

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Mikrobiologické ukazatele kvality jedlého hmyzu

Diplomová práce

Bc. Veronika Kulhavá

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

Ing. Hana Šubrtová Salmonová, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Mikrobiologické ukazatele kvality jedlého hmyzu" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní Ing. Haně Šubrtové Salmonové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za předané vědomosti, trpělivost, motivaci a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování práce věnovala. Na závěr bych chtěla vyjádřit velké díky mé rodině a přátelům, kteří mi byli podporou po celou dobu mého studia.

Mikrobiologické ukazatele kvality jedlého hmyzu

Souhrn

V posledních letech přitahuje jedlý hmyz celosvětovou pozornost. Kvůli stálému růstu populace se zvyšují nároky na produkci potravin, což zatěžuje životní prostředí. Hmyz se jeví jako slibný alternativní zdroj potravy s kvalitními živinami, jejichž obsah a složení předčí i konvenční zdroje. Oproti jiným zdrojům živočišných bílkovin má hmyz vysokou schopnost konverze živin na biologickou hmotu. Konzumace celého hmyzu se však pojí s výskytem biologických činitelů s nebezpečným potenciálem obsažených především v trávicím traktu. Stále však nejsou stanovena mikrobiologická kritéria pro zhodnocení bezpečnosti konzumace hmyzu. Tato diplomová práce byla věnována mikrobiální bezpečnosti a kvalitě jedlého hmyzu, s cílem zhodnotit mikrobiální profil hmyzu a navrhnout vhodné indikátorové skupiny mikroorganismů. V praktické části byly testovány 3 druhy syrového jedlého hmyzu: moučný červ (*Tenebrio molitor*), cvrček stepní (*Gryllus assimilis*) a saranče stěhovavé (*Locusta migratoria*). Kultivačně, dle platných norem a standardů, bylo stanoveno 12 skupin mikroorganismů. Byly zjištěny průměrné počty: celkové aerobní a anaerobní mikroorganismy 7,31 a 7,86 log KTJ/g, aerobní a anaerobní sporulující mikroorganismy 3,54 a 2,58 log KTJ/g, fekální enterokoky 6,26 log KTJ/g, plísně a kvasinky 3,10 log KTJ/g, *Clostridium perfringens* 1,43 log KTJ/g, *Bacillus cereus* 1,89 log KTJ/g, *E. coli* <1 log KTJ/g a koliformní bakterie 5,06 log KTJ/g. Celkově nejvyšší počty mikroorganismů, byly zaznamenány u saranče stěhovavé (*Locusta migratoria*). Současně byly ve všech vzorcích detekovány významné patogeny *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* (2 log KTJ/g) a koaguláza pozitivní stafylokoky (3 log KTJ/g). Pro identifikaci rodového zastoupení byla použita metoda MALDI-TOF MS. Ve všech vzorcích dominovaly bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* a enterokoky. Identifikovány byly bakterie rodů *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Acinobacter*, *Citrobacter*, *Pediococcus*, *Protues*, některé z nich mají patogenní potenciál a představují potencionální riziko kažení potravin. Jako indikátory kvality jedlého hmyzu byly navrženy skupiny: celkové počty mezofilních aerobních mikroorganismů, aerobní sporulující mikroorganismy, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* a koaguláza pozitivní stafylokoky.

Klíčová slova: jedlý hmyz; bakterie; alimentární onemocnění; produkční kvalita; bezpečnost potravin

Microbiological indicators of edible insect quality

Summary

In recent years, edible insects have attracted worldwide attention. Due to the steady population growth, the demands on food production are increasing, which puts a strain on the environment. Insects are emerging as a promising alternative food source with high quality nutrients that are superior in content and composition to even conventional sources. Compared to other sources of animal protein, insects have a high capacity to convert nutrients into biological matter. However, the consumption of whole insects is associated with the presence of biological agents with hazardous potential, mainly in the digestive tract. However, microbiological criteria for assessing the safety of insect consumption are still not established. This thesis was devoted to the microbial safety and quality of edible insects, with the aim of evaluating the microbial profile of insects and proposing suitable indicator groups of microorganisms. In the practical part, 3 species of raw edible insects were tested: the mealworm (*Tenebrio molitor*), cricket (*Gryllus assimiles*) and the migratory locust (*Locusta migratoria*). Twelve groups of micro-organisms were determined by culture according to current norms and standards. The average counts were: total aerobic and anaerobic microorganisms 7,31 and 7,86 log cfu/g, aerobic and anaerobic sporulating microorganisms 3,54 and 2,58 log cfu/g, faecal enterococci 6,26 log cfu/g, moulds and yeasts 3,10 log cfu/g, *Clostridium perfringens* 1,43 log cfu /g, *Bacillus cereus* 1,89 log cfu/g, *E. coli* <1 log cfu/g and coliforms 5,06 log cfu/g. Overall, the highest counts of microorganisms, were recorded in the migratory locust (*Locusta migratoria*). At the same time, significant pathogens *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* (2 log cfu/g) and coagulase positive staphylococci (3 log cfu/g) were detected in all samples. The MALDI-TOF MS method was used to identify the gender representation. Bacteria of the *Enterobacteriaceae* family and enterococci dominated in all samples. Bacteria of the genera *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Acinobacter*, *Citrobacter*, *Pediococcus*, *Protues* were identified, some of which have pathogenic potential and pose a potential risk of food spoilage. The following groups have been proposed as indicators of edible insect quality: total counts of mesophilic aerobic microorganisms, aerobic sporulating microorganisms, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and coagulase positive staphylococci.

Keywords: edible insects; bacteria; foodborne illness; production quality; food safety

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Entomofagie	10
3.1.1 Historie entomofagie.....	10
3.1.2 Entomofagie v současnosti.....	10
3.2 Hmyz jako potravina	12
3.2.1 Legislativa.....	14
3.2.2 Nutriční hodnoty.....	16
3.2.2.1 Sacharidy.....	16
3.2.2.2 Tuk.....	17
3.2.2.3 Bílkoviny.....	18
3.2.2.4 Vitamíny.....	19
3.2.2.5 Minerální látky.....	20
3.2.3 Rizika konzumace.....	20
3.2.3.1 Alergeny.....	21
3.2.3.2 Toxické látky.....	21
3.2.3.3 Mikrobiologická rizika.....	23
3.2.3.4 Potenciální indikátory bezpečnosti hmyzu.....	24
3.2.4 Bakterie.....	25
3.2.5 Kvasinky a plísně.....	33
3.2.5.1 Plísně.....	34
3.2.5.2 Kvasinky.....	36
3.2.6 Viry.....	37
3.2.7 Faktory ovlivňující mikrobiotu jedlého hmyzu.....	37
3.2.8 Metody snížení mikrobiologické zátěže.....	37
3.3 Stanovení indikátorových mikroorganismů	39
3.3.1 Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS).....	39
4 Metodika	41
4.1.1 Příprava vzorků.....	41
4.1.2 Stanovení vybraných skupin mikroorganismů.....	42
4.1.3 MALDI-TOF MS.....	47
4.1.4 Vyjádření výsledků.....	47

4.1.5	Statistické vyhodnocení	48
5	Výsledky	48
5.1	Kultivační stanovení mikroorganismů	48
5.2	Identifikace pomocí MALDI-TOF MS.....	50
6	Diskuze	53
6.1	Celkové počty aerobních mikroorganismů (CPM)	54
6.2	Celkové počty anaerobních mikroorganismů (CPAM)	55
6.3	Stanovení aerobních a anaerobních sporulujících mikroorganismů	55
6.4	Stanovení fekálních enterokoků	56
6.5	Počty plísní a kvasinek	57
6.6	<i>Clostridium perfringens</i>	58
6.7	<i>Bacillus cereus</i>	59
6.8	<i>Salmonella</i>	60
6.9	<i>E. coli</i> /koliformní bakterie	60
6.10	Počty koaguláza pozitivních stafylokoků a průkaz <i>Staphylococcus aureus</i> ...	62
6.11	Identifikace MALDI-TOF MS	63
7	Závěr	65
8	Literatura.....	66

1 Úvod

Konzumace hmyzu provází lidstvo napříč historií, ačkoliv by se mohlo zdát, že se jedná o výstřelek moderní doby. Hmyz je běžnou součástí jídelníčku v řadě zemí, například v Africe nebo jihovýchodní Asii. V posledních letech přitahuje jedlý hmyz celosvětovou pozornost, protože je označován za vhodnou potravinu pro řešení nedostatku potravin kvůli stálému růstu světové populace (Kouřimská & Adámková 2016; Ministerstvo zemědělství 2018; EFSA 2021).

Díky stálému nárůstu populace se zvyšují nároky na produkci potravin, která zatěžuje životní prostředí. Díky schopnosti vysoké přeměny krmiva na biologickou hmotu a obsahu nutričně cenných látek se jedlý hmyz jeví jako vhodné řešení (Lange & Nakamura 2021). Tomu, že se jedná o aktuální téma, nasvědčuje i fakt, že jedlý hmyz a výrobky z něj jsou od 1. 1. 2018 uznány jako potravina a reaguje na ně novela veterinárního zákona v ČR (KHSJK). Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) v průběhu roku 2021 vydal první stanoviska k potravinám nového typu. Mezi prvními povolenými druhy hmyzu byl sušený moučný červ (*Tenebrio molitor*), cvrček domácí (*Acheta domestica*) a saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*) (IPIFF 2021). Do dnešního dne však neexistují mikrobiologická kritéria a metody stanovení mikroorganismů pro zajištění bezpečnosti hmyzu, stejně jako tomu je u konvenčních zdrojů.

Stejně jako jiní živočichové, i hmyz může být zdrojem potenciálně patogenních mikroorganismů, které se vyskytují v jeho trávicí soustavě a na povrchu těla. Narozdíl od hospodářských zvířat je však hmyz konzumován celý i s trávicím traktem. To s sebou nese zvýšené riziko alimentárních onemocnění. Hmyz je proto nutné před konzumací tepelně ošetřit, aby byl snížen počet některých nepatogenních skupin mikroorganismů na úroveň, která nepředstavuje alimentární riziko, a aby byly usmrceny potenciálně nebezpečné patogeny (Caparros Megido et al. 2017; Osimani et al. 2018). Dále je potřeba stanovit indikátory, které budou vhodné pro rychlou a rutinní analýzu mikrobiologické kvality a zdravotní nezávadnosti jedlého hmyzu a produktů z něj.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Předpokládáme, že součástí mikrobioty jedlého hmyzu jsou i potenciálně patogenní bakterie. Dále předpokládáme, že některé skupiny těchto bakterií jsou běžně přítomné u různých druhů jedlého hmyzu a je možné tyto skupiny využít jakožto indikátory kvality.

Cílem diplomové práce bude mikrobiologická analýza třech různých druhů jedlého hmyzu a navržení vhodných indikátorových skupin mikroorganismů.

3 Literární rešerše

3.1 Entomofagie

Entomofagie je pojem, který označuje využití hmyzu jako potravy. Tento pojem je odvozen z řeckých slov *έντομον* (éntomon – hmyz) a *φάγειν* (phagein – k jídlu) (Kouřimská & Adámková 2016).

Za entomofága je označován živočich, který ke své existenci potřebuje hmyz nebo hmyz tvoří převážnou část jeho potravy. V současnosti je ale tento pojem spojován s moderními trendy v gastronomii, kdy je hmyz využíván jako potrava pro člověka v podobě gurmánského zážitku (Adámková et al. 2016; Krčová 2017; Mareček a kol. 1997).

3.1.1 Historie entomofagie

Konzumace hmyzu je součástí lidstva již od pravěku a provází ho téměř celou historií. Člověk byl od raného vývoje všežravec. Předtím, než si byl schopen vyrobit nástroje pro lov a zemědělství, živil se sběrem, a to i hmyzu. (Adámková et al. 2016; Kouřimská & Adámková 2016). Prvním důkazem o konzumaci hmyzu je zkamenělá stolice z jeskyň v USA a Mexiku, jejíž stáří se odhaduje do doby milionů let před našim letopočtem. Ve stolici byly nalezeny části mravenců, vší, klíšťat, roztočů a larev hmyzu (Kouřimská & Adámková 2016). Ve španělské jeskyni Altamira pak byly objeveny malby z let 30 000 až 9 000 př.n.l. znázorňující divoká včelí hnízda, z čehož vychází domněnka, že lidé konzumovali med společně s včelími larvami a kuklami (Kouřimská & Adámková 2016). Aristoteles (384 – 322 př. n. l.) poté popsal ve svém díle *Historia Animalium* konzumaci samic cikád. Další důkazy o entomofagii pochází z Říma kolem roku 77 n.l., kde se pojídaly larvy tesaříka obrovského (*Cerambyx cerdo*), přičemž sloužily jako afrodiziakum (Govorushko 2019).

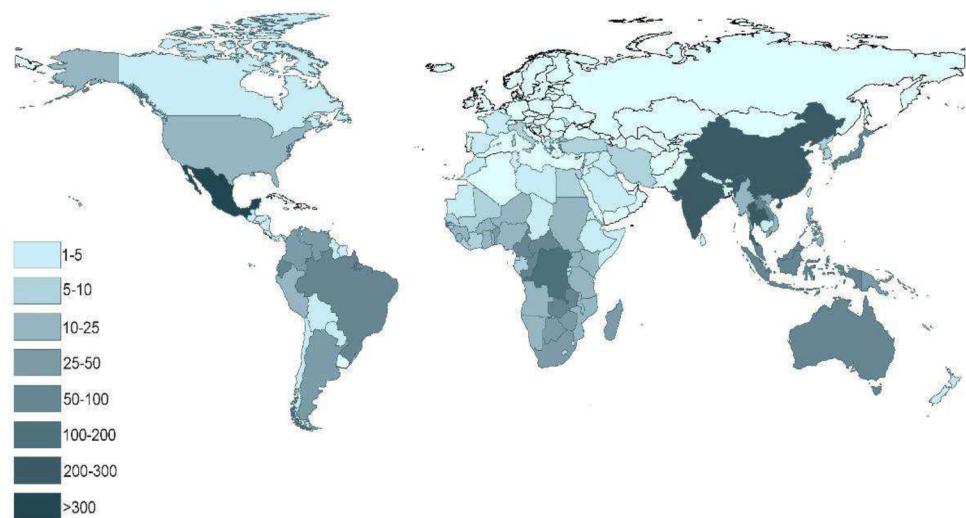
Entomofagie se v Evropě začala vytrácet během středověku, což bylo způsobeno chovem zvířat a pěstováním plodin, kdy byla konzumace hmyzu již nevýznamná a částí populace vnímaná jako odpudivá a nežádoucí (Borkovcová 2009).

3.1.2 Entomofagie v současnosti

V současnosti lze rozdělit entomofagii do dvou kategorií. První kategorie je konzumace hmyzu jako nezbytné výživy, zatímco druhou je konzumace hmyzu pro zpestření jídelníčku. První kategorie využívá hmyz jako zdroj bílkovin v oblastech, kde vládne hladomor a populace

je podvyživená. Jedná se zejména o Afriku, kde jsou například hojně konzumovány kobylky a sarančata, které v rojích napadají zelené části jedlých rostlin. V druhé kategorii je hmyz využíván v gastronomii, kde je záměrně lidmi vyhledáván pro gastronomický zážitek (Capinera 2008).

Entomofagie je rozšířena po celém světě, ať už v rozvojových nebo vyspělých oblastech, jakými jsou Japonsko, USA nebo Korea (Bednářová et al. 2015). V současnosti je konzumace hmyzu běžná ve 113 zemích světa, a to převážně v Africe, Latinské Americe a Asii. Jiný údaj odhaduje, že hmyz je součástí běžné stravy více než dvou miliard lidí po celém světě a v současnosti je známo více než 2 000 druhů jedlého hmyzu. Mezi nejčastěji konzumované druhy patří brouci (*Coleoptera*, 31 % ze všech druhů hmyzu), housenky (*Lepidoptera*, 18 %), včely, vosy, mravenci (*Hymenoptera*, 14 %), kobylky, cvrčci, sarančata (*Orthoptera*, 13 %), polokřídlý hmyz a cikády (*Hemiptera*, 12 %). Termiti (*Isoptera*), vážky (*Odonata*), dvoukřídlí (*Diptera*) a další druhy hmyzu jsou konzumovány v množství menším než 3 % z celkové spotřeby (Kouřimská & Adámková 2016; Lange & Nakamura 2021). S převážnou většinou hmyzu se setkáme v tropech, ale také v „extrémních“ podmínkách pouští, horských oblastech nebo za polárním kruhem. Ovšem zde je hmyz zastoupen v menším počtu a diverzitě (Bednářová a spol. 2015). Na Obrázku 1 jsou uvedeny nejčastější lokality výskytu hmyzu.



Obrázek 1: Nejčastější místa výskytu hmyzu (van Huis 2013)

Evropa a Severní Amerika se v současnosti staví k entomofagii spíše odmítavě. Jeden z mnoha důvodů pro tuto skutečnost může být také fakt, že se v těchto geografických oblastech nevyskytuje mnoho druhů hmyzu vhodných pro konzumaci. Největší překážkou

entomofagie v západních zemích je strach, neofobie a zhnusení již při pouhé zmínce o konzumaci hmyzu. Hmyz je zde považován za špinavou, chudou potravu či je na něj pohlíženo jako na „nouzovou dietu“. Navíc jsou zde často negativní očekávání po sensorické stránce (Bednářová et al. 2015; Dion-Poulin et al. 2021; Orodoñez-Araque & Egas-Montenegro; van Huis 2013).

Tyto aspekty jsou poněkud zvláštní, jelikož lidé běžně konzumují řadu produktů souvisejících se včelou medonosnou (*Apis mellifera*), kterými jsou med, propolis, mateří kašička nebo včelí vosk. Také se konzumují potraviny s aditivy, jakými jsou barvivo E120-karmín nebo lešticí látka E904-šelak. Karmín je získáván z těl samice červce nopálového (*Dactylopius coccus*). Šelak je polyesterová pryskyřice získaná z červce lakového (*Kerria lacca*) a je využíván pro ochranu barev, získání lesklého vzhledu nebo prodloužení trvanlivosti potravin (Bednářová et al. 2015; Dion-Poulin et al. 2021; Orodoñez-Araque & Egas-Montenegro; van Huis 2013).

Mezi světově známé pochutiny s hmyzem můžeme zařadit mj. sardinský kravský sýr Casu marzu. Ten je úmyslně infikován larvou mouchy sýrohločky drobné (*Piophilina casei*). Po dozrání se sýr konzumuje i s živými larvami. Evropská unie však z hygienických důvodů zakázala jeho výrobu. V současnosti se dostávají do popředí výrobky obohacené o hmyzí protein nebo hmyzí mouku, které jsou pak přidávány do pečiva či těstovin, aby se zvýšila jejich výživová hodnota. Dále se prodávají čokolády a lízátka s přídavkem hmyzu, hamburger či alkoholické nápoje (např. mexický Mexcal) (Arther 2015; van Huis 2013).

3.2 Hmyz jako potravina

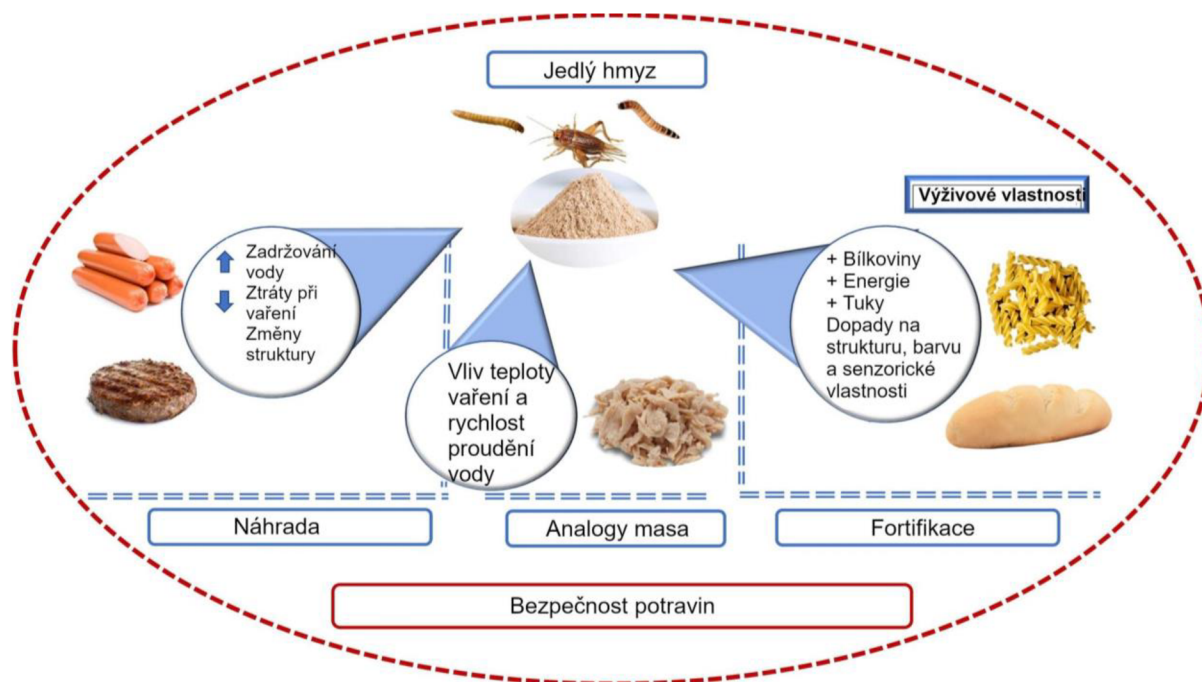
Konzumace hmyzu v posledních letech přitahuje celosvětovou pozornost. Předpokládá se, že hmyz bude hrát významnou roli při řešení nedostatku potravin. Organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů (FAO) předpověděla, že světová populace vzroste do roku 2050 na více než devět miliard, což bude mít za následek zvýšení produkce potravin o 100 %. K nasycení rostoucí populace bude zapotřebí značné zvýšení produkce, která bude představovat velkou zátěž pro přírodní zdroje a životní prostředí (Lange & Nakamura 2021; Kouřimská & Adámková 2016). Dá se například očekávat odlesňování půd, zvyšování produkce skleníkových plynů či kontaminace a nedostatek vody (van Huis 2015).

Vzhledem k této skutečnosti se hmyz nabízí jako nejvhodnější řešení, kdy konvenční zdroje bílkovin mohou být nedostatečné. Hmyz má oproti hospodářským zvířatům vysokou

schopnost přeměny krmiva na biologickou hmotu. Například bylo zjištěno, že cvrčci vyžadují méně než 2 kg krmiva na 1 kg přírůstkem biomasy. Naproti tomu množství krmiva potřebné pro zvýšení tělesné hmotnosti u hospodářských zvířat o 1 kg je 2,5 kg u kuřat, 5 kg u vepřů a až 10 kg u skotu. Míra konverze živin u cvrčka je tedy přibližně dvakrát vyšší než u kuřat a 4 až 22krát vyšší než u prasat a skotu. Proto je výhodou hmyzu menší kontaminace životního prostředí ve srovnání s chovem dobytka. Hmyz produkuje relativně málo skleníkových plynů, čpavku a pro jeho chov je zapotřebí méně půdy a vody (Lange & Nakamura 2021). Entomofagie může také přispět ke snížení aplikace pesticidů (Kouřimská & Adámková 2016).

Jak je již uvedeno výše, se zařazením hmyzu do běžného jídelníčku jsou stále problémy. Přijetí jedlého hmyzu a hmyzích produktů spotřebiteli zůstává nízké, a proto je snaha o popularizaci a postupné navýšení jeho konzumace. Nejčastěji se jedná o výše zmíněné obohacování potravin pomocí hmyzích prášků do známých a tradičních potravin. Tato varianta se ukázala být pro spotřebitele nejvíce přijatelná. S rostoucím počtem studií a začleňování hmyzu do potravin došlo k rozvoji dvou technologických směrů. První směr je zaměřen na fortifikaci potravin, kdy je hmyz přidáván pro zvýšení nutriční hodnoty například do těstovin nebo chleba. Druhý, poměrně nový, směr se věnuje inovaci potravin, kde je snaha o redukci či náhradu tradiční složky (Borges et al. 2022).

Ve studii Borges et al. (2022) se snažili o vytvoření analogu masa nebo o nahrazení podílu masa v masných výrobcích. Ukázalo se, že přídavek hmyzího proteinu snížil hmotnostní ztráty při tepelné úpravě, nicméně se snížila soudržnost masného výrobku a výsledný produkt je dvakrát dražší než běžný výrobek (Tousignant 2017). Obrázek 2 shrnuje vlastnosti potravin po přidavku hmyzu.



Obrázek 2: Technologické, senzorycké a nutriční účinky při obohacování potravin hmyzem (Borges et al. 2022)

Využití hmyzu se netýká pouze potravin. S předpokladem již zmíněného nárůstu populace je snaha o vytvoření alternativního krmiva pro hospodářská zvířata bohatého na bílkoviny, které nebude závislé na orné půdě. Hmyz by mohl nahradit sójový šrot nebo rybí moučku ve výživě prasat nebo přežvýkavců. Alternativní krmivo však může mít vliv na senzorycké vlastnosti masa (Borges et al. 2022; van Huis 2015).

3.2.1 Legislativa

Vzhledem k tomu, že zájem o konzumaci hmyzu stále narůstá a téma jeho konzumace začíná být stále více aktuální, začala se řešit otázka jeho legalizace na území Evropské unie (EU). Do 15. května 1997 byl hmyz považován za netradiční součást stravovacích návyků občanů v EU.

Z hlediska potravinového práva je hmyz považován za potravinu nového typu. Za ty označujeme potraviny nebo jejich složky, které nebyly zařazeny před datem 15. 5. 1997 v dostatečně velké míře do jídelníčku obyvatel EU. Společně s hmyzem lze považovat za potravinu nového typu například chia semínka nebo potraviny na bázi řas (Ministerstvo zemědělství 2018; EFSA 2021).

Zlom nastal 1. ledna 2018, kdy vešlo v platnost nařízení Evropského parlamentu a Rady Evropské unie 2015/2283 o nových potravinách, které jasně definuje hmyz a výrobky z něj jako novou potravinu. Veškeré druhy hmyzu musí před uvedením na trh projít schvalovacím procesem EU podle nařízení 2015/2883.

Konkrétní druhy hmyzu mohou být uvedeny do prodeje pouze za podmínky, že se jedná o druh hmyzu, který byl na základě předpisů v členských zemích uveden do prodeje před datem 1. ledna 2018, a pokud bude pro daný druh hmyzu podána žádost o povolení jako nové potraviny. Nejpozději tak muselo být učiněno 1. ledna 2019. Pokud byly tyto dva požadavky splněny, mohl se konkrétní druh hmyzu uvádět na trh do doby přijetí rozhodnutí o žádosti, nejpozději do 2. ledna 2020 (Ministerstvo zemědělství 2018).

Na evropskou legislativu reaguje novela veterinárního zákona (č. 368/2019 Sb.), která nabyla účinnosti 15. ledna 2020. Stanovuje pravidla pro chov hmyzu, jeho zpracování a uvádění na trh produktů z hmyzu určeného k lidské spotřebě. Hmyz je vnímán jako hospodářské zvíře a vztahují se na něj podmínky pro chov jako pro jiná hospodářská zvířata. Chovatelé hmyzu určeného k výrobě potravin pro konzumaci lidmi i sloužícího jako krmivo pro zvířata budou pod veterinárním dozorem a budou muset splňovat některé zákonné požadavky. Podnik, který zpracovává nebo uvádí na trh produkty z hmyzu určeného k lidské spotřebě, musí požádat krajskou veterinární správu o schválení a registraci podniku, nebo o registraci podniku, pokud vyrábí produkty z hmyzu, který pochází výhradně z vlastního chovu, a prodává produkty z tohoto hmyzu pouze konečnému spotřebiteli (KHSHK).

V průběhu roku 2021 vydal Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) první stanoviska k potravinám nového typu. Mezi prvními povolenými druhy hmyzu byl sušený moučný červ (*Tenebrio molitor*), po něm následoval cvrček domácí (*Acheta domestica*) v sušené, práškové nebo mleté formě a saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*) v sušené a zmražené formě (IPIFF 2021).

Standardy, které zajistila EFSA a jsou řízeny v zemích EU legislativou, není ve světě samozřejmostí. Rozdíly v bezpečnosti mezi hmyzem chovaným a sbíraným v přírodě jsou velké (Murefu et al. 2019). Dále existují názory, že by měly být zavedeny ISO normy (normy Mezinárodní organizace pro normalizaci) a/nebo HACCP (Systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů), které by upravovaly podmínky chovu jedlého hmyzu. Tento sektor by měl také spadat pod hygienický a veterinární dohled. Tímto by měla být zajištěna

bezpečnost konzumace hmyzu a zabránění vzniku alimentárních onemocnění oportunitními patogeny (Doi et al. 2021).

3.2.2 Nutriční hodnoty

Jedlý hmyz je vysoce výživný. Má vysoký obsah tuků, bílkovin, vitamínů, vlákniny a minerálních látek, přesto je v dnešní době velice podceňovaným zdrojem potravy. Konzumace 100 g housenek například pokryje 76 % doporučeného denního příjmu bílkovin. Nicméně složení živin jedlého hmyzu obecně podléhá značným změnám na základě rozdílů v druzích, vývojových stádiích, krmivu, původu a metodách úpravy (Borges et al. 2022; Jantzen Da Silva et al. 2020). Velké rozdíly ve složení jsou zejména u hmyzu s proměnnou dokonalou, např. brouci, mravenci nebo včely. V Tabulce 1 je zobrazen přehled obsahu živin mezi jednotlivými druhy hmyzu a běžnými potravinami. Jednotlivé nutrienty obsažené v hmyzu jsou blíže popsány níže.

Tabulka 1: Přehled obsahu živin u různého hmyzu a běžných potravin na 100 g (Ramos & Elorduy 1998)

Skupina	Kalorie [kcal/100 g]	Bílkoviny [g/100 g]	Tuky [g/100 g]	Sacharidy [g/100 g]	Vápník [mg/100 g]	Fosfor [mg/100 g]	Železo [mg/100 g]	Tiamin [mg/100 g]	Niacin [mg/100 g]
Chroust	77,8	13,4	1,4	2,9	22,6	207,0	6,0	0,29	3,99
Cvrček	112,9	12,8	5,7	2,6	88,2	163,4	14,4	0,26	2,31
Potápník	149,1	21,0	7,1	0,3	36,7	204,8	6,4	0,31	6,85
Vejce	150,0	12,0	10,0	2,0	50,0	7,0	1,4	0,06	-
Fazole	147,0	8,3	0,6	27,2	47,8	164,4	3,0	0,18	0,39
Hovězí	288,2	23,5	21,2	-	10,6	169,4	2,5	0,04	4,40

3.2.2.1 Sacharidy

Sacharidy jsou pro lidský organismus hlavním zdrojem energie a jsou součástí dalších látek (nukleonové kyseliny, lipidy, ATP apod.). Nejčastěji je nalezneme ve formě škrobu, který slouží jako zásobárna energie. V jedlém hmyzu jsou sacharidy zastoupeny pomálu (Lange & Nakamura 2021). Celkově se obsah sacharidů v jedlém hmyzu pohybuje v rozmezí 6,71 až

15,98 %. Nejvíce zastoupen je polysacharid chitin v množství 5 až 20 % v sušině. Chitin je polysacharid složený z molekul N-acetyl-D-glukosaminu, které jsou spojeny 1,4- β -glykosidickou vazbou. Je hlavní součástí kutikuly členovců a tvoří exoskelet hmyzu (Govorushko 2019; Numata & Kaplan 2011). Chitin je považován za nestravitelnou vlákninu, ačkoliv se v lidském těle nachází enzym chitináza, který ho štěpí. Bylo však zjištěno, že tento enzym může být neaktivní. Nejvyšší aktivita tohoto enzymu je pozorována v tropických oblastech, kde jídelníček místních obyvatel tvoří často členovci. Chitinu a jeho derivátu chitosanu je přisuzován pozitivní účinek na funkci střev a imunitu organismu. Je důležité zmínit, že chitin je častý alergen. O této problematice pojednává kapitola Alergeny v této práci (Kouřimská & Adámková 2016).

3.2.2.2 Tuk

Obsah tuku, stejně jako ostatních nutrientů, je, jak již bylo zmíněno, závislý na druhu, stravě i vývojovém stádiu hmyzu. Celkový obsah tuku se pohybuje v rozmezí od 2 do 62 %. Nejvíce lipidů je obsaženo v larválním stádiu. Profil mastných kyselin je obecně podobný živočišným tukům i rostlinným olejům. Triacylglycerol tvoří cca 80 % tuku. Druhou nejvýznamnější skupinou jsou fosfolipidy, které jsou zodpovědné za budování buněčných membrán. Obsah fosfolipidů v surovém tuku je obecně méně než 20 % (Aguilar 2021; Belluco et al. 2013; Govorushko 2019; Jantzen Da Silva et al. 2020; Kouřimská & Adámková 2016; Lange & Nakamura 2021; Nowakowski et al. 2021).

Hmyz obsahuje vysoké množství nenasycených mastných kyselin C18, které představují až 75 % z celkového obsahu mastných kyselin. Jedná se o mastné kyseliny, které si člověk není schopný syntetizovat sám a jsou nezbytné pro funkci mozku, přenos nervových vzruchů a syntézu buněčných membrán. Dělí se na omega-3 a omega-6 nenasycené mastné kyseliny, jedná se o tak zvané polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). Mezi omega-3 nenasycené mastné kyseliny se řadí například kyselina α -linolenová, do skupiny omega-6 nenasycených mastných kyselin patří kyselina γ -linolenová, kyselina linolová, kyselina arachidonová či konjugované linolenové kyseliny (Aguilar 2021; Belluco et al. 2013; Govorushko 2019; Jantzen Da Silva et al. 2020; Kouřimská & Adámková 2016; Lange & Nakamura 2021; Nowakowski et al. 2021).

Jedlý hmyz však neobsahuje kyselinu eikosapentaenovou (EPA) ani kyselinu dokosaheptaenovou (DHA), které se obvykle vyskytují v rybách. Hmyz obsahuje více PUFA než

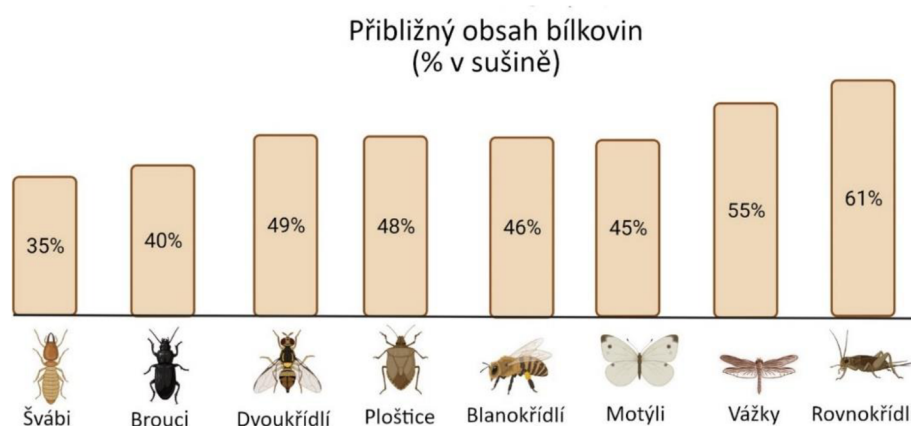
nasycených mastných kyselin, což naznačuje, že hmyz má pravděpodobně nižší obsah cholesterolu. Tento obsah je nejvíce ovlivněn potravou, kterou se hmyz živí (Aguilar 2021; Belluco et al. 2013; Govorushko 2019; Jantzen Da Silva et al. 2020; Kouřimská & Adámková 2016; Lange & Nakamura 2021; Nowakowski et al. 2021).

3.2.2.3 Bílkoviny

Hmyz je prezentován jako jeden z nejslibnějších zdrojů bílkovin při řešení globální produkce bílkovinných zdrojů v době jejich nedostatku. To potvrdila Bednářová (2013) ve své disertační práci, kde zkoumala sedm druhů hmyzu a zjistila, že celkový obsah bílkovin byl u všech druhů relativně stejný, kromě zavíječe voskového (*Galleria mellonella*). Obsah bílkovin se u většiny pohyboval okolo 50,7 %, u zavíječe pouze 38,4 % a naopak největší hodnoty dosáhla saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*), a to až 62,2 %.

Další provedené studie zkoumaly obsah bílkovin u 100 druhů hmyzu. Obsah bílkovin se pohyboval v rozmezí 13 až 77 % v sušině. Na Obrázku 3 je přehled přibližného obsahu bílkovin u osmi nejběžnějších druhů hmyzu. Hmyz obsahuje 20 proteinogenních aminokyselin, ale existují druhy hmyzu, kde se vyskytuje lysin a tryptofan jen v nízké koncentraci. Esenciální aminokyseliny pak představují 46 až 96 % z celkového množství aminokyselin (Belluco et al. 2013; Kouřimská & Adámková 2016).

Hmyzí bílkoviny vykazují i velmi dobrou stravitelnost, která se pohybuje mezi 76 a 96 %. Tyto hodnoty jsou nepatrně menší oproti třeba stravitelnosti vaječného bílku (95 %) nebo hovězího masa (98 %) (Kouřimská & Adámková 2016). Stravitelnost je také ovlivněna chitinem, který působí antinutričně (Belluco et al. 2013).



Obrázek 3: Přehled přibližného obsahu bílkovin u osmi nejběžnějších druhů hmyzu (Liceaga 2022)

Ačkoliv se zdá, že hmyz je dobrý a bohatý zdroj bílkovin, existují úskalí ve zjišťování obsahu bílkovinného dusíku. Odhady obsahu bílkovin v jedlém hmyzu lze získat Kjeldahlovou metodou pomocí konverzního faktoru dusíku (N) na bílkoviny (6,25). Nedávno však Jonas-Levi & Martinez (2017) upozornili na to, že tento faktor nemusí být pro hmyz vhodný a vede k nadhodnocování bílkovin, protože exoskelet hmyzu obsahuje velké množství chitinových vláken, které jsou bohaté na polysacharidy a dusík, a navíc v exoskeletu hmyzu jsou proteiny pevně zabudované do své matrice. Všechny tyto složky jsou nestravitelné jak pro člověka, tak i pro domestikovaná zvířata (Jantzen Da Silva et al. 2020).

3.2.2.4 Vitamíny

Hmyz obsahuje celou řadu vitamínů hydrofilních (např. B nebo C) a/nebo lipofilních (např. A, D, E, K). Obsah jednotlivých vitamínů se odvíjí, stejně jako u ostatních nutrientů, od druhu, vývojového stádia, výživy hmyzu apod. Stejně jako je tomu u ovoce a zeleniny, i u hmyzu dochází ke snížení obsahu vitamínů během kulinářského zpracování (Kinyuru et al. 2010). Všeobecně jsou stále omezené informace o obsahu vitamínů v jedlém hmyzu (Lange & Nakamura 2021).

Například vitamín B12 je hojně zastoupen v larvách potměníka moučného (*Tenebrio molitor*) (0,47 µg na 100 g) a v cvrčku domácím (*Acheta domestica*) (5,4 µg na 100 g u dospělců, 8,7 µg na 100 g u nymf). Cvrček obsahuje až desetkrát více vitamínu B12 než hovězí maso. Také je bohatý na další vitamíny B, jako je thiamin (B1), riboflavin (B2) a kyselina listová (B9) (Kinyuru et al. 2010; Kouřimská & Adámková 2016).

Vitamín E byl nalezen v larvách nosatce rudého (*Rhynchophorus ferrugineus*), který měl v průměru 35 mg α-tokoferolu a 9 mg tokoferolů β+γ na 100 g sušiny. Jako dobrý zdroj retinolu (vit. A), kalciferolu (vit. D) a tokoferolu (vit. E) by mohl sloužit tzv. escamol. Jedná se o „mexický kaviár“, který je tvořen larvami a kuklami mravenců druhu *Liometopum apiculatum* a *L. occidentale* var. *luctuosum*. Escamol obsahuje 505 µg na 100 g vitamínu A, 3,31 µg na 100 g vitamínu D a 2,22 µg na 100 g vitamínu E. Obecně je hmyz bohatý na vitamín B2, kyselinu pantothenovou (vit. B5) a biotin (vit. H), a chudý na vitamín A, C a niacin (vit. B3) (Kouřimská & Adámková 2016).

3.2.2.5 Minerální látky

Z nutričního hlediska obsahu minerálních látek je jedlý hmyz zajímavou komoditou. Minerální složení hmyzu výrazně záleží na jeho výživě (Govorushko 2019). Obsahuje železo, zinek, draslík, sodík, vápník, fosfor, hořčík, mangan, měď a selen (Jantzen Da Silva 2020; Kouřimská & Adámková 2016).

Hmyz obsahuje více železa a vápníku než hovězí, vepřové nebo kuřecí maso, a to ve snadněji stravitelné formě. Vysoký obsah železa je obsažen například v housence můry *Gonimbrasia belina* (31-77 mg na 100 g sušiny), sarančeti stěhovavém (*L. migratoria*) (8-20 mg na 100 g sušiny), cvrčku domácím (*Acheta domesticus*) (8,75 mg železa na 100 gramů sušiny) nebo termitech (Jantzen Da Silva 2020; Kouřimská & Adámková 2016; Nowakowski et al. 2021). Při přepočtu na cvrčka, má cvrček o 180 % vyšší obsah železa než například v hovězí maso (1,2-3 mg na 100 g) (Govorushko 2019; Nowakowski et al. 2021).

Další příklad pro představu udává, že 100 g housenek pokryje 335 % minimálního doporučeného denního příjmu železa. Zinek je obsažen nejvíce v housence můry *G. Belina* (14 mg na 100 g sušiny) (Jantzen Da Silva 2020; Kouřimská & Adámková 2016; Nowakowski et al. 2021), nebo ve cvrčkovi či v termitech. Poslední dva zmíněné druhy mají také vyšší obsah hořčíku, mědi a železa (Lange & Nakamura 2021).

3.2.3 Rizika konzumace

Ačkoliv má konzumace hmyzu řadu výhod, je potřeba se zabývat i možnými riziky spojenými s jeho konzumací. Stejně jako u běžných potravin živočišného nebo rostlinného původu, některé druhy hmyzu nejsou jedlé nebo je jejich konzumace nebezpečná (Finke et al. 2015). Stejně jako u běžných potravin existují u hmyzu rizika mikrobiální kontaminace, kontaminace těžkými kovy, výskyt alergenů nebo přítomnost parazitů (Finke et al. 2015; Rumpold & Schlüter 2013). Zmíněným rizikům se bude práce věnovat v jejich dalších částech.

Většinu rizik spojených s konzumací hmyzu lze eliminovat podmínkami chovu, krmivem, dobou sklizně, druhem a vývojovým stádiem. Mezi nejkvalitnější způsoby patří chování hmyzu v boxech, kde je kontrolovaná atmosféra, krmivo a voda. Další výhodou chování hmyzu je, že zde nejsou používány hormony, antibiotika ani jiné chemické látky. Avšak je-li sbírán hmyz ve volné přírodě, nelze tuto bezpečnost zaručit (Finke et al. 2015).

I přes všechna výše zmíněná nebezpečí neexistují dosud limity pro jednotlivá biologická a chemická rizika. Jedinou podmínkou uvádění na trh dle nařízení EU 2015/2283 je, že hmyz musí být bezpečný pro spotřebitele. EFSA vytvořila dokument, který shrnuje všechna bezpečnostní rizika pro spotřebitele (Finke et al. 2015). V současné době stále probíhají intenzivní výzkumy k vytvoření limitů pro veškerá rizika.

3.2.3.1 Alergeny

U členovců obecně je doposud registrováno 239 různých alergenů. Jedná se především o panalergenní proteiny, které dělíme na svalové proteiny (tropomyosin, myosin, aktin, troponin C), buněčné proteiny (tubulin), cirkulující proteiny (např. hemocyanin, defensin) a enzymy (triosefosfatizomeráza, α -amyláza, trypsin, fosfolipáza A, hyaluronidáza). Například panalergenní tropomyosin může vyvolat alergickou reakci na korýše, roztoče nebo hmyz (např. švába) (Schlüter et al. 2016).

Vůbec nejčastějším alergenem je chitin, který tvoří exoskelet hmyzu. Alergická reakce je častější u Středoevropanů díky historicky nízké konzumaci mořských plodů a nízké aktivitě chitinázy. Dnes je již však vyvinuta technologie, která vyselektuje chitin z hmyzí moučky (Pandely et al. 2017). V případě celého hmyzu nelze konzumaci tohoto alergenů zabránit.

3.2.3.2 Toxické látky

Látky, které působí na lidský organismus nepříznivě a vyvolávají nežádoucí účinky jakékoli povahy, se nazývají toxické. I v poměrně malém množství mohou způsobit poškození nebo onemocnění organismu a mohou být i příčinou smrti (Velíšek 2014). Prvním typem toxických látek, které se v jedlém hmyzu mohou vyskytovat, jsou sloučeniny produkované přímo daným hmyzem. Takové látky se označují jako endogenní a hmyz je využívá jako chemickou obranu proti predátorům. Mají dráždivé, reaktivní nebo toxické účinky a řadí se mezi ně karboxylové kyseliny, alkoholy, alkaloidy, aldehydy, ketony, estery, laktony, fenoly, uhlovodíky a steroidy (Van Der Spiegel 2013).

Druhou možností je, že se toxické látky dostanou do těla hmyzu potravou, kterou konzumují. Tyto látky se pak nazývají exogenní. Nejčastěji se tak stane u hmyzu, který je sbírán ve volné přírodě, příp. v chovech, kde je hmyz krměn kontaminovaným krmivem (Van Der Spiegel 2013). Hlavními kontaminanty z prostředí jsou těžké kovy či chemické sloučeniny,

kteře se uvolňují či vznikají v průmyslových oblastech. Mezi těžké kovy patří rtuť, olovo nebo kadmium. Tyto polutanty se vyskytují ve vodě nebo ovzduší, ale největší dopad mají na půdu, kde se kumulují a mohou tak být zdrojem kontaminace (Cibulka 1991). Ve studii Vijver et al. (2003) byla prokázána korelace obsahu těžkých kovů v hmyzu a jejich obsahem v půdě. To poukazuje na fakt, že těžké kovy nejsou zanedbatelným problémem. Existují již konkrétní případy, kdy jedlý hmyz přispěl k vysoké hladině těžkých kovů v krvi lidí nebo byl její příčinou (Baiano 2020, Handley et al. 2007). Nicméně, ohledně problematiky těžkých kovů v jedlém hmyzu existuje dosud málo informací (Ng'ang'a et al. 2021).

Dalším exogenním kontaminantem jsou agrochemikálie. Některé druhy hmyzu mohou obsahovat toxické látky ve vyšší koncentraci, než je pro spotřebu potravin přijatelné. Děje se tak díky lipofilní povaze některých pesticidů, která podporuje jejich kumulaci v těle (Labu et al. 2022; Van Der Spiegel 2013). Významným problémem je aplikace pesticidů jako jsou například organochlorové pesticidy, které jsou v mnoha zemích již zakázány kvůli perzistenci v životním prostředí a vysoké toxicitě. I přesto jsou však například v Africe aplikovány ilegálně. Některé pesticidy lze odstranit tepelnou úpravou hmyzu. Pesticid se z pokrmů buď vypaří nebo degraduje, ale ne všechny typy jsou termolabilní (Labu et al. 2022).

Jako u běžných potravin, i u hmyzu může dojít ke vzniku toxických látek během zpracování jako důsledek nežádoucích reakcí. Při tepelné úpravě hmyzu mohou vznikat aromatické aminy, akrylamid nebo furany (Van Der Spiegel 2013).

V neposlední řadě byly v hmyzu objeveny i rezidua léčiv. Příkladem může být kyselina acetylsalicylová nebo paracetamol. Do hmyzu se nejspíše dostaly skrz kontaminované krmivo či vodu. Žádná z nalezených hodnot nepřekračovala limit, ale data o bezpečnosti jsou zatím velmi omezená (De Paepe et al. 2019).

Specifický případem je hmyz, který v sobě kumuluje toxiny z potravy a ty mu pak slouží jako obrana před predátory. Příkladem je můra rodu *Asota*, která konzumuje různé druhy fíkusu, jež obsahují vysoký obsah alkaloidů. Ty pak ukládá do svých tkání (Volf et al. 2017).

V hmyzu se mohou vyskytovat také toxiny produkované mikroorganismy. Významnou skupinou jsou mykotoxiny. Mykotoxiny jsou sekundární metabolity plísní a jsou považovány za nejvýznamnější kontaminanty potravin vzhledem ke svým toxickým a karcinogenním účinkům (Evans & Shao 2022; Imathiu 2020). Mykotoxiny se do hmyzu dostávají buď v krmivu, kontaminací v důsledku špatného skladování hmyzu nebo při jeho zpracování, kde vlivem

nehygienických podmínek (např. sušení venku na slunci) dochází k produkci metabolitů. Mykotoxiny jsou nejčastější kontaminací v rozvojových zemích (Imathiu 2020).

Další mikrobiální toxiny jsou bakteriálního původu. Produkovány jsou například rody *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Clostridium* nebo *Bacillus* (Imathiu 2020). Blíže se bude dané problematice věnovat tato práce v následující kapitole.

3.2.3.3 Mikrobiologická rizika

Jedlý hmyz je potravinou živočišného původu a je obvykle konzumován celý, včetně trávicího traktu, což znamená, že může obsahovat biologické činitele s nebezpečným potenciálem (např. bakterie, parazity, viry, priony, kvasinky či plísňe). Dále se mikroorganismy (MO) vyskytují na kutikule, vnější kostře hmyzu, nebo v jeho ústech (Osimani et al. 2018; Schlüter et al. 2016). Z tohoto důvodu by se mělo zabránit konzumaci syrového hmyzu a před konzumací by se měl vyláchnit a tepelně opracovat – nejlépe sterilací, pasterací nebo blanšírováním v horké vodě, aby se snížila jeho mikrobiologická zátěž (Caparros Megido et al. 2017). Z dostupných výzkumu se prozatím zdá, že MO specifické pro hmyz nepředstavují hrozbu pro člověka a nepodílí se ve významné míře na přenosu zoonóz (Doi et al. 2021; Murefu et al. 2019). Vzhledem k tomu, že mikrobiota hmyzu a s ní souvisejí možná rizika alimentárních otrav ještě nebyla zcela prostudována, probíhá intenzivní výzkum, který se touto problematikou zabývá.

Mikrobiota jedlého hmyzu

Mikrobiota hmyzu je společenství veškerých mikroorganismů, které ho osidlují. Zahrnuje bakterie, houby, kvasinky, viry, archea či řasy nacházející se na různých místech organismu s největší koncentrací ve střevech. Mikrobiota má vlastní metabolickou aktivitu s rozsáhlou enzymatickou aktivitou a může produkovat některé metabolity prospěšné pro hostitelský organismus. Podílí se také na funkci imunitního systému a brání hmyz před kolonizací cizími skupinami mikroorganismů (Zheng et al. 2020; Lawley & Walker 2012).

Mikrobiota členovců se skládá ze společenství bakterií specifických pro druh a souboru dalších MO schopných reagovat na změny během života živočicha (Grabowski & Klein 2017). Mikrobiota hmyzu se podílí na trávení stravy a produkci živin, ale oproti savčím střevům je mikrobiální rozmanitost chudá a odlišná (Engel & Moran 2013; Milanović et al. 2016). Větší rozmanitost střevní mikrobioty byla pozorována u všežravého hmyzu, než u toho býložravého

nebo masožravého (Grabowski & Klein 2017). Existují i druhy hmyzu, které se živí rostlinnou šťávou a mají vzácnou nebo prakticky žádnou střevní mikrobiotu, ale místo toho obsahují intracelulární symbioty. O střevní mikrobiotě hmyzu je však zatím známo jen málo a nelze s jistotou říci, které MO a v jakém množství se v něm přesně vyskytují. (Grabowski & Klein 2017; Engel & Moran 2013; Milanović et al. 2016).

Nejnovější studie se zaměřují zejména na hodnocení rizika výskytu genů antibiotické rezistence a mikroorganismů rezistentních na antibiotika a na výskyt patogenních MO (Garofalo et al. 2019; Milanović et al. 2016).

Níže jsou uvedeny bližší informace o jednotlivých skupinách MO, doposud popsaných v odborné literatuře.

3.2.3.4 Potenciální indikátory bezpečnosti hmyzu

Mikroorganismy hrají důležitou roli v potravinách a jinak tomu není ani u jedlého hmyzu. Významné jsou z hlediska hygieny a bezpečnosti s výjimkou odvětví, kde jsou MO aplikovány záměrně a účastní se výroby potravin. Nejčastěji jsou pro výrobu využívány v průmyslu kvasném nebo mlékárenském (Lorenzo et al. 2018). Potravinové patogeny jsou důležitým parametrem bezpečnosti potravin, zatímco mezofilní aeroby, koliformní bakterie a bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* jsou indikátory hygieny (Garofalo et al. 2019). Indikátorové mikroorganismy jsou organismy, které byly vytipovány zejména kvůli jejich termolabilnosti (indikátor spolehlivosti pasterizace a termizace), dobrému růstu (indikátor sekundární kontaminace) a chemolabilnosti (indikátor sanitace a dekontaminace) (VVP:MIKRO 2003). Pro potravinářské provozy jsou počty indikátorových mikroorganismů odrazem úrovně hygieny a sanitace v provozech a ukazují na možnou fekální kontaminaci, nebo mohou naznačovat sekundární kontaminaci, nedostatky v technologii výroby potravin či počínající kažení (Lorenzo et al. 2018).

Patogenní MO mohou způsobovat zoonózy, což jsou infekce přenosné mezi zvířaty a lidmi, a být původci alimentární onemocnění z potravin. Jedním z těchto onemocnění je alimentární infekce, ke které dochází požitím patogenního mikroorganismu, jeho pomnožením ve střevu hostitele a produkcí toxinu. Druhým typem onemocnění je alimentární intoxikace, která je důsledkem konzumace potraviny, ve které již je toxin vyprodukovaný. K intoxikaci tedy může dojít i po usmrcení patogenního mikroorganismu. Z potenciálně patogenních mikroorganismů nebezpečných pro člověka byly u hmyzu zjištěny následující:

Escheria coli, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., *Listeria monocytogenes*, *Citrobacter* sp., *Yersinia* sp. nebo *Campylobacter* sp. (Murefu et al. 2019; Osimani et al. 2018; Lorenzo et al. 2018).

Tabulka 2: Mikroorganismy vyskytující se u jedlého hmyzu, mající rizikový potenciál pro konzumenta (Aleknavičius et al. 2022; Vandeweyer et al. 2021; Vandeweyer et al. 2018; Gałęcki et al., 2023; Garofalo et al. 2019; Grabowski & Klein 2017; Kumar et al. 2017)

Druh hmyzu	Potencionální potravinové patogeny
bourec morušový (<i>Bombix mori</i>)	skupina <i>Bacillus cereus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Listeria</i>
cvrček domácí (<i>Acheta domestica</i>)	skupina <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Listeria</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Enterobacter</i>
cvrček krátkokřídlý (<i>Gryllus sigillatus</i>)	<i>Erwinia oleae</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i>
cvrček stepní (<i>Gryllus assimilis</i>)	<i>Enterococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i>
mopanový červ (<i>Imbrasia belina</i>)	<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i>
saranče stěhovavá (<i>Locusta migratoria</i>)	Koliformní bakterie, <i>Serratia</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Serratia</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Microsporidia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Cladosporium</i>
moučný červ (<i>Tenebrio molitor</i>)	Skupina <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Cronobacter</i> , <i>Escheria coli</i> , <i>Listeria</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Serratia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Candida</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>E. coli</i> , <i>Cladosporium</i>

3.2.4 Bakterie

Bakterie jsou prokaryotické jednobuněčné mikroorganismy. V největších počtech jsou obsaženy ve střevech, kde je vyšší obsah živin. Přítomné jsou ale i na povrchu a v dalších částech trávicí soustavy (Osimani et al. 2018; Schlüter et al. 2016; Šilhánková 1995). Ve studii Grabowski & Klein (2017) bylo zjištěno, že hlavní taxony střevní mikrobioty jsou kmeny Proteobacteria a Firmicutes. Větší rozmanitost střevní mikrobioty pak byla pozorována u všežravého hmyzu oproti býložravému nebo masožravému (Grabowski & Klein 2017). Hlavní zastoupení Proteobacteria a Firmicutes bylo potvrzeno i ve studii Ssepuyua et al. (2019). Tyto

studie využily klasické plotnové kultivační metody, dle již zavedených metod pro kontrolu jiných živočišných produktů. Ve studii Ssepuuya et al. (2019) byla navíc aplikována sekvenace 16S rDNA. Detekovány byly i kmeny následujících bakterií (v pořadí dle počtu zastoupení): Actinobacteria, Bacteroidetes a Fusobacteria. Z hlediska rodového složení byly u jedlého hmyzu nalezeny bakterie: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* a *Acinetobacter*. Dále pak bakterie rodů *Serratia*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Vibrio*, *Erwinia*, *Hespellia*, *Ruminococcus*, *Lysobacter*, *Hydrogenophilus* a sporulující bakterie rodů *Anaerobacillus*, *Psychrobacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Geobacillum*, *Akkermansia* a *Coprococcus* (Borremans et al. 2018; Grabowski & Klein 2017; Milanović et al. 2020; Nyangena et al. 2020; Osimani et al. 2018; Osimani & Aquilanti 2021). Komezální střevní bakterie hmyzu napomáhají hostiteli štěpit přijatou potravu a produkovat látky pro regulaci střevního mikrobiomu. Například *Bacillus* spp. ve střevě hmyzu rozkládají lignocelulózový materiál (Lee et al. 2021). Aleknavičius et al. (2022) izolovali ze dvou druhů cvrčka rody *Lactococcus*, *Akkermansia*, *Coprococcus*, *Parabacteroides* a *Bacteriodes*. Rod *Lactococcus* je probiotickou bakterií se schopností produkce kyseliny mléčné pomocí fermentace polysacharidů, čímž pomáhá hostiteli trávit. Rody *Akkermansia* a *Coprococcus* jsou známé tím, že regulují střevní mikrobiotu. Rod *Coprococcus* navíc produkuje kyselinu máselnou, která je důležitá pro udržení střevní homeostázy a posiluje imunitu organismu (Peng 2014). Dalším nalezeným zástupcem je *Paludibacter*, který fermentuje polysacharidy za vzniku acetátu a propionátu. Byl nalezen také rod *Trabulsiella*, který má vysokou enzymatickou aktivitu a pomáhá trávit rostlinou biomasu. Poslední nalezenou bakterií je dosud validně nepopsaný druh z rodu „*Candidatus Azobacterioides*“. Jedná se o symbiotickou střevní bakterii, která fixuje dusík a rozkládá celulózu. Nachází se pouze u hmyzu, zejména u termitů (Lee et al. 2021).

Z dostupných studií využívající plotnové metody je hlášen celkový počet bakterií 10^5 - 10^7 kolonií tvořící jednotku na gram (dále jen KTJ/g) (Grabowski & Klein 2017; van Huis 2013). Takto vysokou hodnotu kontaminace lze vysvětlit přítomností MO ve střevech hmyzu, a to i přes fakt, že hmyz byl vylučněn (Caparros Megido et al. 2017).

Potenciálně patogenní bakterie

Bacillus

Rod *Bacillus* patří do kmene Firmicutes, čeledi *Bacillaceae*. Jedná se rod všudypřítomných, rovných grampozitivních aerobních nebo fakultativně aerobních, mezofilních sporulujících tyčinkovitých bakterií (Bergey's 2009). Pro tento rod je typická tepelná rezistence jejich spor, které mohou přežívat v tepelně opracovaných potravinách a způsobují tak následně vady nebo kažení výrobků díky jejich proteolytické, lipolytické a sacharolytické aktivitě (Šviráková a spol. 2014).

Rod *Bacillus* není považován za přímo nebezpečný pro konzumenta, některé druhy (např. *Bacillus coagulans*) jsou dokonce využívány jako probiotika (Dodd et al. 2017; Osimani & Aquilanti 2021; Osimani et al. 2018). Existují však druhy, které produkují toxiny způsobující gastrointestinální onemocnění (Osimani & Aquilanti 2021). Jedná se převážně o některé druhy a kmeny *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus licheniformis* (Šviráková a spol. 2014, Delbrassinne & Mahillon 2016).

Jedním z alimentárních onemocnění je emetický syndrom. Ten je způsoben termostabilním toxinem cereulidem, produkovaným v matrici potraviny druhem *B. cereus*. Toto onemocnění se projevuje zvracením a ve vážných případech může způsobit selhání jater. Druhým je průjmové onemocnění, které může způsobeno enterotoxiny, jež jsou produkovány přímo ve střevě (Osimani & Aquilanti 2021). Velmi vážná jsou onemocnění způsobená *Bacillus anthracis*, která prvotně postihuje zvířata, ale může být smrtelná i pro lidi. Tato bakterie způsobuje nemoc zvanou antrax, která může mít kožní, plicní, gastrointestinální, orálně-glandulární nebo cerebrální formu. U všech forem, kromě kožní, je smrtnost více než 80 %. Antrax může být použit jako zbraň v bioterorismu (Lukáš 2001).

Rod *Bacillus* ve vztahu k hmyzu hraje významnou roli. Jmenovitě druh *Bacillus subtilis* s vysokou proteolytickou aktivitou byl nalezen ve střevě černopásky bavlníkové (*Helicoverpa armigera*). Tento druh zřejmě pomáhá trávit bílkovinná krmiva a nepředstavuje hrozbu pro hostitele (Shinde et al. 2012).

Clostridium

Rod *Clostridium* patří do kmene Firmicutes, čeledi *Clostridiaceae*. Jedná se rod rovných, grampozitivních, obligátně anaerobních, mezofilních sporulujících tyčinkovitých

bakterií. (Bergey's 2009). Charakteristickou vlastností pro tento rod je tvorba spor, které jsou rezistentní vůči nepříznivým podmínkám. Rod *Clostridium* disponuje proteolytickou a sacharolytickou aktivitou.

Z rodu *Clostridium* způsobují obavy patogenní druhy jako *Clostridium botulinum*, *Clostridioides difficile* a *Clostridium perfringens*. *Cl. botulinum* produkuje botulotoxin, který je silným neurotoxinem a v případě intoxikace je nutné podat protisérum – v opačném případě nastává smrt v důsledku obrny dýchacích svalů a bránice (Bergey's 2009; Milanoić et al. 2020). Byly dokonce zaznamenány případy botulismu a dalších onemocnění ve spojitosti s konzumací špatně skladovaného hmyzu v Africe (Caparros Megido et al. 2017). *Cl. perfringens* způsobuje nekrotické infekce a *Cl. difficile* produkuje enterotoxin, který vyvolává enterokolitidy (Polák a spol. 2014)

Spory *Cl. perfringens* byly nalezeny u tepelně opracovaných cvrčků, kobylek a moučných červů (Garofalo et al. 2019).

Campylobacter

Rod *Campylobacter* patří do kmene Proteobacteria, čeledi *Campylobacteraceae*. Bakterie rodu *Campylobacter* jsou gramnegativní, mikroaerofilní, termofilní tyčinky (Dodd et al. 2017). *Campylobacter jejuni* je jednou z hlavních příčin alimentárních onemocnění v EU a významným problémem pro bezpečnost potravin. Tyto bakterie způsobují průjemové onemocnění doprovázené horečkami, bolestmi hlavy a břicha (Belluco et al. 2013; Mondor et al. 2021; WHO 2021; WHO 2018). Výskyt u členovců je spojován s jejich kontaktem s farmou. Bakterie rodu *Campylobacter* spp. byly izolovány z larev a dospělců potemníka stájového (*Alphitobius diaperinus*), ale nepředpokládá se, že by potemník byl hlavním vektorem této bakterie, protože *Campylobacter* může přežít v těle hmyzu jen krátkou dobu. Za hlavní přenašeče je považována moucha domácí (*Musca domestica*) (Belluco et al. 2013).

Citrobacter

Bakterie z rodu *Citrobacter* patří do kmene Proteobacteria, čeledi *Enterobacteriaceae*. Rod *Citrobacter* patří do skupiny fakultativně anaerobních, mezofilních, gramnegativních bacilů. Tato bakterie se vyskytuje ve vodě, půdě, potravinách a v trávicím traktu zvířat a lidí. Způsobuje kažení ovoce, zeleniny a masa (Adegun et al. 2019). Jedná se o poměrně málo patogenní rod, ale u oslabených jedinců mohou tyto bakterie způsobit močové nebo respirační

infekce, u novorozenců meningitidy a sepse (Bektaş et al. 2020). *C. freundii* je navíc zodpovědný za epidemie gastroenteritidy a hemolyticko-uremický syndrom zejména v letních měsících (Guma et al. 2022). Tento rod byl nalezen ve střevě cvrčka domácího (*Acheta domesticus*) (Mudalungu et al. 2021).

Escherichia coli

Escherichia coli patří do kmene Proteobacteria, čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o gramnegativní, mezofilní, fakultativně anaerobní tyčinky (Batt & Patel 2014). *E. coli* je běžnou součástí střevní mikrobioty živočichů a kmen *E. coli* Nissle 1917 je využíván také jako probiotikum (Lukáš 2015).

E. coli patří mezi nejdůležitější a nejčastější patogeny přenášených potravinami. Mimo střevo svého hostitele je *E. coli* vždy patogenní, zatímco ve střevě jen tehdy, když obsahuje tzv. virulentní faktory (Goering et al. 2016). Produkce Shiga toxinu patří mezi hlavní faktory virulence. Tento toxin způsobuje průjemy, hemoragickou kolitidu a hemolyticko-uremický syndrom (Müller et al. 2021). *E. coli* se schopností virulence dělíme do 6 patotypů. Nejvýznamnější a nejznámější z nich je patotyp enterohemoragická *E. coli* (EHEC) (NHS24 2023). Přítomnost *E. coli* v potravinách ukazuje na chybné hygienické postupy ze strany prodejců či na chybné zpracování (Murefu et al. 2019).

Studie Müller et al. (2021) poukazuje na skutečnost, že *E. coli* pravděpodobně není běžnou součástí střevního mikrobiomu hmyzu (Murefu et al. 2019). Ve studii Müller et al. (2021) byly nalezeny izoláty *E. coli* v moučných čvech (*Tenebrio molitor*) a v sarančeti stěhovavém (*Locusta migratoria*). U cvrčka domácího (*Acheta domesticus*) v rámci této studie *E. coli* nalezena nebyla.

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes náleží do kmene Firmicutes, čeledi *Listeriaceae*, rodu *Listeria*. Jedná se o mezofilní grampozitivní fakultativně anaerobní tyčinky (Bergey's 2009). V rámci tohoto rodu se jedná o nejvýznamnější druh, který je patogenní pro lidi i zvířata (Schmid et al. 2005). *L. monocytogenes* způsobuje onemocnění zvané listerióza, které se v neinvazivní formě projevuje průjemy, horečkami a bolestmi svalů, tzv. myalgií. Nejvíce ohroženou skupinou jsou děti, těhotné ženy, důchodci a lidé s oslabeným imunitním systémem. V těžších invazivních formách tohoto onemocnění může dojít k septikémii, meningitidě nebo ke spontánnímu

potratu či úmrtí plodu. Listerióza patří k nejsmrtelnějším bakteriálním infekcím. Úmrtnost se uvádí 20 až 30 % a to navzdory včasné léčbě antibiotiky (Vázquez-Boland et al. 2001).

L. monocytogenes není běžně spojována s jedlým hmyzem. Studie Belleggia et al. (2020) a Mancini et al. (2019) však zjistily, že larvy moučného červa mohou být přenašečem tohoto patogenu, jsou-li krmeny kontaminovaným substrátem. *L. monocytogenes* neovlivňuje životaschopnost červů. Koncentrace *L. monocytogenes* se snížila, když se nechal hmyz vyláchnit a v kombinaci s tepelnou úpravou byl patogen zcela usmrcen (Belleggia et al. 2020; Mancini et al. 2019).

Proteus

Rod *Proteus* je bakterie patřící do kmene Proteobacteria, čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o rod gramnegativních, mezofilních, anaerobních bakterií ve tvaru tyčinek. Nachází se jako saprofyt ve vodě, půdě nebo v mrtvých a rozkládajících se organických látkách. Zároveň jsou tyto bakterie součástí střevní mikrobioty a při oslabení organismu můžou vyvolat infekci (Roy et al. 2008). Patogenní kmeny druhů *P. mirabilis* a *P. panneri* způsobují primární a sekundární infekce. Mezi primární infekce, které *Proteus* způsobuje v trávicím traktu, patří průjem. Při sekundárních infekcích dochází k zánětu močových cest nebo k hematogenní infekci. V potravinářství způsobuje kažení syrového masa, mořských plodů, ovoce, zeleniny a konzerv (Bergey's 2005). Obecně je *Proteus* spp. spojován s potravinami, které obsahují vysoký podíl bílkovin, kde snižují nutriční kvalitu kontaminované potraviny. Alimentární infekce způsobuje jen zřídka (Ogbalu & Williams 2015).

Ve studii Grabowski & Klein (2017) byl *Proteus* sp. nalezen spíše v podestýlce a v mrtvých jedincích sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*). U cvrčka byl *Proteus* sp. nalezen i u živých jedinců.

Pseudomonas

Pseudomonas spp. pochází z kmene Proteobacteria, čeledi *Enterobacteriaceae*, rodu *Pseudomonas*. Bakterie z tohoto rodu jsou gramnegativní, psychrotrofní, aerobní tyčinky. Jedná se o rod oportunitních patogenů, který způsobuje různá infekční onemocnění člověka. Patogenitu umožňuje seskupení genů virulence, které je obsaženo např. u druhů *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes* nebo *P. fluorescens* (Tuon et al. 2022). Jiné druhy způsobují také onemocnění rostlin a živočichů (Bergey's 2005). Tato bakterie se podílí na znehodnocování potravin, které kontaminuje. Kontaminuje potraviny s vysokou vlhkostí a produkuje

termostabilní proteázu a lipázu, které degradují obsažené živiny (Braide et al. 2011; Němečková a spol. 2012). Tento rod disponuje schopností růst i za nízkých teplot a v nestandardním prostředí (Němečková a spol. 2012).

Tento rod byl nalezen u živých larev moučných červů (*T. molitor*) (Grabowski & Klein 2017; Vandeweyer et al. 2017).

Salmonella

Salmonella spp. jsou gramnegativní, mezofilní, fakultativně anaerobní tyčinky patřící do kmene Proteobacteria, čeledi *Enterobacteriaceae* (Dodd et al. 2017). Rod *Salmonella* zahrnuje dva druhy *Salmonella enterica* a *Salmonella bongori*, které obsahují další poddruhy. *S. enterica* má v současnosti popsáno šest poddruhů (MacKenzie et al. 2017). *Salmonella* spp. se běžně nachází v zažívacím traktu ptáků, plazů, zvířat i člověka. Častým rezervoárem jsou vejce drůbeže. *Salmonella* spp. způsobují gastroenteritidy zvané salmonelóza. Většinou k nákaze dochází požitím kontaminované potravy, následně pronikají salmonely do tenkého střeva, kde se množí a produkují endotoxin. Toto onemocnění probíhá většinou bez komplikací, občas může být doprovázené horečkami, bolestmi hlavy a břicha. Druhým typem je tyfoidní onemocnění, které je spojováno např. se sérotypem *Salmonella enterica* spp. *enterica* Typhi. Tato forma onemocnění přechází ze střeva do dalších tělních orgánů (Beneš 2009). Nejvíce jsou ohroženi děti, důchodci a lidé s oslabenou imunitou. Bakterii lze bezpečně usmrtit varem (96 °C po dobu 5 minut), který předchází dalším úpravám (Belluco et al. 2013; Mondor et al. 2021; WHO 2021; WHO 2018).

Rod *Salmonella* je rozšířen spíše u much, které žijí blízko kontaminovaných dobytčích nebo drůbežích farem. Zdá se, že přenos dále probíhá mezi mouchami vzájemně (Belluco et al. 2013; Mondor et al. 2021).

Staphylococcus

Rod *Staphylococcus* jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní koky, patřící do kmene Firmicutes, čeledi *Staphylococcaceae* (Dodd et al. 2017). Bakterie rodu *Staphylococcus* nepředstavují pro hmyz zdravotní riziko, ale mohou jím být přenášeny na jiného hostitele. Klinicky nejvýznamnějším druhem je *S. aureus*, který se běžně vyskytuje na povrchu lidské kůže, sliznic, ale i ve vzduchu, prachu a vodě. Tento druh je průvodcem mnoha onemocnění, od kožních infekcí až po závažnější onemocnění jako je syndrom toxického šoku nebo

meningitida. Patogenita se vyznačuje především produkcí extracelulárních toxinů, které jsou termostabilní a vyskytují se v substrátu i po usmrcení bakteriální buňky. Do chovů hmyzu je tento rod bakterií zavlečen obvykle krmnými nebo chovnými substráty (Gorrens et al. 2021).

Serratia

Serratia náleží do kmene Proteobacteria, čeledi *Enterobacteriaceae*. *Serratia* je skupina gramnegativních, psychrotrofních, fakultativně anaerobních tyčinek. Tento rod se vyskytuje ve vodě či půdě a disponuje významnou proteolytickou aktivitou. Existují však domněnky, že by mohla být součástí lidské intestinální mikrobioty. U imunokompromitovaných osob způsobuje infekce (Md et al. 2019).

Rozvoj této bakterie u hmyzu je spojován se stresem během chovu (např. hladovění), načež stává se pro hmyz patogenní. Např. infikované larvy moučného červa lze snadno rozeznat díky jejich růžovočervenému zbarvení (Dupriez et al. 2022). Na Obrázku 4 lze vidět rozdíl mezi normální larvou moučného červa (*T. molitor*) a larvou infikovanou *S. marcescens*.

Ve studii Grabowski & Klein (2017) byl nalezen druh *S. liquefaciens* ve vzorcích švábů, sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*), housenky zavíječe voskového (*Galleria mellonella*), housenky *Chilecomadia moorei*, červa zlatohlávka konžského (*Pachnoda marginata*), červa potemníka brazilského (*Zophobas atratus*) a u larev trubců včely medonosné (*Apis mellifera*). Dupriez et al. (2022) navrhli, aby *Serratia marcescens* byla používána jako indikátor hygienických problémů v chovu moučných červů (*T. molitor*).



Obrázek 4: Rozdíl mezi normální larvou moučného červa (*T. molitor*) a larvou infikovanou *S. marcescens* (Dupriez et al. 2022).

Yersinia

Rod *Yersinia* náleží do kmene Proteobacteria, čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o gramnegativní, fakultativně anaerobní, psychrotrofní tyčinky (Azíz & Yelamanchili 2022). Běžně se vyskytují v půdě a v povrchových vodách. Hlavním rezervoárem jsou volně žijící hospodářská zvířata, jež jsou napadána infikovanými členovci (Marshall et al. 2016; Ministerstvo zemědělství 2022). *Yersinie* zapříčinila několik morových epidemií, bakterie byly zejména přenášeny blechami (Duan et al. 2014). Nejčastěji jsou *Yersinia* spojovány s kontaminací syrového masa, ale také se vyskytují v mléce, zmrzlině nebo v zelenině, kde přežívají a množí se i při chladírenských teplotách (Marshall et al. 2016). Nejvýznamnějšími druhy jsou *Y. enterocolitica* a *Y. pestis* (Duan et al. 2014). Druh *Y. enterocolitica* způsobuje alimentární onemocnění zvané yersinióza. Toto onemocnění se projevuje akutní hořčnatou enterokolitidou. U nákazy se objevují vysoké horečky, výrazné bolesti břicha, průjemová stolice s příměsí hlenu a krve. Nejvíce ohrožení jsou imunokompromitované osoby a děti (Marshall et al. 2016; Ministerstvo zemědělství 2022).

Ve studii Stoops et al. (2016) byla bakterie rodu *Yersinia* nalezena v syrových vzorcích sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*). Jinak výskyt této bakterie je spíše ojedinělý (Vandeweyer et al. 2021).

3.2.5 Kvasinky a plísňe

Plísňe a kvasinky jsou normální součástí hmyzí mikrobioty. Jsou častým původcem kažení produktů potravinářského průmyslu díky jejich schopnosti tvořit spory nebo se snadno šířit do různých prostředí. Mohou kontaminovat potraviny a zhoršit jejich kvalitu degradací živin. Některé druhy jsou navíc patogenní (Garofalo et al. 2019).

Kontaminace hmyzu kvasinkami a plísněmi, jak se ukázalo, souvisí úzce s druhem krmiva. Ve studii Vandeweyer et al. (2017) zjistili, že larvy moučného červa vykazovaly vyšší kontaminaci plísněmi a cvrčci naopak vykazovali vyšší kontaminace kvasinkami. Larvy moučných červů byly krmeny obilnými produkty, které jsou častým zdrojem plísní, zatímco cvrčci jsou krmeni rozmanitým substrátem, jako jsou krmiva pro kuřata, zelenina nebo pivovarské mláto.

U potravin živočišného původu nejsou stanoveny konkrétní limity pro počty plísní a kvasinek. Ty jsou zahrnuty pouze do celkového počtu mikroorganismů (CPM), které zahrnují i bakterie. Dle nařízení komise Evropského společenství (ES) č. 1441/2007 by počet aerobních

mikroorganismů neměl překročit hodnotu 5,0 log KTJ/g u mletého masa (Nařízení Rady (ES) č. 1441/2007). Pro zajištění zdravotní nezávadnosti jsou zde stanoveny limity obsahu mykotoxinů (viz. kapitola 3.2.5.1.1) dle Nařízení (ES) č. 1881/2006 (Nařízení Rady (ES) č. 1881/2006).

3.2.5.1 Plísňe

Plísňe (mikromycety) jsou eukaryotní organismy, jejichž tělo tvoří hyfy, které mohou být vícebuněčné nebo jednobuněčné a následně tvoří mycelium. Plísňe se množí rozpadem mycelia nebo sporami, které jsou všudypřítomné. Díky sporám a bohatému enzymatickému aparátu mohou kolonizovat rozmanité substráty. Výskyt plísni v potravinách je obecně indikátorem špatných skladovacích podmínek, ale nemusí být tomu nutně tak, protože se vyskytují prakticky všude. Jejich přítomnost představuje zdravotní riziko z důvodu produkce mykotoxinů (Malíř a kol. 2003).

Vztah plísni a hmyzu nebyl dosud zcela objasněn. Některé rody plísni přilnou na exoskelet svého hostitele a začnou ho narušovat produkcí enzymů. Příkladem je druh *Beauveria bassiana*, který po přilnutí začne do těla hostitele produkovat toxiny. Ty pak hostitele zabijí. V další studii byla hlášena snížená reprodukční schopnost u jedinců, které napadly rody *Trichoderma* a *Aspergillus*. Entomopatogenní plísňe (např. *B. bassiana*, *Metarhizium*, *Lecanicillium*) produkcí mykotoxinů zabíjí hmyz, ale jsou také rizikové pro lidi, kteří tento hmyz konzumují (Ozdal et al. 2012).

U housenek martináče (*Gonimbrasia belina*), též známých jako „mopanví červi“, bylo nalezeno několik rodů plísni včetně *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* a *Phytophthora* (Marshall et al. 2016). U řádu Motýli byly nalezeny rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Chaetomium*, *Mucor*, *Phoma*, *Dreschlera* a *Fusarium* (Garofalo et al. 2019). U cvrčka domácího (*Acheta domesticus*) byly nalezeny plísňe rodů *Aspergillus*, *Lichtheimia*, *Trichoderma* a *Trichosporon* (Vandeweyer et al. 2018). Rody *Lichtheimia*, *Trichoderma* a *Trichosporon* mohou být oportunitní patogeny (Anaissie et al. 2003).

3.2.5.1.1 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity produkované mnoha fytopatogenními plísněmi a plísněmi kazícími potraviny. Jedná se zejména o rody *Fusarium*, *Aspergillus* a *Penicillium*. Ke kontaminaci mykotoxiny může dojít buď jejich produkcí plísněmi v trávicím traktu hmyzu nebo pozřením již vyprodukovaných mykotoxinů v krmivu. Mykotoxiny zůstávají přítomné v krmivu či v těle hmyzu i po usmrcení plísní, protože mnohé z nich jsou obtížně odstranitelné a odolné vůči vysokým teplotám (Evans & Shao 2022; Imathiu 2020).

Mykotoxiny obecně představují zdravotní riziko, které je potřeba držet pod dohledem (Kalina & Váňa 2005). Ze všech zjištěných mykotoxinů bylo největší zdravotní riziko vyhodnocené u aflatoxinu, který je produkován plísněmi rodu *Aspergillus*, zejména druhy *A. niger*, *A. flavus* a *A. flavus parasiticus* (Garofalo et al. 2019; Imathiu 2020). Aflatoxin B₁ je nejsilnější dosud známý přírodní karcinogen (Malíř a kol. 2003). Aflatoxiny jsou karcinogenní, genotoxické a postihují játra (Garofalo et al. 2019; Imathiu 2020).

Další mykotoxiny jsou produkované rodem *Fusarium*. Prvním z nich jsou fumonisiny, karcinogenní metabolity produkované např. druhy *F. moniliforme*, *F. proliferatum* (Ostrý & Ruprich 2018). Nejvýznamnější je fumonosin B₁. Ten má cytotoxický účinek a je spojován s karcinogenním účinkem a toxicitou jater a ledvin (Evans & Shao 2022; Ostrý & Ruprich 2018).

Druhým typem mykotoxinů produkovaných rodem *Fusarium* jsou zearalenony. Nejvýznamnějšími producenty tohoto toxinu jsou *F. graminearum* a *F. semicectum*. Zearalenony mají hepatotoxické účinky a jsou spojovány s poruchami reprodukce u savců (Evans & Shao 2022; Malíř a kol. 2003). Mezi nejvíce rizikové zearalenony patří α -zearalenon díky své největší podobnosti s ženským estrogenem (Evans & Shao 2022). Bylo prokázáno, že mouční červi (*T. molitor*) dokáží metabolizovat zearalenony na toxičtější α -zearalenon (Mézès & Erdélyi 2020).

Rody *Aspergillus* a *Penicillium* produkují sekundární metabolity ochratoxiny. Nejznámějším toxinem z této skupiny je ochratoxin A. Ochratoxiny způsobují neurotoxické a karcinogenní poškození organismu. Mezi další účinky ochratoxinu se řadí karcinogenita, teratogenita a imunotoxicita (Malíř a kol. 2003). Jsou také pozorovány závažné případy selhání ledvin (Evans & Shao 2022).

3.2.5.2 Kvasinky

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotní buňky, které řadíme do říše hub. Obecně dosahují velikosti od 5 do 10 μm a rozmnožují se dělením (Baker et al. 2022).

Vztah hmyzu s kvasinkami je pozoruhodný. Je známo, že několik druhů kvasinek pomáhá hmyzu lokalizovat potravu s cukernou složkou produkcí těkavých látek. Tyto těkavé látky jsou vedlejším produktem při metabolismu cukrů. Mezi ně patří například ethanol, ethylacetát, isoamylacetát, ethylfenylacetát. Tyto těkavé látky signalizují hmyzu přítomnost cukrů a na oplátku jsou kvasinky přenášeny hmyzem do dalších míst. Tento transport absolvuje kvasinka na povrchu těla nebo ve střevech hmyzu. Kvasinky také pomáhají hmyzu trávit potravu, či pro ně vytváří cenné látky. Například rod *Symbiotaphrina* může svému hostiteli ve střevech poskytnout dusík a vitamíny, také štěpí celobiózu a produkuje enzymy lipázu, fosfatázu a trypsin (Madden et al. 2018; Stefanini 2018).

Mezi identifikovanými kvasinkami v hmyzu byla v larvě moučného červa (*T. molitor*) nalezena *Debaryomyces hansenii* (Garofalo et al. 2019). Normálně se vyskytuje v sliznicích dutiny ústní nebo v gastrointestinálním traktu živočichů. Vzácně je patogenní pro člověka. Další nalezenou kvasinkou byla *Trichosporon asahii*, jež byla nalezena u larev můry *Bunaea alcinoe* z čeledi martináčovitých. Běžně se nachází v půdě nebo na povrchu lidské pokožky. Jedná se o oportunitní patogen a u imunokompromitovaných osob může způsobit onemocnění zvané trichosporonóza (Garofalo et al. 2019; Desnons-Ollivier et al. 2008; Parapouli et al. 2020). Ve studii Grabowski & Klein (2017) byla nalezena kvasinka *Candida albicans* ve vzorku sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*). Jedná se o kvasinku, která způsobuje až 50 % celosvětových kvasinkových onemocnění. Pro většinu populace nepředstavuje riziko, jelikož je běžnou součástí gastrointestinálního traktu, ale při snížené imunitě může dojít k rozvoji onemocnění a způsobit život ohrožující infekci krevního řečiště (Sudbery 2011). Ve studii Wyanants et al. (2018) byly nalezeny *Pichia sporuriosa*, *Issatchenkia orientalis*, *Diutina rugosa*, *Wickerhamomyces anomalus*. *Wickerhamomyces anomalus* je patogenní pro člověka (Zhang et al. 2021).

O kvasinkách ve spojitosti s jedlým hmyzem se ví málo. Z dostupných publikací je zřejmé, že syrový hmyz obsahuje nadlimitní množství kvasinek oproti limitům, které platí pro syrové maso. V syrovém hmyzu bylo zjištěno 7-9 log KTJ/g jen kvasinek, počty se ale tepelnou úpravou snižují (Nařízení Rady (ES) č.1441/2007; Nyangena et al. 2020). Dále jsou kvasinky

zapojovány do pokusů fermentace hmyzích prášků pro zlepšení sensorických vlastností a získání nutričně cenných látek. Ve studii Kim et al. (2021) fermentace prášku z nosorožníka japonského (*Allomyrina dichotoma*) kvasinkou *S. cerevisiae* zlepšila celkovou chuť, výrazně snížila fekální zápach a zapříčinila narůst těkavých látek ovocné chuti.

3.2.6 Viry

Viry jsou obvykle specifické pro hmyz a pro člověka nepředstavují riziko. Chovaný hmyz by mohl pasivně přenášet viry na člověka, ale tento jev není ještě dobře zdokumentován (Gravel & Doyen 2020). Problém by patogenní viry mohly představovat v hromadných chovech, kde by mohlo docházet k úmrtí, poklesu růstu a reprodukce (Bertola & Mutinelli 2021).

3.2.7 Faktory ovlivňující mikrobiotu jedlého hmyzu

Tělo hmyzu je kolonizováno různými MO, které mohou obsadit nejen střevo, ale i jejich kutikulu, buňky, hemocoel, reprodukční orgány či slinné žlázy. Kromě mechanických bariér, jako je např. kutikula či kutikulární výstelky trávicího traktu, které jsou složeny z lipidů a chitinu s antimikrobiálními vlastnostmi, se MO setkávají i s trávicími enzymy či s imunitní odpovědí hmyzu v hemolymfě, která je analogem ke krvi savců. Tyto faktory jim kolonizaci tkání značně znesnadňují (Dillon & Dillon, 2004; Douglas, 2015; Hadj Saadoun et al. 2022). Střevní mikrobiota hmyzu je jedním z obraných mechanismů proti patogenům, kdy mikrobiota produkuje antimikrobiální látky. Důležitou roli ve střevě hrají bakterie mléčného kvašení (BMK) (Görner & Valík 2004). BMK produkují silné organické kyseliny, kyselinu mléčnou a octovou, a další antimikrobiální látky, které inhibují růst patogenů, zabraňují produkci spor a jejich vyklíčení (Lee et al. 2021). Dalším faktorem, který ovlivňuje mikrobiotu, je krmivo. Ve studii Ng'ang'a et al. (2021) se ukázalo, že antibakteriální složky z rostlinného krmiva snižují kontaminaci MO (Doi et al. 2021; Murefu et al. 2019). V neposlední řadě mikrobiotu hmyzu ovlivňují i podmínky chovu (např. teplota, vlhkost, větrání apod.) a kvalita použitých chovných substrátů (IPIFF 2021).

3.2.8 Metody snížení mikrobiologické zátěže

Účinnost jakéhokoliv ošetření je závislé na počáteční koncentraci MO (Caparros Megido et al. 2017). Ve studii Caparros Megido et al. (2017) sledovali počty mikroorganismů (MO)

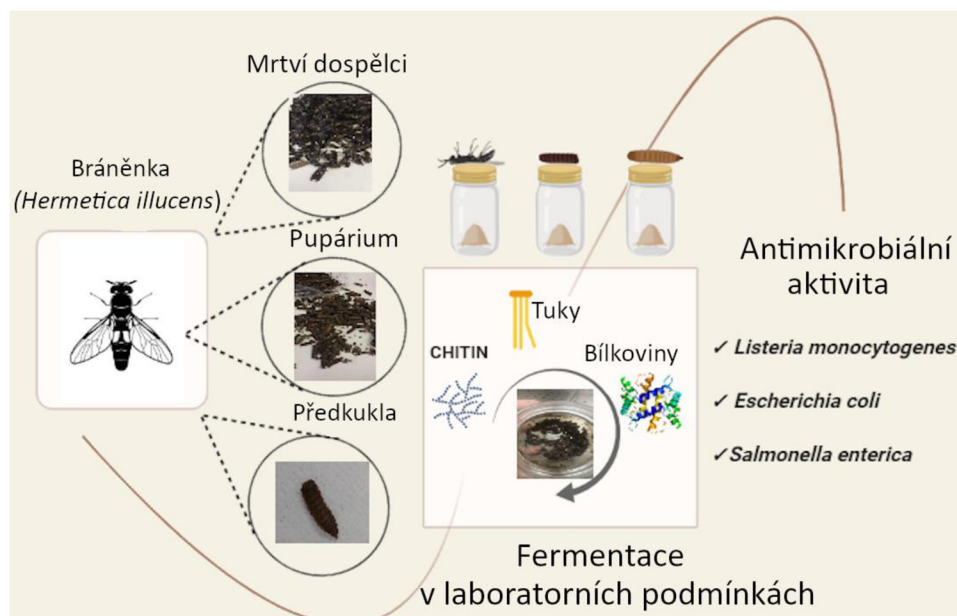
v syrovém hmyzu a hmyzu, který byl podroben různým technologickým operacím. Tato studie zjistila, že blanšírování je dostatečné pro usmrcení bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Už ale není dostatečné pro usmrcení spor, což má za následek krátkou skladovatelnost výrobku. Jako nejvíce spolehlivé pro likvidaci MO se jeví smažení (Milanović et al. 2016). Avšak ani tyto kulinářské operace nezajišťují úplnou likvidaci spor (Osimani & Aquilanti 2021).

Sušení se zdá být vhodnou metodou, jak prodloužit trvanlivost výrobku. V zemích, kde je entomofágie běžná, jej suší na slunci. Někdy je sušení doplněno uzením, což přispívá k snížení počtu MO (Caparros Megido et al. 2017). Grabowski & Klein (2017) ve své studii aplikovali předvaření hmyzu před samotným sušením. Aplikace tohoto kroku výrazně snižuje celkové počty MO a spor.

Další oblíbenou operací pro zpracování je lyofilizace. Jedná se o metodu, která je založena na sublimaci zmrzlé vody při nízkém tlaku a teplotě. Tato metoda MO pouze inaktivuje, po rehydrataci by se mohly vrátit do vegetativního stádia a být škodlivé (Milanović et al. 2016).

Dalším způsobem zpracování hmyzu je fermentace pomocí bakterií mléčného kvašení (BMK). Jedná se nejčastěji o druhy *Lactobacillus plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei* a *L. acidophilus* (Hadj Saadoun et al. 2020; Lee et al. 2021). Této operace se využívá mimo jiné i pro změnu sensorických vlastností hmyzu a prodloužení jeho trvanlivosti (Lee et al. 2021).

Na Obrázku 5 je zobrazeno potencionální využití antimikrobiální aktivity fermentovaných biomas odpadu z muchy černé (*Hermetia illucens*) na vybrané patogeny. Během fermentace vzniká kyselina mléčná a současně dochází k metabolizaci obsažených lipidů a proteinů na antimikrobiálně aktivní látky. V odpadu z bráněnky je obsažen chitin, který byl též fermentován BMK a fermentace vedla k jeho modifikaci a vzniku antimikrobiálních látek.



Obrázek 5: Vznik antimikrobiálně působících látek fermentací odpadní biomasy muchy černé (*Hermetia illucens*) (Hadj Saadoun 2020)

Jiné způsoby zpracování, jako je solení, uzení a ionizační záření, nejsou pokládány za vhodný způsob zpracování, protože dosud nebyla prokázána jejich účinnost (Bessa et al. 2018).

3.3 Stanovení indikátorových mikroorganismů

Metodika pro stanovení mikrobiálního profilu potravin se především opírá o klasické kultivační metody. Mikrobiologická kritéria a standardizované postupy pro potraviny jsou dány nařízením Evropské komise (ES) č. 2073/2005, které bylo několikrát novelizováno. Mikrobiologická kritéria a metody stanovení pro hmyz v tomto nařízení nejsou zatím obsaženy, proto byly prozatím vydány doporučení například od EFSA (2021) nebo Ministerstva zemědělství České republiky (2018) a chovatelé tak mají možnost určit si svá vlastní kritéria.

Standardizované postupy a metody byly využity i v této diplomové práci. Současně proběhla confirmace a identifikace vybraných narostlých kolonií pomocí MALDI-TOF MS pro ověření selektivnosti použitých půd.

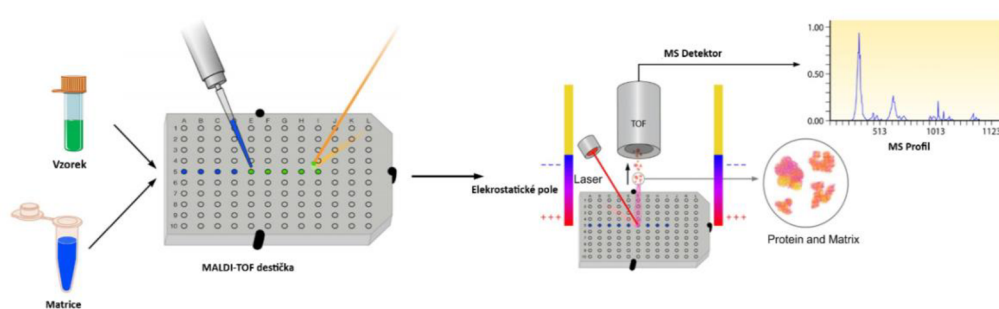
3.3.1 Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS)

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF) je metoda hmotnostní spektrometrie s měkkou ionizací, kdy je

vzorek ionizován pomocí laseru za přítomnosti matrice (Norková a spol. 2013). Při této ionizaci nedochází ke fragmentaci molekul analytu (Murray 2010). Tato metoda má široké využití v hmotnostní spektrometrii velkých netěkavých biomolekul, konkrétně peptidů, proteinů, oligonukleotidů a oligosacharidů (Zenobi & Knochenmuss 1999). V současné době je tato metoda úspěšně využívána v klinických mikrobiologických laboratořích k rychlé a účinné identifikaci patogenních bakterií a kvasinek (Clark et al. 2013; Stein et al. 2018). Metoda identifikace mikroorganismů, zejména bakterií, je založena na analýze ribozomálních proteinů (Sugawara et al. 2016). Mikroorganismy lze určit na rodové, druhové a často i kmenové úrovni, čehož se využívá při monitoringu životního prostředí, zpracování potravin, ochraně veřejného zdraví nebo při klinické diagnostice (Huong a spol. 2014).

Vzorky jsou aplikovány na destičku vyrobenou z inertního kovu (nerezová ocel) a překryty matricí. Po umístění do přístroje jsou vzorky ionizovány laserem. Matrice energii laserového pulsu absorbuje, čímž dochází k její desorpci. Po předání energie skrz matrici ke vzorku se ionizované molekuly uvolní do plynné fáze. Nabité molekuly analytu jsou poté urychleny elektrickým polem a vstupují do hmotnostního analyzátoru doby letu (TOF), který měří dobu, za kterou ionty proletí trubicí o známé délce. Lehčí ionty letí rychleji, jejich doba letu je kratší a k detektoru dorazí dříve (Clark et al. 2013; Singhal et al. 2015). Bakterie jsou identifikovány na základě jejich typického iontového m/z profilu. Hmotnostní spektra vzorku jsou porovnávána s knihovnou referenčních spekter. Shodu či neshodu program vyhodnocuje pomocí logaritmického číselného skóre v hodnotách 0-3 (Huong a spol. 2014). V Tabulce 3 je znázorněna spolehlivost hodnocení.

Mezi nejčastěji používané matrice patří α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina, 2,5-dihydroxybenzoová kyselina, 3,5-dimethoxy-4-hydroxy skořicová kyselina a 2,6-dihydroxyacetofenon (Clark et al. 2013). Na Obrázku 6 je znázorněn proces MALDI-TOF.



Obrázek 6: Proces MALDI-TOF (upraveno dle Clark et al. 2013)

Tabulka 3: Hodnocení spolehlivosti identifikace

Barva	Rozsah skóre	Popis
	2,300-3,000	Druh byl s vysokou pravděpodobností identifikován
	2,000-2,299	Rod identifikován s jistotou, druh pravděpodobně
	1,700-1,999	Pravděpodobná identifikace rodu
	0,000-1,699	Nespolehlivá identifikace

4 Metodika

V praktické části diplomové práce byl studován mikrobiální profil třech druhů jedlého hmyzu, které byly analyzovány ve třech opakováních, jak lze vidět v Tabulce 4. Saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*) byla testována pouze v jednom opakování z důvodu nedostatečného množství odchovaných jedinců.

Vzorky

Tabulka 4: Seznam testovaných vzorků hmyzu a jejich vývojového stádia.

Označení vzorku	Druh hmyzu	Latinský název hmyzu	Stádium hmyzu
1	Moučný červ	<i>Tenebrio molitor</i>	Larvy
2	Moučný červ	<i>Tenebrio molitor</i>	Larvy
3	Moučný červ	<i>Tenebrio molitor</i>	Larvy
4	Cvrček stepní	<i>Gryllus assimilis</i>	Nymfy
5	Cvrček stepní	<i>Gryllus assimilis</i>	Nymfy
6	Cvrček stepní	<i>Gryllus assimilis</i>	Nymfy
7	Saranče stěhovavá	<i>Locusta migratoria</i>	Nymfy

4.1.1 Příprava vzorků

Vzorky hmyzu byly důkladně zhomogenizovány v třecí misce s tloučkem. Poté byly pro vybrané vzorky hmyzu naváženy po 1 g a asepticky převedeny do 9 ml sterilního ředícího média (9 g NaCl a 1 g peptonu na 1 l destilované vody). Pro stanovení anaerobních mikroorganismů bylo použito 9 ml sterilního ředícího média (5 g tryptonu, Nutrient broth No.2 5 g, kvasniční extrakt 2,5 g, L-cystein 0,25 g a tween 80 g na 1 l destilované vody). Následně

byly vzorky desítkově sériově naředěny do hodnoty 10^{-8} . Všechny skupiny MO byly stanoveny kultivačně podle platných norem a standardních postupů.

4.1.2 Stanovení vybraných skupin mikroorganismů

Všechna média, u kterých byla nutná sterilace, byla sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a vytemperována na teplotu 50 °C ve vodní lázni. V Tabulce 5 je znázorněn přehled testovaných parametrů a použitých kultivačních médií.

Tabulka 5: Seznam testovaných parametrů a použitých kultivačních médií

Parametr	Kultivační médium	Metoda
Celkové počty aerobních mikroorganismů	Standard plate count agar base	ČSN ISO 4833-1
Celkové počty anaerobních mikroorganismů	Wilkins–Chalgren Anaerobe Agar (Oxoid)	
Celkové počty aerobních sporulujících mikroorganismů	Trypton-sójový agar base (Oxoid)	
Celkové počty anaerobních sporulujících mikroorganismů	Wilkins-Chalgren anaerob agar (Oxoid)	
Enterokoky	Slanetz-Bartley agar base (Oxoid)	
Kvasinky a plísňe	DG18 base (Oxoid)	ČSN ISO 21527
<i>Clostridium perfringens</i>	Perfringens agar base base (Oxoid)	
<i>Bacillus cereus</i>	Bacillus cereus agar base base (Hmedia)	ČSN EN ISO 7932
<i>Salmonella</i>	Peptonová voda (Oxoid) Rappaport-Vassiliadis bujón base (Oxoid) Salmonella Shigella agar base (Oxoid)	ČSN ISO 6579-1
<i>Escherichia coli</i>	Tryptone Bile X-Glucuronide médium (Oxoid)	ČSN EN ISO 16649-2
<i>Staphylococcus aureus</i> a koaguláza pozitivní stafylokoky	Baird-Parker agar base (Oxoid)	ČSN EN ISO 6888-1

Celkové počty aerobních mikroorganismů (CPM)

Stanovení proběhlo dle ČSN ISO 4833-1. Příslušné množství Standard plate count agaru (Oxoid) bylo převedeno do destilované vody, rozmícháno a sterilováno v autoklávu, jak je uvedeno výše.

Pro stanovení byl odebrán 1 ml z příslušného ředění, převeden do Petriho misky a zalit agarem. Následně byla Petriho miska promíchána krouživým pohybem a agar se nechal ztuhnout. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 72 hodin. Po uplynutí doby byly spočítány narostlé kolonie.

Celkové počty anaerobních mikroorganismů (CPAM)

Pro stanovení počtu anaerobních mikroorganismů byl použit Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar (Oxoid) obohacený o sójový pepton (5 g/l), L-cystein (0,5 g/l) a Tween 80 (1 ml/l).

Pro stanovení byl odebrán 1 ml z příslušného ředění, který byl převeden do Petriho misky a zalit agarem. Následně byla Petriho miska promíchána krouživým pohybem a umístěna do anaerostatu, kde byly vytvořeny anaerobní podmínky pomocí přístroje Whitley jar gassing system (Don Whitley scientific). Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 48 hodin, poté byly spočítány narostlé kolonie.

Celkové počty aerobních sporulujících mikroorganismů

Pro stanovení aerobních sporulujících mikroorganismů byl použit trypton-sójový agar (TSA, Oxoid).

Před stanovením byly ředící řady pasterovány při teplotě 85 °C po dobu 10 minut ve vodní lázni. Následně byl odebrán 1 ml z příslušného ředění, který byl převeden do sterilní Petriho misky a zalit agarem. Kultivace probíhala aerobně při 30 °C po dobu 24 hodin a následně byly spočítány narostlé kolonie.

Celkové počty anaerobních sporulujících mikroorganismů

Pro stanovení byl použit stejný agar a postup přípravy jako u stanovení celkových počtů anaerobních MO.

Vzorky byly pasterovány při teplotě 85 °C po dobu 10 minut ve vodní lázni. Následně byl odebrán 1 ml z příslušného ředění, který byl převeden do sterilní Petriho misky a zalit agarem. Byla provedena anaerobní kultivace v anaerostatu jako výše, při 37 °C po dobu 48 hodin, následně byly spočítány narostlé kolonie.

Stanovení fekálních enterokoků

Enterokoky byly stanoveny pomocí Slanetz-Bartley (SB) agaru (Oxoid). Agar byl připraven dle návodu a za občasného míchání rozvařen do úplného rozpuštění. Následně bylo médium zchlazeno na 50 °C a nalito do sterilních Petriho misek.

Pro stanovení byl odebrán 1 g homogenizovaného vzorku, navážen do sterilní Petriho misky a následně zalit agarem. Dále byl odebrán 1 ml z prvního ředění a rozdávkován na povrch tří agarových ploten a rozetřen sterilní mikrobiologickou hokejkou. Pro vyšší ředění bylo odebráno a rozetřeno 0,1 ml. Kultivace probíhala při 44 °C po dobu 48 hodin a následně byly spočítány narostlé kolonie, kdy se počítaly pouze kolonie kaštanové barvy nebo kolonie

s tmavě rudým středem a růžovými okraji. Toto zbarvení je typické pro enterokoky, které redukují trifenylnitroimidazol obsažený v médiu na červeno-hnědý formazan.

Počty kvasinek a plísní

Médium DG18 bylo připraveno pro kultivaci a detekci plísní a kvasinek dle ČSN ISO 21527. Agar byl připraven dle návodu s přidavkem glycerolu (220 g/l) a chloramphenicolu (100 ml/l).

Dále byl odebrán 1 ml z prvního ředění a rozdávkován na povrch tří agarových ploten a rozetřen sterilní mikrobiologickou hokejkou. Poté bylo odebráno 0,1 ml z příslušného ředění a rozetřeno sterilní mikrobiologickou hokejkou na předem připravené ztuhlém médiu. Byla provedena aerobní kultivace při 25 °C po dobu 7 dní, poté byly spočítány narostlé kolonie.

Clostridium perfringens

Pro stanovení *Cl. perfringens* bylo použito médium Perfringens agar base (Oxoid) s přidavkem perfringens selective supplementu (1 vialka/500 ml, HiMedia) a žlutkové emulze (25 ml/500 ml, HiMedia). Po sterilizaci byl agar vytemperován na teplotu 50 °C a byly přidány suplementy. Takto připravené médium bylo rozdávkováno do sterilních Petriho misek.

Pro stanovení byl odebrán 1 g homogenizovaného vzorku, který byl navážen do sterilní Petriho misky a následně zalit agarem. Dále byl odebrán 1 ml z prvního ředění a rozdávkován na povrch tří agarových ploten a rozetřen sterilní mikrobiologickou hokejkou. Pro vyšší ředění bylo odebráno 0,1 ml a rozetřeno na povrchu agaru sterilní mikrobiologickou hokejkou. Byla provedena anaerobní kultivace v anaerostatu při 37 °C po dobu 24 hodin, následně byly spočítány typické černé kolonie se zónou precipitace.

Bacillus cereus

Pro izolaci a stanovení *Bacillus cereus* dle ČSN EN ISO 7932 (2005) byla použita půda Bacillus cereus (MYP) agar base (Himedia). Po sterilizaci byl agar vytemperován a médium bylo asepticky obohaceno o polymyxin (2 vialky/l, Himedia) a žlutkovou emulzi (50 ml/l, Himedia). Následně bylo vše zamícháno a přelito do sterilních Petriho misek.

Pro stanovení byl odebrán 1 g homogenizovaného vzorku, který byl navážen do sterilní Petriho misky a následně zalit agarem. Dále byl odebrán 1 ml z prvního ředění a převeden na povrch tří předem připravených Petriho misek s agarem. Pro vyšší ředění bylo odebráno 0,1 ml

a rozetřeno na povrchu agaru sterilní mikrobiologickou hokejkou. Byla provedena aerobní kultivace v termostatu při 30 °C po dobu 24 hodin, následně byly spočítány typické růžové kolonie s lecitinázovou aktivitou. Kolonie se zónou precipitace byly následně potvrzovány na agaru s přídatkem ovčí krve k prokázání β -hemolytické aktivity. Inkubace proběhla při 30 °C po dobu 24 hodin.

Pro potvrzení suspektních narostlých kolonií bylo použito médium Columbia agar base (Oxoid) pro sledování hemolytické aktivity. Po 15 minutách sterilace v tlakovém hrnci a vychladnutí média bylo přidáno 5 % objemu defibrilované ovčí krve. Následně bylo médium rozlito do sterilních Petriho misek a ponecháno vychladnout. Na povrch agarové plotny byla sterilní mikrobiologickou kličkou rozetřena čerstvá kultura. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 24 h. Byla sledována tvorba zón.

Salmonella

Průkaz bakterií rodu *Salmonella* byl proveden dle ČSN ISO 6579-1. Pufrovaná peptonová voda (Oxoid) a Rappaport-Vassiliadis (Oxoid) bujón byl dodán výrobcem a rehydratován podle návodu s následnou sterilací. Salmonella Shigella (SS) agar (Oxoid) byl připraven pro selektivní stanovení a izolaci presumtivních *Salmonella*. Agar byl připraven dle návodu a rozvařen do rozpuštění všech složek, následně byl nalit do sterilních Petriho misek.

Pro primární pomnožení bylo naváženo 25 g podezřelého vzorku hmyzu, které bylo poté převedeno do 225 ml peptonové vody a homogenizováno v přístroji Stomacher 400 (Seward). Následně byly vzorky kultivovány při 37 °C po dobu 18 hodin. Po pomnožení bylo odebráno 0,1 ml a zočkovááno do semiselektivního bujónu Rappaport-Vassiliadis (Oxoid) a kultivováno při 37 °C po dobu 48 hodin. Suspenze byla následně rozetřena na selektivní Salmonella Shigella agar (Oxoid) a kultivována při 37 °C po dobu 24 hodin. *Salmonella* spp. tvoří na SS agaru světlé kolonie s černým středem.

Pro ověření příslušnosti k rodu *Salmonella* byly charakteristické kolonie otestovány konfirmačním latexovým aglutinačním testem Salmonella test kit (Oxoid) dle pokynů výrobce. Z narostlých suspektivních kolonií byla odebrána kolonie sterilní mikrobiologickou kličkou a rozmíchána v reakčním činidlu. Následně byla sledována reakce kolonie s reakčním činidlem v porovnání s kontrolou. Za pozitivní výsledek byl považován vznik shluků.

***E. coli*/koliformní bakterie**

Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX) médium (Oxoid) je selektivním chromogenním médiem pro stanovení počtu *E. coli* dle ČSN EN ISO 16649-2. Agar byl připraven dle návodu.

Pro stanovení byl odebrán 1 g homogenizovaného vzorku, který byl navážen do sterilní Petriho misky a zalit agarem. Dále byl odebrán 1 ml z prvního ředění a převeden na povrch do tří předem připravených Petriho misek s agarem. Pro vyšší ředění bylo odebráno 0,1 ml a rozetřeno na povrchu agaru sterilní mikrobiologickou hokejkou. Byla provedena aerobní kultivace v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. Jako počet *E. coli* byly hodnoceny pouze modré kolonie, popřípadě bílé kolonie s modrým středem. Koliformní bakterie byly hodnoceny jako bílé kolonie srovnatelné s velikostí *E. coli*.

Počty koaguláza pozitivních stafylokoků a průkaz *Staphylococcus aureus*

Počty koaguláza pozitivních stafylokoků a *S. aureus* byly stanoveny na Baird-Parker agaru (BP agar, Oxoid) dle ČSN EN ISO 6888-1. Po sterilizaci byl agar vytemperován a médium bylo asepticky obohaceno o žloutkovou emulzi (50 ml/l) a 3,5% teluričitan draselný (3 ml /l). Médium bylo dobře promícháno a rozlito do Petriho misek.

Pro stanovení byl odebrán 1 g homogenizovaného vzorku, který byl navážen do sterilní Petriho misky a následně zalit agarem. Dále byl odebrán 1 ml z prvního ředění, převeden na povrch do tří předem připravených Petriho misek s agarem a rozetřen na plotnu. Pro vyšší ředění byl odebrán 0,1 ml a rozetřen na povrchu agaru sterilní mikrobiologickou hokejkou. Byla provedena aerobní kultivace v termostatu při 37 °C po dobu 24 a 48 hodin, následně byly spočítány typické černé až tmavě šedé kolonie s tenkým bílým okrajem a projasněnou zónou v důsledku proteolytické aktivity a zónou precipitace. Za atypické kolonie byly považovány černé až šedé kolonie bez zóny projasněné zóny či zóny precipitace. Pro confirmaci bylo odebráno 5 kolonií každé morfologie ze dvou po sobě jdoucích ředění.

S. aureus byl potvrzen u vybraných typických a atypických kolonií pomocí testovací sady Staphylase test kit (Oxoid). Sterilní mikrobiologickou kličkou byla odebrána kolonie a následně sledována reakce kolonie s reakčním činidlem v porovnání s kontrolou. Za pozitivní výsledek byl považován vznik shluků. Pro potvrzení koagulázové aktivity byl proveden test s králičí plasmou. Půl mililitru rehydratované králičí plasmy (rabbit coagulase plasma, Oxoid) bylo inokulováno čerstvě narostlou bakteriální kulturou (BHI, 37 °C, 24 hodin). Za pozitivní bylo

považováno sražení plazmy. Z počtu potvrzených suspektních kolonií vyrostlých na Petriho miskách se vypočítalo množství koaguláza pozitivních stafylokoků.

4.1.3 MALDI-TOF MS

Pro identifikaci bakterií narostlých na plotnách a ověření selektivnosti médií byla použita metoda MALDI-TOF. Byl zapotřebí 1 ml čerstvě narostlé kultury z BHI nebo TSB, který byl převeden do mikrocentrifugační zkumavky o objemu 1,5-2 ml a následně centrifugován při 14,5 tis. ot./min po dobu 2 minut. Následně byl supernatant slit a pelet rozpuštěn v 0,5 ml 70% ethanolu. Směs byla znovu odstředěna za stejných podmínek pro odstranění zbytků kultivačního média. Následně byl znovu slit supernatant, zbytek odstraněn pipetou a pelet ponechán několik minut vyschnout. K peletu bylo přidáno 15 μ l 70% kyseliny mravenčí a stejné množství 100% acetonitrilu. Směs byla promíchána a opět centrifugována při 14,5 tis. ot./min po dobu 2 minut. Vzniklý supernatant byl přenesen pipetou v objemu 1 μ l na MALDI destičku a ihned po zaschnutí překryt 1 μ l roztoku MALDI matrice (kyselina alfa-kyano-4-hydroxyskořicová). Destička byla vložena do přístroje MALDI-TOF hmotnostního spektrometru (Bruker Daltonik) a analyzována. Identifikace vzorku byla provedena pomocí softwaru FlexControl (verze 3.4). Každý vzorek byl nanesen ve dvou opakováních.

4.1.4 Vyjádření výsledků

Po kultivaci byly spočítány kolonie narostlé na miskách. Počty byly vypočítány dle následujícího vzorce:

$$N = \frac{\sum c}{n} \times \frac{V_2}{V_1 \times d \times m}$$

kde:

N je počet MO kolonie tvořící jednotka na gram (KTJ/g),

$\sum c$ je počet narostlých kolonií použitých pro výpočet,

D je ředící faktor použitého ředění použitý pro výpočet,

V_1 je objem pipetovaného inokula vzorku očkovaného na plotnu (ml),

V_2 je objem ředícího média (ml),

n je počet ploten použitých pro výpočet a

m je navážka vzorku (g)

4.1.5 Statistické vyhodnocení

Z vypočítaných hodnot, vyjádřených jako log KTJ/g, byly vytvořeny průměry a směrodatné odchylky. Statistická analýza byla provedena v programu STATISTICA 12 (StatSoft CR s.r.o.) pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu ANOVA ($p < 0,05$) s použitím Schéffého metody.

5 Výsledky

5.1 Kultivační stanovení mikroorganismů

Počty sledovaných skupin mikroorganismů jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Počty sledovaných skupiny mikroorganismů. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka ze třech opakování. U sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*) je uvedena hodnota jednoho opakování.

Parametr		moučný červ (<i>Tenebrio molitor</i>)	cvrček stepní (<i>Gryllus assimilis</i>)	saranče stěhovavá (<i>Locusta migratoria</i>)
Mezofilní aerobní bakterie		7,08 \pm 0,52 ^a	7,39 \pm 0,13 ^a	7,81 ^a
Anaerobní bakterie		7,97 \pm 0,11 ^a	7,54 \pm 0,08 ^b	8,49 ^a
Sporulující bakterie	Aerobní	2,10 \pm 0,14 ^a	2,60 \pm 0,11 ^a	3,94 ^a
	Anaerobní	3,03 \pm 0,76 ^a	3,46 \pm 0,23 ^b	5,30 ^{ab}
Fekální enterokoky		5,68 \pm 0,08 ^{ab}	6,37 \pm 0,34 ^a	7,73 ^b
Plísňe		2,31 \pm 1,08 ^a	3,51 \pm 0,18 ^a	4,28 ^a
<i>Clostridium perfringens</i>		1,62 \pm 0,98 ^a	0,73 \pm 0,17 ^a	3,00 ^a
<i>Bacillus cereus</i>	Typické	2,33 \pm 0,99 ^a	1,42 \pm 0,59 ^a	3,00 ^a
	Ostatní L+	0,77 \pm 1,08 ^a	0 ^a	3,56 ^a
<i>Salmonella</i>		pozitivní	pozitivní	pozitivní
<i>E. coli</i>		<1 ^a	0,64 \pm 0,30 ^a	<1 ^a
Koliformní bakterie		4,30 \pm 0,23 ^a	5,30 \pm 0,21 ^b	6,60 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i>		2 ^a	2 ^a	2 ^a
Koaguláza pozitivní stafylokoky		3 ^a	3 ^a	3 ^a

Nejvyšší počty všech indikátorových skupin mikroorganismů byly zjištěny u sarančete stěhovavého, s výjimkou *E. coli*, kde nejvyšších hodnot dosahovaly vzorky cvrčka stepního.

Počty aerobních mikroorganismů dosahovaly u sarančete hodnot až 7,81 log KTJ/g, u ostatních druhů hmyzu byly hodnoty nižší, avšak bez statisticky významného rozdílu ($p < 0,05$). Maximální celkový počet anaerobních mikroorganismů (CPAM) byl 8,49 log KTJ/g. Zároveň byl u této skupiny zjištěn statisticky významně nižší počet u cvrčka, než u sarančete a moučného červa.

Celkový počet aerobních sporulujících mikroorganismů se pohyboval v rozmezí $2,10 \pm 0,14$ až $3,94$ log KTJ/g. Mezi jednotlivými vzorky nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. U celkového počtu anaerobních sporulujících mikroorganismů, jejichž hodnoty byly v rozmezí $3,03 \pm 0,76$ až $5,30 \pm 0,06$ log KTJ/g, byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi vzorky červa a cvrčka.

Počty enterokoků byly mezi $5,68 \pm 0,08$ a $7,73$ log KTJ/g, přičemž i u nich byl zjištěn statisticky významný rozdíl, a sice mezi vzorky cvrčka a sarančete a sarančete a červa. U kvasinek a plísní byla zjištěna nejvyšší hodnota $4,28$ log KTJ/g, nicméně statisticky významný rozdíl zjištěn nebyl.

Bakterie *Clostridium perfringens* se ve vzorcích vyskytovala v hodnotách mezi $0,73 \pm 0,17$ a $3,00$ log KTJ/g. Nejvyšších hodnot nabývala, jak již je popsáno výše, u vzorku sarančete stěhovavého. Mezi vzorky jednotlivých testovaných druhů hmyzu neexistoval statisticky významný rozdíl.

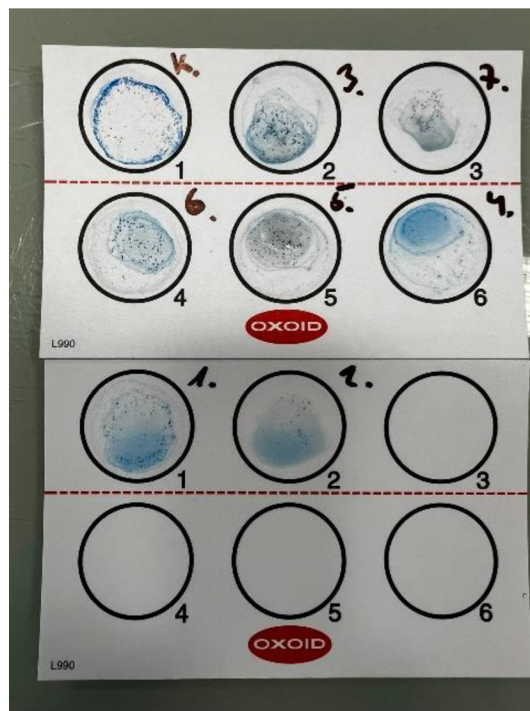
Typické kolonie *Bacillus cereus* činily $1,42 \pm 0,59$ až $3,00$ log KTJ/g. Po statistickém vyhodnocení zjištěných výsledků nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými vzorky hmyzu.

U všech vzorků byl sledován pozitivní nárůst na SS agaru pro zjištění Salmonelly. Pro confirmaci pak byl použit latexový aglutinační test, který potvrdil přítomnost *Salmonella* spp.

u všech testovaných druhů. Na Obrázku 7 je znázorněn nárůst na SS agaru. Výsledky latexového aglutinačního testu jsou pak znázorněny na Obrázku 8.



Obrázek 7 (vlevo): Nárůst na *Salmonella* na SS agaru (autor 2023)



Obrázek 8 (vpravo): Pozitivní výsledek latexového aglutinačního testu (autor 2023).

První vlevo nahoře je pozitivní kontrola. Následně jsou vzorky otestovány v pořadí 3, 7, 6, 5, 4, 1, 2

Počty *Escherichia coli* byly u všech vzorků nižší než 1 log KTJ/g. Koliformní bakterie se ve vzorcích vyskytovaly v rozmezí $4,30 \pm 0,23$ až $6,60$ log KTJ/g. Po provedeném statistickém vyhodnocení byl zaznamenán mezi všemi třemi vzorky statisticky významný rozdíl, kdy nejvyšších hodnot dosahovaly vzorky sarančete.

Po provedení konfirmačního testu pro *S. aureus* (Staphylase test kit) a koagulázového testu vybraných typických a atypických kolonií byl u všech vzorků stanoven počet *Staphylococcus aureus* 2 log KTJ/g a počet koaguláza pozitivních stafylokoků 3 log KTJ/g.

5.2 Identifikace pomocí MALDI-TOF MS

Identifikací pomocí MALDI-TOF MS byly u izolátů z celkových počtů mezofilních bakterií zjištěny rody *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Acinobacter*, *Citrobacter* a *Pediococcus*. Dominantním byl rod *Enterobacter*, který se vyskytoval u všech







druhů testovaného hmyzu. Dalším dominantním rodem byl *Enterococcus*, který se vyskytoval u vzorků cvrčka a sarančete. Druhové zastoupení a hodnoty skóre jsou uvedeny v následující Tabulce 7.

Celkové počty

Tabulka 7: Výsledky identifikace mezofilních bakterií pomocí MALDI-TOF MS

Izolát	Druh	Skóre	Izolát	Druh	Skóre
1/3	<i>Acinetobacter soli</i>	1,88	4/6	<i>Enterococcus thailandicus</i>	2,13
1/4	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	2,14	5/4	<i>Enterobacter cloacae</i>	2,13
1/5	<i>Enterobacter cancerogenus/ cloacae</i>	2,01	5/5	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,22
1/6	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	2,02	5/6	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,03
1/7	<i>Bacillus cereus</i>	2,28	5/7	<i>Lactococcus garvieae</i>	2,18
2/4	<i>Citrobacter koseri</i>	1,91	5/7a	<i>Lactococcus garvieae</i>	2,15
2/5	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,97	6/4	<i>Enterobacter hormaechei</i>	2,13
2/8	<i>Bacillus cereus</i>	2,13	6/5	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,30
3/3	<i>Enterobacter cloacae</i>	1,97	7/4a	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,41
3/4	<i>Lactococcus garvieae</i>	1,93	7/4a	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,16
3/5	<i>Lactococcus garvieae</i>	1,91	7/5	<i>Klebsiella aerogenes</i>	2,14
3/6	<i>Lactococcus garvieae</i>	2,03	7/6	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	2,26
4/4	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,20	7/7	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1,99
4/5	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,11			

Legenda:







MALDI-TOF		Druh vzorku	
	Identifikace na úrovni rodu a pravděpodobně na úroveň druhu (2,00-2,99)		moučný červ (<i>Tenebrio molitor</i>)
	Identifikace na úrovni rodu (1,700-1,999)		cvrček stepní (<i>Gryllus assimilis</i>)
	Neidentifikováno (0,000-1,699)		saranče stěhovavá (<i>Locusta migratoria</i>)

Z ploten určených pro stanovení celkového počtu anaerobních bakterií byly izolovány bakterie rodů *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* a *Pediococcus*. Dominantním rodem byl *Enterococcus*, který se vyskytoval u všech druhů testovaného hmyzu. Dalším dominantním rodem byl *Lactococcus*, který se vyskytoval u vzorků moučného červa a cvrčka. Pro stanovení anaerobních sporulujících MO pomocí MALDI-TOF nebylo možné odebrat více izolátů z ploten z důvodu přerůstání agaru. Izolovány byly pouze dva kmeny, oba identifikované jako *Bacillus cereus*. Druhové zastoupení a hodnoty skóre jsou uvedeny v následující Tabulce 8.

Tabulka 8: Výsledky identifikace izolátů z celkových počtů anaerobních mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS

Vzorek	Druh	Skóre	Vzorek	Druh	Skóre
1/6a	<i>Enterococcus villorum</i>	1,99	5/7a	<i>Lactococcus garvieae</i>	2,25
1/7a	<i>Enterococcus villorum</i>	1,98	5/5e	<i>Enterococcus thailandicus</i>	2,23
2/6a	<i>Enterococcus villorum</i>	1,93	6/1	<i>Enterococcus pseudoavium</i>	1,82
2/7a	<i>Enterococcus villorum</i>	1,90	6/3	<i>Enterococcus faecalis</i>	1,74
3/6a	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,18	6/4	<i>Lactobacillus sakei</i>	1,72
3/7a	<i>Lactococcus garvieae</i>	1,98	6/5	<i>Enterococcus raffinosus</i>	2,03
3/7c	<i>Enterococcus ratti</i>	1,73	7/1	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,34
4/6a	<i>Enterococcus raffinosus</i>	1,90	7/2	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,33
4/6b	<i>Enterococcus thailandicus</i>	2,27	7/3	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2,25
4/7a	<i>Enterococcus thailandicus</i>	2,16	7/4	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2,36
4/7b	<i>Enterococcus raffinosus</i>	1,94	7/5	<i>Pediococcus acidilactici</i>	2,12
4/8a	<i>Staphylococcus condimenti</i>	2,34	anspor1	<i>Bacillus cereus</i>	1,92
5/6a	<i>Lactococcus garvieae</i>	2,21	anspor4	<i>Bacillus cereus</i>	2,14
5/6b	<i>Lactococcus garvieae</i>	2,23			

Legenda:







MALDI-TOF		Druh vzorku	
	Identifikace na úrovni rodu a pravděpodobně na úrovni druhu (2,00-2,99)		moučný červ (<i>Tenebrio molitor</i>)
	Identifikace na úrovni rodu (1,700-1,999)		cvrček stepní (<i>Gryllus assimilis</i>)
	Neidentifikováno (0,000-1,699)		saranče stěhovavá (<i>Locusta migratoria</i>)

Pro identifikaci mikroorganismů narostlých na Baird-Parker agaru pomocí MALDI-TOF MS byly odebrány atypické černé až tmavě šedé kolonie. Odběr samostatných kolonií, které disponovaly proteolytickou aktivitou a zónou precipitace, nebylo možné z důvodu vysokého počtu narostlých kolonií jiných MO. Ze všech vybraných kolonií nebyl žádný izolát identifikován jako *Staphylococcus aureus*. Pouze jeden izolát byl identifikován jako *Staphylococcus cohnii/gallinarum* a jednalo se o jediného zástupce rodu *Staphylococcus*. Většina izolátů byla identifikována jako *Enterococcus* nebo *Klebsiella*. U vzorků cvrčka byly identifikovány také rody *Lactococcus* a *Protues*. Druhové zastoupení a hodnoty skóre jsou uvedeny v následující Tabulce 9.

Tabulka 9: Výsledky identifikace mikroorganismů z Baird-Parker agaru pomocí MALDI-TOF MS

Vzorek	Druh	Skóre	Vzorek	Druh	Skóre
1/1	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2,10	6/1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,23
1/2	<i>Enterococcus gallinarum</i>	1,97	6/2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,46
1/3	<i>Enterococcus gallinarum</i>	1,98	6/2a	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,22
1/3a	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2,02	6/2b	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,31
1/4	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2,05	6/2c	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,28
1/4	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2,20	1/2 SA AT2	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2,14
2/2a	<i>Enterococcus gallinarum</i>	1,91	1/2 SA AT3	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2,13
2/2b	<i>Enterococcus gallinarum</i>	1,85	3/2aTP+	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1,73
2/2c	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2,09	3/2cTP+	<i>Enterococcus mundtii</i>	1,73
2/2d	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2,06	5/2cTP+	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,21
2/2e	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2,15	5/2dTP+	<i>Protues vulgaris</i>	2,13
3/3a	<i>Enterococcus gallinarum</i>	1,93	6/2c	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,18
3/3b	<i>Enterococcus gallinarum</i>	1,90	6/2d	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,15
3/3c	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2,08	6/3aTP+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,22
5/3a	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,28	6/3bTP+	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,18
5/3b	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,29	6/3SAAT2	<i>Lactococcus garvieae</i>	2,17

Legenda:

MALDI-TOF		Druh vzorku	
	Identifikace na úrovni rodu a pravděpodobně na úroveň druhu (2,00-2,99)		moučný červ (<i>Tenebrio molitor</i>)
	Identifikace na úrovni rodu (1,700-1,999)		cvrček stepní (<i>Gryllus assimilis</i>)
	Neidentifikováno (0,000-1,699)		saranče stěhovavá (<i>Locusta migratoria</i>)

6 Diskuze

V této diplomové práci byla zkoumána mikrobiální kvalita jedlého hmyzu. Analyzovány byly tři druhy hmyzu, a to jedinci moučného červa (*Tenebrio molitor*), cvrčka stepního (*Gryllus assimilis*) a sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*). Stejně jako u jiných potravin, i u hmyzu je důležité dodržovat základní hygienická a mikrobiologická pravidla. Tato pravidla by měla zajišťovat bezpečnost konzumace a kvalitu jedlého hmyzu a pomoci tak předcházet vzniku alimentárních onemocnění. Toto téma je velmi aktuální vzhledem k tomu, že hmyz je konzumován celý a mikroorganismy se vyskytují v trávicí soustavě hmyzu i na jeho povrchu. Problém představuje i absence mikrobiologických kritérií a standardizovaných metod stanovení pro hmyz.

6.1 Celkové počty aerobních mikroorganismů (CPM)

Odborná literatura udává, že celkový počet aerobních mikroorganismů se pohybuje u jedlého hmyzu mezi hodnotami 5,7 až 7,5 log KTJ/g (Grabowski & Klein 2016). V živých larvách potemníka moučného (*T. molitor*) byly stanoveny celkové počty 7,7 log KTJ/g, $6,9 \pm 1,0$ log KTJ/g a 8,5 log KTJ/g (Klunder et al. 2012; Grabowski & Klein 2016; Caparros Medigo et al. 2017; Vendeweyer et al. (2015)). Podobně vysoké počty byly zaznamenány i u cvrčka stepního (*G. assimilis*), v syrových nymfách bylo množství $7,3 \pm 0,1$, $7,97 \pm 0,1$ a 7,2 log KTJ/g log KTJ/g (Grabowski & Klein 2016; Caparros Medigo et al. 2017; Klunder et al. 2012). I vzorky sarančete stěhovavého (*L. migratoria*) měly podobné hodnoty 7,8-8,6 log KTJ/g, až na hodnotu 5,9 log KTJ/g (Stoops et al. 2016; Grabowski & Klein 2016).

Stanovené celkové počty aerobních mikroorganismů v této práci u syrových larev potemníka moučného (7,08 log KTJ/g) se shodují s hodnotami ve výše uvedených studiích. Totéž platí i pro vzorky cvrčka stepního (7,39 log KTJ/g) a sarančete stěhovavého (7,81 log KTJ/g). Žádný ze vzorků testovaných v této práci by před tepelným ošetřením neprošel přes aktuální nařízení komise Evropského společenství (ES) č. 2073/2005, avšak v tomto nařízení nejsou uvedeny limity pro jedlý hmyz. Ve studii Caparros Medigo et al. (2017) bylo navrženo, aby CPM vycházelo z limitů pro mleté maso z tohoto nařízení. Limit pro mleté maso je $5 * 10^5$ KTJ/g (5,7 log KTJ/g), ovšem je těžké porovnávat vzorky syrového hmyzu, protože se v podstatě jedná o celá zvířata včetně jejich trávicího traktu. Proto byly prozatím vydány doporučení od Ministerstva zemědělství České republiky (dále jen MZe) (2018), které uvádí maximální hodnotu 5 log KTJ/g po pasteraci nebo jiném tepelném zpracování. Tomu nasvědčuje i provedená studie, kde u různých druhů hmyzu byla aplikována různá tepelná ošetření. Téměř všechny tepelné aplikace snížily kontaminaci až o šest řádů (Nyangena et al. 2020). Celkové počty poskytují informace o celkové mikrobiální zátěži MO v hmyzu a mohou tak být použity pro určení vhodných skladovacích podmínek a tepelné úpravy. Proto by bylo vhodné zařadit tuto skupinu jako indikátor kvality hmyzu a výrobků z něj.

Metodou MALDI-TOF MS byly identifikovány z celkových počtů aerobních MO *Acinetobacter soli*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cancerogenus*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *Enterococcus faecalis*, *E. thailandicus*, *Klebsiella aerogenes*, *K. oxytoca*, *Lactococcus garvieae* a *Pediococcus acidilactici*.

6.2 Celkové počty anaerobních mikroorganismů (CPAM)

Z dostupné literatury nebyla nalezena žádná studie, která by výlučně stanovila celkové počty anaerobních mikroorganismů. Tato skupina je poměrně široká, patří sem BMK, sporulující bakterie a další bakteriální rody, například *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Peptococcus*, *Streptococcus* a *Provatella* (Noor 2022).

Stanovené celkové počty anaerobních mikroorganismů v této práci se shodují nebo pouze mírně liší od hodnot uvedených ve studiích, které jsou zaměřené na stanovení počtu bakterií mléčného kvašení. Jelikož jsou BMK a koliformní bakterie fakultativně anaerobní, je možné, že tvoří hlavní skupinu obsažených MO v této skupině. Tomu nasvědčuje i fakt, že většina izolátů na MALDI-TOF byla identifikována jako enterokoky, které jsou též součástí střevní mikrobioty. Přítomnost vysokého počtu bakterií z této skupiny představuje potenciální riziko kažení potravin a výskyt patogenních a potenciálně patogenních MO, jako je např. *Enterococcus faecalis*, především při nedostatečném tepelném opracování (Garofalo et al. 2017). Do této skupiny spadají i sporulující bakterie, které tvoří termorezistentní spory a představují tak riziko produkce toxinů do potravin.

V praktické části této diplomové práce byly pomocí MALDI-TOF MS identifikovány bakterie *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *E. gallinarum*, *E. villorum*, *E. raffinosus*, *E. pseudoaerium*, *E. ratti*, *E. thailandicus*, *Lactococcus garvieae*, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici*. Ve všech vzorcích hmyzu dominovaly bakterie, které jsou součástí intestinální mikrobioty obratlovců.

6.3 Stanovení aerobních a anaerobních sporulujících mikroorganismů

Sporulující bakterie představují nezanedbatelné zdravotní a/nebo technologické riziko. Pro bakterie z této skupiny je typická produkce spor za nepříznivých podmínek. Jsou také tepelně rezistentní, přežívají tak i tepelné opracování potravin. Jejich potenciální rozvoj v potravinách představuje zvýšené riziko kažení a produkce toxinů. Nejznámějšími zástupci této skupiny jsou rody *Bacillus* a *Clostridium* (Šviráková a spol. 2014). Data obsažená ve studii Garofalo et al. (2019) ukazují, že průměrný obsah bakteriálních endospor a sporotvorných bakterií se pohybuje od 0,5 do 5,8 log KTJ/g v závislosti na druhu hmyzu a vývojové fázi. Ve studii Klunder et al. (2012) stanovili množství bakteriálních spor v potměníku moučném (*Tenebrio molitor*) 2,5 log KTJ/g a v cvrčkovi stepním (*Gryllus assimilis*) 3,6 log KTJ/g. Ve studii

Stoops et al. (2016) stanovili počty sporulujících mikroorganismů u sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*) 3,3-3,8 log KTJ/g.

Tyto výsledky se příliš neliší od výsledku v této diplomové práci. Byl zaznamenán počet aerobních sporulujících bakterií u moučného červa s hodnotou $2,10 \pm 0,14$ log KTJ/g, u cvrčka stepního $2,60 \pm 0,11$ a sarančete stěhovavého 3,94 log KTJ/g. Pro anaerobní sporulující byla zaznamenána u moučného červa hodnota $3,03 \pm 0,76$ log KTJ/g, u cvrčka stepního $3,46 \pm 0,23$ a sarančete stěhovavého 5,30 log KTJ/g. Dle Hanboonso & Durst (2014) je množství sporulujících bakterií v hmyzu nebezpečné, je-li hodnota vyšší než 5 log KTJ/g. U vzorku červa a cvrčka nebylo této hodnoty dosaženo, ale u sarančete byla tato hodnota překročena. V takovém případě je nutné vzorek řádně tepelně ošetřit a zvolit vhodné podmínky skladování. Mikrobiologické limity nejsou pro tuto skupinu určeny zvlášť, ale jsou zahrnuty do celkového počtu mikroorganismů (CPM). V doporučení od MZe (2018) je uvedena maximální hodnota CPM 5 log KTJ/g po pasteraci nebo jiném tepelném zpracování. Pro stanovení sporulujících bakterií byly vzorky ošetřeny teplotou 85 °C po dobu 10 min. Proto by bylo vhodné zařadit do výroby jinou metodu nebo doplnit metodu tepelného opracování, jakými jsou např. dvoustupňová pasterace nebo blanšírování s následným smažením (Milanović et al. 2016). Počty aerobních sporulujících mikroorganismů, by měly být zahrnuty do rutinních stanovení, aby poskytly informace o účinnosti tepelného ošetření.

6.4 Stanovení fekálních enterokoků

Enterokoky jsou považovány za běžnou a nepostradatelnou součást ve hmyzích i lidských střevech (Vilanova et al. 2016). Často jsou používány jako indikátory fekálního znečištění v potravinářství, zejména vody. Mezi nejznámější zástupce patří *E. faecalis* a *E. faecium*. Některé kmeny uvedených druhů mohou být oportunitně patogenní a způsobit endogenní nebo exogenní infekce (Stoops et al. 2016; Garofalo et al. 2017). Enterokoky mohou způsobit alimentární intoxikaci produkcí biogenních aminů nebo se podílejí na kažení živočišných výrobků, protože jsou schopny přežít tepelné zpracování (např. *E. faecium* přežívá v teplotě 68 °C po dobu 30 minut). To platí zejména pokud jsou přítomny ve vysokém množství. Dalším potenciálním rizikem, vyplývajícím z přítomnosti enterokoků je přenos genů antibiotické rezistence (Giraffa 2002). Na druhou stranu, některé druhy či kmeny jsou probiotické a produkují antimikrobiální sloučeniny ve střevě svého hostitele (Krawczyk et al. 2021). Počty enterokoků stanovovali v jedlém hmyzu Martin & Mundt (1972). V této studii se

obsah enterokoků pohybuje v rozmezí 3,0-7,48 log KTJ/g. Do tohoto rozmezí spadají i vzorky testované v této práci.

Moučný červ (*Tenebrio molitor*) v této práci obsahoval $5,68 \pm 0,08$ KTJ/g, u cvrčka stepního (*Gryllus assimilis*) byla v této práci zaznamenána hodnota $6,37 \pm 0,34$ log KTJ/g a u sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*) počet byl 7,73 log KTJ/g. Pro enterokoky neexistuje limitní hodnota v potravinách, ale jsou zahrnuty do celkového počtu mikroorganismů (CPM) z doporučení MZe (2018) pro limity po tepelné úpravě hmyzu. V porovnání s celkovým počtem MO se jedná o poměrně vysoké hodnoty, ale dá se očekávat snížení obsahu MO po tepelném ošetření.

6.5 Počty plísni a kvasinek

Množství kvasinek a plísni je ovlivněno mnoha faktory, jakými jsou např. manipulace, zpracování či následné skladování. Jsou také schopny přežívat a množit se i v nepříznivých podmínkách. Proto jsou kvasinky a plísně využívány jako indikátory hygieny nebo kvality potravinářských výrobků (Stoops et al. 2016). Plísně obecně mohou růst na substrátech v širokém rozmezí hodnot vodní aktivity (a_w), od 0,60 až 0,99, i v širokém rozmezí pH, v rozmezí 5-7 (Nwakamna & Unachukwu 2017). Konzumace jedlého hmyzu s vyšším množstvím těchto MO by mohla mít za následek otravu mykotoxiny, které produkují patogenní plísně (např. *Aspergillus*, *Penicillium*). Nebezpečí představují i entomopatogenní plísně, které napadají hmyz, přičemž by konzumace takového hmyzu představovala riziko i pro konzumenta (Gałęcki et al. 2023). V tepelně neopracovaných vzorcích byly zaznamenány obsahy kvasinek a plísni u moučného červa (*Tenebrio molitor*) v rozmezí 4,8-5,6 a $4,8 \pm 0,9$ log KTJ/g, u cvrčka domácího (*Acheta domestica*) 6-6,1 a $4,4 \pm 0,2$ log KTJ/g, u sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*) byl počet plísni a kvasinek 5,0-5,4 a $5,2 \pm 0,5$ log KTJ/g (Grabowski & Klein 2016; Stoops et al. 2016; Vandeweyer et al. 2015).

U larev potměnka moučného byla v této práci stanovena hodnota $2,31 \pm 1,08$ log KTJ/g, u vzorku cvrčka stepního byl zjištěn obsah $3,51 \pm 0,18$ log KTJ/g a u sarančete stěhovavého 4,28 log KTJ/g. Nejsou dosud stanoveny limity pro počty plísni a kvasinek, tyto limity nejsou stanoveny ani u potravin živočišného původu. Počty plísni a kvasinek jsou zahrnuty do celkového počtu mikroorganismů (CPM) v doporučení MZe (2018). I přesto, že není tato skupina obsažena v doporučení, měla by být navržena jako ukazatel kvality jedlého hmyzu a to v podobě mykotoxinů. Plísně mají schopnost širokého pásma růstu a s tím souvisí nebezpečí

produkce mykotoxinů, které představují riziko zejména pro sušený hmyz a další výrobky z něj, jako jsou hmyzí mouky, které se přidávají do pečiva či těstovin.

6.6 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens je sporulující anaerobní tyčinka, jejichž spory jsou termorezistentní. *Cl. perfringens* způsobuje nekrotické infekce, které jsou způsobeny vyprodukovanými sporami pozřenými hostitelem (Polák et al. 2014). Častější jsou však otravy způsobené toxinem, který *Cl. perfringens* produkuje v potravinách. Toxin vyvolává břišní křeče, nevolnost, plynatou sněť a průjem (CDC 2022). Data obsažená ve studii Garofalo et al. (2019), která mapovala veškeré studie o jedlém hmyzu, ukázala, že průměrný obsah *Cl. perfringens* se pohybuje do 2 log KTJ/g v tepelně opracovaných vzorcích. Nebyla nalezena žádná publikace, ve které by byla zjištěna tato sporulující bakterie u jedlého hmyzu testovaném v této práci – alespoň ne v jeho syrovém stavu. Jediná studie, kde byl zaznamenán výskyt *Cl. perfringens*, byla studie od Grabowski & Klein (2017), kde jej objevili u syrového brouka poterníka hnědého (*Tribolium castaneum*). Bohužel v této studii chyběl údaj o počtu KTJ.

V této diplomové práci byl stanoven obsah *Cl. perfringens* u moučného červa (*Tenebrio molitor*) $1,62 \pm 0,98$ log KTJ/g, u cvrčka stepního (*Gryllus assimilis*) $0,73 \pm 0,17$ log KTJ/g a u sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*) 3,0 log KTJ/g. Výskyt *Cl. perfringens* závisí na hygienických podmínkách, protože jeho spory mohou být zavlčeny pomocí prachu a půdy (Garofalo et al. 2019). V doporučení od MZe (2018) není obsažen limit pro *Cl. perfringens*, ale může být zahrnut do CPM. Existuje však nařízení komise Evropského společenství (ES) č. 142/2011 o hygienických pravidlech vedlejších produktů živočišné výroby, ve které je ustanovena nepřítomnost *Cl. perfringens* v 1 g produktu. Toto hygienické pravidlo by mělo být též aplikováno na jedlý hmyz a *Cl. perfringens* by měl být zařazen do indikátorů kvality hmyzu a výrobků z něj. Přítomnost *Cl. perfringens* poukazuje na nutnost tepelného ošetření potravin. Jako vhodná metoda se jeví pasterace s doplněním jiné metody (blanšívání, sušení nebo dvoustupňová pasterace) pro eliminaci vegetativních forem bakterií a spor (Milanović et al. 2016).

6.7 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus je druh sporulujících tyčinkovitých bakterií. Spory jsou rezistentní vůči nepříznivým podmínkám a tepelným úpravám. Jejich potencionální rozvoj v potravinách představuje riziko kažení a produkce toxinů. *B. cereus* produkuje řadu toxinů, které způsobují dva typy gastrointestinálního onemocnění. Prvním typem alimentárního onemocnění je emetický syndrom, které způsobuje termostabilní toxin cereulid. Druhým typem je průjemové onemocnění, které je způsobeno enterotoxiny, jež jsou produkovány ve střevě (Osimani & Aquilanti 2021). Existují však další druhy z rodu *Bacillus*, které produkují toxiny způsobující též alimentární onemocnění. Jedná se například o druhy *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus licheniformis* (Šviráková a spol. 2014; Garofalo et al. 2019; Osimani & Aquilanti 2021). *B. cereus* produkuje lecitinázu, která má schopnost rozkladu červených krvinek. Zároveň právě kvůli této schopnosti byly pro tuto práci zájmovými všechny druhy s lecitinázovou aktivitou. Tento enzym hraje důležitou roli při infekcích, kdy štěpí fosfolipidy v buněčných membránách, což mu dává patogenní potenciál. Tento enzym je také produkován druhem *Cl. perfringens* nebo zástupci rodů *Pseudomonas*, *Acinetobacter* a *Staphylococcus*. Všichni jmenovaní zástupci jsou oportunitními patogeny, které jsou schopny vyvolat alimentární onemocnění nebo se podílet na kažení potravin (Šviráková a spol. 2014; Aloulou et al. 2018). Data obsažená ve studii Garofalo et al. (2019) ukazují, že průměrný obsah *B. cereus* u hmyzu se pohybuje v rozmezí od 4,0 do 6,6 log KTJ/g. Ve studii od Grabowski & Klein (2016) byl stanoven počet ve vzorcích moučného červa (*Tenebrio molitor*) $6,5 \pm 1,3$ log KTJ/g, u cvrčka stepního (*Gryllus assimilis*) $7,1$ log KTJ/g. U sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*) byl počet $6,3 \pm 0,5$ log KTJ/g. Další studie se tímto druhem bakterií u stanovovaných druhů hmyzu v této práci nezabývaly.

Stanovené počty *B. cereus* v této práci u syrových larev potměníka moučného (*T. molitor*) byly pro typické kolonie *B. cereus* $2,33 \pm 0,99$ log KTJ/g a pro kolonie s lecitinázovou aktivitou, jiné než *B. cereus* (dále jen LB), $0,77 \pm 1,08$ log KTJ/g. U vzorku cvrčka stepního (*G. assimilis*) byl zjištěn počet pro typické kolonie *B. cereus* $1,42 \pm 0,59$ log KTJ/g, pro LB nebyla detekována žádná kolonie. U sarančete stěhovavého (*L. migratoria*) byl počet typických kolonií *B. cereus* $3,00$ log KTJ/g, pro LB činil počet $3,56$ log KTJ/g. Všechny uvedené hodnoty se výrazně liší od uvedených studií výše. Pro počet *B. cereus* nebylo vydáno žádné konkrétní doporučení pocházející od správních orgánů. Dle studie Fasolato et al. (2018) by neměl počet *B. cereus* překročit hodnotu 5 log KTJ/g. Po jeho překročení hrozí riziko tvorby toxinů, které vyvolávají

výše uvedené onemocnění. *B. cereus* v těchto vzorcích nepředstavoval potenciální riziko při konzumaci, avšak přítomnost bacilů by mohla značit přítomnost spor a představovat tak potencionální riziko při dalším zpracování. Proto by bylo vhodné zařadit tento druh jako indikátor kvality hmyzu a výrobků z něj.

6.8 *Salmonella*

Salmonella spp. způsobují gastroenteritidy zvané salmonelóza, kdy k nákaze dochází pozřením kontaminované potravy. Následně pronikají salmonely do tenkého střeva, kde se množí a produkují endotoxin, který způsobuje průjemy, horečky, bolesti břicha a hlavy. Tato forma onemocnění většinou probíhá bez komplikací. Závažnější onemocnění, které je spojeno s rodem *Salmonella* je tyfoidní onemocnění. Kdy tato forma onemocnění přechází ze střeva do dalších tělních orgánů (Beneš 2009).

V praktické části této práce byla zaznamenána přítomnost rodu *Salmonella* ve všech vzorcích, což je významný rozdíl od vědeckých publikací o syrovém hmyzu. V publikacích jako jsou např. Huis et al. (2013), Garofalo et al. (2017), Grabowski & Klein (2017), Osmani et al. (2018), Garofalo et al. (2019) nebyla prokázána přítomnost rodu *Salmonella* u žádného ze vzorků. Jediná studie, kde byla nalezena *Salmonella*, byla Nyangena et al. (2020), kde byla detekována u syrového cvrčka domácího (*Acheta domesticus*). Na výskyt bakterií rodu *Salmonella* má vliv mnoho faktorů, jakými jsou přítomnost živočišných farem v okolí chovu, krmivo nebo chovný substrát (Belluco et al. 2013; Mondor et al. 2021; Wynants et al. 2019). Ačkoli je známo, že tyto mikroorganismy způsobují onemocnění, přímá infekce konzumací jedlého hmyzu zatím nebyla reportována (Grabowski & Klein 2017). Vzhledem k tomu, že se jedná o druhé nejčastější alimentární onemocnění v Evropské unii (EFSA 2023), je tento rod obsažen v doporučení od MZe (2018). Zde je uvedeno kritérium, že *Salmonella* spp. nesmí být přítomna v 25 g po pasteraci nebo jiném tepelném zpracování. Je složité porovnávat syrové vzorky s kritériem pro tepelné opracování, ale výsledky této práce posilují doporučení o tepelně úpravě hmyzích výrobků před přímou konzumaci a rutinní stanovení těchto bakterií u potravin obsahujících jedlý hmyz.

6.9 *E. coli*/koliformní bakterie

Koliformní bakterie jsou řazeny do čeledi *Enterobacteriaceae*, která je rodově i druhově početná. Většina jejich zástupců je obsažena v trávícím traktu obratlovců a jsou součástí

mikrobioty střeva. Do této čeledi patří patogenní nebo podmíněně patogenní druhy. Mezi koliformní bakterie patří rody *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Serratia* a další (Garofalo et al. 2017). *E. coli* je běžnou součástí střevní mikrobioty a řadí se mezi nejdůležitější a nejčastější patogeny přenášené potravinami. Některé kmeny *E. coli* produkují toxiny, které způsobují gastrointestinální onemocnění a infekce močových cest (Goering et al. 2016; Murefu et al. 2019). *E. coli* a koliformní bakterie jsou indikátory hygieny v potravinářství (Garofalo et al. 2019). Dostupná odborná literatura uvádí pouze omezené informace ohledně výskytu *E. coli* a koliformních bakterií u jedlého hmyzu. Jediná studie, která se zabývala oběma skupinami, pocházela od autorů Ali et al. (2010), kteří analyzovali saranče. Bohužel již nevedli, o jaký druh se konkrétně jednalo. V této studii byla stanovena hodnota *E. coli* 5,32 log KTJ/g a u koliformních bakterií 8,32 log KTJ/g. Data obsažená ve studii Garofalo et al. (2019), která se zabývá celou čeledí *Enterobacteriaceae*, ukazují, že se průměrný obsah pohybuje 4,2 do 7,8 log KTJ/g. Ve studii od Grabowski & Klein (2016) byl stanoven počet *Enterobacteriaceae* ve vzorcích moučného červa (*Tenebrio molitor*) $6,6 \pm 0,8$ log KTJ/g, u cvrčka stepního (*Gryllus assimilis*) $7,4 \pm 0,4$ log KTJ/g a u sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*) byl počet $5,7 \pm 0,7$ log KTJ/g. Ve studii Stoops et al. (2016) uvádí hodnotu počtu bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* u sarančete stěhovavého (*L. migratoria*) 7,1-7,6 log KTJ/g.

E. coli byla v této práci zastoupena ve všech vzorcích v počtu nižším než <1 log KTJ/g. U vzorku potměníka moučného a sarančete stěhovavého nebylo možné přesně stanovit počty, z důvodů tmavého zabarvení Petriho misek vzorkem. U vzorku cvrčka stepního byla stanovena hodnota $0,64 \pm 0,30$ log KTJ/g. V porovnání s prací Ali et al. (2010) byly zjištěny výrazně nižší hodnoty. Koliformní bakterie byly v této práci zastoupeny u vzorku potměníka moučného v počtu $4,30 \pm 0,23$ log KTJ/g, u cvrčka stepního $5,30 \pm 0,21$ log KTJ/g a u sarančete stěhovavého 6,60 log KTJ/g. Z literatury i z této diplomové práce je zřejmé, že počty koliformních MO kolísají. *Enterobacteriaceae* obsažena u hmyzu může pocházet z intestinálního traktu hmyzu, z prostředí a podmínek chovu, popřípadě z nehygienické manipulace, zpracování či skladování (Garofalo et al. 2017). Vliv na výskyt této čeledi je spojen s vertikálním přenosem MO z matky na potomstvo při kladení vajec (Osimani & Aquilanti 2021). V doporučení od MZe (2018) je uvedena limitní hodnota CPM 2 log KTJ/g po pasteraci nebo jiném tepelném zpracování. Koliformní bakterie jsou citlivé na teplotu a dá se očekávat při aplikaci tepelného ošetření snížení počtu. Jak již bylo uvedeno výše, zástupci

Enterobacteriaceae byly dominantní skupinou zjištěnou v celkových počtech MO a tato skupina společně s druhem *E. coli* by měly být součástí rutinní analýzy.

6.10 Počty koaguláza pozitivních stafylokoků a průkaz *Staphylococcus aureus*

Rod *Staphylococcus* jsou fakultativně anaerobní koky (Dodd et al. 2017). Klinicky nejvýznamnějším druhem je *S. aureus*, který je všudypřítomný. *S. aureus* patří mezi patogenní bakterie, které produkují toxiny, čímž mohou poškodit zdraví člověka. Tyto toxiny jsou termostabilní a vyskytují se v substrátu i po usmrcení bakteriální buňky a podílí se tak na alimentární intoxikaci (Gorrens et al. 2021). Dalším parametrem, který určuje míru virulence, je zařazení stafylokoků dle schopnosti koagulovat plazmu. Kmeny, které disponují enzymem koaguláza nazýváme koaguláza pozitivní stafylokoky, kam patří i *S. aureus*. Tato skupina je dobře popsána a má větší klinický význam oproti koaguláza negativním stafylokokům (Fontana & Favaro 2018). Koaguláza negativní stafylokoky se vykytují na povrchu těla živočichů a nebývají patogenní, přesto jsou schopni vyvolat onemocnění, především u predisponovaných osob. Průměrný počet rodu *Staphylococcus* byl stanoven ve studii Fasolato et al. (2018) na <4 log KTJ/g. Ve studii Vandeweyer et al. (2018), byl stanoven počet koaguláza pozitivních stafylokoků na <2 log KTJ/g. Koaguláza negativní stafylokoky stanovili ve studii Grabowski & Klein (2017) a Grabowski & Klein (2016), kde v první uvedené studii uvedli počet $4,5$ log KTJ/g. Jejich počet ve vzorcích moučného červa (*Tenebrio molitor*) byl $6,1 \pm 0,9$ log KTJ/g, u cvrčka stepního (*Gryllus assimilis*) $5,7$ log KTJ/g a u sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*) $5,0 \pm 0,6$ log KTJ/g. Přítomnost *S. aureus* zkoumali ve studii Garofalo et al. (2017), ale v žádném vzorku zjištěn nebyl.

V této práci byl u všech zkoumaných vzorků stanoven počet *S. aureus* na 2 log KTJ/g a počet koaguláza pozitivních stafylokoků 3 log KTJ/g. Tento výsledek odpovídá výše uvedeným publikacím. V doporučení od MZe (2018) je uvedeno kritérium, aby *S. aureus* byl nepřítomen v 1 g výrobku po pasteraci nebo jiném tepelném zpracování. Z výše uvedených publikací i z analýzy v této práci je patrné, že výskyt koaguláza pozitivního *S. aureus* není nejspíše příliš častý, přesto je ve vzorcích nacházen a může představovat vážné riziko, vzhledem k schopnosti *S. aureus* přežít i 80 °C var po dobu 20 minut. Má i široké rozmezí růstu při pH $4-10$ a a_w do $0,87$ (Montanari et al. 2015; Casey & Backofen 2021). Kvůli této odolnosti a patogenitě by bylo vhodné zvolit tento druh jako indikátor kvality hmyzu a výrobků z něj.

V praktické části této diplomové práce byly ze selektivního agaru pomocí MALDI-TOF MS identifikovány bakterie *Enterococcus gallinarum*, *E. faecalis*, *E. mundtii*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Lactococcus garvieae*, *Staphylococcus cohnii* a *Proteus vulgaris*.

6.11 Identifikace MALDI-TOF MS

Identifikace pomocí MALDI TOF MS, byla provedena u izolátů z celkových počtů mezofilních bakterií, celkových anaerobních počtů a izolátů narostlých na Baird-Parker agaru, určeného pro stanovení *S. aureus* a koaguláza pozitivních stafylokoků. Nejvíce dominovali rody *Enterobacter*, který byl zaznamenán u všech druhů testovaného hmyzu a rod *Enterococcus*, který se vyskytoval v hojném počtu u všech vzorků. Níže jsou popsány jednotlivé identifikované taxony, které doposud nebyly v této práci blíže diskutovány.

Acinetobacter salii je řazen mezi všudypřítomné, aerobní, nesporulující kokobacily. Jedná se o rod oportunitních patogenů, který způsobuje nozokomiální infekce (Rani et al. 2022; Almasaudi 2016). V posledních letech přibývá případů nákazou bakterií rodu *Acinetobacter*, kdy k nákaze může dojít skrz kontaminované maso, ovoce, zeleninu, čímž může být způsobena gastroenteritida. Proto se dostává tento rod do popředí a odhaluje tak novou oblast, kterou je nutné prozkoumat (Malta et al. 2020; Carvalheira et al. 2021). Bakterie rodu *Acinetobacter* byly izolovány z cvrčka domácího (*Acheta domesticus*) (Osimani et al. 2018) a larev brouků z čeledi potěmnickových (Garofalo et al. 2019).

Enterobacter je rod fakultativně anaerobních tyčinek patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Někteří zástupci tohoto rodu jsou mimo střevo hostitele oportunitní patogeny způsobující infekce operačních ran nebo meningitidy. *Enterobacter sakazakii* a *E. cloacae* způsobují alimentární onemocnění (Shaker et al. 2007). Dalšími klinicky významnými druhy jsou *E. aerogenes* a *E. hormaechei*. *E. cancerogenus* je zřídka spojován s lidskými infekcemi, u ostatních druhů nebylo pozorováno vyvolané onemocnění (Ramirez & Giron 2022; Garazzino et al. 2005).

Rod *Klebsiella* je fakultativně anaerobní bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Tyto bakterie se vyskytují v půdě, ve vodě, ale i v mikrobiotě gastrointestinálního traktu a v respiračním ústrojí. Jedná se o podmíněné patogeny, které mohou způsobit infekci močových cest, pneumonie a nozokomiální infekce. Za klinicky nejvýznamnější druhy jsou označovány *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* a *K. variicola*. První jmenovaný druh je jediný schopný způsobit alimentární onemocnění (Dong et al. 2022). Stejná schopnost byla

pozorována i u druhu *K. aerogenes*, která způsobila onemocnění u pacientů s leukémií. Ovšem jedná se o ojedinělý případ (Kiddy et al. 1987).

Rod *Lactococcus* je spíše spojován s BMK, ale druh *Lactococcus garvieae* je patogenem vyskytujícím se převážně v syrových rybách a mase. Je spojován hlavně s chorobami v akvakultuře, ale existují i případy, kdy tento druh způsobil infekci u člověka. Tyto případy se vyskytují jen velmi vzácně (Tariq et al. 2020). Nákaza z potravin nebyla nikdy prokázána.

Pediococcus je rod BMK využívaný hojně v potravinářství a pro produkci siláže. Ovšem byly zaznamenány případy, kdy *Pediococcus acidilactici* vyvolal infekci u člověka (Iwen et al. 2012). *Pediococcus acidilactici* byl nalezen u sarančete stěhovavého (*L. migratoria*) ve studii Garofallo et al. (2017), stejně jako v této práci.

Rod *Proteus* je součástí střevní mikrobioty a při oslabení organismu může vyvolat infekci nebo průjem (Roy et al. 2008). *Proteus vulgaris* způsobuje záněty močových cest, ovšem objevují se případy, kdy tento druh způsobil bakteriémii a mozkové abscesy, kdy k nákaze pravděpodobně došlo pozřením kontaminované potravin (Bloch et al. 2011). Obecně je *Proteus* spp. spojován s potravinami, které obsahují vysoký podíl bílkovin (Ogbalu & Williams 2015). Ve studii Grabowski & Klein (2017) byl *Proteus* sp. nalezen u cvrčka, ale i v podestýlce a v mrtvých jedincích sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*). Z výše uvedených informací neplyne velký význam pro tento samostatný rod vzhledem k tomu, že spadá pod mikroorganismy pocházející z intestinálního traktu živočichů, které spadají do čeledi *Enterobacteriaceae*. Tato čeleď obsahuje i jiné oportunitní patogeny, a proto by měla být zvolena jako indikátor kvality hmyzu.

7 Závěr

Na základě výsledků mikrobiologické analýzy a údajů z odborné literatury lze dojít k závěru, že hmyz obsahuje podobná spektra mikroorganismů relevantních z hlediska bezpečnosti potravin, zatímco počty se mírně liší v závislosti na druhu a způsobu chovu.

Na základě provedeného rozboru v této diplomové práci bylo zjištěno, že je v syrovém hmyzu obsažena významná mikrobiální zátěž s obsahem patogenních a oportunně patogenních organismů.

Za vhodné indikátory kvality by mohly být navrženy: celkové počty mezofilních aerobních mikroorganismů, aerobní sporulující bakterie, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* a koaguláza pozitivní stafylokoky, a *Salmonella*.

8 Literatura

- Adámková, A., Kouřimská, L., Borkovcová, M. (2016). Jedlý hmyz a jeho postavení ve výživě člověka. *Výživa a potraviny* 71. ISSN: 1211-846X
- Adegun, B. R., Oluduro, A. O., & Aregbesola, O. A. (2019). Isolation and molecular characterization of *Citrobacter* species in fruits and vegetables sold for consumption in ILE-IFE, Nigeria. *Scientific African*, 6, (e00173).
<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00173>
- Aguilar, J. G. D. S. (2021). An overview of lipids from insects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 101967. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101967>
- Aleknavičius, D., Lukša, J., Strazdaitė-Žielienė, I., & Servienė, E. (2022). The bacterial microbiota of edible insects *Acheta domesticus* and *Gryllus assimilis* revealed by high content analysis. *Foods*, 11(8), 1073. <https://doi.org/10.3390/foods11081073>
- Ali, A., Mohamadou, B. A., 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. *Research Journal of Animal Sciences*, 4(5), 108–111.
<https://doi.org/10.3923/rjnasci.2010.108.111>
- Almasaudi, S. B. (2016). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(3), 586-596.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.009>
- Aloulou, A., Rahier, R., Arhab, Y., Noiriél, A., & Abousalham, A. (2018). Phospholipases: An Overview. *Methods in molecular Biology*, 1835: 69-105. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_3
- Anaissie, E. J., Stratton, S. L., Dignani, M. C., Lee, C. K., Summerbell, R. C., Rex, J. H., Monson, T. P., & Walsh, T. J. (2003). Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital

- water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. *Blood*, **101**(7), 2542-2546.
<https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0530>
- Anderson, A., Jonas, D. E., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E., Arweiler, N. B., Vach, K., Wittmer, A., & Al-Ahmad, A. (2016). *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence factors in association with biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, **6**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01534>
- Arther, R. (2015) Gin made with ants: Distillery adds new dimension to insect potential. In Beveragedaily.com. On-line available in :
<https://www.beveragedaily.com/Article/2015/05/20/Gin-made-with-ants-Distillery-adds-new-dimension-to-insect-potential>
- Aziz M, Yelamanchili VS. (2022) *Yersinia enterocolitica*. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; January 2022. On-line dostupné z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499837/>
- 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*, **100**, 35-50.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.040>
- Baker, L., Kraft, J., Karnezos, T., & Greenwood, S. (2022). Review: The effects of dietary yeast and yeast-derived extracts on rumen microbiota and their function. *Animal Feed Science and Technology*, **294**, 115476.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115476>
- Batt, C. A., & Patel, P. (2014). *Encyclopedia of food microbiology* (2nd ed.). Academic Press.
- Bednářová, M. (2016). Possibilities of using insects as Food in the Czech Republic. 2013: In Kouřimská L, Adámková A. Review: Nutritional and sensory quality of edible insectsю. *NFS Journal*, **4**, 22-26.

- Bednářová, M., Borkovcová, M., Fišer, V., Ocknecht, P., Václavík, M., Švejnoha, D. (2015) Hmyz na talíři. Brno: Jota ISBN 978-7462-91-0
- Bektaş, M., Orhan, F., Erman, M. K., & Barış, Z. (2020). Bacterial microbiota on digestive structure of *Cybister lateralimarginalis torquatus* (Fischer von Waldheim, 1829) (Dytiscidae: *Coleoptera*). *Archives of Microbiology*, **203**(2), 635-641. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02049-w>
- Belleggia, L., Milanović, V., Cardinali, F., Garofalo, C., Pasquini, M., Tavoletti, S., Riolo, P., Ruschioni, S., Isidoro, N., Clementi, F., Ntoumos, A., Aquilanti, L., & Osimani, A. (2020, August). *Listeria* dynamics in a laboratory-scale food chain of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) intended for human consumption. *Food Control*, **114**, 107246. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107246>
- Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C. C., Paoletti, M. G., & Ricci, A. (2013). Edible Insects in a food safety and nutritional perspective: A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **12**(3), 296-313. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12014>
- Beneš J. (2009). *Infekční lékařství*. Galén, Praha. ISBN 978-80-7262-644-1
- Bergey's (2005) *Listeria*. Pages 244-261 in De Vos P., Garitty G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Whitman W. B, editors *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd ed., Vol. 3: Proteobacteria. Part B: The Gammaproteobacteria). Springer, New York.
- Bergey's (2009) *Listeria*. Pages 244-261 in De Vos P., Garitty G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Whitman W. B, editors *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd ed., Vol. 2: the Firmicutes). Springer, New York.

- Bertola, M., & Mutinelli, F. (2021, November 15). A systematic review on viruses in mass-reared edible insect species. *Viruses*, **13**(11), 2280. <https://doi.org/10.3390/v13112280>
- Bessa, L. W., Pieterse, E., Sigge, G., & Hoffman, L. C. (2018). Insects as human food; from farm to fork. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **100**(14), 661-663. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8860>
- Bloch, J., Lemaire, X., Legout, L., Ferriby, D., Yazdanpanah, Y., & Senneville, E. (2011). Brain abscesses during *Proteus vulgaris* bacteremia. *Neurological Sciences*, **32**(4), 5017-5022. <https://doi.org/10.1007/s10072-010-0408-0>
- Borges, M. M., da Costa, D. V., Trombete, F. M., & Câmara, A. K. F. I. (2022). Edible insects as a sustainable alternative to food products: an insight into quality aspects of reformulated bakery and meat products. *Current Opinion in Food Science*, **46**, 100864. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100864>
- Borkovcová, M. a kol (2009). *Kuchyně hmyzem zpestřená*. Brno: Lynx ISBN 978-80-86787-374
- Borremans, A., Lenaerts, S., Crauwels, S., Lievens, B., & van Campenhout, L. (2018). Marination and fermentation of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Food Control*, **92**, 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.036>
- Braide, W., Oranusi, S., Udegbumam, LI, Oguoma, O., Akobondu, C., & Nwaoguikpe, RN (2011). Microbiological quality of an edible caterpillar of an emperor moth, *Bunaea alcinoe*. *J. Ecol. Nat. Environ* , **3** (5), 176-180. ISSN 2006- 9847
- Caparros Megido, R., Desmedt, S., Blecker, C., Béra, F., Haubruge, R., Alabi, T., & Francis, F. (2017). Microbiological load of edible insects found in Belgium. *Insects*, **8**(1), 12. <https://doi.org/10.3390/insects8010012>
- Capinera, J. L., (2008) *Encyclopedia of Entomology*, 2. Springer, ISBN 978-1-4020-6360-2

- Carvalho, A. A., Silva, J., & Teixeira, P. (2021). *Acinetobacter* spp. in food and drinking water – A review. *Food Microbiology*, **95**, 103675. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103675>
- Casey, D., & Backofen, R. (2021). A genomic analysis of osmotolerance in *Staphylococcus aureus*. *Gene*, **767**, 145268. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145268>
- CDC-Centers for Disease Control and Prevention (2022). *Prevent illness from C. perfringens*. On-line available: https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/clostridium-perfringens.html?fbclid=IwAR1TbGVGIlhGGJNTg_YqoVXp0AMewfYj9fMH1SazYXe7eqcsfYrA5mMucJ4
- Cibulka, J. (1991). *Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosfere*. Czech Institute of Egyptology Charles University.
- Clark A. E., Kaleta E. J., Arora A., Wolk D. M. (2013). Matrix-Assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* **26**:547–603.
- De Paepe, E., Wauters, J., Van Der Borght, M., Claes, J., Huysman, S., Croubels, S., & Vanhaecke, L. (2019). Ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap high-resolution mass spectrometry for multi-residue screening of pesticides, (veterinary) drugs and mycotoxins in edible insects. *Food Chemistry*, **293**, 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.082>
- Delbrassinne, L., & Mahillon, J. (2016). *Bacillus*: Occurrence. *Encyclopedia of Food and Health*, 307-311. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00050-7>
- Desnos-Ollivier, M., Ragon, M., Robert, V., Raoux, D., Gantier, J. C., & Dromer, F. (2008). *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *Journal of clinical microbiology*, **46**(10), 3237-3242. <https://doi.org/10.1128/JCM.01451-08>

- Dillon, R., & Dillon, V. (2004). The gut bacteria of insects: Nonpathogenic Interactions. *Annual Review of Entomology*, **49**(1), 71-92.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123416>
- Dion-Poulin, A., Turcotte, M., Lee-Blouin, S., Perreault, V., Provencher, V., Doyen, A., & Turgeon, S. L. (2021). Acceptability of insect ingredients by innovative student chefs: An exploratory study. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, **24**.
<https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100362>
- Dodd, C. E. R., Aldsworth, T. G., & Stein, R. A. (2017). *Foodborne diseases (food science and technology)* (3rd ed.). Academic Press.
- Doi, H., Gałęcki, R., & Mulia, R. N. (2021). The merits of entomophagy in the post COVID-19 world. *Trends in Food Science & Technology*, **110**, 849-854.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.067>
- Dong, N., Yang, X., Chan, E. D., Zhang, R., & Chen, S. (2022). *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *EBioMedicine*, **79**, 103998.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103998>
- Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal Insects: Diversity and Function of Resident Microorganisms. *Annual Review of Entomology*, **60**(1), 17-34.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020822>
- Duan, R., Liang, J., Shi, G., Cui, Z., Hai, R., Wang, P., Xiao, Y., Li, K., Qiu, H., Gu, W., Du, X., Jing, H., & Wang, X. (2014). Homology analysis of pathogenic *Yersinia* Species *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia pestis* based on multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, **52**(1), 20-29.
<https://doi.org/10.1128/jcm.02185-13>

- Dupriez, F., Rejasse, A., Rios, A., Lefebvre, T., & Nielsen-LeRoux, C. (2022). Impact and persistence of *Serratia marcescens* in *Tenebrio molitor* larvae and feed under optimal and stressed mass rearing conditions. *Insects*, **13**(5), 458. <https://doi.org/10.3390/insects13050458>
- EFSA, S. (2021). Edible insects: the science of novel food evaluations. On-line dostupné z: <https://www.efsa.europa.eu/en/news/edible-insects-science-novel-food-evaluations>
- EFSA. (2023, March 30). *Salmonella*. On-line dostupné z: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella>
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, **37**(5), 699-735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Evans, N. M., & Shao, S. (2022). Mycotoxin metabolism by edible insects. *Toxins*, **14**(3), 217. <https://doi.org/10.3390/toxins14030217>
- Finke, M., Rojo, S., Roos, N., van Huis, A., & Yen, A. (2015). The European Food Safety Authority scientific opinion on a risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *Journal of Insects as Food and Feed*, **1**(4), 245-247. <https://doi.org/10.3920/jiff2015.x006>
- Fisher, R. G. (2009). *Citrobacter*. In Elsevier eBooks (pp. 1515–1519). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4160-4044-6.50117-5>
- Fontana, C. R., & Favaro, M. (2018). Coagulase-Positive and Coagulase-Negative Staphylococci in Human Disease. Elsevier eBooks, 25–42. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813547-1.00003-0>

- Gałęcki, R., Bakula, T., & Gołaszewski, J. (2023). Foodborne diseases in the edible insect industry in Europe—new challenges and old problems. *Foods*, **12**(4), 770. <https://doi.org/10.3390/foods12040770>
- Garazzino, S., Aprato, A., Maiello, A., Massè, A., Biasibetti, A., De Rosa, F. G., & Di Perri, G. (2005). Osteomyelitis caused by *Enterobacter cancerogenus* infection following a traumatic injury: case report and review of the literature. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**(3), 1459-1461. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.3.1459-1461.2005>
- 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*, **125**, 108527. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108527>
- 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*, **62**, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.012>
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *Fems microbiology reviews*, **26**(2). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00608.x>
- Goering, R. V., Dockrell, H. M., Zuckerman, M. A., Roitt, I. M., Chiodini, P. L., Julák, J., Bobek, J., Čermáková, R., Holada, K., & Mělková, Z. (2016). *Mimsova lékařská mikrobiologie*. ISBN 978-807-387-928-0
- Görner, F., Valík, L. (2004) *Aplikovaná mikrobiológia požívateľín*. 1. vyd. Bratislava : Malé centrum, Typoset, ISBN 80-967064-9-7.
- Gorrens, E., Van Looveren, N., Van Moll, L., Vandeweyer, D., Lachi, D., De Smet, J., & Van Campenhout, L. (2021). *Staphylococcus aureus* in substrates for black soldier fly larvae

(*Hermetia illucens*) and its dynamics during rearing. *Microbiology Spectrum*, **9**(3).

<https://doi.org/10.1128/spectrum.02183-21>

Govorushko, S. (2019). Global status of insects as food and feed source: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *91*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.032>

Grabowski, N. T., & Klein, G. (2016). Microbiology of cooked and dried edible Mediterranean field crickets (*Gryllus bimaculatus*) and superworms (*Zophobas atratus*) submitted to four different heating treatments. *Food Science and Technology International*, **23**(1). doi:10.1177/1082013216652994

Grabowski, N. T., & Klein, G. (2017b). Bacteria encountered in raw insect, spider, scorpion, and centipede taxa including edible species, and their significance from the food hygiene point of view. *Trends in Food Science and Technology*, **63**, 80-90. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.007>

Grabowski, N., & Klein, G. (2017). Microbiological analysis of raw edible insects. *Journal of Insects as Food and Feed*, *3*(1). <https://doi.org/10.3920/jiff2016.0004>

Gravel, A., & Doyen, A. (2020, January). The use of edible insect proteins in food: Challenges and issues related to their functional properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **59**, 102272. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102272>

Guma, S., Jiang, Z., Zhang, Y., Wu, C., Chen, Z., Xu, J., Jiang, Q., Zhang, X., Wang, C., & Gao, X. (2022). The pathogenic characterization of *Citrobacter freundii* and its activation on immune related genes in *Macrobrachium nipponense*. *Microbial Pathogenesis*, **169**, 105682. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105682>

Hadj Saadoun, J., Luparelli, A. V., Caligiani, A., Macavei, L. I., Maistrello, L., Neviani, E., Galaverna, G., Sforza, S., & Lazzi, C. (2020). Antimicrobial biomasses from lactic acid

- fermentation of black soldier fly prepupae and related by-products. *Microorganisms*, **8**(11), 1785. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111785>
- Hadj Saadoun, J., Sogari, G., Bernini, V., Camorali, C., Rossi, F., Neviani, E., & Lazzi, C. (2022). A critical review of intrinsic and extrinsic antimicrobial properties of insects. *Trends in Food Science & Technology*, **122**, 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.018>
- Hanboonsog, Y., Durst, P., (2014) *Edible insects in LAO PDR: building on traditi-on to enhance food security*, FAO 2014. ISBN 978-92-5-108307-9
- Handley, M. A., Hall, C., Sanford, E., Diaz, E., Gonzalez-Mendez, E., Drace, K., Wilson, R., Villalobos, M., & Croughan, M. (2007). Globalization, binational communities, and imported food risks: results of an outbreak investigation of lead poisoning in Monterey County, California. *American Journal of Public Health*, **97**(5), 900-906. <https://doi.org/10.2105/ajph.2005.074138>
- Hugas, M., Garriga, M., & Aymerich, M. (2003). Functionalty of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, **88**(2–3), 223-233. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00184-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00184-3)
- Huong, T. T., M. Komínková, R. Guráň, B. Ruttkay-Nedecký, P. Kopel, L. Trnková, O. Zítka, V. Adam a R. Kizek (2014). Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, **1**(2), 64-66. http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0214/pdf/d-microbial_identification_by_maldi-tof_ms.pdf
- Imathiu, S. (2020). Benefits and food safety concerns associated with consumption of edible insects. *NFS Journal*, **18**, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2019.11.002>
- IPIFF International Platform of Insects for Food and Feed (2021). *Insects as novel foods-an overview in EU Novel Food Legislation*. On-line available in: https://ipiff.org/wp-content/uploads/2019/03/IPIFF_Guide_A4_2019-v5-separate.pdf

- Iwen, P. C., Mindru, C., Kalil, A. C., & Florescu, D. F. (2012). *Pediococcus acidilactici* endocarditis successfully treated with daptomycin. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**(3), 1106-1108. <https://doi.org/10.1128/jcm.05648-11>
- Jantzen Da Silva Lucas, A., Menegon De Oliveira, L., da Rocha, M., & Prentice, C. (2020). Edible insects: An alternative of nutritional, functional and bioactive compounds. *Food Chemistry*, **311**, 126022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126022>
- Jonas-Levi, A., & Martinez, J. J. I. (2017). The high level of protein content reported in insects for food and feed is overestimated. *Journal of Food Composition and Analysis*, **62**, 184-188. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.06.004>
- Kalina, T., Váňa, J. (2005) *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, ISBN: 978-80-246-1036-8
- KHSHK Krajská hygienická stanice Královéhradeckého kraje. Enotmofágie – využití hmyzu jako potravy. On-line dostupné z: http://www.khshk.cz/print.php?type=A&item_id=1332
- Kiddy, K., Josse, E., & Griffin, N. (1987). An outbreak of serious *Klebsiella* infections related to food blenders. *Journal of Hospital Infection*. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(87\)90059-4](https://doi.org/10.1016/0195-6701(87)90059-4)
- Kim, J., Lee, H. E., Kim, Y., Yang, J., Lee, S. J., & Jung, Y. H. (2021, October). Development of a post-processing method to reduce the unique off-flavor of *Allomyrina dichotoma*: Yeast fermentation. *LWT*, **150**, 111940. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111940>
- Kinyuru, JN, Kenji, GM, Njoroge, SM a Ayieko, M. (2010). Effect of processing methods on the in vitro protein digestibility and vitamin content of edible winged termite (*Macrotermes subhylanus*) and grasshopper (*Ruspolia differentens*). *Technologie potravin a bioprocenů*, **3** (5), 778-782. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0264-1>

- Klunder, H., Wolkers-Rooijackers, J., Korpela, J., & Nout, M. (2012). Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control*, **26**(2), 628-231. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.013>
- Kouřimská, L., & Adámková, A. (2016). Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal*, **4**(1), 22-26. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2016.07.001>
- Krawczyk, B., Wityk, P., Gałęcka, M., & Michalik, M. (2021). The Many Faces of *Enterococcus* spp.—commensal, probiotic and opportunistic Pathogen. *Microorganisms*, **9**(9), 1900. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091900>
- Krčová, D. (2017), Entomofagie aneb hmyz na talíři. On-line dostupné z: <https://kulturstika.ronnie.cz/c-27163-entomofagie-aneb-hmyz-na-taliri.html>
- Kumar, D., Sun, Z., Cao, G., Xue, R., Hu, X., & Gong, C. (2019). *Bombyx mori* bidensovirus infection alters the intestinal microflora of fifth instar silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, **163**. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.03.004>
- Labu, S., Subramanian, S., Cheseto, X., Akite, P., Kasangaki, P., Chemurot, M., Tanga, C. M., Salifu, D., & Egonyu, J. (2022). Agrochemical contaminants in six species of edible insects from Uganda and Kenya. *Current Research in Insect Science*, 100049. <https://doi.org/10.1016/j.cris.2022.100049>
- Lange, K. W., & Nakamura, Y. (2021). Edible insects as future food: chances and challenges. *Journal of Future Foods*, **1**, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2021.10.001>
- Lawley, T. D., & Walker, A. W. (2012). Intestinal colonization resistance. *Immunology*, **138**(1), 1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2012.03616.x>
- Lee, H. E., Kim, J., Kim, Y., Bang, W. Y., Yang, J., Lee, S. J., & Jung, Y. H. (2021). Identification and improvement of volatile profiles of *Allomyrina dichotoma* larvae by fermentation

with lactic acid bacteria. *Food Bioscience*, **43**, 101257.

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101257>

Liceaga, A. M. (2022). Edible insects, a valuable protein source from ancient to modern times.

Advances in Food and Nutrition Research.

<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2022.04.002>

Lipovský, J., Patáková, P., Rychter, M., Čížková, H., Melzoch, K. (2009) Perspektivy produkce butanolu ze škrobnatých rostlin a celulosových materiálů. *Chemické listy* **103**. On-line dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_06_479-483.pdf

Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J. A., & Franco, D. (2018).

Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability: general aspects and overall description. *Innovative Technologies for Food Preservation*. 53-107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0>

Lukáš, M (2015). Prebiotika, probiotika a střevní mikroflora. *Interní Medicína* **17**(1), 14-17 On-line dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2015/01/03.pdf>

MacKenzie, K. D., Palmer, M. J., Köster, W., & White, A. (2017). Examining the link between biofilm formation and the ability of pathogenic *Salmonella* strains to colonize multiple host species. *Frontiers in Veterinary Science*, **4**. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00138>

Madden, A. A., Epps, M. J., Fukami, T., Irwin, R. E., Sheppard, J., Sorger, D. M., & Dunn, R. R. (2018, March 21). The ecology of insect–yeast relationships and its relevance to human industry. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **285**(1875), 20172733. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2733>

Malíř, F. a kolektiv autorů (2003). Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. 1.vyd. Brno: NCO NZO, 349s. ISBN 80-7013-395-3

- Malta, R. C. R., Guimarães, J. T., & Nascimento, J. D. S. (2020). From food to hospital: we need to talk about *Acinetobacter* spp. *Germs*, **10**(3).
<https://doi.org/10.18683/germs.2020.1207>
- Mancini, S., Paci, G., Ciardelli, V., Turchi, B., Pedonese, F., & Fratini, F. (2019, October). *Listeria monocytogenes* contamination of *Tenebrio molitor* larvae rearing substrate: Preliminary evaluations. *Food Microbiology*, **83**, 104-108.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.006>
- Mareček, F. a kol. (1997) Zahradnický slovník naučný. II. svazek Č - H. 1. vyd. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 260s. ISBN 80-85120- 62-3
- Marshall, D. L., Dickson, J. S., & Nguyen, N. H. (2016). Ensuring food safety in insect based foods: Mitigating microbiological and other foodborne hazards. In *Insects as sustainable food ingredients*. Academic Press.
- Martin, J. W., & Mundt, J. O. (1972). Enterococci in Insects. *Applied Microbiology*, **24**(4), 575-580. <https://doi.org/10.1128/am.24.4.575-580.1972>
- Md, J. B. E., Md, D. R., & Md, M. B. J. (2019). *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases: 2-Volume Set* (9th ed.). Elsevier.
- Mézes, M., Erdélyi, M. (2020). Food Safety of edible insects. In: Adam Mariod, A. (eds) *African edible insects as alternative source of food, oil, protein and bioactive components*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-32952-5_5
- Milanović, V., Cardinali, F., Aquilanti, L., Garofalo, C., Roncolini, A., Sabbatini, R., Clementi, F., & Osimani, A. (2019). A glimpse into the microbiota of marketed ready-to-eat crickets (*Acheta domesticus*). *Indian Journal of Microbiology*, **60**(1), 115-118.
<https://doi.org/10.1007/s12088-019-00817-x>
- Milanović, V., Osimani, A., Pasquini, M., Aquilanti, L., Garofalo, C., Taccari, M., Cardinali, F., Riolo, P., & Clementi, F. (2016). Getting insight into the prevalence of antibiotic

- resistance genes in specimens of marketed edible insects. *International Journal of Food Microbiology*, **227**, 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.018>
- Ministerstvo zemědělství (2018). Bezpečnost potravin - potraviny nového typu hmyz. On-line dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/hmyz.aspx>
- Ministerstvo zemědělství (2022). Bezpečnost potravin – *Yersinia enterocolitica*. On-line dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76764.aspx>
- Mondor, M., Piña-Domínguez, I. A., Sánchez-Velázquez, O. A., & Melgar Lalanne, G. (2021, May 10). Drying technologies for edible insects and their derived ingredients. *Drying Technology*, **39**(13), 1991-2009. <https://doi.org/10.1080/07373937.2021.1915796>
- Montanari, C., Serrazanetti, D. I., Felis, G. E., Torriani, S., Tabanelli, G., Lanciotti, R., & Gardini, F. (2015). New insights in thermal resistance of staphylococcal strains belonging to the species *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, **50**, 605-612. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.039>
- Motta, J. C., Forero-Carreño, C., Arango, Á., & Sánchez, M. C. (2020). *Staphylococcus cohnii* endocarditis in native valve. *New Microbes and New Infections*, **38**, 100825. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100825>
- Mudalungu, C. M., Tanga, C. M., Kelemu, S., & Torto, B. (2021). An Overview of antimicrobial compounds from african edible insects and their associated microbiota. *Antibiotics*, **10**(6), 621. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060621>
- Müller A, Seinige D, Grabowski NT, Ahlfeld B, Yue M, Kehrenberg C. (2021) Characterization of *Escherichia coli* from Edible Insect Species: Detection of Shiga Toxin-Producing Isolate. *Foods*; **10**(11): 2552. <https://doi.org/10.3390/foods10112552>
- Murefu, T., Macheka, L., Musundire, R., & Manditsera, F. (2019). Safety of wild harvested and reared edible insects: A review. *Food Control*, **101**, 209–224. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.03.003>

- Murray PR. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection* **16**:1626–1630
- Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006 o maximálních limitech některých kontaminujících látek v potravinách. On-line dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02006R1881-20230101>
- Nařízení Rady (ES) č.142 /2011 ze dne 25.února 2011 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu potravin. On-line dostupné z: <https://esipa.cz/sbirka/sbsrv.dll/sb?DR=SB&CP=32011R0142>
- Nařízení Rady (ES) č.1441/2007 ze dne 5.prosince 2007 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. On-line dostupné z: <https://esipa.cz/sbirka/sbsrv.dll/sb?DR=SB&CP=32007R1441>
- Nařízení Rady (ES) č.2073/2005 ze dne 15.listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. On-line dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02005R2073-20200308&qid=1678969802772>
- Němečková, I., Pešek, E., Hanušová J., Roubal, P. (2012). Mlékařské listy **131**: Kultivační metody stanovení bakterií rodu *Pseudomonas* v mléce. On-line dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2012/131_i-v.pdf
- Ng'ang'a, J., Fombong, F., Kiiru, S., Kipkoech, C., & Kinyuru, J. (2021). Food safety concerns in edible grasshoppers: a review of microbiological and heavy metal hazards. *International Journal of Tropical Insect Science*, **41**(3), 2103–2111. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00372-9>
- Ng'ang'a, J., Imathiu, S., Fombong, F., Vanden Broeck, J., & Kinyuru, J. (2021). Effect of dietary supplementation with powder derived from *Moringa oleifera* and *Azadirachta indica*

leaves on growth and microbial load of edible crickets. *Journal of Insects as Food and Feed*, **7**(4), 1–14. <https://doi.org/10.3920/jiff2020.0056>

NHS24 -Scotland's national health information service (2023) *Escherichia coli (E. coli)*, 0157.

On-line dostupné: <https://www.nhsinform.scot/illnesses-and-conditions/infections-and-poisoning/escherichia-coli-e-coli-o157>

Niermans, K., Woyzichovski, J., Kröncke, N., Benning, R., & Maul, R. (2019). Feeding study for the mycotoxin zearalenone in yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae- investigation of biological impact and metabolic conversion. *Mycotoxin research*, **35**(3), 231–242. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00346-y>

Noor, A. (2022, May 11). Anaerobic Infections. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482349/>

Norková R, Dyrtrtová JJ, Kašička V. (2013). Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektro-migračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí. *Chemicke Listy* **107**, 949–955. <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/588/588>

Nowakowski, A. C., Miller, A. C., Miller, M. E., Xiao, H., & Wu, X. (2021). Potential health benefits of edible insects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **62**(13), 3499–3508. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1867053>

Numata, K., & Kaplan, D. (2011). Biologically derived scaffolds. *Advanced Wound Repair Therapies*, 524–551. <https://doi.org/10.1533/9780857093301.4.524>

Nwakanma, C., & Unachukwu, M. N. (2017). Molds. *Elsevier EBooks*, 133–148. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100502-6.00009-1>

Nyangena, D. N., Mutungi, C., Imathiu, S., Kinyuru, J., Affognon, H., Ekesi, S., Nakimbugwe, D., & Fiaboe, K. K. M. (2020). effects of traditional processing techniques on the nutritional

- and microbiological quality of four edible insect species used for food and feed in East Africa. *Foods*, **9**(5), 574. <https://doi.org/10.3390/foods9050574>
- Ogbalu, O. K., & Williams, J. O. (2015). The edibility, distribution and damage indices of *Oryctes Monocerosoliv.*(*Coleoptera*: Scarabaeidae) an edible larva of the oil palms (*Elaise Guineensis*) and associated microorganism. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, **10**(6), 118-125.
- Ordoñez-Araque, R., & Egas-Montenegro, E. (2021). Edible insects: A food alternative for the sustainable development of the planet. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, **23**, 100304. <https://doi.org/10.1016/J.IJGFS.2021.100304>
- Osimani, A., & Aquilanti, L. (2021). Spore-forming bacteria in insect-based foods. *Current Opinion in Food Science*, **37**, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.011>
- 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*, **276**, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.013>
- Ostrý, V., Ruprich, J. (2018) Fumonisin-30 let výzkumu mykotoxinů významných pro veřejné zdraví. Státní zdravotní ústav v Praze, Centrum zdraví, výživy a potravin v Brně. On-line dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/CZVP/Fumonisin_30_let_vyroci_Lenfeldovy_Hoklovy_dny_2018.pdf
- Ozidal, M., Incekara, U., Polat, A., Gur, O., Kurbanoglu, EB, & Tasar, GE (2012). Izolace vláknitých hub spojených se dvěma běžnými jedlými vodními hmyzy, *Hydrophilus piceus* a *Dytiscus marginalis*. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences* , **2** (1), 95-105.

Pandey, A., Negi, S., Soccol, C., (2017). Chitinase. In: Current developments. On-line available in:

https://www.researchgate.net/publication/316551346_Current_developments_in_biotechnology_and_bioengineering_Production_isolation_and_purification_of_industrial_products

Parapouli, M., Vasileiadi, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae*

and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, **6**(1), 1–32.

<https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>

Peng, M., Salaheen, S., & Biswas, D. (2014). Animal health: global antibiotic issues.

Encyclopedia of Agriculture and Food Systems, 346–357.

<https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52512-3.00187-x>

Polák, P., Husa, P., Freibergová M. (2014). Kolitida způsobená *Clostridium difficile* její příčiny

a aktuální možnosti léčby v širších souvislostech. *Interní Medicína* **16**(6) On-line

dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2014/06/06.pdf>

Qiu, Y. (2014, January 14). *Paludibacter jiangxiensis* sp. nov., a strictly anaerobic, propionate-

producing bacterium isolated from rice paddy field. SpringerLink.

[https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-013-0951-](https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-013-0951-1?error=cookies_not_supported&code=d6da71b5-40cd-4669-b4db-78ef51556a4f)

[1?error=cookies_not_supported&code=d6da71b5-40cd-4669-b4db-78ef51556a4f](https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-013-0951-1?error=cookies_not_supported&code=d6da71b5-40cd-4669-b4db-78ef51556a4f)

Ramirez, D., Giron M. (2022). *Enterobacter* Infections. *StatPearls - NCBI Bookshelf*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559296/>

Ramos-Elorduy, J., (1998): *Hmyz na talíři: Labužníkův průvodce po světě jedlého*

Rani, F. M., Rahman, N. a. A., Ismail, S., Cleary, D. W., Clarke, S. C., & Yeo, C. C. (2022). Draft

genome sequences of two *Acinetobacter soli* clinical isolates from a tertiary hospital in

Terengganu, Malaysia. *Microbiology Resource Announcements*.

<https://doi.org/10.1128/mra.00082-22>

- Roy, F. H., Fraunfelder, F. T., & Fraunfelder, F. T. (2008). Roy and Fraunfelder's Current Ocular Therapy. Elsevier Gezondheidszorg.
- Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition & Food Research*, **57**(5), 802–823. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200735>
- Said, M. S., Tirhtani, E., Lesho, E. (2022). *Enterococcus* Infections. *StatPearls* - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567759/>
- Shaker, R. R., Osaili, T. M., Al-Omary, W., Jaradat, Z. W., & Al-Zuby, M. (2007). Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments. *Food Control*, **18**(10), 1241–1245. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.07.020>
- Shinde, AA, Shaikh, FK, Padul, MV, & Kachole, MS (2012). *Bacillus subtilis* RTSA6 6.00, nový kmen izolovaný ze střeva *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) produkuje proteázy podobné chymotrypsinu. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **19** (3), 317-323.
- Schlüter, O., Rumpold, B., Holzhauser, T., Roth, A., Vogel, R. F., Quasigroch, W., Vogel, S., Heinz, V., Jäger, H., Bandick, N., Kulling, S., Knorr, D., Steinberg, P., & Engel, K. H. (2016). Safety aspects of the production of foods and food ingredients from insects. *Molecular Nutrition & Food Research*, **61**(6), 1600520. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600520>
- Schmid, M. W., Ng, E. Y. W., Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., Goebel, W., Wagner, M., & Schleifer, K. H. (2005). Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Systematic and Applied Microbiology*, **28**(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.09.005>
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* **6**, 1–16.

10.3389/fmicb.2015.00791

- Ssepuyya, G., Wynants, E., Verreth, C., Crauwels, S., Lievens, B., Claes, J., Nakimbugwe, D., & van Campenhout, L. (2019). Microbial characterisation of the edible grasshopper *Ruspolia differens* in raw condition after wild-harvesting in Uganda. *Food Microbiology*, **77**, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.005>
- Stefanini, I. (2018). Yeast-insect associations: It takes guts. *Yeast*, **35**(4), 315–330. <https://doi.org/10.1002/yea.3309>
- Stein, M., Tran, V., Nichol, K. A., Lagacé-Wiens, P., Pieroni, P., Adam, H. J., Turenne, C., Walkty, A. J., Normand, A. C., Hendrickx, M., Piarroux, R., & Karlowsky, J. A. (2018). Evaluation of three MALDI-TOF mass spectrometry libraries for the identification of filamentous fungi in three clinical microbiology laboratories in Manitoba, Canada. *Mycoses*, **61**(10), 743–753. <https://doi.org/10.1111/myc.12800>
- Stoops, J., Crauwels, S., Waud, M., Claes, J., Lievens, B., & Van Campenhout, L. (2016). Microbial community assessment of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and grasshoppers (*Locusta migratoria migratorioides*) sold for human consumption. *Food Microbiology*, **53**, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.010>
- Sudbery, Peter E. (2011) Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, 737-748. On-line available in: <https://www.nature.com/articles/nrmicro2636>
- Sugawara R, Yamada S, Tu Z, Sugawara A, Suzuki K, Hoshiba T, Eisaka S, Yamaguchi A. (2016). Rapid and reliable species identification of wild mushrooms by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Analytica Chimica Acta* **934**, 163–169. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.056>.
- Šilhánková, Ludmila (1995). *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 1. vyd. Praha: Victoria publishing, 361 s. ISBN 80-856-0571-6.

- Šviráková, E., Hanušová, J., Muhlhansová A., Jebavá, I., Pukrtová, S. (2014). Mlékařské listy 146: Identifikace *Bacillus sp.* izolovaných z mlékárenských výrobků a výrobních zařízení pomocí PCR a MALDI-TOF MS. On-line dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2014/146_xxv-xxviii.pdf
- Tariq, E., Irshad, Y., Khalil, H., Khakwani, A. S., & Khan, U. A. (2020). Urinary tract infection caused by the novel pathogen, *Lactococcus Garvieae*: A Case Report. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.9462>
- Tousignat, L. (2017). Bug „Burgers“ ale hitting supermarket shelves. In: *New York Post*
- Tuon, F. F., Dantas, L. M. S., Suss, P. H., & Ribeiro, V. M. B. (2022). Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens*, **11**(3), 300. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>
- Van Der Spiegel, M. (2016). Safety of Foods Based on Insects. *Elsevier eBooks*, 205–216. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800605-4.00011-6>
- Van Huis, A. (2013). Edible insects: future prospects for food and feed security. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO forestry paper 171. ISBN 978-92-5-107595-1.
- Van Huis, A. (2015). Edible insects contributing to food security? *Agriculture & Food Security*, **4**(1). <https://doi.org/10.1186/s40066-015-0041-5>
- Vandeweyer, D., Crauwels, S., Lievens, B., & Van Campenhout, L. (2017). Microbial counts of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and crickets (*Acheta domesticus* and *Gryllobates sigillatus*) from different rearing companies and different production batches. *International Journal of Food Microbiology*, **242**, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.007>
- Vandeweyer, D., De Smet, J., Van Looveren, N., & Van Campenhout, L. (2021). Biological contaminants in insects as food and feed. *Journal of Insects as Food and Feed*, **7**(5), 807–822. <https://doi.org/10.3920/jiff2020.0060>

Vandeweyer, D., Lievens, B., & Van Campenhout, L. (2015, September). Microbial quality of edible insects reared on industrial scale in Belgium and the Netherlands. In Conference Paper. In *Innovations in Food Packaging, Shelf Life and Food Safety*. Munich, Germany (pp. 15-17)

Vandeweyer, D., Wynants, E., Crauwels, S., Verreth, C., Viaene, N., Claes, J., Lievens, B., & Van Campenhout, L. (2018). Microbial Dynamics during Industrial Rearing, Processing, and Storage of Tropical House Crickets (*Gryllobates sigillatus*) for Human Consumption. *Applied and Environmental Microbiology*, **84**(12). <https://doi.org/10.1128/aem.00255-18>

Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., & Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**(3), 584–640. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.584-57640.2001>

Velisek, J. (2014). *The Chemistry of Food*. Wiley.

Velíšek, J. (2014). *The Chemistry of Food*. United States: Wiley. ISBN 978-1-118-38384-1.

Vijver, M., Jager, T., Posthuma, L., & Peijnenburg, W. (2003). Metal uptake from soils and soil-sediment mixtures by larvae of *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **54**(3), 277–289. [https://doi.org/10.1016/s0147-6513\(02\)00027-1](https://doi.org/10.1016/s0147-6513(02)00027-1)

Vilanova, C., Baixeras, J., Latorre, A., & Porcar, M. (2016). The Generalist inside the specialist: gut bacterial communities of two insect species feeding on toxic plants Are Dominated by *Enterococcus* sp. *Frontiers in Microbiology*, **7**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01005>

VVP:MIKRO - Vědecký výbor pro potraviny Mikrobiologické kontaminanty v potravinách (2004) Státní zdravotní ústav Brno, On-line dostupné:

http://czvp.szu.cz/vedvybor/dokumenty/studie/mikro_2003_2_deklas.pdf?fbclid=IwAR1KjY2-gae2mBefZHVBnr7_DR2zafQ8SsVP2YaIBDHE_2KLBcstKi7P5Y

WHO World Health Organisation. (2018) *Salmonella*. On-line dostupné z: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))

WHO World Health Organisation. (2020) *Campylobacter*. On-line dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>

Wynants, E., Froominckx, L., Van Miert, S., Geeraerd, A., Claes, J., & Van Campenhout, L. (2019).

Risks related to the presence of *Salmonella* sp. during rearing of mealworms (*Tenebrio molitor*) for food or feed: Survival in the substrate and transmission to the larvae. *Food Control*, **100**, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.01.026>

Zenobi., R., Knochenmuss, R. (1999). Ion formation in MALDI mass spektrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, **17**(5), 337–366. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2787\(1998\)17:5<337::AID-MAS2>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2787(1998)17:5<337::AID-MAS2>3.0.CO;2-S)

Zhang, L., Xiao, M., Arastehfar, A., Ilkit, M., Zou, J., Deng, Y., Xu, Y., Liao, W., Zhao, J., Fang, W.,

& Pan, W. (2021). Investigation of the emerging nosocomial wickerhamomyces anomalus infections at a chinese tertiary teaching hospital and a systemic review: Clinical Manifestations, Risk Factors, Treatment, Outcomes, and Anti-fungal Susceptibility. *Frontiers in Microbiology*, **12**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.744502>

Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research*, **30**(6), 492–506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>