, vyšší hodnoty v konvenčních klecových systémech pozorovali Lichovníková a Zeman (2008) a Ledvinka et al. (2012). Mostert et al. (1995) a Leyendecker et al. (2001) naopak detekovali pevnější skořápku ve výběhu. Pištěková et al. (2006) a Klecker et al. (2004) však významný vliv systému ustájení na pevnost skořápky nenašli. Guesdon a Faure (2004) porovnávali obohacený a neobohacený klecový systém a v pevnosti skořápky nenašli signifikantní rozdíly. Rozdílné výsledky v kvalitě skořápky v závislosti na systému ustájení uváděnými v literatuře pravděpodobně souvisí s podmínkami pokusů a použitými hybridy.

6.3.1.2 Pórovitost skořápky

V rámci pokusu 3 byl u vaječné skořápky stanovován také počet pórů, a to v různých oblastech skořápky (tabulka 14). Jak naznačují výsledky, z hlediska různých částí byla nejmenší hustota pórů zjištěna na ostrém konci, naopak nejvíc pórů bylo zaznamenáno na tupém konci vejce. Větší množství pórů v oblasti rovníku a na tupém konci vejce našel také Musgrove (2004). V souladu s těmito výsledky je i práce Messens et al. (2005b). U vajec z výběhu byl významně ($P < 0,001$) vyšší počet pórů ve skořápce, a to jak na tupém konci, tak i v ekvatoriální rovině. To je v souladu s výsledky Messense et al. (2005b), kteří našli větší množství pórů na tupém konci vejce. Podobně také Englmaierová a Tůmová (2009) zaznamenaly vyšší pórovitost na tupém konci a v ekvatoriální rovině u vajec z alternativního typu ustájení, podestýlky. Tůmová et al. (2011) zjistili vyšší hustotu pórů v ekvatoriální rovině u vajec z podestýlky ve srovnání s klecí. Možné vysvětlení těchto rozdílů nabízí studie Lichovnickové a Zemana (2008), ve které popisují, že obsah vápníku ve vaječné skořápce a příjem vápníku byl vyšší v klecích oproti podestýlce. Strukturální rozdíly v utváření skořápky v závislosti na systému ustájení pak mohou mít za následek i odlišnou hustotu pórů u vajec z klecí a z podestýlky. Z výsledků je tedy možné se domnívat, že počet pórů na vaječné skořápce, může ovlivnit velikost penetrace mikroorganismů na podskořápečnou blánu a do bílku. Již v dřívějších studiích Fromma a Monroe (1960) a Boarda a Hallse (1973) jsou udávány korelace mezi pórovitostí a penetrací bakterií. Nascimento et al. (1992) však vztah mezi pórovitostí a penetrací salmonely nenašli. Stejně tak De Reu et al. (2006a) neuvádějí korelaci mezi počtem pórů a penetrací *Salmonella* Enteritidis přes vaječnou skořápku. Naproti tomu ve studii Messense et al. (2005b), kde sledovali velikost penetrace *Salmonella* Enteritidis v různých oblastech vaječné skořápky, zjistili vyšší průnik těchto bakterií na tupém konci vejce, kde byl zjištěn také i vyšší počet pórů.

6.3.2 Mikrobiální kontaminace skořápky

6.3.2.1 Mikrobiální kontaminace čerstvých vajec

V tabulce 15 je uvedena velikost bakteriální kontaminace povrchu vaječné skořápky čerstvých vajec v závislosti na systému ustájení. Z uvedených výsledků je zřejmé, že množství *Escherichia coli* a celkového počtu mikroorganismů bylo průkazně ($P < 0,001$) vyšší u vajec z výběhu v porovnání s obohacenou klecí. V pokusu 2, kde byla porovnávána

konvenční klec a podestýlka, byl u enterokoků a u celkového počtu mikroorganismů zjištěn významný vliv systému ustájení, kde u vajec z podestýlky byla zaznamenána vyšší mikrobiální kontaminace povrchu skořápky. Výsledky z obou pokusů tak shodně naznačují, že vejce snesená v alternativních systémech ustájení mají vyšší mikrobiální kontaminaci. To koresponduje s výsledky De Reua et al. (2005a); Singha et al. (2009) a Huneau-Salaüna et al. (2010), kteří také detekovali vyšší kontaminaci povrchu skořápky u vajec z alternativních typů ustájení. Stejně tak v současné studii Parisiho et al. (2015) našli vyšší mikrobiální kontaminaci u celkového počtu aerobních bakterií, enterobakterií a *Campylobacter* na povrchu vajec z podestýlky ve srovnání s bateriovými klecemi. Výsledky v tomto pokusu jsou v souladu i s prací Belkot a Gondek (2014), kteří porovnávali mikrobiální kontaminaci vajec ze 4 různých systémů ustájení. Z jejich výsledků je patrné, že nejnižší množství aerobních bakterií bylo naměřeno v klecovém systému ve srovnání s podestýlkou, výběhem a ekologickým chovem. I v případě rodů *Enterococcus* a *Staphylococcus* našli autoři nižší kontaminaci u vajec z klecí, oproti alternativním způsobům ustájení, kde byly hodnoty 2 – 3 krát vyšší. To je zapříčiněno zejména vyšší koncentrací bakterií ve vzduchu hal způsobené volným pohybem slepic, které vyřítí prach z podestýlky (De Reu et al., 2005a). Další příčinou může být krmivo, které ovlivňuje vlhkost trusu, což následně vede k vyšší míře trusem kontaminovaných vajec, ale i ke zvýšené mikrobiální kontaminaci zdánlivě čistých vajec (Smith et al., 2000).

6.3.2.2 Mikrobiální kontaminace v průběhu skladování

Výsledky prezentující mikrobiální kontaminaci vaječné skořápky během skladování u vajec z různých systémů ustájení jsou uvedeny v tabulce 16. Průkazná interakce mezi systémem ustájení a dobou skladování byla nalezena u všech sledovaných mikroorganismů ($P < 0,016$ pro *Escherichia coli*, $P < 0,007$ pro rod *Enterococcus* a celkový počet mikroorganismů). Nejvyšší počet *Escherichia coli* a celkového počtu mikroorganismů byl detekován u čerstvých vajec z výběhu, zatímco nejnižší kontaminace byla u vajec z klecového systému po 21 dnech skladování. Signifikantně nejvyšší množství enterokoků bylo současně zjištěno u vajec z výběhu v den sběru a 2. den skladování, naopak nejnižší v obohacené kleci po 21 dnech skladování. Zcela patrný je zde rozdíl v úrovni mikrobiální kontaminace v rámci systémů ustájení. Průkazně ($P < 0,001$) nejnižší množství *Escherichia coli*, *Enterococcus* a celkového množství mikroorganismů na povrchu skořápky bylo u vajec snesených v obohacené kleci ve srovnání s výběhem, kde jsou hodnoty v řádech až o 2 log vyšší. S tím

ostatně koresponduje i řada prací. De Reu et al. (2009) a Hunau-Salaün et al. (2010) zaznamenali vyšší kontaminaci u vajec z neklecových systémů ve srovnání s klecemi. Schwarz et al. (1999) našli 10 krát více bakterií u vajec z výběhu než u vajec z klece. Zjištěná nízká kontaminace vaječné skořápky u vajec z klecí je v souladu i s výsledky De Reu et al. (2005a) a Protais et al. (2003), kteří jej porovnávali s voliéry. Podobně i Singh et al. (2009 z knihy) ve své práci detekovali vyšší množství koliformních bakterií a *Escherichia coli* na vejcích z hnízd v podestýlkovém systému než u vajec z klece. Podobné výsledky byly zaznamenány i v pokusu 2, kde byl detekován signifikantně vyšší počet *Enterococcus* a celkového počtu mikroorganismů na skořápkách vajec z podestýlky v porovnání z konvenčních klecí.

U všech hodnocených mikroorganismů byla kontaminace povrchu vejce dobou skladování průkazně změněna ($P < 0,001$ pro *Escherichia coli* a *Enterococcus*, $P < 0,003$ pro celkový počet mikroorganismů). V pokusu 2 byl signifikantně dobou skladování ovlivněn pouze celkový počet mikroorganismů, kdy se kontaminace v jejím průběhu postupně snižovala, a to jak v konvenční kleci, tak i na podestýlce. Snižování kontaminace bylo, ikdyž neprůkazně, patrné i u ostatních sledovaných druhů. Jak je vidět z výsledků v tabulce 16, u čerstvých vajec z obou systémů ustájení byla mikrobiální kontaminace všech sledovaných mikroorganismů nejvyšší, až na enterokoky, kde tomu tak bylo 2. den skladování. V jejím průběhu se pak hodnoty mikrobiální kontaminace snižovaly až do 21. dne. Výjimkou však byla vejce z výběhu, kde *Enterococcus* a celkový počet mikroorganismů dosahoval nejnižší kontaminace na skořápce už 7. den skladování. Nejintenzivnější pokles kontaminace byl však zaznamenán především v obohacené kleci. U *Escherichia coli* klesly hodnoty po 21 dnech skladování o 1,37 log u *Enterococcus* o 1,45 log. U vajec z výběhu nebylo snížení počtu mikroorganismů během skladování tak intenzivní. S těmito výsledky korespondují i práce De Reu et al. (2005b, 2008), kteří rovněž zaznamenali průkazné snížení celkového počtu aerobních bakterií a gramnegativních bakterií na skořápce během skladování. Je tedy pravděpodobné, že za méně intenzivním snížením kontaminace během skladování u vajec z výběhu, může být především vyšší množství nečistot a reziduí na povrchu skořápky, které mohou sloužit po delší dobu jako dočasný zdroj živin pro mikroorganismy.

6.3.3 Penetrace mikroorganismů do vejce

V rámci tohoto experimentu byl sledován také vliv systému ustájení a doby skladování na penetraci mikroorganismů do vaječného obsahu (tabulka 17). Systém ustájení ani doba skladování průkazně velikost penetrace neovlivnily. Nejnižší penetrace na podskořápečnou blánu byla zjištěna u enterokoků, a to mezi 2. a 14. dnem skladování, zatímco *Escherichia coli* a celkový počet mikroorganismů penetrovaly během celého hodnoceného období bez rozdílu v době skladování. De Reu et al. (2006b) studovali vliv doby skladování na penetraci vybraných druhů bakterií (*Staphylococcus warneri*, *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes* sp., *Serratia marcescens*, *Carnobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. a *Salmonella* Enteritidis) a zjistili, že nejčastěji byla penetrace skořápkou 4. - 5. den skladování. Rozdíl ve velikosti penetrace na podskořápečnou blánu u všech sledovaných mikroorganismů, nebyl mezi obohacenou klecí a výběhem výrazný. Naproti tomu v pokusu 2 byl zaznamenán vyšší průnik *Escherichia coli*, *Enterococcus* a celkového počtu mikroorganismů na podskořápečné blány u vajec z podestýlky ve srovnání s konvenční klecí, a to 2., 7. i 14. den skladování. Také ve studii De Reu et al. (2007) byla zjištěna vyšší penetrace do vaječného obsahu u vajec z alternativního systému (2,3 %) v porovnání s vejci z obohacené klece (1,9 %).

Co se týče kontaminace vaječného bílku, nebyla zjištěna žádná penetrace enterokoků do vajec z obohacené klece. U vajec z výběhu byl průnik *Enterococcus* zaznamenán 2. a 7. den skladování. V experimentu 2 při porovnání konvenční klece a podestýlky, nebyla penetrace enterokoků do vaječného bílku zaznamenána vůbec. *Escherichia coli* a celkový počet mikroorganismů pronikly do vaječného bílku u vajec z výběhu ve větším množství v porovnání s obohacenou klecí. To pravděpodobně koresponduje s průkazně vyšším mikrobiálním znečištěním skořápky a její vyšší pórovitostí u vajec z tohoto systému ustájení (tabulka 14 a 15), které zvyšují pravděpodobnost průniku. Vztah mezi počtem mikroorganismů na povrchu vejce a mírou jejich penetrace do vaječného obsahu naznačuje i řada prací (Chen et al., 1996; Miyamoto et al., 1998; Messens et al., 2006; 2007).

6.3.4 Změny v technologické hodnotě vajec v průběhu skladování

6.3.4.1 Hmotnost vejce a ukazatele kvality bílku

Technologickou hodnotu vajec v různých systémech ustájení v průběhu skladování popisuje tabulka 18. Výsledky změn kvality vajec ukazují, že u čerstvých vajec byla

zaznamenána průkazně ($P < 0,001$) vyšší hmotnost vajec v obohacené kleci oproti výběhu. V porovnání s experimentem 2, kde byla použita konvenční klec s podestýlkou, byla těžší vejce od nosnic ustájených v alternativním systému. V souladu s výsledky tohoto experimentu jsou i studie Moorthy et al. (2000), Leyendecker et al. (2001) a Lewko a Gornowicz (2011), kde také uvádějí těžší vejce v klecích. Naproti tomu Hidalgo et al. (2008), kteří porovnávali čtyři systémy ustájení, zaznamenali nejvyšší hmotnost vejce ve výběhu následovaným ekologickým chovem, klecí a nakonec podestýlkou, kde byla vejce nejlehčí. Také Moorthy et al. (2000) pozorovali vyšší hmotnost vajec snesených ve výběhu. Sekeroglu et al. (2008) porovnávali dva alternativní systémy ustájení, a to podestýlku a výběh. Mezi těmito dvěma systémy však nezaznamenali průkazné rozdíly v hmotnosti vejce. Podobně i Van den Brand et al. (2004) nenašli signifikantní odlišnosti v hmotnosti vajec z klece a z výběhu. V průběhu skladování se hmotnost vajec průkazně ($P < 0,001$) snižovala, a to u obou systémů ustájení, avšak u vajec z podestýlky byl pokles hmotnosti znatelnější, a to o 3,69 g po 21 dnech skladování oproti 2,29 g v obohacené kleci. Signifikantní ($P < 0,001$) úbytek hmotnosti vajec během skladování byl zaznamenán i v pokusu 2, kde průměrná ztráta byla v konvenční kleci 3,20 g a u vajec z podestýlky 3,35 g. Významné snížení hmotnosti během skladování uvedli ve své práci i Scott a Silversides (2000). Canera a Yüceere (2015) zaznamenali snižování hmotnosti během 5 týdenního skladování, kdy ztráta činila 6,71 %. Akyurek a Okur (2009) uvedli ztrátu hmotnosti po 14 dnech skladování při pokojové teplotě 1,97 g.

Z ukazatelů kvality bílku, především pak z Haughových jednotek, indexu a pH bílku, které spolu velice úzce souvisí, je možné nejlépe sledovat průběh změn v kvalitě vajec během skladování. U Haughových jednotek byla zjištěna průkazná ($P < 0,001$) interakce mezi systémem ustájení a dobou skladování. Nejvyšší kvalita vajec z pohledu tohoto ukazatele byla ta čerstvá snesena v obohacených klecích (89,21), zatímco vejce o nejnižší kvalitě byla z výběhu po 21 dnech skladování (53,29). Tento kvalitativní ukazatel byl průkazně ovlivněn systémem ustájení na vysoké hladině významnosti ($P < 0,001$), s vyšší kvalitou v obohacených klecích v porovnání s výběhem. Naproti tomu v pokusu 2 nebyly při porovnání konvenční klece a podestýlky průkazné rozdíly. V průběhu skladování se signifikantně ($P < 0,001$) Haughovy jednotky snižovaly, a to s rozdílem 33,01 v obohacené kleci a 25,83 ve výběhu mezi čerstvými a 21 dnů skladovanými vejci. Z hodnot uvedených v tabulce 18 je patrné, že rychlejší snižování kvality bílku nastalo především u vajec z obohacené klece. Nejintenzivněji hodnoty klesaly především v prvním týdnu skladování a to v obou systémech ustájení. Také v pokusu 2 se hodnoty Haughových jednotek průkazně ($P < 0,001$) s dobou skladování snižovaly, a to z hodnot 80,5 – 89,5 u čerstvých na 41,9 – 46,4 po

21 dnech skladování. Výrazné změny tohoto ukazatele v průběhu skladování uvádějí i Sekeroglu et al. (2008), kde se po 20 dnech snížily z 90 na 67,3. Také Jin et al. (2011) zaznamenali během 10 denního skladování výrazný pokles Haughových jednotek, a to o 18,67. Tyto změny dále shodně popisují i Samli et al. (2005), Ragni et al. (2007), Akyureka a Okura (2009) a Jones et al. (2014). Podobně jako Haughovy jednotky se choval také index tvaru hustého bílku. Průkazná interakce ($P < 0,001$) naznačuje velmi úzký vztah mezi systémem ustájení a dobou skladování a koresponduje s výsledky Haughových jednotek s kterými úzce souvisí. Po 21 dnech skladování se v obohacené kleci index bílku průkazně snížil o 7,45 % a o 4,92 % u vajec z výběhu. Výrazné snížení hodnot indexu bílku bylo detekováno také v experimentu 2, kde hodnoty během 21 denního skladování klesly z 8,5 – 10,6 % na 2,6 – 3 %. Ve studii Sekerogla et al. (2008) zaznamenali pokles indexu bílku z 10,23 % u čerstvého vejce na 4,91 % po 20 dnech skladování. Samli et al. (2005) ve své studii také zjistili změnu kvality bílku prostřednictvím jeho výšky během skladování, a to z 8,56 mm u čerstvých vajec na 6,18 mm u 10 dní skladovaných.

Z tabulky 18 je dále zřejmé, že podíl bílku byl průkazně ovlivněn jak systémem ustájení ($P \leq 0,038$), tak i dobou skladování ($P < 0,001$). Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u vajec z výběhu oproti vejcům z obohacené klece. V průběhu 21 denního skladování se podíl bílku postupně snižoval, a to o 3,36 % v obohacené kleci a o 3,19 % ve výběhu, což koresponduje i s postupně se snižující hmotností vejce. Stejně tak v pokusu 2 bylo zaznamenáno průměrné snížení podílu bílku o 2,95 % po 21 dnech a to na vysoké hladině významnosti ($P < 0,001$). Scott a Silversides (2000) vyjádřili změny v podílu jednotlivých částí vejce přímo jejich hmotností a uvádějí, že hmotnost bílku se během dvoutýdenního skladování snížila o 1,49 g. Silversides a Scott (2001) také sledovali vliv 10 denního skladování na podíl bílku a zaznamenali jeho pokles o 2,21 %. To je v souladu s výsledky práce Englmaierové a Tůmové (2009). Na druhou stranu v práci Jin et al. (2011) se podíl bílku při skladování po 10 dnech průkazně nesnížil. Podobně tomu bylo i ve studii Safaa et al. (2013).

V tomto experimentu bylo v rámci kvality bílku sledováno také pH. Z uvedených výsledků je zřejmé, že byla zjištěna signifikantní ($P < 0,001$) interakce mezi systémem ustájení a dobou skladování podobně, jako u Haughových jednotek a indexu bílku, byl nejkvalitnější bílek u čerstvých vajec v obohacené kleci (8,23), ve srovnání s vejci z výběhu skladovanými po dobu 21 dnů (9,42), kdy měl bílek nejhorší kvalitu. Tento ukazatel, stejně jako ostatní ukazatele kvality bílku, byl průkazně ovlivněn systémem ustájení a dobou skladování ($P < 0,001$). Při 21 denním skladování se hodnoty pH postupně zvyšovaly, a to jak

v kleci (o 1,16), tak i ve výběhu (o 0,52), kde však zvýšení pH nebylo již tak intenzivní. To je ovlivněno již vyššími počátečními hodnotami pH u čerstvých vajec v tomto typu ustájení. Tyto výsledné hodnoty jsou v souladu s pokusem 2, kde pH v průběhu 21 denního skladování vzrostlo v průměru o 0,97. Na podobné výsledky poukázal i Samliho et al. (2005), kde se hodnoty pH bílku zvýšily ze 7,47 u čerstvých vajec na 9,11 po 10 dnech skladování. S tím se ztotožňují i Akyurek a Okur (2009) a Jin et al. (2011). Jak uvádí Scott a Silversides (2000), index bílku a jeho pH spolu úzce souvisí, neboť postupně se uvolňující oxid uhličitý během stárnutí vajec, způsobí sled několika změn ve vejci, které probíhají v těsném sledu. Během nich nastane rozklad bílkovinného vaku, což zapříčiní snížení výšky bílku a zvýšení jeho alkality tedy hodnot pH. Ve své práci autoři zaznamenali zvyšující se negativní korelaci mezi výškou bílku a hodnotami pH po 10 dnech skladování, což naznačují i výsledky tohoto pokusu uvedené v tabulce x, kde jsou však změny ve výšce bílku zahrnuty v indexu bílku. K tomu dále dodávají, že tento vztah nebyl sledován u čerstvých vajec.

6.3.4.2 Ukazatele kvality žloutku

V tabulce 19 jsou uvedeny kvalitativní ukazatele žloutku. Z výše uvedených ukazatelů byla pouze u indexu žloutku zjištěna průkazná ($P \leq 0,021$) interakce, kde nekvalitnější žloutek (44,95 %) byl zaznamenán shodně u čerstvých vajec jak v obohacené kleci, tak i ve výběhu a naopak nejnižší byl u vajec z výběhu po 21 dnech (27,26 %). Dále byly jeho hodnoty průkazně ($P < 0,001$) vyšší u vejce z obohacené klece v porovnání s vejci z výběhu. V průběhu skladování se index žloutku průkazně ($P < 0,001$) snižoval, a to o 16,92 % v klecovém systému a o 17,69 % ve výběhu. Signifikantní pokles tohoto kvalitativního ukazatele byl zaznamenán rovněž v pokusu 2. Také Akyurek a Okur (2009) ho sledovali v průběhu 14 denního skladování a zaznamenali vysoce průkazný vliv doby skladování, v jejímž průběhu se hodnoty postupně snižovaly. Průkazné změny byly patrné i u podílu žloutku, který se v průběhu stárnutí vajec pozvolna zvyšoval, což naznačuje přesun vody z bílku do žloutku. Podobně také v pokusu 2 byl v průběhu skladování zjištěn nárůst těchto hodnot. Stejný trend popisuje i Scott a Silversides (2000).

6.3.5 Obsah bílkovin

V rámci pokusu 3 byl dále sledován také vliv systému ustájení a doby skladování na obsah bílkovin ve vaječném bílku (tabulka 20). Z výsledků je patrné, že pouze obsah

lysozymu byl průkazně ovlivněn systémem ustájení ($P \leq 0,001$). Vyšší hodnoty byly zaznamenány u vajec z výběhu ve srovnání s vejci z obohacených klecí. Obsah ovotransferinu i ovoalbuminu v našem sledování nebyl systémem ustájení ani dobou skladování průkazně ovlivněn. Z dostupné literatury je patrné, že zmínky o vlivu ustájení na obsah bílkovin chybí, na druhou stranu však existuje několik studií, zabývajících se jejich aktivitou. Jako např. práce Swierczeeska et al. (2003), kde u slepic ustájených v extenzivních systémech ustájení, našli vejce s vyšší aktivitou vaječného lysozymu, cystatinu, ovoinhibitoru a ovomukoidu, ve srovnání s vejci z intenzivních chovů. Nízká aktivita lysozymu ve vaječném bílku se projevila tehdy, když se teplota v hale v zimním období příliš snížila, nebo naopak byla v letních měsících příliš vysoká, a to nad rámec standardního rozsahu teplot stanovené pro nosnice. Trziszka et al. (2006) zaznamenali vyšší aktivitu biologicky aktivních látek u vajec z ekologického chovu. Uvádějí, že nejen produkční systémy, ale také ostatní faktory, jako je třeba genotyp, mohou ovlivňovat koncentraci a aktivitu substancí ve vaječném bílku. Zda-li zmíněný vliv ustájení na aktivitu bílkovin může souviset i s vlivem na jejich obsah není jasné, avšak studii Swierczewska et al. (2005) prokázali vliv věku nosnic na aktivitu lysozymu a Sellier et al. (2007) zaznamenali s rostoucím věkem zvyšující se obsah lysozymu a ovotransferinu. Je tedy pravděpodobné, že vysoká aktivita jednotlivých bílkovin může souviset i s jejich vyšším obsahem, a to nejen v rámci věku ale např. i ve vztahu k systému ustájení.

V průběhu skladování se v tomto experimentu obsah lysozymu neprůkazně snižoval, a to jak v obohacené kleci (z 3,99 mg/ml u čerstvých vajec na 3,72 mg/ml u 21 dní skladovaných vajec), tak i ve výběhu (ze 4,29 mg/ml u čerstvých na 3,94 mg/ml u 21 dní skladovaných vajec). Podobně tento vliv popisuje i Wang et al. (2012), kteří však nezaznamenali vliv 9 týdeního skladování na obsah lysozymu ve vaječném bílku, ale na druhou stranu obsah ovoalbuminu a ovomukoidu se zvýšil. Tento fakt vysvětlují tak, že zvýšení hodnot pH vaječného bílku při dlouhodobém skladování, vede k degradaci ovomucinu, a to je také možnou příčinou jeho snížené extrahovatelnosti. Lomakina a Míková (2006) k tomu dodávají, že ačkoliv mechanismus řidnutí vaječného bílku není zcela objasněn, zvýšení hodnot pH (od 8,0 do 9,5) během tohoto procesu je bráno jako klíčový faktor vedoucí ke změně fyzikálně-chemických vlastností vaječného bílku. Je tedy pravděpodobné, že podobný mechanismus by se mohl podílet i na změnách v obsahu lysozymu vaječného bílku během skladování. Již v dřívější studii Schäfera et al. (1999) skladovali vejce při teplotě 5, 20 a 30°C, v 60% relativní vlhkosti a následně zkoumali složení bílkovin ve vaječném bílku. Během doby skladování však nezaznamenali žádné výrazné změny v obsahu lysozymu.

Dodávají však, že změny ve složení jsou více ovlivněny skladovací teplotou než dobou skladování.

6.3.6 Shrnutí výsledků pokusu 3

Při porovnání dvou systémů ustájení nosnic, obohacené klece a výběhu, byl v pokusu 3 zjištěn průkazný vliv systému ustájení na všechny ukazatele kvality skořápky, mimo jejího povrchu. Z výsledků vyplývá, že její vyšší kvalita byla zaznamenána u vajec z obohacené klece. Systém ustájení průkazně ovlivnil také její pórovitost, kde větší množství pórů na tupém konci vejce a v ekvatoriální rovině, bylo sledováno u vajec z výběhu.

V rámci hodnocení mikrobiální kontaminace povrchu skořápky u čerstvých vajec, bylo detekováno vyšší mikrobiální znečištění u vajec z výběhu, a to všemi sledovanými druhy mikroorganismů. Při porovnání mikrobiální kontaminace skořápky v průběhu skladování byla nalezena interakce systému ustájení a doby skladování u *Escherichia coli*, *Enterococcus* i u celkového počtu mikroorganismů. Nejvyšší kontaminace povrchu skořápky byla zjištěna u všech sledovaných mikroorganismů u čerstvě snesených vajec, až na enterokoky, kde byla nejvyšší 2. den skladování. V jeho průběhu se míra kontaminace na povrchu vajec postupně snižovala, s výjimkou vajec z výběhu, kde byly enterokoky a celkový počet mikroorganismů nejnižší již po 7 dnech skladování. Co se týče intenzity poklesu kontaminace skladovaných vajec, ten byl nejvýraznější v obohacené kleci v porovnání s výběhem.

U penetrace mikroorganismů do vaječného obsahu byl zjištěn nižší průnik na podskořápečné blány u enterokoků 2. a 14. den skladování. *Escherichia coli* a celkový počet mikroorganismů tam penetrovali během celého sledovaného období bez ohledu na dobu skladování. Do vaječného bílku vajec z obohacených klecí proniklo menší množství *Escherichia coli* a celkového počtu mikroorganismů ve srovnání s vejci snesenými ve výběhu. Průnik *Enterococcus* do vajec z klecí nebyl detekován.

Při hodnocení technologické hodnoty vajec byla u Haughových jednotek, indexu bílku, pH bílku a indexu žloutku zjištěna průkazná interakce. Systém ustájení signifikantně ovlivnil hmotnost vejce, všechny ukazatele kvality bílku, index a barvu žloutku. V rámci výsledků těchto ukazatelů byla kvalitnější vejce snesena nosnicemi ustájenými v klecích. Během skladování se průkazně všechny hodnoty vyjadřující technologickou hodnotu vajec zhoršovaly.

Při stanovení obsahu bílkovin ve vaječném bílku byl u lysozymu zjištěn průkazný vliv systému ustájení s nejvyšší koncentrací u vajec z výběhu.

Tabulka 13 Vliv systému ustájení na kvalitu skořápky (pokus 3)

ukazatel	Systém ustájení		SEM	průkaznost
	Obohacená klec	Výběh		
Hmotnost skořápky (g)	6,1	5,5	0,045	< 0,001
Barva skořápky	26,3	46,3	0,867	< 0,001
Tloušťka skořápky (mm)	0,35	0,31	0,002	< 0,001
Pevnost skořápky (N)	44,0	38,1	0,542	< 0,001
Deformace skořápky (mm)	0,212	0,231	0,003	< 0,001
Podíl skořápky (%)	10,1	9,0	0,061	< 0,001
Index skořápky (%)	8,5	7,5	0,051	< 0,001
Povrch skořápky (cm ²)	72,3	72,3	0,289	NS

NS neprůkazný

Tabulka 14 Vliv systému ustájení na množství pórů ve vaječné skořápce (pokus 3)

Systém ustájení	Ostrý konec	Tupý konec	Ekvatoriální rovina
Obohacená klec	75,9	119,3	105,6
Výběh	78,9	137,9	116,2
Průkaznost	NS	< 0,001	< 0,001

NS neprůkazný

Tabulka 15 Mikrobiální kontaminace vaječné skořápky čerstvých vajec v různých systémech ustájení (pokus 3)

Systém ustájení	log (ktj/skořápka)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus</i>	Celkový počet mikroorganismů
Obohacená klec	3,40	2,46	4,04
Výběh	4,83	3,06	5,41
Průkaznost	< 0,001	NS	< 0,001

ktj kolonie tvořící jednotku

NS neprůkazný

Tabulka 16 Mikrobiální kontaminace vaječné skořápky v různých systémech ustájení během skladování (pokus 3)

Systém ustájení	Doba skladování (dny)	log (ktj/skořápka)		
		EC	ENT	CPM
Obohacená klec	0	3,40 ^c	1,56 ^c	4,04 ^c
	2	2,94 ^d	2,43 ^{ab}	3,72 ^{cd}
	7	2,82 ^d	0,79 ^{cd}	4,00 ^{cd}
	14	3,00 ^{cd}	0,76 ^{cd}	3,33 ^d
	21	2,03 ^e	0,11 ^d	3,24 ^d
Výběh	0	4,83 ^a	3,06 ^a	5,40 ^a
	2	4,77 ^a	3,07 ^a	5,08 ^{ab}
	7	4,25 ^b	2,08 ^b	4,47 ^{bc}
	14	4,29 ^b	2,23 ^b	4,85 ^b
	21	4,23 ^b	2,79 ^{ab}	5,23 ^{ab}
Průkaznost				
systém ustájení		< 0,001	< 0,001	< 0,001
doba skladování		< 0,001	< 0,001	0,003
systém ustájení x doba skladování		0,016	0,007	0,007

^{a-d} číslo ve stejném sloupci označené jiným písmenem než předchozí se průkazně liší
ktj kolonie tvořící jednotku

Tabulka 17 Mikrobiální penetrace do vaječného obsahu v různých systémech ustájení v průběhu skladování (pokus 3)

Systém ustájení	Doba skladování (dny)	Penetrace (%)					
		Podskořápečná blána			Bílek		
		EC	ENT	CPM	EC	ENT	CPM
Obohacená klec	0	2,22	-	4,44	-	-	2,22
	2	1,67	0,56	1,67	0,56	-	1,11
	7	0,56	-	7,22	-	-	2,22
	14	2,78	0,56	6,67	0,56	-	5
	21	1,11	-	3,89	0,56	-	1,67
Výběh	0	0,56	-	5	0,56	-	5,56
	2	2,78	1,11	4,44	0,56	1,11	3,89
	7	-	0,56	5,56	0,56	-	2,78
	14	3,89	1,67	3,89	4,44	1,67	2,78
	21	1,11	-	5,56	0,56	-	4,44

Tabulka 18 Technologická hodnota vajec v různých systémech ustájení v průběhu skladování (pokus 3)

Systém ustájení	Doba skladování	Hmotnost vejce (g)	Haughovy jednotky	Index bílku (%)	Podíl bílku (%)	pH bílku
Obohacená klec	0	61,56	89,21 ^a	10,79 ^a	62,85	8,23 ^d
	2	60,99	73,76 ^c	6,72 ^c	62,69	8,94 ^c
	7	60,22	61,47 ^e	4,51 ^e	57,56	9,28 ^b
	14	59,87	56,40 ^f	3,59 ^f	60,36	9,38 ^a
	21	59,27	56,20 ^f	3,34 ^{fg}	59,49	9,39 ^a
Výběh	0	61,02	79,12 ^b	8,00 ^b	63,79	8,90 ^c
	2	59,78	68,40 ^d	5,59 ^d	62,81	9,25 ^b
	7	59,27	59,15 ^{ef}	4,20 ^{ef}	61,99	9,38 ^a
	14	57,78	58,00 ^f	3,77 ^f	61,41	9,39 ^a
	21	57,33	53,29 ^g	3,08 ^g	60,60	9,42 ^a
Průkaznost						
systém ustájení		< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,038	< 0,001
doba skladování		< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,005	< 0,001
systém ustájení x doba skladování		NS	< 0,001	< 0,001	NS	< 0,001

^{a-g} číslo ve stejném sloupci označené jiným písmenem než předchozí se průkazně liší
NS neprůkazný

Tabulka 19 Kvalita vaječného žloutku v různých systémech ustájení v průběhu skladování (pokus 3)

Systém ustájení	Doba skladování	Index žloutku (%)	Podíl žloutku (%)	Barva žloutku
Obohacená klec	0	44,95 ^a	25,22	11,04
	2	41,77 ^b	25,70	11,20
	7	38,19 ^d	29,92	9,73
	14	31,98 ^f	28,19	10,40
	21	28,03 ^h	28,65	10,87
Výběh	0	44,95 ^a	25,87	7,47
	2	39,57 ^c	27,05	7,27
	7	36,58 ^e	27,61	6,83
	14	30,88 ^g	28,12	6,61
	21	27,26 ^h	28,77	7,39
Průkaznost				
systém ustájení		< 0,001	NS	< 0,001
doba skladování		< 0,001	< 0,001	< 0,001
systém ustájení x doba skladování		0,021	NS	NS

^{a-h} číslo ve stejném sloupci označené jiným písmenem než předchozí se průkazně liší
NS neprůkazný

Tabulka 20 Obsah bílkovin ve vaječném bílku vajec z různých systémů ustájení v průběhu skladování (pokus 3)

Systém ustájení	Doba skladování (dny)	(mg/ml)		
		lysozym	ovotransferin	ovoalbumin
Obohacená klec	0	3,99	12,8	96,6
	7	3,98	15,5	113,2
	14	3,79	13,6	107,2
	21	3,72	11,2	99,8
Výběh	0	4,29	14,9	111,2
	7	4,10	14,5	105,8
	14	4,12	12,2	104,5
	21	3,94	12,6	106,8
Průkaznost				
systém ustájení		0,001	NS	NS
doba skladování		NS	NS	NS
systém ustájení x doba skladování		NS	NS	NS

NS neprůkazný

7 ZÁVĚR

Kvalita vajec je ovlivněna mnoha vnitřními a vnějšími faktory. K těm velmi významným vnějším faktorům patří způsob a podmínky chovu nosnic a jejich výživa. Důležitý vliv představují i podmínky skladování vajec, při kterých dochází k výrazným změnám v jejich kvalitě. Cílem práce bylo posoudit vliv barvy světla, různých systémů ustájení a odlišného obsahu vápníku na základní produkční ukazatele nosnic, kvalitu skořápky, technologickou hodnotu vajec a na úroveň mikrobiální kontaminace vaječné skořápky a vaječného obsahu na skladovatelnost vajec.

V souvislosti s použitím různé barvy světla nebyl zjištěn jejich průkazný vliv na produkci vajec ani na jejich hmotnost. Vyšší mortalita byla pozorována při modrém světle, naopak nejméně slepic uhynulo při světle červeném. Vyšší úhyn při modrém osvětlení mohl pravděpodobně souviset s jejich vyšší aktivitou a následně s vyšší mírou ozobávání nebo kanibalismu což mohlo vést k vyšším ztrátám. Barva světla neovlivnila mikrobiální kontaminaci vzduchu v halách. Mikrobiální kontaminace vaječné skořápky byla ovlivněna interakcemi mezi barvou světla a etáží u *Escherichia coli* a *Enterococcus*, kde nejvyšší množství *Escherichia coli* bylo ve střední etáži při žluté barvě světla a nejnižší v horní etáži pod stejnou barvou. Vyšší množství bakterií rodu *Enterococcus* bylo u vajec ve střední etáži při žlutém světle, v porovnání s nejnižší kontaminací v horní etáži při světle modrém. Během tohoto sledování byl zjištěn vliv etáže na míru mikrobiálního znečištění vaječné skořápky, s nejvyšší kontaminací ve střední etáži, a to u všech sledovaných mikroorganismů. To pravděpodobně souviselo s vyšším množstvím poletujícího prachu a s ním i množstvím bakterií v prachu obsažených, které ulpávaly na povrchu vejce. Vyšší prašnost byla zřejmě zapříčiněna aktivitou slepic v okolních etážích.

Systém ustájení měl významný vliv na většinu ze sledovaných ukazatelů. Vyšší počet vajec snesly nosnice ustájené v konvenční kleci v porovnání s podestýlkou a voliérou. Naproti tomu slepice ve voliére měly vyšší spotřebu krmiva. Z technologické hodnoty vajec byla zaznamenána významně vyšší hmotnost vajec na podestýlce v porovnání s klecemi. To pravděpodobně souviselo s nižší intenzitou snášky v tomto alternativním systému ustájení. Také kvalita vaječné skořápky byla systémem ustájení ovlivněna. Lepší hodnoty pevnosti, tloušťky a podílu skořápky byly u vajec z klecových systémů. V tomto ustájení byla zaznamenána i nižší pórovitost skořápky v porovnání s výběhem. Z pohledu ukazatelů kvality bílku a žloutku, byla vejce o vyšší kvalitě sesbírána z obohacené klece.

Během hodnocení mikrobiálního znečištění vaječné skořápky byla detekována vyšší kontaminace vajec *Escherichia coli* a celkovým počtem mikroorganismů z podestýlky i výběhu ve srovnání s klecí, kde byly hodnoty v řádech až o 3 log nižší. Průnik mikroorganismů zejména *Escherichia coli* a *Enterococcus* do vaječného obsahu byl v porovnání s klecemi jak na podestýlce, tak i ve výběhu vyšší. To naznačuje, že s vyšším množstvím mikroorganismů na povrchu vejce roste i pravděpodobnost jejich penetrace do vaječného obsahu.

U vajec z výběhu byl z analýzy vaječných bílkovin zaznamenán průkazně vyšší obsah lysozymu. Je možné, že vyšší zastoupení této ochranné bílkoviny naznačuje určitý vztah k vyššímu mikrobiálnímu zatížení těchto vajec v alternativních systémech.

Při hodnocení vlivu dvou odlišných úrovní obsahů vápníku v krmné směsi byly zaznamenány průkazné interakce mezi systémem ustájení a obsahem vápníku u hmotnosti vejce, pevnosti, podílu a hmotnosti skořápky. Z ukazatelů kvality bílku u Haughových jednotek a indexu bílku. Průnik mikroorganismů na podskořápečnou blánu byl 2. a 7. den skladování ve skupině se 3,5 % vápníku v krmivu vyšší u všech sledovaných druhů bakterií, a to u vajec z podestýlky. Z toho je možné usuzovat na vztah mezi velikostí penetrace a pevností skořápky, neboť obsah vápníku zřejmě způsobil změny ve struktuře skořápky, čímž mohl být průnik do jisté míry ovlivněn.

Doba skladování vajec měla významný vliv zejména na technologické ukazatele jejich kvality. Především hmotnost vajec a ukazatele kvality bílku jako jsou Haughovy jednotky, index, podíl a pH bílku se v průběhu skladování výrazně měnili a zhoršovali tak kvalitu vejce. Během skladování se snižovala i mikrobiální kontaminace povrchu vejce. Její nejintenzivnější pokles byl patrný především u vajec z obohacené klece, a to zřejmě díky menšímu množství nečistot a reziduí, které mohou po určitou dobu sloužit jako potencionální zdroj živin pro mikroorganismy. Na skladovatelnost vajec má vliv také systém ustájení což naznačují interakce u Haughových jednotek, indexu a pH bílku, indexu žloutku a u mikrobiální kontaminace povrchu vejce u všech sledovaných druhů mikroorganismů.

Z výsledků práce je zřejmé, že z hlediska kvality vajec se zdá být nejvýhodnější ustájením klecový systém chovu, neboť nosnice zde ustájené mají vyšší snášku, nižší spotřebu krmiva a je zde patrný pozitivní vliv na kvalitu skořápky a nižší mikrobiální kontaminaci povrchu vejce a vaječného obsahu. V průběhu skladování vejce z tohoto typu ustájení neztrácí tak rychle kvalitu jako z alternativních systémů. V otázce kvality skořápky zde hraje důležitou roli i minerální výživa, kde vhodným obsahem vápníku v krmné směsi lze zajistit její lepší

kvalitu a tím pravděpodobně ovlivnit i její schopnost chránit vaječný obsah proti mikroorganismům.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abrahamsson, P., Tauson, R. 1993. Effect of perches at different positions in conventional cages for laying hens of two different strains. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science*. 43. 228 - 235.
- Abrahamsson, P., Tauson, R. 1995. Aviary systems and conventional cages for laying hens - Effects on production, egg quality, health and bird location in three hybrids. *Acta Agriculturae Scandinavica Animal Science*. 45. 191 - 203.
- Abrahamsson, P., Tauson, R., Elwinger, K. 1996. Effects on production, health and egg quality of varying proportions of wheat and barley in diets for two hybrids of laying hens kept in different housing system. *Acta Agriculturae Scandinavica Animal Science*. 46. 176 - 182.
- Ahammed, M., Chae, B. J., Lohakare, J., Keohavong, B., Lee, M. H., Kim, D. M., Lee, J. Y., Ohh, S. J. 2014. Comparison of aviary, barn and conventional cage raising of chickens on laying performance and egg quality. *Asian Australian Journal of Animal Science*. 27. 8. 1196 - 1203.
- Akyurek, H., Okur, A. A. 2009. Effect of storage time, temperature and hen age on egg quality in free-range layer hens. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 8. 10. 1953 - 1958.
- Anonym. 1999. Council Directive 1999/74/EC on 19 July 1999 laying down minimum standards for the protection of laying hens. *Official Journal of the European Communities L 203*. 53 - 57.
- Bain, M. N., Mcdade, K., Burchmore, R., Law, A., Wilson, P. W., Schmutz, M., Preisinger, R. and Dunn, I. C. 2013. Enhancing the egg's natural defence against bacterial penetration by increasing cuticle deposition. *Animal Genetics*. 44. 661 - 668.
- Baker, J. R., Balch, D. A. 1962. A study of organic material of hens egg shell. *Biochemical Journal*. 82. 352 - 361.
- Ball, R.F., Logan, V., Hill, J. F. 1975. Factors affecting cuticle of egg as measured by intensity of staining. *Poultry Science*. 54. 1479 - 1484.
- Bar, A., Razaphkovsky, V., Vax, E. 2002. Re-evaluation of calcium and phosphorus requirements in aged laying hens. *British Poultry Science*. 43. 261 - 269.
- Barnhart, H. M., Dreesen, D. W., Bastien, R., Pancorbo, O. C. 1991. Prevalence of *Salmonella* Enteritidis and other serovars in ovaries of layer hens at time of slaughter. *Journal of Food Protection*. 54. 488 - 491.

- Barrow, P. A., Lowell, M. A. 1991. Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. *Avian Pathology*. 20. 335 - 348.
- Bäumler, A. J., Hargis, B. M., Tsois, R. M. 2000. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. *Science*. 287. 5450. 50 - 53.
- Belkot, Z., Gondek, M. 2014. The bacterial pollution of consumer egg surfaces with regards to the maintenance system of laying hens. *Medycyna Weterynaryjna*. 70. 6. 378 - 382.
- Berrang, M. E., Frank, J. F., Buhr, R. J., Bailey, J. S., Cox, N. A. 1999. Eggshell membrane structure and penetration by *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Protection*. 62. 73 - 76.
- Bichler, L. A., Kabambi, V., Nagaraja, D. V. M., Halvorson, D. A. 1996. *Salmonella* Enteritidis in eggs, cloacal swab specimens, and internal organs of experimentally infected white leghorn chickens. *American Journal of Veterinary Research*. 57. 489 - 495.
- Board, R. G. 1966. Review article: the course of microbial infection of the hen's egg. *Journal of Applied Bacteriology*. 219. 319 - 341.
- Board, R. G., Halls, N. A. 1973. The cuticle: A barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hen's egg. *British Poultry Science*. 14. 69 - 97.
- Board, R. G. 1980. The avian eggshell-a resistant network. *Journal of Applied Bacteriology*. 48. 303 - 313.
- Board, R. G., Tranter, H. S. 1995. The Microbiology of Eggs. Pages 81-103 in *Egg Science and Technology*, 4th ed., W. J. Stadelman and O. J. Cotterill (eds.). Food Products Press. NY.
- Borille, R., Garcia, R. G., Royer, A. F. B., Santana, M. R., Colet, S., Naas, I. A., Caldara, F. R., Almeida Paz, I. C. L., Rosa, E. S., Castilho, V. A. R. 2013. The use of light-emitting diodes (LED) in commercial layer production. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 15. 2. 135 - 140.
- Bowlby, G. M. S. 1957. Some preliminary investigations into the effect of light on broilers. *World's Poultry Science Journal*. 13. 755 - 764.
- Braun, P., Fehlhaber, K., Wicke, A. 1999. *Salmonella* Enteritidis invades the egg through the shell. *World Poultry Special*. 23 - 24.
- Bruce, J., Drysdale, E. M. 1994. Trans-shell transmission. Pages 63-91 in: *Microbiology of the Avian Egg*. 1st Edition. RG. Board and R. Fuller, ed. Chapman and Hall. London, England.

- Caner, C. 2005. The effect of edible eggshell coatings on egg quality and consumer perception. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85. 1897 - 1902.
- Caner, C., Yüceer, M. 2015. Efficacy of various protein-based coating on enhancing the shelf life of fresh eggs during storage. *Poultry Science*. 94. 7. 1665 - 1677.
- Casiraghi, E., Hidalgo, A., Rossi, M. 2005. Influence of weight grade on shell characteristics of marketed hen eggs. In *Proceedings of the 10th European symposium on the quality of eggs and egg products* (pp. 183 - 188). Doorwerth: WPSA.
- Castillo, C., Cuca, M., Pro, A., González, M., Morales, E. 2004. Biological and economic optimum level of calcium in White Leghorn laying hens. *Poultry Science*. 83. 868 - 872.
- Clunies, M., Leeson, S. 1994. Calcium-45 dynamics of hens laying thick-shelled eggs. *Canadian Journal of Animal Science*. 74. 541 - 546.
- Coufal, C. D., Chavez, C., Knape, K. D., Carey, J. B. 2003. Evaluation of a method of ultraviolet light sanitation of broiler hatching eggs. *Poultry Science*. 82. 754 - 759.
- Cox, N. A., Stern, N. J., Hiatt, K. L., Berrang, M. E. 1999. Transmission of *Campylobacter* from breeders to commercial broiler chickens. Page 67 in *Proceedings of the International workshop on Campylobacter, Helicobacter, and related organisms*, Copenhagen, Denmark (abstract).
- Cox, N. A., Stern, N. J., Hiatt, K. L., Buhr, R. J., Craven, S. E., Bailey, J. S., Wilson, J. E., Musgrove, M. T., Siragusa, G. R. 2000. Eggborne transmission of *Campylobacter jejuni* from the breeder hen to her progeny and the presence of other human foodborne pathogens in the breeder hen's reproductive system. Pages 1-5 in *Proceedings of Campylobacter Control in Poultry*. Arhus. Denmark.
- Cox, N. A., Bailey, J. S., Richardson, L. J., Buhr, R. J., Hiatt, K. L., Siragusa, G. R., Cosby, D. E., Wilson, J. L., Bourassa, D. V. 2004. Detection of *Campylobacter* and *Salmonella* in 37 the mature and immature reproductive follicles of late life broiler breeder hens. *Poultry Science*. 83 (Suppl): 1 (abstract).
- Cufadar, Y., Olgun, O., Yildiz, A. Ö. 2011. The effect of dietary calcium concentration and particle size on performance, eggshell quality, bone mechanical properties and tibia mineral contents in moulted laying hens. *British Poultry Science*. 52. 6. 761 - 768.
- Davies, R. H., Breslin, M. 2003. Investigation of *Salmonella* contamination and disinfection in farm egg-packing plants. *Journal of Applied Microbiology*. 94. 191 - 196.
- De Buck, J., Pasmans, F., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. 2004a. Tubular glands of the isthmus are the predominant colonization site of *Salmonella* Enteritidis in the upper oviduct of laying hens. *Poultry Science*. 83. 352 - 358.

- De Buck, J., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. 2004b. Effect of type-1 fimbriae of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis on bacteremia and reproductive tractinfection in laying hens. *Avian Pathology*. 33. 314 - 320.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Heyndrickx, M., Zoons, J., De Baere, D., Uyttendaele, M., Debevere, J., Herman, L. 2005a. Bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages and aviary housing systems. *British Poultry Science*. 46. 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 eggshell contamination in the egg collection chains of different housing systems for laying hens. *British Poultry Science*. 47. 163 - 172.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Messens, W., Heyndrickw, M., Uyttendaele, M., Debevere, J., Herman, L. 2006b. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*. 112. 253 - 260.
- De Reu, K., Heyndricky, M., Grijspeerdt, K., Rodenburg, T. B., Tuyttens, F., Uyttendaele, M., Debevere, J., Herman, L. 2007. Estimation of the vertical and horizontal bacterial infection of hen's table eggs. XVII European symposium on the quality of poultry meat a XIIth European symposium on the quality of eggs and egg products. Conference proceedings. Prague. Czech Republic. 46 - 47.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Rodenburg, B., Tuyttens, F., Heyndrickx, M., Zoons, J., Herman L. 2008. 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 „XXIIIth World's poultry congress“. Brisbane. Australia. (CD).
- De Reu, K., Rodenburd, T. B., Grijspreerd, K., Heyndrickx, M., Tuyttens, F. A. M., Sonck, B., Zoons, J. and Herman, L. 2009. Bacteriological contamination, dirt, and crack of eggshells in furnished cages and noncage systems for laying hens: An international on-farm comparison. *Poultry Science*. 88. 2442 - 2448.
- Dukić - Stojčić, M., Perić, L., Bjedov, S., Milošević, N. 2009. The quality of table eggs produced in different housing systems. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 25. 5 - 6. 1103 - 1108.

- El Halawani, M. F. 2009. Light intensity requirement for breeder hen turkeys. *Gobbles*. 66. 4. 6 - 7.
- El Halawani, M. F. 2013. Light spectrum requirement for maximizing breeder hen turkey egg production. *Gobbles*. 70. 4. 6 - 8.
- Ellen, H. H., Bottcher, R. W., Von Wachenfelt, E., Takai, H. 2000. Dust levels and control methods in poultry houses. *Journal of Agricultural Safety and Health*. 6. 275 - 282.
- Englmaierová, M., Tůmová, E. 2009. The effect of housing system and storage time on egg quality characteristics [online]. Czech University of Life Sciences in Prague. [cit. 4. listopadu 2015]. Dostupné z: http://www.cabi.org/animalscience/Uploads/File/AnimaAnimalSc/additionalFiles/WPSATurku2009/51_eggmeat2009_englmaierova_EP6.pdf.
- Englmaierová, M. 2010. Faktory bezpečnosti produkce konzumních vajec. Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 71 s.
- Englmaierová M., Tůmová, E., Charvátová, V., Skřivan, M. 2014. Effects of laying hens housing system on laying performance, egg quality characteristics, and egg microbial contamination, *Czech Journal of Animal Science*. 59. 345 - 352.
- Er, D., Wang, Z., Cao, J., Chen, Y. 2007. Effect of monochromatic light on the egg quality of laying hens. *Journal Applied Poultry Research*. 16. 605 - 612.
- Fiks-van Niekerk T. G. C. M. 2005. Housing systems for laying hens and their effect on egg quality. In: Proc. XIth European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products Doorwerth. The Netherlands. 262 - 266.
- Foster, R., Soni, B. 1998. Extraretinal photoreceptors and their regulation of temporal physiology. *Reviews of Reproduction*. 3. 145 - 150.
- Freitas, H. J., Cotta, J. T. B., Oliveira, A. I., Murgas, L. D. S., Gewehr, C. E. 2010. Efeito de diferentes programas de iluminação para poedeiras semi-pesadas criadas em galpões abertos. *Revista Biotemas*. 23. 2. 157 - 162.
- Fromm, D., Monroe, R. J. 1960. Interior physical quality and bacterial contamination of market eggs as influenced by eggshell porosity. *Food Technology*. 14. 401 - 403.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Timbermont, L., Boyen, F., Bohez, L., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F. 2006. Oral immunisation of laying hens with live vaccine strains of TAD *Salmonella vacE* and TAD *Salmonella vacT* reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine*. 24. 6250 - 6255.

- Gantois, I., Eeckhaut, V., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F. 2008. A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathology*. 37. 399 - 406.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T. J., Van Immerseel, F. 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *Federation of European Microbiological Societies*. 33. 718 - 738.
- Garibaldi, J. A., Stokes, J. L. 1958. Protective role of shell membranes in bacterial spoilage of eggs. *Food Research*. 23. 283 - 290.
- Gast, R. K., Beard, C. W. 1990. Production of *Salmonella* Enteritidis - contaminated eggs by experimentally infected hens. *Avian Diseases*. 34. 438 - 446.
- Gast, R. K., Cox, N. A., Bailey, J. S. 1992. *Salmonella* in eggs. *Food Poisoning*, 49-67 in *Food Poisoning*, Tu, A. T. ed., Marcel Dekker, New York, NY.
- Gast, R. K., Holt, P. S. 2000. Deposition of phage type 4 and 13a *Salmonella* Enteritidis strains in the yolk and albumen of eggs laid by experimentally infected hens. *Avian Diseases*. 44. 706 - 710.
- Gast, R. K., Guard-Petter, J., Holt, P. S. 2002. Characteristics of *Salmonella* Enteritidis contamination in eggs after oral, aerosol, and intravenous inoculation of laying hens. *Avian Diseases*. 46. 629 - 635.
- Gast, R.K., Guraya, R., Guard-Bouldin, J., Holt, P.S., Moore R. W. 2007. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. *Avian Diseases*. 51. 40 - 44.
- Gautron, J., Hincke, M. T., Panheleux, M., Garcia - Ruiz, J. M., Boldicke, T., Nys, Y. 2001. Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer. *Connect Tissue Research*. 42. 255 - 267.
- Gautron, J., Murayama, E., Vignal, A., Morisson, M., McKee, M. D., Rehault, S., Labas, V., Belghazi, M., Vidal, M. L., Nys, Y., Hincke, M. T. 2006. Cloning of ovocalyxin-36, a novel chicken eggshell protein related to lipopolysaccharide-binding proteins, bactericidal permeability-increasing proteins, and Plunc family proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 282. 5273 - 5286.
- Gentry, R. F., Quarles, C. L. 1972. The measurement of bacterial contamination on egg shells. *Poultry Science*. 51. 930 - 933.
- Gerzilov, V., Datkova, V., Mihaylova, S., Bozakova, N. 2012. Effect of poultry housing systems on egg production. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 18. 6. 953 - 957.

- Giannenas, I., Nisianajis, P., Gavriil, A., Kontopidis, G., Kyriazakis, I. 2009. Trace mineral content of conventional, organic and courtyard eggs analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Food Chemistry*. 114. 706 - 711.
- Gilbert, A. B. 1983. Calcium and reproductive function in the hen. *Proceedings of the Nutrition Society*. 42. 195 - 212.
- Griffin, H. D., Perry, M. M., Gilbert, A. B. 1984. Yolk formation. *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl* (Freeman BM, ed), Academic Press. London. 345 - 378.
- Guesdon, V., Faure, J. M. 2004. Laying performance and egg quality in hens kept in standard or furnished cages. *Animal Research*. 53. 45 - 57.
- Guesdon, V., Ahmed, A. M. H., Mallet, S., Faure, J. M., Nys, Y. 2006. Effects of beak trimming and cage design on laying hen performance and egg quality. *British Poultry Science*. 47. 1 - 12.
- Guillam, M. T., Claude, C., Dewitte, J. D., Michel, V., Segala, C. 2007. Health hazards and inhalers exposures in poultry farming. *Archives des maladies professionnelles et de l'environnement*. 68. 161 - 168.
- Haigh, T., Betts, W. B. 1991. Microbial barrier properties of hen egg shells. *Microbios*. 68. 137 - 146.
- Harry, E. G. (1963): The relationship between egg spoilage and the environment of the egg when laid. *British Poultry Science*. 4. 91 - 100.
- Hartung, T. E., Stadelman, W. J. 1963. *Pseudomonas fluorescens* penetration of egg shell membranes as affected by shell porosity, age of egg and degree of bacterial challenge. *Poultry Science*. 42. 147 - 150.
- Hartung J. 1994. The effect of airborne particulates on livestock health and production. In: Dewi I., Axford R.F.E., Fayez I. M. M., Omed H. M. (eds.): *Pollution in Livestock Production System*. CAB International. Wallingford. Great Britain. 55 - 69.
- Hassan, R. Md., Sultana, S., Sung, H. H., Saon, R. K. 2013. Effect of monochromatic and combined light colour on performance, blood parameters, ovarian morphology and reproductive hormones in laying hens. *Italian Journal of Animal Science*. 12. 3. 1 - 6.
- Heath, J. L. 1977. Chemical and related osmotic changes in egg albumen during storage. *Poultry Science*. 56. 822 - 828.
- Hidalgo, A., Rossi, M., Clerici, F., Ratti, S. 2008. A market study on the quality characteristics of eggs from different housing systems. *Food Chemistry*. 106. 1031 - 1038.

- Hincke, M. T., Gautron, J., Panheleux, M., Garcia-Ruiz, J., McKee, M. D., Nys, Y. 2000. Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix. *Matrix Biology*. 19. 443 - 453.
- Hincke, M. T., Wellman-Labadie, O. 2008. Biosynthesis and structural assembly of eggshell components. In: Mine, Y. (Ed.), *Egg Bioscience and Biotechnology*. John Wiley and Sons. New York. S. 97 - 128.
- Holt, P. S., Davies, R. H., Dewulf, J., Gast, R. K., Huwe, J. K., Jones, D. R., Waltman, D., Willian, K. R. 2011. The impact of different housing systems on egg safety and quality. *Poultry Science*. 90. 251 - 262.
- Huber-Eicher, B., Suter, A., Spring-Stahli, P. 2013. Effects of colored light-emitting diode illumination on behavior and performance of laying hens. *Poultry Science*. 92. 869 - 873.
- Hulzebosch, J. 2006. Wide range of housing options for layers. *World Poultry*. 22. 20 - 22.
- Humphrey, T. J. 1989. *Salmonella* Enteritidis phage type 4 from the contents of intact eggs: a study involving naturally infected hens. *Epidemiology and Infection*. 103. 3. 415 - 423.
- Humphrey, T. J., Whitehead, A., Gawer, A., Henley, A., Rowe, B. 1991. Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the contents of naturally contaminated hen's eggs. *Epidemiology and Infection*. 106. 489 - 496.
- Humphrey, T. J. 1994. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella* Enteritidis: a review, *International Journal of Food Microbiology*. 21. 31 - 40.
- Huneau-Salaün, A., Michel, V., Huonnic, L., Balaine, L., Le Bouquin, S. 2010. Factors influencing bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages and free-range systems for laying hens under commercial conditions. *British Poultry Science*. 51. 163 - 169.
- Chavez, C., Knape, K. D., Coufal, C. D., Carey, J. B. 2002. Reduction of egg shell aerobic plate counts by ultraviolet irradiation. *Poultry Science*. 81. 1132 - 1135.
- Chen, J., Clarke, R. C., Griffiths, M. W. 1996. Use of luminescent strains of *Salmonella* Enteritidis to monitor contamination and survival in eggs. *Journal of Food Protection*. 59. 915 - 921.
- Jácome, I. M. T. D., Rossi, L. A., Borille, R. 2014. Influence of artificial lighting on the performance and egg quality of commercial layers: a Review. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 16. 4. 337 - 344.
- Jelínek, K. 1996. Defective shell - one of the problems in the production of eggs. *Czech Journal of Animal Science*. 41. 375 - 379.

- Jendral, M. J., Church, J. S., Feddes, J. J. 2004. Assessing the welfare of Layers hens housed in conventional, modified and commercially-available furnished battery cages. Proceedings of 22nd World Poultry Congress, Istanbul, Turkey, 4s (CD).
- Jin, Y. H., Lee, K. T., Lee, W. I., Han, Y. K. 2011. Effects of storage temperature and time on the quality of eggs from laying hens at peak production. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 24. 2. 279 - 284.
- Jones, D. R., Anderson, K. E., Curtis, P. A. and Jones, F. T. 2002. Microbial contamination in inoculated shell eggs: I. Effects of layer strain and hen age. *Poultry Science*. 81. 715 - 720.
- Jones, D. R., Musgrove, M. T. 2005. Effects of extended storage on egg quality factors. *Poultry Science*. 84. 1774 - 1777.
- Jones, D. R., Karcher, D. M., Abdo, Z. 2014. Effect of a commercial housing system on egg quality during extended storage. *Poultry Science*. 93. 1282 - 1288.
- Keller, L. H., Benson, C. E., Krotec, K., Eckroade, R. J. 1995. *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid egg of chickens. *Infection and Immunity*. 63. 2443 - 2449.
- Kim Min, J., Salim Hossan, Md., Nazma, A., Na Jae, C., Bang Han, T., Kang Hwan, K., Kim Dong, W., Chae Hyun, S., Choi Hee, C., Suh Ok, S. 2012. Effect of monochromatic light on sexual maturity, production performance and egg quality of laying hens. *Avian Biology Research*. 5. 69 - 74.
- Kinde, H., Shivaprasad, H. L., Daft, B. M., Read, D. H., Ardans, A., Breitmeyer, R., Rajashekara, G., Nagaraja, K. V., Gardner, I. A. 2000. Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis, phage type 4. *Avian Diseases*. 44. 239 - 248.
- Kirunda, D. F. K., McKee, S. R. 2000. Relating quality characteristics of aged eggs and fresh eggs to vitelline membrane strength as determined by a texture analyzer. *Poultry Science*. 79. 1189 - 1193.
- Klecker, D., Zeman, L., Lichovníková, M., Havlíček, Z., Pavlík, A., Pokludová, M., Jelínek, P. 2004. *Nové technologické systémy chovu slepic*. Brno. s. 47.
- Kraft, A. A., Elliott, L. E., Brant, A. W. 1958. The shell membrane as a barrier to bacterial penetration of eggs. *Poultry Science*. 37. 238 - 240.
- Kretzshmar-McCluskey, V., Curtis, P. A., Andersson, K. E., Berry, W. D., Kerth, L. K. 2009. Influence of hen age and strain on eggshell exterior, eggshell interior with membranes,

- and egg contents of microflora, and on *Salmonella* incidence during a single production cycle. *Journal of Applied Poultry Research*. 18. 665 - 670.
- Kusuda, S., Iwasawa, A., Doi, O., Ohya, Y., Yoshizaki, N. 2011. Diversity of the cuticle layer of avian eggshells. *Journal of Poultry Science*. 48. 119 - 124.
- Ledvinka, Z., Tůmová, E., Ebeid, T., Klesalová, L. 2004. Užítkovost nosnic a kvalita vajec slepic chovaných v odlišných podmínkách. *Náš chov*. 10. 36 - 38.
- Ledvinka, Z., Tůmová, E., Englmaierová, M., Podsedníček, M. 2012. Egg quality of three laying hen genotypes kept in conventional cages and on litter. *Archiv für Geflügelkunde*. 76. 38 - 43.
- Lewis, P. D., Morris, T. R., 2000. Poultry and coloured light. *World's Poultry Science Journal*. 56. 3. 189 - 207.
- Lewko, L., Gornowicz, E. 2011. Effect of housing system on egg quality in laying hens. *Annals of Animal Science*. 11. 4. 607 - 616.
- Leyendecker, M., Hamann H., Hartung J., Kamphues J., Ring C., Glünder G., Ahlers C., Sander I., Neumann U., Distl O. (2001): Analysis of genotype- environment interactions between layer lines and housing systems for performance traits, egg quality and bone strength. 2nd communication: Egg quality traits. *Züchtungskunde*. 73. 308 - 323.
- Leyendecker, M. 2003. Einfluss verschiedener legehennenhaltungssysteme (konventionelle Käfige, ausgestaltete Käfige, intensive Auslauf- und Volierenhaltung) auf die Legeleistung, Eiqualität und Knochenfestigkeit von Legehennen. Ph. D. Diss. Univ. Osnabrück, Fachbereich Biologie, Osnabrück, Germany.
- Lifshitz, A., Baker, R. C., Naylor, H. B. 1964. The relative importance of chicken exterior structures in resisting bacterial penetration. *Journal of Food Science*. 29. 94 - 99.
- Lichovnicková M., Zeman, L. 2008. Effect of housing system on the calcium requirements of laying hens and eggshell quality. *Czech Journal of Animal Science*. 53. 162 - 168.
- Lomakina, K., Míková, K. 2006. A study of the factors affecting the foaming properties of egg white - a Review. *Czech Journal of Animal Science*. 24. 3. 110 - 118.
- Mallet, S., Ahmed, A., Guesdon, V., Nys, Y. 2003. Comparison of eggshell quality and hygiene in two housing systems: standard and furnished cages. *Proceedings of the 10th European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products*, Ploufragan, France, pp. 283 - 242.
- 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. 30 - 35.

- Matt, D., Veromann, E., Luik, A. 2009. Effect of housing systems on biochemical composition of chicken eggs. *Agronomy Research*. 7. 2. 662 - 667.
- Mawer, S. L., Spain, G. E. and Rowe, B. 1989. *Salmonella* Enteritidis phage type 4 and hen's eggs. *Lancet I*, 280 - 281.
- Mayes, F. J., Takeballi, M. A. 1983. Microbial contamination of the hen's egg: a review. *Journal Food Protection*. 46. 1092 - 1098.
- Miyamoto, T., Baba, E., Tanaka, T., Sasai, K., Fukata, T., Arakawa, A. 1997. *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal and intravenous routes. *Avian Diseases*. 34. 463 - 465.
- Menaker, M., Underwood, H. 1976. Extraretinal photoreception in birds. *Photophysiology*. 23. 299 - 306.
- Mertens, K., Bamelis, F., Kemps, B., Kamers, B., Verhoelst, E., De Ketelaere, B., Bain, M., Decuypere, E., De Baerdemaeker, J. 2006. Monitoring of eggshell breakage and eggshell strength in different production chains of consumption eggs. *Poultry Science*. 85. 1670 - 1677.
- Messens, W., Grijspeerdt, K., Herman, L. 2005a. Eggshell penetration by *Salmonella*: a review. *World's Poultry Science Journal*. 61. 71 - 85.
- Messens, W., Grijspeerdt, K., Herman, L. 2005b. Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis through the production period of a layer flock. *British Poultry Science*. 46. 694 - 700.
- Messens, W., Grijspeerdt, K., Herman, L. 2006. Eggshell penetration of hen's eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis upon various storage conditions. *British Poultry Science*. 47. 5. 554 - 560.
- Messens, W., Grijspeerdt, K., De Reu, K., De Ketelaere, B., Mertens, K., Bamelis, F., Kemps, B., De Baerdemaeker, J., Decuypere, E., Herman, L. 2007. Eggshell penetration of various types of hens' eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of Food Protection*. 70. 623 - 628.
- Methner, U., Al-Shabibi, S., Meyer, H. 1995. Experimental oral infection of specific pathogen-free laying hens and cocks with *Salmonella* Enteritidis strains. *Journal of Veterinary Medicine*. 42. 459 - 469.
- Miyamoto, T., Horie, T., Baba, E., Sasai, K., Fukata, T., Arakawa, A. 1998. *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *Journal of Food Protection*. 61. 3. 350 - 353.

- Mohammed, H. H., Grashorn, M. A., Bessei, W. 2010. The effects of lighting conditions on the behaviour of laying hens. *Archiv für Geflügelkunde*. 74. 3. 197 - 202.
- Moorthy, M., Sundaresan, K., Viswanathan, K. 2000. Effect of feed and system of management on egg quality parameters of commercial White Leghorn Layers. *Indian Veterinary Journal*. 77. 233 - 236.
- Mostert, B. E., Bowes, E. H., Van der Walt, J. C. 1995. Influence of different housing systems on the performance of hens of four laying strains. *Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Veekunde*. 25. 80 - 86.
- Musgrove, M. T. 2004. Effect of processing on the microbiology of commercial shell eggs. Doctoral dissertation. University of Georgia. Athens.
- Narváez-Solarte, W., Rostagno, H. S., Soares, P. R., Uribe-Velasquez, L. F., Silva, M. A. 2006. Nutritional requirement of calcium in white laying hens from 46 to 62 wk of age. *International Journal of Poultry Science*. 5. 181 - 184.
- Nascimento, V. P., Solomon, S. E. 1991. The transfer of bacteria (*Salmonella* Enteritidis) across the eggshell wall of eggs classified as poor quality. *Animal Technology*. 42. 157 - 165.
- 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.
- Nedomová, Š., Simeonovová, J. 2007. Effect of storage time on quality of eggs. In: Book of abstracts „XVIIIth European symposium on the quality of poultry meat and XIIth European symposium on the quality of eggs and egg products“, Prague, Czech Republic. 286 - 287.
- Nicholls, T. J., Goldsmith, A. R., Dawson, A. 1988. Photofracturiness in birds and comparison with mammals. *Physiological Reviews*. 68. 133 - 176.
- Okamura, M., Kamijima, Y., Miyamoto, T., Tani, H., Sasai, K., Baba, E. 2001. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Diseases*. 45. 61 - 69.
- Orel, V. 1959. The *Pseudomonas* spoilage of eggs laid by individual hens. *Poultry Science*. 38. 8 - 12.
- Padron, M. N. 1990. *Salmonella* typhimurium penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian Diseases*. 34. 463 - 465.

- Parisi, M. A., Northcutt, J. K., Smith, D. P., Steinberg, E. L., Dawson, P. L. Microbiological contamination of shell eggs produced in conventional and free-range housing systems. *Food Control*. 47. 161 - 165.
- Paul, J., Batchelor, B. 1988. *Salmonella* Enteritidis phage type 4 and hen's eggs. *Lancet* ii. 1421.
- Pavlovski, Z., Hopic, S., Lukic, M. 2001. Housing systems for layers and egg quality. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 17. 197 - 201.
- Peebles, E. D., McDaniel, Ch. D. 2004. A practical manual for understanding the shell structure of broiler hatching eggs and measurements of their quality. Office of Agricultural Communications. Division of Agriculture, Forestry, and Veterinary Medicine. Mississippi State University. 16 s.
- Perales, I., Audicana, A. 1988. *Salmonella* Enteritidis and eggs. *Lancet* ii. 1133.
- Pišťeková, V., Hovorka, M., Večerek, V., Straková, E., Suchý, P. 2006. The quality comparison of eggs laid by laying hens kept in battery cages and in a deep litter system. *Czech Journal of Animal Science*. 51. 318 - 325.
- Prescott, N. B., Watches, C. M. 1999. Spectral sensitivity of domestic fowl (*Gallus g. domesticus*). *British Poultry Science*. 40. 332 - 339.
- 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, *Conference proceedings - Xth European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products*. Saint-Brieuc. Ploufragan. France. 142 - 149.
- Pyrzak, R., Siopes, T. D. 1986. The effect of color light on egg quality of turkey hens in cage. *Poultry Science*. 65. 1262 - 1267.
- Pyrzak, R., Snapir, N., Goodman, G., Perek, M. 1987. The effect of light wavelength on the production and quality of eggs of the domestic hen. *Theriogenology*. 28. 947 - 960.
- 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.
- Radkowski, M. 2002. Effect of moisture and temperature on survival of *Salmonella* Enteritidis on shell eggs. *Archiv für Geflügelkunde*. 66. 119 - 123.
- Radon, K., Weber, C., Iversen, M., Danuser, B., Pedersen, S., Nowak, D. 2001. Exposure assessment and lung function in pig and poultry farmers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 58. 405 - 410.
- Ragni, L., Al-Shami, A., Mikhaylenko, G., Tang, J. 2007. Dielectric characterization of hen eggs during storage. *Journal of Food Engineering*. 82. 450 - 459.

- Reiber, M. A., Conner, D. E., Bilgili, S. F. 1995. *Salmonella* colonization and shedding patterns of hens inoculated via semen. *Avian Diseases*. 39. 317 - 322.
- Reinke, W. C., Baker, R. C. 1966. Relation between carbon dioxide permeability and bacterial penetration in chicken egg shell models. *Poultry Science*. 45. 1327 - 1334.
- Ricke, S. C., Birkhold, S. G., Gast, R. K. 2001. Eggs and egg products. Pages 473 - 479 in *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th ed., F. P. Downes and K. Ito eds. American Public Health Assoc. Washington D.C.
- Roberts, J. R., Brackpool, C. E. 1994. The ultrastructure of the avian egg shells. *Poultry Science Reviews*. 5. 245 - 272.
- Roberts, J. R., Brackpool, C. E., Solomon, S. E. 1995. The ultrastructure of good and poor quality eggshells from Australian layer strains. In *Proceedings of the 6th European symposium on the quality of eggs and egg products* (pp. 107 - 115). Zaragoza: WPSA.
- Roberts, J. R. 2004. Factors affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens. *The Journal of Poultry Science*. 41. 3. 161 - 177.
- Rodenboog, H. 2001. Sodium, green, blue, cool or warm-white light? *World Poultry*. 17. 12. 22 - 23.
- Roland, D. A., Gordon, R. 1997. Phosphorus, calcium optimization requires new approach. *Feedstuffs*. 7. 14.
- Romanoff, A. L., Romanoff, A. J. 1949. *The Avian Egg*. Wiley. New York.
- Rozenboim, I., Silberman, E., Gvarahu, G. 1998. New monochromatic light source for laying hens. *Poultry Science*. 77. 1695 - 1698.
- Safaa, H. M., Serrano, M. P., Valencia, D. G., Frikha, M., Jiménez-Moreno, E., Mateos, G. G. 2008. Productive performance and egg quality of brown egg-laying hens in the late phase of production as influenced by level and source of calcium in the diet. *Poultry Science*. 87. 2043 - 2051.
- Samiullah, S., Roberts, J. R., Chousalkar, K. K. 2014. Effect of production system and flock age on egg quality and total bacterial load in commercial laying hens. *Journal of Applied Poultry Research*. 23.1. 59 - 70.
- Samli, H. E., Agma, A., Senkoylu, N. 2005. Effects of storage time and temperature on egg quality in laying hens. *Journal of Applied Poultry Research*. 14. 548 - 553.
- Sas Institute Inc. 2003. *The SAS System for Windows*. Release 9.1.
- Sauter, E. A., Petersen, C. F. 1974. The effect of egg shell quality on penetration by various *Salmonella*. *Poultry Science*. 53. 2159 - 2162.

- Savory, C. J., Mann, J. S. 1999. Feather pecking in groups of growing bantams in relation to floor litter substrate and plumage colour. *British Poultry Science*. 40. 565 - 572.
- Scott, T. A., Silversides, F. G. 2000. The effect of storage and strain of hen on egg quality. *Poultry Science*. 79. 1725 - 1729.
- Sekeroglu, A., Sarica, M., Demir, E., Uluta, Z., Tilki, M., Saatci, M. 2008. The effects of housing system and storage length on the quality of eggs produced by two lines of laying hens. *Archiv für Geflügelkunde*. 72. 3. 106 - 109.
- Sellier, N., Vidal, M. L., Baron, F., Michel, J., Gautron, J., Protais, M., Beaumont, C., Gautier, M., Nys, Y. 2007. Estimations of repeatability and heritability of egg albumen antimicrobial activity and of lysozyme and ovotransferrin concentrations. *British Poultry Science*. 48. 5. 559 - 566.
- Shivaprasad, H. L., Timoney, J. F., Morales, S., Lucio, B., Baker, R. C. 1990. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis infection in laying hens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serological responses. *Avian Diseases*. 34. 548 - 557.
- Schäfer, A., Drewes, W., Schwagele, F. 1999. Effect of storage temperature and time on egg white protein. *Die Nahrung*. 43. 86 - 89.
- Schumaier, G., Harrison, P. C., McGinnis, J. 1968. Effects of colored fluorescent light on growth, cannibalism and subsequent egg production of single comb White Leghorn pullets. *Poultry Science*. 47. 1599 - 1602.
- Schwarz, G., Kobe, A., Fries, R. 1999. Microflora on egg shells from different housing systems. *Archiv für Geflügelkunde*. 63. 5. 220 - 224.
- Silversides, F. G., Villeneuve, P. 1994. Is the Haugh unit correction for egg weight valid for eggs stored at room temperature? *Poultry Science*. 73. 50 - 55.
- Silversides, F. G., Scott, T. A. 2001. Effect of storage and layer age on quality of eggs from two lines of hens. *Poultry Science*. 80. 1240 - 1245.
- Silyn-Roberts, H. 1983. Interior openings of functional pores in the avian egg shell: identification with the scanning electron microscope. *British Poultry Science*. 24. 497 - 499.
- Simons, P. C. M. 1971. *Ultrastructure of the Hen Eggshell and its Physiological Interpretation*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen. The Netherlands.
- Singh, R., Cheng, K. M., Silversides, F. G. 2009. Production performance and egg quality of four strains of laying hens kept in conventional cages and floor pens. *Poultry Science*. 88. 256 - 264.

- 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.
- Smith, A., Rose, S. P., Wells, R. G., Pirgozliev, V. 2000. The effect of changing the excreta moisture of caged laying hens on the excreta and microbial contamination of their egg shells. *British Poultry Science*. 41. 168 - 173.
- Solangi, A. H., Rind, M. I., Solangi, A. A., Shahani, N. A., Rind, A. N., Solangi, S. H. 2004. Influence of lighting on production and agonistic behaviour of broiler. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 3. 285 - 288.
- Solomon, S. E. 1991. *Egg and Eggshell Quality*. Wolfe Publishing. London. 149 s.
- Solomon, S. E. 1997. *Egg and eggshell quality*. Iowa State University Press. USA. 149 s.
- Sparks, N. H. C. 1987. The hen's eggshell: A resistance network. *Aslib Index Theses*. 36. 294.
- Sparks N. H. C. 1994. Shell accessory materials: structure and function. In: *Microbiology of the Avian Egg*, (Board and R. Fuller eds). Chapman and Hall. London s. 25 - 42.
- Stadelman, W. J., Cotterill, O. J. 1995. *Egg science and technology*. The Haworth Press. London. 563 s.
- Stevens, L. 1996. Egg proteins: What are their functions. *Science Progress*. 79. 65 - 87.
- Swierczewska, E., Kopec, W., Noworyta-Glowacka, J., Ridel, J. 2003. Activity of biologically-active components of egg white depending on breeding system of hens. *Medycyna Weterynaryjna*. 59. 157 - 160.
- Swierczewska, E., Skiba, T., Sokolowska, A., Noworyta-Glowacka, J., Kopec, W., Korzeniowska, M., Bobak, L. 2005 Egg white biologically active proteins activity in relation to laying hen's age. *Materials of XI European Symposium on the quality of eggs and egg products*. Doorwerth. The Netherlands. WPSA. 23 - 26 May 2005.
- Takai, H., Pedersen, S., Johnsen, J. O., Metz, J. H. M., Groot Koerkamp, P. W. G., Uenk, G. H., Phillips, V. R., Holden, M. R., Sneath, R. W., Short, J. L., White, R. P., Hartung, J., Seedorf, J., Schroder, M., Linkert, K. H., Wathes, C. M. 1998. Concentrations and emissions of airborne dust in livestock buildings in Northern Europe. *Journal of Agricultural Engineering Research*. 70. 59 - 77.
- Tanaka, T., Hurnik, J. F. 1992. Comparison of behavior and performance of laying hens housed in battery cages and an aviary. *Poultry Science*. 62. 1155 - 1159.
- Tauson, R., Wahlström, A., Abrahamsson, P. 1999. Effect of two floor housing systems and cages on health, production, and fear response in layers. *The Journal of Applied Poultry Research*. 8. 152 - 159.

- Tauson, R. 2005. Management and housing systems for layers - effect on welfare and production. *Worlds Poultry Science Journal*. 61. 477 - 490.
- Trziszka, T., Dobrzański, Z., Oziemblowski, M., Jarmoluk, A., Krasnowska, G. 2004. An attempt to compare the quality of chicken eggs from cage system and ecological production. *Archiv für Geflügelkunde*. 68. 6. 269 - 274.
- Trziszka, T., Kopec, W., Skiba, T., Dobrzanski, Z. 2006. Proteinases activity inhibitors in the egg white depending on various housing systems of egg layers. In: *Materials of the XII European poultry Conference*. 10 - 14 09. 2006. Verona. *World's Poultry Science Journal*. Supplement. 62. 171. CD Abstract and Proceedings. EPC 2006.
- Thomson, B. K., Hamilton, R. M. G., Grunder, A. A. 1985. The relationship between laboratory measures of egg shell quality and breakage in commercial egg washing and candling equipment. *Poultry Science*. 64. 901 - 909.
- Tůmová, E., Ebeid, T. 2005. Effect of time of oviposition on egg quality characteristics in cages and in a litter housing system. *Czech Journal of Animal Science*. 50. 129 - 134.
- Tůmová, E. 2007. Vliv systému ustájení a výživy na kvalitu masa a vajec drůbeže. [online]. Praha. Výzkumný ústav živočišné výroby. [cit. 24. dubna 2014]. Dostupné z: <http://www.vuzv.cz/sites/File/studie_tumova_10-09.pdf>.
- Tůmová, E., Englmaierová, M., Ledvinka, Z., Charvátová, V. 2011. Interaction between housing system and genotype in relation to internal and external egg quality parameters. *Czech Journal of Animal Science*. 56. 11. 490 - 498.
- Valkonen, E., Venäläinen, E., Rossow, L., Valaja, J. 2008. Effects of dietary energy content on the performance of laying hens in furnished and conventional cages. *Poultry Science*. 87. 844 - 852.
- Valkonen, E., Venäläinen, E., Rossow, L., Valaja, J. 2010. Effects of calcium diet supplements on egg strength in conventional and furnished cages, and effects of 2 different nest floor materials. *Poultry Science*. 89. 2307 - 2316.
- Van Delden, Ch., Iglewski, B. H. 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging infectious diseases* 4. 4. 551.
- Van den Brand, H., Parmentier, H. K., Kenp, B. 2004. Effects of housing system (outdoor vs cages) and age of laying hens on egg characteristics. *British Poultry Science*. 45. 745 - 752.
- Vazques-Torres, A., Jones-Carson, J., Baumler, A. J., Falkow, S., Valdivia, R., Brown, W., Le, M., Berggren, R., Parks, W. T., Fang, F. C. 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18 - expressing phagocytes. *Nature*. 401. 804 - 808.

- Vigh, B., Manzano, M. J., Zadora, A., Frnak, C. L., Lukats, A., Rohlich, P., Szel, A., David, C. 2002. Nonvisual photoreceptors of the deep brain, pineal organs and retina. *Histopathology*. 17. 2. 555 - 590.
- Vits, A., Weitzenburger, D., Hamann, H., Distl, O. 2005. Production, egg quality, bone strength, claw length, and keel bone deformities of laying hens housed in furnished cages with different group sizes. *Poultry Science*. 84. 1511 - 1519.
- Voslářová, E., Hanzalek, V., Večerek, V., Straková, E., Suchý, P. 2006. Comparison between latiny hen performance in the cage system and deep liter system on a diet free from animal protein. *Acta Veterinaria Brno*. 75. 219 - 225.
- Vučemilo, M., Vinković, B., Matković, K., Štoković, I., Jakšić, S., Radović, S., Granić, K., Stubičan, D. 2010. The influence of housing systems on the air quality and bacterial eggshell contamination of table eggs. *Czech Journal of Animal Science*. 55. 6. 243 - 249.
- Wall, H., Tauson, R. 2002. Egg quality in furnished cages for laying hens - Effects of cracked reduction measures and hybrid. *Poultry Science*. 81. 340 - 348.
- Wall, H., Tauson, R., Elwinger, K. 2002. Effect of nest design, passages and hybrid on use of nest and production performance of layers in furnished cages. *Poultry Science*. 81. 333 - 339.
- Wall, H., Tauson, R. 2007. Perch arrangements in small group furnished cages for laying hens. *Journal of Applied Poultry Research*. 16. 322 - 330.
- Wall, H., Tauson, R., Sorgjerd, S. 2008. Bacterial Contamination of Eggshells in Furnished and Conventional Cages. *Journal of Applied Poultry Research*. 17. 11 - 16.
- 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. 276 - 279.
- Wang, X. L., Zheng, J. X., Ning, Z. H., Qu, L. J., Xu, G. Y., Yang, N. 2009. Laying performance and egg quality of blueshelled layers as affected by different housing systems. *Poultry Science*. 88. 1485 - 1492.
- Wang, J., Omana, D. A., Wu, J. 2012. Effect of shell eggs storage on ovomucin extraction. *Food Bioprocess Technology*. 5. 2280 - 2284.
- Wathes C. M. 1994. Air and surface hygiene. In: Wathes C. M., Charles D. R. (eds.): *Livestock Housing*. CAB International, Wallingford, Great Britain, 123-148.

- 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.
- Woodard, A. E., Moore, J. A., Wilson, W. O. 1969. Effect of wave length of light on growth and reproduction in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Poultry Science*. 48. 118 - 123.
- Wong Liong, J., Frank, J., Bailey, S. 1997. Visualization of eggshell membranes and their interaction with *Salmonella* Enteritidis using confocal scanning laser microscopy. *Journal of Food Protection*. 60. 1022 - 1028.
- Yüceer, M., Caner, C. 2014. Antimicrobial lysozyme-chitosan coatings affect functional properties and shelf life of chicken eggs during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94. 153 - 162.