

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Výskyt patogenních bakterií ve výrobcích z jedlého hmyzu
Bakalářská práce**

Zuzana Váchová

Výživa a potraviny

Ing. Roman Švejstl, PhD.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Výskyt patogenních bakterií ve výrobcích z jedlého hmyzu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce 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 3.5.2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Romanu Švejstilovi, PhD., vedoucímu mé bakalářské práce, za odborné vedení, pomoc v laboratoři a cenné rady, které mi pomohly vypracovat tuto bakalářskou práci.

Výskyt patogenních bakterií ve výrobcích z jedlého hmyzu

Souhrn

Stálý populační růst vede k poptávce po alternativních zdrojích bílkovin, jedlý hmyz se do budoucna jeví jako dobrý udržitelný zdroj bílkovin, ale i dalších živin. Konzumace hmyzu však může mít svá mikrobiologická rizika, kterým je potřeba předcházet. V dnešní době není dostatek studií, které by se zabývaly bezpečností konzumace jedlého hmyzu. Jedlý hmyz se legislativně řadí do nových potravin, avšak požadavky na mikrobiologickou kvalitu jedlého hmyzu nejsou v legislativě zavedeny. Díky této absenci jsou uvedena pouze doporučení, která by měla být dodržována při zpracování jedlého hmyzu a výrobků z nich.

Cílem této bakalářské práce bylo, zjistit výskyt bakterií ve výrobcích z jedlého hmyzu. Bylo testováno 6 vzorků s obsahem cvrččí mouky, které ji obsahovaly v různém procentuálním zastoupení. Všechny skupiny mikroorganismů byly stanoveny klasickými kultivačními metodami podle platných technických norem a standardních postupů. K identifikaci vykultivovaných bakteriálních druhů bylo využito MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

Z provedených rozborů bylo prokázáno, že analyzované produkty obsahovaly potenciálně patogenní bakterie rodu *Clostridium*, avšak metodou MALDI-TOF byly identifikovány pouze *Clostridium sporogenes*. Také byla zjištěna i přítomnost *Bacillus cereus*, počty ale nepřekročily mezní hodnoty (10^3 KTJ/g). Analyzované vzorky neobsahovaly potenciálně patogenní bakterie *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* nebo *Salmonella* spp. Analýza *Enterobacteriaceae* a *Escherichia coli*, taktéž neprokázala jejich přítomnost (detekční limit <1 log KTJ/g). Vzorky rovněž obsahovaly určitá množství plísní v rozmezí od 1 log KTJ/g do 2,80 log KTJ/g, a také sporulujících bakterií v rozmezí od 1 log KTJ/g do 4,76 log KTJ/g, avšak ani v těchto hodnotách nepřesahovaly mezní hodnoty. V jedné šarži u vzorku 1 a 6 byly naměřeny vyšší hodnoty mezofilních aerobních bakterií 7 log KTJ/g a $5,57 \pm 0,59$ log KTJ/g, avšak průměrné naměřené hodnoty mezofilních aerobních bakterií nepřekročily doporučenou mikrobiologickou limitní hodnotu.

Ze získaných výsledků lze usoudit, že výrobky z jedlého hmyzu až na dvě výjimky splňovaly požadavky, které jsou na ně kladené z hlediska mikrobiologické kvality.

Klíčová slova: mikrobiota, *Bacillus*, *Clostridium*, nová potravina

Occurrence of pathogenic bacteria in edible insect products

Summary

Continuous population growth leads to a demand for alternative sources of protein; edible insects appear to be a good sustainable source of protein and other nutrients in the future. However, the consumption of insects can possess the microbiological risks, which need to be prevented. In the present day, there is lack of studies concerning the safety of consumption of edible insects. Edible insects are considered as novel foods but requirements for the microbiological quality of edible insects are not included in the legislation. Due to this absence, only recommendations are given that should be followed when processing edible insects.

The aim of this bachelor thesis was to determine the occurrence of bacteria in edible insect products. Six samples containing cricket flour in different percentages were tested. All groups of microorganisms were determined by the classical cultivation methods according to valid technical norms and standard procedures. MALDI-TOF mass spectrometry was used to identify bacterial species.

The analyzes have shown that insects contained potentially pathogenic bacteria of the genus *Clostridium*, but only *Clostridium sporogenes* was identified by MALDI-TOF MS. The presence of *Bacillus cereus* was also found, but the counts did not exceed the recommended limit values (10^3 CFU/g). The analysis did not show the presence of the potentially pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* or *Salmonella* spp.. The analysis also did not show the presence of *Enterobacteriaceae* and *Escherichia coli* (detection limit <1 log CFU/g). The samples also contained fungi ranging from 1 log CFU/g to 2.80 log CFU/g and aerobic sporulating bacteria ranging from 1 log CFU/g to 4.76 log CFU/g that are the values also not exceeding the recommended limit values. Two samples, both in single lot, contained counts of aerobic mesophilic bacteria (7 log CFU/g and $5,57 \pm 0,59$ log CFU/g,) that exceeded the recommended values, but the averages of these samples complied with the recommendation.

The results show that products from edible insects met the microbiological requirements with two exceptions.

Keywords: microbiota, *Bacillus*, *Clostridium*, novel food

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce.....	9
2.1 Hypotéza	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Konzumace hmyzu.....	10
3.1.1 Historie	10
3.1.2 Příklady ze světa	10
3.2 Výživové vlastnosti jedlého hmyzu.....	12
3.2.1 Bílkoviny	12
3.2.2 Tuky.....	14
3.2.3 Sacharidy	15
3.2.4 Minerální látky.....	16
3.2.5 Vitaminy	16
3.3 Rizika konzumace	17
3.3.1 Alergeny	18
3.3.2 Toxiny.....	19
3.3.2.1 Toxiny syntetizovány hmyzem (fanerotoxické).....	19
3.3.2.2 Toxiny absorbovány z prostředí (kryptotoxické)	19
3.3.3 Mikroorganismy	20
3.4 Mikrobiologie jedlého hmyzu	21
3.4.1 Mikrobiota jedlého hmyzu.....	25
3.5 Legislativa	27
4 Metodika	28
4.1 Příprava vzorků	28
4.2 Kultivace	29
4.2.1 Celkové počty aerobních mikroorganismů.....	30
4.2.2 Celkové počty aerobních sporulujících	30
4.2.3 <i>Bacillus cereus</i>	30
4.2.4 <i>Escherichia coli</i>	30
4.2.5 <i>Enterobacteriaceae</i>	30
4.2.6 Počet koaguláza-pozitivních stafylokoků a průkaz <i>S. aureus</i>	31
4.2.7 Počet kvasinek a plísní.....	31
4.2.8 <i>Salmonella</i> spp.....	32
4.2.9 <i>Listeria monocytogenes</i>	32
4.2.10 Přítomnost <i>Clostridium</i> spp.	33

4.3	Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie	34
4.3.1	Příprava vzorků.....	34
4.3.2	MALDI-TOF	34
4.4	Statistické vyhodnocení	34
5	Výsledky	35
5.1	Kultivační stanovení mikroorganismů.....	35
6	Diskuze	39
7	Závěr.....	43
8	Literatura.....	44
9	Zdroje obrázků.....	51
10	Seznam použitých zkratk a symbolů	52
11	Seznam tabulek	53
12	Seznam obrázků	54
13	Samostatné přílohy	II

1 Úvod

Hmyz je součástí lidské stravy mnoho let, o čemž svědčí záznamy z dávné historie. Nyní je entomofágie rozšířena především v mnoha regionech Afriky, Asie a Austrálie, v některých rozvojových zemích jsou lidé na konzumaci hmyzu do určité míry závislí. Ve většině evropských zemí je hmyz pokládán spíše za lahůdku, avšak jeho oblíbenost rychle vzrůstá.

Stálý nárůst světové populace vede ke zvyšování živočišné výroby, tato skutečnost má zásadní vliv na klima naší planety. Jednou z možných alternativ masa by mohla být produkce hmyzu, při níž vzniká méně skleníkových plynů, spotřebovává se menší množství vody a zabírá menší prostor, než vyžaduje produkce různých druhů masa. Hmyz je navíc ceněn díky svým nutričně významným látkám, které obsahuje, je dobrým zdrojem bílkovin, vlákniny, mastných kyselin a mnoha mikronutrientů.

Hmyz lze konzumovat v různých formách. Jednou z možností je konzumace celého hmyzu, jak v syrovém stavu, tak upraveném například pražením nebo smažením. Další variantou je zpracování hmyzu do formy prášku nebo pasty, ty se pak mohou přidávat do různých pekárenských výrobků nebo proteinových tyčinek. Právě proteinové tyčinky a hmyzí mouka jsou v této bakalářské práci podrobeny mikrobiologickému rozboru. Aby výrobky na bázi hmyzu nepředstavovaly riziko pro konzumenty, je důležité se zaměřit na výskyt možných rizik, ve všech fázích výroby, tzn. při zpracování surovin (hmyzí mouka) až po konečné potravinářské výrobky.

Teoretická část bakalářské práce je zaměřena na historii konzumace hmyzu a na současnou spotřebu hmyzu ve světě, čemuž je věnována první kapitola literární rešerše. Následující kapitola se zabývá výživovými hodnotami hmyzu, zde jsou popsány hlavní makronutrienty a mikronutrienty, které se nachází v jedlém hmyzu. Další kapitola je věnována rizikům konzumace mikrobiální kontaminací, toxikologickým rizikům a alergickým reakcím, které mohou mít vliv na kvalitu a bezpečnost konzumovaného hmyzu. Předposlední kapitola literární rešerše se zabývá mikrobiologií jedlého hmyzu, zde jsou popsány konkrétní rody bakterií identifikované v mikroflóře jedlého hmyzu. V závěru literární rešerše je zmínka o legislativě.

Praktická část bakalářské práce poskytuje informace o výskytu patogenních bakterií ve výrobcích z jedlého hmyzu, je zde kompletně popsána metodika stanovení bakterií, souhrn výsledků a diskuze.

2 Cíl práce

Hmyz obsahuje nutričně cenné látky, které mohou být využity ve výživě člověka. Vzhledem k rapidně vzrůstající celosvětové populaci roste i poptávka po nových zdrojích potravy. Jedním z těchto zdrojů může být hmyz, který ale obsahuje velké množství bakterií, z nichž některé jsou potenciálně patogenní. Technologická úprava hmyzí mouky, která je základem některých výrobků na bázi hmyzu, by měla tyto mikroorganismy eliminovat. Cílem bakalářské práce bylo zjistit výskyt bakterií ve výrobcích z jedlého hmyzu.

2.1 Hypotéza

Výrobky z jedlého hmyzu budou splňovat požadavky na ně kladené z hlediska mikrobiologické kvality.

3 Literární rešerše

3.1 Konzumace hmyzu

Konzumace hmyzu je známa jako entomofágie, slovo pochází z řeckého éntomon (hmyz) a phagein (k jídlu), jedná se o potravinový zvyk, který je rozšířen mezi mnoha lidmi ve světě (Pandey et al., 2018). Jedlý hmyz je součástí stravovacích návyků v mnoha asijských i afrických zemích a je vynikajícím zdrojem makronutrientů i mikronutrientů. V Evropě však požívání jedlého hmyzu není příliš obvyklé. Avšak díky pozitivním nutričním vlastnostem a relativně malému dopadu na životní prostředí může být jedlý hmyz považován za „potravu budoucnosti“. Díky krátkému životnímu cyklu hmyzu má jeho produkce ekologický význam, jelikož může vést ke snížení emisí skleníkových plynů, k poklesu využití půdy, zlepšení stavu znečištěné vody a životního prostředí (Raheem et al., 2019).

3.1.1 Historie

Stravovací návyky jsou ovlivňovány kulturními zvyky, které jsou většinou dány náboženskou vírou v daném místě. O požívání hmyzu se můžeme dočíst v křesťanské, židovské i islámské literatuře. Jeden z příkladů je popsán v knize Leviticus, kde je zmínka o kobylykách, pravděpodobně se jednalo o pouštní kobylyky *Schistocerca gregaria*. V islámské tradici se většina odkazů vztahuje na povolení konzumace kobylek, zmiňováno je však i požívání včel, mravenců, termitů a dalšího hmyzu. O konzumaci košer kobylek se můžeme dočíst i v židovské literatuře. Tento zvyk ale upadal díky nedostatečné znalosti o hmyzu, tradice se zachovala pouze u jemenských Židů a v částech severní Afriky (van Huis et al., 2013).

Záznamy o entomofágii existují také ze starověku, jeden z nich je z 8. století př. n. l. o sluzích na Středním Východě, kteří nosili na královské hostiny kobylyky napíchané na špejlích. První záznam o entomofágii v Evropě pochází z Řecka, kde Aristoteles (384–322 př. n. l.) ve své knize popisuje cikády, které považuje za vynikající pochoutku. Ve starověkém Římě přírodovědec Plinius starší píše o pokrmu nazývaném *coosu*, což by údajně měla být larva tesaříka černého *Cerambyx cerdo* (Morris, 2004).

O hmyzu jako potravině a o jeho léčebných vlastnostech se píše také v čínské literatuře z období dynastie Ming (1368–1644). Další zmínky jsou například z roku 1857, kde německý cestovatel Barth Heinrich ve své knize z cest po Africe psal o lidech, kteří si pochutnávali na hmyzu a existují i další záznamy z různých zemí (van Huis et al., 2013). O historii entomofágie v Česku svědčí česká kuchařka z let 1920 a 1937, nachází se v ní recepty připravené z hmyzu, například postup na přípravu chroustové polévky (Bureš, 2020).

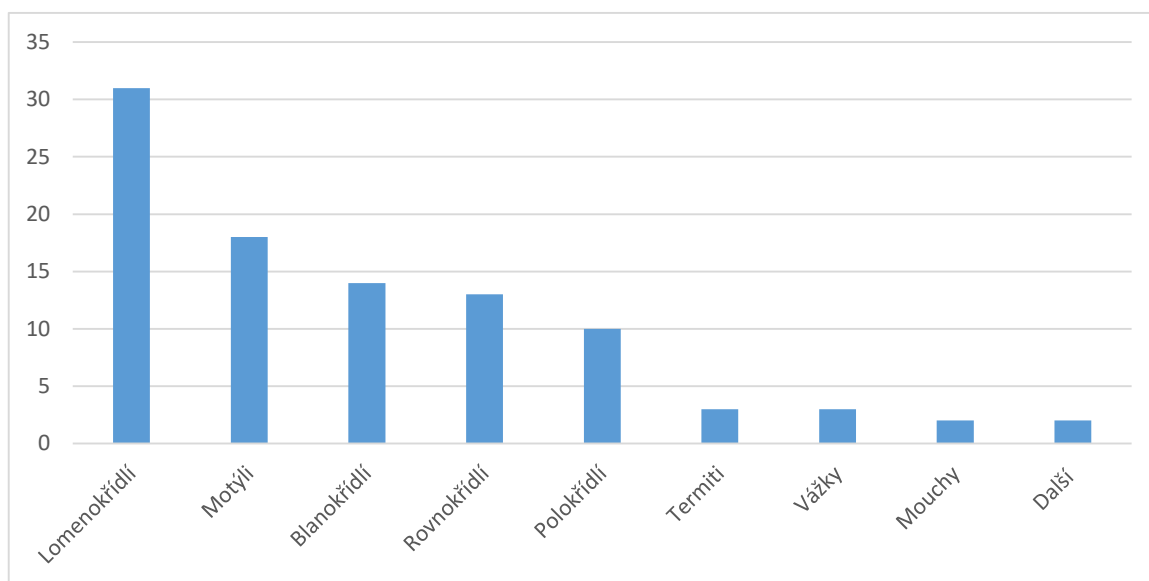
3.1.2 Příklady ze světa

Růst světové populace vede ke zvyšování poptávky po mase. Nárůst živočišné výroby vede k úbytku zemědělské půdy, a proto se hledají nové strategie pro výrobu potravin. Jednou z nich může být právě konzumace hmyzu, která může přispět zvýšení potravinové bezpečnosti i v rozvojových zemích (van Huis et al., 2015).

Existuje několik záznamů o počtu druhů jedlého hmyzu. DeFoliart (1997) odhadoval 1000 druhů jedlého hmyzu, Ramos Elorduy (2005) zaznamenal nejméně 1 681 druhů. Jongema (2012) z výzkumné univerzity ve Wageningenu v Nizozemsku vypsál pomocí latinských jmen celosvětový soupis jedlého hmyzu, který zahrnoval 1900 druhů jedlého hmyzu po celém světě, v roce 2017 byl tento seznam aktualizován a bylo napočítáno 2111 druhů (Jongema, 2017)

Mezi nejkonzumovanější řád hmyzu ve světě (31 %) patří brouci (*Coleoptera*), což je dáno převážně tím, že v tomto řádu je zahrnuto zhruba 40 % ze všech známých druhů hmyzu. Druhým nejčastěji konzumovaným hmyzem (18 %) jsou motýli (*Lepidoptera*), ti jsou oblíbení hlavně v subsaharské Africe. V Latinské Americe jsou oblíbenou pochoutkou blanokřídlí (*Hymenoptera*), do tohoto řádu se řadí například včely, vosy a mravenci, se 14 % jsou na třetím místě. Dalším populárním hmyzem jsou s 13 % kobylky, sarančata a cvrčci, ti patří do řádu rovnokřídlých (*Orthoptera*). Mezi další často konzumované (10 %) patří hmyz z řádu polokřídlých (*Hemiptera*). Již méně konzumovaným řádem jsou termiti (*Isoptera*) a vážky (*Odonata*), obojí zastoupení 3 %. Posledním zmíněným řádem jsou mouchy (*Diptera*), ty jsou zastoupeny 2 % a poté následují už jen další řády (Graf 1) (van Huis et al., 2013).

Lepidoptera se konzumují téměř vždy jako housenky a *Hymenoptera* se konzumují většinou v jejich larválních nebo kuklových stádiích. *Coleoptera* se konzumují jak dospělí, tak i larvy, zatímco řády *Orthoptera*, *Homoptera*, *Isoptera* a *Hemiptera* se konzumují většinou v jejich dospělé fázi (van Huis et al., 2013).



Graf 1 Procentuální podíl konzumovaného hmyzu dle řádu konzumovaného po celém světě. Upraveno podle van Huis et al. (2013).

V současné době je požívání hmyzu tradiční záležitostí minimálně ve 108 zemích světa. Počty druhů konzumovaného hmyzu se velice liší, například ve Francii je známa konzumace pouze jednoho druhu, kdežto například v Mexiku se jí až 450 druhů hmyzu (Bureš, 2020). Největší spotřebu hmyzu mají v Africe, Asii a také Jižní Americe (Mlček, 2020).

V Africe se konzumace hmyzu odvíjí podle počasí, v období dešťů je obtížné lovit zvěř i ryby, a tak je tento druh potravy nahrazen právě hmyzem. Že je hmyz důležitým zdrojem obživy ukazuje příklad z hlavního města Demokratické republiky Kongo, kde sní průměrná

domácnost 300 g housenek týdně. U etnické skupiny Gbaya se konzumace hmyzu podílí až z 15 % na celkovém denním příjmu bílkovin (van Huis et al., 2013).

V Asii entomofágií ovlivňuje migrace obyvatel, příkladem je Thajsko, kde se díky migraci rozšířila konzumace ze severovýchodní části až po celé zemi. Na jihovýchodě Asie se konzumuje zhruba 150-200 druhů hmyzu, na jihu Asie je to 50 druhů a 39 druhů v Papui - Nové Guineji a na ostatních tichomořských ostrovech (van Huis et al., 2013).

Díky bohatým znalostem původních obyvatel Mexika nejen o hmyzu, ale i zdejších rostlinách a dalších přírodních zákonitostech, konzumují Mexičané velký počet druhů jedlého hmyzu, jak již bylo zmíněno až 450 druhů hmyzu.

V Evropě, ale i v jiných vyspělých zemích, například USA, lidé projevují odpor k entomofágií. Konzumaci hmyzu mají spojenou s primitivním chováním, obávají se přenosu nemocí. Další negativní postoje jsou zakořeněny z minulosti, kdy byl hmyz konzumován z nedostatku jiných potravin, například v době válek. Právě díky tomuto přístupu nebyl hmyz součástí stravy vůbec nebo jen minimálně jako zážitková potravina. Avšak v posledních letech se postoj k jedlému hmyzu mění a začíná být tento styl stravování stále populárnější, zasloužily se o to v první řadě festivaly jídla a restaurace, které připravují hmyzí speciality (Mlček, 2020).

Po celém světě, včetně Evropy, konzumace hmyzu roste, což je dáno zejména nutričními a environmentálními výhodami, které hmyz jako potravina nabízí (Bureš, 2020). Produkce hmyzu se navyšuje a začíná být oblíbeným trendem ve výživě člověka, širší veřejnosti je prezentována jako nová alternativní potravina s dobrými výživovými vlastnostmi (Mlček, 2020).

3.2 Výživové vlastnosti jedlého hmyzu

Hmyz je kvalitním trvale udržitelným zdrojem potravy, má potenciál si poradit s problémy podvýživy v rozvojových i rozvinutých částech světa. Splnění energetických požadavků uznala i Organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů (WHO/FAO, 2003). Předností jedlých druhů hmyzu je jejich dobrá přizpůsobivost, nenáročnost na podmínky prostředí, široká druhová rozmanitost, možnost různého způsobu opracování, ale také především jejich výživová hodnota, všech těchto výhod můžeme využívat nejen v potravinářství (Mlček, 2020).

Díky velkému počtu druhů a jejich morfologickým rozdílnostem je těžké zobecnit nutriční hodnoty (van Huis et al., 2015). Výživové hodnoty jedlého hmyzu se také mění s růstovými fázemi, rychlostí růstu, stravou a prostředím, ve kterém hmyz žije. Hmyz obsahuje vysoký podíl bílkovin, vitamínů, tuků a dalších živin (Naseem et al., 2020). Obsah bílkovin ve hmyzu je vyšší ve srovnání s hovězím, vepřovým a kuřecím masem. Hmyz obsahuje více polynenasycených mastných kyselin a má vyšší obsah minerálních látek, jako je železo a zinek (van Huis et al., 2015).

3.2.1 Bílkoviny

Proteiny jsou organické sloučeniny, které se skládají z aminokyselin. Aminokyseliny jsou základní potřebnou složkou k biosyntéze všech bílkovin, s pomocí lidského metabolismu, je tak zajištěn správný růst, vývoj a funkce organismu (van Huis et al., 2013). Proto jsou

bílkoviny nepostradatelné ve výživě člověka, je zapotřebí přijmout alespoň 50 g bílkovin denně (Naseem et al., 2020).

Proteiny hrají důležitou roli v potravinách, přispívají k jejich fyzikálním i senzorickým vlastnostem. Výživová hodnota potravin se odvíjí od obsahu a kvality bílkovin, kterou určuje složení aminokyselin. Také záleží, jestli kvalita bílkovin odpovídá lidským potřebám, dalším faktorem je stravitelnost bílkovin (van Huis et al., 2013). I díky vhodnému zastoupení aminokyselin u některých druhů hmyzu, má hmyz opodstatnění ve výživě, bílkoviny z obilovin jsou základem ve výživě lidí po celém světě, avšak nemají adekvátní obsah aminokyselin, množství lysinu je nízké, některé obilniny postrádají tryptofan (např. kukuřice) a také threonin. Lidé z Papui – Nové Guineji kompenzují nedostatek lysinu a leucinu požíváním larev nosatce palmového, který tyto cenné aminokyseliny obsahuje (Anankware, 2015).

Většina bílkovin je přijímána z živočišných zdrojů, ty však nemusí být v budoucnu dostačující, proto se hledají alternativy zdrojů bílkovin. I přes snahu najít různé jiné zdroje bílkovin, např. použití kvasinek, se hmyzí protein ukazuje jako nejlepší varianta (Naseem et al., 2020).

V porovnání s hovězím (190 g bílkovin na kilogram jedlé hmotnosti), drůbežím, (200 g) a s vepřovým (150 g) masem je koncentrace bílkovin u dospělých cvrčků vyšší, ty obsahují 205 g bílkovin na kilogram jedlé hmotnosti (Naseem et al., 2020).

Obsah bílkovin v jedlém hmyzu se pohybuje v rozmezí od 5 do 77% sušiny, existují velké rozdíly mezi jednotlivými řády hmyzu (Schlüter et al., 2017). Průzkum hodnocení bílkovin u 100 druhů hmyzu patřících do různých řádů, který provedli Xiaoming et al. (2010), prokázal rozdíly nejen mezi jednotlivými řády hmyzu, ale i v rámci stádií (Tabulka 1).

Tabulka 1 Obsah proteinů u jednotlivých řádů hmyzu v procentech (van Huis et al., 2013)

Řád	Stádium vývoje	Obsah proteinů (%)
Lomenokřídli (<i>Coleoptera</i>)	Dospělec, larva	23 - 66
Motýli (<i>Lepidoptera</i>)	Kukla, larva	14 - 68
Polokřídli (<i>Hemiptera</i>)	Dospělec, larva	42 - 74
Stejnokřídli (<i>Homoptera</i>)	Dospělec, larva, vajíčko	45 - 57
Blanokřídli (<i>Hymenoptera</i>)	Dospělec, kukla, larva, vajíčko	13 - 77
Vážky (<i>Odonata</i>)	Dospělec, nymfa	46 - 65
Rovnokřídli (<i>Orthoptera</i>)	Dospělec, nymfa	23 - 65

Kobylky, sarančata a cvrčci jsou bohaté na bílkoviny ve srovnání s dalším jedlým hmyzem, obsah bílkovin se však liší nejen u každého druhu, ale i dle jejich aktuálního životního stádia. Například u sarančete *Locusta migratoria* v larválním stádiu může být podstatně méně bílkovin, než u dospělého jedince (Naseem et al., 2020).

Procento bílkovin také závisí na způsobu, jakým je hmyz upraven. Ve svém výzkumu Bukkens (1997) ukázal, že červ *Mopane* měl při suchém pražení o 11 % nižší obsah bílkovin než při sušení. Stejně tak u termitů, kteří obsahovali v syrovém stavu 20 % bílkovin, upravení smažením 32 % a v uzeném stavu 37 % bílkovin.

Na obsah bílkovin má vliv i výživa. Ukázalo se, že vlivem otrubového krmiva podávaného sarančím v Nigérii je jejich obsah bílkovin až dvojnásobný, oproti sarančím, kterým byla podávána kukuřice (van Huis et al., 2013).

3.2.2 Tuky

Tuk je nejenergičtější makroživinou v potravinách, skládá se z triacylglycerolů, které jsou složeny z jedné molekuly glycerolu a tří mastných kyselin. Mastné kyseliny můžeme rozdělit na nasycené a nenasycené, nasycené jsou tuhé při pokojové teplotě a mají vyšší teplotu tání. Nasycené mastné kyseliny můžeme najít převážně v živočišných produktech, ale například i v tropických olejích jako je palmový nebo kokosový. Nenasycené mastné kyseliny vždy obsahují alespoň jednu dvojnou vazbu, obvykle jsou v kapalném skupenství. Můžeme je najít v rostlinných olejích, v rybách a v ořechích. Stejně jako u aminokyselin, i u tuků máme esenciální mastné kyseliny, které si lidské tělo nedokáže syntetizovat, a tak musí být přijaty společně s potravou, příkladem jsou kyselina linolová a α -linolenová (van Huis et al., 2013).

Průměrně se v hmyzu nachází kolem 10 % až 60 % obsahu tuku v sušině (Kouřimská, et al., 2016). Vysoký obsah tuku (38 % v sušině) mají tzv. Witchetty grub (van Huis et al., 2013), jedná se o larvy, které jsou základem stravy australských domorodců, termín se používá hlavně tehdy, pokud jsou larvy považovány za potravu (Yen et al., 2018). Jedí se buď syrové, nebo uvařené v horkém popelu. I přesto, že jsou nejdůležitější hmyzí potravou pouště (van Huis et al., 2013), není stále znám počet a totožnost konzumovaných druhů. Larvy se sbírají a konzumují dříve, než dospějí, a protože je vědecká taxonomie založena na pojmenování dospělých jedinců, existuje ohledně identifikace Witchetty grub mnoho nezodpovězených otázek (Yen et al., 2018).



Obrázek 1 Witchetty grub (foto: telegraph.co.uk)

Množství tuku se odvíjí od pohlaví, druhu, vývojového stádia hmyzu a od působení dalších faktorů (migrace, teplota) (Naseem et al., 2020). Složení mastných kyselin hmyzu je ovlivňováno také rostlinami, kterými se hmyz živí (van Huis et al., 2013).

Hmyz používá tuky k různým účelům, uplatňují se například při vývoji, reprodukci, dále jsou součástí buněčné membrány a pokožka je díky nim voděodolná. Tuky slouží také jako zásoba energie, které je nutná při dlouhých přeletových vzdálenostech.

Hmyzí tuk se objevuje v různých formách, obsahuje mnoho triacylglycerolů (80%), ty jsou využívány, pokud je zvýšená energetická spotřeba například u dlouhých letových vzdáleností. Druhou skupinou jsou fosfolipidy, jejich množství se liší dle aktuálního

vývojového stádia, většinou je nižší než 20% (Kouřimská et al., 2016). V hmyzu je málo cholesterolu, volných mastných kyselin a vosku. Výživovou hodnotu hmyzu zvyšuje i dostatečný obsah esenciálních mastných kyselin a omega-3 mastných kyselin.

3.2.3 Sacharidy

Sacharidy jsou významnou nutriční složkou v lidském těle. Díky jejich struktuře jsou rychlým zdrojem energie, slouží jako zásobní látky a také jako stavební materiál. Mohou se kombinovat s bílkovinami a tuky, jejich sloučeniny mají důležité fyziologické funkce.

Jak již bylo zmíněno, jedlý hmyz je bohatý na bílkoviny a tuky, sacharidů je v něm podstatně méně. Dle druhu jedlého hmyzu se liší i obsah sacharidů, pohybuje se v rozmezí od 1 do 10 %. Neobvyklým zdrojem sacharidů hmyzí exkrementy (16,27 %) (Xiaoming et al., 2010).

Tabulka 2 Obsah sacharidů v některých řádech hmyzu (% sušiny) (Xiaoming et al., 2010)

Řád hmyzu	Sacharidy		
	Nejvíce	Nejméně	Průměr
Vážky (<i>Odonata</i>)	4,78	2,36	3,75
Rovnokřídlí (<i>Orthoptera</i>)			1,20
Stejnokřídlí (<i>Homoptera</i>)	2,80	1,54	2,17
Polokřídlí (<i>Hemiptera</i>)	4,37	2,04	3,23
Lomenokřídlí (<i>Coleoptera</i>)	2,82	2,79	2,81
Motýli (<i>Lepidoptera</i>)	16,27	3,65	8,20
Mouchy (<i>Diptera</i>)			12,04
Blanokřídlí (<i>Hymenoptera</i>)	7,15	1,95	3,65

Hmyz obsahuje značné množství polysacharidů (Xiaoming et al., 2010). Veškerý hmyz obsahuje polysacharid chitin, polymer N-acetyl-D-glukosaminu, který je součástí exoskeletu (Schlüter et al., 2017). Je nejběžnější formou nerozpustné vlákniny u hmyzu. Je podobný polysacharidové celulóze, která se nachází v rostlinách. Obsah chitinu u komerčně chovaného hmyzu se pohyboval od 2,7 do 49,8 mg na kg čerstvé hmotnosti (od 11,6 do 137,2 mg na kg sušiny).

Chitin je tráven v lidském organismu pomocí enzymu, který se nazývá chitináza, který je součástí žaludečních šťáv, nemusí však být vždy aktivní. Pokud není chitin běžnou součástí stravy, může docházet k nižší míře aktivity chitinázy. Průzkum provedený u Italů, ukázal, že ve 20 % případů, byl enzym neaktivní. Naopak u lidí, kteří konzumují hmyz pravidelně, tedy hlavně u lidí žijících v tropických oblastech, je aktivita chitinázy častější (Muzzarelli et al., 2001) Chitin má příznivé účinky, pomáhá při parazitárních infekcích a alergiích, jeho antivirový účinek může zabraňovat růstu tumoru (Kouřimská et al., 2016). Chitin také působí jako vláknina, vysoký obsah chitinu mají zejména druhy hmyzu s tvrdým exoskeletem, a tudíž mohou být dobrým zdrojem vlákniny. (Bukkens, 2005)

3.2.4 Minerální látky

Mezi nejdůležitější minerální látky v lidské výživě řadíme vápník, fosfor, hořčík, sodík, draslík. Mezi základní stopové prvky patří železo, zinek, měď, mangan, jód a selen (Finke et al., 2014). U jednotlivých druhů hmyzu jsou velké odchylky v jejich množství (Rumpold et al., 2013), avšak velká část z nich obsahuje málo vápníku, protože většina hmyzu na rozdíl od bezobratlých nemá mineralizovanou kostru. Jeho hladina se pohybuje kolem 0,3 % sušiny (Finke et al., 2014). Množství vápníku je vyšší v porovnání s hovězím, vepřovým a kuřecím masem, to platí i u obsahu železa. Ve většině druhů hmyzu je malé množství draslíku, sodíku a hořčíku, výjimkou jsou brouci (*Hemiptera*) a některé druhy řádu *Orthoptera* (kobyly, cvrčci, kobyly), ti jsou obzvláště bohatí na hořčík. Většina hmyzu vykazuje vysoké množství fosforu (Rumpold et al., 2013). Většina hmyzu obsahuje relativně vysoké hladiny stopových minerálů, železa, zinku, mědi a manganu (Finke et al., 2014). Jak již bylo zmíněno, ve většině případů jedlý hmyz obsahuje dostatek manganu a mědi, to však neplatí u brouků a termitů, ti mají nízký obsah manganu. Velmi dobrým zdrojem zinku jsou druhy z řádu *Orthoptera* (saranče, kobyly a cvrčci) (Rumpold et al., 2013).

Obsah minerálních látek je ovlivněn například ročním obdobím, odlišné množství bylo zaznamenáno i mezi různými populacemi stejného druhu, které žily ve stejné oblasti (Finke et al., 2014). Také se odvíjí od stravy, kterou je hmyz krmen, například obsah vápníku v larvách zavíječe voskového, domácích cvrčcích, moučných červech a v larvách bource morušového lze zvýšit 5 až 20krát, pokud jsou krmeny stravou s vysokým obsahem vápníku. Toto zvýšení obsahu vápníku je díky zbytkové potravě, která zůstává v gastrointestinálním traktu, vápník nebyl vyloučen, ani zabudován do těla hmyzu (Mlček et al., 2014).

I přesto, že většina hmyzu nemá dostatečné množství vápníku a draslíku, má konzumace hmyzu potenciál poskytovat specifické mikroživiny jako měď, železo, hořčík, mangan, fosfor, selen a zinek. Díky malému množství sodíku lze využít jedlý hmyz při stravě s nízkým obsahem sodíku (Rumpold et al., 2013).

3.2.5 Vitaminy

Vitaminy jsou organické sloučeniny, které jsou nezbytné pro správný chod metabolismu lidského těla. Tělo neumí vitaminy syntetizovat, a tak je potřeba je dodávat potravou (Tiencheu et al., 2017).

Zatím nebylo provedeno dostatek studií, a proto jsou nedostatečné informace o obsahu vitamínů v jedlém hmyzu. Dle dosavadních analyzovaných výsledků obsahuje jedlý hmyz především karoteny, vitaminy B1, B2, B6, D, E, K a C (Xiaoming et al., 2010).

Údaje o vitamínu A jsou různorodé, liší se dle jednotlivých druhů, dle původu analyzovaného hmyzu, ale také záleží na metodách, které byly vybrány a způsob jakým byl hmyz připravován (Mlček et al., 2014). Hmyz všeobecně není nejlepším zdrojem vitamínu A (van Huis et al., 2013), avšak u mnoha druhů divokého hmyzu se vyskytuje velké množství karotenoidů (Finke et al., 2014). Většina druhů obratlovců může přeměnit některé z těchto karotenoidů na retinol, takže hmyz obsahující vysoké hladiny karotenoidů může být významným zdrojem vitamínu A pro hmyzožravce i obratlovce (Mlček et al., 2014).

O množství vitamínu B v jedlém hmyzu opět není mnoho informací (Finke et al., 2014). Hmyz se jeví jako dobrý zdroj většiny vitamínů skupiny B, ale zdá se, že řada z nich má nízké hodnoty thiaminu (Mlček et al., 2014). Některé vitamíny skupiny B jsou relativně nestabilní, pokud jsou vystaveny teplu, světlu nebo kyslíku. Z toho vyplývá, že komerčně dostupný sušený hmyz může obsahovat nižší hladiny některých vitamínů skupiny B v důsledku zpracování, sušení a skladování.

V hmyzu bylo naměřeno různé množství vitamínu E (Finke et al., 2014). Relativně vysoká hladina vitamínu E byla naměřena u larev nosatce palmového a v lyofilizovaném prášku bource morušového (van Huis et al., 2013). Hodnoty u domácích cvrčků v zajetí se pohybovaly od 5 do 79 mg na kg sušiny. Obsah vitamínu E v jiném komerčně chovaném hmyzu byl relativně nízký (obvykle méně než 15 mg na kg sušiny). Tyto velké rozdíly mohou být způsobeny stravou, která jim byla poskytována. U divokého hmyzu existuje jen málo údajů o obsahu vitamínu E (Finke et al., 2014).

Přesto, že některé druhy hmyzu obsahují relativně vysoké množství vitamínu, tak na 100 g hmyzu není dostatečným zdrojem vitamínů A, C, niacinu a jak již bylo zmíněno ve většině případů ani thiaminu (Rumpold et al., 2013).

3.3 Rizika konzumace

Vzhledem k vzrůstající tendenci spotřeby jedlého hmyzu po celém světě, vyvstává otázka ohledně jeho bezpečnosti. Stejně jako u ostatních druhů potravin, hodnocení bezpečnosti jedlého hmyzu zahrnuje monitorování škodlivých mikroorganismů, parazitů, toxinů, těžkých kovů, veterinárních léčiv, hormonů a reziduí pesticidů (Baiano, 2020). Stále je však nedostatek znalostí o bezpečnosti konzumování jedlého hmyzu, což může být značnou překážkou pro podporu chovu a následnou spotřebu jedlého hmyzu. Právě obavy spojené s bezpečností konzumace jedlého hmyzu snižují jeho oblibu hlavně v západních zemích, proto je třeba tuto otázku řešit a podpořit tak užívání hmyzu v lidské stravě (Imathiu, 2020).

Konzumace hmyzu je spojena s mnoha výhodami nejen výživovými, avšak stejně jako všechny rostlinné a živočišné potravinové výrobky může být i jedlý hmyz zdrojem rizikových faktorů, jak exogenních, tak endogenních (Alrifai et al., 2019). Ve srovnání se savci a ptáky, představuje hmyz menší riziko přenosu infekcí mezi zvířaty a lidmi, avšak stále jsou zde další důležité faktory spojeny s bezpečností, právě ty by měly být prioritou při výzkumu chovaného hmyzu. Rozdělujeme je do tří hlavních kategorií: mikrobiální kontaminace, toxikologická rizika a alergenní reakce (Raheem et al., 2019).

Evropský úřad pro bezpečnost potravin ve svých studiích o používání hmyzu jako potravy pro člověka, ale i jako krmení pro zvířata, došel k závěru, že riziko pro zdraví lidí a zvířat se odvíjí na způsobu chovu a způsobu zpracování hmyzu. Druh konzumovaného hmyzu, použité krmivo, prostředí, ve kterém se hmyz nachází, použité výrobní a zpracovatelské metody, to vše může mít vliv na následnou bezpečnost. (EFSA, 2015). Ve většině evropských zemí je hmyz chován v kontrolovaném prostředí, kde jsou zajištěny správné hygienické postupy, čímž jsou snížena některá rizika. Problémy s bezpečností jsou však ve většině afrických zemí, kde je hmyz sklízen z volné přírody, a tudíž je složité kontrolovat jeho bezpečnost (Murefu et al., 2019).

Ke zlepšení bezpečnosti požívání jedlého hmyzu je třeba správně zvolit a dodržovat všechny již zmíněné postupy (Alrifai et al., 2019), což je však obtížné u divoké sklizně. Právě zajištění bezpečnosti by mohlo pomoci zlepšit vnímání spotřebitelů (Imathiu, 2020).

3.3.1 Alergeny

Díky očekávané zvýšené poptávce po této potravíně, je třeba vyhodnotit rizika spojená s jeho konzumací včetně alergií (Ribeiro et al., 2018). Jde o nepříznivou imunitní reakci na potraviny, která je způsobena látkami zvanými alergeny, může mít za následek vážné onemocnění a někdy i smrt (Imathiu, 2020). Podobně jako u ostatních potravin, které obsahují bílkoviny, jsou členovci schopni vyvolat u citlivějších lidí alergickou reakci (zprostředkovanou imunoglobulinem E) (van Huis et al., 2013). Při studiu alergenního potenciálu nových proteinových zdrojů je důležité studovat taxonomický vztah se známými alergenními zdroji, za účelem identifikace možné rizikové skupiny.

Alergenní riziko může vzniknout kvůli možné křížové reakci s dalšími členovci (Ribeiro et al., 2018), protilátky vytvořené proti specifickému alergenu jednoho druhu hmyzu jsou schopné identifikovat alergeny jiného druhu a mohou tak vyvolat alergickou reakci na tento hmyz (van Huis et al., 2013). Křížová reakce probíhá především s korýši, kteří jsou nejčastějším původcem potravinové alergie v západním světě, další křížová reakce může nastat například s roztoči z domácího prachu, kteří jsou častým spouštěčem respirační alergické reakce (Ribeiro et al., 2018). Důkazem této reakce je studie, která identifikovala pozitivní zkříženou reakci po konzumaci bílkovin moučných červů u jedinců, kteří trpí alergiemi na roztoče a korýše. Studie s cvrčky (*Gryllus bimaculatus*) ukázala zkříženou reakci u jedinců s prokázanými alergiemi na krevety (Dobermann et al., 2017).

Ačkoli současné získané poznatky naznačují, že důležitou roli hrají právě panalergeny členovců, jako je tropomyosin nebo arginin kináza, je zapotřebí provést další studie o molekulárních mechanismech, které jsou základem potravinové alergie na hmyz (Ribeiro et al., 2018). Můžeme naleznout i další důkazy o alergiích, které vznikly po konzumaci hmyzu, například po požití larev včel, které obsahují pyl, může nastat tato nežádoucí reakce organismu, proto se lidem s alergií na pyl nedoporučuje tyto larvy konzumovat. U kobylek (*Orthoptera*) v jižní Africe, které byly konzumovány z důvodu zmenšení roje kobylek, byly zaznamenány u citlivějších jedinců astmatické záchvaty (Auerswald et al., 2005). Více než 1 000 případů anafylaktických reakcí je každoročně hlášeno v Číně po konzumaci kukly bource morušového a až 50 osob je přijato na pohotovost (Alrifai et al., 2019).

Lepší charakterizace alergenů jedinečných pro jedlý hmyz, povede k vyšší bezpečnosti jejich konzumace. Z tohoto důvodu by také měly být zkoumány změny v hmyzích bílkovinách při jejich dalším zpracování (např. vaření), aby se zlepšilo všeobecné chápání potravinových alergií jedlého hmyzu (Jeong et al., 2020). Pro velkou většinu populace po sněžení nebo expozici hmyzu není významné riziko vyvolání alergické reakce, zejména pokud jednotlivci nemají zvýšenou citlivost na členovce nebo nejsou dlouhodobě vystaveni hmyzím alergenům (van Huis et al., 2013).

3.3.2 Toxiny

Pokud je jedlý hmyz považován za složku potravy, je potřeba se zaměřit na potenciální toxicitu při požití člověkem. V současné vědecké literatuře chybí studie, které se zabývají toxicitou po požití hmyzu. Studie se zaměřují spíše na požívání insekticidů, které byly použity při eliminaci určitých zemědělských druhů. Při přípravě jedlého hmyzu je třeba vzít v úvahu vnější faktory, protože byly hlášeny případy botulismu, parazitóz a otravy (např. aflatoxinem) (Alrifai et al., 2019).

Stejně jako u všech toxických látek a dalších druhů v přírodním světě je nutné rozlišovat mezi jedlým a nebezpečným hmyzem. Jedovatý hmyz lze rozdělit do dvou kategorií, fanerotoxika a kryptotoxika (Alrifai et al., 2019). Kryptotoxické látky obsahují toxické látky buď z přímé syntézy, nebo hromaděním z potravy. Fanerotoxika mají specifické orgány, které syntetizují toxiny (Dobermann et al., 2017).

3.3.2.1 Toxiny syntetizovány hmyzem (fanerotoxické)

Existuje hmyz, který syntetizuje sloučeniny toxické pro člověka. Příkladem je toxický monoterpen Kantaridin, který je vytvářen Puchýřníkem lékařským, známým také jako španělská muška (*Lytta vesicatoria*) a několika dalšími brouky.

Pokud jsou konzumovány, způsobují nevolnost, potíže s polykáním a zvracení krve, mohou proniknout do krevního oběhu a způsobit smrt.



Obrázek 2 *Lytta vesicatoria* (Zdroj: www.ukbeetles.co.uk)

Tesaříkovití (rody *Syllitus* a *Stenocentrus*) jsou zdrojem toluenu, což je látka toxická pro ledviny, játra a mozek. Proto se konzumace tohoto hmyzu nedoporučuje. Potemníkovití (*Tenebrionidae*) produkují chinony a alkany. Je třeba prozkoumat potenciální riziko spojené s těmito látkami. (Raheem et al., 2019)

3.3.2.2 Toxiny absorbovány z prostředí (kryptotoxické)

Všechny insekticidy jsou považovány za potencionálně nebezpečné, zejména při divoké sklizni, protože v minulosti nastalo několik případů, které tuto hypotézu potvrdily. Příklad z Thajska, kdy po dezinfekci byl mrtvý hmyz uveden na trh a způsobil spotřebitelům zdravotní problémy nebo dokonce smrt (De Foliart, 1999). Další zaznamenanou kumulovanou látkou byl arsen, ten byl identifikován u *Agrotis infusa* (*Lepidoptera*) v Austrálii. Další kategorií sloučenin, které se mohou bioakumulovat v těle hmyzu, jsou těžké kovy. Ve studii byl prokázán vysoký obsah olova v *Chapulines* (kobyly z rodu *Sphenarium*), které jsou konzumovány

v Mexiku (Raheem et al., 2019). Kryptotoxický hmyz je po požití pro člověka nebezpečný (Alrifai et al., 2019).

Při špatné manipulaci, při nevhodném skladování a také v krmném substrátu, na kterém je chován jedlý hmyz, se mohou objevit mykotoxiny. Mykotoxiny, jsou považovány za nejdůležitější kontaminanty potravin, které mají negativní dopad na veřejné zdraví a bezpečnost potravin. Jsou to sekundárními metabolity produkované mnoha plísněmi, které kazí potraviny, převážně jde o plísně rodů *Fusarium*, *Aspergillus* a *Penicillium*. Ze všech mykotoxinů detekovaných u jedlého hmyzu jsou nejvíce rizikové aflatoxiny. Aflatoxiny jsou prokázané karcinogeny, které jsou také spojeny se zpomaleným růstem u lidí. Plísně podílející se na výrobě aflatoxinů byly objeveny jak u čerstvého jedlého hmyzu, tak i u sušeného. Důvodem jejich přítomnosti jsou pravděpodobně špatné hygienické podmínky při zpracování a nevhodné skladování (pouliční prodej jídla). To jsou důvody, které by mohly přispět k rozvoji aflatoxikóz, pokud nebudou přijata vhodná opatření (Imathiu, 2020).

Celkově lze toxicitu jedlého hmyzu zmírnit v závislosti na stanovišti a kvalitě krmiva. Tyto faktory mohou být kontrolovány prostřednictvím vhodného zemědělství, protože při divoké sklizni může být hmyz vystaven kontaminujícím látkám a nevhodné stravě (Alrifai et al., 2019). Naměřené hladiny nebezpečných chemických látek v jedlém hmyzu byly nižší než v běžných živočišných produktech (Poma et al., 2017).

3.3.3 Mikroorganismy

Stejně jako u ostatních živých organismů, obsahuje hmyz veškeré mikrobiální společenství (bakterie, viry, houby, prvoky a archea), společně mohou být v různých vztazích od mutualismu až po patogenismus (Raheem et al., 2019). Hmyz je bohatý na živiny a vlhkost, a tak poskytuje příznivé podmínky pro přežití a růst mikrobů (Klunder et al., 2012). Mikroby tvoří mikrobiotu organismu a nachází se u hmyzu jak v zemědělském prostředí, tak v přírodě (Raheem et al., 2019).

Několik vědeckých studií zkoumalo mikrobiotu jedlého hmyzu s cílem určit přítomnost a hojnost patogenních mikroorganismů. Mezi rody, které zahrnují patogenní nebo potenciálně patogenní kmeny a byly detekovány v mikroflóře jedlého hmyzu, patří *Cronobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Salmonella* a *Listeria* (Garofalo et al., 2019).

Existuje řada kulturně odlišných způsobů vaření hmyzu, ale konzumuje se i hmyz celý včetně jeho střevní mikroflóry, která může ovlivnit mikrobiologickou kvalitu potravin. Správné podmínky tepelného zpracování a skladování snižují mikrobiologické riziko (Klunder et al., 2012). Více o mikrobiologii jedlého hmyzu uvádí následující kapitola.

3.4 Mikrobiologie jedlého hmyzu

Kvalita a bezpečnost jedlého hmyzu jsou důležitými ukazateli jak pro výrobce, tak pro spotřebitele, kvalita výrazně ovlivňuje přijímání jedlého hmyzu jako součást lidské stravy. Existuje riziko přenosu škodlivých mikroorganismů konzumací hmyzích produktů. Většina hmyzích mikrobů je součástí střev nebo jsou přijaty vnějšími zdroji, ovlivňuje je prostředí, podmínky chovu (substráty a krmivo), manipulace, zpracování a konzervace (Frigerio et al., 2020).

Hmyz lze konzumovat třemi způsoby. Prvním způsobem je konzumace celého hmyzu, který je ve finální podobě rozpoznatelný, často se konzumuje jako smažené občerstvení. Další možností je zpracování hmyzu do formy prášku nebo pasty. Třetím způsobem je extrakce, která se používá například k výrobě proteinových izolátů (Klunder et al., 2012). U všech těchto způsobů je třeba dodržovat průmyslové postupy, jako je posklizňové hladovění, čištění atd., tak aby bylo dosaženo mikrobiální kvality konečných produktů hmyzu. Jelikož všechny potravinářské výrobky, včetně těch na bázi hmyzu, procházejí zpracováním, mělo by se riziko pro bezpečnost lidí hlídat v různých fázích, od surovin (hmyzí mouka) až po konečné potravinářské výrobky. Znalost mikrobiálního složení představuje příležitost k ověření strategie bezpečnosti potravin i sledovatelnosti potravin. Mikrobiální variabilita umožňuje získat více informací nejen o identifikaci druhů hmyzu, ale i o hygienických podmínkách v odchovných systémech (Frigerio et al., 2020).

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, mezi rody identifikované v mikrobiotě jedlého hmyzu, které zahrnují patogenní nebo potenciálně patogenní kmeny, patří *Cronobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Salmonella* a *Listeria* (Garofalo et al., 2019).

Cronobacter

Cronobacter spp. jsou gramnegativní, tyčinkovité bakterie, které patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o oportunní patogeny, které mohou způsobovat infekce u dospělých a kojenců. Rod se skládá ze sedmi druhů, z nichž většina může způsobit onemocnění člověka. *Cronobacter sakazakii* je obvykle spojován s kojeneckými infekcemi, zatímco *Cronobacter malonaticus* je běžně spojován s infekcemi u dospělých.

Cronobacter spp. jsou všudypřítomné a byly izolovány v široké škále potravin, jako například zelenina, koření, masné výrobky. *Cronobacter* spp. byly také izolovány z vnitřností hmyzu, například u ovocné mušky. V některých studiích je *Cronobacter* spojován s přirozenou mikrobiotou moučných červů (Greenhalgh et al., 2019).

Bacillus

Bakterie rodu *Bacillus* jsou aerobní, sporulující, tyčinkovité bakterie, které jsou v přírodě všudypřítomné. *Bacillus anthracis* je patogenem obratlovců a způsobuje nemoc antrax. *B. lentimorbus*, *B. popilliae*, *B. sphaericus* a *B. thuringiensis* jsou patogeny některých larev hmyzu. Řada dalších druhů, zejména *B. cereus*, jsou příležitostnými patogeny lidí, mohou

způsobovat zvracení a průjem. Spory mnoha druhů rodu *Bacillus* jsou odolné vůči teplu, záření, dezinfekčním prostředkům a vysoušení a je obtížné je odstranit z lékařských a farmaceutických materiálů, což může způsobit kontaminaci. V potravinářském průmyslu jsou brány jako problematické organismy, které se podílejí na kazivosti (Turnbull et al., 1991).

Velká většina druhů rodu *Bacillus* jsou v nízké koncentraci neškodné, avšak při vyšších koncentracích se riziko zvyšuje. V roce 2016 zveřejnil úřad EFSA rizika pro veřejné zdraví související s přítomností *Bacillus cereus* a nutnost kontroly obsahu *Bacillus cereus* a dalších kmenů *Bacillus* v potravinářských výrobcích. (EFSA, 2016)

Clostridium

Rod *Clostridium* zahrnuje anaerobní mezofilní bakterie tvořící spory. Většina z *Clostridium* spp. jsou komenzální, u patogenních *Clostridium* spp. je známo, že jsou odpovědné za lidské nemoci jako tetanus, botulismus, a pseudomembranózní enterokolitidu. *Clostridium botulinum* a *Clostridium perfringens* jsou dva z nejčastějších potravinových patogenů. Navzdory škodlivým aktivitám některých *Clostridium* spp. však může mít nepatogenní většina příznivé účinky na lidské zdraví. Specifické kmeny *Clostridium butyricum* mají ochranný účinek proti některým patogenům a v některých zemích byly komerčně dostupné jako probiotika pro lidi a zvířata (Pahalagedara et al., 2020).

Pseudomonas

Pseudomonas spp. jsou gramnegativní bakterie, které se vyskytují všudypřítomně u lidí, zvířat, rostlin a v půdě. Pouze několik druhů má klinický význam pro lidi a zvířata. *P. aeruginosa* je nejčastěji uváděný patogen (Lupo et al., 2018). Jsou dobře známí svou schopností využívat velkou škálu organických sloučenin jako zdrojů energie, odolností vůči širokému spektru lékařsky a zemědělsky důležitých látek (Hesse et al., 2018).

Staphylococcus

Taxonomicky patří rod *Staphylococcus* do čeledi *Staphylococcaceae*. *Staphylococcus* jsou fakultativně anaerobní grampozitivní bakterie, které se vyskytují v mikroskopických shlucích připomínající hrozny (Todar, 2015).

Většina z nich jsou neškodné bakterie, které se běžně vyskytují na pokožce, vlasech a sliznicích lidí i zvířat. Při špatných hygienických postupech potravin mohou následně způsobit otravu z jídla. Nejvíce patogenním druhem je *Staphylococcus aureus*, jeho toxiny jsou odolné vůči teplu, a tak zde existuje riziko nákazy gastroenteritidou i po převaření. Stafylokokové infekce mohou způsobit různé příznaky jako nevolnost, průjem, zvracení, silné křeče v žaludku a mírnou horečku (D'Agostino et al., 2016)

Streptococcus

Streptococcus spp. jsou fakultativně anaerobní, grampozitivní koky z čeledi *Streptococcaceae*, obvykle se vyskytují v řetězcích nebo v párech. Jsou negativní na katalázu a fermentují cukry bez produkce plynu (Coetzer et al., 2020). Některé druhy rodu *Streptococcus* jsou přirozenou součástí bakteriální mikroflóry u lidí i zvířat. Existují však i patogenní zástupci, ti jsou původci různých onemocnění.

Klinická identifikace streptokoků je částečně založena na jejich hemolytických reakcích na krevním agaru. Existují tři typy: beta, alfa a gama hemolytické streptokoky. Beta- hemolytické streptokoky rozruší membrány červených krvinek, které obklopují kolonii. Tyto bakterie mají tendenci způsobovat většinu akutních streptokokových onemocnění. Alfa- hemolytické streptokoky způsobují částečnou hemolýzu kolem kolonie spojenou s redukcí hemoglobinu červených krvinek. Gama-hemolýza je termín někdy používaný pro nehemolytické kolonie. (The Center for Food Security and Public Health, 2005).

Známými zástupci jsou například *S. pyogenes* (beta-hemolytický), lidský patogen, který způsobuje faryngitidu, kožní onemocnění a mnoho dalších infekcí. *S. pyogenes* se lidé mohou infikovat po konzumaci kontaminovaného syrového mléka. *S. agalactiae* (beta-hemolytický) je příčinou lidských infekcí, zejména novorozenecké meningitidy a zápalu plic (The Center for Food Security and Public Health, 2005).

Vibrio

Vibrio spp. jsou skupinou běžných gramnegativních bakterií, mají tvar tyčinek, jsou přirozenými složkami sladkovodního a mořského prostředí. *Vibrio* spp. infekce jsou obvykle způsobeny vystavením kontaminované vody nebo konzumací syrových nebo nedostatečně tepelně upravených kontaminovaných mořských plodů.

Vibrio cholerae může způsobit cholera, závažné průjmové onemocnění, které může být při neléčení smrtelné, obvykle se přenáší kontaminovanou vodou a kontaktem mezi lidmi. *Non- cholera Vibrio* spp. (například *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* a *Vibrio vulnificus*) způsobují vibriózu (Baker-Austin, 2018).

Escherichia

Rod *Escherichia* patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. *Escherichia* spp. jsou nesporulující gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinkovité organismy 2–6 mm dlouhé a 1,1–1,5 mm široké. *Escherichia* mají obvykle pohyblivé peritrichální bičíky a produkují plyn z fermentovatelných sacharidů.

Nejvýznamnějším kmenem je *E. coli*, je součástí normální střevní mikroflóry u lidí i jiných savců. Za určitých podmínek (imunokompromitovaní jedinci, vysoká expozice) však mohou způsobit onemocnění, například různé druhy průjmů, infekce močových cest nebo novorozeneckou meningitidu (Leung et al., 2014). Patotypy *E. coli* se dělí dle mechanismu virulence na enteropatogenní (EPEC), enterotoxigenní (ETEC), enterohemoragický (EHEC), enteroinvazivní (EIEC), enteroagregativní (EAEC nebo EaggEC), uropatogenní (UPEC), spojené se sepsí (SEPEC) a způsobující meningitidu (MENEK) (Bekal et al., 2003).

Dalším významnými zástupci *Escherichia* jsou *E. albertii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* a *E. vulneris* (Leung et al., 2014).

Serratia

Serratia spp. jsou gramnegativní bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae* (Barman et al., 2020). *Serratia* spp. jsou fakultativně anaerobní rovné a pohyblivé tyčinky (Foltýnová, 2019). *Serratia* spp. se vyskytují všudypřítomně v přírodě, jsou součástí střevního traktu hmyzu, jsou známé jako mikroorganismus, který kazí potraviny (Barman et al., 2020). Produkují červený nebo oranžový pigment tzv. prodigiosin. Rozkládají bílkoviny a tuky. Nepigmentující druhy způsobují zánětlivá onemocnění, příkladem je *Serratia marcescens*, který způsobuje infekce močových a dýchacích cest (Foltýnová, 2019).

Proteus

Proteus spp. jsou gramnegativní bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Obvykle jsou považovány za komenzály v gastrointestinálním traktu, avšak jejich podíl v mikrobiální komunitě je velmi nízký (0,05%). Mohou mít patogenní potenciál a způsobit například infekce močových cest (Hamilton et al., 2018). Příklady zástupců jsou *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri*, *P. hauseri*, *P. terrae* a *P. cibarius* (Drzewiecka, 2016).

Yersinia

Yersinia tvoří klinicky důležitý rod z čeledi *Enterobacteriaceae* (Rohde et al., 2017). Jedná se o skupinu gramnegativních, nesporotvorných, oxidázově negativních, katalázově pozitivních, fakultativně anaerobních tyčinek (nebo kokobacilů) (D'Agostino et al., 2016). Mezi tři lidské patogeny se řadí *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* a jeho blízký příbuzný *Y. pestis* (Rohde et al., 2017). Mohou být přenášeny konzumací kontaminovaných potravinářských výrobků. Optimální růstová teplota je kolem 30 °C, ale mohou přežít i proces zmrazení. Mezi příznaky infekce *Yersinia enterocolitica* patří průjem, mírná horečka, bolesti břicha a případně zvracení (D'Agostino et al., 2016). V Evropské unii je *Y. enterocolitica* třetí nejčastější bakteriální zoonóza potravinového původu po salmonelóze a kampylobakterióze (Rohde et al., 2017).

Campylobacter

Rod *Campylobacter* patří do čeledi *Campylobacteraceae*, zahrnuje malé (0,2–0,8 µm × 0,5–5 µm) gramnegativní spirálovitě zakřivené tyčinky (Silva et al., 2011). Nejvýznamnější potravinářské patogenní kampylobaktery jsou *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*. Spotřeba nedovařených drůbežích výrobků představuje vysoké riziko infekce těmito bakteriemi. *Campylobacter* způsobuje onemocnění charakterizované horečkou, bolestmi břicha, průjemem, nevolnostmi a zvracením (D'Agostino et al., 2016).

Salmonella

Salmonella spp. jsou členy skupiny *Enterobacteriaceae*, jsou to fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinky. *Salmonella* spp. jsou skupina bakterií, které se nacházejí ve střevním traktu lidí a teplokrevných zvířat a jsou schopné způsobit onemocnění (Food Safety authority of Ireland, 2011). Ačkoli jsou díky novým metodám v potravinách zjišťovány i nové patogeny, *Salmonella* spp. zůstává jedním z nejčastějších potravinových patogenů na celém světě. Mohou infikovat člověka hlavně kontaminovanou potravou: kuřecím masem, vepřovým masem, mléčnými výrobky, vejci, ovocem, zeleninou a dalšími (Mařka et al., 2016).

Lidská infekce způsobená *Salmonella* spp. se označuje jako salmonelóza (Food Safety authority of Ireland, 2011). Klinickými příznaky salmonelózy jsou obvykle horečka, bolesti břicha, průjem a zvracení, avšak stejný kmen může u různých hostitelů způsobit různé příznaky (Mařka et al., 2016).

Je důležité si uvědomit, že ačkoli *Salmonella* spp. netvoří spory, může v potravinách dlouho přežívat (Food Safety authority of Ireland, 2011).

Listeria

Listeria spp. jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní, tyčinkovité a pohyblivé bakterie, liší se od mnoha jiných bakterií tím, že mají schopnost růstu při nízkých teplotách (D'Agostino et al., 2016). Pouze dva z těchto druhů, *L. monocytogenes* a *L. ivanovii*, jsou považovány za patogeny. *L. monocytogenes* je důležitý lidský patogen přenášený z potravin a je třetí hlavní příčinou úmrtí přenášenou potravinami v důsledku mikrobiálních příčin v USA (Orsi et al., 2016). *Listeria* se vyskytuje všudypřítomně v životním prostředí, ve vodě a u zvířat jako je drůbež a dobytek. Mohou být přítomny v syrových mléčných výrobcích a v mase. Infekce způsobená *Listerií* je známá jako listerióza, představuje velké riziko pro těhotné ženy, starší osoby a osoby s oslabeným imunitním systémem. Listeriíóza může vést k potratu, porodu mrtvého dítěte nebo k celoživotním zdravotním problémům (D'Agostino et al., 2016).

3.4.1 Mikrobiota jedlého hmyzu

Podle Klunder et al. (2012) obsahuje čerstvý jedlý hmyz obecně velké množství mikroorganismů, včetně celkových mezofilních aerobů (3,6-9,4 log KTJ/g), *Enterobacteriaceae* (4,2-7,8 log KTJ/g), bakteriálních endospor nebo bakterií tvořících spory (0,5–5,4 log KTJ/g), bakterií mléčného kvašení (5,2–9,1 log KTJ/g), psychrotrofních aerobních bakterií (6,0–7,6 log KTJ/g) a kvasinek a plísní (1,4–7,2 log KTJ/g). Naopak, zpracovaný (tj. sušený a tepelně ošetřený) jedlý hmyz obecně vykazoval nižší počty mikrobů oproti hmyzu čerstvému, což naznačuje účinnost některých ošetření při snižování mikrobiální kontaminace (Garofalo et al., 2019). Obecně je tedy dostatečným krokem zahřívání, například vaření, které napomáhá k odstranění nebo alespoň výraznému snížení počtu nežádoucích mikrobiálních skupin. Některé spory však tento proces mohou přežít a později mohou vyklíčit, což by mohlo vést ke znehodnocení jídla a onemocnění člověka. Stejně tak je nutné se vyhnout opětovné kontaminaci, ke které může dojít po procesu tepelného zpracování (Klunder et al., 2012).

Každý druh hmyzu je hostitelem odlišné skupiny bakterií s několika společnými rody; např. *Bacteriodes*, *Enterobacter*, *Bacillus* a *Citrobacter* (Belluco et al., 2013). V Evropě jsou nejvíce studovanými druhy hmyzu *Tenebrio molitor* a *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera), *L. migratoria*, *Acheta domesticus* a *Grylloides sigillatus* (Orthoptera), u těchto druhů navrhnul EFSA (2015), že mají největší potenciál lidské spotřeby v EU a patří mezi ekonomicky nejdůležitější druhy.

Tenebrio molitor L., hostí bakterie rodu *Actinobacillus*, *Propionibacterium*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Bacillus*, *Dermabacter*, *Brachybacterium*, *Clavibacter* a *Exiguobacterium* (Raheem et al., 2019). Garofalo et al. (2019) uvádí, že se v larvách *Tenebrio molitor* vyskytují *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii* a *Enterobacter hormonaechei*. *Enterobacter asburiae* byly nalezeny ve střevech *Galleria mellonella* (Raheem et al., 2019).

Střevo *Acheta domestica* L. obsahuje bakterie rodů *Yersinia*, *Bacteroides*, *Citrobacter*, *Klebsiella* a *Fusobacterium*. Bylo prokázáno, že střevní mikrobiální komunita polních cvrčků z volné přírody byla rozmanitější než u cvrčků chovaných v laboratoři, kteří byli krmeni definovanou stravou (Raheem et al., 2019).

Mikrobiologická studie provedena se vzorky sušených cvrčků, kobylek a larev potměníka moučného ukázala na přítomnost bakterií druhu *Clostridium perfringens*, tyto vzorky však neobsahovaly *Salmonella* spp. a *Listeria monocytogenes* (Garofalo et al. 2017).

Šest druhů jedlého hmyzu (*Belostoma lutarium*, *Polyrhachis*, *Termitoidae*, *Hyboschema contractum*, *Gryllotalpidae* a *Bombyx mori*) vyprodukovaného v Thajsku a následně prodávaného po celém světě bylo vybráno ke studii. Jejím cílem bylo identifikovat mikrobiotu zpracovaného jedlého hmyzu. Bylo zjištěno, že mikrobiota *Belostoma lutarium* obsahovala *Clostridium sordellii*, *Clostridium hiranonis*, *Vibrio hangzhouensis* a *Vibrio diazotrophicus* (Osimani et al., 2018).

Dalšími identifikovanými a potenciálně patogenními bakteriemi jsou například *Klebsiella oxytoca* a *Klebsiella michiganensis*, ty byly detekovány u larev *T. molitor*, švábů, brouků, motýlů a bource morušového. Rod *Pantoea agglomerans*, což je příležitostný lidský patogen, byl detekován u moučných červů a mravenců (*L. apiculatum*) (Garofalo et al., 2019).

Informace o mikrobiálních skupinách jsou důležité pro ověření účinnosti kroku zpracování nebo mohou vést ke zdokonalení hygienických postupů a kvality potravinářského průmyslu (Garofalo et al., 2019).

3.5 Legislativa

Jedlý hmyz je od 1. ledna 2018 zařazen do takzvaných nových potravin dle nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 o nových potravinách. Novou potravinou je podle evropských pravidel potravin, která nebyla ve významné míře před 15. květnem 1997 v Evropě konzumována. (EFSA, 2018). Celý proces však stále probíhá a státy EU postupně schvalují další legislativu v souvislosti s jedlým hmyzem. Od 14. prosince 2019 je dle novely Zákona č. 166/1999 Sb. o veterinární péči možné v České republice zakládat a provozovat farmy, které budou chovat hmyz k lidské spotřebě nebo k výrobě zpracované živočišné bílkoviny. Aby jedlý hmyz mohl být uvedený na trh v České republice, je potřeba, aby byla podána žádost o povolení nové potravin. K datu 21. 9. 2019 byla žádost kompletní u těchto druhů:

- cvrček domácí (*Acheta domestica*),
- potěmník stájový (*Alphitobius diaperinus*),
- cvrček krátkokřídý (*Grylloides sigillatus*),
- potěmník moučný (*Tenebrio molitor*)
- saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*)

Druhy, které jsou zapsané v Seznamu Unie, v němž jsou zahrnuty všechny autorizované nové potraviny, mohou být uváděny na trh od 2. 1. 2020 (Mlček, 2020).

Ministerstvo zemědělství zpracovalo v roce 2018 příručku pro chovatele a zpracovatele. Kde jsou vypsány zásady správné zemědělské a výrobní praxe produkce hmyzu určeného pro lidskou spotřebu. V příručce jsou doporučena mikrobiologická kritéria pro výrobky z farmově chovaného hmyzu vycházející z dříve platných evropských právních předpisů. Uvedené maximální přípustné hodnoty pro jednotlivé mikroorganismy, *Salmonella* spp. musí být nepřítomna v 25 g, mezofilní aerobní bakterie nesmí přesáhnout hodnotu 10^5 v 1 g, *Enterobacteriaceae* 10^2 v 1 g, *Staphylococcus aureus* nesmí být zjištěn v 1 g. Celkový počet mikroorganismů dobře pasterovaných potravin obsahuje méně než 10^3 v 1 g. V hmyzích výrobcích mohou být přítomny i další patogenní i nepatogenní mikroorganismy, proto by měl výrobce spektrum sledovaných mikroorganismů přizpůsobit dle předpokládaných rizik (např. původ hmyzu, způsob skladování) (Ministerstvo zemědělství ČR, 2018).

4 Metodika

4.1 Příprava vzorků

K praktické části bakalářské práce bylo analyzováno 6 výrobků s obsahem cvrččí mouky dle pokynů od výrobce. Jednalo se o proteinové tyčinky s příchutí s obsahem cvrččí mouky 10 %, 20 % a samotná cvrččí mouka (100 %). Tyčinky s obsahem 10 % cvrččí mouky byly ve třech příchutích, tyčinky s obsahem 20 % cvrččí mouky ve dvou příchutích a 100% cvrččí mouka. Přehled testovaných vzorků a jejich šarží se nachází v Tabulce č. 3.

Tabulka 3 Testované vzorky

Číslo vzorku	Šarže	Název	Cvrččí mouka (%)
1	1.	Proteinová tyčinka – příchut' 1	10
	2.		
	3.		
2	1.	Proteinová tyčinka – příchut' 2	10
	2.		
	3.		
3	1.	Proteinová tyčinka – příchut' 3	10
	2.		
	3. jen pro analýzu plísní		
4	1.	Proteinová tyčinka – příchut' 1	20
	2.		
	3.		
	4.		
5	1.	Proteinová tyčinka – příchut' 2	20
	2.		
	3. jen pro analýzu plísní		
6	1.	Cvrččí mouka	100
	2.		
	3.		

K výrobě těchto produktů byl použit cvrček domácí (*Acheta domestica*) ve fázi imago, který je chován na soukromé farmě za optimálních podmínek. Krmen byl různými druhy obilovin, mouky a ovocem. Aby byla zachována genetická rozmanitost, na farmu jsou pravidelně přiváženi cvrčci z jiných farem. Dle výrobce jsou cvrčci, kteří se používají k výrobě vyláčeni přibližně 24 hodin před sklizní a poté prochází třístupňovým procesem čištění s pomocí filtrované vody a UV paprsků. Hmoty z cvrčků se poté ještě převažuje, suší a mele. Kvůli zachování výrobního tajemství nejsou známi konkrétní teploty a hygienická opatření.

Všechny vzorky byly jednotlivě zhomogenizovány v mixéru a 1 g byl asepticky navážen a převeden do zkumavek s 9 ml ředícího média (Tabulka 4).

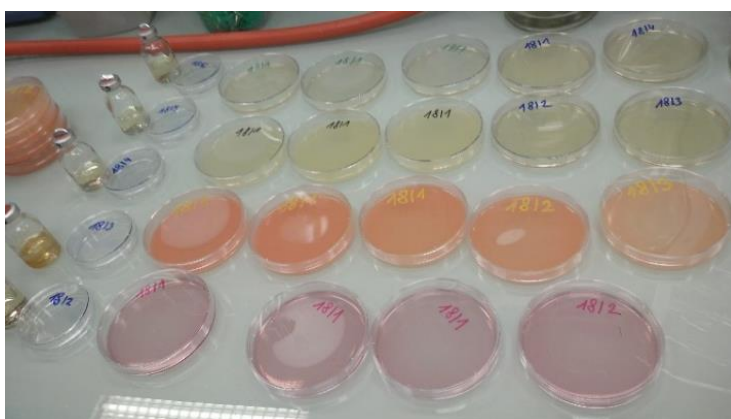
Tabulka 4 Složení ředícího média

Složka	Množství
NaCl	9 g
Pepton (Oxoid)	1 g
dH ₂ O	1000 ml

Vzorky byly sériově naředěny do hodnoty 10⁻⁶. Všechny skupiny mikroorganismů byly stanoveny klasickou kultivační metodou dle platných norem a standardních postupů.

4.2 Kultivace

Zásadním krokem kvantitativního i kvalitativního průkazu mikroorganismů nejen v potravinách je kultivace. Některé kultivační techniky se používají k uchování mikroorganismů nebo jejich pomnožení, tak aby bylo získáno dostatečné množství buněk pro další mikrobiologické, biochemické, genetické či biotechnologické analýzy. Ke kultivaci je třeba vhodná sterilní živná půda, kultivační nádoby, očkovací pomůcky, termostat nebo chladnička, která se využívá pro kultivaci při nižších teplotách (4 - 5 °C) u potravinářsky významných psychrofilních či psychrotrofních mikroorganismů (např. *Listerie*) (Bursová, 2014).



Obrázek 3 Příprava na kultivaci (Foto: Autor 2021)

4.2.1 Celkové počty aerobních mikroorganismů

Ke stanovení celkových počtů aerobních mikroorganismů byla použita norma ČSN EN ISO 4833-1. V této metodě byl použit Standard plate count agar, jehož složení je uvedeno v tabulce č. 5. Jeden mililitr vzorku z příslušného ředění byl naočkován na Petriho misku a přelit agarem. Následovala aerobní kultivace při 30 °C po dobu 72 hodin.

Tabulka 5 Složení Standard plate count agar

Složka	Množství (g/l)
Trypton	5
Kvasničný extrakt	2,5
Glukóza	1
Agar (Oxoid)	9

4.2.2 Celkové počty aerobních sporulujících

V této metodě byl použit Trypton-sójový agar (TSA, Oxoid). Vzorky byly nejprve pasterovány ve vodní lázni při teplotě 85 °C po dobu 10 minut. Poté byl jeden mililitr z příslušného ředění převeden na sterilní Petriho misky a zalit agarem. Kultivace probíhala aerobně při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin.

4.2.3 *Bacillus cereus*

K analýze *Bacillus cereus* byl použit *Bacillus cereus* agar base (Himedia) obohacený o polymyxin B a o žloutkovou emulzi. Metoda probíhala dle ČSN EN ISO 7932. Na agar byl naočkován 1 ml z prvního ředění, u vyššího ředění bylo pipetováno 0,1 ml a následně rozetřeno sterilní mikrobiologickou hokejkou. Kultivace probíhala aerobně při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. *Bacillus cereus* na krevním agaru vyrůstá ve velkých koloniích s nepravidelnými okraji, obklopených zónou β -hemolýzy (Ústav mikrobiologie, 2020), proto konfirmační test probíhal metodou průkazu hemolýzy na agaru s ovčí krví.

4.2.4 *Escherichia coli*

Pro průkaz *Escherichia coli* byla použita norma ČSN ISO 16649-2 a bylo zde použito Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX) médium (Oxoid). Jeden mililitr z prvního ředění byl aplikován na tři agarové plotny, dále byl rozetřen sterilní mikrobiologickou hokejkou. Následná kultivace probíhala aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin. *Escherichia coli* jsou hodnoceny jako počet modrých kolonií, případně bílých kolonií s modrým středem.

4.2.5 *Enterobacteriaceae*

K průkazu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* byla použita metoda dle normy ČSN ISO 21528-2, kde byl použit Violet red bile glucose agar, jehož složení se nachází v tabulce č. 6. Jeden mililitr z prvního ředění byl přenesen na povrch třech předem připravených

agarových ploten. Pro vyšší ředění bylo pipetováno 0,1 ml a rozetřeno sterilní mikrobiologickou hokejkou. Poté následovala aerobní kultivace při 37 °C po dobu 24 hodin. Hodnocení typických kolonií bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* - růžovočervené, červené nebo fialové kolonie, mohou být obklopeny růžovou zónou precipitované žluče.

Tabulka 6 Složení Violet red bile glucose agar

Složka	Množství (g/l)
Agar	12
Glukóza	10
Pepton	7
NaCl	5
Yeast extrakt	3
Žlučové soli	1,5
Neutral red	0,03
Crystal violet	0,002

4.2.6 Počet koaguláza-pozitivních stafylokoků a průkaz *Staphylococcus aureus*

Metoda stanovení počtu koaguláza-pozitivních stafylokoků a průkazu *Staphylococcus aureus* byla provedena dle ČSN EN ISO 6888-1. Jedná se o techniku s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera (B-P agar) se žloutkovou emulzí a teluricitanem draselným. 1 ml vzorku z prvního ředění byl převeden na agar a s pomocí sterilní mikrobiologické hokejky rozetřen. Následná kultivace probíhala aerobně při 37 °C po dobu 24–48 hodin. Z počtu potvrzených suspektních kolonií vyrostlých na vybraných miskách se vypočítal počet koaguláza–pozitivních stafylokoků. Pomocí koagulázového testu byla provedena confirmace vybraných typických a atypických kolonií, ke které byla využita souprava Staphylase test kit (Oxoid). Součástí soupravy je testovací činidlo skládající se z ovčích červených krvinek senzibilizovaných na králičí fibrinogen, kontrolní činidlo skládající se z necitlivých ovčích červených krvinek a reakční karty na jedno použití. Pokud dojde ke shlukování suspenzí testovaných buněk, výsledek je pozitivní a naznačuje přítomnost *Staphylococcus aureus*. U kontrolního činidla by neměla být pozorována shluková reakce, pokud tomu tak není, je potřeba test zopakovat (Thermo Fisher Scientific, 2020).

4.2.7 Počet kvasinek a plísní

Stanovení kvasinek a plísní na půdě DG18 podle ČSN ISO 21527. U této metody bylo naočkováno 0,1 ml z příslušného ředění na agarové plotny a poté rozetřeno sterilní mikrobiologickou hokejkou. Kultivace probíhala aerobně po dobu 7 dní při 25 °C.

4.2.8 *Salmonella* spp.

Stanovení přítomnosti bakterií rodu *Salmonella* bylo uskutečněno podle normy ČSN EN ISO 6579- 1. Do baňky s peptonovou vodou bylo přidáno 25 gramů zhomogenizovaného vzorku. Tato směs byla inkubována při 37 °C po dobu 18 hodin. Poté bylo 0,1 ml z této směsi převedeno do semiselektivního Rappaport-Vassiliadis (Oxoid) bujónu a kultivováno při 37 °C po dobu 48 h. Směs byla následně rozetřena na selektivní Salmonella Shigella (SS) agar (Oxoid) a kultivována dalších 24 hodin při 37 °C. Z kultivačního média byly odebrány světlé kolonie s černým středem, které byly použity pro konfirmační test. Byl použit latexový aglutinační test s pomocí soupravy Salmonella Test Kit (Oxoid™). Postup byl dodržován dle návodu, nejprve byla provedena kontrola pomocí kontrolního činidla, které bylo součástí balení, poté byly použity odebrané kolonie, které byly rozetřeny na testovacím papíru s kapkou testovacího činidla. Po uplynutí 2 minut, bylo možné sledovat pozitivní či negativní reakci. Při pozitivní reakci vzniká sraženina a testovaný vzorek obsahuje bakterie rodu *Salmonella*.



Obrázek 4 latexový aglutinační test Salmonella Test Kit (Oxoid™) (www.fishersci.se)

4.2.9 *Listeria monocytogenes*

Pro analýzu *Listeria monocytogenes* byla použita metodika dle normy ČSN EN ISO 11290-1:2017. Řádně zhomogenizovaný vzorek byl navážen (25 g) a převeden do tekuté selektivní půdy pro primární pomnožení - polovičního bujónu podle Frasera (½FB médium), poté byl aerobně inkubován při 30 °C po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby byla suspenze přeočkována do tekuté selektivní půdy pro sekundární pomnožení – bujón podle Frasera (FB médium) a inkubována aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin. Z obou byl proveden roztěr na Brilliance Listeria Agar (Oxoid), který byl aerobně kultivován při 37 °C po dobu 24 a 48 hodin. *L. monocytogenes* roste po 24 hodinách inkubace v modrozelených koloniích obklopených širokou zónou precipitace.

4.2.10 Přítomnost *Clostridium* spp.

Pro stanovení *Clostridium* spp. bylo naváženo 0,1 g vzorku a přeneseno do Cooked Meat Media (Oxoid), který byl inkubován v anaerobním prostředí při 37 °C po dobu 48 hodin. Vzorky byly ponechány 14 dní při pokojové teplotě, aby mohlo dojít k vytvoření endospor. Po uplynutí této doby byly lahvičky pasterovány v 85 °C po dobu 10 minut. Po pasteraci byly vzorky nanášeny na Petriho misky metodou přelití na Wilkins–Chalgren Anaerobe Agar (Oxoid) následná kultivace probíhala při 37 °C po dobu 48 h v anaerobní atmosféře vyvinuté pomocí AnaeroGen Plus (Oxoid). Kolonie, které narostly, byly identifikovány pomocí MALDI–TOF hmotnostní spektrometrie (Bruker Daltonics) s využitím MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1 a knihovny Bruker Taxonomy.

Veškeré druhy kultivačních médií, doba a teplota kultivace a použitá metoda, které byly využity pro jednotlivé druhy mikroorganismů, jsou přehledně uvedeny v tabulce č. 7.

Tabulka 7 Kultivační média, doba a podmínky kultivace

Druh mikroorganismu	Kultivační médium	Čas	Podmínky kultivace	Metoda
Celkové počty aerobních mikroorganismů:	Standard plate count agar	72 h	30 °C (aerobně)	Přelití
Celkové počty aerobních sporulujících bakterií	Trypton-sójový agar (TSA, Oxoid)	24 h	30 °C (aerobně)	Přelití
<i>Bacillus cereus</i>	Bacillus Cereus Agar Base	24 h	30 °C (aerobně)	Roztěr
<i>Enterobacteriaceae</i>	Violet red bile glucose agar	24 h	37 °C, aerobně	Roztěr
<i>E. coli</i>	TBX Agar (Oxoid)	24 h	37 °C (aerobně)	Roztěr
Koaguláza – pozitivní stafylokoky	Baird-Parker agar	24–48 h	37 °C po (aerobně)	Roztěr
<i>Salmonella</i> spp.	SS Agar (Oxoid)			Pomnožovací
<i>Listeria monocytogenes</i>	Brilliance Listeria Agar (Oxoid)			Pomnožovací
<i>Clostridium</i>	Cooked Meat Medium			Pomnožovací
Počet kvasinek a plísní	DG18 médium	7 dní	25 °C (aerobně)	Roztěr

4.3 Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Narostlé kolonie byly identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (Bruker Daltonics) s využitím MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1 a knihovny Bruker Taxonomy.

MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie je založena na ionizaci kokrytalizovaného vzorku krátkými laserovými pulsy. Ionty se akcelerují a jejich doba letu se měří ve vakuové letové trubici (Wieser et al., 2012). Jedná se o proteomickou metodu, která pro identifikaci využívá hmotnostní spektrum intracelulárních proteinů přítomných v buňce (Purkrťová, 2018). Tato metoda má vysoký potenciál přesně identifikovat mikroorganismy, její výhodou je rychlost, redukované náklady a ne příliš vysoké nároky na přípravu vzorku. Nevýhodou je však vysoká pořizovací cena přístroje (Vrioni et al., 2018).

4.3.1 Příprava vzorků

Po kultivaci mikroorganismů byl vzorek připraven dle návodu a následně nanesen na jednotlivé spoty na ocelové MALDI destičce, po zaschnutí byl vzorek překryt 1 μ l kyselé organické matrice (kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová rozpuštěná v acetonitrilu, vodě a kyselině trifluoroctové) Po zaschnutí byla destička vložena do hmotnostního spektrometru MALDI-TOF a měřena v pozitivním lineárním režimu v detekčním hmotnostním rozsahu 2 – 20 kDa.

4.3.2 MALDI-TOF

Vzorek, který byl nanesen na jednotlivé spoty a překryt matricí, kokrytalizoval a následně byl ionizován laserovým paprskem (Singhal et al., 2015). Po ionizaci laserem matrice absorbuje energii, při jejímž vypařování s sebou bere i molekuly vzorku. Konečným výsledkem je získání hmotnostních spekter testovaného mikroorganismu. Následuje srovnání získaného průměrného proteinového spektra s databází průměrných proteinových spekter vybraných referenčních kmenů mikroorganismů (Purkrťová, 2018). Právě databáze organismů jsou klíčovými komponentami komerčních platform MALDI. Proto se neustále rozšiřují a výrobci je pravidelně aktualizují objevováním nových mikrobiálních druhů a anotací (Singhal et al., 2015).

Databáze MALDI Biotyper rozeznává dle hodnoty skóre shody celkem tři třídy spolehlivosti:

- 2,00–3,00 identifikace s vysokou mírou jistoty
- 1,70–1,99 identifikace s nízkou mírou jistoty
- 0,00–1,69 identifikaci organismu nelze provést

4.4 Statistické vyhodnocení

Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky, které byly podrobeny mikrobiologickému rozboru, byly vyhodnoceny pomocí programu IBM SPSS Statistics Subscription za použití dvouvýběrového t-testu s rovností rozptylů s hladinou významnosti $P = 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Kultivační stanovení mikroorganismů

Dle výše popsané metodiky byly po uplynutí doby kultivace zaznamenány počty kolonií mikroorganismů ve vzorcích. Hodnoty jsou uváděny v jednotkách log KTJ/g a znázorněny v Tabulce 8. Získané výsledky jednotlivých šarží se nacházejí v příloze v tabulkách č. 11 - 14.

Tabulka 8 Stanovené počty mikroorganismů ve vzorcích. Hodnoty jsou průměry ± směrodatná odchylka log KTJ/g. Počty *Listeria monocytogenes* a *Salmonella* spp. byly stanoveny v 25 gramech.

Stanovovaný parametr	Vzorek 1 Tyčinky 10 % příchut' 1	Vzorek 2 Tyčinky 10 % příchut' 2	Vzorek 3 Tyčinky 10 % příchut' 2	Vzorek 4 Tyčinky 20 % příchut' 1	Vzorek 5 Tyčinky 20 % příchut' 2	Vzorek 6 Mouka 100 %
<i>Bacillus cereus</i>	1,00	1,00	1,00	<1	<1	1,00
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Koaguláza pozitivní stafylokoky	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<i>Escherichia coli</i>	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Kvasinky a plísňe	1,83 ± 0,76	2,50 ± 0,43	2,67 ± 0,91	1,25 ± 0,50	1,26 ± 0,45	1,00
Mezofilní aerobní bakterie	3,89 ± 0,19	4,27 ± 0,64	4,00 ± 0,00	3,55 ± 0,38	3,59 ± 0,59	4,93 ± 0,79
Aerobní sporující bakterie	3,87 ± 0,82	3,47 ± 1,06	2,55 ± 0,35	2,42 ± 1,04	2,04 ± 1,47	2,95 ± 1,82
<i>Listeria monocytogenes</i> (/25 g)	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní
<i>Salmonella</i> spp. (/25 g)	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní
<i>Clostridium</i> spp.	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	negativní

Bacillus cereus

Po ukončení kultivace byl zaznamenán nejvyšší nárůst *Bacillus cereus* ve vzorku číslo jedna s obsahem 10 % cvrččí mouky, v první šarži výskyt činil $2 \pm 0,00$ log KTJ/g. U ostatních vzorků nebyl přesažen limit detekce daného analytického postupu (1 log KTJ/g).

Enterobacteriaceae

Získané výsledky ukazují, že vzorky neobsahovaly bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* nebo je obsahovaly v množství pod limitem detekce metody (1 log KTJ/g.)

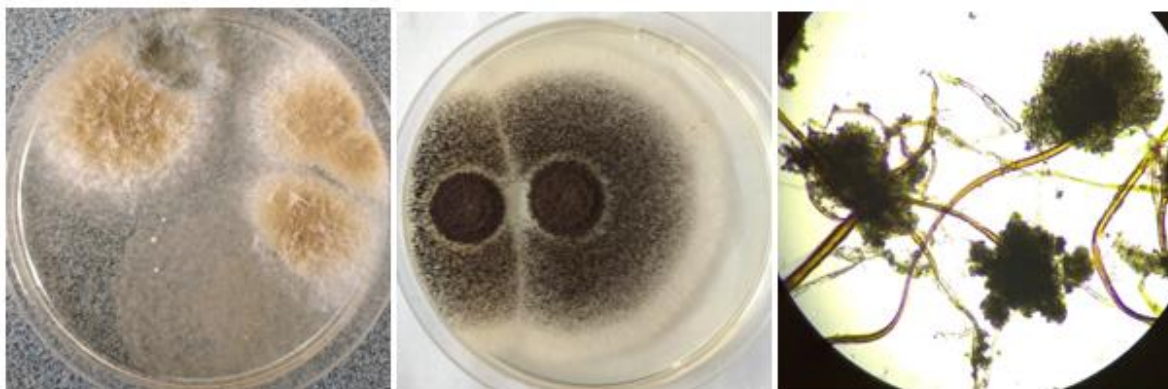
Escherichia coli

Po ukončení kultivace vzorky neobsahovaly bakterie *Escherichia coli* buď vůbec, nebo nebyl překročen detekční limit metody (1 log KTJ/g).

Kvasinky a plísň

Nejvyšší naměřené průměrné hodnoty kvasinek a plísni ($2,67 \pm 0,91$ log KTJ/g) byly ve vzorku č. 3. Ve všech vzorcích s obsahem 10 % cvrččí mouky kromě jedné šarže byly naměřeny hodnoty vyšší než 2 log KTJ/g. Naopak u vzorků s obsahem 20 % a 100 % cvrččí mouky, dosahoval této hodnoty pouze jeden vzorek v jedné šarži.

Po provedeném statistickém vyhodnocení byl mezi vzorky s obsahem 10 % a 20 % cvrččí mouky zaznamenán statisticky významný rozdíl ($P = 0,005$) a mezi vzorky tyčinek s 10 % mouky a samotnou cvrččí moukou byl statisticky významný rozdíl ($P = 0,013$).



Obrázek 5 Plísň vzorek č. 2, vzorek č. 3, vzorek číslo 1 – houby s hyfy a fruktifikačními orgány (zvětšení 200×) (Foto: Autor 2021)

Mezofilní aerobní bakterie

Nejvyšší nárůst mezofilních aerobních bakterií byl zaznamenán ve vzorku číslo 1 (10 % cvrččí mouky), který v první šarži obsahoval <7 log KTJ/g. Nejvyšší průměrné hodnoty $4,93 \pm 0,79$ log KTJ/g byly naměřeny v cvrččí mouce, ve vzorku číslo 6. Nejnižší průměrné naměřené hodnoty $3,55 \pm 0,38$ log KTJ/g byly ve vzorku č. 4.

Po provedeném statistickém vyhodnocení byl mezi vzorky tyčinek s 20 % mouky a samotnou cvrččí moukou zaznamenán statisticky významný rozdíl ($P = 0,009$).

Aerobní sporulující bakterie

Nejvyšší naměřená hodnota byla ve vzorku číslo 1 v první šarži, který se řadí k výrobkům s obsahem 10 % cvrččí mouky, jeho obsah byl $4,76 \pm 0,06$ log KTJ/g. Průměrné hodnoty tyčinek s obsahem 10 % cvrččí mouky se pohybovaly od 2,55 log KTJ/g do $3,87 \pm 0,82$ log KTJ/g. Průměrné hodnoty tyčinek s 20 % cvrččí mouky byly v rozsahu od 2,04 až $2,42 \pm 1,04$ log KTJ/g. Průměrné hodnoty samotné cvrččí mouky byly $2,95 \pm 1,82$ log KTJ/g.

Koaguláza pozitivní stafylokoky

Počet koaguláza pozitivních stafylokoků byl menší než 1 log KTJ/g ve všech testovaných vzorcích. *Staphylococcus aureus* nebyl ani u jednoho vzorku, jak bylo prokázáno provedeným konfirmačním testem Staphylase test kit (Oxoid), kde nedošlo ke shlukování suspenzí testovaných buněk.



Obrázek 6 Konfirmační test Staphylase test kit (Oxoid) (Foto: Autor, 2021)

Listeria monocytogenes

Ani v jednom vzorku nebyla detekována *Listeria monocytogenes*.

Salmonella spp.

Po skončení kultivace byly na SS agaru sledovány světlé kolonie s černým středem připomínající kolonie salmonel. Ty byly odebrány a následně byl proveden aglutinační test pomocí soupravy Salmonella Test Kit (Oxoid™). Po provedení tohoto testu se neobjevila sraženina u žádného testovaného izolátu, reakce byla negativní, tudíž bylo zjištěno, že žádný ze vzorků neobsahoval bakterie rodu *Salmonella*.

Přítomnost *Clostridium* spp.

Pozitivní přítomnost klostridií byla zjištěna ve 3 vzorcích. Všechny tyto vzorky patřily do skupiny tyčinek s obsahem 10% cvrččí mouky. Z medií pro *Clostridium* spp. byly po kultivaci vybrány pravděpodobné kolonie. Podle metodiky, která byla popsána výše, byla

provedena identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (Tabulka 9).

První vzorek byl pozitivní u jedné ze tří šarží. Druhý vzorek byl pozitivní u dvou ze tří šarží. Třetí vzorek byl pozitivní u jedné ze dvou šarží. Všechny tyto vzorky obsahovaly 10 % cvrččí mouky. V šesti případech byla zaznamenána identifikace s vysokou mírou jistoty u bakteriálního druhu *Clostridium sporogenes*. Nejvyšší identifikačním skóre 2,27 bylo identifikováno ve vzorku č. 2.

Tabulka 9 Bakteriální druhy a jejich identifikační skóre, stanoveno pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Číslo vzorku	Identifikovaný druh	Skóre
Vzorek 1	<i>Clostridium sporogenes</i>	1,93
Vzorek 1	<i>Clostridium sporogenes</i>	2,16
Vzorek 1	<i>Clostridium sporogenes</i>	2,26
Vzorek 1	<i>Clostridium sporogenes</i>	2,16
Vzorek 2	<i>Clostridium sporogenes</i>	2,27
Vzorek 2	<i>Clostridium sporogenes</i>	1,97
Vzorek 2	<i>Clostridium sporogenes</i>	2,27
Vzorek 3	<i>Clostridium sporogenes</i>	2,06

Nejvyšší zaznamenané hodnoty

Tabulka č. 10 s nejvyššími naměřenými hodnotami v porovnání s doporučenými limitními hodnotami.

Tabulka 10 Maximální naměřené a limitní hodnoty (Ministerstvo zemědělství ČR, 2018)

Parametr	Jednotka	Maximální naměřená hodnota	Maximální limitní hodnota
<i>Bacillus cereus</i>	Log KTJ/g	2	3
<i>Enterobacteriaceae</i>	Log KTJ/g	<1	2
<i>Escherichia coli</i>	Log KTJ/g	<1	
Koaguláza pozitivní stafylokoky	Log KTJ/g	<1	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Přítomnost/g	0	0/1g
Mezofilní aerobní bakterie	Log KTJ/g	<7	5
Aerobní sporulující bakterie	Log KTJ/g	4,76	
Kvasinky a plísně	Log KTJ/g	2,7	
<i>Salmonella</i>	Přítomnost/25g	0	0/25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Přítomnost/25g	0	

6 Diskuze

Bacillus cereus

Grabowski et al. (2017) uvádí, že *Bacillus cereus* je patogen, který může způsobit otravu jídlem. Některé kmeny produkují toxiny, které způsobují zvracení nebo průjem ($> 6 \log$ KTJ/g). *B. cereus* je vysoce tepelně odolný a může přežít pasteraci. Pokusy ukázaly, že počet bacilů sušeného hmyzu závisí, stejně jako u jiných potravin, do značné míry na kombinaci teploty a času. Metoda tyndalace po vysušení zcela eliminovala počty těchto bakterií (Grabowski et al., 2017). EFSA (2016) zveřejnil, nutnost sledovat *Bacillus cereus* a další kmeny *Bacillus* v potravinářských výrobcích Potravin ve stavu určeném ke konzumaci by neměly přesahovat hodnoty 3 resp. 5 log KTJ/g (Evropská komise, 2011) Fasolato et al. (2018) ve své studii o zpracovaném jedlém hmyzu uvedl bezpečnostní prahovou hodnotu 5 log KTJ/g. V této studii se u 25 % analyzovaných vzorků počty *B. cereus* pohybovaly v rozmezí od 4 do 6,6 log KTJ/g (Fasolato et al., 2018).

V této práci byl zaznamenán nejvyšší nárůst *Bacillus cereus* ve vzorku číslo jedna v první šarži, výskyt činil $2 \pm 0,00 \log$ KTJ/g. Ostatní vzorky dosahovaly $1 \pm 0,00 \log$ KTJ/g a méně. Dle výše uvedených prahových hodnot nebyly překročeny hraniční hodnoty pro výskyt *B. cereus*.

V důsledku nevhodného skladování může počet *B. cereus* růst na nepřijatelně úroveň vyšší než 5 log KTJ/g (Fasolato et al., 2018).

Enterobacteriaceae

Doporučená mikrobiologická kritéria pro *Enterobacteriaceae* vycházející evropských právních předpisů, maximální limitní hodnota je 2 log KTJ/g (Evropská komise, 2011).

Ve studii mikrobioty prodáváného zpracovaného jedlého hmyzu, ve které byli cvrčci podrobeni mikrobiologické analýze, dosahovaly *Enterobacteriaceae* hodnot menších než 2 log KTJ/g u všech vzorků (Garofalo et al., 2017) a splňovaly tak hraniční hodnoty, stejně jako v této bakalářské práci, kde veškeré zaznamenané hodnoty testovaných vzorků obsahovaly méně než 1 log KTJ/g.

Dle studie zpracovaného jedlého hmyzu, byly bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* zabity během 5 minut varu u všech druhů testovaného hmyzu. Pražení však dostatečně neeliminuje přítomné *Enterobacteriaceae*, tomu však může pomoci blanšírování hmyzu ve vroucí vodě pro několik minut před pražením (Klunder et al., 2012).

Escherichia coli

Ve studii, která vyhodnocovala bakteriální počty zpracovaných vzorků hmyzu ve srovnání s prahovými hodnotami *Escherichia coli* předloženými Belgií a Nizozemskem, uvádí hodnotu *Escherichia coli* $<1 \log$ KTJ/g. Všechny testované vzorky v této studii splnily kritérium *Escherichia coli* $<1 \log$ KTJ/g. (Grabowski et al., 2017) V této bakalářské práci byl

po ukončení kultivace u všech testovaných vzorků zaznamenán nárůst *Escherichia coli* méně než 1 log KTJ/g. Což také splňuje uvedené limitní hodnoty *Escherichia coli* (<1 log KTJ/g).

Dle Fernandez-Cassi et al. (2019) byly tyto patogeny detekovány kultivačními metodami u hmyzích produktů pouze příležitostně. *Escherichia coli*, která se běžně používá k hodnocení kontaminace vody a potravin, se nezdá být významnou součástí mikrobioty cvrčků. Ani citlivější techniky, jako jsou metagenomické studie nezjistily přítomnost *Escherichia coli*. Pokud je však přítomnost bakterií *Escherichia coli* v jedlém hmyzu zaznamenána, pravděpodobně je to důsledek použité kontaminované vody, jak uvádí Ali et al. (2010).

Koaguláza pozitivní stafylokoky a *Staphylococcus aureus*

V provedených analýzách hmyzích produktů nebyly ve všech testovaných vzorcích detekovány koaguláza pozitivní stafylokoky nebo byl jejich počet pod detekčním limitem (1 log KTJ/g). *Staphylococcus aureus* nebyl prokázán ani u jednoho vzorku, limitní hodnoty tedy nebyly přesaženy.

Tuto skutečnost potvrzují i další provedené studie. Fasolo et al. (2018) uvádí v provedené studii na zpracovaný jedlý hmyz, nebyl zaznamenán *S. aureus* v žádném vzorku. Další studie, v níž byl proveden mikrobiologický rozbor zpracovaných jedlých hmyzích produktů, uvádí, že všechny nalezené stafylokoky byly negativní na koagulázu a tudíž neobsahovaly *S. aureus*. Tato absence může být způsobena efektivním zpracováním, ale průzkum syrového hmyzu, zaznamenal stejné výsledky. Tudíž moderní techniky chovu mohou také zabránit šíření těchto patogenů (Grabowski et al., 2017).

Kvasinky a plísně

Kvasinky a plísně jsou běžnou součástí mikrobioty jedlého hmyzu. Jsou to všudypřítomné organismy, které jsou schopny produkovat spory a mohou se snadno šířit v prostředí a kontaminovat tak potravinové produkty. Způsobují kažení produktu, mohou způsobovat změny barvy a chuti, snižují nutriční vlastnosti a trvanlivost výrobku. Houby jsou hlavními organismy odpovědnými za znehodnocování potravin. Některé druhy plísní jsou navíc patogenní a mohou produkovat toxiny a mykotoxiny (Garofalo et al., 2019). V jedlém hmyzu se obvykle vyskytují plísně rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* a *Candida* (Schlüter et al., 2017). Jeden z hlavních vlivů, který se podílí na koncentraci kvasinek a plísní, je prostředí, ve kterém je hmyz chován (EFSA, 2015). Na základě analyzovaných vědeckých studií čerstvý jedlý hmyz obsahoval 1,4 - 7,2 log KTJ/g kvasinek a plísní. Naopak zpracovaný (sušený a tepelně ošetřený) jedlý hmyz obecně vykazoval nižší hodnoty, což naznačuje účinnost některých ošetření při snižování mikrobiální kontaminace těchto nových potravin (Garofalo et al., 2019).

Ve svém výzkumu prodávávaného zpracovaného jedlého hmyzu uvedli Garofalo et al. (2017), že nejvyšší počet kvasinek byl naměřen u zpracovaných cvrčků $5,10 \pm 0,20$ log KTJ/g, ostatní vzorky hmyzu vykazovaly počty <2 log KTJ/g. Počty plísní byly nejvyšší v cvrččí mouce ($3,10 \pm 0,02$ KTJ/g) (Garofalo et al., 2017).

V porovnání s těmito výzkumy byly v praktické části této bakalářské práce naměřeny nižší hodnoty, protože nejvyšší hodnota $2,8 \pm 0,01$ log KTJ/g byla naměřena u vzorku č. 2 s obsahem 10% cvrččí mouky.

Mezofilní aerobní bakterie

Doporučené mikrobiologické kritérium u mezofilních aerobních bakterií je 5 log KTJ/g (Evropská komise, 2011) Na základě vědeckých studií čerstvý jedlý hmyz obvykle obsahuje vysoké počty aerobních mezofilních bakterií (3,6 - 9,4 log KTJ/g) (Garofalo et al., 2019). Právě tato skutečnost může být důvodem, proč byly v praktické části této práce naměřeny hodnoty, překračující hraniční hodnoty pro aerobní mezofilní bakterie. U dvou zpracovaných výrobků byly naměřeny vyšší hodnoty než 5 log KTJ/g. Hodnota <7 log KTJ/g byla naměřena u vzorku číslo 1 (10 % cvrččí mouky) v první šarži. Druhá nejvyšší hodnota byla naměřena v cvrččí mouce, ve vzorku číslo 6 v prvním šarži, v němž bylo $5,76 \pm 0,59$ log KTJ/g. Klunder et al. (2012) však udávají, že tepelné ošetření značně snižuje počty mezofilních bakterií, což dokázal výzkum tepelného opracování cvrčka domácího. Čerstvý hmyz obsahoval 7,2 log KTJ/g, vařený pouze 1,7 log KTJ/g, což znázorňuje vliv tepelného ošetření na mikrobiologickou kvalitu výrobků z hmyzu.

Důvodem, proč byly naměřené vyšší hodnoty mezofilních bakterií, tak mohou být přidané příchutě nebo doba trvanlivosti výrobku, která má vliv na počty bakterií, jak uvádí Klunder et al. (2012) ve svém výzkumu. Avšak průměrná hodnota ve všech vzorcích nebyla překročena. Porovnání s dalšími výzkumy, ve studii mikrobioty prodáváného zpracovaného jedlého hmyzu, byl naměřen relativně nízký počet celkových mezofilních aerobů ve všech studovaných šaržích hmyzu. Nejvyšší počty byly hlášeny v cvrččí mouce ($4,80 \pm 0,06$ log KTJ/g) (Garofalo et al., 2017). Osimani et al. (2017) uvádí mikrobiální počty vzorků prodáváného sušeného jedlého hmyzu. Nejvyšší celkové počty mezofilních aerobů byly naměřeny také v cvrččí mouce $5,0 \pm 0,05$ log KTJ/g.

Aerobní sporulující bakterie

Přítomnost bakterií vytvářejících spory v potravinách představuje vážný problém. Mohou produkovat endospory, které jsou odolné vůči teple, dehydrataci, záření a chemikáliím, a proto je obtížné je eliminovat. V případě, že je potravina nesprávně uvařena, chlazená a skladována, mohou spory vyklíčit a množit se (Garofalo et al., 2019). Hanboonsong et al. (2014) ve své studii o jedlém hmyzu uvádí bezpečný limit pro aerobní sporulující bakterie 5 log KTJ/g. Také uvádí, že v pražených cvrčcích byla naměřena hodnota bakterií vytvářejících spory 3 log KTJ/g. V mikrobiologickém rozboru v praktické části byla nejvyšší naměřená hodnota ve vzorku číslo jedna, který se řadí k výrobkům s obsahem 10 % cvrččí mouky, jeho obsah byl $4,76 \pm 0,06$ log KTJ/g. Garofalo et al. (2019) uvádí podobné hodnoty bakterií vytvářejících spory v rozboru cvrččí mouky 5,5 log KTJ/g.

Salmonella* spp. a *Listeria monocytogenes

Patogenní bakterie *L. monocytogenes* a *Salmonella* spp. nebyly identifikovány v žádném analyzovaném vzorku. Tento výsledek se shoduje s provedenými výzkumy, kde také nedošlo k jejich identifikaci (Fasolato, 2018; Garofalo, 2017; Grabowski, 2017).

Přítomnost *Clostridium* spp.

Ve výzkumu sporotvorných bakterií v potravinách na bázi hmyzu byl rod *Clostridium* detekován pouze sporadicky (Osimani et al., 2021). V další studii, která se zabývala mikrobiotou prodáváného zpracovaného jedlého hmyzu byl rod *Clostridium* nalezen s nízkou četností (Garofalo et al., 2017).

V praktické části byla zjištěna přítomnost *Clostridium* téměř u 3 vzorků., avšak metodou MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie byl identifikován pouze *Clostridium sporogenes*. *Clostridium sporogenes* je fenotypicky podobný ostatním členům svého rodu *C. difficile* a *C. botulinum*, ale postrádá schopnost produkovat neurotoxin botulinum, který způsobuje onemocnění člověka. Proto je *C. sporogenes* klasifikován jako neškodný organismus (Kubiak et al., 2015).

7 Závěr

V této bakalářské práci byly zkoumány patogenní bakterie ve výrobcích z jedlého hmyzu. K rozboru byly vybrány výrobky s různým procentuálním obsahem cvrččí mouky. Tyto výrobky musí splňovat mikrobiologické požadavky, stejně jako ostatní potraviny. Proto je důležité dodržovat všechna hygienická kritéria při chovu, zpracování a skladování jedlého hmyzu tak, aby výrobky dosahovaly co nejlepší mikrobiální kvality.

Z analýzy produktů s obsahem cvrččí mouky byla zjištěna u některých šarží přítomnost rodu *Clostridium* spp. Také byla zjištěna přítomnost *Bacillus cereus*, aerobní sporulující bakterie a kvasinky a plísně, jejich počty však nepřekročily limitní hodnoty. Počty *Enterobacteriaceae* a *Escherichia coli* byly menší než 1 log KTJ/g. Ve vzorku 1 a 6 v jedné šarži byly limity pro aerobní mezofilní bakterie přesaženy, avšak průměrné naměřené hodnoty mezofilních aerobních bakterií nepřekročily doporučenou mikrobiologickou limitní hodnotu. U patogenních bakterií *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* a *Salmonella* spp. nedošlo k jejich průkazu.

Cíl bakalářské práce zjistit výskyt bakterií ve výrobcích z jedlého hmyzu, byl splněn.

Výrobky z jedlého hmyzu převážně splňují požadavky na ně kladené z hlediska mikrobiologické kvality. Hypotéza této práce byla z velké části, ne však zcela, potvrzena. K úplnému vyhovění legislativním požadavkům by mohla přispět správná výrobní praxe, ale také mikrobiologická analýza jednotlivých komponent hmyzích tyčinek, například příchutí.

Jedlý hmyz je díky svým nutričním a dalším pozitivním vlastnostem vnímán jako perspektivní potravina, protože jeho obliba stále stoupá, je jisté, že se této nové potraviny budou věnovat další studie týkající se chovu a zpracování jedlého hmyzu. Pozornost by měla být i nadále věnována patogenním a potenciálně patogenním rodům bakterií.

8 Literatura

Ali A, Mohamadou BA, Saidou C, Aoudou Y, Tchiegang C. 2010. Physico-chemical properties and safety of grasshoppers, important contributors to food security in the far North Region of Cameroon. *Pes. J. Animal Science*.

Alrifai, O., Marcone, M. 2019. *Comprehensive Biotechnology (Third Edition): Human Use of Insects as Food – Food Security*. 2019, pp. Pages 618-628.

Anankware, J. 2015. *Insects as food and feed: A review*.

Auerswald, L., Lopata, A. 2005. *Insects: diversity and allergy*. *Current Allergy & Clinical Immunology*

Baiano, A. 2020. *Edible insects: An overview on nutritional characteristics, safety, farming, production technologies, regulatory framework, and socio-economic and ethical implications*. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 100, pp. 35-50.

Baker-Austin, C. 2018. *Vibrio spp. infections*. *Nature Reviews Disease Primers*.

Barman, S., Bhattacharya, S., Chandra Mandal, N. 2020. *Serratia*. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. (pp. 27-36). Elsevier.

Bekal, S., Brousseau, R., Masson, L., Prefontaine, G., Fairbrother, J., Harel, J. 2003. *Rapid Identification of Escherichia coli Pathotypes by Virulence Gene Detection with DNA Microarrays*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), pp. 2113-2125.

Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C., Paoletti, M., Ricci, A. 2013. *Edible Insects in a Food Safety and Nutritional Perspective: A Critical Review*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(3), pp. 296-313.

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*, pp. 545–577. New Hampshire, Science Publishers.

Bukkens, S.G.F. 1997. *The nutritional value of edible insects*. *Ecology of Food and Nutrition*, 36: 287–319.

Bureš, L. 2020. *Krátká historie konzumace hmyzu*. Grig.cz. Retrieved from: <https://grig.cz/kratka-historie-konzumace-hmyzu/>

Bursová, Š. 2014. *Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I. Obecná mikrobiologie*. Revidované vydání. Brno.

Coetzer, J., Penrith, M., Maclachlan, N., & Thomson, G. 2020. *Streptococcus spp. infections*. Anipedia. Retrieved from: <https://www.anipedia.org/resources/streptococcus-spp-infections/897>

ČSN EN ISO 11290-1. 2017. Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* a *Listeria* spp. - Část 1: Metoda průkazu.

ČSN EN ISO 4833-1. 2014. Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 1: Technika přelivem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C.

ČSN EN ISO 6579-1. 2020. Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda průkazu, stanovení počtu a sérotypizace bakterií rodu *Salmonella* - Část 1: Průkaz bakterií rodu *Salmonella*.

ČSN EN ISO 6888-1. 1999. Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) - Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera.

ČSN EN ISO 7932. 2005. Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu presumptivního *Bacillus cereus* - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C.

ČSN ISO 16649-2. 2003. Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu beta-glukuronidázopozitivních *Escherichia coli* - Část 2: Technika počítání kolonií vykultivovaných při 44 °C s použitím 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glukuronidu.

ČSN ISO 21527-2. 2009. Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní - Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody vyšší než 0,95.

ČSN ISO 21528-2. 2018. Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* - Část 2: Technika počítání kolonií.

D'Agostino, M., Cook, N. 2016. Foodborne Pathogens. In *Encyclopedia of Food and Health*. (pp. 83-86). Elsevier.

De Foliart, G. R. 1999. Insects as food: why the western attitude is important. *Annual Review of Entomology*. 44(1): 21 -50.

Dobermann, D., Swift, J., Field, L. 2017. Opportunities and hurdles of edible insects for food and feed. *Nutrition Bulletin*, 42(4), pp. 293-308.

Drzewiecka, D. 2016. Significance and roles of *Proteus* spp. bacteria in natural environments. *Microbial ecology*.

EFSA. 2015. Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA Journal*, 13(10).

EFSA. 2016. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal* [online]. 2016, 14(7) [cit. 2021-4-27]. ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2016.4524

EFSA. 2018. Novel food [online]. [cit. 2021-4-27]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/food/safety/novel_food_en

Fasolato, L., Cardazzo, B., Carraro, L., Fontana, F., Novelli, E., Balzan, S. 2018. Edible processed insects from e-commerce: Food safety with a focus on the *Bacillus cereus* group. *Food Microbiology*, vol. 76, pp. 296-303.

Fernandez-Cassi, X., Supeanu, A., Vaga, M., Jansson, A., Boqvist, S., Vagsholm, I. 2019. The house cricket (*Acheta domesticus*) as a novel food: a risk profile. *Journal of Insects as Food and Feed*, 5(2), pp. 137-157.

Finke, M., Oonincx, D. 2014. Insects as Food for Insectivores. In *Mass Production of Beneficial Organisms*. (pp. 583-616). Elsevier.

Foltýnová, Z. 2019. *Mikrobiologie potravin I: Rod Serratia*.

Frigerio, J., Agostinetti, G., Galimberti, A., De Mattia, F., Labra, M., Bruno, A. 2020. Tasting the differences: Microbiota analysis of different insect-based novel food. *Food Research International*, vol. 137.

Garofalo, C., Milanović, V., Cardinali, F., Aquilanti, L., Clementi, F., Osimani, A. 2019. Current knowledge on the microbiota of edible insects intended for human consumption: A state-of-the-art review. *Food Research International*, vol. 125.

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 as revealed by high-throughput sequencing. *Food Microbiology*, vol. 62, pp. 15-22.

Grabowski, N., Klein, G. 2017. Microbiology of processed edible insect products – Results of a preliminary survey. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 243, pp. 103-107.

Greenhalgh, J., Amund, D. 2019. Examining the Presence of *Cronobacter* spp. in Ready-to-eat Edible Insects. *Food Safety*, 7(3), pp. 74-78.

Hamilton, A., Kamm, M., Ng, S., Morrison, M. 2018. *Proteus* spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(3), pp. e00085-17.

Hesse, C., Schulz, F., Bull, C., Shaffer, B., Yan, Q., Shapiro, N., Hassan, K., Varghese, N., Elbourne, L., Paulsen, I., Kyrpides, N., Woyke, T., Loper, J. 2018. Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. *Environmental Microbiology*, 20(6), pp. 2142-2159.

Imathiu, S. 2020. Benefits and food safety concerns associated with consumption of edible insects. *NFS Journal*, vol. 18, pp. 1-11.

Jeong, K., Park, J. 2020. Insect Allergens on the Dining Table. *Current Protein & Peptide Science*, 21(2), pp. 159-169.

Jongema Y. 2017. List of edible insects of the world WUR. Available online: <https://www.wur.nl/en/Expertise-Services/Chairgroups/Plant-Sciences/Laboratory-of-Entomology/Edible-insects/Worldwide-species-list.htm>

- Klunder, H., Wolkers-Rooijackers, J., Korpela, J., Nout, M. 2012. Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control*, 26(2), pp. 628-631.
- Kouřimská, L., Adámková, A. 2016. Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal*, vol. 4, pp. 22-26.
- Kubiak, A., Poehlein, A., Budd, P., Kuehne, S., Winzer, K., Theys, J., Lambin, P., Daniel, R., Minton, N. 2015. Complete Genome Sequence of the Nonpathogenic Soil-Dwelling Bacterium *Clostridium sporogenes* Strain NCIMB 10696. *Genome Announcements*, 3(4), pp. e00942-15.
- Leung, J., Gallant, C. 2014. Infections due to *Escherichia* and *Shigella*☆. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier.
- Lupo, A., Haenni, M., Madec, J. 2018. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*. (pp. 377-393). Washington, DC, USA: ASM Press.
- Mąka, Ł., Popowska, M. 2016. Antimicrobial resistance of salmonella spp. Isolated from food.
- Ministerstvo zemědělství ČR. 2018. Zásady správné zemědělské a výrobní praxe produkce hmyzu určeného pro lidskou spotřebu [online]. [cit. 2021-4-21]. ISBN 978-80-7434-420-6. Dostupné z: [https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/Zasady%20produkce%20hmyzu%204%20\(2\).pdf](https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/Zasady%20produkce%20hmyzu%204%20(2).pdf)
- 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 Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(3), pp. 147-157.
- Mlček, J. 2020. Netradiční druhy potravin - jejich význam, vlastnosti a využití: Non-traditional types of food - their importance, properties and utilization. (Pořadí vydání: první). Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- Morris, Brian. 2004. *Insects and Human Life* [online]. [cit. 2021-4-27]. ISBN 978-1859738474.
- Murefu, T., Macheke, L., Musundire, R., Manditsera, F. 2019. Safety of wild harvested and reared edible insects: A review. *Food Control*, vol. 101, pp. 209-224.
- Muzzarelli, R.A.A., Terbojevich, M., Muzzarelli, C., Miliani, M. & Francescangeli, O. 2001. Partial depolymerization of chitosan with the aid of papain. In R.A.A. Muzzarelli, ed. *Chitin Enzymology*, pp. 405–414. Italy, Atec.
- Naseem, R., Majeed, W., Rana, N., Koch, E., Naseem, M. 2020. Entomophagy: an innovative nutritional and economic navigational tool in race of food security. *International Journal of Tropical Insect Science*.

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 ze dne 25. listopadu 2015 o nových potravinách, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 a o zrušení nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 258/97 a nařízení Komise (ES) č. 1852/2001

Orsi, R., Wiedmann, M. 2016. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), pp. 5273-5287.

Osimani, A., Aquilanti, L. 2021. Spore-forming bacteria in insect-based foods. *Current Opinion in Food Science*, vol. 37, pp. 112-117.

Osimani, A., Milanović, V., Garofalo, C., Cardinali, F., Roncolini, A., Sabbatini, R., De Filippis, F., Ercolini, D., Gabucci, C., Petruzzelli, A., Tonucci, F., Clementi, F., Aquilanti, L. 2018. Revealing the microbiota of marketed edible insects through PCR-DGGE, metagenomic sequencing and real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 276, pp. 54-62.

Pahalagedara, A., Flint, S., Palmer, J., Brightwell, G., & Gupta, T. 2020. Antimicrobial production by strictly anaerobic *Clostridium* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(5).

Pandey, S., & Poonia, A. 2018. Insects - An Innovative Source of Food. *The Indian Journal of Nutrition and Dietetics*, 55(1), pp. 108-115.

Poma, G., Cuykx, M., Amato, E., Calaprice, C., Focant, J., Covaci, A. 2017. Evaluation of hazardous chemicals in edible insects and insect-based food intended for human consumption. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 100, pp. 70-79.

Potravinářská komora České republiky. 2018. Hmyz (konečně) i v našem jídelníčku ?.

Purkrťová, S. 2018. Využití MALDI-TOF MS pro identifikaci bakterií způsobujících kažení mlékárenských výrobků.

Raheem, D., Raposo, A., Oluwole, O., Nieuwland, M., Saraiva, A., Carrascosa, C. 2019. Entomophagy: Nutritional, ecological, safety and legislation aspects. *Food Research International*, vol. 126.

Ribeiro, J., Cunha, L., Sousa-Pinto, B., Fonseca, J. 2018. Allergic risks of consuming edible insects: A systematic review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(1).

Rohde, A., Hammerl, J., Appel, B., Dieckmann, R., Al Dahouk, S. 2017. Differential detection of pathogenic *Yersinia* spp. by fluorescence in situ hybridization. *Food Microbiology*, vol. 62, pp. 39-45.

Rumpold, B., Schlüter, O. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(5), pp. 802-823.

Food Safety authority of Ireland, 2011. *Salmonella* species. Dostupné z: <file:///C:/Users/Lenovo/Downloads/Salmonella%20Factsheet%20FINAL.pdf>

- Schlüter, O., Rumpold, B., Holzhauser, T., Roth, A., Vogel, R., Quasigroch, W., Vogel, S., Heinz, V., Jäger, H., Bandick, N., Kulling, S., Knorr, D., Steinberg, P., Engel, K. 2017. Safety aspects of the production of foods and food ingredients from insects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(6).
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P., Teixeira, P. 2011. *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Frontiers in Microbiology*, vol. 2.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P., Viridi, J. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, vol. 6.
- The Center for Food Security and Public Health. 2005. Streptococcosis. Dostupné z: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/streptococcosis.pdf>
- Thermo Fisher Scientific. 2020. Staphylase™ Test. Retrieved from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DR0595A#/DR0595A>
- Tiencheu, B., Womeni, H. 2017. Entomophagy: Insects as Food. In *Insect Physiology and Ecology*. InTech.
- Todar, K. 2015. Staphylococcus. Dostupné z: <http://metabase.uaem.mx/handle/123456789/1239>
- Turnbull, P., Kramer, J., & Melling, J. 1991. *Bacillus*. *Manual of clinical microbiology*. pp. 5: 296-303.
- Ústav mikrobiologie. 2020. *Bacillus cereus*. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/rep/bace.htm>
- van Huis, A., Dicke, M., & van Loon, J. 2015. Insects to feed the world. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(1), pp. 3-5.
- van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., Vantomme, P. 2013. *Edible insects: Future prospects for food and feed security*. Rome: Food and agriculture organization of the united nations.
- Vrioni, G., Tsiamis, C., Oikonomidis, G., Theodoridou, K., Kapsimali, V., Tsakris, A. 2018. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Annals of Translational Medicine*, 6(12), pp. 240-240.
- WHO/FAO. 2003. *Diet nutrition and the prevention of chronic diseases*. WHO, Geneva, pp 4–101
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., Schubert, S. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), pp. 965-974.

Xiaoming, C., Ying, F., Hong, Z., Zhiyong, C. 2010. Forest insects as food: humans bite back. Proceedings of a workshop on Asia-Pacific resources and their potential for development: Review of the nutritive value of edible insects. (19–21 February 2008). Bangkok.

Yen, A., Bilney, C., Shackleton, M., Lawler, S. 2018. Current issues involved with the identification and nutritional value of wood grubs consumed by Australian Aborigines. *Insect Science*, 25(2), pp. 199-210.

Zákon č. 166/1999 Sb. o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon), ve znění pozdějších předpisů, a některé související zákony In: *Sbírka zákonů*. 30. 7. 1999.

9 Zdroje obrázků

Obrázek 1: <https://www.telegraph.co.uk/travel/destinations/oceania/australia/galleries/A-guide-to-Australian-bushtucker/>

Obrázek 2: <https://www.ukbeetles.co.uk/lytta-vesicatoria>

Obrázek 3: <https://www.fishersci.se/shop/products/salmonella-test-kit-using-latex-agglutination/10557473>

10 Seznam použitých zkratk a symbolů

ČSN ISO - Česká technická norma, která zavádí do soustavy českých norem mezinárodní normu ISO

ČSN EN ISO - Česká technická norma, která zavádí do soustavy českých norem evropskou normu identickou s mezinárodní normou ISO

EFSA – European Food Safety Authority

EU – Evropská unie

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

KTJ – kolonie tvořící jednotky

Log – dekadický logaritmus

SD – směrodatná odchylka

Tzv – takzvaný

11 Seznam tabulek

Tabulka 1 Obsah proteinů u jednotlivých řádů hmyzu v procentech	13
Tabulka 2 Obsah sacharidů v některých řádech hmyzu	15
Tabulka 3 Testované vzorky	28
Tabulka 4 Složení ředícího média	29
Tabulka 5 Složení Standard plate count agar	30
Tabulka 6 Složení Violet red bile glucose agar	31
Tabulka 7 Kultivační média, doba a podmínky kultivace	33
Tabulka 8 Stanovené počty mikroorganismů ve vzorcích.	35
Tabulka 9 Bakteriální druhy a jejich identifikační skóre	38
Tabulka 10 Maximální naměřené a limitní hodnoty	38
Tabulka 11 Naměřené hodnoty kvasinek a plísní.....	I
Tabulka 12 Naměřené hodnoty mezofilních aerobních bakterií	I
Tabulka 13 Naměřené hodnoty aerobních sporulujících bakterií.....	II

12 Seznam obrázků

Obrázek 1 Wichetty grub	14
Obrázek 2 Lytta vesicatoria.....	19
Obrázek 3 Příprava na kultivaci	29
Obrázek 4 latexový aglutinační test Salmonella Test Kit	32
Obrázek 5 Plísně.....	36
Obrázek 6 Konfirmační test Staphylase test kit	37

13 Samostatné přílohy

Tabulka 11 Naměřené hodnoty kvasinek a plísni

Číslo vzorku	Opakování	KTJ	log KTJ	± SD
1	1.	<10 ²	2	
	2.	3*10 ²	2,48	± 0,01
	3.	<10	1	
2	1.	10 ²	2	
	2.	6,3*10 ²	2,8	± 0,01
	3.	5,0 *10 ²	2,7	± 0,00
3	1.	2,0*10 ²	2,3	± 0,00
	2.	10 ²	2	
	3.	5,0 *10 ²	2,7	± 0,00
4	1.	<10	1	
	2.	<10	1	
	3.	10 ²	2	± 0,00
	4.	<10	1	
5	1.	6*10	1,78	± 0,00
	2.	<10	1	
	3.	<10	1	
6	1.	<10	1	
	2.	<10	1	
	3.	<10	1	

Tabulka 12 Naměřené hodnoty mezofilních aerobních bakterií

Číslo vzorku	opakování	KTJ	log KTJ	± SD
1	1.	<10 ⁷	7	
	2.	5,4*10 ³	3,67	± 0,07
	3.	<10 ⁴	4	
2	1.	<10 ⁵	5	
	2.	7,3*10 ³	3,82	± 0,06
	3.	<10 ⁴	4	
3	1.	<10 ⁴	4	
	2.	<10 ⁴	4	
4	1.	<10 ⁴	4	
	2.	5,9*10 ³	3,71	± 0,05
	3.	2,0*10 ³	3,3	± 0,00
	4.	1,8*10 ³	3,17	± 0,09
5	1.	1,2*10 ³	3,17	± 0,09
	2.	<10 ⁴	4	
6	1.	1,2*10 ⁵	5,76	± 0,59
	2.	7,2*10 ⁴	4,82	± 0,04
	3.	1,6*10 ⁴	4,2	± 0,01

Tabulka 13 Naměřené hodnoty aerobních sporulujících bakterií

Číslo vzorku	opakování	KTJ	log KTJ	± SD
1	1.	$6,4 \cdot 10^4$	4,76	± 0,06
	2.	$5,2 \cdot 10^3$	3,71	± 0,01
	3.	$1,4 \cdot 10^3$	3,15	± 0,03
2	1.	$2,1 \cdot 10^4$	4,44	± 0,02
	2.	$4,6 \cdot 10^3$	3,62	± 0,13
	3.	$2,2 \cdot 10^2$	2,34	± 0,01
3	1.	$6,0 \cdot 10^2$	2,79	± 0,01
	2.	$2,0 \cdot 10^2$	2,3	± 0,01
4	1.	$2,0 \cdot 10^3$	3,3	± 0,00
	2.	<10	1	
	3.	$1,2 \cdot 10^3$	3,08	± 0,01
	4.	$2,0 \cdot 10^2$	2,3	± 0,00
5	1.	$1,2 \cdot 10^3$	3,08	± 0,01
	2.	<10	1	
6	1.	$1,8 \cdot 10^3$	3,26	± 0,01
	2.	<10	1	
	3.	$4,3 \cdot 10^4$	4,6	± 0,04