

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Hygienická a toxikologická jakost jedlého hmyzu
s ohledem na bezpečnost potravin**

Bakalářská práce

Autor práce: Žaneta Ferusová

Obor studia: Kvalita produkce

Vedoucí práce: doc. Ing. Lenka Kouřimská, Ph.D.

**Konzultanti práce: Ing. Anna Adámková, Ph.D.,
Ing. Roman Švejstl**

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Hygienická a toxikologická jakost jedlého hmyzu s ohledem na bezpečnost potravin“ jsem vypracovala samostatně pod vedením školitelky a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20. 4. 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Lence Kouřimské, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při zpracování bakalářské práce.

Děkuji Ing. Anně Adámkové, Ph.D. za dodání vzorků a uvedení do celé problematiky.

A na závěr děkuji Ing. Romanu Švejtilovi za veškerou spolupráci při výzkumu a následně tvorbě celé práce, bez které by vznik této bakalářské práce nebyl možný.

Hygienická a toxikologická jakost jedlého hmyzu s ohledem na bezpečnost potravin

Abstrakt

Předložená bakalářská práce se zaměřuje na zhodnocení mikrobiální kvality hmyzu. Analyzován byl dospělec cvrčka domácího (*Acheta domestica*), larva potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) a larva potemníka brazilského (*Zophobas morio*). S těmito druhy bylo pracováno ve formě živé, spařené a sušené.

Po mikrobiologické stránce byla práce zaměřena na zhodnocení celkového počtu přítomných mikroorganismů, detekování přítomnosti bacilů, salmonel, kvasinek a plísní. K detekování jednotlivých druhů mikroorganismů byly použity různé druhy živných medií, která zajistila nárůst konkrétních druhů organismů. Po namnožení byly sečteny nárůsty kolonií, na základě kterých byly vyvozeny určité trendy v přítomnosti mikroorganismů. U vzorků byla provedena identifikace konkrétních přítomných druhů mikroorganismů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Spařené a následně usušené vzorky obsahovaly statisticky významně méně ($P < 0,05$) mikroorganismů ($5,98 \pm 1,31 \log \text{KTJ/g}$) než pouze spařené ($7,05 \pm 0,29 \log \text{KTJ/g}$) a čerstvě usmrcené ($7,66 \pm 0,44 \log \text{KTJ/g}$). Hodnoty bacilů a kvasinek se statisticky významně nelišily v závislosti na způsobu opracování. Množství mikroorganismů bylo rovněž nezávislé na rozdílnosti druhu hmyzu.

Mezi jednotlivými druhy mikroorganismů byly nejhojněji zastoupeny druhy *Acinetobacter baumannii* u cvrčka domácího spařeného. Dále byl zaznamenán hojnější výskyt *Enterobacter aerogenes* u potemníka brazilského spařeného. Četný výskyt bakterie *Staphylococcus kloosii* byl detekován v těle živého potemníka moučného. Rod *Bacillus* byl ve většině vzorků detekován pouze v malém množství. Ve většině případů nepřekročil množství $2 \log \text{KTJ/g}$. Hodnoty přítomnosti kvasinek se pohybovaly průměrně kolem $3 \log \text{KTJ/g}$. Přítomnost salmonely nebyla potvrzena ani u jednoho ze vzorků.

V našem měření byl zaznamenán vliv tepelné úpravy na mikroorganismy. S rostoucí intenzitou tepelného ošetření klesal počet přítomných mikroorganismů. Přítomnost mikroorganismů nebyla nijak neobvykle ovlivněna druhem zkoumaného hmyzu. V živých jedincích byly hodnoty srovnatelné.

Klíčová slova: jedlý hmyz, hygienické požadavky, toxikologická jakost, potemník moučný, potemník brazilský, cvrček domácí

Hygienic and toxicological quality of edible insects with regard to food quality

Summary

In this bachelor thesis we were focused on monitoring microbial quality of edible insects. It was analyzed adult of house cricket (*Acheta domesticus*), larvae of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) and larvae of superworm (*Zophobas morio*). It was analyzed raw insect bodies, killed by hot water and killed by hot water and dried.

We were focused on total bacterial count, presence of bacilli, salmonellae, yeasts and molds. Different plate count agars were used to enumerate specific microorganisms. Total viable counts were assessed after aerobic incubation. Thanks to these results we were able to determine some trends. The bacterial isolates were later identified by MALDI-TOF mass spectrometry.

Dried samples contained statistically significantly less ($P < 0.05$) microorganisms (5.98 ± 1.31 log cfu/g) than the ones killed by hot water (7.05 ± 0.29 log cfu/g) and raw ones (7.66 ± 0.44 log cfu/g). Counts of bacilli and yeasts did not significantly differ in relation to processing method. Counts of microorganisms were also not significantly different in relation to species.

Using MALDI-TOF mass spectrometry, the most often represented microorganisms were recognized. It was *Acinetobacter baumannii* in a house cricket killed by hot water. Then it was *Enterobacter aerogenes* in a superworm as a next really frequent microorganism. *Staphylococcus kloosii* was detected in a raw yellow mealworm.

Bacillus was detected in majority of samples just in low count. In majority of cases the value wasn't higher than 2 log cfu/g. The value of presence of yeasts was approximately around 3 log cfu/g.

The presence of salmonellae wasn't confirmed in any of samples.

It was noticed that the count of microorganisms was influenced by the drying techniques. The count of microorganisms increases with growing temperature of the technique. The presence of microorganisms wasn't influenced by the insect species. The values were comparable.

Keywords: Edible insects, hygienic requirements, toxicological quality, yellow mealworm, house cricket, superworm

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce.....	9
3	Teoretická část	10
3.1	Entomofágie.....	10
3.1.1	Důvody proč jíst hmyz.....	11
3.1.2	Negativní názory.....	11
3.2	Skupiny jedlého hmyzu.....	11
3.2.1	Coleoptera (brouci)	11
3.2.2	Lepidoptera (motýli)	12
3.2.3	Orthoptera (kobylky, cvrčci).....	12
3.3	Vedlejší produkty	12
3.3.1	Karmín	12
3.3.2	Lerp.....	12
3.3.3	Olej.....	13
3.4	Nutriční složení.....	13
3.4.1	Bílkoviny a aminokyseliny	13
3.4.2	Tuky a mastné kyseliny	14
3.4.3	Mikronutrienty	14
3.4.4	Minerální látky.....	14
3.4.5	Vitamíny	15
3.4.6	Obsah vlákniny	16
3.5	Mikrobiota jedlého hmyzu	16
3.5.1	Bakterie.....	17
3.5.1.1	<i>Enterobacteriaceae</i>	18
3.5.1.2	<i>Salmonella</i> spp.	18
3.5.1.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	19
3.5.1.4	Psychrotrofní bakterie	19
3.5.2	Kvasinky a plísňe.....	19
3.5.3	Viry	20
3.6	Vliv druhu na přítomnost mikroorganismů	20
3.7	Vliv úpravy na přítomnost bakterií.....	21
3.8	Vliv zpracování na přítomnost mikroorganismů	21
3.9	Těžké kovy	22
4	Praktická část.....	23
4.1	Materiál a metody	23
4.1.1	Charakteristika vzorků.....	23
4.1.2	Příprava vzorků na ředění	23

4.1.3	Živná půda	23
4.1.4	Maldi Biotyper	25
4.2	Vyhodnocení výsledků	25
4.2.1	Získ výsledků.....	26
5	Výsledky.....	27
5.1	Mikrobiologický rozbor – statistika	27
5.2	Identifikace izolátů.....	29
5.2.1	Identifikace bakterií	29
5.2.2	Identifikace mikroskopických hub.....	30
6	Diskuze.....	31
6.1	Celkový počet mikroorganismů	31
6.1.1	Živí jedinci.....	31
6.1.2	Vaření jedinci.....	31
6.2	Identifikace stanovených bakterií.....	31
6.3	Kvasinky a plísňe.....	32
6.3.1	Sušení jedinci.....	32
6.3.2	Živí jedinci.....	32
6.4	Identifikace stanovených kvasinek a plísní.....	33
6.4.1	<i>Bacillus</i> spp.....	33
6.4.2	<i>Salmonella</i> spp.....	34
7	Závěr	35
	Seznam použité literatury.....	36

1 Úvod

V současnosti řešíme problémy zabývající se rostoucími náklady na živočišné bílkoviny, tlakem na kvalitu životního prostředí, růstem počtu populace a větší poptávkou i mezi nižšími vrstvami. Proto je potřeba nalézt kvalitní alternativní zdroje těchto bílkovin, které nebudou tak snadno vyčerpateľné. Za ideální náhradu je považován hmyz. Bavíme-li se o konzumaci hmyzu, jedná se o entomofágii.

Hmyz je již od pradávna užíván i jako potravina. V některých kulturách je jeho konzumace na běžném pořádku a nikdo se nad ní nepozastavuje. Tento přístup se objevuje především v Africe, Asii, Austrálii a Americe. Avšak dále tu jsou kultury, kde pozření tohoto organismu je naprosto nepředstavitelné. To je způsobené určitou nevšedností, nechutností či obavami.

Po nutriční stránce jsou tyto živočichové prozkoumáni do detailů. Výživové hodnoty jedlého hmyzu jsou velice variabilní a to i díky rozmanitosti druhů a různorodosti přijímané potravy. Ale pořád jsou velice vysoce hodnocené. Jsou závislé na stupni metamorfózy, stanovišti výskytu a potravě. Stejně jako u většiny potravin jsou hodnoty závislé na způsobu přípravy, uskladnění a zpracování. Některé druhy mohou být svými hodnotami přirovnávány savcům, plazům a rybám.

Po stránce mikrobiologické bylo provedeno několik výzkumů na přítomnost určité mikrobioty v těle těchto živočichů. Bohužel doposud zveřejněné výsledky jsou velice obecné, jelikož došlo k testování jen několika konkrétních druhů. Zároveň testování probíhalo běžnými kultivačními metodami, které nemusely být vyhovující pro všechny potravinářské patogeny a výsledky mohou být nepřesné. Mikrobiální kvalita těchto jedinců je především ovlivněna životními podmínkami, přijímanou potravou, opracováním a způsobem uchování.

Cílem této práce bylo porovnat mikrobiální složení obsahu střev různých druhů hmyzu. Zároveň tyto jedinci prošli určitými tepelnými úpravami, po kterých došlo opět k porovnání změně obsahu a různorodosti mikrobioty v těle.

2 Cíl práce

Jedlý hmyz může jako potravina nového typu představovat určité mikrobiologické a chemické riziko.

Cílem bakalářské práce je shromáždit dostupné informace týkající se hygienické a toxikologické kvality jedlého hmyzu s ohledem na bezpečnost hmyzu jako potraviny a porovnat zjištěné údaje s konvenčními druhy masa s použitím údajů ve vědecké literatuře. Praktická část bude zaměřena na hodnocení mikrobiologického rizika u vybraných druhů jedlého hmyzu.

3 Teoretická část

3.1 Entomofágie

Hmyz již po dlouhá tisíciletí slouží zároveň i jako potrava. Jsou kultury, kde patří do běžného jídelníčku a v tomto případě se bavíme o entomofágii. Dále pak jsou kultury, kde je toto naprosto nepředstavitelné. Hmyz má prospěšný vliv i na životní prostředí, zdraví a podmínky pro život (Durst et al., 2010).

Hmyz je řazen mezi živočichy, jejichž tělo je kryto exoskeletem – chitinovou schránkou. Během vývoje procházejí tzv. metamorfózou, kdy tuto pokrývku těla shazují. Na tu navazují 3 páry článkovaných končetin. V hlavové části se nachází pár složených očí a tykadla. Řadí se mezi skupinu živočichů s největší druhovou rozmanitostí a velice rychlou rozmnožovací schopností (Harpe and McCromack, 2001). Na planetě můžeme nalézt až milion druhů, což je více než polovina všech žijících organismů. Můžeme ho nalézt téměř ve všech životních podmínkách, ačkoli pouze několik druhů bychom našli například v oceánech. Tam dominuje další skupina členovců, a to korýši (Delong, 1960).

Rovněž hrají důležitou roli jako opylovači při reprodukci rostlin a při zlepšování úrodnosti půdy. Zároveň slouží jako biokontrola v rámci vlivu škodlivých prostředků na ochranu rostlin a poskytují člověku plno užitečných produktů, jako je med, hedvábí, lékařské aplikace, aj (van Huis et al., 2013b).

Jedlý hmyz nabízí srovnatelnou alternativu běžných živočišných bílkovin. Je vhodným řešením rostoucího počtu obyvatel a nárůstu spotřeby živočišných produktů (Mlcek et al., 2014; Premalatha et al., 2011, van Huis et al., 2013) Mimo jiné, jedlý hmyz obsahuje tuky, dostatek vitamínů a minerálů, jako třeba vápník, železo a zinek) (Belluco et al., 2013; Rumpold and Schlüter, 2013; van Huis, 2013).

Může být vhodným řešením v rozvojových zemích, kde zdroj potravy a všech životně nepostradatelných látek nemusí být tak bohatý (Klunder et al., 2012). Potenciální riziko konzumace hmyzu může přinést přítomnost těžkých kovů, alergenů, mykotoxinů a různých mikroorganismů (van der Spiegel et al., 2013; Belluco et al., 2015; Milanović et al., 2016). Chov hmyzu způsobuje menší ekologický dopad v porovnání s chovy běžných hospodářských zvířat (Oonincx and de Boer, 2012; Oonincx et al., 2010; van Huis et al., 2013).

3.1.1 Důvody proč jíst hmyz

Hmyz je obecně považován za velice zdravou potravinu, kterou lze považovat za plnohodnotnou alternativu kuřecího, vepřového, hovězího masa a dokonce i ryb. To je zapříčiněno jeho bohatostí na bílkoviny a významným obsahem tuků. Zároveň můžeme zaznamenat přítomnost vápníku, železa a zinku (van Huis et al., 2013b).

Chov hmyzu je prospěšný, i co se vyprodukovaných skleníkových plynů týče. Těch je mnohem méně v porovnání s hospodářskými zvířaty. Metan je produkován pouze několika skupinami hmyzu, jako jsou termity a švábi (van Huis et al., 2013b).

Emise čpavku spojené s chovem hmyzu jsou také mnohem nižší oproti chovu dobytka. Jelikož se jedná o studenokrevné živočichy, dochází k velice efektivní přeměně přijaté potravy na proteiny. Například cvrček potřebuje 12x méně krmiva než dobytek, 4x méně než ovce a poloviční množství oproti prasatům a drůbeži k produkci stejného množství bílkovin (van Huis et al., 2013b).

3.1.2 Negativní názory

Většina světa, především západní vyspělé státy vnímají hmyz v první řadě jako škůdce a málokdo si uvědomuje, jak moc užitečný je a co vše z něj lze získat. Předpojatost je spojená s fakty, že hmyz je přenašečem nemocí, ničitelem dřeva, může nepříjemně obtěžovat, případně rozdávat různá kousnutí. Odpor může být spojený i skrze náboženské vyznání (Kellert, 1993).

Hmyz obsahuje významné množství vlákniny, jehož nejběžnější formou je chitin, nerozpustné vlákno pocházející z exoskeletu (Klunder et al., 2012). Tato látka se podobá polysacharidové celulóze nacházející se v rostlinách, o níž se předpokládá, že je pro člověka nestravitelná (Paoletti et al., 2007).

Nedávné studie odhalily, že kobylička může obsahovat vysoké a někdy až nebezpečné množství olova (Cohen et al., 2009).

3.2 Skupiny jedlého hmyzu

3.2.1 Coleoptera (brouci)

Tato skupina je nejpočetnější na světě a zahrnuje druhy od jedlého, přes vodní až po dřevokazný hmyz. Obvykle jsou konzumovány pouze larvy. Typickým znakem jsou krovky, které kryjí pár blanitých křídel a po zadeček. Ty jsou rýhované nebo hladké. Další dominantou těla je předohruď, která je kryta štítem. Tykadla a končetiny jsou přizpůsobeny

potřebám jedince. Nejnámějšími jedlými jedinci této skupiny jsou nosatec palmový (*Rynchophorus phoenicis*), potěmnik moučný (*Tenebrio molitor*) a potěmnik brazilský (*Zophobas morio*) (van Huis et al., 2013b).

3.2.2 Lepidoptera (motýli)

Motýli a můry se konzumují během jejich larválního stádia jako housenky, což nevyklučuje spotřebu i dospělých jedinců (Flood, 1980). Jedná se o druhou největší skupinu hmyzu, která dominuje svými vzdušnicemi protkanými křídly. Ta jsou pokryta malými šupinkami, od nichž je odvozený název celého řádu. Nejpopulárnější a ekonomicky nejpodstatnější je *Imbrasia belina*. V Asii mezi nejčastěji konzumované patří bambusová housenka (*Omphisa fuscidentalis*) (Yhoun-Aree and Viwatpanich, 2005).

3.2.3 Orthoptera (kobyly, cvrčci)

Tento druh hmyzu hraje podstatnou roli na latinskoamerických trzích a restauracích, kde ho najdeme v hojném množství.

Cvrčci jsou v Asii sbíráni ve volné přírodě a běžně konzumováni jako potrava. Cvrček domácí je také v asijských státech běžně chován a konzumován, především v Thajsku. Často je mu dávana přednost před jinými druhy hmyzu kvůli jeho měkké struktuře (Yhoun-Aree and Viwatpanich, 2005).

3.3 Vedlejší produkty

3.3.1 Karmín

Košenila, jinak nazývaná karmín, je červené barvivo získané primárně z vysušených těl červce nopálového (*Dactylopius coccus*). Je užíváno v potravinářském, textilním a farmaceutickém průmyslu. Je znám pod označením E120. Tento hmyz se vyskytuje na opuncii mexické (*Opuntia ficus-indica*), která se pěstuje pro své plody. Mezi další karmínové výrobky se řadí karminový lak, sušený karmín a karmínová kyselina (van Huis et al., 2013b).

3.3.2 Lerp

Lerp je krystalizovaná sladová sekrece sloužící jako ochrana těla hmyzu. Je produkována larvami psyllidového hmyzu řadící se mezi Hemiptera. Ten ji vylučuje z důvodu příjmu potravy s vysokým množstvím sacharidů, ale s nedostatkem živin, jako je dusík. O to příjem potravy musí být objemnější, aby všech živin bylo dostatek. Tudíž musí docházet

k vyloučení nadměry přijatých sacharidů, které odcházejí skrze tento sekret. Následně slouží jako potrava pro různé ptáky a savce (van Huis et al., 2013b).

3.3.3 Olej

Melounový brouk (*Coridius Vidutus*) je rozšířen po celém Súdánu, a to především v oblastech, kde se hojně pěstují melouny. Ty jsou v dané oblasti považovány za jednu z nejdůležitějších plodin už jen jako zdroj pitné vody a využití zbytků jako krmiv pro zvířata. Tento škůdce plodinu napadá, propichuje listy, stonky a nasává šťávu, což má za následek vadnutí, pokles produkce a nakonec smrt rostliny (van Huis et al., 2013b).

Zároveň jeho sušená forma má využití v kulinářství jako koření. Jinde ho namáčí do horké vody, čímž z něho získávají olej. Melounový olej má široké využití v medicíně k léčení kožních léz (Mariod, Matthäus a Eichner, 2004). Další předností takto získaného oleje jsou antibakteriální účinky. Toho by se dalo využít jako masný konzervační prostředek.

3.4 Nutriční složení

Výživové hodnoty jedlého hmyzu jsou velice variabilní, a to i díky rozmanitosti druhů. Ty se mohou lišit i v rámci druhu. Jsou závislé na stupni metamorfózy, stanovišti výskytu a potravě. Stejně jako u většiny potravin jsou hodnoty závislé na způsobu přípravy, uskladnění a zpracování. Hlavními složkami hmyzu jsou bílkoviny, tuky a vláknina (van Huis et al., 2013b).

3.4.1 Bílkoviny a aminokyseliny

Proteiny jsou organické sloučeniny složené z aminokyselin. Jsou důležitou součástí potravy, kde přispívají k jejím fyzikálním a senzorickým vlastnostem. Výživová hodnota závisí na několika faktorech: obsah bílkovin, který je u všech potravin odlišný, dále závisí na kvalitě bílkovin, která je ovlivněna přítomností aminokyselin (esenciální či neesenciální) a na tom, zda kvalita odpovídá lidským potřebám (van Huis et al., 2013b).

Obsah bílkovin v hmyzu se výrazně liší dle zkoumaného druhu (Belluco et al. 2013). Například kobylky obsahují 13-28 g bílkovin na 100 g své váhy, bourec morušový 10-17g bílkovin a například cvrčci 8-25 g. Některé druhy mohou být svými hodnotami přirovnávány savcům, kteří mají kolem 19-26 g bílkovin na 100 g hmotnosti, plazům, u kterých se hodnoty pohybují kolem 25-27 g bílkovin a rybám, kde se množství bílkovin pohybuje kolem 20 g. Obsah bílkovin je ovlivněn přijímanou potravou během života a stádiem metamorfózy.

Zároveň obsah těchto makronutrientů může být změněn během přípravy v kuchyni, aby hmyz byl snadno konzumovatelný (FAO, 2012).

Ačkoli obiloviny jsou celosvětově užívanou potravinou, nejsou schopny nabídnout všechny potřebné aminokyseliny. Například v nedostatku se nachází lysin a v některých případech i tryptofan (např. kukuřice). U některých druhů hmyzu jsou tyto aminokyseliny velice bohatě zastoupeny (Bukkens, 2005). Avšak užití hmyzu jako náhražku, je ovlivněno určitými stravovacími návyky daných zemí.

3.4.2 Tuky a mastné kyseliny

Jedlý hmyz je významným zdrojem tuku. Byl zkoumán obsah a složení vyextrahovaných olejů a jsou bohaté na polynenasycené mastné kyseliny a často obsahují esenciální linolové a α -linolenové kyseliny. Nutriční význam těchto dvou látek je zaznamenán především pro zdravý vývoj dětí a kojenců. Hmyz by mohl vyřešit nedostatečný příjem omega-3 a omega-6 mastných kyselin, a to především v zemích s omezeným přístupem ke zdrojům rybích potravin. Složení mastných kyselin hmyzu se zdá být ovlivněno rostlinami, kterými se hmyz živí (van Huis et al., 2013b).

Obsah tuku je také ovlivněn mnoha faktory, mezi které se řadí druh, životní fáze, pohlaví a druh přijímané potravy. Obecně u hmyzu v larválním stádiu a samiček byl zaznamenán vyšší obsah tuku než u dospělých jedinců a samců (Mlcek et al., 2014).

3.4.3 Mikronutrienty

Mikronutrienty, zahrnující minerální látky a vitamíny, hrají velice důležitou roli v nutriční hodnotě jídla. Jejich nedostatek může mít za následek nepříznivý dopad na zdraví, což může vést k poruchám růstu, imunitní disfunkce, opožděný duševní a fyzický vývoj a reprodukční neschopnost. Opět na tyto hodnoty má silný vliv fáze metamorfózy. Spotřeba celého těla hmyzu obecně zvyšuje nutriční obsah (Roos et al., 2010).

3.4.4 Minerální látky

Minerální látky hrají důležitou roli v biologických procesech. Doporučená dávka přijatých minerálů za den je obecně užívána k vyčíslení potřebných přijatých hodnot. Housenky druhu *Gonimbrasia belina* jsou například skvělým zdrojem železa. Svým obsahem předčí i obsah v hovězím mase (Bukkens, 2005). Tam je hodnota vyčíslena na 6 mg na 100 g masa, zatímco u housenky obsah dosahuje až 31-77 mg na 100 g masa. Obsah železa

v kobyčkách (*Locusta migratoria*) se pohybuje kolem 8-20 mg na 100 g v závislosti na přijaté potravě (Oonincx et al., 2010).

Jedlý hmyz je bezpochyby nejbohatším zdrojem železa a jeho začlenění do běžné stravy by mohlo napomoci zlepšení roli železa a předcházet chudokrevnosti v rozvojových státech. Tento problém je považován za nejčastější a nejrozšířenější z poruch příjmu potravy. Zdravotní důsledky zahrnují špatnou reprodukci, narušení kognitivního a tělesného vývoje (FAO/WHO, 2001).

Dalším problémem, se kterým se svět potýká, je nedostatek zinku v potravě. Týká se především dětí a jejich matek. Jeho nedostatek má za následek zpomalení růstu, opožděný sexuální vývoj a zrání kostí, dál kožní léze, průjem, alopecie, poruchy chuti k jídlu a zvýšená citlivost vůči infekcím. Obecně je známo, že většina hmyzu je dobrým zdrojem zinku. Ve srovnání s hovězím masem, které obsahuje 12,5 mg/100 g masa hodnoty larvy jedince *Rhynchophorus phoenicis* dosahují až na 26,5 mg na 100 g masa (Bukkens, 2005).

3.4.5 Vitamíny

Tyto látky jsou nezbytné pro stimulaci metabolických procesů a posílení funkce imunitního systému. Můžeme je nalézt téměř ve všech druzích. Byla dokázána přítomnost thiaminu, také jinak nazývaného vitamínu B1, který působí hlavně jako koenzym pro trávení sacharidů na energii (Bukkens, 2005). Jeho hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 0,1-4 mg na 100 g sušiny. Riboflavin, také známý jako vitamin B2, jehož hlavní funkcí je metabolismus, byl zaznamenán v rozmezí 0,11-8,9 mg/100 g. Vitamin B12 se vyskytuje v potravinách živočišného původu a je dobře zastoupen v larvách potměníka (*Tenebrio molitor*) s hodnotami 0,47 µg na 100 g a ve cvrčkovi (*Acheta domesticus*) s obsahem 5,4 µg na 100 g v těle dospělého a 8,7 µg na 100 g u nymf (Anankware et al., 2015). Nicméně mnoho druhů má velmi nízkou hladinu vitamínu B12, proto je zapotřebí provést mnoho výzkumů k identifikaci jedlého hmyzu bohatého na vitamín B (Bukkens, 2005, Finke, 2002).

Retinol a β-karoten byly zjištěny v určitých druzích housenek (*Imbrasi oyemensis*, *I. truncata*). Hodnoty byly 32-48 µg na 100 g a 6,8-8,2 µg na 100 g sušiny. Po měření hladiny těchto vitamínů u žlutých larev potměníka, červů druhu *Zophobas morio* a cvrčků byla hladina retinolu menší než 20 µg na 100 g a u β-karotenu byla hodnota menší než 100 µg na 100 g. Obecně hmyz není nejlepším zdrojem vitamínu A. Obsah vitamínu E je vysoký v Bourci morušovém (*Bombix mori*) a to ve mleté i sušené podobě (Bukkens, 2005).

3.4.6 Obsah vlákniny

Hmyz obsahuje významné množství vlákniny. Nejběžnější formou je chitin, nerozpustné vlákno pocházející z exoskeletonu. Informací ohledně přítomného chitinu je mnoho díky různému testování, avšak výsledky nejsou úplně srovnatelné. Obsah chitinu je odhadován na 2,7 - 49,8 mg na kg za čerstvého stavu a na 11,6 - 137,2 mg na kg sušiny (Finke, 2007).

Chitin je polymer s dlouhým řetězcem N-acetylglukosaminu, což je derivát glukózy. V případě disfunkce chitinázy, která je přítomna v žaludečních šťávách, může dojít k alergické reakci. Ta je častější v západních zemích, kde lidé hmyzí organismy do jídelníčku zařazují sporadicky. Domněnka je taková, že čím tvrdší exoskeleton, tím více obsaženého chitinu (Paoletti et al., 2007).

3.5 Mikrobiota jedlého hmyzu

Existují tři typy mikrobioty, které mohou představovat určité riziko, co se hmyzu týče jako potravy. Hrozbou jsou bakterie, viry a houby. Souvisí s životním stylem těchto živočichů, s životními podmínkami a jeho zpracováním, během kterého mohlo dojít k přenosu toxických částic (ANSES Opinion, 2014). Mikrobiota, včetně bakterií, virů a hub, se jim ukládá ve střevě. Následně nijak nepříznivě nepůsobí na metabolismus, chování a přežití jedince. Obsah střev se odvíjí od druhu jedince, jeho stáří a od typu přijaté stravy (EFSA Scientific Committee, 2015; Yun et al., 2014).

Hmyz se zpracovává jak s plným obsahem střev, tak i po jejich vyprázdnění. Tento proces se dělá z důvodu snížení různorodosti mikrobů. I přesto může být organismus kontaminovaný. Ne každý mikroorganismus je hrozbou pro lidské zdraví. Proto je potřeba rozlišovat patogenní a nepatogenní mikroorganismy (van Huis et al., 2013). Otázka je, zda takto budou působit pouze na hmyz nebo i na ostatní zvířata a lidi po jejich pozření. Mohou způsobovat kažení potravin vlivem fermentace, hnití nebo žluknutí. O to se mohou postarat bakterie rodu *Spiroplasma* spp., které mohou způsobovat neurodegenerativní choroby (Krämer, 2011; Zschaler et al, 2015).

Celkový počet mikroorganismů poskytuje informaci o množství bakterií, kvasinek a plísní, které tvoří kolonie za příslušných podmínek (teplota, přítomnost kyslíku) (Holzapfel et al., 2004). V této práci budou sledovány počty mikroorganismů v mezofilním rozsahu za aerobních podmínek. Termín aerobní implikuje nezbytnou přítomnost kyslíku během

buněčné respirace mikroorganismů. Mezofilní popisuje chování zárodků, v tomto případě všech přítomných bakterií, které rostou při 36°C na příslušném médiu (Keweloh, 2009).

Může se jednat o patogenní bakterie, které způsobují onemocnění a o bakterie, které nejsou zdraví nikterak škodlivé. Se stanovením celkového počtu životaschopných bakterií bez specifického rozlišení jednotlivých druhů v definovaném množství vzorku mohou být identifikovány a využity pro vyhodnocení mikrobiální kvality potravin (Prändel et al., 1988; Zschaler et al., 2015).

3.5.1 Bakterie

Mikrobiální flóra intestinálního traktu hmyzu je složena různých rodů a druhů bakterií. Pomocí pyrosekvence DNA byly mezi nejčastěji zastoupenými rody *Streptococcus*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* a *Acinetobacter*. V nižším počtu byl prokázán rod mezofilních aerobních bakterií rodu *Enterobacteriaceae* a spory *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus* spp. a *Bacillus* spp (Agabou and Alloui, 2010; Amadi et al., 2005; Braide et al., 2011; Giaccone, 2005).

Ačkoli rozmanitost přítomných bakterií je široká, přítomnost patogenů jako *Salmonella* spp. a *Listeria monocytogenes* nebyla detekována v žádném z testovaných vzorků. (Garofalo et al., 2017). I přes to, že nebyla zjištěna přítomnost patogenních salmonel., mohly by být součástí detekovaných bakterií rodu *Enterobacteriaceae*, který byl detekován ve vysokém množství ve cvrčcích a v nižším množství v práškových cvrčcích a larvách moučného červa (Barco et al., 2014). Z doposud provedených studií bylo zjištěno, že přítomnost bakterií v hmyzu používaném na přípravu potravy je vysoká, a to 10^5 - 10^7 KTJ/g (kolonie tvořících jednotek).

Mnohé patogeny se používají při biokontrolě hmyzích škůdců a jsou buď obecně považovány za bezpečné, nebo je u nich určitý předpoklad bezpečnosti, když jsou účelně užívané jako potraviny nebo krmiva (Sundh et al. 2012). Ty, které nejsou, jsou testovány specificky a individuálně na přítomnost určitých toxinů nebo jiných metabolických sloučenin a jejich bezpečnosti pro člověka a zvířata před použitím. Bezpečnost používání bezobratlých patogenů je podstatnou součástí registrace těchto látek jako kontrolních biočinidel před komercializací (Eilenberg et al., 2015). Patogenní bakterie hmyzu jsou považovány za neškodné jak pro zvířata, tak pro lidi, protože se jedná o dva naprosto fylogeneticky rozdílné organismy (FAO, 2013). Jediné riziko pro lidi a zvířata může představovat mikrobiologie spojená s podmínkami chovu, manipulací, zpracováním či uchováním (ANSES, 2015)

3.5.1.1 *Enterobacteriaceae*

Bakterie z rodu *Enterobacteriaceae* jsou gram-negativní, tyčinkovitého tvaru a fakultativně anaerobní. Jsou všudypřítomné a můžeme je nalézt v zemi, ve vodě, na rostlinách a ve střevním traktu člověka a zvířat. Hrají velice důležitou roli jako indikátor fekálního znečištění v rámci posuzování kvality potravin. Slouží jako indikátorový organismus, který má za úkol indikovat přítomnost patogenů, kazivost a znečištění (Barco et al., 2014).

Při výzkumu zabývajícím se přítomností této bakterie, které provedl Garofalo et al. (2017), se zaměřil na rozdílné výsledky ovlivněné odlišným druhem organismu. Mikrobiální kontaminace byla obecně mnohem vyšší u cvrčka než u moučného červa, kde hodnoty byly naopak nejnižší, tj. nižší než 2.00 log KTJ/g (Garofalo et al., 2017). Naopak, při testování, které provedl Vandeweyer (2016), byly výsledky úplně rozdílné. Byl prokázán vysoký výskyt *Enterobacteriaceae* u potemníka moučného (*Tenebrio Molitor*) a potemníka brazilského (*Zophobas Atratus*), kde hodnoty sahaly až na 5,9 log KTJ/g.

3.5.1.2 *Salmonella* spp.

Salmonella je gram-negativní, fakultativně anaerobní mezofilní nesporotvorná tyčinka řadící se do čeledi *Enterobacteriaceae*. Kataláza je pozitivní a oxidáza je negativní. Rod *Salmonella* obsahuje dva druhy *S. enterica* a *S. bongori*. Většina onemocnění způsobené salmonelou se nazývají salmonelóza. Způsobuje různé infekce a enteritidy. Po pozření kontaminované potravy dochází k uvolnění salmonely v tenkém střevě, kde se rychle množí a pronikají do lymfatického a krevního oběhu. Mezi nejvýznamnější vypouštěné toxiny patří endotoxin a v menší míře ST a LT toxiny (Klaban, 2001; Šindler, 2010).

Z většiny se hromadí ve střevním traktu zvířat a syrová podoba masa a vajec jsou hlavním zdrojem infekce (Krämer, 2011). Kromě teplotokrevných živočichů se salmonela objevuje taktéž ve střevním traktu živočichů studenokrevných, kam se řadí například hmyz. U těch je salmonela považována za patogenní dle vyhlášky o kritériích bezpečnosti potravin. U masa i jiných druhů potravin, které jsou uváděny na trh je předepsaná nulová tolerance. V případě detekce přítomnosti musí být ihned šarže daného produktu stažena z trhu (Baumgart et al., 2016).

3.5.1.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus se řadí do čeledi *Staphylococcaceae* a je grampozitivní, fakultativně anaerobní, mezofilní kok. Tento druh bakterií se dělí na koaguláza-pozitivní a koaguláza-negativní jedince. Jedná se o schopnost enzymu srážet krevní plazmu. Většina stafylokoků je koaguláza-negativní, ale *Staphylococcus aureus* se řadí mezi ty pozitivní (Komprda, 2004). Jeho hlavním sídlem je lidské tělo. Můžeme ho nalézt především ve stolici a na sliznici nosohltanu.

3.5.1.4 Psychrotrofní bakterie

Počtu psychrotrofních bakterií nebyla nikdy věnována pozornost, ačkoli se jedná o poměrně podstatný hodnotící parametr v rámci skladovaného chlazeného hmyzu. U cvrčků byly naměřeny hodnoty 4,5 log KTJ/g. Průměrná hodnota u moučných červů byla naměřena okolo 6,6 log KTJ/g. U některých vzorků hodnota přesahovala dokonce 9,1 log KTJ/g. To by mohlo znamenat riziko kažení v chlazeném prostředí stejně tak, jako výskyt psychrotrofních patogenů, jako je *Listeria monocytogenes* nebo *Bacillus cereus* (Hwang and Tamplin, 2005; Martínez et al., 2007). Zároveň studie téměř vylučuje přítomnost lidských či zvířecích patogenů u jedlého hmyzu používaného jako potravina.

3.5.2 Kvasinky a plísně

Hmyz může tvořit ideální životní podmínky pro tyto organismy. Avšak představuje potenciální riziko pro lidi a zvířata. Hmyz je choulostivý na entomopatogenní plísně vylučující konkrétní toxiny, které mohou způsobit smrt (Keweloh, 2009). Množství přítomných plísní a kvasinek je ovlivněno prostředím, ve kterém se hmyz vyskytuje. Zároveň dalším faktorem může být způsob zacházení, forma úpravy a následné uskladnění (Krämer, 2011).

Mykotoxiny, které můžeme v hmyzu nalézt, mohou mít původ z patogenních plísní rodu *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. a *Fusarium* spp., které jsou součástí substrátu, na kterém žijí. Vyloučené mykotoxiny mohou ovlivnit jejich vitalitu. Co se týče kvasinek, byl zjištěn vysoký výskyt u cvrčků, přibližně 4.86 log KTJ/g. Zatímco plísně měly hodnotu nejvyšší u cvrčků, kteří byli v práškové podobě (Simpanya et al., 2000). Druhy plísní, jejichž přítomnost byla potvrzena v těle hmyzu, jsou *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Mucor*, *Mucorales*, *Alternaria*, *Drechslera* a *Phoma* (Simpanya et al., 2000).

Kvasinky jsou fakultativně anaerobní jednobuněčné houby. Jsou odolné ke kyselému prostředí, ale o to hůře snáší zvýšenou teplotu - v případě vzrůstu teploty nad 60 °C dochází

k jejich usmrcení. Některé kvasinky mají schopnost tvorby tepelně odolných výtrusů, tzv. spor (Riemelt et al., 2012).

Saranče stěhovavé (*L. moratotia*) a potěmník moučný (*T. molitor*) byli testováni na přítomnost těchto mikroorganismů. Výsledek prokázal četný výskyt jak v čerstvém, lyofilizovaném, tak i zmraženém vzorku. Konkrétně se jednalo o druh plísně *Aspergillus* spp. a *Penicillium* spp. (FASFC, 2014).

3.5.3 Viry

Hmyz obsahuje velké množství virů a mnohé z nich jsou patogenní vůči tomuto organismu,

tj. způsobují onemocnění a mohou mít za následek až vymření a kolaps kolonií (Eilenberg et al., 2015; King et al., 2012). Tyto viry jsou však hlavním problémem producentů zemědělského hmyzu. Mohou způsobit ztrátu produkce (Eilenberg et al., 2015). Zástupci rodů *Iridoviridae*, *Parvoviridae*, *Iflaviridae*, *Dicistroviridae* a *Reoviridae* potřebují podstoupit ještě další testování, jelikož se mohou vyskytovat u hmyzu chovanému pro potravu. U cvrčků byly nejčastěji zaznamenány infekce způsobené denzoviry, které spadají pod *Parvoviridae* (Weissman et al., 2012; Szelei et al., 2011) a viry *Picornovirales* z řady *Discistroviridae*, které mohou způsobovat jejich paralýzu¹. Experimenty zabývající se denzoviry prokázaly, že tento druh viru se nemůže replikovat v buňkách obratlovců (El-Far et al., 2004).

Většina potravinových virů neobsahuje lipoproteinový obal, pouze protein s genetickou informací v lipidovém obalu. To zapříčiňuje větší stabilitu viru, která pomáhá odolností vůči potravinovému zpracování. Technologie přípravy a způsobu vaření mohou snížit rizika pasivního přenosu (Moore et al., 1987). Patogenní viry hmyzu, který je zpracováván jako potravina, nejsou hrozbou pro obratlovce a člověka. Tyto mikroorganismy mohou na obratlovcích přežít v substrátech a následně být zachyceny hmyzem, který je zpracováván jako potravina. Toto riziko by mohlo být zmírněno výběrem správného substrátu a efektivním zpracováním (Tabachnick et al., 1996).

3.6 Vliv druhu na přítomnost mikroorganismů

Z čerstvého chovaného hmyzu (*Tenebrio Molitor* - moučný červ, *Acheta Domesticus* - cvrček domácí) byly izolovány Klunderem et al. (2012) bakterie rodu *Enterobacteriaceae*.

¹ Úplné ochrnutí.

Mikrobiální kontaminace byla obecně mnohem vyšší u cvrčka než u moučného červa, kde hodnoty byly naopak nejnižší.

Cvrček na druhou stranu vykazuje významně vysoké celkové hodnoty způsobené přítomností hub oproti moučnému červu (Giaccone, 2005; Grabowski et al., 2014). Z těchto výsledků lze vyčíst, že substrát a druh hmyzu ovlivňuje mikrobiální složení.

3.7 Vliv úpravy na přítomnost bakterií

Výsledky byly ovšem taktéž rozdílné u tvorů čerstvých a tepelně opracovaných (Ali et al., 2010; Klunder et al., 2012; Stoops et al., 2016). Syrový hmyz je typický zvýšeným počtem bakterií a plísní kvůli přítomnosti mikroorganismů, jak na povrchu zvířat, tak uvnitř jejich gastrointestinálního traktu (Grabowski et al., 2014). Vykazuje vyšší hodnoty, než je doporučený limit pro čerstvé mleté maso (celkový počet aerobních $<10^6$ KTJ/g) (TCEC Commission Regulation, 2007; Stannard, 1997).

Procesy sušení mrazem a sterilace vykazují redukci přítomných aerobních bakterií na povolený limit přítomných bakterií. To značí zdravotní nezávadnost. Sušení mrazem zapříčinilo neaktivitu mikroorganismů. Dojde-li k jejich rehydrataci, mnoho z nich se navrátí do vegetativního stádia, které může být škodlivé (Grabowski et al., 2016). Obecně sterilace je považována za efektivnější než sušení mrazem a blanšírování (Megido et al., 2016).

U cvrčků, u kterých došlo pouze k procesu vaření nebo smažení, byla zaznamenána neúplná inaktivace sporulujících bakterií. U těchto jedinců, kteří byli smaženi, byla stanovena hodnota sporulujících bakterií až 3,0 log KTJ/g (Hanboonsog and Durst, 2014).

Klunder et al. (2012), který se zabýval rozdílnou přítomností na základě úpravy organismu, uvádí, že u jedinců, kteří byli vařeni, byl počet přítomných bakterií *Enterobacteriaceae* snížen. U vzorků, které byly následně osmažené, byla aktivita sporulujících bakterií nulová a přítomnost čeledi *Enterobacteriaceae* vyloučena (Klunder et al., 2012).

3.8 Vliv zpracování na přítomnost mikroorganismů

Značné rozdíly byly taktéž zaznamenány mezi druhy sušenými a těmi, které byly rozmělněny v prášek. Ty obsahovaly mnohem více kvasinek a plísní, zatímco se vyznačovaly podobnými hodnotami, co se přítomných bakterií týče (Grabowski and Klein, 2016).

Vyšší mikrobiální hodnoty jsou akceptovatelné u druhů, které byly sušeny a rozmělněny v prášek. Před konzumací by mělo dojít znovu k tepelnému ošetření. U druhů, které byly hluboce zmrazené a následně uvařeny, klesly hodnoty tak, že přítomnost bakterií

není nikterak vysoká, a tudíž mohou být ihned konzumovány, aniž by muselo dojít k nějakým tepelným zásahům (Grabowski and Klein, 2016). Pouze v případě špatné manipulace a skladování může dojít k rozmnožení těchto bakterií a riziko pro spotřebitele roste.

V Belgii a Nizozemí (FASFC, 2014) byla uveřejněna data týkající se hmyzu chovaného jako zdroj potravy. Byly zjištěny vysoké hodnoty 10^7 cfu/g přítomných aerobních a anaerobních bakterií. V dalších výzkumech, týkajících se syrového a zmraženého potměníka moučného a sarančat, byly naměřeny podobně vysoké hodnoty pro přítomnost aerobních bakterií a spor, tj. 10^7 - 10^9 cfu/g (Klunder et al., 2012).

Při testování hmyzu (*Alphitobius diaperinus*, *Tenebrio molitor*, *Locusta migratoria*), který byl ošetřen pouze lyofilizací, bylo zjištěno, že 59 % z 55 testovaných produktů nesplňovalo hygienická kritéria 10^6 KTJ/g aerobních bakterií v surovinách, které jsou používány na přípravu masa. Zatímco koncentrace *Enterobacteriaceae* v 65 % vzorků překročila kritérium 10^3 KTJ/g pro syrové maso užívané k přípravě. Studie se taktéž zabývala přítomností *Clostridium perfringens*, *Salmonella* sp. a *Vibrio* sp., která potvrzena nebyla. U 93 % vzorků byly koncentrace sporující bakterie *Bacillus cereus* nižší než 100 KTJ/g (NVA, 2014).

3.9 Těžké kovy

V těle hmyzu byla mimo mikroorganismů zaznamenána i přítomnost škodlivých těžkých kovů. Jejich stopy se nacházely především v částech těla jako je tuk, exoskelet, reprodukční orgány a trávicí ústrojí, kde se hromadily. Studie zabývající se potměníkem moučným (*Tenebrio molitor*) ukázaly, že tento hmyz má tendence ve svém těle hromadit kadmium a olovo z přijatých organických látek z půd, které tyto kovy obsahují (Vijver et al., 2003). Nicméně zároveň bylo prokázáno, že tělo se z části naakumulovaných kovů zbavuje s metamorfózou².

Dalším velice diskutovaným problémem je zisk pesticidů skrze velké množství zkonsumovaných kobylek. Kontrola je obzvláště náročná z důvodu sběru živočichů z volné přírody, kde nelze ovlivnit jejich přijatou potravu. Čímž se nabízí otázka ohledně potencionálního chovu hmyzu, kdy lze takovýmito situacím předejít (Saeed et al., 1993).

² Přeměna dokonalá u hmyzu – vajíčko, larva, kukla, nový jedinec.

4 Praktická část

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Charakteristika vzorků

K rozboru byl zvolen druh hmyzu, který je často konzumován jako potrava. Konkrétně se jednalo o dospělce cvrčka domácího (*Acheta domesticus*), larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) a larvy potemníka brazilského (*Zophobas morio*). Tito živočichové byli zakoupeni v obchodu s chovatelskými potřebami a pracovalo se s nimi ve formě živé, spařené a spařené a následně sušené. Před usmrcením byly vzorky vylačňeny po dobu 48 hodin. K smrti došlo za pomoci vroucí vody s teplotou 100 °C a sušení probíhalo při 105 °C.

4.1.2 Příprava vzorků na ředění

Prvním krokem bylo navázení jednotlivých druhů hmyzu, které byly rozmělněny v roztoku k decimálnímu ředění. K jeho přípravě bylo zapotřebí:

- 4,5 g tryptonu (Oxoid CM0075)
- 4,5 g nutrient brothu 2 (Oxoid CM0067)
- 25 g kvasničného extraktu (Oxoid LP0021)
- 0,45 ml Tween polysorbate 80 (Scharlau 6-088)
- 0,225 g cysteinu (Sigma-Aldrich C7780)

Homogenizace byla provedena třením ve zkumavce a vortexováním (Třepačka IKA MS Yellow line). Následně byl vypočítán objem vzniklého roztoku obsahující zbytky hmyzu přepipetován do penicilínky, ve které byl totožný roztok.

S každým dalším ředěním byl přepipetován 1 ml předchozího roztoku. Ve všech případech se jednalo o sterilní média (viz výše). Toho bylo docíleno umístěním na 15 minut do autoklávu při teplotě 121 °C. Desítkové ředění bylo provedeno do ředění 10^{-6} v rámci určení celkového počtu bakterií a do ředění 10^{-4} v rámci detekování jednotlivých druhů bakterií.

4.1.3 Živná půda

V případě aerobních bakterií byly zředěné vzorky hmyzu přeočkovány po 0,1 ml inokula na předem připravenou živnou půdu. Přeočkování probíhalo formou roztěru. Pro určité druhy mikroorganismů byly použité konkrétní druhy agarů.

Pro nárůst bakterií *Escherichia coli* byl připraven T. B. X. – agar (Oxoid CM0945). Pro stanovení celkového počtu bakterií byl nachystán Yeast extract agar (Oxoid CM0019), který zároveň posloužil k zjištění přítomnosti spor bakterií *Bacillus*. Pro stanovení bakterií rodu *Staphylococcus* byl přichystán Staphylococcus medium No. 110 (Oxoid CM0145). K nárůstu kvasinek a plísní byl připraveno živné médium Dichloran glycerol agar (Oxoid DG 18) za přídavku antibiotika chloramphenicol selective supplement (Oxoid SR 0078), které má za úkol při nárůstu kolonií omezit namnožení jakýchkoli bakterií a zaručit selektivitu nárůstu. K detekování rodu *Salmonella Spp.* byly vzorky nanášeny na S.S. agar (Oxoid CM533).

Při průkazu rodu *Salmonella* bylo postupováno dle ČSN EN ISO 6579 (2003). Tato metoda je založená na několika po sobě jdoucích krocích. Nejprve byly bakterie namnoženy v peptonové vodě 24 h při 37 °C. Ta byla připravena následovně:

- 1000 ml destilované vody
- 1 g peptonu
- 8,5 g NaCl

Poté došlo k přenesení 0,1 ml namnožené kultury do Rappaport Vassiliadis bujónu (Oxoid CM0669), kde došlo k selektivnímu pomnožení salmonel 48 h při 37 °C. Kultury byly přeneseny kličkou na SS agar.

Vzorky určené k detekci bakterií *Bacillus* byly před nanesením na médium podrobeny pasteraci v autoklávu (Systec DB-23) po dobu 10 minut za teploty 80 °C.

Nakultivované misky pro stanovení přítomnosti bakterií rodu *Bacillus* byly umístěny do termostatu (Pol-Eko Aparatura) po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C. Ostatní naočkovaná média byla v termostatu po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C. Po uplynutí doby byly misky vyndány a došlo k počítání počtu kolonií.

Po vyhodnocení kultivace byly náhodně vybrány kolonie z celkových počtů anaerobních bakterií a tyto byly přeočkovány a pomnoženy 24 h při 37 °C pro identifikaci pomocí MALDI TOF hmotnostní spektrometrie.

Po 24 hodinách, kdy došlo k namnožení mikroorganismů, byly vzorky využity k přesnému detekování jednotlivých druhů za pomoci metody MALDI³ Biotyper. Ten pracuje na principu identifikace mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem.

³ Matrix assisted laser desorption ionization.

4.1.4 Maldy Biotyper

Do eppendorfek bylo napipetováno po 1 ml vzorku. Ty byly následně odstředěny v centrifuze 14 000 RPM/3 minuty (Eppendorf Minispin plus). Po odstředění mikroorganismů z roztoku došlo k jeho vylití. Zbytku usazené kapaliny jsme byli zbaveni propláchnutím etanolem 96% p.a.

Následně k peletu bylo napipetováno 1 ml etanolu 96% p.a. a společně promícháno. Suspenze byla opět dána na 3 minuty do centrifugy při stejném počtu otáček, jako napoprvé. Po oddělení složek došlo k vylití etanolu a následně k peletu bylo přidáno 15 µl 70% kyseliny mravenčí a následně byl roztok doplněn o 15 µl acetonitrylu. Během aplikace těchto dvou chemikálií došlo k rozmíchání usazeného peletu. Následně byly eppendorfky naposledy vloženy do centrifugy, kde došlo k finálnímu stočení.

Následně byla nanášena kapka supernatantu na destičku MTP 384 ground steel. Po jejím zaschnutí byla kapka překryta maticí kyseliny hydroxyskořicové.

Na krystaly matrice se vzorkem působí laserové záření, díky němuž dochází k desorpci molekul matrice spolu s molekulami vzorku. Ta má napomoci k ionizaci molekul vzorku předáním H⁺ od molekul matrice. Následně je aplikováno extrakční napětí mezi MALDI destičku a vstupní šterbinu průletového analyzátoru. Tím dojde k extrakci nabitých molekul podle zvolené polaritý napětí a k jejich analýze v průletovém hmotnostním analyzátoru. Na základě detekované skladbě přítomných proteinů dochází k určení druhu přítomných mikroorganismů. V závislosti na době letu molekul analyzátozem k detektoru se vypočítá poměr m/z (Huong et al., 2014).

4.2 Vyhodnocení výsledků

Po vyjmutí nakultivovaných médií z termostatu došlo k sečtení narostlých kolonií. Jejich počty nám pomohou k určení celkového počtu. V případě nárůstu u dvou po sobě jdoucích ředění ke stanovení výsledků využijeme vzorec:

$$\log\{[(P1 + P2)/11] \times F\} = \log KTJ$$

Kdy:

P1 – Počet narostlých kolonií u konkrétního ředění

P2 – Počet narostlých kolonií u následující plotny

F – Převrácená hodnota vyššího ředění

V případě nárůstu kolonií pouze u nejnižšího ředění uijeme vzorec:

$$\log\{P/1 \times F\} = \log KTJ$$

Kdy:

P – Počet narostlých kolonií u konkrétního ředění

F – Převrácená hodnota daného ředění

4.2.1 Zisk výsledků

Hodnoty, ke kterým jsme došli za pomoci výše uvedených vzorců, byly zadány do statistického softwaru STATISTICA, díky kterému došlo k vyhodnocení výsledků. Bylo vycházeno ze statisticky významných rozdílů na hladině významnosti v rámci odlišnosti jednotlivých skupin.

Vzájemně byly porovnávány výsledky souhrnné statistiky výskytu mikroorganismů v rámci jednotlivých skupin hmyzu a v rámci druhu opracování. K porovnání byly použity softwarem vypočítané průměry a směrodatné odchylky.

Hladina významnosti, se kterou bylo počítáno, byla zvolena na 95 %. K analýze rozptylu byla použita Scheffého metoda.

5 Výsledky

5.1 Mikrobiologický rozbor – statistika

Tabulka 1 - Počty jednotlivých skupin mikroorganismů – log KTJ/g (kolonie tvořících jednotek)

Skupina	Celkové počty	<i>Bacillus</i> spp.	Kvasinky	<i>Salmonella</i> spp.
Cvrček živý	7,81±0,25	<2,0	3,46±0,04	ND
Cvrček spařený	7,29±0,07	2,26±0,46	2,92±0,27	ND
Cvrček sušený	6,68±0,20	<2,0	3,81±0,11	ND
Potemník moučný živý	7,46±0,48	2,15±0,27	4,09±0,06	ND
Potemník moučný spařený	6,91±0,44	4,52±0,17	2,44±0,30	ND
Potemník moučný sušený	4,43±1,18	<2,0	<2,0	ND
Potemník brazilský živý	7,70±0,62	<2,0	2,58±0,50	ND
Potemník brazilský spařený	6,94±0,14	<2,0	2,99±0,30	ND
Potemník brazilský sušený	6,84±0,09	2,91±0,16	3,31±0,12	ND

Ve výše vyobrazené tabulce č. 1 jsou znázorněny výsledky kultivací z testovaných vzorků hmyzu. Jsou zde uvedeny jednotlivé druhy zároveň ve vztahu s jednotlivým opracováním. Lze si povšimnout vlivu tepelného opracování na celkové počty mikroorganismů. U všech tří druhů hmyzu byl zaznamenán pokles po spaření. Zároveň další vliv na celkový počet mělo i sušení. Po tomto ošetření došlo k dalšímu poklesu celkového množství organismů.

Počty bacilů ve většině případů nepřesáhly hodnotu 2 log KTJ/g. Vyšší hodnoty byly zaznamenány u cvrčka, který byl spařený. Dále jeho zvýšený výskyt byl zaznamenán u potemníka moučného ve stavu živém a spařeném, a dále u potemníka brazilského sušeného.

Hodnoty kvasinek se pohybovaly průměrně kolem 3 log KTJ/g. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u živého potemníka moučného, kde hodnoty sahaly až na 4 log KTJ/g.

Salmonella nebyla detekována v žádném ze vzorků (ND = nedetekována).

Tabulka 2 – Porovnání vzorků podle způsobu opracování – log KTJ/g (kolonie tvořících jednotek)

Způsob opracování	Celkové počty	<i>Bacillus spp.</i>	Kvasinky
Živý	7,66±0,44 ^b	2,05±0,15 ^a	3,37±0,70 ^a
Spařený	7,05±0,29 ^b	2,92±1,22 ^a	2,78±0,36 ^a
Sušený	5,98±1,31 ^a	2,30±0,46 ^a	3,04±0,81 ^a

Horní indexy (a, b) u jednotlivých hodnot značí statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými způsoby opracování. Na 95% hladině významnosti se jednotlivé způsoby opracování neliší v počtech bacilů, ani v počtech kvasinek. Hodnoty týkající se celkových počtů mikroorganismů se dělí na dvě odlišné skupiny. Na základě výsledků lze potvrdit vliv tepelného opracování na celkový počet mikroorganismů, jelikož sušené vzorky obsahovaly významně méně bakterií ($P < 0,05$). U kvasinek došlo taktéž k jejich poklesu především po spaření, pokles ovšem nebyl statisticky významný.

Tabulka 3 – Porovnání podle druhu – log KTJ/g (kolonie tvořících jednotek)

Druh	Celkové počty	<i>Bacillus spp.</i>	Kvasinky
Cvrček	7,26±0,51 ^a	2,08±0,26 ^a	3,4±0,42 ^a
Potemník moučný	6,27±1,55 ^a	2,89±1,23 ^a	2,84±0,96 ^a
Potemník brazilský	7,16±0,52 ^a	2,30±0,46 ^a	2,96±0,43 ^a

Horní indexy u jednotlivých hodnot značí statistické rozdíly mezi jednotlivými druhy hmyzu. Na 95% hladině významnosti v rámci celkových počtů nedochází ke statisticky významné odlišnosti.

Na základě výsledků byl u cvrčka zjištěn nejvyšší počet přítomných mikroorganismů. Naopak nejnižší byl zaznamenán u potemníka moučného.

V rámci přítomnosti bacila nedochází k nijak výrazné odlišnosti mezi jednotlivými druhy hmyzu. Nejvyšší počet výskytu bacila byl zaznamenán u potemníka moučného.

V porovnání rozdílnosti přítomnosti kvasinek se jednotlivé druhy neliší.

5.2 Identifikace izolátů

5.2.1 Identifikace bakterií

Tabulka 4 - Výsledky identifikace pomocí MALDI-TOF MS

Identifikovaný druh bakterie	Cvrček			Potemník			Potemník brazilský		
	živý	pařený	sušený	živý	pařený	sušený	živý	pařený	sušený
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1								
<i>Enterococcus termitis</i>	3								
<i>Acinetobacter baumannii</i>		6							
<i>Enterobacter aerogenes</i>				3			1	9	
<i>Staphylococcus kloosii</i>				5					3
<i>Bacillus subtilis</i>						1			
<i>Enterococcus dispar</i>						1			
<i>Acinetobacter pittii</i>						3			
<i>Citrobacter koseri</i>							1		
<i>Citrobacter braakii</i>							2		

Ve výše vyobrazené tabulce jsou znázorněny četnosti výskytu jednotlivých druhů bakterií u jednotlivých druhů hmyzu při různých opracováních.

U cvrčka, který byl spařený, byl zaznamenán největší výskyt bakterie *Acinetobacter baumannii*. U potemníka moučného živého byly nejvyšší výskyt bakterie *Staphylococcus kloosii*. U potemníka brazilského spařeného byl nejvyšší výskyt bakterie *Enterobacter aerogenes*.

Citrobacter amalonaticus byl prokázán u vzorku živého cvrčka domácího, konkrétně č. 3. *Enterococcus termitis* byl prokázán taktéž u živého cvrčka domácího, u vzorku č. 1 a 2. *Acinetobacter baumannii* byl prokázán u vzorků č. 10 a 12, které patřily cvrčkovi domácímu spařenému. *Enterobacter aerogenes* byl prokázán u vzorků potemníka moučného č. 4, 5, 6, u vzorku č. 8 živého potemníka brazilského a u vzorků č. 17, 18, které patřily spařenému potemníkovi brazilskému. *Staphylococcus kloosii* byl prokázán u vzorku živého potemníka moučného, a to č. 4 a 6. Dále byla jeho přítomnost u vzorku sušeného potemníka brazilského, a to konkrétně u vzorku č. 26 a 27. *Bacillus subtilis* byl prokázán u vzorku sušeného potemníka moučného č. 22. *Enterococcus dispar* byl prokázán u vzorku sušeného potemníka moučného č. 23. *Acinetobacter pittii* byl prokázán u vzorku sušeného potemníka moučného, u vzorku č. 23 a 24. *Citrobacter koseri* byl prokázán u živého potemníka brazilského, vzorku č. 7. *Citrobacter braakii* byl detekován u živého potemníka brazilského, u vzorku č. 8.

5.2.2 Identifikace mikroskopických hub

Při detekování výskytu bylo použito ředění odpovídající 0,1 g vzorku. Kvalitativní vyhodnocení prokázalo u vzorku živého cvrčka výskyt plísně rodu *Aspergillus*. U vzorků živého potemníka brazilského byla nalezena plíseň rodu *Alternaria* a sterilní plíseň (bez fruktifikačních orgánů). U vzorků spařeného potemníka moučného byly detekovány plísně rodů *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* a sterilní plísně.

6 Diskuze

6.1 Celkový počet mikroorganismů

6.1.1 Živí jedinci

Při testování, které provedli Klunder et al. (2012) na živých larvách moučného červa, byl stanovený celkový počet mikroorganismů 7,7 log KTJ/g. Výsledky týkající se živých tvorů cvrčka domácího ukázaly celkový počet mikroorganismů 7,2 log KTJ/g. Ve výsledcích, které uvedli Stoops et al. (2016), kteří se taktéž zabývali hodnotami celkového počtu mikroorganismů v těle živé larvy potemníka moučného, hodnoty dosahovaly 7,7 - 8,3 log KTJ/g. Dále se tímto výzkumem zabývali Vandeweyer et al. (2016). Jejich výsledná koncentrace naměřených hodnot celkového počtu mikroorganismů v těle cvrčka domácího sahala až k 8,2 - 8,4 log KTJ/g. U larev potemníka moučného byly hodnoty celkového počtu mikroorganismů kolem 8,0 - 8,5 log KTJ/g. Megido et al. (2016) se rovněž zabývali celkovým počtem mikroorganismů v těle u moučného červa a cvrčka. Hodnoty u potemníka se pohybovaly kolem 8,58 log KTJ/g a hodnoty u cvrčka byly 7,97 log KTJ/g.

Výsledky měření, která jsme provedli v této práci, jsou srovnatelné s výše zmíněnými testováními. Co se týče celkového počtu mikroorganismů v těle cvrčka, kdy byla naměřena hodnota 7,81 log KTJ/g, což se nejvíce blíží k hodnotám měření, které provedli Megido et al. (2016). V případě porovnání podobnosti výsledků potemníka moučného, kdy se hodnoty rovnají 7,46 log KTJ/g, se nejvíce shodují s výsledky, které uveřejnili Klunder et al. (2012).

6.1.2 Vaření jedinci

Testování, které provedli Klunder et al. (2012), kdy se zabývali celkovým počtem mikroorganismů v těle hmyzu, který byl 1 minutu vařen, byly hodnoty u potemníka moučného nižší než 1,7 log KTJ/g.

V testování, které jsme provedli my, byly hodnoty razantně vyšší. U potemníka byla hodnota celkového počtu mikroorganismů 6,91 log KTJ/g. Je tedy nasnadě, že Klunder et al. (2012) použili lehce odlišný způsob ošetření, než my v případě ošetření spařením.

6.2 Identifikace stanovených bakterií

Stoops et al. (2016) se zabývali konkrétními přítomnými druhy v těle potemníka moučného. Rozmanitost jednotlivých druhů byla opravdu veliká. Mezi nejčastěji detekovanými kmeny bakterií byly *Proteobacteria*, *Firmicutes* a *Actinobacteria*. Dále byla

prokázána přítomnost rodů *Haemophilus*, *Staphylococcus* a *Clostridium*. V testování, které provedli Grabowski a Klein (2016), byl ve cvrčkovi detekován *Bacillus cereus* a v potměníku moučném *Listeria ivanovii*.

V našem testování pomocí metody MALDI-TOF byly detekovány především bakterie z kmenů *Firmicutes* a *Proteobacteria*, konkrétně rody *Staphylococcus*, *Enterobacter* a *Acinetobacter*. V menším zastoupení byla prokázána přítomnost bakterií rodu *Bacillus* a *Enterococcus*. Výsledky našich identifikací se tedy zčásti shodují se studií provedenou Stoops et al. (2016).

6.3 Kvasinky a plísně

6.3.1 Sušení jedinci

Garofalo et al. (2017), kteří se ve svém testování zaměřili i na přítomnost kvasinek v těle sušených jedinců, jejich přítomnost prokázali. Cvrček svým výsledkem 4,8 log KTJ/g, silně dominoval nad výslednou hodnotou potměníka moučného, u kterého byla naměřena hodnota nižší než 2,0 log KTJ/g. V měření, které provedli Garofalo et al. (2017), byly výsledky trochu rozdílné. Hodnota vypovídající o množství přítomných kvasinek v těle cvrčka byla nižší než 1,0 log KTJ/g. V těle potměníka moučného byla hodnota přítomných kvasinek 2,4 log KTJ/g.

V našem testování byl počet přítomných kvasinek odlišný. U cvrčka byla naměřena hodnota nižší než v měření, které provedl Garofalo et al. (2017), a to 3,81 log KTJ/g. U potměníka byla naměřena shodná hodnota jako v měření, které provedl Garofalo et al. (2017). Počet přítomných kvasinek u moučného červa byl také nižší než 2 log KTJ/g.

6.3.2 Živí jedinci

Vandeweyer et al. (2015) ve výsledcích svého výzkumu uvádí množství kvasinek a plísni v těle živého potměníka moučného v hodnotách pohybujících se v rozmezí od 4,8-6,0 log KTJ/g. V případě cvrčka domácího jsou hodnoty o něco vyšší. Ty se pohybují v rozmezí 5,9-6,4 log KTJ/g. Ve výsledcích, které uveřejnili Stoops et al. (2016), můžeme pozorovat opět rozdílné hodnoty. Hodnoty množství přítomných kvasinek a plísni v těle živého potměníka moučného se rovnaly 5,2-5,7 log KTJ/g. V těle živého cvrčka domácího byla hodnota 5,64 log KTJ/g. Výsledky, které uveřejnili Garofalo et al. (2017), byla naměřena hodnota přítomných kvasinek a plísni v těle sušeného potměníka moučného pouze 2,4 log KTJ/g. V některých vzorcích byla hodnota dokonce nižší než 1 log KTJ/g. Na počet kvasinek a plísni se ve svém výzkumu zaměřili i Megido et al. (2016). V jejich výsledcích byl

uveřejněn výsledek 4,7 log KTJ/g vztahující se k živému moučnému červu. V těle čerstvého cvrčka byla naměřena hodnota 4,8 log KTJ/g.

V našem měření byla u živého potemníka moučného zjištěna hodnota přítomných kvasinek 4,09 log KTJ/g, což je shodné jako hodnoty, které naměřili Vandeweyer et al. (2015). V těle živého cvrčka domácího byla stanovena hodnota 3,46 log KTJ/g. V porovnání s ostatními výzkumy je tato hodnota nižší.

6.4 Identifikace stanovených kvasinek a plísní

Van der Spiegel et al. (2013), kteří se daným tématem zabývali, uveřejnili, že v hmyzu byly detekovány plísně rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Mucor*, *Mucorales*, *Alternaria*, *Dreschlera* a *Phoma*. V testování, které provedl Grabowski (2016), taktéž potvrdil přítomnost plísní *Mucor* spp., *Aspergillus* spp. a *Penicillium* spp. Ve výsledcích, které uveřejnili Grabowski a Klein (2016) taktéž potvrdili přítomnost v těle potemníka moučného plísní *Penicillium* spp. a *Mucor* spp.

V materiálu, který jsme zkoumali my, byla u živého cvrčka detekována plíseň *Aspergillus* a u živého potemníka brazilského byla detekována plíseň rodu *Alternaria* a sterilní plíseň⁴. Dále byl zaznamenán výskyt plísní u spařeného moučného červa. Konkrétně se jednalo o plísně rodu *Penicilium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* a sterilní plíseň, což je částečně v souladu s výsledky van der Spiegel et al. (2013) a Grabowski a Klein (2016).

6.4.1 *Bacillus* spp.

Výzkum, kterému se věnovali Garofalo et al. (2017), prokázal výskyt bakterie *Bacillus cereus* v těle sušeného cvrčka. Hodnoty se rovnaly 3,6 log KTJ/g. V případě sušeného moučného červa byly hodnoty nižší, konkrétně méně než 1 log KTJ/g.

Co se týče výsledků našeho bádání, hodnoty u cvrčka byly rozdílné. Maximální hodnota byla menší než 2,0 log KTJ/g. V těle sušeného moučného červa byl průkaz přítomného bacila rovněž minimální. Hodnota dosahovala max 2,0 log KTJ/g. Nárůst byl naopak vysoký ve vzorku spařeného moučného červa. Hodnoty dosahovaly až na 2,92 log KTJ/g. Tento rozdílný výsledek byl způsoben vysporulováním po spaření. To nám umožnilo detekci.

⁴ Mycelium bez fruktifikačních orgánů.

6.4.2 *Salmonella* spp.

Ve výzkumu, který provedl Vandeweyer (2016) s živými cvrčky a moučnými červy, došlo ke shodě s výsledky Giacconeho (2005) a Grabowskiho et al. (2014), kdy *Salmonella* spp. nebyla detekována v ani jednom ze vzorků, který prošel testováním. Totéž bylo potvrzeno v testování, které provedli Garofalo et al. (2017) a Vandeweyer et al. (2016). Výzkum, který provedl Garofalo et al. (2017) na sušených cvrčcích a moučných červech, taktéž nepotvrdil přítomnost salmonely v ani jednom z testovaných vzorků.

V našem rozboru jsme se taktéž zaměřili na přítomnost salmonely, kdy taktéž v žádném z testovaných vzorků nebyl potvrzen výskyt. V tomto parametru jsou tedy naše výsledky plně ve shodě s odbornou literaturou.

7 Závěr

Z výsledků bakalářské práce vyšly nejvyšší hodnoty celkového počtu mikroorganismů u cvrčka domácího, avšak hodnoty u zbylých dvou druhů v živém stavu jsou srovnatelné. U spařených a sušených druhů vždy hodnoty postupně klesají. To značí určitý vliv tepelného opracování na celkový počet mikroorganismů. Ve většině vzorků nebyla potvrzena přítomnost bacilů. Kvasinky se objevily u všech vzorků, nejvyšší hodnoty byly naměřeny u cvrčka. Salmonela nebyla detekována v žádném ze vzorků.

Na základě identifikace izolovaných bakterií pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, díky které byla detekována široká škála přítomných bakterií, je možno hlídat přítomnost potenciálně patogenních mikroorganismů, které mohou představovat určitou hrozbu pro zdraví konzumenta.

Jelikož je jedlý hmyz díky svým nutričním vlastnostem brán jako jídlo budoucnosti, bude mu po mikrobiologické stránce věnováno ještě mnoho výzkumů, které snad povedou k zajištění nezávadnosti a ochraně spotřebitele.

Seznam použité literatury

- Agabou, A., Alloui, N. (2010). Importance of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) as a reservoir for pathogenic bacteria in Algerian broiler houses. *Veterinary World*, 3, str. 71–73.
- Ali, A., Mohamadou, B. A., Saidou, C., Aoudou, Y., Tchiegang, C. (2010). Physicochemical properties and safety of grasshoppers, important contributors to food security in the far North Region of Cameroon. *Res. J. Anim. Sci.* 4 (5), str. 108-111.
- Amadi, E. N., Ogbalu, O. K., Barimalaa, I. S., Pius, M. (2005). Microbiology and nutritional composition of an edible larva (*Bunaea alcinoe* STOLL) of the Niger Delta. *J. Food Safety*, 25: str. 193-197.
- Anankware, J., Fening, O., Osekre, E., Obeng-Ofori, D. (2015). Insects as food and feed: A review, *Interantional Journal of Agricultural Research and Review*, str. 143-151.
- ANSES Opinion Request No 2014-SA-0153, (2014). OPINION of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety on “the Use of Insects as Food and Feed and the Review of Scientific Knowledge on the Health Risks Related to the Consumption of Insects.
- ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety), 2015. Opinion on the use of insects as food and feed and the review of scientific knowledge on the health risks related to the consumption of insects. [online] [cit. 11.01.2018] Dostupné na: <<https://www.anses.fr/en/documents/BIORISK2014sa0153EN.pdf>>.
- Barco, L., Belluco, S., Roccato, A., Ricci, A. (2014). *Escherichia coli* and Enterobacteriaceae Counts on Poultry Carcasses Along Slaughter Processing line, Factors Influencing the Counts and rElantionship between Visual Faecal Contamination of Carcasses and Counts: a review, 107. EFSA Supporting Publication, 2014:EN-636.
- Baumgart, J., Becker, B., Stephan (Hrsg.), R. (2016). *Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, Ein Leitfaden für das Studium* (6. Ausg.). Hamburg: Behr's Verlag, str. 496.

- Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C. C., Paoletti, M. G., Ricci, A. (2013). Edible insects in a food safety and nutritional perspective: a critical review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 12 (3), str. 296-313.
- Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C. C., Ricci, A., Paoletti, M. G. (2015). Edible insects: a food security solution or a food safety concern. *Anim. Front.* 5(2), str. 25-30.
- Braide, W., Oranusi, S., Udegbonam, L. I., Oguoma, O., Akobondu, C. and Nwaoguikpe, R. N. (2011). Microbiological quality of an edible caterpillar of an emperor moth, *Bunaea alcinoe*. *Journal of Ecology and the Natural Environment*, 3, str. 176–180.
- Bukkens, S. G. F. (2005). Insects in the human diet: nutritional aspects. In M. G. Paoletti, ed. *Ecological implications of minilivestock; role of rodents, frogs, snails, and insects for sustainable development*, New Hampshire, Science Publishers, str. 545–577.
- Carbonne, A., Arnaud, I., Maugat, S., Marty, N., Dumartin, C., Bertrand, X. (2013). National multidrug-resistant bacteria (MDRB) surveillance in France through the RAISIN network: a 9 year experience. *J. Antimicrob. Chemother.* 68 str.954–959 . [online] [cit. 01.02.2018] Dostupné na: < <https://doi.org/10.1093/jac/dks464>>.
- Cerqueira, G. M., Peleg, A. Y. (2011). Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB Life.* 2011;63:str. 1055–1060. [online] [cit. 09.01.2018] Dostupné na: < <https://doi.org/10.1002/iub.533>>.
- Cohen, J. H., Sánchez, N. D. M., Montiel-ishinoet, F. D. (2009). Chapulines and food choices in rural Oaxaca. *Gastronomica: the Journal of Food and Culture*, 9(1): str. 61–65.
- DeLong, D. M. (1960). Man in a world of insects. *The Ohio Journal of Science*, 60(4): str. 193–206.
- Durst, B. P., Johnson, D., Leslie, N. R., Shono, K. (2010). *Forest insects as food: humans bite back*. Bangkok, Thailand. ISBN 978-92-5-106488-7. Str. 231.
- EFSA Scientific Committee. (2015). Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. in: *ej EFSA Journal*, 13 (10), str. 1-60.

- Eilenberg, J., Vlak, J. M., Nielsen-LeRoux, C., Cappellozza, S., Jensen, A. B. (2015). Diseases in insects produced for food and feed. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1, str. 87–102.
- El-Far, M., Li, Y., Fediere, G., Abol-Ela, S., Tijssen, P. (2004). Lack of infection of vertebrate cells by the densovirus from the maize worm *Mythimna loreyi* (MIDNV). *Virus Res.* 9, str. 17-24.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), (2012). Composition database for Biodiversity Version 2, BioFoodComp2. (Latest update: 10 January 2013). Accessed January 2012. [online] [cit. 13.01.2018] Dostupné na: <www.fao.org/infoods/infoods/tables-and-databases/en/>.
- FAO, (2013). Edible insects. Future prospects for food and feed security. van Huis A, van Itterbeeck J, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G and Vantomme P. Rome, 2013. [online] [cit. 07.02.2018] Dostupné na: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3253e/i3253e00.htm>>.
- FAO/WHO, (2001). Human vitamin and mineral requirements. Rome.
- FASFC (Belgian Scientific Committee of the Federal Agency for the Safety of the Food Chain), (2014). Food safety aspects of insects intended for human consumption. Common advice of the Belgian Scientific Committee of the Federal Agency for the Safety of the Food Chain (FASFC) and of the Superior Health Council (SHC). [online] [cit. 14.2.2018] Dostupné na: <http://www.favv-afsc.fgov.be/scientificcommittee/advice/_documents/ADVCE14-2014_ENG_DOSSIER2014-04.pdf>.
- Finke, M. D. (2002). Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology*, 21(3): str. 269–285.
- Finke, M. D. (2007). Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biology*, 26, str. 105–115.
- Flood, J. (1980). *The moth hunters: Aboriginal prehistory of the Australian Alps*. Canberra, Humanities Press, Inc.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A. (2015). *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition). Chapter 37 – *Staphylococcus aureus*, str. 655-674, [online] [cit. 05.01.2018] Dostupné na: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00037-8>>.

- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Taccari, M., Cardinali, F., Aquilanti, L., Riolo, P., Ruschioni, S., Isidoro, N., Clementi, F. (2017). The microbiota of marketed processed edible insects revealed by high-throughput sequencing.
- Giaccone, V. (2005). Hygiene and health features of “minilivestock”. In: Paoletti, M. G. (Ed.), Ecological Implications of Minilivestock: Potential of Insects, Rodents, Frogs and Snails. Science Publishers, Inc., Enfield (NH), USA, str. 579–598.
- Grabowski, N. T., Jansen, W., Klein, G. (2014). Microbiological status of edible insects sold as pet feed in Germany. In: Insects to feed the world conference, summary report (eds Vantomme P, Münke C, van Huis A, van Itterbeeck J and Hackman A) Ede, Netherlands, 14–17 May 2014 str. 48. Wageningen: Wageningen University and Research Centre.
- Grabowski, N. T., Klein, G. (2016). Microbiology of cooked and dried edible Mediterranean field crickets (*Gryllus bimaculatus*) and superworms (*Zophobas atratus*) submitted to four different heating treatments. Food Sci. Technol. Int.
- Hanboonsog, Y., Durst, P. (2014). Edible insects in Lao PDR: building on tradition to enhance food security. FAO 2014. ISBN 978-92-5-108307-9, str. 55.
- Harpe, D., McCormack, D. (2001). Online Etymological Dictionary. Accessed on 1 November 2012. [online] [cit. 07.02.2018] Dostupné na: <www.LogoBee.com>.
- Holzapfel, W. H., Baumgart, J., Heeschen, W., Zschaler, R., Freiherr v. Rheinbaben, F. (2004). Lexikon Lebensmittel-Mikrobiologie und -Hygiene (3. Ausg.). Hamburg: Behr's Verlag., str. 121.
- Huong, T. T., Komínková, M., Guráň, R., Ruttkay-Nedecký, B., Kopel, P., Trnková, L., Zítka, O., Adam, V., Kizek, R. (2014). Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. Journal of Metallomics and Nanotechnologies 2014., str. 64-66.
- Hwang, C.-A., Tamplin, M. L. (2005). The influence of mayonnaise pH and storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* in seafood salad. Int. J. Food Microbiol. 102: str. 277–285. [online] [cit. 07.01.2018] Dostupné na: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.019>>.
- Chusri, S., Chongsuvivatwong, V., Rivera, J. I. (2014). Clinical Outcomes of Hospital-Acquired Infection with *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.;58(7): str. 4172-4179. [online] [cit. 05.01.2018] Dostupné na: <<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02992-14>>.

- Jarlier, V., INVS (2014). Surveillance of Multidrug Resistant Bacteria in French Healthcare Facilities BMR-Raisin Network Données 2012. Saint-Maurice: Institut de Veille Sanitaire. [online] [cit. 10.01.2018] Dostupné na: <<http://www.invs.sante.fr>>.
- Karah, N., Haldorsen, B., Hegstad, K., Simonsen, G. S., Sundsfjord, A., Samuelsen, O. (2011). Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: str. 738–744. [online] [cit. 13.02.2018] Dostupné na: <<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq521>>.
- Kellert, S. R. (1993). Values and perceptions of invertebrates. *Conservation Biology*, 7(4): str. 845–855.
- Keweloh, H. (2009). *Mikroorganismen in Lebensmitteln, Theorie und Praxis der Lebensmittelhygiene.* (3. Ausg.). Haan-Gruiten: Fachbuchverlag Pfanneberg.
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J. (2012). *Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Inc.
- Klaban, V. (2001). *Svět mikrobů*, 2. vydání upravené, Gaudeamus, Hradec Králové, str. 311-312, 388-391, ISBN: 80-7041-687-4.
- Klunder, H. C., Wolkers-Rooijackers, J., Korpela, J. M., Nout, M. J. R. (2012). Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control*, 26, str. 628–631.
- Komprda, T. (2004). *Obecná hygiena potravin. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně*, Brno, ISBN 80-7157-757-X, str. 146.
- Krämer, J. (2011). *Lebensmittel-Mikrobiologie.* (6. Ausg.). Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
- Lavigne, J. P., Sotto, A., Nicolas-Chanoine, M. H., Bouziges, N., Bourg, G., Davin-Regli, A., (2012). Membrane permeability, a pivotal function involved in antibiotic resistance and virulence in *Enterobacter aerogenes* clinical isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, str. 539–545, [online] [cit. 10.02.2018] Dostupné na: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03607>>.
- Mariod, A., Matthäus, B., Eichner, K. (2004). Fatty acid, tocopherol and sterol composition as well as oxidative stability of three unusual sudanese oils. *Journal of Food Lipids*, 11: str. 179–189.
- Martínez, S., Borrajo, R., Franco, I., Carballo, J. (2007). Effect of environmental parameters on growth kinetics of *Bacillus cereus* (ATCC 7004) after mild heat

treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 117:str. 223–227. [online] [cit. 12.02.2018] Dostupné na: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.002>>.

- Megido, R. C., Desmedt, S., Blecker, Ch., Béra, F., Haubruge, É., Alabi, T. and Francis, F. (2016). Microbiological load of edible insects foud in Belgium.
- Milanović, V., Osimani, A., Pasquini, M., Aquilanti, L., Garofalo, C., Taccari, M., Cardinali, F., Riolo, P., Clementi, F. (2016). Getting insight into the prevalence of antibiotic resistance genes in specimens of marketed edible insects. *Int. J. Food Microbiol.* 227, str. 22-28.
- Mlcek, J., Rop, O., Borkovcova, M., Bednarova, M. (2014). A comprehensive look at the possibilities of edible insects as food in europe – a review. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 64: str. 147–157. [online] [cit. 12.02.2018] Dostupné na: <<http://dx.doi.org/10.2478/v10222-012-0099-8>>.
- Montefour, K., Frieden, J., Hurst, S., Helmich, C., Headley, D., Martin, M., Boyle, D. A. (2008). *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. *Crit Care Nurse.* Feb; 28(1):str. 15-25.
- Moore, N., King, L., Possee, R. (1987). Viruses of insects. *Insect Science and Its Application*,8(3), str. 275-289.
- Nemeč, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T. J., Deschaght, P., Passet, V., Vaneechoutte, M., Brisse, S., Dijkshoorn, L. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res. Microbiol.* 162: str. 393–404. [online] [cit. 13.02.2018] Dostupné na: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2011.02.006>>.
- NVWA (Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority), (2014). Advisory report on the risks associated with the consumption of mass-reared insects. [online] [cit. 07.01.2018] Dostupné na: <<http://www.nvwa.nl/actueel/risicobeoordelingen/bestand/2207475/consumptie-gekwekte-insecten-advies-buro>>.
- Oonincx, D. G. A. B., de Boer, I. J. M. (2012). Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans - a life cycle assessment. *PLoS One* 7:e51145. [online] [cit. 12.02.2018] Dostupné na: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051145>>.

- Oonincx, D. G. A. B., van Itterbeeck, J., Heetkamp, M. J. W., van den Brand, H., van Loon, J. J. A., van Huis, A., (2010). An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. PLoS One 5:e14445. [online] [cit. 16.01.2018] Dostupné na: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0014445>>.
- Paoletti, M. G., Norberto, L., Damini, R. & Musumeci, S. (2007). Human gastric juice contains chitinase that can degrade chitin. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51(3): str. 244–251.
- Prändel, O., Fischer, A., Schmidhofer, T., Sinell, H.-J. (1988). *Handbuch der Lebensmittel-Technologie, Fleisch Technologie und Hygiene der Gewinnung und Verarbeitung*. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
- Premalatha, M., Abbasi, T., Abbasi, T., Abbasi, S. A. (2011). Energy-efficient food production to reduce global warming and ecodegradation: the use of edible insects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15: str. 4357–4360. [online] [cit. 08.01.2018] Dostupné na: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.115>>.
- Riemelt, I., Bartel, B., Malczan, M. (2012). *Milchwirtschaftliche Mikrobiologie* (2. Ausg.). Hamburg: Behr's Verlag.
- Roos, N., Nurhasan, M., Thang, B., Skau, J., Wieringa, F., Khov, K., Friis, H., Michaelsen, K. F., Chamnan, C. (2010). WinFood Cambodia: improving child nutrition through improved utilization of local food. Poster for The WinFood Project, Denmark, Department of Human Nutrition, University of Copenhagen.
- Rumpold, B. A., Schlüter, O. K. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Mol. Nutr. Food Res.* 57 (5), str. 802-823.
- Ryu, K. S., Lee, H. S., Kim, K. Y., Kim, M. J., Kang, P. D., Chun, S. N., Lee, S. H., Lee, M. L. (2012). Anti-diabetic effects of the silkworm (*Bombyx mori*) extracts in the db/db mice. *Planta Med.*, 78: str. 458.
- Saeed, T., Dagga, F. A., Saraf, M. (1993). Analysis of residual pesticides present in edible locusts captured in Kuwait. *Arab Gulf Journal of Scientific Research*, 11(1): str. 1–5.
- Sebeny, P. J., Riddle, M. S., Petersen, K. (2008). *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma, str. 444–449. [online] [cit. 09.02.2018] Dostupné na: <<https://doi.org/10.1086/590568>>.

- Schleifer, K. H., Kilpper-Balz, R., Devriese, L. A. (1984). *Staphylococcus arlettae* sp. nov., *S. equorum* sp. nov. and *S. kloosii* sp. nov.: three coagulase-negative, novobiocin-resistant species from animals. *System. Appl. Microbiol.* 5, str. 501-509.
- Simpanya, M. F., Allotey, J., Mpuchane, S. (2000). A mycological investigation of phane, and edible caterpillar of an emperor moth, *Imbrasia belina*. *J. Food Prot.* 63 (1), str. 137-140.
- Song, E.-H., Park, K.-H., Jang, E.-Y., Lee, E.-J., Chong, Y.-P., Cho, O.-H. (2010). Comparison of the clinical and microbiologic characteristics of patients with *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes* bacteremia: a prospective observation study. *Diagnos. Microbiol. Infect. Dis.* 66, str. 436–440, [online] [cit. 11.01.2018] Dostupné na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.11.007>.
- Stannard, C. (1997). Development and use of microbiological criteria for foods. *Food Sci. Technol. Today* 1997, 11, str. 137–176.
- Stoops, J., Crauwels, S., Waud, M., Claes, J., Lievens, B., Van Campenhout, L. (2016). Microbial community assessment of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and grasshoppers (*Locusta migratoria migratorioides*) sold for human consumption. *Food Microbiol.* 53, str. 122-127.
- Sundh, I., Vilcks, A., Goettel, M. S. (2012). Beneficial microorganisms in agriculture, food and the environment: safety assessment and regulation. CABI, Oxfordshire, UK, str. 360.
- Szelei, J., Woodring, J., Goettel, M. S., Duke, G., Jousset, F. X., Liu, K. Y., Zadori, Z., Li, Y., Styer, E., Boucias, D. G., Kleespies, R. G., Bergoin, M., Tijssen, P. (2011). Susceptibility of North-American and European crickets to *Acheta domesticus* densovirus (AdDNV) and associated epizootics. *Journal of Invertebrate Pathology* 106: str. 394-399.
- Šindler, J. (2010). *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*, 1. vydání, Grada, Praha, str. 81-82, ISBN:978-80-247-3170-4.
- Tabachnick, W. J., MacLachlan, N. J., Thompson, L. H., Hunt, G. J., Patton, J. F. (1996). Susceptibility of *Culicoides variipennis sonorensis* to infection by polymerase chain reaction-detectable bluetongue virus in cattle blood. *Am J Trop Med Hyg* 54, str. 481–485.

- TCEC Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Off. J. Eur. Union 2007, 322/12, str. 12–29.
- van der Spiegel, M., Noordam, M. Y., van der Fels-Klerx, H. J. (2013). Safety of novel protein sources (insects, microalgae, seaweed, duckweed, and rapeseed) and legislative aspects for their application in food and feed production. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 12 (6), str. 662-678.
- van Huis, A., van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Vantomme, P. (2013). *Edible Insects: Future Prospects for Food and Feed Security*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. FAO Forestry Paper, FAO.
- van Huis, A., Klunder, H., Mertens, E. (2013b): *Edible insects*. Food and agriculture organization of the united states. ISSN 0258-6150.
- Vandeweyer, D., Lievens, B., van Campenhout, L. (2015). Microbial quality of edible insects reared on industrial scale in Belgium and the Netherlands, Conference on Food Microbiology edition:20 location:Brussels.
- Vandeweyer, D., Crauwels, S., Lievens, B., Van Campenhout, L. (2016). Microbial counts of mealworm larvae (*Tenebrio monitor*) and crickets (*Acheta domestici* and *Gryllobates sigillatus*) from different rearing companies and different production barches. *Interntional Journal of Food Microbiology* 242 (2017), str. 13-18.
- Vijver, M., Jager, T., Posthuma, L., Peijnenburg, W. (2003). Metal uptake from soils and soil-sediment mixtures by larvae of *Tenebrio monitor* (L.) (Coleoptera). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 54 (3), str. 277-289.
- Weissman, D. B., Gray, D. A., Pham, H. T., Tijssen, P. (2012). Billions and billions sold: pet-feeder crickets (Orthoptera: Gryllidae), commercial cricket farms, an epizootic densovirus.
- -Aree, J., Viwatpanich, K. (2005). Edible insects in the Laos PDR, Myanmar, Thailand, and Vietnam. In M. G. Paoletti, ed. *Ecological implications of minilivestock*, New Hampshire, Science Publishers, str. 415–440.
- Yun, J.-H., Roh, S. W., Whon, T. W., Jung, M.-J., Kim, M.-S., Park, D.-S., Yoon, C., Nam, Y.-D., Kim, Y.-J., Choi, J.-H., Kim, J.-Y., Shin, N.-R., Kim, S.-H., Lee, W.-J., Bae, J.-W. (2014). Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: str. 5254–5264. [online] [cit. 18.01.2018] Dostupné na: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01226-14>>.

- Zschaler, R., Heeschen, W. (2015). Fragen & Antworten, Prozesshygiene. (2. Ausg.). Hamburg: Behr's Verlag.