

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**MIKROBIOLOŠKO ONEČIŠĆENJE LJUSKE
KOKOŠJIH JAJA IZ RAZLIČITIH PROIZVODNIH
UZGOJA**

DIPLOMSKI RAD

Nikolina Blatarić

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Agroekologija – Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**MIKROBIOLOŠKO ONEČIŠĆENJE LJUSKE
KOKOŠJIH JAJA IZ RAZLIČITIH PROIZVODNIH
UZGOJA**

DIPLOMSKI RAD

Nikolina Blatarić

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Kozačinski

Neposredni voditelj: izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Nikolina Blatarić**, JMBAG 1003089170, rođen/a dana 19.01.1993. u Varaždinu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

MIKROBIOLOŠKO ONEČIŠĆENJE LJUSKE KOKOŠJIH JAJA IZ RAZLIČITIH PROIZVODNIH UZGOJA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Nikolina Blatarić**, JMBAG 10030089170, naslova

**MIKROBIOLOŠKO ONEČIŠĆENJE LJUSKE KOKOŠJIH JAJA IZ RAZLIČITIH
PROIZVODNIH UZGOJA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Prof. dr. sc. Lidija Kozačinski mentor

Izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec neposredni voditelj

2. Izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec član

3. Izv. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka član

Zahvala

Veliku zahvalnost u izradi diplomskog rada dugujem svojoj mentorici koja mi je svojom srdačnošću i toplinom predano pomagala tijekom pisanja rada. Hvala vam na razumijevanju i strpljenju te na svakoj riječi podrške koju ste mi pružili.

Zahvaljujem docentu Zdolcu na pomoći prilikom odrađivanja praktičnog dijela u laboratoriju.

Hvala svim mojim dragim i bliskim osobama koji su mi velika podrška i koji su bili tu uz mene u svim teškim i sretnim trenucima i koji su mi pružili nezaboravne studentske dane.

Najveću zaslugu za svoja postignuća pripisujem svojoj obitelji, a posebno roditeljima koji su uvijek bili uz mene, koji su mi omogućili da danas budem to što jesam i koji mi svakodnevno pružaju podršku u ostvarenju mojih snova svojom nesebičnom ljubavlju i potporom.

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Nikolina Blatarić**, naslova

MIKROBIOLOŠKO ONEČIŠĆENJE LJUSKE KOKOŠJIH JAJA IZ RAZLIČITIH PROIZVODNIH UZGOJA

Kokošje jaje pripada osnovnoj namirnici u prehrani ljudi i iznimno je bogato hranjivim tvarima, no jednako tako može biti izvorom raznih mikroorganizama te uzrok otrovanja ljudi. Zato je bitno brinuti o procesu proizvodnje jaja, od nesenja pa sve do njihove distribucije i prodaje. Cilj rada bio je istražiti i usporediti mikrobiološku kvalitetu ljuske konzumnih jaja koja se nalaze u prodaji na našem tržištu te opisati načine uzgoja. Analizirana jaja bila su porijeklom iz kaveznog (konvencionalan) te slobodnog i podnog (alternativni) uzgoja. Za mikrobiološku pretragu ljuske pripremljeni su ispirci ljusaka jaja koji su pretraženi na ukupni broj aerobnih mezofilnih bakterija, prisutnost enterokoka i bakterije *Escherichia coli*. Bez obzira na način uzgoja nesilica, broj aerobnih mezofilnih bakterija nije pokazivao velika odstupanja i bio na razini od 3,5 do 3,9 log₁₀. Broj enterokoka prosječno je iznosio 2,8 log₁₀ CFU/ml na ljusci jaja iz slobodnog, 2,3 log₁₀ CFU/ml iz podnog te 1,1 log₁₀ CFU/ml iz kaveznog uzgoja. Bakterija *E. coli* je utvrđena u broju manjem od 10 CFU/ml isprika.

Ključne riječi: kokošja jaja, proizvodni uzgoji, mikrobiološko onečišćenje

Summary

Of the master's thesis – student **Nikolina Blatarić**, entitled

MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF HEN'S EGGSHELL IN DIFFERENT HOUSING SYSTEMS

Hen's egg belongs to basic foodstuffs in human nutrition and it is extremely rich in nutrients, but also can be the source of various microorganisms and the cause of human poisoning. That is why it is important to worry about the process of egg production from laying to distribution and selling. The aim of this study was to investigate and compare the microbiological quality of the eggshells that are sold on our market and to describe housing systems. The analyzed eggs are originated from battery cages (conventional), free range and deep litter housing systems (alternative). Eggshell's lavages were prepared for the microbiological examination of the eggshell and were searched for the total number of aerobic mesophilic bacteria, the presence of enterococci and bacteria *Escherichia coli*. Regardless of the housing system, the number of the aerobic mesophilic bacteria did not show large deviations and was at the level 3,5 to 3,9 log₁₀. The average number of enterococci was 2,8 log₁₀ CFU/ml on eggshell from free range, 2,3 log₁₀ CFU/ml from deep litter and 1,1 log₁₀ CFU/ml from battery cage. *E. coli* was found to be below 10 CFU/ml of lavage.

Keywords: hen's eggs, housing systems, microbiological contamination

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Dosadašnje spoznaje.....	3
2.1. Sastav i građa jajeta.....	3
2.2. Tehnologija proizvodnje jaja.....	5
2.2.1. Kavezni način uzgoja nesilica	5
2.2.2. Alternativni načini uzgoja nesilica – podni uzgoj i slobodno držanje	7
2.3. Sakupljanje jaja.....	10
2.4. Klasiranje jaja.....	10
2.5. Pakiranje i skladištenje jaja	12
2.6. Konzerviranje jaja.....	12
2.7. Mikrobiološka kvaliteta jaja	13
3. Materijali i metode istraživanja	19
3.1. Postupak mikrobiološke pretrage	19
4. Rezultati i rasprava	21
5. Zaključak.....	27
6. Popis literature.....	28
Životopis	31

1. Uvod

Kokošja jaja jedna su od najosnovnijih namirnica u ljudskoj prehrani. Odličan su izvor bjelančevina, masti, ugljikohidrata, minerala te nekih od najvažnijih vitamina. Jedno jaje (ovisno o veličini) osigurava između 4,5 – 6 g bjelančevina, a polovica te količine nalazi se u bjelanjku koji se smatra idealnim izvorom bjelančevina jer sadrži sve esencijalne aminokiseline u pravim omjerima. Od ukupnih masti u jajetu, više od polovice otpada na nezasićene masne kiseline. Jaja su nadalje dobar izvor kolina, luteina, željeza, riboflavina (vitamina B2), folne kiseline, biotina, vitamina B12, vitamina D te vitamina E. Jaja sadrže i tvari koje povoljno djeluju na ljudsko zdravlje te smanjuju rizik od različitih bolesti. Biološka vrijednost bjelančevina, jajeta iznosi 94, što znači da od 100 g bjelančevina ljudski organizam može izgraditi 94 g vlastitih. Na našim prostorima, od sve peradi, najviše se proizvode i konzumiraju jaja kokoši. Široka potrošnja u svakodnevnoj ljudskoj prehrani te činjenica da su izvor različitih hranjivih tvari, govori kolika je važnost kokošjih jaja. Osim toga, jaja se koriste i u medicini i farmaciji za proizvodnju jeftinih i kvalitetnih imunoglobulina te cjepiva.

Posljednjih godina događale su se mnoge promjene kako u samoj proizvodnji tako i u postupcima rukovanja s jajima. Mnoge te promjene doprinijele su mikrobiološkim izazovima s kojima se suočavamo i danas. *Salmonella enterica* serovar Enteridis (SE) i nadalje ima najveću ulogu u mikrobiološkoj kontaminaciji jaja. Ako su loše mikrobiološke kvalitete, jaja mogu biti izvor različitih mikroorganizama, a samim time uzrok otrovanja ljudi. Iako jaja imaju prirodne fizikalne i kemijske mehanizme koji ih štite od štetnih mikroba, njihova mikrobiološka ispravnost ovisi i o čimbenicima iz okoliša, a posebice tijekom proizvodnje, te kasnije pri manipulaciji kod sortiranja, pakiranja i skladištenja jaja. Iz tog razloga bitno je obratiti pažnju na preventivu u proizvodnim uzgojima i samim time provoditi higijenske mjere u cjelokupnoj proizvodnji, od nesenja jajeta, preko pakiranja pa sve do njegovog ciljnog odredišta kod potrošača. Stoga se danas sve više važnosti pridaje načinu držanja kokoši nesilica prema postulatima dobrobiti životinja. Prijašnjih godina uzgoj kokoši nesilica uglavnom se odvijao na konvencionalan način u neobogaćenim kavezima što je danas zabranjeno zbog loših životnih uvjeta. Danas se primjenjuje konvencionalni uzgoj u obogaćenim kavezima s poboljšanim uvjetima te alternativni načini uzgoja, odnosno slobodno držanje, poluintenzivno držanje, podni način držanja, etažno držanje u staji te ekološko držanje kokoši. Svaki od tih uzgoja mora biti naveden na ambalaži u kojoj se jaja stavljaju na tržište, tako da je vidljiv potrošačima. Navedeni uzgoji međusobno se razlikuju pa shodno tome postoje prednosti i mane svakog od uzgoja koji utječu na kvalitetu jaja, a samo su svježja, neoplođena jaja određene veličine, pravilne, čiste i neoštećene ljuske najbolje kvalitete. S obzirom na široku svakodnevnu potrošnju jaja diljem svijeta, proizvođačima je veoma bitno osigurati da je jaje koje stigne do potrošača zdravstveno ispravan proizvod.

Cilj ovoga rada bio je istražiti mikrobiološku čistoću ljuske konzumnih jaja koja se nalaze u prodaji na našem tržištu. Također, opisat ćemo i načine držanja kokoši nesilica (podno, kavezno i slobodno držanje – free range) od kojih potječu uzorci jaja u našem istraživanju.

2. Dosadašnje spoznaje

2.1. Sastav i građa jajeta

Jaja su veoma kvalitetna namirnica čiji kemijski sastav sadrži sve hranjive tvari potrebne ljudskom organizmu - bjelančevine, masti, ugljikohidrate i minerale. Bitan su izvor esencijalnih aminokiselina. Osim toga, bogata su i vitaminima A, D, E, K te B-kompleksom. Svi bitni mikro i makro elementi (kalij, fosfor, željezo, jod, bakar, kobalt, magnezij, cink, mangan, kalcij itd.) sadržani su u jajetu (Samac i Senčić, 2017.).

Bjelanjak se sastoji od približno 90% vode u kojoj su otopljene različite bjelančevine (približno 10% bjelanjka). U bjelanjku nema masti, a ugljikohidrata ima oko 1%. Bjelanjak je, nakon ljuske, sljedeća crta obrane jajeta od mikroorganizama. Sadrži veliku količinu antimikrobnih tvari, uključujući transferine te enzim lizozim. Lizozim je sposoban razbiti čvrstu bakterijsku staničnu stijenku građenu od peptidoglikana te na taj način ubija bakterije.

Žumanjak sadrži otprilike 4% ugljikohidrata, 25% masti te 10 do 15% bjelančevina. U žumanjku se može naći velik broj antitijela koja čine još jedan način zaštite jajeta od bakterijskog napada. Boja žumanjka potječe od velikog broja karotenoidnih pigmenata koje sadrži (Betts, 2014.). Jaja su bogata i imunoglobulinima, posebice IgY koji je jeftinija zamjena za IgG dobiven od sisavaca. Odlično su sredstvo za proizvodnju cjepiva te imunoglobulina (Jurić i sur., 2005). Osim što daju boju, karotenoidni pigmenti (lutein i zeksantin) djeluju kao antioksidansi i imaju višestruki povoljni učinak na ljudsko zdravlje. Imaju utjecaj na dobar vid, uklanjaju slobodne radikale, djeluju na zdravlje srca i krvnih žila, snižuju razinu LDL kolesterola te imaju antikancerogeno djelovanje (Samac i Senčić, 2017.).

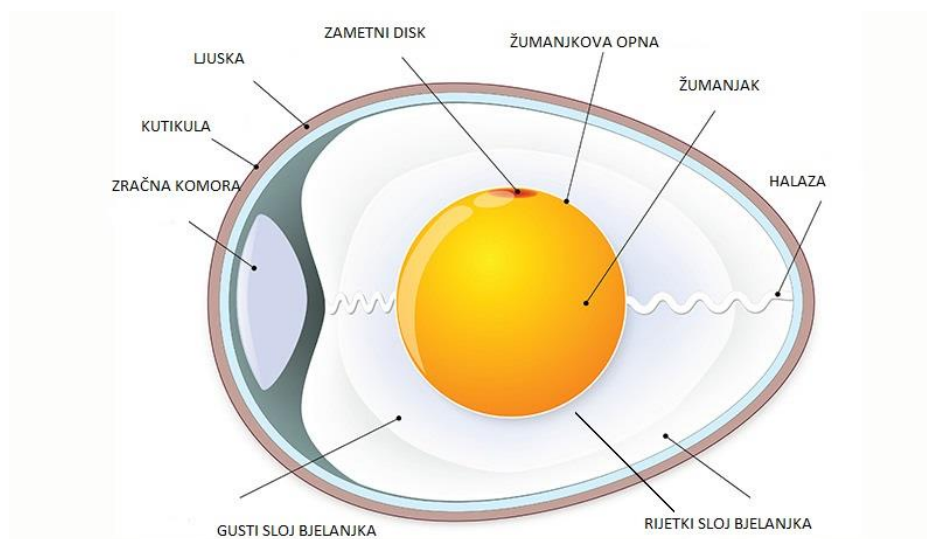
Jaja sadrže bjelančevine ovotransferin, ovoalbumin, lizozim, ovoinhibitor, ovomukoid, avidin, cistatin, fosvitin, livetin, flavoprotein. Glavni udio masti u jajetu čine trigliceridi sa 65% te fosfolipidi sa 32%. Javljuju se i steroli, od kojih je najviše kolesterola. Najznačajnije nezasićene masne kiseline u jajetu su oleinska, arahidonska te alfa-linolenska masna kiselina. Od zasićenih masnih kiselina najviše ima palmitinske te stearinske kiseline (Samac i Senčić, 2017.). Prema Grčeviću i sur. (2011.), moguće je modifikacijama u prehrani kokoši nesilica promijeniti profil masnih kiselina te dobiti veći udio vitamina i mikroelemenata s antioksidativnim djelovanjem te povoljnim djelovanjem na ljudsko zdravlje. Jaja proizvedena ovim postupkom pripadaju grupi funkcionalnih proizvoda koji predstavljaju zamjenu za različite dodatke prehrani.

Osnovne dijelove jaja čine ljuska, bjelanjak i žumanjak. Ljuska je tvrdi vapneni omotač koji se sastoji od organske tvari (mreže proteina) te minerala – kalcijevih i magnezijevih karbonata i fosfata. Postotni udio sadržaja ljuske iznosi 1,6% vode, 3,3% proteina te 95% anorganske tvari – uglavnom kalcijev karbonat (Jurić i sur., 2005). Uloga ljuske je ključna u održavanju sadržaja jajeta u dobrom stanju.

Sprječava prodor mikroorganizama u bjelanjak i žumanjak te omogućava izmjenu plinova i vlage zadržavajući jaje svježim tijekom duljeg vremena (Betts, 2014.). Struktura membrane u obliku mreže ima svrhu obrane od mikroorganizama djelujući tako da ih hvata u svoje kanale (Jurić i sur., 2005.). Na vanjskoj površini ljuske nalazi se kutikula. Ljuska jajeta sadrži mnogobrojne pore koje služe razmjeni plinova i na taj način omogućuju disanje zametka. Debljina ljuske kokošjeg jajeta varira između 0,26 mm i 0,36 mm. Na unutarnjoj strani ljuske nalaze se unutarnja i vanjska jajna opna. Na tupom dijelu jajeta nalazi se zračna komorica koja nastaje nakon nesjenja hlađenjem jajeta. Atmosferski zrak prodire kroz pore i stvara komoricu između unutarnje i vanjske opne. Zračna komorica služi kao indikator svježine jer se starenjem jaja njena veličina povećava.

Bjelanjak se sastoji od vanjskog sloja rijetkog bjelanjka, sloja gustog bjelanjka i unutarnjeg sloja rijetkog bjelanjka. Oko žumanjka nalaze se halaze – uvijene vrpce bjelanjka koje žumanjak drže u sredini (Senčić i Samac, 2017.). Međutim, tijekom skladištenja debeli bjelanjak postaje tanji što omogućuje veće pomicanje žumanjka (Jacqueline i sur., 1998.).

Žumanjak je omotan tankom snažnom žumanjkovom opnom. Boja mu varira od žute do narančaste. Sadrži tamnije i svjetlije nijanse boje koje se izmjenjuju u koncentričnim krugovima (Senčić i Samac, 2017.). Žumanjak se formira u jajniku. Na površini žumanjka nalazi se bijela mrljica, zametni disk veličine 2 mm. Prisutan je i kad jaje nije oplođeno, no onda sadrži samo genetički materijal kokoši. Ako je oplođeno, sadrži genetički materijal oba roditelja. Žumanjak je bogat hranjivim tvarima za razvoj embrija (Jacqueline i sur., 1998.).



Slika 1. Građa jajeta (Izvor: www.hobbyfarms.com)

2.2. Tehnologija proizvodnje jaja

Proizvodnja konzumnih jaja predstavlja proizvodnju jaja koja se koriste kao prehrambeni proizvod pa nisu oplođena kao kod roditeljskih jata. Proizvodnja jaja u našoj zemlji odvija se na tri načina, kao intenzivna proizvodnja na obiteljskim gospodarstvima, na velikim farmama i proizvodnim subjektima ili kao ekstenzivna proizvodnja na okućnicama (Senčić i sur., 2017.).

Postoje različiti načini uzgoja kokoši nesilica. Razlikujemo konvencionalni način proizvodnje u koji spada kavezno držanje te alternativne sustave koji se dijele na slobodno držanje, poluintenzivno držanje, podni način držanja, etažno držanje u staji te ekološko držanje kokoši. Način uzgoja mora biti naveden na samim jajima te pakiranju, a označava se na sljedeći način:

- 0 - jaja iz ekološkog uzgoja
- 1 – jaja iz slobodnog uzgoja
- 2 – jaja iz podnog uzgoja
- 3 – jaja iz kaveznoga (baterijskog) uzgoja

Crnčan i sur. (2013.) navode da su proizvođači jaja u Hrvatskoj skloniji kaveznom uzgoju nesilica nego alternativnim načinima. Zaključak temelje na podacima prema kojima od ukupnog broja farmi njih 25 drži 27.763 nesilica u slobodnom uzgoju, u 22 farme ukupnog kapaciteta 270.416 komada nesilica proizvodnja je organizirana u stajskom uzgoju, a čak u 31 farmi, ukupnog kapaciteta 1,069.964 nesilica proizvodnja se odvija u obogaćenim kavezima. Također, u porastu je i držanje peradi prema ekološkim principima proizvodnje.

2.2.1. Kavezni način uzgoja nesilica

Ovo je konvencionalni način uzgoja nesilica koje se drže u kavezima. Taj tip uzgoja najzastupljeniji je u proizvodnji konzumnih jaja, no postoje određeni uvjeti prema standardima EU koje se mora zadovoljiti u svrhu dobrobiti nesilica. Od 1. siječnja 2012. godine, uzgoj nesilica u klasičnim, neobogaćenim kavezima je zabranjen i zamijenjen uzgojem u obogaćenim kavezima s poboljšanim uvjetima držanja nesilica.

Prema Pravilniku o minimalnim uvjetima za zaštitu kokoši nesilica (NN 77/10) kokoši nesilice moraju imati:

- najmanje 750 cm² površine kaveza po kokoši, od čega 600 cm² korisne površine. Visina kaveza, osim visine nad korisnom površinom, mora biti

najmanje 20 cm na svakoj točki, a ukupna površina ni kod jednog kaveza ne smije biti manja od 2 000 cm²;

- gnijezdo te stelju koja omogućava kljucanje i čeprkanje;
- odgovarajuće prečke minimalne dužine 15 cm po kokoš;
- hranilicu minimalne dužine 12 cm po kokoši, koja se može koristiti bez ograničenja;
- sustav za napajanje dostatan broju kokoši, a ako se koriste kapljične pojilice ili šalice za napajanje, minimalno 2 moraju biti dostupne svakoj kokoši;
- u svrhu lakše kontrole, naseljavanja ili vađenja kokoši, prolaz među pojedinim redovima kaveza mora biti širok minimalno 90 cm, a udaljenost od poda objekta do prvog reda kaveza mora iznositi minimalno 35 cm,
- odgovarajuće materijale za trošenje kandži.

Kavezi i ostala oprema smještaju se u peradnjake, velike prostorije bez prozora jer se na taj način lakše održavaju najpovoljniji uvjeti za uzgoj. Obogaćeni kavezi sadrže dodatnu opremu koja osigurava udobnost i prirodnije ponašanje (pješčana kupka, prečke, gnijezdo, materijale za trošenje kandži i kljuna). Kod kaveznog načina uzgoja nesilica, svjetlost, temperatura i vlaga u peradnjacima održavaju se na umjetni način. Jaja se skupljaju u košarice koje se odvoze automatski po traci. Višak vlage, štetne plinove te višak topline uklanja sustav za prozračivanje. Koriste se brzinski ventilatori koji ne stvaraju buku. Rasvjetni sustav omogućava ujednačeno osvjetljenje te jačinu svjetlosti. Svjetlost se regulira pomoću posebnog mehanizma, a koriste se klasične, halogene i neonske žarulje. Izvori svjetlosti moraju biti jednako udaljeni i redovno očišćeni da se spriječi prikupljanje prašine. Svjetlo igra bitnu ulogu u proizvodnji jaja jer djeluje stimulacijski na količinu nesenja (preko hipotalamusa i hipofize). Na samom početku proizvodnje, potrebno je postupno produljivati dnevno svjetlo do 30 minuta tjedno sve do postizanja maksimalno 15 sati dnevnog svjetla. Nakon toga, ovo trajanje dnevnog svjetla se održava do završetka proizvodnog ciklusa. Da ne bi došlo do pada produktivnosti, bitno je održavati temperaturu i relativnu vlažnost u peradnjacima. Optimalna temperatura iznosi 15-20 °C, a vlažnost zraka 60-70%. Hranilice se postavljaju s vanjske strane kaveza, a hranjenje se također odvija automatski. Izmet se uklanja automatski, pomoću pogona s trakama koje se nalaze ispod žičanog poda i odvoze izmet iz peradnjaka. Da bi se spriječilo širenje zaraznih bolesti, kokoši moraju biti iste starosti i iz istog uzgoja (Samac i Senčić, 2017.).



Slika 2. Kavezni način uzgoja (Izvor: www.agroklub.com)

2.2.2. Alternativni načini uzgoja nesilica – podni uzgoj i slobodno držanje

S obzirom na sve veću svjesnost javnosti o potrebi zaštite dobrobiti životinja, u mnogim državama se umjesto kaveznog uzgoja uvode alternativni načini uzgoja. Njihovom primjenom omogućuje se kokošima prirodniji način života i bolji uvjeti. Unatoč tome, i dalje su slabije zastupljeni zbog nedostataka u odnosu na kavezni uzgoj, kao što su slabija higijena, manja produktivnost, veći broj razbijenih jaja, otežana provjera zdravstvenog stanja, češća pojava kanibalizma, veći troškovi i drugo (Samac i Senčić, 2017.).

Alternativni načini uzgoja moraju također prema Pravilniku o minimalnim uvjetima za zaštitu kokoši nesilica (NN 77/10) zadovoljavati sljedeće uvjete:

- minimalno 10 cm prostora za hranjenje po kokoši kod ravnih hranilica ili minimalno 4 cm prostora za hranjenje po kokoši kod okruglih hranilica;
- minimalno 2,5 cm prostora za piće po kokoši kod ravnih pojilica ili minimalno 1 cm prostora za piće po kokoši kod okruglih pojilica;
- kod napajanja kapljičnim pojilicama ili šalicama za napajanje mora biti minimalno jedna pojilica ili šalica za napajanje na 10 kokoši;
- ako su mjesta za napajanje opskrbljena fiksno postavljenim pojilicama, tada se u dometu svake kokoši moraju nalaziti barem po 2 šalice za napajanje ili 2 kapljične pojilice;

- minimalno jedno gnijezdo na sedam kokoši, a ako se koriste zajednička gnijezda, mora biti osigurano minimalno 1 m² površine gnijezda za maksimalno 120 kokoši;
- minimalno 15 cm dužine odgovarajuće prečke bez oštih rubova po kokoši;
- prečke ne smiju biti postavljene iznad stelje, a vodoravna udaljenost među pojedinim prečkama mora iznositi minimalno 30 cm, a između prečki i zida minimalno 20 cm;
- minimalno 250 cm² površine sa steljom po kokoši, pri čemu stelja mora pokrivati minimalno trećinu površine poda;
- podovi moraju biti oblikovani tako da na odgovarajući način podupiru svaki prema naprijed okrenuti prst svake noge;
- kod načina uzgoja pri kojem se kokoši nesilice mogu slobodno kretati među pojedinačnim etažama ne smije biti više od 4 etaže, visina među pojedinim etažama mora iznositi minimalno 45 cm, pojllice i hranilice moraju biti raspoređene na način da su jednako dostupne svim kokošima, a etaže moraju biti uređene tako da se spriječi padanje fecesa na donje etaže;
- kod načina uzgoja pri kojem kokoši nesilice imaju uređen ispust potrebno je osigurati više otvora za neposredan izlazak u ispust, minimalne visine 35 cm i minimalne širine 40 cm te razmještenih po cijeloj dužini objekta, na skupinu od 1000 kokoši zajednički otvor mora iznositi minimalno 2 m, ispusti moraju imati površinu primjerenu gustoći naseljenosti i prirodi terena da bi se spriječilo bilo kakvo zagađenje i sklonište od nepovoljnih vremenskih uvjeta i grabežljivaca, te ako je potrebno, odgovarajuće pojllice duž ispusta, a gustoća naseljenosti ne smije biti veća od 9 kokoši nesilica po m² korisne površine.

Podni način držanja nesilica

Kod podnog načina držanja kokoši nesilica, one se nalaze na površini pokrivenoj steljom. Pod steljom podrazumijevamo slamu, drvenu hoblovinu, treset ili pijesak. Minimalno 1/3 poda mora biti prekrivena nekim od ovih materijala. Da bi se spriječilo širenje zaraznih bolesti, potrebno je redovito voditi brigu o zdravstvenom stanju kokoši i uklanjati uginule. Zbog očuvanja čistoće jaja, potrebno ih je skupljati nekoliko puta na dan te redovito stelju zamijeniti svježom. Higijena jaja kod podnog načina bolja je nego kod slobodnog držanja, jednostavnije je prikupljanje jaja te je potrebno manje ljudske radne snage. Kod ovog načina držanja kokoši nesu manje jaja nego kod kaveznog uzgoja, no više u odnosu na slobodno držanje (Samac i Senčić, 2017.).



Slika 3. Podni način držanja (Izvor: <http://www.toolsofchange.com>)

Slobodno držanje nesilica

Kod slobodnog držanja kokoši nesilice se tijekom dana slobodno kreću po vanjskom prostoru prekrivenom travom. Da bi se kokoši zaštitile od grabežljivaca, vanjski prostor potrebno je ograditi žičanom ogradom. Prednost ovog načina držanja je u slobodnom kretanju po svježem zraku te na taj način kokoši pokazuju prirodno karakteristično ponašanje. Loše strane su manja produktivnost u odnosu na ostale načine uzgoja, odnosno najmanji broj jaja po kokoši, utjecaj vanjskih klimatskih čimbenika na zdravstveno stanje kokoši, slabija higijena jaja, veća opasnost od pristupa grabežljivih životinja te glodavaca koji su potencijalni prenositelji zaraznih bolesti. Farme koje drže do 10 000 kokoši moraju imati nadstrešnice za zaklon od kiše te pojilice (Samac i Senčić, 2017.).

Senčić i sur. (2017.) proveli su istraživanje o proizvodnosti kokoši i o kvaliteti jaja iz ekološkoga i podnog sustava držanja te zaključili da su kokoši iz ekološkog uzgoja trošile više hrane i nesle manji broj jaja no bile su veće mase, žumanjak im je bio intenzivnije boje, a ljuska jajeta bila je deblja.

Senčić i sur. (2006.) utvrdili su da jaja iz slobodnog sustava držanja imaju intenzivniju boju žumanjka, veću masu, deblju ljusku te veći indeks oblika u odnosu na kavezni (konvencionalni) sustav držanja.



Slika 4. Slobodno držanje (Izvor: <http://www.willowzen.com.au>)

2.3. Sakupljanje jaja

U alternativnim načinima uzgoja nesilica, jaja se prikupljaju ručno nekoliko puta na dan (minimalno 2 puta). Razlog tome je gubitak kvalitete te sklonost jaja da poprime različite mirise. U kaveznom načinu uzgoja prikupljanje teče automatski. Kod nekih farmi sustav za prikupljanje jaja radi neprestano, dok se kod nekih automatski uključuje jednom na dan. Nakon što kokoš snese jaje, ono po kosom podu otkliže na sabirnu traku. Uključivanjem sustava za prikupljanje jaja, trakom se prenose do početka svake baterije. Zatim pomoću lifta koji jaja prikuplja po etažama odlaze u prostoriju gdje ih stroj za pakiranje automatski odlaže u kartonske podloge nakon čega odlaze u sortirnicu (Samac i Senčić, 2017.).

2.4. Klasiranje jaja

Nakon dopreme u sortirnicu, jaja se pregledaju s ciljem odvajanja razbijenih i prljavih jaja, a potom se prosvjetljavaju u mračnoj prostoriji kako bi se otkrile moguće greške jaja u smislu napukle ljuske, visine zračne komorice, promjena u sadržaju jaja ili mikrobiološke promjene koje uzorkuju bakterije i plijesni (Samac i Senčić, 2017.).

Jaja se, s obzirom na kakvoću, Prema Pravilniku o kakvoći jaja (NN 115/06) i Uredbi Komisije (EZ) 589/2008 dijele na:

- jaja „A“ klase ili svježja jaja,
- jaja „B“ klase namijenjena industrijskoj preradi

Prilikom pakiranja, jaja „A“ klase moraju ispuniti minimalno sljedeće uvjete:

- ljuska i pokožica je normalnog oblika, bez oštećenja i čista,
- zračna komora mora biti nepokrena i manja od 6 mm, a kod „ekstra“ jaja manja od 4 mm
- bjelanjak mora biti proziran, bistar i kompaktan
- žumanjak mora biti smješten u sredini jajeta, kod prosvjetljavanja mora se vidjeti kao sjena nejasnih obrisa, kod naglog okretanja nepokretan ili neznatno pokretan
- zametak treba biti neprimjetnog razvoja
- ne smiju biti prisutne strane tvari ni mirisi
- jaja „A“ klase ne smiju se prati ni na koji način čistiti ni prije ni nakon klasiranja
- jaja koja su oprana ne smiju se označiti oznakom jaja „A“ klase čak ni ako ispunjavaju ostale uvjete iz „A“ klase, a moraju biti označena natpisom „oprana jaja“
- jaja „A“ klase ne smiju se konzervirati ni hladiti na temperaturu nižu od 5°C
- jaja čuvana na temperaturi nižoj od 5°C kraće od 24 sata ne smatraju se hlađenima u slučaju da zaliha nije veća od količine koja se prodava u roku 3 dana
- hlađena jaja moraju nositi natpis „hlađena jaja“ i ne smiju biti označena kao „A“ klasa

Nakon prosvjetljavanja svako jaje se važe i zatim se odvajaju prema težini. S obzirom na težinu, jaja „A“ klase odvajaju se u razrede:

- XL, teža od 73 grama
- L, težine između 63 i 73 grama
- M, težine između 53 i 63 grama
- S, težine manje od 53 grama

Oznaka razreda stavlja se žigom na površinu ljuske bojom koja se ne ispiri i ne šteti zdravlju (Samac i Senčić, 2017.). U Republici Hrvatskoj potrošači uglavnom konzumiraju jaja razreda M (Kralik i sur., 2017.).

2.5. Pakiranje i skladištenje jaja

Prema Pravilniku o kakvoći jaja (N.N. br. 115/06) i Uredbi (589/06), na vanjskoj strani pakiranja mora biti jasno označen naziv i adresa tvrtke te trgovački znak tvrtke, broj proizvođača ili parkirnog centra, klasu i težinski razred, broj jaja, minimalni rok trajanja, pojedinosti o hlađenju i čuvanju jaja.

Ambalaža u kojoj se prodaju jaja mora biti suha, otporna na udarce, čista, a materijali od kojih se izrađuje ambalaža moraju biti otporni na mirise i loše utjecaje iz okoline (Samac i Senčić, 2017.).

Nakon što su upakirana u ambalažu u kojoj se prodaju, jaja se još stavljaju u prijevozna pakiranja i odlažu u rashladnim komorama na 15°C gdje su zaštićena od loših okolišnih utjecaja.

Prema Uredbi Komisije (EZ) br. 589/2008., jaja se trebaju skladištiti i transportirati na stalnoj temperaturi i u većini slučajeva ih ne treba hladiti prije prodaje. Ako ohlađena jaja stavimo na sobnu temperaturu, može se javiti kondenzacija koja djeluje pozitivno na rast bakterija na ljusci te njihov prodor unutar ljuske.

Jaja se do mjesta potrošnje ili prodaje prevoze vozilima koja su čista, suha, štite od štetnih vanjskih utjecaja te služe isključivo za transport jaja.

2.6. Konzerviranje jaja

Konzerviranje su svi fizički i kemijski postupci kojima se namirnice štite od raspadanja, truleži i drugih štetnih promjena. Postupak konzerviranja provodi se samo na svježim i neoštećenim jajima. S obzirom na sredstvo koje se koristi u postupku, konzerviranje se dijeli na:

- konzerviranje vapnenom vodom
- konzerviranje 10% natrij-silikatom
- konzerviranje pčelinjim voskom
- konzerviranje parafinom
- konzerviranje mineralnim uljima

Za svaki od ovih načina princip je isti, a njima se začepi pore na ljusci i na taj način prodor mikroorganizama unutar jajeta nije moguć, a istodobno se onemogućava i isparavanje vode iz jajeta (Samac i Senčić, 2017.).

2.7. Mikrobiološka kvaliteta jaja

Jaja su u jajovodu zdravih nesilica sterilna. Nakon nesenja, površina ljuske jajeta može biti kontaminirana različitim mikroorganizmima koji se nalaze u okolišu. Mikrobiološka kontaminacija jaja može dovesti do higijenskih problema te problema kvarenja jajeta, a posljedično dolazi i do opasnosti od trovanja potrošača. Najčešći izolirani serotip prilikom otrovanja ljudi u Hrvatskoj je *Salmonella* Enteritidis, u više od 90% izolata salmonela, jednako kao i u većini europskih zemalja (Mlinarić Galinović i sur., 2003.).

Kako navode Senčić i Samac (2017.), u pokvarenim jajima najviše su prisutne gram negativne bakterije, najčešće vrste *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Cloaca*, *Hafnia*, *Citrobacter*, *Proteus* i *Aeromonas*.

Prema Bakeru (1974.), najznačajnije patogene bakterije kod jaja su *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* te *Clostridium perfringens*.

Na površini ljuske jajeta može se naći velik broj vrsta roda *Salmonella* zbog toga što su česte u probavnom sustavu kokoši. Salmonele rijetko penetriraju kroz ljusku, osim ako se s jajima nepravilno rukuje. Ako ljuska jajeta dođe u doticaj s kontaminiranom vodom prilikom hlađenja, bakterije se mogu provući kroz ljusku unutar jajeta. Bitno je napomenuti da se u slučaju pranja jaja, hladna jaja moraju prati u toploj vodi, u suprotnom bi moglo doći do usisavanja bakterija u unutrašnjost jajeta (Baker, 1974.).

Salmonella spp. može biti povezana s jajima na dva načina: kontaminacijom preko peradi iz fekalnog materijala ili trans-ovarijalnom infekcijom koja se događa tijekom razvoja jajeta unutar jedinke. Kontaminacija ljuske može se kontrolirati pridavanjem pažnje higijenskim uvjetima, a trans-ovarijalna infekcija može se kontrolirati jedino osiguravanjem potpune odsutnosti salmonela u uzgoju. U kasnim osamdesetim godinama 20. stoljeća u Velikoj Britaniji došlo je do velikog porasta slučajeva humane salmoneloze, pa je devedesetih godina proveden program vakcinacije peradi što je rezultiralo drastičnom redukcijom kontaminacije peradi i jaja salmonelom (Betts, n.d.). Osim preko fecesa peradi, prijenos salmonela mogući je i putem glodavaca, farmera te kućnih ljubimaca (Jakopović i sur., 2016.).

Prema Duguidu i Northu (1991.), jaja snesena na vlažnu površinu zaprljanu fecesom privući će osim salmonela, velik broj bakterija uzročnika truljenja te fekalnih bakterija kao što su *Pseudomonas* spp. te gram negativni anaerobi. Neki od tih saprofita množiti će se brže od salmonela na sobnoj temperaturi te bi jaje postalo neadekvatno za konzumaciju i prije no što se salmonela namnoži.

Staphylococcus aureus ima mnogo kraći period inkubacije od bakterija roda *Salmonella* te može izazvati bolest u ljudi u jako kratkom vremenu. S obzirom da je gram-pozitivna bakterija, vjerojatnost za kontaminaciju jaja nije velika. Glavni izvor bakterije su ljudi, a nalazi se u velikom broju na površini kože (Baker, 1974.).

Clostridium perfringens je također gram pozitivna bakterija i mala je vjerojatnost za kontaminaciju jaja (Baker, 1974.).

Kokošje jaje osjetljivo je na napad mikroorganizama na više načina. Žumanjak ili bjelanjak mogu biti kontaminirani prije nesenja. Nakon nesenja, mikroorganizmi u jaja mogu prodrijeti izvana. Membrana ljuske pruža najbolju zaštitu od penetracije bakterija, a unutar jajeta bakterijski rast i množenje usporavaju proteini bjelanjka, pH te baktericidna svojstva lizozima i konalbumina (Mayes i Takeballi, 1983.).

Veoma je bitno da je ljuska jajeta čista, jer preko pora na ljusci mogu prodrijeti mikroorganizmi i uzrokovati kvarenje jajeta. Jaja se prati smiju jedino neposredno prije upotrebe zbog toga što se pranjem uklanja opna koja štiti od prodora mikroorganizama. Redovno održavanje čistoće gnijezda nužno je da bi ljuska ostala čista (Senčić i Samac, 2017.). Osim toga, nakon pranja i uklanjanja kutikule, ljuska postaje više podložna razmjeni plinova kroz pore, čime se oslobađaju ugljični dioksid i vlažnost iz jajeta što dovodi do gubitka težine tijekom skladištenja (Stringhini i sur., 2009.). Kako navode Favier i sur. (2000.), elektronskom mikroskopijom očišćenih i dezinficiranih jaja na njihovoj ljusci vide se brojne pukotine, stanjenje ljuske te djelomični ili potpuni nedostatak kutikule.

Kontaminacija jajeta bakterijama tijekom njegovog stvaranja u reproduktivnom sustavu inficiranih kokoši događa se kada su reproduktivna tkiva visoko kontaminirana, no javlja se sporadično i znatno rjeđe nego kontaminacija nakon nesenja jajeta, a razine kontaminacije su niske. Drugi način kontaminacije odnosi se na na kontaminaciju površine ljuske jajeta fekalnim mikroorganizmima iz kokošjeg izmeta te mikroorganizmima iz svih površina s kojima jaja dolaze u doticaj nakon nesenja. Javlja se različita mikroflora, uključujući patogene i uzročnike hrane (Techer i sur., 2013.).

Dominantna mikroflora nađena na površini ljuske jajeta sastoji se od gram pozitivnih bakterija, dok je unutarnji sadržaj jajeta uglavnom kontaminiran gram negativnim bakterijama jer su otpornije na prirodne obrambene mehanizme jajeta. Bakterije uključene u kvarenje jajeta imaju sljedeće karakteristike:

- visoku pokretljivost koja olakšava prodor kroz ljusku jajeta i membrane unutar jajeta
- sposobnost da se odupru inhibitornim svojstvima albumina
- različite enzimatske aktivnosti koje omogućuju razgradnju složenih ugljikovih i dušikovih spojeva prisutnih u jajetu čime postaje odlična podloga za bakterijski rast

Najčešći oblik kvarenja koji se javlja je truljenje jajeta što se manifestira u obliku mirisa po truleži te dolazi do promjene boje jajeta u crnu, plavu, zelenu, crvenu ili rozu. Bakterije koje uzrokuju truljenje jajeta su: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Proteus*, *Moraxella*, *Cloaca*, *Enterobacter*, *Citrobacter*,

Stenotrophomonas te *Serratia* spp. Vrste rodova *Flavobacterium* i *Cytophaga* prilikom kvarenja uzrokuju žuto obojenu membranu ljuske (Techer i sur., 2013.).

Povezanost između razine kontaminacije površine ljuske jajeta te pojave kvarenja nije očigledna. Bakterije roda *Micrococcus* i *Aerobacter*, koje su često nađene na površini ljuske jajeta, rijetko kad su pronađene u pokvarenim jajima. S druge strane, bakterije koje su nađene u niskom broju na površini ljuske jajeta, kao što su one roda *Aeromonas* i *Proteus*, pripadaju najbrojnijim bakterijama u pokvarenim jajima (Mayes i Takeballi, 1983.).

U Tablici 2.1. prikazana je učestalost pojave nekih rodova bakterija u pokvarenim jajima prema Board i Tranter (1995.).

Tablica 2.1. Rodovi bakterija pronađeni u pokvarenim jajima (Board i Tranter, 1995.)

Rod bakterija	Učestalost javljanja
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+ -
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	++
<i>Pseudomonas putida</i>	++
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	+
<i>Flavobacterium</i>	+ -
<i>Alcaligenes</i>	++
<i>Acinetobacter</i>	+ -
<i>Cloaca</i>	+ -
<i>Cytophaga</i>	+ -
<i>Aeromonas</i>	+
<i>Proteus</i>	++
<i>Escherichia</i>	++
<i>Hafnia</i>	+
<i>Citrobacter</i>	+
<i>Bacillus</i>	+ -
<i>Micrococcus</i>	+ -
<i>Serratia</i>	++
<i>Streptococcus</i>	+ -
<i>Arthrobacter</i>	+ -

Prisutnost: + - povremeno; + rijetko; ++ uobičajeno (Izvor: Board i Tranter, 1995.)

Kvarenje jaja povezano je s kontaminacijom ljuske bakterijama te njihovom sposobnosti da prodru kroz pore unutar jajeta. Razina i vrsta kontaminacije ljuske i sadržaja jajeta ovisi o okolišu i higijenskim uvjetima u kojima se drže kokoši, vrsti

proizvodnog uzgoja, godišnjem dobu i zemljopisnom području. Do kontaminacije također može doći tijekom pakiranja i prijevoza jaja, prelazom bakterija s jednog jaja na drugo ili iz okoliša. Iako je mikroflora na površini ljuske jajeta raznolika i promjenjiva, bakterije uzročnici kvarenja obično su manje raznovrsne, što se može pripisati utjecaju unutarnje barijere samog jajeta na invazivnost bakterija. Kutikula, ljuska te membrana ljuske su dobre barijere koje sprječavaju prodor bakterija i drugih mikroorganizama unutar jajeta (Techer i sur., 2013.). U Tablici 2.2. prikazana je učestalost pojave poznatijih rodova bakterija na površini ljuske kokošnjeg jajeta prema Board i Tranter (1995.).

Tablica 2.2. Bakterije prisutne na površini ljuske kokošnjeg jajeta

Rod bakterija	Učestalost pojave
<i>Streptococcus</i>	+ -
<i>Staphylococcus</i>	+
<i>Micrococcus</i>	++
<i>Sarcina</i>	+ -
<i>Arthrobacter</i>	+
<i>Bacillus</i>	+
<i>Pseudomonas</i>	+
<i>Acinetobacter</i>	+
<i>Alcaligenes</i>	+
<i>Flavobacterium</i>	+
<i>Cytophaga</i>	+
<i>Escherichia</i>	+
<i>Aerobacter</i>	+
<i>Aeromonas</i>	+ -
<i>Proteus</i>	+ -
<i>Serratia</i>	+ -

Prisutnost: + - povremeno; + kod većine jaja, ali u malim količinama; ++ uvijek prisutni u velikim količinama (Izvor: Board i Tranter, 1995.)

Svakako se ne smije zapostaviti onečišćenje ljuske jaja fekalnim bakterijama. prije svega tu mislimo na enterokoke. Oni su široko rasprostranjeni u prirodi, a najčešće ih se nalazi u probavnom sustavu ljudi i životinja, stoga je njihov broj odličan indikator fekalne kontaminacije (Wall i sur., 2008) Drugi pak autori dovode u vezu način uzgoja nesilica s nalazom broja enterokoka na ljusci jaja (Svobodova i sur., 2013; Englmaierova i sur., 2014.; Vlčkova i sur., 2018.). Rod *Enterococcus*

sadrži više različitih vrsta, a za higijenu namirnica poseban značaj imaju fekalni enterokoki ili tzv. serološka D grupa (*E. faecalis*).

De Reu i sur. (2009.) nisu pronašli značajnu razliku u broju enterobakterija, na površini ljuske jaja između kaveznog i alternativnih načina uzgoja. S njihovim tvrdnjama slaže se istraživanje Svobodove i sur. (2013.). Međutim, Galvao i sur. (2018.) koji su uspoređivali mikrobiološko onečišćenje ljuske jajeta enterobakterijama, između slobodnog držanja i konvencionalnog uzgoja utvrdili su da ljuske koje potječu iz slobodnog držanja pokazuju višu razinu onečišćenja. Autori smatraju da njihova studija ukazuje na ranjivost postizanja dobre mikrobiološke kakvoće jaja kod nesilica držanih u slobodnom uzgoju.

Kornacki i Johnson (2001.) ukazuju da je bakterija *E. coli* odličan indikator sanitarne kvalitete u proizvodnji jaja s obzirom da bakterija prvenstveno potječe iz crijevnog sadržaja ptica, a u manjoj mjeri od radnika iz procesa proizvodnje. Prisustvo *E. coli* u namirnicama ukazuje na loše higijenske uvjete te fekalnu kontaminaciju. Neki sojevi *E. coli* su patogeni, no primjenom postupaka čišćenja u proizvodnji ova bakterija lako se uklanja (Health Protection Agency, 2009.).

Iako je kutikula otporna na prodor bakterija i vode, njena učinkovitost je ograničena jer se često uništava s vremenom i tijekom loše manipulacije jajima (Techer i sur., 2013.). Kutikula je osjetljiva na prodor mikroorganizama odmah po nesenju jer je još vlažna i „nezrela“. Postoji mogućnost da se kutikula kod nekih jaja uopće ne stvori, dok kod manjeg broja ima nedostatke i time ne predstavlja prepreku mikroorganizmima (Samac i Senčić, 2017.).

Ljuska koja je kalcificirani proteinski sloj služi kao fizikalna barijera, no problem predstavljaju pore, osobito ako se na površini ljuske nalazi kondenzirana voda. Povećana poroznost i prisutnost pukotina važan su čimbenik ulaska bakterije kroz ljusku (Trpčić i sur., 2010.). S obzirom da u razdoblju od nesenja jajeta do njegovog dolaska kod potrošača ono prolazi kroz razne manipulacije, rizik od pucanja ljuske je velik (Techer i sur., 2013.). Jaja s oštećenom ljuskom češće su bila inficirana bakterijom *Salmonella* Enteritidis. Jaja s tanjom ljuskom su osjetljivija na prodor bakterija, osobito roda *Salmonella* i *Pseudomonas*. Cijepljenje kokoši, genotip, stres, hranidba, temperatura, bolesti i drugi faktori utječu na debljinu ljuske i samim time na mogućnost prodora bakterija u jaje (Samac i Senčić, 2017.).

Membrane ljuske čine učinkovite filtere sastavljene od antibakterijskih vlakana, koja su bitna u zaštiti jajeta prilikom prodora bakterija (Techer i sur., 2013.). Unutarnja membrana ljuske sadrži visok udio lizozima, a nalazi se i u vanjskoj membrani ljuske ali ne u tolikoj količini. Lizozim je veoma djelotvoran protiv Gram pozitivnih, a ima slabije djelovanje na većinu Gram negativnih bakterija. Lizozim uništava mnoštvo bakterija na unutarnjoj membrani i to je glavni razlog zašto se jaja ne kvare jednako brzo kao i druge namirnice sličnih nutritivnih svojstava (Baker, 1974.).

Osim toga, bjelanjak je okoliš koji je nepovoljan za razvoj mikroorganizama, jer ima alkalni pH, sadržaj hranjivih tvari, visoka viskoznost i heterogenost ne pogoduju razvoju bakterija. Nadalje, sadrži tvari kao što su lizozim, inhibitori proteinaze (ovoinhibitor, cistatin, ovomukoid) te proteine koji grade vitamine. Sve navedeno ima bitnu ulogu u zaštiti od prodora i proliferacije mikroorganizama (Techer i sur., 2013.). Gusti sloj bjelanjka sadrži lizozim koji će uništiti Gram pozitivne bakterije u slučaju da su uspjele prodrijeti u unutrašnjost jajeta. Osim lizozima, sadrži i konalbumin koji veže željezo potrebno za normalnu funkciju bakterija te polipeptid avidin koji veže biotin čiji nedostatak također negativno utječe na bakterije. Rijetki sloj bjelanjka nije bogat antimikrobnim tvarima no njegov pH je nepovoljan za bakterijski rast (Baker, 1974.).

Istražene su razne tehnike za smanjivanje razine kontaminacije ljuske jajeta i očuvanje ili poboljšanje prirodne zaštite, koje tijekom proizvodnji jaja zahtijevaju pažnju u sljedećim koracima:

- selekcija kokoši
- poboljšanje prakse uzgoja i upravljanja poljoprivrednim gospodarstvom
- pakiranje jaja
- transport jaja
- skladištenje jaja

S obzirom da razina kontaminacije ljuske jajeta mikroorganizmima ima veze s razinom kontaminacije zraka u uzgojnom prostoru, veoma je značajno utjecati na smanjenje stvaranja prašine te promicati dobru higijensku i građevinsku dekontaminacijsku praksu kako bi se spriječilo širenje mikroorganizama. Broj razbijenih ili napuknutih jaja te mikroflora povezuju se s tipom proizvodnog uzgoja. Na većini farmi diljem svijeta koristili su se neobogaćeni konvencionalni kavezi, no zbog povećanja svjesnosti javnosti o dobrobiti životinja oni su prema Direktivi EU 1999/74/EZ zabranjeni 2012. godine. Dok su obogaćeni konvencionalni kavezi izrađeni s ciljem postizanja visoke produktivnosti nesilica i s dodatnom prednosti higijenske kvalitete jaja, korištenje pješčanih kupki i gnijezda u proizvodnim uzgojima utječe na porast broja prljavih jaja te mikrobne kontaminacije (Techer i sur., 2013.).

3. Materijali i metode istraživanja

U ovom su radu opisani načini držanja kokoši nesilica od kojih potječu uzorci jaja koje smo mikrobiološki pretražili.

Za potrebe analize mikrobiološke kvalitete konzumnih jaja uzorkovali smo jaja iz različitih načina uzgoja, i to kaveznog, podnog i slobodnog (ukupno 30 jaja, tri načina uzgoja). Uzorkovali smo jaja koja su u prodaji u trgovinama na području grada Zagreba. Jaja su bila upakirana u kartonsku ambalažu (po 10 jaja). Ambalaža je bila čista i neoštećena. Jaja su bila čista, neoštećene ljuske, a pripadala su klasi A.

Jaja, odnosno ljuska jaja pretražena je na prisutnost enterokoka, bakterije *Escherichia coli*, te je utvrđen ukupni broj aerobnih mezofilnih bakterija.

3.1. Postupak mikrobiološke pretrage

Priprema jaja za mikrobiološku pretragu obavljena je na način kako su to opisali Englmaierova i sur. (2014.), a uključivala je uranjanje jaja u 10 ml puferirane peptonske vode (PPV), kako bi se dobio ispirak površine ljuske jajeta i upotrijebio za daljnju mikrobiološku pretragu. Jaje smo nakon uranjanja u PPV ostavili oko tri minute i dobili ispirak njegove površine (ljuske). Iz tako dobivenog ispirka napravili smo daljnja decimalna razrjeđenja (do 10^{-3}), te potom nacjepljivali selektivne podloge za dokaz enterokoka i bakterije *E. coli*, odnosno za utvrđivanje broja aerobnih mezofilnih bakterija. Od pripreme uzorka, osnovnog i serijskih decimalnih razrjeđenja do nacjepljivanja inokuluma na agar ne smije proteći više od 45 minuta.

U mikrobiološkoj pretrazi ispirka s površine (ljuske) jajeta korišteni su uobičajeni postupci mikrobiološke pretrage (enterokoki i *E. coli*), te postupci prema HRN ISO metodi za dokaz aerobnih mezofilnih bakterija.

Određivanje aerobnih mezofilnih bakterija

Za dokaz aerobnih mezofilnih bakterija koristili smo metodu * HRN EN ISO 4833-1:2013 Mikrobiologija hrane i stočne hrane - Horizontalna metoda za brojenje mikroorganizama -- 1. dio: Određivanje broja kolonija pri 30 °C tehnikom zalijevanja podloge

Za određivanje broja aerobnih mezofilnih bakterija koristili smo razrjeđenja ispirka od 10^{-1} , 10^{-2} i 10^{-3} . Po 1 ml svakog razrjeđenja stavili smo u petrijeve zdjelice i zalili s Plate count agarom (PCA), lagano promiješali i ostavili da se skrutne, a potom inkubirali na 30 °C kroz 72 sata.

U skladu s metodom za brojanje bakterija u izračun se uzimaju ploče s više od 15 i manje od 300 kolonija. Izračunat je broj CFU po ml razrjeđenja, kako je opisano u odgovarajućem ISO standardu.

Određivanje broja enterokoka

Za određivanje broja enterokoka koristili smo Kanamycin Esculin Azide agar. Na selektivnu podlogu naciijepljeno je 0,1 ml inokuluma razrjeđenja 10^{-1} i 10^{-2} . Sterilnim štapićem inokulum je jednakomjerno razmazan po podlozi. Naciijepljene petrijeve zdjelice inkubirali smo na temperaturi od 35 °C 48 sati.

Određivanje broja bakterije Escherichia coli i drugih koliformnih bakterija

Za određivanje broja *E. coli* koristili smo RAPID *E. coli* 2 agar. Na petrijevu zdjelicu s podlogom nanesen je 0,1 ml inokuluma, razmazan staklenim štapićem, a podloga je inkubirana na 37 °C kroz 24 sata.

4. Rezultati i rasprava

Načini držanja kokoši nesilica (kavezni i alternativni uzgoji - podno i slobodno držanje) detaljno su opisani u poglavlju „Dosadašnje spoznaje“, potpoglavlje „Tehnologija proizvodnje jaja“.

U tablici 4.1. smo još jednom naglasili razlike u sustavima držanja nesilica, u skladu s porijeklom jaja u istraživanju.

Tablica 4.1. Razlike u sustavima držanja nesilica (kavezno i alternativno držanje)

Način držanja	Parametri
<p>Sustavi držanja u obogaćenim kavezima</p>	<p>U takvom sustavu držanja svaka kokoš nesilica mora imati na raspolaganju:</p> <ul style="list-style-type: none"> • najmanje 750 cm² podne površine kaveza, od čega 600 cm² iskoristivog prostora, • visina kaveza na mjestima osim iskoristivog prostora najmanje 20 cm u svakoj točki, • kavez mora imati površinu od minimalno 2000 cm², • mora imati gnijezdo, stelju za kljucanje i čeprkanje, • odgovarajući materijal za trošenje kandži, • unutar kaveza prečku dužine od 15 cm po nesilici za sjedenje, • svaki kavez mora po cijeloj dužini kaveza imati sustav napajanja lako dostupan svakoj nesilici, • hranilicu od najmanje 12 cm dužine po jednoj nesilici, • prolaz između redova kaveza od najmanje 90 cm širine, • najmanje 35 cm od objekta do prvog reda kaveza, • najmanje 2 kapljične pojilice („nipple“) ili šalice za napajanje
<p>Alternativni sustav uzgoja</p> <ul style="list-style-type: none"> • Slobodno držanje • Poluintenzivno držanje • Držanje na dubokoj stelji • Etažno držanje u staji • Ekološki uzgoj 	<p>U takvom sustavu držanja svakoj nesilici mora biti osigurano:</p> <ul style="list-style-type: none"> • najmanje 10 cm prostora za hranjenje kod ravnih hranilica ili najmanje 4 cm prostora kod okruglih hranilica, • najmanje 2,5 cm prostora za piće kod ravnih pojilica ili najmanje 1 cm prostora kod okruglih pojilica, • kod napajanja kapljičnim pojilicama („nipple“) ili šalicama za napajanje najmanje jedna pojilica ili šalica na 10 nesilica, • kod fiksno postavljenih pojilica u dometu svake nesilice moraju se nalaziti barem po dvije kapljične pojilice ili šalice za napajanje, • najmanje jedno gnijezdo na sedam nesilica, • kod zajedničkih gnijezda mora biti osigurano najmanje 1 m² površine gnijezda za najviše 120 nesilica, • gustoća naseljenosti ne veća od devet nesilica po m², • najmanje 15 cm dužine prečke za odmaranje (bez oštih rubova), gdje prečka ne smije biti postavljena iznad stelje, a vodoravna udaljenost među pojedinim prečkama mora iznositi najmanje 30 cm dok između prečki i zida mora iznositi najmanje 20 cm

U tablici 4. 2. prikazani su rezultati mikrobiološke pretrage uzoraka ispiraka površine (ljuske) jaja.

Tablica 4.2. Nalaz bakterija u uzorcima ispiraka površine jaja porijeklom iz različitih uzgoja nesilica (CFU/ml)

UZORAK	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	Aerobne mezofilne bakterije
A - Slobodni uzgoj			
A1	<10	1,4x10 ³	1,85x10 ³
A2	<10	9x10 ²	3,10x10 ³
A3	<10	5x10 ²	8,15x10 ³
A4	<10	4x10 ²	8,95x10 ³
A5	<10	8x10 ²	8,35x10 ³
A6	<10	6x10 ²	3,55x10 ³
A7	<10	7x10 ²	2,10x10 ³
A8	<10	3x10 ²	7,45x10 ³
A9	<10	5x10 ²	7,72x10 ³
A10	<10	8x10 ²	8,44x10 ³
B – Podni uzgoj			
B1	<10	<10 ²	3,25x10 ³
B2	<10	<10 ²	7,25x10 ³
B3	<10	4x10 ²	8,25x10 ³
B4	<10	10 ²	3,10x10 ³
B5	<10	<10 ²	2,55x10 ³
B6	<10	<10 ²	3,20x10 ³
B7	<10	2x10 ²	2,52x10 ³
B8	<10	<10 ²	5,22x10 ³
B9	<10	3x10 ²	4,80x10 ³
B10	<10	<10 ²	6,48x10 ³
C- Kavezni uzgoj			
C1	<10	2x10 ²	3,14x10 ⁴
C2	<10	<10 ²	8,64x10 ⁴
C3	<10	10 ²	5,47x10 ⁴
C4	<10	10 ²	3,85x10 ³
C5	<10	<10 ²	3,85x10 ³
C6	<10	<10 ²	2,35x10 ⁴
C7	<10	10 ²	3,80x10 ³
C8	<10	2x10 ²	2,00x10 ³
C9	<10	<10 ²	8,20x10 ³
C10	<10	<10 ²	2,80x10 ³

Kao što je vidljivo iz tablice 4.2., bakterija *E. coli* je u uzorcima ispiraka ljuske jaja iz svih uzgoja utvrđena u broju manjem od 10 CFU/ml, odnosno broj joj je bio manji od razine detekcije podloge. Takav je nalaz zadovoljavajući i ukazuje na dobru higijensku praksu držanja nesilica, ali i proizvodnje jaja. U istraživanjima drugih autora bakterija *E. coli* utvrđena je na ljusci jajeta u različitom broju ovisno o načinu držanja nesilica. Karlsson (2010.) navodi da je broj *E. coli* manji kod kaveznog uzgoja u odnosu na podni uzgoj, a Rajmani i Verma (2011.) navode da je najčešće izolirana gram-negativna bakterija s površine ljuske jajeta upravo *E. coli*. Englmaierova i sur. (2014.) također su utvrdili manji broj *E. coli* u kaveznom (3,5 log₁₀ CFU/ml) nego u podnom uzgoju (5,68 log₁₀ CFU/ml). U istraživanju Vlčkove i sur. (2018.), također je utvrđen veći broj *E. coli* u slobodnom držanju. Broj poraslih kolonija *E. coli* na ljusci jajeta iznosio je 4,51 log₁₀ CFU/ml u slobodnom uzgoju odnosno 2,75 log₁₀ CFU/ml iz obogaćenih kaveza, a njihov je broj opadao s duljinom pohrane (4,23 log₁₀ CFU/ml u odnosu na 2,91 log₁₀ CFU/ml) na razini značajnosti od P < 0,001.

Tablica 4.3. Prosječni broj utvrđenih bakterija na ljusci jaja porijeklom iz različitih uzgoja nesilica (log₁₀CFU/ml ispirka)

Kontaminanti ljuske jaja (log ₁₀ CFU/ml)	Način držanja nesilica		
	Slobodni	Podni	Kavezni
<i>Escherichia coli</i>	<1	<1	<1
<i>Enterococcus spp</i>	2,8	2,3	1,1
Aerobne mezofilne bakterije	3,7	3,5	3,9

Broj enterokoka (Tablica 4.2.) kretao se ispod razine detekcije (<10²) do najviše 1,4x10³ CFU/ml ispirka u uzorcima jaja porijeklom iz slobodnog i podnog načina držanja (uzorci A i B). U uzorcima jaja iz kaveznog uzgoja (C) broj enterokoka bio je do najviše 2x10² CFU/ml. Prosječno je broj enterokoka iznosio 2,8 log₁₀ CFU/ml na površini jaja iz slobodnog, 2,3 log₁₀ CFU/ml iz podnog te 1,1 log₁₀ CFU/ml iz kaveznog uzgoja (tablica 4.3.).

Rezultati istraživanja mnogih autora ukazuju na manji broj enterokoka na ljusci jaja porijeklom iz uzgoja nesilica u kaveznom u odnosu na podni uzgoj. U našem je istraživanju prosječni broj enterokoka od 1,1 log₁₀ CFU/ml u kaveznom uzgoju u skladu s rezultatima drugih autora, dok je broj enterokoka na ljuskama jaja iz slobodnog ili podnog uzgoja bio veći i iznosio prosječno od 2,3 do 2,8 log₁₀ CFU/ml. Tako su Vlčkova i sur. (2018.) utvrdili veći broj enterokoka na površini ljuske u slobodnom uzgoju (2,56 log₁₀ CFU/ml) u odnosu na kavezni uzgoj (1,1 log₁₀ CFU/ml). Englmaierova i sur. (2014.) u svom istraživanju navode da je veći broj enterokoka pronađen na površini ljuske kod podnog (3,58 log₁₀ CFU/ml) nego kaveznog uzgoja

(1,50 log₁₀ CFU/ml za konvencionalne kaveze odnosno 1,46 log₁₀ CFU/ml u obogaćenim kavezima). Slične rezultate dobili su Svobodova i sur. (2013.), u čijem istraživanju je također veći broj enterokoka u podnom u odnosu na kavezni uzgoj. Wall i suradnici (2008.) tvrde da je broj enterokoka pronađen na ljusci jajeta u obogaćenim kavezima veći nego u klasičnim neobogaćenim kavezima.

Mikrobiološkom analizom ispiraka ljuske jaja u našem istraživanju, utvrđen je raspon za aerobne mezofilne bakterije od 1,85x10³ - 8,95x10³ CFU/ml za slobodni uzgoj, 2,52x10³ - 8,25x10³ CFU/ml za podni uzgoj te 2,00x10³ - 8,64x10⁴ CFU/ml za kavezni uzgoj. Prosječni ukupni broj bakterija u slobodnom uzgoju bio je 3,7 log₁₀ CFU/ml ispirka, 3,5 log₁₀ CFU/ml ispirka u podnom te 3,9 log₁₀ CFU/ml ispirka u kaveznom uzgoju (Tablica 4.3.). Ti su rezultati podjednaki bez obzira na raspon i više vrijednosti ukupnog broja u kaveznom uzgoju (maksimalna vrijednost od 8,64x10⁴ CFU/ml). Mnogi su autori utvrdili da način držanja nesilica utječe na higijenske uvjete proizvodnje jaja, pa samim time i na ukupni broj bakterija na površini ljuske jajeta. Pri tome prednost daju kaveznom načinu uzgoja. De Reu i sur. (2009.) bilježe značajnu razliku u stupnju kontaminacije aerobnim mezofilnim bakterijama između kaveznog uzgoja i alternativnih načina uzgoja. Ljuske iz kaveznog uzgoja manje su kontaminirane u odnosu na alternativne načine. Spitzer (2015.) također ističe da je ukupan broj bakterija na površini ljuske jajeta mnogo manji kod jaja iz kaveznog uzgoja, nego kod jaja iz alternativnih načina uzgoja. S njihovom tvrdnjom slaže se i istraživanje Schwarz i sur. (1999.).

Prema Karlssonu (2010.), broj aerobnih mezofilnih bakterija manji je kod kaveznog uzgoja u odnosu na podni uzgoj. Huneau-Salaün i sur. (2010.) tvrde kako je veći stupanj kontaminacije aerobnim mezofilnim bakterijama u slobodnom načinu uzgoja u odnosu na kavezni uzgoj. U skladu s ovom tvrdnjom su i rezultati istraživanja Svobodove i sur. (2013.). Englmaierova i sur. (2014.) su utvrdili prosječni ukupni broj bakterija od 6,24 log₁₀ CFU/ml ispirka ljuske jaja iz podnog uzgoja u odnosu na 4,05 log₁₀ CFU/ml ispirka kod konvencionalnog kaveznog uzgoja i 3,98 log₁₀ CFU/ml ispirka u uzgoju u obogaćeni kavezima. Jones i sur. (2015) utvrdili su prosječni ukupni broj bakterija u jajima iz podnog uzgoja (4.9 log₁₀ CFU/m) a najmanji je broj utvrđen u obogaćenim i konvencionalnim kavezima (2.6 odnosno 2.8 log₁₀ CFU/ml). Vičková i sur. (2018.) također su donijeli takav zaključak. Prema Wall i sur. (2008.) jaja uzgojena u obogaćenim kavezima pokazuju veću razinu mikrobiološke kontaminacije aerobnim mezofilnim bakterijama od jaja uzgojenih u klasičnim neobogaćenim kavezima koji se danas u EU više ne koriste. Englmaierova i sur. (2014.) smatraju da su sa stajališta sigurnosti jaja prikladnija zamjena za konvencionalne kaveze obogaćeni kavezi i aviariji od podnog držanja.

Rezultati ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija dobiveni u našem istraživanju ukazuju na podjednakom mikrobiološku sliku jaja bez obzira na način držanja nesilica. Ove rezultate treba sagledavati u kontekstu činjenice da jaja nisu uzorkovana u samim objektima već kao originalna pakiranja u maloprodaji. Također, utvrđeni broj enterokoka na površini ljuske jaja ne pokazuje velike razlike kod slobodnog i podnog držanja, a u kaveznom načinu uzgoja na razini je od 1,1 log₁₀

CFU/ml. Kako nismo imali saznanja o higijenskim uvjetima držanja nesilica i čistoći jaja, to ostavlja otvorenu mogućnost da su proizvođači jaja podvrgnuli procesu pranja. Prema Pravilniku jaja koja su podvrgnuta postupku pranja ne smiju se označavati kao „A“ klasa čak i ako ispunjavaju ostale zahtjeve za tu klasu jaja, te se moraju označiti riječima „oprana“ jaja.

5. Zaključak

Iako je iz dostupne literature poznato da se alternativni načini uzgoja kokošjih jaja često povezuju s višom razinom fekalne kontaminacije u odnosu na kavezni uzgoj, u ovom radu nisu zabilježene velike razlike u broju bakterija na površini ljuske jaja iz različitih proizvodnih uzgoja. Bakterija *E. coli* nije utvrđena u uzorcima jaja, odnosno u sva tri proizvodna uzgoja broj je bio manji od 10 CFU/ml, odnosno ispod razine detekcije. U ispircima ljuske jaja bakterije roda *Enterococcus* utvrđene su u podjednakom broju na površini jaja dobivenih od kokoši iz slobodnog i podnog držanja, dok je njihov broj manji u jajima iz kaveznog držanja. Ukupni broj mikroorganizama u svim uzorcima ispiraka ljuske jaja nije pokazivao veća odstupanja bez obzira na način uzgoja.

6. Popis literature

1. Baker C. R. (1974). *Milk Food Technol.*, 37 (5): 265-268.
2. Betts R. (2014). Microbial update: eggs and egg products. *International Food Hygiene*. 25 (4): 10-11
3. Board R. G., Tranter H. S. (1995). *The microbiology of eggs*. U: Stadelman N.J., Cotterill O. J. *Egg science and Technology* The Haworth Press, London, 81-104.
4. Crnčan A., Kristić J., Ranogajec, Lj. (2013). Multiple criteria decision making for setting priorities of investments into the table egg production. *Worlds Poultry Science*, 16: 903-916.
5. De Reu K, Rodenburg T. B., Grijspeerdt K., Messens W., Heyndrickx M., Tuytens F. A. M., Sonck B., Zoons J., Herman L.. (2009). Bacteriological contamination, dirt, and cracks of eggshells in furnished cages and noncage systems for laying hens: An international on-farm comparison, *Poultry Science*, 88 (11): 2442–2448.
6. Duguid P. J., North E. A. R. (1991). Eggs and salmonella food-poisoning: an evaluation. *Med. Microbiol.* - V. 34, 65-72.
7. Englmaierova M., Tumova E., Charvatova V., Skrivan M. (2014). Effects of laying hens housing system on laying performance, egg quality characteristics, and egg microbial contamination. *Czech J. Anim. Sci.*, 59, (8): 345–352.
8. Favier, G.I., Escudero M. E., de Guzman A. M. S. (2000). Reduction of *Yersinia enterocolitica* and mesophilic aerobic bacteria in egg-shell by washing with surfactants and their effect on the shell microstructure. *Food Microbiology*, v.17, 73-81.
9. Galvão A. J., Biondo W. A., Possebon S. F., Spina B. L. T., Correia N. B. L., Zuim V. C., Filho G. P. B. J., Pantoja F. C. J., De Almeida Nogueira Pinto P. J. (2018). Microbiological vulnerability of eggs and environmental conditions in conventional and free-range housing systems. *Ciências Agrárias, Londrina*, 39 (1): 133-142
10. Grčević M., Gajčević-Kralik Z., Kralik G., Ivanković S. (2011). Kokošje jaje kao funkcionalna namirnica. *Krmiva* 53, 2, 93-100.
11. Health Protection Agency. *Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods*. London: Health Protection Agency, November 2009. Hrvatska agencija za hranu, prijevod 2015. Dostupno na: <https://www.hah.hr/wp-content/uploads/2015/09/HPA-vodic-za-procjenu-mkb-sigurnosti-RTE-proizvoda.pdf>
12. Huneau-Salaün A., Michel V., Huonnic D., 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 (2): 163-169.
13. Jacob P. J., Miles D. R., Mather B. F. (1998). *Egg Quality*. Animal Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
14. Jones D.R., Cox N.A., Guard J., Fedorka-Cray P.J., Buhr R.J., Gast R.K., Abdo Z., Rigsby L.L., Plumblee J.R., Karcher D.M., Robison C.I., Blatchford R.A.,

- Makagon M.M. (2015). Microbiological impact of three commercial laying hen housing systems. *Poult Sci.* 94 (3): 544–551.
15. Jakopović Ž., Čanak I., Lešić T., Pleadin J., Frece J., Markov K. (2016). Usporedba osnovnog kemijskog i masnokiselinskog sastava te mikrobiološke ispravnosti guščjih, kokošnjih, pačjih i purećih jaja. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* 11 (3-4), 152-158.
 16. Jurić V., Jajić I., Bursić V., Jurić J. (2005). Nutritivna i upotrebna vrednost jaja. *Letopis naučnih radova.* Godina 29, broj 1, 138–145.
 17. Karlsson A. (2010). Bacterial contamination of egg shells in deep litter floor systems and conventional cages in Jordan. Swedish University of Agricultural Science, Department of Animal Nutrition and Management, Uppsala.
 18. Kornacki J.L., Johnson J., (2001). Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. U: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Downes FP, Ito K eds). Poglavlje 8. 4 izdanje, American Public Health Association, Washington, D.C., 69-82.
 19. Kralik Z., Grčević M., Kralik G., Hanžek D., Zelić A. (2017). Quality of table eggs on the Croatian market. *Poljoprivreda*, 23 (1), Lipanj, 63-68.
 20. Mayes F. J., Takeballi M. A. (1983). Microbial Contamination of the Hen's Egg: A Review. Poultry Department. Loughry College of Agriculture and Food Technology. Cookstown BT80 9AA. Co. Tyrone, Northern Ireland. *Journal of Food Protection*, 46 (12): 1092-1098.
 21. Mlinarić Galinović G., Ramljak Šešo M., Andreis S., Bedenić B., Brudnjak Z., Horvat Krejči D., Hunjak B., Jarža Davila N., Katalinić Janković V., Kovaček I., Lukić Grlić A., Ljubičić M., Markotić A., Matica B., Mlinarić Đepina A., Mlinarić Missoni E., Perković D., Peršić Z., Presečki V., Punda Polić V., Turković B., Važić Babić V., Vraneša Tunuković J. (2003). Specijalna medicinska mikrobiologija i parazitologija. udžbenik Visoke zdravstvene škole. Merkur A.B.D. Zagreb.
 22. Pravilnik o kakvoći jaja, Narodne novine 115/2006.
 23. Pravilnik o minimalnim uvjetima za zaštitu kokoši nesilica, Narodne novine 77/2010.
 24. Rajmani R. S., Verma S. P. (2011). Microbial flora of eggs and egg contents from organised and unorganised poultry farms. *Indian journal of veterinary research.* 20 (1):73-76.
 25. Schwarz, G., A. Kobe, R. Fries (1999). Mikroflora auf den Schalen von Hühnereiern unterschiedlicher Haltungsformen. *Arch.Geflügelk.* 63, 220 - 224.
 26. Senčić Đ., Antunović Z., Domaćinović M., Šperanda M. Steiner Z. (2006). Kvaliteta kokošnjih jaja iz slobodnog i kaveznog sustava držanja. *Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Zavod za stočarstvo.* Stočarstvo, 60 (3): 173-179.
 27. Senčić Đ., Samac D. (2017). Jaja. *Poljoprivredni fakultet u Osijeku.*
 28. Senčić Đ., Samac D., Antunović Z., Galović D. (2017). Proizvodnost kokoši i kvaliteta jaja iz ekološkoga i konvencionalnoga (podnoga) sustava držanja. *Meso* 5, September – October. Vol. XIX.
 29. Spitzer, H. (2015). An Analysis of Bacterial Contamination of Chicken Eggs and Antimicrobial Resistance. *Celebrating Scholarship & Creativity Day.* 77.

30. Stringhini, M.L.F., Andrade A. M., Mesquita A. J., Rocha T. M., Rezende P. M., Leandro M. N. S. (2009). Bacteriological characteristics of washed and unwashed laying hen's eggs. *Ciência Animal Brasileira*, 10 (4): 1317-1327.
31. Svobodova J., Tumova E., Charvatova V. (2013.) The effect of housing system on microbial contamination of eggs in Czech hen and Lohmann LSL. *EggMeat Symposia 2013.*, Bergamo 15-19 September. *World's Poultry Science Journal*, Volume 69, Supplement.
32. Svobodova J., Tumova E., Popelarova E., Chodova D. (2015). Effect of light colour on egg production and egg contamination. *Czech Journal of Animal Science*, 60, 550–556
33. Techer C., Baron F., Jan S. (2013). Microbial spoilage of eggs and egg products. *World's Poultry Science Journal*, Volume 69, Supplement.
34. Trpčić I., Njari B., Zdolec N., Cvrtila Fleck Ž., Fumić T., Kozačinski L. (2010). Mikrobiološka kakvoća i ocjena svježine konzumnih jaja. *Meso* 5, 281-293.
35. Uredba Komisije (EZ) br. 589/2008 od 23. lipnja 2008. o utvrđivanju detaljnih pravila za provedbu Uredbe Vijeća (EZ) br. 1234/2007 u pogledu tržišnih standarda za jaja
36. Vlčková J., Tumová E., Ketta M., Englmaierová M., Chodová D. (2018). Effect of housing system and age of laying hens on eggshell quality, microbial contamination, and penetration of microorganisms into eggs. *Czech Journal of Animal Science*. 63, 51-60.
37. Wall H., Tauson R., Sørgerd S., (2008). Bacterial Contamination of Eggshells in Furnished and Conventional Cages. *The Journal of Applied Poultry Research*, 17, 11-16.

Životopis

Nikolina Blatarić rođena je 19. siječnja 1993. godine u Varaždinu.

Osnovnu školu Veliki Bukovec pohađa u razdoblju od 1999. do 2007. godine.

Nakon završetka osnovnoškolskog obrazovanja 2007. godine upisuje Drugu gimnaziju Varaždin.

Srednjoškolsko obrazovanje završava 2011. godine i iste godine upisuje preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu, gdje diplomira 2015. na temu „Bolničke infekcije uzrokovane respiratornim sincicijskim virusom“.

Iste godine upisuje diplomski studij Agroekologija: usmjerenje Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi.