

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Vliv reziduí léčiv v krmivu na růst a vývoj larev potemníka moučného  
chovaného jako krmivo či potravina**

**Diplomová práce**

**Bc. Ivana Papoušková  
Zájmové chovy**

**doc. Ing. Lenka Kouřimská, Ph.D.**

**© 2021 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv reziduí léčiv v krmivu na růst a vývoj larev potměníka moučného chovaného jako krmivo či potravina" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí 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 neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24. 4. 2021

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Lence Kouřimské, Ph.D. za odborné a podnětné připomínky při zpracování diplomové práce. Velké díky patří Ing. Martinu Kulmovi, Ph.D. za ochotu a rady, které mi pomohly s realizací.

Dále děkuji také Ing. Petře Škvorové za vstřícnost a rady při konzultaci praktické části diplomové práce a doc. Ing. Františkovi Hniličkovi, Ph.D. za poskytnutí vzorků kontaminovaného salátu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým nejbližším, rodině a partnerovi za psychickou podporu i v situacích, které se zdály být bezvýchodné, obzvláště pak otci, díky kterému jsem měla k dispozici sledovaný hmyz.

# Vliv reziduí léčiv v krmivu na růst a vývoj larev potměnka moučného chovaného jako krmivo či potravina

## Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo zpracování ucelené literární rešerše, ve které je čtenář seznámen s informacemi o hmyzu a výhodách jeho začlenění v oblasti krmivářství i potravinářství. Byla zmíněna výhodnost z hlediska nutričních hodnot, konkrétně obsahu bílkovin a tuků. Dále byl v teoretické části popsán legislativní postoj k této problematice v rámci Evropské unie. V další části bylo popsáno využití hmyzu v oblasti odpadového hospodářství a v neposlední řadě byla uvedena bezpečnostní hlediska hmyzu, kterým může výrobce, či spotřebitel čelit. V rámci rešerše byl podrobněji popsán druh *Tenebrio molitor* a léčivo paracetamol, které bylo součástí experimentální části diplomové práce.

V praktické části práce byl uskutečněn a popsán experiment, který měl za cíl pozorovat reakce larev hmyzu *Tenebrio molitor* na předloženou potravu, která byla záměrně kontaminována různě vysokými koncentracemi paracetamolu. Pozorované skupiny hmyzu byly získány z faremního chovu české firmy a jednalo se o larvy, které byly staré 55 dní. Larvám byla předkládána krmná směs složená z mrkve, která sloužila jako zdroj vlhkosti a vzorků salátu, který byl během pěstování vystaven působení roztoků s různou koncentrací paracetamolu. Průběh experimentu probíhal tak, že byly larvy umístěny do nádob spolu s krmnou směsí a ponechány po dobu 24 hodin k volnému přístupu ke krmivu, po uplynutí této doby byly larvy odděleny od zbytků krmiva a výkalů a následně po dobu 12 hodin lačnily. Z pozorování nebylo patrné, že by měla případná přítomnost paracetamolu o různé koncentraci v krmivu nějaký vliv na aktivitu hmyzu. Se získanými daty se dále pracovalo a byly stanoveny dvě hypotézy. V první byla, jako sledovaný parametr růstu, zvolena hmotnost a zda na ni budou mít vliv různé koncentrace paracetamolu. Z výsledků je patrné, že se se zvyšující koncentrací paracetamolu v krmivu nezvyšovala hmotnost larev. V rámci druhé hypotézy byla sledována mortalita larev. Konkrétně zda se bude zvyšovat mortalita v závislosti na zvyšující se koncentraci paracetamolu. Ani v tomto případě se nepotvrdilo, že by měla koncentrace paracetamolu v krmivu statisticky významný vliv na mortalitu larev.

**Klíčová slova:** Nutriční hodnota; obsah tuku a bílkovin; parametry růstu; *Tenebrio molitor*; paracetamol.

# Effect of drug residues in feed on the growth and development of mealworms reared as feed or food

## Summary

The aim of this diploma thesis is elaboration of a comprehensive literature review, in which the reader is acquainted with information about insects and its benefits as a feed as well as in the food industry. There are mentioned advantages in terms of nutritional values, namely protein and fat content. Furthermore, the theoretical part describes the legislative opinion of the European Union on this matter. In the following part, there is described the use of insects in the field of waste management as well as the aspects of safety measures that the producer or consumer may face. Furthermore, in the experimental part of the diploma, the species *Tenebrio molitor* and the drug paracetamol are described.

In the practical part of the work an experiment, which aimed to observe the reactions of *Tenebrio molitor*'s larvae to the presented food, which was intentionally contaminated with various concentrations of paracetamol was performed and described. The observed groups of *Tenebrio molitor* were obtained from a Czech breeding company and the mealworms were 55 days old. The larvae were fed with a fodder made of carrot which served as a source of moisture and samples of lettuce which were exposed to solutions with various concentrations of paracetamol during cultivation. The experiment was performed by placing the larvae in containers with the fodder of above mentioned composition. The mealworms were able to access the fodder for 24 hours, afterwards the larvae were separated from the fodder and their faeces and they started 12 hours fasting. It was not proved that the possible presence of paracetamol of various concentrations in the fodder had any effect on the activity of the insects. Nevertheless, two hypotheses were established from the obtained information. The first hypothesis took into consideration weight which was observed as a growth parameter and it was evaluated whether it can be affected by various concentrations of paracetamol. The results showed that the weight of the larvae did not increase with increasing concentration of paracetamol in the fodder. In the second hypothesis, larval mortality was monitored. Specifically, whether mortality will increase depending on increasing paracetamol concentration. Even in this case, it was not proved that the concentration of paracetamol in the fodder had a statistically significant effect on larval mortality.

**Keywords:** Nutritional value; content of fat and protein; parameter of growth; *Tenebrio molitor*; paracetamol.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Potenciál hmyzu</b>	<b>10</b>
<b>3.2</b>	<b>Legislativa</b>	<b>11</b>
<b>3.3</b>	<b>Využití hmyzu v odpadovém hospodářství</b>	<b>12</b>
<b>3.4</b>	<b>Bezpečnostní hlediska hmyzu</b>	<b>12</b>
3.4.1	Alergie	13
3.4.2	Mikrobiální a virové kontaminace	13
3.4.3	Mykotoxiny	14
3.4.4	Pesticidy	14
3.4.5	Těžké kovy	14
3.4.6	Léčiva	15
<b>3.5</b>	<b>Potemník moučný</b>	<b>16</b>
3.5.1	Obecná charakteristika	16
3.5.2	Vývojový cyklus	16
3.5.3	Využití potemníka moučného	17
<b>3.6</b>	<b>Paracetamol</b>	<b>17</b>
3.6.1	Historie paracetamolu	17
3.6.2	Charakteristika	17
3.6.3	Toxicita	18
<b>4</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>19</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiál</b>	<b>19</b>
<b>4.2</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>20</b>
4.2.1	Předběžný test	20
4.2.2	Vlastní experiment	22
<b>4.3</b>	<b>Statistické metody</b>	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>24</b>
<b>5.1</b>	<b>Pozorování</b>	<b>24</b>
<b>5.2</b>	<b>Změna hmotnosti</b>	<b>24</b>
<b>5.3</b>	<b>Mortalita</b>	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>28</b>
<b>6.1</b>	<b>Vliv paracetamolu na přírůstek hmyzu</b>	<b>28</b>
<b>6.2</b>	<b>Vliv paracetamolu na mortalitu hmyzu</b>	<b>29</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>30</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b>	<b>31</b>

**9 Samostatné přílohy .....I**

# 1 Úvod

V posledních několika desetiletích se začíná ve společnosti stále více diskutovat o tématech, které se dotýkají více či méně celého světa. Jedná se o otázky, zda bude schopna planeta Země uživit stále rostoucí populaci obyvatelstva. Zvyšující se nároky na ubývající zemědělskou plochu, vedou k vyhledávání různých alternativ v oblasti získávání nových zdrojů živin, za cílem uspokojení potřeb obyvatelstva. Právě využívání hmyzu může představovat jednu z možných cest. Otázka využívání hmyzu v krmivářství, nebo v potravinářství se těší od počátku 21. století velké pozornosti, nejenom na vědecké úrovni, ale i v povědomí veřejnosti, díky médiím a odborné i populární literatuře.

Produkční chov hmyzu představuje, prozatím ne moc významnou, konkurenci chovu běžných hospodářských zvířat. V porovnání s konvenčními hospodářskými chovy však představuje mnoho výhod. Mezi hlavní výhody chovu hmyzu patří nižší nároky na prostor, který je k produkci využíván a je za potřebí mnohonásobně nižší množství vody. Hmyz se vyznačuje tím, že je schopen produkce velkého množství rychle přirůstající biomasy při nízké spotřebě krmiva. Další předností je možnost odchovu hmyzu na odpadních produktech potravinářského průmyslu nebo odpadech zemědělského charakteru.

Ve srovnání s chovem jiných hospodářských zvířat produkuje hmyz mnohonásobně nižší množství skleníkových plynů, zejména oxidu uhličitého, oxidu dusného a v neposlední řadě metan.

Hlavním benefitem hmyzu jsou jeho nutriční vlastnosti. Mnoho prováděných výzkumů, které se zabývaly tematikou nutričních hodnot hmyzu, se shodovalo na tom, že má hmyz lepší nutriční složení v porovnání s tradičními rostlinnými zdroji bílkovin a za určitých podmínek je srovnatelný i s živočišnými bílkovinnými zdroji. Mnozí autoři došli ke společným závěrům o výhodách používání hmyzu jako alternativního nebo dodatečného zdroje živočišných bílkovin.

Vědecky podložených faktů, které popisují benefity chovu hmyzu existuje opravdu mnoho, ale velké množství výhod s sebou může přinášet rovněž velké množství nebezpečí. Od roku 2018 byl hmyz uznán za novou potravinu na území Evropské unie, tudíž i v České republice. Tato legislativní cesta byla dlouhá a rozhodně nekončí. Prozatím bylo ustanoveno 6 druhů hmyzu, které lze uvádět na trh v různých formách. Tento seznam však není konečný a lze předpokládat, že se do budoucna rozšíří. Hlavním úskalím je zaručení potravinářské a zdravotní nezávadnosti. Úřady pro bezpečnost potravin čelí novým výzvám a musely legislativně ošetřit podmínky, za kterých lze hmyz produkovat. Bylo nutné vyhodnotit potenciální rizika, které mohou různé druhy hmyzu znamenat z hlediska bezpečnostních rizik. Mezi sledované faktory patří možné alergické reakce a otázky mikrobiálních, virových, nebo chemické kontaminací.



## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza 1: Se zvyšující se koncentrací paracetamolu v krmivu se zvětší i změna hmotnosti larev v porovnání před a po zkonsumování kontaminovaného salátu.

Hypotéza 2: Se zvyšující se koncentrací paracetamolu v krmivu se zvýší mortalita larev po zkonsumování kontaminovaného salátu.

Cílem této diplomové práce bylo zpracování literární rešerše v rámci teoretické části, ve které bude čtenář seznámen s potencionálem hmyzu a možnostmi jeho využití. Dále seznámení s aktuálními legislativními postoji k hmyzu jakožto potraviny a s tím spojená bezpečnostní rizika konzumace hmyzu. V praktické části této diplomové práce byl sledován vliv krmiva zalévaného roztoky léčiva paracetamol na růst a vývoj larev *Tenebrio molitor*.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Potenciál hmyzu

Během uplynulých pěti let exponenciálně roste množství vědeckých poznatků s tematikou hmyzu a jeho využití jakožto krmiva či potraviny. Mezi hlavní výhody chovu hmyzu je bezesporu nižší negativní dopad na životní prostředí, než je tomu u běžně chovaných hospodářských zvířat (Van Huis, 2020).

Kromě tradičního využití hmyzu při krmení jiných živočichů je hmyz považován za jeden z pilířů budoucí lidské výživy z různých důvodů. Jedná se o kvalitní zdroj bílkovin i v oblastech, které souží chudoba, špatné životní podmínky a kde není taková dostupnost výživných potravin (Baiano, 2020).

Stále více nás aktuální otázky týkající se udržitelnosti životního prostředí v závislosti na uspokojení našich základních potřeb, jako je hlad a žízeň, nutí se zamyslet nad životním stylem, kterým žijeme právě teď. Problémy, které se dříve zdály být na hony vzdálené, jako je zrychlující se tempo nedostatku pitné vody, začínají rezonovat ve společnosti čím dál intenzivněji. Mezi další problémy, které ovlivňují přetěžování zdrojů a volání po alternativách, můžeme zařadit i zvyšující se růst populace ve světě. Rozsah dostupné zemědělské plochy je omezen, čímž se začínají přetěžovat zdroje plodin. Předpokládá se, že k roku 2050 by se mělo množství celkové populace zvýšit k 9 miliardám obyvatel, což by mělo zvýšit spotřebu potravin více než dvojnásobně, jako je tomu doposud. Klasické zdroje bílkovin budou časem nedostatečné, nebo se stanou zcela vyčerpanými. Tato vyhlídka budoucnosti nás vede k vyhledávání nových, alternativních zdrojů bílkovin, kterým by se mohl stát právě hmyz a produkty z něj vyrobené (Godfray et al., 2010).

Mnoho druhů jedlého hmyzu je ceněno díky svému vysokému obsahu bílkovin, který je srovnatelný a v některých případech dokonce i předčívá hodnoty u jiných, běžně konzumovaných, zdrojů bílkovin. (Stull et Platz, 2020).

Bílkoviny jsou pro fungování těla velice důležité, napomáhají tvorbě, fungování a údržbě tělesných tkání, důležitou funkci mají i co se týče enzymatické funkce, tvorby hormonů a protilátek (Araújo et al., 2019). Výživná hodnota hmyzu z hlediska lipidů a minerálních látek je velice příznivá. Tučky, které jsou pro živé organismy také nepostradatelné a mají rozmanité funkce, už jen z hlediska zdroje energie k fungování organismu, dále tvoří složky buněčných membrán a pomáhají rozpouštět vitamíny A, D, E a K. Všechny tyto látky jsou nedílnou součástí živých organismů a jsou potřebné k jejich životu (Araújo et al., 2019).

Konkrétní nutriční hodnoty hmyzu jsou rozmanité v závislosti na variabilitě a velkému množství druhů. Rozdílné hodnoty můžeme zaregistrovat i v rámci jednoho druhu. Roli v tom hraje fáze i životního cyklu, tedy stupeň metamorfózy (van Huis, 2013). Podstatnou výhodou hmyzu celkově je, že se pomocí změny složení krmných dávek dá částečně manipulovat s výslednými nutričními hodnotami (Stull et Platz, 2020).

Dle Ooninx a van der Poel (2011) může být výsledná chuť i výživové hodnoty hmyzu ovlivněné způsobem chovu a krmivem, který hmyz přijímal. Byla pozorována změna výsledných nutričních hodnot u jedinců sarančat stěhovavých, kteří byli krmení třemi různými dietami, které se lišily svým složením. První tvořila píce, druhou směs píce a pšeničných otrub a třetí byla kombinace píce, pšeničných otrub a mrkve. Bylo zjištěno, že sarančata krmena směsí s příměsí pšeničných otrub vykazovala snížení obsahu bílkovin a zvýšení obsahu tuku, zatímco obohacení krmné dávky o mrkev vedlo ke zvýšení obsahu tuku a výskytu  $\beta$  karotenu (Baiano, 2020).

S ohledem na udržitelnost má chov hmyzu mnoho výhod, ať už se bavíme o vysoké konverzi krmiva, rychlém růstu biomasy, minimálním dopadům na životní prostředí během

celého svého životního cyklu. Další výhodou je bezesporu i možnost chovu na různých substrátech jako je například i odpad potravinového charakteru (Araújo et al., 2019).

Oproti tradičním chovům hospodářských zvířat vzniká při chovu hmyzu méně skleníkových plynů, mnohem méně se využívá půda a nižší je i znečištění a využití vody (van Huis et al., 2013). Dalším zajímavým přínosem konzumace hmyzu je snižování využívání pesticidů, nebo snížení použití insekticidů při aktivním sběru škůdců. Takové snížení spotřeby pesticidů snižuje jak finanční zátěž pro zemědělce, tak i ekologické zatížení prostředí. (Kouřimská, 2016).

Veškeré výše zmíněné výhody však mohou narazit na problém s přijetím ze strany konzumentů. Veřejnost si je však stále více vědoma výhod využívání hmyzu, které z něj činí potencionální alternativu zdroje živočišných bílkovin a tuků v našich jídelničích. Hmyz musí být zpracován na složky, které lze využívat k výrobě bezpečných a chutných produktů, které konečného spotřebitele osloví. Odvětví zabývající se chovem a zpracováním hmyzu rychle roste, ale stále čelí mnoha výzvám, které lze splnit pouze tehdy, jestliže všechny zúčastněné strany budou úzce spolupracovat, jak už chovatelé/výrobci, zpracovatelé, tak i kontrolní a administrativní složky (Van Huis, 2020).

## 3.2 Legislativa

Vzhledem k tomu, že hmyz byl relativně nedávno uznán za potravinu nebo krmivo, legislativa sleduje vývoj v tomto sektoru a musí na něj nějak reagovat. Nejprve musí být zaručeno, že techniky chovu a zpracování hmyzu zaručují, že výsledný produkt nebude obsahovat chemické nebo mikrobiální kontaminanty (Van Huis, 2020).

Přístup jednotlivých členských států EU v problematice právního přístupu vůči hmyzu nebyl do roku 2018 jednotný. Česká republika se řadila mezi státy, které sdílely názor Evropské komise, že se hmyz považuje za neschválenou novou potravinu dle tehdy platného nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 258/1997. V jiných zemích EU však byl hmyz považován za potravinu a díky národním předpisům byla umožněna distribuce hmyzu na trhu jakožto potraviny.

Začátek roku 2018 přináší jednotný úhel pohledu na tuto probematiku pro všechny státy. Od 1. 1. 2018 je v EU použitelné nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 o nových potravinách, kde je jasně definováno, že se hmyz a výrobky z něho vyrobené považují za novou potravinu. Toto nařízení otevírá spoustu příležitostí v tomto odvětví.

Podstatné je, že by každý druh hmyzu měl projít schvalovacím procesem podle nařízení (EU) 2283/2015 před tím, než je uveden na trh. Současně však toto nové nařízení stanovuje dvě přechodná období, které umožní legalizovat všechny potraviny, které nepatřily do působnosti nařízení původního (nařízení (ES) č. 258/1997), byly tedy na trh uvedeny v souladu s předpisy, ale do působnosti nařízení nového (nařízení (EU) 2015/2283) již spadají.

Aby byl na trh uveden konkrétní druh hmyzu je jako potravina, je nutné, aby splňoval tyto podmínky:

- jedná se o druh hmyzu, který byl v souladu s národními předpisy v některé z členských zemí uveden na trh před 1. 1. 2018,
- nejpozději do 1. 1. 2019 bude pro daný druh podána žádost o povolení nové potraviny, lhůta pro podání žádosti je do 1. 1. 2019.

Jestliže budou tyto dva požadavky náležitě splněny, konkrétní druh hmyzu, pro který bude podána žádost, může být uváděn na trh do přijetí rozhodnutí o žádosti, nejpozději však do 2. 1. 2020) (Ministerstvo zemědělství, 2018).

Mezi druhy, které bylo možné od roku 2018 uvádět na trh patří tito zástupci:

*Acheta domesticus* – cvrček domácí

*Alphitobius diaperinus* – larvy potemníka stájového – Buffalo  
*Grylloides sigillatus* – cvrček krátkokřídlý  
*Locusta migratoria* – saranče stěhovavá  
*Schistocerca gregaria* – saranče pustinná  
*Tenebrio molitor* – larvy potemníka moučného (moučný červ)

Tento výčet však není konečným, lze předpokládat, že s přibývajícím zájmem a množstvím získaných informací ohledně bezpečnosti využívání jiných druhů, se tento seznam bude rozrůstat.

Díky nárůstu zájmu v oblasti chovu a následného zpracování hmyzu, vypracovalo Ministerstvo zemědělství dokument, který podává přijatelnou formou informace pro zájemce, kteří již v tomto oboru působí, nebo takové podnikání zvažují a zajímá je. V příručce jsou uvedeny základní podmínky pro chovatele a zpracovatele, kteří hospodaží s hmyzem, který je určen pro lidskou spotřebu. Poskytuje přehled základních měřítek pro posouzení možných nebezpečí, které mohou vést k ohrožení nezávadnosti výrobků. V tomto dokumentu čtenář najde informace rozdělené do dvou kapitol. První se zabývá chovem, jeho náležitostmi, podmínkami a obecnými doporučeními. Ve Druhé kapitole jsou uvedené informace o zpracování hmyzu, od schválení, registrace a zahájení procesu přes hygienické faktory až po pasteraci (Ministerstvo zemědělství, 2018).

### 3.3 Využití hmyzu v odpadovém hospodářství

Jak již bylo zmíněno, produkce hmyzu může přinášet mnoho výhod. Krom získávání zdroje bílkovin pro lidskou spotřebu, nebo pro výkrm jiných živočichů, může být hmyz využit ke zpracování široké škály biologicky rozložitelných odpadů. Mezi druhy, které mají velký potenciál ve zpracování odpadů se řadí jednoznačně bráněnka, *Hermetia illucens* anglicky se nazývá black soldier fly. Zpracování odpadů tímto hmyzem je prozatím jen velmi málo využíváno i přes to, že odpad obsahuje relativně velké množství potenciálně využitelné energie. Zatím není tato možnost likvidace odpadu prováděna ve větší míře za účelem ekonomického zisku, ale na poli výzkumu již existuje celá řada studií problematiky zabývajících se používáním bráněnek jako reducenta hnoje a jejich následné použití jako krmivo. Obrovským benefitem je podstata zpracování odpadu a zároveň tvorba nového energetického zdroje plného bílkovin a tuků. Mezi konkrétní druhy odpadu zpracovávané bráněnkami patří zvěřecí hnoje, konkrétně prasečí a drůbeží (De Marco et al. 2015). Velký potenciál může mít i zpracovávání odpadních kalů z čistíček odpadních vod (Lalander et al. 2013), nebo také komunální organický odpad (Stefan Diener et al. 2011).

### 3.4 Bezpečnostní hlediska hmyzu

Rostoucí zájem a začleňování hmyzu do lidské stravy rovněž přináší zvýšené obavy o bezpečnost konzumentů. U hmyzu je třeba kontrolovat jeho bezpečnost, aby nebyl kontaminován mikroorganismy, parazity, toxiny, těžkými kovy, rezidui léčiv, hormony nebo pesticidy (Baiano, 2020).

Ne všechny druhy hmyzu jsou jedlé. Druhy, které jsou tradičně konzumovány, jsou obecně považovány za bezpečné, přesto má hmyz potenciál přenášet patogeny, houby nebo parazity na člověka, převážně pokud nebyl získán z hygienického prostředí (Stull et Platz, 2020).

Mezi další rizika konzumace hmyzu patří i výběr nevhodného vývojového stádia hmyzu, skladování a kulinářské přípravy. Problém může nastat například při konzumaci

nevhodně připravených sarančat, nebo kobylek, kterým nebyly odstraněny končetiny, které mohou způsobit například ucpaní střev, které může mít i fatální následky (Kouřimská, 2016).

Další problémy může činit horší stravitelnost. Obecně je chitin je považován za nestravitelný i pro člověka, přestože lidské žaludeční žlázy obsahují enzym chitinázu, bohužel tento enzym může být neaktivní. (Kouřimská, 2016).

### 3.4.1 Alergie

Hmyz může být zdrojem alergenů podobně jako jiné potraviny. K alergické reakci může dojít kontaktem, inhalací či po orálním požití. U druhů hmyzu, jako jsou kobylky a bourec morušový, bylo prokázáno, že dlouhodobá expozice v prostředí s vysokým obsahem antigenu, což je například u chovatelů hmyzu, může způsobit senzibilizaci dýchacích cest u 50-60 % osob (Baiano, 2020).

Dle zjištění Ji et al. (2009) se v Číně mezi roky 1980 až 2007 jako čtvrtá nejčastější alergie objevovala právě reakce na hmyz. U pacientů alergických na korýše nebo domácí roztoče byla pozorována alergická reakce po konzumaci moučných červů (Baiano, 2020; Van Huis, 2020). Rovněž byla pozorována silná korelace mezi specifickými hladinami imunoglobulinu E (IgE) u cvrčka dvouskrvného a krevet, což naznačuje, že cvrčci rovněž mohou vyvolávat alergické reakce podobně jako korýši (Stull et Platz, 2020). Hlavními alergenními reaktanty jsou u hmyzu bílkoviny tropomyosin a argininkináza, což jsou dobře známé alergeny u členovců (Stull et Platz, 2020; Van Huis, 2020).

Bylo také zjištěno, že alergická reakce na jeden druh hmyzu nemusí nutně znamenat alergickou reakci na všechny druhy hmyzu (Baiano, 2020).

### 3.4.2 Mikrobiální a virové kontaminace

Oblast mikrobiálního výzkumu jedlého hmyzu není prozatím velmi probádanou, ale nedávné důkazy Stull et Platz (2020) naznačují, že kvalita hmyzu se dramaticky liší mezidruhově, dále v závislosti na metodách chovu, podle podmínek v chovném zařízení, i v průběhu výrobních cyklů ve stejné společnosti.

Za určitých podmínek se může stát chovné zařízení hmyzu jakýmsi médiem pro růst nežádoucích mikroorganismů, jako jsou například bakteriální spóry rodu *Bacillus*. *Bacillus* spp. může způsobit onemocnění přenášené potravinami a tvoří stres-rezistentní endospóry. Ne všechna tepelná ošetření nebo konzervační metody jsou dostatečné k odstranění těchto spór nalezených v jedlém hmyzu. Kontaminace těmito spórami mohou vyvolat mnoho zdravotních rizik pro spotřebitele. Rovněž byla zjištěna přítomnost bakterií *Salmonella* sp. u larev moučných červů, která byla závislá na úrovni kontaminace pšeničných otrub, které tyto larvy konzumovaly (Van Huis, 2020).

U druhů hmyzu jako jsou rus domácí a šváb americký bylo prokázáno, že mohou obsahovat patogenní prvoky, jako je *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Toxoplasma* spp. a *Sarcocystis* spp. (Baiano, 2020).

Nejenom bakterie a prvoci mohou být nevítanou součástí hmyzu. Dle Baiano (2020) obsahuje hmyz specifické množství virových patogenů, které mohou ohrozit zdraví zvířat i člověka. Viry přenášené členovci (arboviry) jsou schopné způsobit nemoci jako je horečka dengue, západonilská horečka, hemoragická horečka a onemocnění chikungunya.

Dle Van Huis (2020) bylo prokázáno, že jedlý hmyz obsahuje geny rezistence vůči antibiotikům. V larvách moučných červů byl dokonce objeven výskyt k antibiotikům

rezistentních mikroorganismů, což by mělo vést k bedlivějším pozorováním a následným navržením kroků dalšího zpracování hmyzu k docílení jeho nezávadnosti.

Abychom mohli hmyz považovat za bezpečný, je důležité, aby byl kladen důraz na správné zpracování a skladování hmyzu. Vhodná manipulace a spracování hmyzu je cesta, jak zamezit tomu, aby se produkčně chovaný hmyz stal vektorem přenosu patogenních organismů (Baiano, 2020).

Proto není doporučena konzumace hmyzu v surovém stavu, a vždy je pro spotřebitele lepší hmyz nějakým způsobem upravit. Je zapotřebí dalšího výzkumu k určení optimálních metod zpracování pro bezpečnost potravin vzhledem ke zdravotním rizikům (Stull et Platz, 2020).

### **3.4.3 Mykotoxiny**

Jedlý hmyz může být kontaminován mykotoxiny díky špatné manipulaci nebo špatnému skladování za neoptimálních podmínek. Byl zaznamenán přenos deoxynivalenolu z pšeničných otrub do larev moučných červů, důvodem byly vysoké koncentrace mykotoxinů v otrubách, které sloužily jako chovný substrát pro larvy moučných červů (Baiano, 2020).

Sice byla prokázána přítomnost mykotoxinů, otázkou však zůstává, jestli a jak se hmyz vyrovná s těmito kontaminanty. Dle Van Huis (2020) se larvy moučných červů, které byly vystaveny působení mykotoxinu deoxynivalenolu, vyvíjely normálně a degradovaly mykotoxin na koncentrace nižší, než byly regulační limity pro potravinářství nebo krmivářství. Ačkoli i u jiných studií nebylo zjištěno závadné množství mykotoxinů, je důležité hodnoty mykotoxinů v hmyzu sledovat, a zkoumat.

### **3.4.4 Pesticidy**

Akumulace insekticidů (chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, pirimifos-methyl) byla studována v larvách bráněneki. Larvám bylo zkrmováno krmivo, které bylo kontaminováno těmito látkami. Výsledkem studie bylo, že se pesticidy v larvách nehromadily, ani neovlivnily jejich růst (Van Huis, 2020). Lalander et al. (2016) rovněž nepotvrdil bioakumulaci fungicidů, kterými byl obohacen chovný substrát hmyzu. Tato zjištění mohou představovat obrovskou výhodu, jestliže je hmyz schopný takto, pro zdraví finálních konzumentů, nebezpečné látky ve svém těle rozkládat a neakumulovat, mohl by být využíván při likvidaci odpadů a následně využit jako krmivo, či potravina.

### **3.4.5 Těžké kovy**

Krmné substráty pro hmyz mohou obsahovat environmentální kontaminanty v podobě těžkých kovů, chemických prvků jako je selen, dioxiny a jiné organochloriny a polybromované difenyl ethery, které mohou být bioakumulovány v jedincích žijících na těchto substrátech (Baiano, 2020).

Dle Van Huis, (2020) měla kontaminace potravy larev black soldier fly těžkými kovy za následek narušený růst larev a následné hromadění kadmia a rtuti v larvách poukazuje na vysoké riziko z hlediska bezpečnosti potravin. Když byly těžké kovy (Ca, Cu, Pb, Zn) studovány u larev potěmníků moučných a brazilských, byla hodnota olova pod detekčními limity, ale ostatní kovy vykazovaly vysoký obsah, což larvy činilo nepoužitelné pro spotřebu.

### 3.4.6 Léčiva

Dle Van Huis (2020) bylo prokázáno, že larvy black soldier fly neakumulovaly ve svých tělech ani jedno ze tří podávaných léčiv (karbamazepin, roxithromycin, trimethoprim). Také množství reziduí těchto léčiv, jakož i dvou zároveň sledovaných fungicidů, bylo nižší ve výkalech, které tyto larvy vyprodukovaly nežli v kontrolním vzorku. V jiném pozorování bylo zjištěno, že antibiotikum sulfonamid se může objevit reziduálně ve výkalech larev black soldier fly, avšak v nízkých koncentracích ( $>1$  mg/kg) a zkrmování potravy obohacené o tuto léčivou látku nemělo žádný vliv na přežití larev. Z těchto výsledků vyplývá, že použití larev bráněnky při zkrmování kontaminovaných krmiv pravděpodobně brání šíření léčiv a pesticidů dále do životního prostředí. Toto zjištění otevírá obrovské možnosti využívání hmyzu k likvidaci odpadní biomasy a její transformace do zdroje živočišných bílkovin.

### 3.5 Potemník moučný

Systémové zařazení <i>Tenebrio molitor</i> (Brendell, 1975)	
Kategorie	Název
<b>ŘÍŠE</b>	Živočichové ( <i>Animalia</i> )
<b>KMEN</b>	Členovci ( <i>Arthropoda</i> )
<b>TŘÍDA</b>	Hmyz ( <i>Insecta</i> )
<b>ŘÁD</b>	Brouci ( <i>Coleoptera</i> )
<b>PODŘÁD</b>	Všežraví ( <i>Polyphaga</i> )
<b>ČELEĎ</b>	Potemníkovití ( <i>Tenebrionidae</i> )
<b>ROD</b>	Potemník ( <i>Tenebrio</i> )
<b>DRUH</b>	Potemník moučný ( <i>Tenebrio molitor</i> )

#### 3.5.1 Obecná charakteristika

Latinským pojmenováním *Tenebrio molitor*, česky zvaný potemník moučný. Jedná se o kosmopolitně rozšířený druh brouka hnědo až černého zbarvení, jehož velikost se pohybuje v rozmezí 12-18 mm. Ve volné přírodě potemníky najdeme v například v tlejícím materiálu, konkrétně v opadu listnatých stromů či v hnízdech ptáků. V převážné většině se však s nimi setkáváme v blízkosti lidských obydlí, protože se jedná o skladištního škůdce, který se živí moukou a jinými obilnými produkty (Hůrka, 2005).

Jedinci tohoto druhu aktivují převážně v noční době, přes den se většinou ukrývají a ukrývají se v různých skulinách. Rostlinná složka tvoří největší podíl jejich potravy, zejména pokud žijí v lidské blízkosti. V přírodě se živí kromě rostlinných zbytků, také larvami podkorního hmyzu a jejich exkrementy (Zahradník, 2008).

#### 3.5.2 Vývojový cyklus

Snůška samice potemníka moučného je tvořena přibližně 160 až 280 vajíčky, jejichž povrch je lepkavý. Doba, než se z vajíček vylíhnou larvy, se pohybuje v tozmezí 2 týdnů od naklazení. Čerstvě vylíhlá larva je světlá, až bělavé barvy a díky růstu a svlékání, ke kterému může dojít až 16x, postupně mění svoje zbarvení od bílé, přes žlutou až po světle hnědou barvu. Povrch těla larev je poměrně pevný a odolný díky kutikule, kterou tvoří chitin (Zahradník, 2008). Velikost larvy může dosahovat 30 mm a během svého vývoje prochází jednotlivými instary, kterých může být od 8 až více než 20 (Cotton & St. George, 1929). Konkrétní počet instarů u larev je ovlivněn mnoha faktory. Mezi vnější faktory ovlivňující vývoj spadá kvalita a množství potravy, teplota, vlhkost, fotoperioda a také stáří rodičů (Murray, 1960, Ludvig & Fiore 1960). Dle Esperk et al. (2007) se počet instarů zvyšuje v nepříznivých podmínkách.

Studie Morales-ramos et al. (2010) uvádí, že počet instarů má značný vliv na celkovou délku vývoje. Dále tvrdí, že délka prvních čtyř stádií bývá zpravidla u všech jedinců stejná a není ovlivněna výživovými podmínkami, jedná se tedy pravděpodobně o stabilní část vývojového cyklu. Závěrečný instar, před zakuklením, má specifické vlastnosti. Poslední instar lze rozlišit díky morfologickým změnám kutikuly a vývoje očí, larva je v tomto instaru schopna se zakuklit a tím dokončit svůj vývojový cyklus i při nedostatku potravy, zatímco předchozí instary při hladovění svlékání potlačují (Connat et al. 1991).

Za zmínku stojí rovněž schopnost larev odolávat vůči hladovění, které může trvat až 9 měsíců. K zakuklení larev dochází v řídkém substrátu a za následujících 14 dní se z kukel líhnou dospělci. Tento cyklus může trvat až 2 roky (Zahradník, 2008).



### 3.5.3 Využití potemníka moučného

Dospělce i larvy potemníků moučných považujeme zpravidla za škůdce, jelikož se larvy i dospělci živí obilninami a tím pádem je z lidského úhlu pohledu znehodnocují. Avšak v poslední době se tento druh začal hojně využívat v hospodářském významu (Zahradník 2008).

Dochází k masové produkci potemníků moučných, protože jsou larvy tohoto druhu považovány za jedno z nejběžnějších krmiv pro zvířata chovaná v zajetí, konkrétně pro ptactvo, plazy, obojživelníky i některé drobné savce. Výhodou chovu potemníků je zejména nenáročný chov a proto, že se snadno rozmnožují (Klasing et al. 2000). Právě ekonomičnost a snadná dostupnost potemníků z nich učinila vhodný modelový organismus (Clopton et al. 1991).

## 3.6 Paracetamol

Paracetamol je systematickým názvem 4-hydroxyacetanilid, nebo *N*-acetyl-*p*-aminophenol, dále acetaminofen. Jedná se o analgetikum a antipyretikum, které je řazeno do nenarkotik širokého využití. Nemá žádné, nebo pouze slabé protizánětlivé účinky (Toussaint et al. 2010).

### 3.6.1 Historie paracetamolu

Paracetamol byl poprvé nesyntetizován v roce 1878 americkým chemikem Morsem a posléze roku 1887 byl poprvé klinicky použit německým lékařem Josephem von Meringem. Paracetamol byl velice rychle nahradil látku zvanou fenacetin, o kterém bylo později prokázáno, že má nefrotoxické vlastnosti a tím se Paracetamol začal hojněji používat až v 50. letech 19. století (Bertolini et al. 2006).

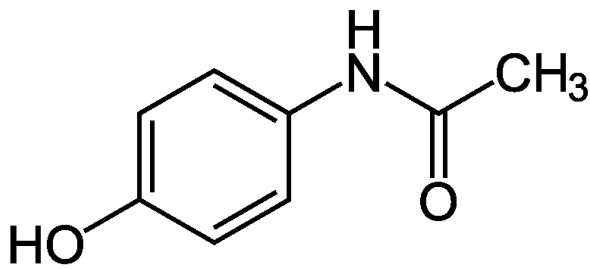
První uvedení léčivého přípravku na trh proběhlo v USA v roce 1950 pod názvem Triogesic, a kromě paracetamolu obsahoval také kofein a aspirin. Tento přípravek byl však zanedlouho stažen z trhu. Dále se v roce 1955 uvedl na trh Tylenon, který byl pouze na předpis a rok na to čili roku 1956 byl představen Panadol na Britském trhu (Toussaint et al. 2010).

Větší popularitu získal Paracetamol až v 80 letech, díky Reyovu syndromu, který byl spojován s užíváním aspirinu (Toussaint et al. 2010). Od té doby považujeme Paracetamol za jeden z nejpoužívanějších a nejrozšířenějších léčiv pro léčbu horečky a bolestí na světě (Bertolini et al. 2006).

### 3.6.2 Charakteristika

Strukturní vzorec paracetamolu je uveden na Obrázku 1. Sumární vzorec paracetamolu je  $C_8H_9NO_2$ . Molekulová hmotnost paracetamolu je 151,16 g/mol.

Sloučenina paracetamolu má aromatický charakter. Na benzenovém jádře má substituovanou jednu hydroxylovou skupinu a dusíkový atom amidové skupiny v poloze para (1,4). Amidovou skupinou tvoří acetamid. Díky dvěma vazebným skupinám je benzenový kruh vysoce reaktivní. Paracetamol je více rozpustný v alkoholech nežli ve vodě (Marzuillo et al. 2014).



Obrázek 1: Strukturální vzorec paracetamolu.

Paracetamol se používá zpravidla v perorální formě a jeho účinkem je tlumení střední až těžké bolesti, zvýšené teploty až horečky. Jeho podání může být rovněž intravenózní či per rectum po operacích ke krátkodobému léčení mírné bolesti (Moriarty et Carroll 2016).

### 3.6.3 Toxicita

Dle Zaher et al. (1998) je paracetamol považován za bezpečný lék, jestliže je užíván v doporučených dávkách. Pokud je požit velké množství tohoto léčivého přípravku může nastat projev masivní jaterní nekrózy jak u pokusných organismů, tak i u člověka. Perorální dávka paracetamolu u dospělých se pohybuje okolo 650–1000 mg každé 4 hodiny v závislosti na potřebě. Maximální doporučenou denní dávkou u dospělých jsou 4 g. Doporučené množství paracetamolu u dětí je v rozmezí 10-15 mg/kg tělesné váhy jedince každých 4-6 hodin, přičemž počet dávek za den by neměl přesáhnout hranici pěti dávek. Dostavení účinku paracetamolu přichází v řádech desítek minut, konkrétně při perorálním podání zhruba za půl hodiny a trvání analgetického účinku je přibližně 4 hodiny (Bertolini et al. 2006).

Dle McGill et al. (2012) je předávkování paracetamolem hlavní příčinou akutního selhání jater v USA i v mnoha dalších západních zemích. Kvůli překročení denní dávky paracetamolu, která by neměla činit více než 4 gramy, je zaznamenáno mnoho případů neúmyslného poškození. Poškození jater může zabránit *N*-acetylcystein, popřípadě jiný donor thiolové skupiny, pokud je podán do 12-24 hodin po požití paracetamolu. Problém s léčbou nastává, protože neúmyslné předávkování je obvykle rozpoznáno až po delším časovém úseku. (McGill et al. 2012, Kučera et al. 2012). Pouze ve Spojených státech amerických zemí následkem předávkování paracetamolem 500 lidí ročně, přičemž polovina těchto případů je výsledkem úmyslného předávkování (McGill et al. 2012). Je důležité podotknout, že hepatotoxicky nepůsobí samotný paracetamol, ale jeho reaktivní metabolit *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin (Lancaster et al. 2015).

Krom hepatotoxických reakcí může po zvýšeném užití paracetamolu docházet i k nefrotoxickým stavům. Nefrotoxicita způsobená paracetamolem méně častá než hepatotoxicita, je nutné sledovat funkci ledvin po předávkování paracetamolem (Stern et al. 2005). V některých případech se může po předávkování objevit akutní renální selhání (přibližně u 1-2 % pacientů) jako komplikace hepatotoxicity (Vrbová et al. 2016).

## 4 Materiál a metody

Praktická část diplomové práce byla založena hlavně na pozorování hmyzu. Sledování bylo zaměřeno na to, jak, a jestli vůbec ovlivní předpokládané různé hladiny paracetamolu obsaženého v kmivu život larev, zda nedojde ke zvýšení mortality, nebo tomu bude naopak a přítomnost paracetamolu bude na larvy působit příznivě na aktivitu, nebo přírůstek biomasy.

### 4.1 Materiál

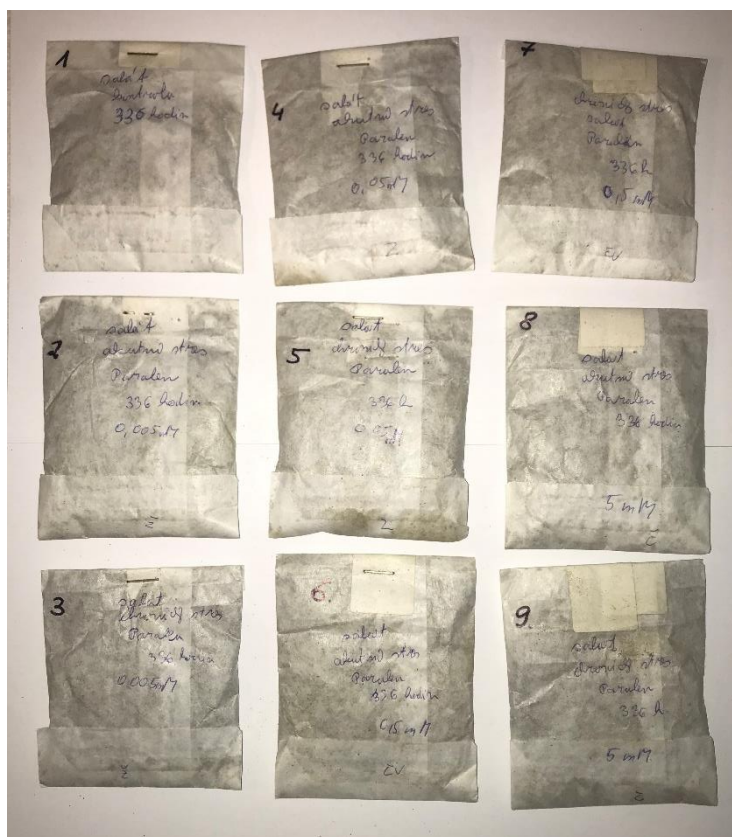
Praktická část diplomové práce spočívala v pozorování a výkrmu larev potěmníků moučných. Larvy byly získány z chovu firmy Papek s.r.o., která se zabývá chovem a prodejem krmného hmyzu i hmyzu určenému k lidské konzumaci. Pro tento experiment byly využity larvy ve stáří 52 dní, takto staré larvy byly vybrány pro jejich zvýšený žír, ale zároveň již dosahují velikosti vhodné k prodeji. Hmyz byl vylučněn a oddělen od výkalů.

Cílem celého experimentu bylo, aby pozorované skupinky larev zkonzumovaly vzorky sušeného salátu, který byl kontaminován paracetamolem a následné sledování, jak budou larvy na tuto potravu reagovat.

Další součástí experimentu byly právě vzorky salátu vyzobrazené na obrázku 2. Tyto vzorky byly poskytnuty Katedrou botaniky a fyziologie rostlin, Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze. Vzorky vznikly jakožto vedlejší materiál jiného experimentu, kdy byl sledován vliv paracetamolu na růst salátů (nádobové pokusy ve skleníku). Jednalo se o 9 vzorků. První byl tzv slepý, bez obsahu paracetamolu a sloužil jako kontrola. Vzorky číslo 2 a 3 byly zalévány roztokem, který obsahoval 0,005 mM koncentraci paracetamolu, jediné, čím se liší byla délka působení roztoku s paracetamolem. Vzorek 2 byl vystaven akutnímu stresu (jednorázové zalití 150 ml roztoku po přesazení) na rozdíl tomu vzorek 3 byl vystaven chronickému stresu roztoku s obsahem paracetamolu (zalévání roztokem s paracetamolem 2 x týdně po celou dobu pěstování). Vzorek 4 byl vystaven roztoku o koncentraci 0,05 mM při akutním stresu, sáček číslo 5 obsahoval salát zaléváný roztokem s koncentrací rovněž 0,05 mM vystaven chronickému stresu. Vzorky 6 a 7 vystavené roztoku se společnou koncentrací 0,5 mM rovněž rozdělovala doba působení paracetamolu na rostliny. V poslední řadě sáčky se vzorky 8 a 9, oba zalévány roztokem s nejvyšší koncentrací a to 5 mM paracetamolu, vzorek 8 podléhal akutnímu stresu na rozdíl od vzorku 9, který byl vystaven chronickému působení. Vzorky byly uchovány v papírových sáčcích, které byly zapečetěny, aby bylo zabráněno rozsypaní a popsány, aby nedošlo k záměně vzorků. Pro přehlednost jsou tyto údaje uvedeny v následující tabulce 1.

Číslo vzorku	Koncentrace roztoku	Vystavení
1	0 – slepý vzorek	-
2	0,005 mM	Akutní
3	0,005 mM	Chronické
4	0,05 mM	Akutní
5	0,05 mM	Chronické
6	0,5 mM	Akutní
7	0,5 mM	Chronické
8	5 mM	Akutní
9	5 mM	Chronické

Tabulka 1: Souhrn použitých vzorků salátu.



Obrázek 2: Vzorky kontaminovaného salátu.

V neposlední řadě byla při experimentu využita krmná mrkev, kterou je hmyz krměn ve firmě Papek s.r.o. Mrkev pochází z české produkce společnosti VH Agroprodukt, spol. s r.o.

## 4.2 Experimentální část

### 4.2.1 Předběžný test

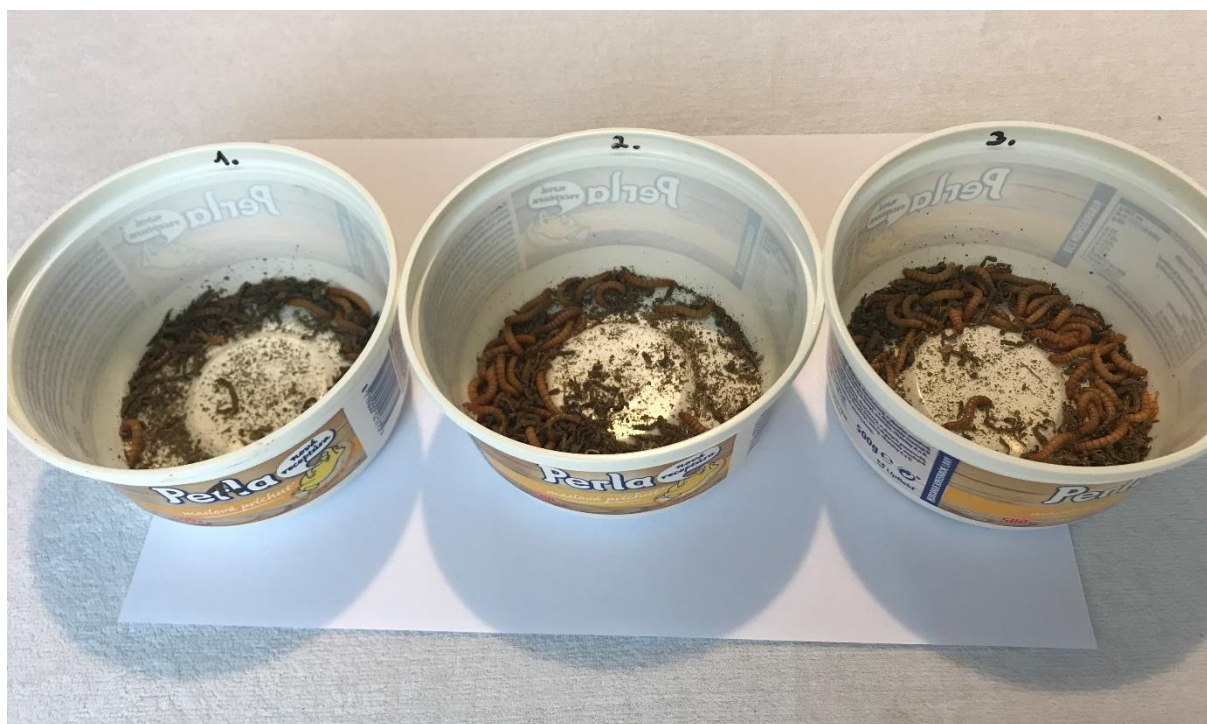
Nejprve by proveden předběžný test, který pomohl ke stanovení navážek jednotlivých komponentů – hmyzu, vzorků salátu a mrkve. Mrkev v tomto případě měla hlavně zvlhčovací funkci, aby byly sypké vzorky salátu lépe konzumovatelné a více přitažlivé pro larvy. Tento test se skládal ze 3 pozorovaných skupin larev o stejném stáří v nádobách, z nichž do první byly naváženy 3 g larev, 1 g vzorku krmiva a 5 g mrkve. Ve druhé nádobě bylo 6,1 g larev, 1 g vzorku krmiva a 5 g mrkve a v poslední bylo 9 g larev, 1 g vzorku krmiva a 5 g mrkve. Larvy byly ponechány 24 hodin v přístupu ke směsi mrkve a krmiva a po této době bylo zjištěno, že ani jedna z pozorovaných skupin nebyla schopna zkonzumovat celé množství směsi. Bylo nutné zachovat poměr sypké části směsi s množstvím mrkve, aby byla vytvořena vhodná konzistence, proto se při samotném testu navýšilo množství larev, aby byly schopné zkonzumovat většinu krmné směsi.

Na snímku číslo 3 jsou vzorky předběžného testu označené číslicemi 1 až 3.



Obrázek 3: Vzorky předběžného testu.

Na obrázku 4 je zachycen stav vzorků po 24 hodinách. Z fotografie je viditelné, že ani jedna z pozorovaných skupin během tohoto časového úseku nezakonzomovala veškeré množství krmiva.



Obrázek 4: Stav předběžného testu po 24 hodinách.

#### 4.2.2 Vlastní experiment

Na základě předběžného testu bylo zvýšeno, pro samotný experiment, množství sledovaných larev. Stejně jako u předtím byly využity larvy stáří nyní již 55 dní. Hmyz nebyl 48 hodin před experimentem vystaven přítomnosti jakéhokoli krmiva, tudíž byl vyláčen a oddělen od výkalů. Bylo zhotoveno 9 skupin vzorků při třech opakováních. Experimentální část diplomové práce probíhala v domácích podmínkách díky pandemii koronaviru, tudíž se k vážení nevyužívaly laboratorní váhy, ale byla použita váha Professional Digital Pocket Scale Balance Weigh Texas USA, která váží s přesností na desetiny gramu, tato váha je vyzobrazena na obrázku 5 spolu s komponenty, které tvořily sledované skupiny. V příloze 1 jsou uvedeny veškeré naměřené hodnoty. Hmotnost hmyzu činila v průměru 15,1 g což odpovídalo průměrnému množství 150,2 kusů larev na vzorek. Následně byla do každé sledované skupiny přidána směs mrkve, která činila v průměru 4,99 g a k ní byla následně přisypána sypká složka v podobě hrubšího prášku z kontaminovaného salátu, jejíž hmotnost byla v průměru 1 g. Takto připravené vzorky byly umístěny v čistých plastových nádobách, které původně sloužily jako obaly pro rostlinný margarín, viz fotografie číslo 6. Vzorky hmyzu v nádobách zůstaly při pokojové teplotě ladem po dobu 24 hodin, při kterých byl průběžně sledovány. Po uplynutí této doby byly larvy odděleny od zbytků nezkonsumovaného materiálu, pomocí kuchyňského sítka. Zbytek byl následně zvážen a hmyz se nechal vytrávit bez přístupu krmiva následujících 12 hodin. Po uplynutí lačnické fáze byly larvy opět prosity od výkalů, zváženy, spočítány a následně zabaleny do papírových sáčků. Každý ze sáčků byl popsán a zapečetěn, aby nedošlo k záměně či smíchání hmyzu. Takto připravené vzorky byly zamražené v klasickém mrazicím boxu při teplotě  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následně byly vzorky přepraveny do mrazicího boxu na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky k případným laboratorním rozborům.



Obrázek 5: Vážení jednotlivých komponentů vzorku.



Obrázek 6: Připravené vzorky.

Poslední měření proběhlo na půdě univerzity, konkrétně v laboratořích katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky. Probíhalo měření hmotnosti, kdy bylo z každé sledované skupiny odebráno 10 kusů larev o 4 opakováních a následné určení hmotnosti jedné larvy. Naměřené hmotnosti jsou vedeny v příloze 2. z naměřených dat vyplývá, že průměrná váha 10 kus larev činila 1,118 g, tudíž průměrná váha jedné larvy odpovídala hmotnosti 0,1118 g.

### 4.3 Statistické metody

V rámci statistického zpracování dat bylo k ověření obou hypotéz zvolen neparametrický test založený na pořadí. A protože byly sledovány rozdíly mezi více než dvěmi skupinami, byl zvolen Kruskal-Wallisův test u obou hypotéz. Testy byly prováděny na hladině významnosti 0,05

## 5 Výsledky

### 5.1 Pozorování

Po smíchání všech komponentů a uložení vzorků do nádob byly pravidelně pozorovány. Během prvních 4 hodin byla patrná zvýšená aktivita hmyzu. Larvy obklopily krmnou směs a bylo jasně viditelné, že distribuce krmiva byla rovnoměrná. Po následujících 10 hodinách byl znát mírný útlum aktivity larev, ale stále projevovaly zájem o krmivo. Během celého pozorování nebyly ani u jednoho vzorku zaznamenány známky úhynů, larvy si udržovaly stále hnědo-zlatavé zbarvení a v žádném ze vzorků nebylo pozorování tmavnutí larev. Po uplynutí pozorovací fáze 24 hodin byly ve vzorcích zbytky nezkonzumované potravy. Množství nezkonzumovaného materiálu však nebylo nijak markantní, činilo v průměru 1,44 g. Ani po odstranění nezkonzumovaného materiálu a ponechání larev 12 hodin bez přístupu krmiva, nevykazovaly larvy změny vitality.

### 5.2 Změna hmotnosti.

H1: Se zvyšující se koncentrací paracetamolu v krmivu se zvětší i změna hmotnosti larev v porovnání před a po zkonzumování kontaminovaného salátu.

Stanovení statistické hypotézy:

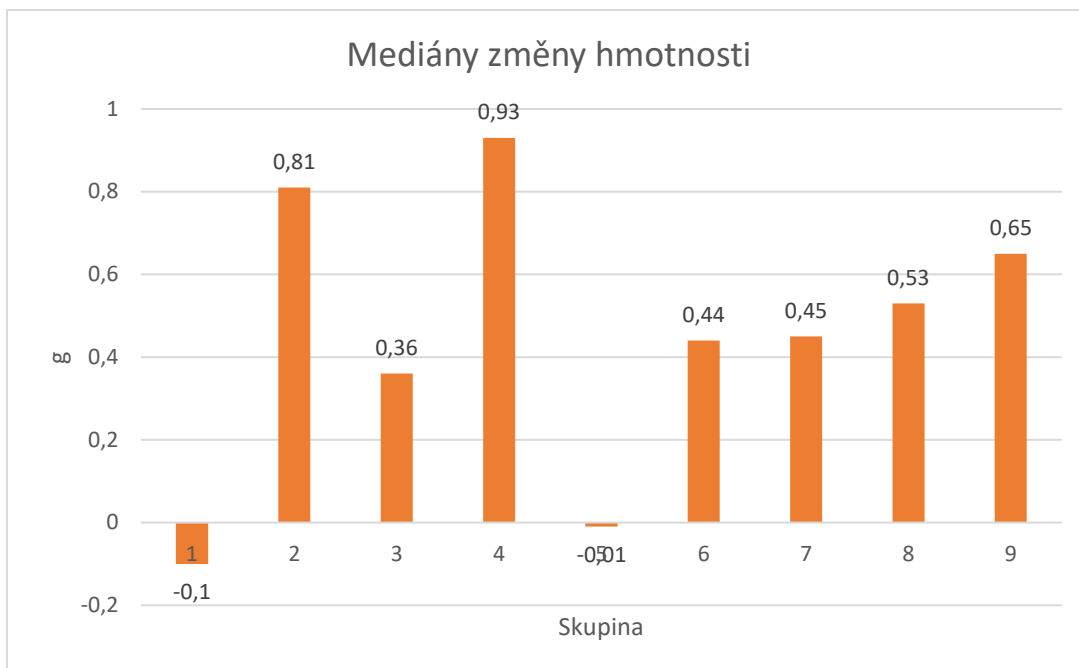
H0: Koncentrace paracetamolu v krmivu nemá vliv na změnu hmotnosti larev po zkonzumování kontaminovaného salátu.

HA: Koncentrace paracetamolu v krmivu má vliv na změnu hmotnosti larev po zkonzumování kontaminovaného salátu.

Hypotéza ověřuje vztah dvou proměnných, jedné kategoriální (skupina 1–9) a druhé metrické (změna hmotnosti larvy). Jelikož jsou ve skupinách vždy jen tři vzorky, tedy velmi nízký počet, byl použit k ověření hypotézy neparametrický test založený na pořadí. A protože sledujeme rozdíl mezi více než dvěma skupinami, byl zvolen Kruskal-Wallisův test. Test byl proveden na hladině významnosti 0,05.

Na grafu č.1 jsou zobrazeny mediány ve skupinách vzorků.





Graf 1: Mediány změny hmotnosti.

Z grafu mediánů vyplývá, že se hypotéza o rostoucí změně hmotnosti s rostoucí koncentrací paracetamolu v krmivu moc nepotvrzuje.

V tabulce 2 jsou uvedené výsledky Kruskal-Wallisova testu:

Závislá: Změna hmotnosti	Kruskal-Wallisova ANOVA založ. na poř.; Změna hmotnosti Nezávislá (grupovací) proměnná: Vzorek Kruskal-Wallisův test: $H(8, N=27) = 15,303$ $p = 0,0535$		
	Počet (platných)	Součet (pořadí)	Prům. (Pořadí)
1	3	14,0	4,7
2	3	65,5	21,8
3	3	24,0	8,0
4	3	74,0	24,7
5	3	30,0	10,0
6	3	38,0	12,7
7	3	44,5	14,8
8	3	48,0	16,0
9	3	40,0	13,3

Tabulka 2: Výsledky Kruskal-Wallisova testu změny hmotnosti.

Z výsledků Kruskal-Wallisova testu vyplývá, že největší změnu hmotnosti vykazují vzorky 4 a 2, nejmenší vzorky 1 a 3.

Hodnota testovacího kritéria je 15,3 a vypočtená p-hodnota je 0,0535. P-hodnota je vyšší než zvolená hladina významnosti 0,05, nulová hypotéza tedy nebyla zamítnuta. Nepodařilo se prokázat, že by měla koncentrace paracetamolu v krmivu statisticky významný vliv na změnu hmotnosti larev.

### 5.3 Mortalita.

H2: Se zvyšující se koncentrací paracetamolu v krmivu se zvýší mortalita larev po zkonsumování kontaminovaného salátu.

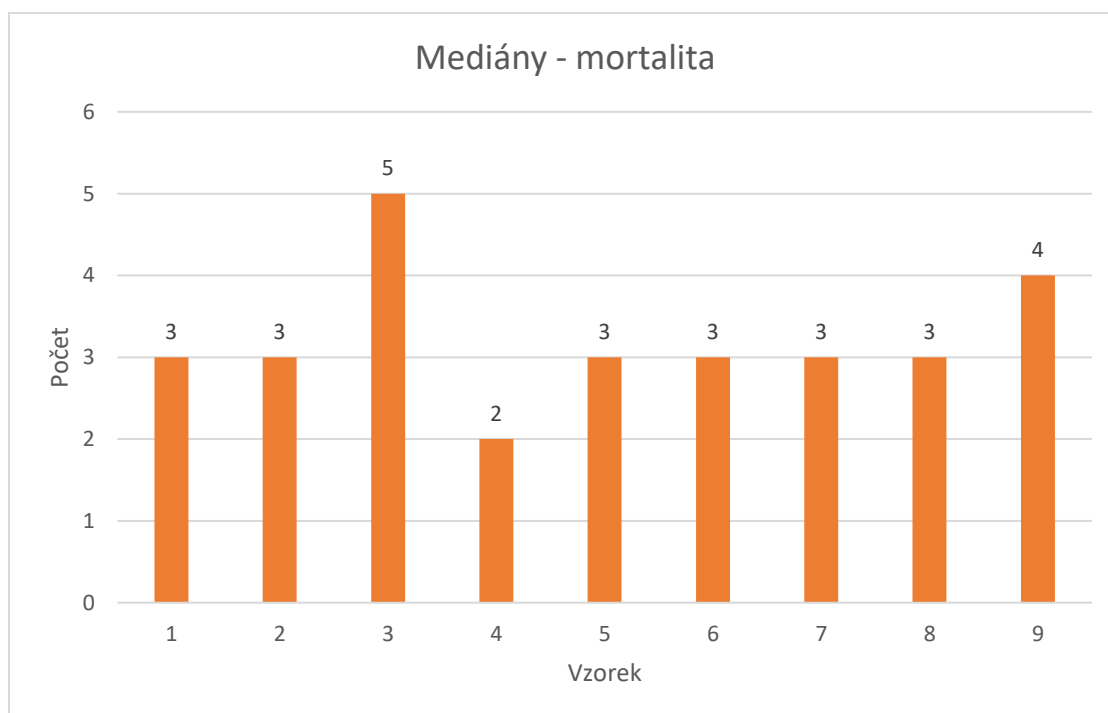
Stanovení statistické hypotézy:

H0: Koncentrace paracetamolu v krmivu nemá vliv na mortalitu larev po zkonsumování kontaminovaného salátu.

HA: Koncentrace paracetamolu v krmivu má vliv na mortalitu larev po zkonsumování kontaminovaného salátu.

Hypotéza ověřuje vztah dvou proměnných, jedné kategoriální (skupina 1–9) a druhé metrické (mortalita – počet mrtvých larev). Jelikož jsou ve skupinách vždy jen tři vzorky tedy velmi nízký počet, byl zvolen k ověření hypotézy neparametrický test založený na pořadí. A protože byl sledován rozdíl mezi více než dvěmi skupinami, byl zvolen Kruskal-Wallisův test. Test byl proveden na hladině významnosti 0,05.

V grafu číslo 2 jsou zobrazeny mediány ve skupinách vzorků.



Graf 2: Mediány mortality larev.

Dle grafu mediánů je patrné, že se mortalita mezi skupinami moc nelišila. Následující tabuka 3 uvádí výsledky Kruskal-Wallisova testu pro mortalitu.

Výsledek testu:

Závislá: Mortalita	Kruskal-Wallisova ANOVA založ. na poř.; Mortalita Nezávislá (grupovací) proměnná: Vzorek Kruskal-Wallisův test: $H(8, N=27) = 5,850$ $p = 0,6640$		
	Počet (platných)	Součet (pořadí)	Prům. (Pořadí)
1	3	52,5	17,5
2	3	29,0	9,7
3	3	54,5	18,2
4	3	24,0	8,0
5	3	50,5	16,8
6	3	43,5	14,5
7	3	39,5	13,2
8	3	33,0	11,0
9	3	51,5	17,2

Tabulka 3: Výsledky Kruskal-Wallisova testu mortality.

Z výsledků Kruskal-Wallisova testu vykazují největší mortalitu vzorky 1 a 3, nejmenší vzorky 4 a 2.

Hodnota testovacího kritéria je 5,9 a vypočtená p-hodnota je 0,664. P-hodnota je vyšší než zvolená hladina významnosti 0,05, tudíž nulovou hypotézu nezamítáme. Nepodařilo se nám prokázat, že by měla koncentrace paracetamolu v krmivu statisticky významný vliv na mortalitu larev.

## 6 Diskuze

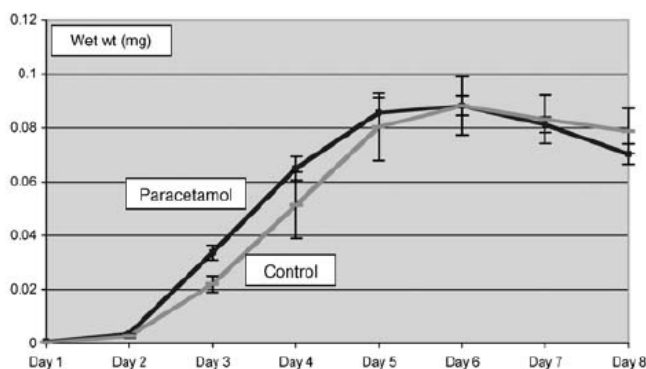
Srovnávání výsledů této práce s jinými bylo velice složité, protože doposud není žádná literatura, která by se zabývala rozbořením a sledováním účinků paracetamolu na vývoj larev *Ternebrio molitor*. K porovnání byly využity články od tvůrců Fuke et al. (1997) a O'Brien et Turner (2004), přičemž obě studie jsou z oboru forenzní entomologie. Poznatky o reziduích látek v larvách bzučivek totiž mohou v praxi napomáhat při forenzních analýzách a zjišťování příčin a doby úmrtí lidí. Dle O'Brien et Turner (2004) bylo zneužívání analgetik, jako je paracetamol, roce 2000 zodpovědné za více než 1 000 úmrtí obyvatel Velké Británie.

Práce Fuke et al. (1997) se zabývala odchovem larev *Calliphora vicina* na potravinách obohacených koncentracemi aspirinu (kyselina acetylsalicylová), salicylátu sodného, paracetamolu, aminohippurátu sodného, amfetamin sulfátu a barbiturátů thiopentonu, fenobarbitonu, amylobarbitonu, barbitonu a barbitonu. Následně byly larvy bzučivek sklizeny buď 6., 7. nebo 8. den pro analýzu obsahu léčiva. Výsledkem práce bylo zjištění, že látky paracetamol, aspirin, amylobarbiton a thiopenton nebyly detekovány u larev krmených potravou obsahující koncentraci léčiva ekvivalentní koncentracím očekávaným v kosterním svalu při smrtelném předávkování člověka.

Článek O'Brien et Turner (2004) se zabývali otázkou, zda má paracetamol nějaké významné účinky na vývoj bzučivek. Skupiny larev *Calliphora vicina* byly odchovány na směsích vepřových jater s práškem čistého paracetamolu (4-acetamidofenolu). Paracetamol byl použit v pěti koncentracích: 1 000 mg/kg, 500 mg/kg, 250 mg/kg, 100 mg/kg a 0 mg/kg. Pro představu, hodnota 250 mg/kg udává letální koncentraci léku u lidí, kteří zemřeli z důvodů předávkování paracetamolem.

### 6.1 Vliv paracetamolu na přírůstek hmyzu

Z výsledků práce O'Brien et Turner (2004) vyplývá, že různé dávky paracetamolu nezpůsobovaly významný rozdíl v přírůstcích larev. Až na jednu výjimku se larvy krmené jakoukoli koncentrací paracetamolu významně nelišily od kontroly, což je patrné z grafu číslo 3. Graf naznačuje, že požití paracetamolu mírně zrychluje rychlost růstu larev v průběhu 2 až 4 dne odchovu, ale ve své podstatě se rozdíly v rychlostech růstu hmyzu významně nelišily od kontroly.



**Fig. 1** Larval growth in terms of wet weight, of *Calliphora vicina*. Because larvae feeding on different concentrations of paracetamol demonstrated no significant difference, the data have been combined and labeled paracetamol. The control plot is of larvae feeding on a concentration of 0 mg/kg

Graf 3: výsledky studie O'Brien et Turner (2004)

K obdobným výsledkům bylo dosaženo i v rámci této diplomové práce. Nebylo prokázáno, že by krmivo obohacené o různé koncentrace paracetamolu, mělo výsledný vliv na přírůstek larev. Zajímavé jsou vyšší změny hmotnosti u larev, které byly krmené saláty s akutní zálivkou o nejnižší koncentraci paracetamolu (vzorky 2 a 4).

## **6.2 Vliv paracetamolu na mortalitu hmyzu**

Ani v jedné z prací nebyl zmíněn vztah obsahu paracetamolu a mortality. Je možné, že tento ukazatel buď nebyl sledován, nebo byla závislost míry koncentrace paracetamolu na mortalitu zanedbatelná až nulová. Tento fakt by souhlasil s výsledky této diplomové práce, ze které vyplývá, že různé koncentrace paracetamolu v krmivu neměly statisticky významný vliv na výslednou úmrtnost hmyzu.

Získané výsledky jsou součástí studie, která počítala i se stanovením koncentrací reziduí paracetamolu a jeho případných metabolitů v listech salátu i v larvách *T. molitor*. Z důvodu opatření proti šíření epidemie ale nebylo možno tato měření do termínu odevzdání práce uskutečnit, a budou provedena až posléze. Teprve pak bude možné vyhodnotit experiment komplexněji. Výsledky chovného pokusu již nicméně naznačují, že larvy potměníka moučného mají potenciál tolerovat zeleninu potenciálně obsahující zbytky léčiv. Bude tedy zajímavé zjištění, zdali jsou schopny toto léčivo jen kumulovat či metabolizovat na jiné látky.

## 7 Závěr

- V teoretické části této diplomové práce byla zpracována literární rešerše shrnující potenciál hmyzu v roli krmiva či potravy. Zmíněna byla rovněž dobrá bilance nutričních hodnot a schopnost s nimi částečně manipulovat pomocí potravy, kterou hmyz přijímá. Mezi další nespornou výhodou produkčního chovu hmyzu se řadí udržitelnost. Hmyz se vyznačuje vysokou schopností konverze krmiva. Růst biomasy je zpravidla velmi rychlý, významná je rovněž vysoká produkce potomstva. Navzdory těmto faktům má chov hmyzu minimální dopady na životní prostředí v porovnání s konvenčními chovy hospodářských zvířat. Hmyz rovněž může hrát roli v odpadovém hospodářství, jakožto likvidátor organických odpadů, které mohou být využity jako krmivo.

Dále byl v práci zmíněn legislativní postoj vůči využití hmyzu v potravinářství v rámci Evropské unie, který se vztahuje i na Českou republiku.

V neposlední řadě byly v této práci zmíněny bezpečnostní hlediska hmyzu, a to konkrétně nebezpečí pro konzumenty v podobě možných alergických reakcí, mikrobiálních a virových kontaminací, možné kontaminace mykotoxiny a rezidui dalších nechtěných látek v podobě pesticidů, těžkých kovů a léčiv.

V rešerši byly uvedeny bližší informace o druhu *Tenebrio molitor* a léčivu paracetamol, se kterými se pracovalo v praktické části.

- V rámci praktické části byl proveden experiment, při kterém byla sledována reakce *Tenebrio molitor* na předloženou potravu obohacenou o paracetamol. Konkrétně byly pozorovány skupiny larev stáří 55 dnů. Larvám bylo předloženo krmivo složené z mrkve a vzorků salátu, které byly pěstovány za přítomnosti různých koncentrací paracetamolu. Larvy konzumovaly tuto směs po dobu 24 hodin a následně byly ponechány 12 hodin ladem, bez přístupu krmiva, k vyláčení.

Během sledování, nebyly zaznamenány žádné změny v chování larev ani žádné známky úhynů. Následně byly zpracovány získaná data a stanoveny dvě hypotézy.

- Hypotéza H1: Se zvyšující se koncentrací paracetamolu v krmivu se zvětší i změna hmotnosti larev v porovnání před a po zkonzumování kontaminovaného salátu.

Ze získaných dat byla vypočtená p-hodnota, která odpovídala hodnotě 0,0535. P-hodnota byla tedy vyšší než zvolená hladina významnosti 0,05, nulová hypotéza tedy nebyla zamítnuta a z výsledků vyplývá, že se nepodařilo prokázat, že by měla koncentrace paracetamolu v krmivu statisticky významný vliv na změnu hmotnosti larev.

- Hypotéza H2: Se zvyšující se koncentrací paracetamolu v krmivu se zvýší mortalita larev po zkonzumování kontaminovaného salátu.

Na základě získaných dat byla vypočtena p-hodnota ve výši 0,664. P-hodnota je vyšší než zvolená hladina významnosti 0,05, tudíž nebyla nulová hypotéza zamítnuta. Nepodařilo se prokázat, že by měla koncentrace paracetamolu v krmivu statisticky významný vliv na mortalitu larev.

## 8 Literatura

- 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. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.03.040.
- Bertolini, A., Ferrari, A., Ottani, A., Guerzoni, S., Tacchi, R., Leone, S. 2006. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Reviews*. 12 (3). 250-275.
- Clopton, R. E., Percival, T. J., Janovy, J. 1991. Gregarina niphandrodes N. Sp. (Apicomplexa: Eugregarinorida) from Adult *Tenebrio molitor* (L.) with Oocyst Descriptions of Other Gregarine Parasites of the Yellow Mealworm. *The Journal of Protozoology*. 38 (5). 472-479.
- Connat, J. L., Delbecque, J. P., Glitho, I., Delachambre, J. 1991. The onset of metamorphosis in *Tenebrio molitor* larvae (Insecta, Coleoptera) under grouped, isolated and starved conditions. *Journal of Insect Physiology*. 37 (9). 653-657.
- De Marco, M. et al. 2015. "Nutritional Value of Two Insect Larval Meals (*Tenebrio Molitor* and *Hermetia Illucens*) for Broiler Chickens: Apparent Nutrient Digestibility, Apparent Ileal Amino Acid Digestibility and Apparent Metabolizable Energy." *Animal Feed Science and Technology* 209: 211–18.
- Diener, Stefan et al. 2011. "Biological Treatment of Municipal Organic Waste Using Black Soldier Fly Larvae." *Waste and Biomass Valorization* 2(4): 357–63.
- Esperk, T., Tammaru, T., Nylín, S. 2007. Intraspecific Variability in Number of Larval Instars in Insects. *Journal of Economic Entomology*. 100 (3). 627–645.
- Fuke, C., Pounder, D. J., Sadler, D. W., Brown, G., Robertson, L. 1997. Barbiturates and Analgesics in *Calliphora vicina* Larvae. *Journal of forensic sciences*. 3 (42). 481-485.
- Graham, G. G., Davies, M. J., Day, R. O., Mohamudally, A., Scott, K. F. 2013. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology*. 21 (3). 201–232.
- Hůrka, K. 2015. *Brouci České a Slovenské republiky. 2*. Karoubek. Zlín. ISBN: 978-80-86447-17-9
- Ji, kunmei, Chen, J., Li, M., Liu, Z., Wang, C., Zhan, Z., Wu, X., Xia, Q. 2009. Anaphylactic shock and lethal anaphylaxis caused by food consumption in China. *Trends in food science & technology*. 2009 (20). 227-231.
- Klasing, K. C., Thacker, P., Lopez, M. A., Calvert, C. C. 2000. Increasing the calcium content of mealworms (*Tenebrio molitor*) to improve their nutritional value for bone mineralization of growing chicks. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 31 (4). 512-517.
- Kořínek, M. 1993. Chov krmného hmyzu, část 1. *Akvárium terárium*. 36 (8): 30–31.
- Kouřimská, L., Adámková, A. 2016. Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal*. 4. p. 22–26.
- Kučera, O., Roušar, T., Staňková, P., Haňáčková, L., Lotková, H., Podhola, M., Cervinková, Z. 2012. Susceptibility of rat non-alcoholic fatty liver to the acute toxic effect of acetaminophen. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 27 (2). 323–330.
- Kulma, M., Plachý, V., Kouřimská, L., Vrabec, V., Butová, T., Adámková, A., Hučko, B. 2016. Nutritional value of three Blattodea species used as feed for animals. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 25: 354-360
- Lalander, C., Senecal, J., Gros Calvo, M., Ahrens, L., Josefsson, S., Wiberg, K., Vinneras, B. 2016. Fate of pharmaceuticals and pesticides in fly larvae composting. *Science of the total environment*. 2016 (565). 279-286.

- Lalander, Cecilia et al. 2013. "Faecal Sludge Management with the Larvae of the Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*) - From a Hygiene Aspect." *Science of the Total Environment* 458–460: 312–18.
- Lancaster, E. M., Hiatt, J. R., Zarrinpar, A. 2005. Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review. *Archives of Toxicology*. 89 (2). 193–199.
- Ludwig, D., Fiore, C. 1960. Further studies on the relationship between parental age and the life cycle of the mealworm *Tenebrio molitor*. *Annals of the Entomological Society of America*. 53 (5). 595-600.
- Marzuillo, P., Guarino, S., Barbi, E. 2014. Paracetamol: a focus for the general pediatrician. *European Journal of Pediatrics*. 173 (4). 415-425.
- Mc Gill, M. R., Sharpe, M. R., Williams, D. C., Taha, M., Curry, S. C., Jaeschke, H. 2012. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Clinical Investigation*. 122 (4). 1574–1583.
- Ministerstvo zemědělství, 2018. Potraviny nového typu – Hmyz. Informační centrum bezpečnosti potravin [online]. Praha. [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/hmyz.aspx>
- Morales-Ramos, J. A., Rojas, M. G., Shapiro-Ilan, D. I., Tedders, W. L. 2010. Developmental Plasticity in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae): Analysis of Instar Variation in Number and Development Time under Different Diets. *Journal of Economic Entomology*. 45 (2). 75-90.
- Moriarty, C., Carroll, W. 2016. Paracetamol: pharmacology, prescribing and controversies. *Archives of Disease in Childhood. Education and Practise Edition*. 101 (6). 331–334.
- Murray, D. P. 1960. The stimulus to feeding in larvae of *Tenebrio molitor*. *Journal of Insect Physiology*. 4 (1). 80-91.
- O'Brien, C., Turner, B. 2004. Impact of paracetamol on *Calliphora vicina* larval development. *International journal of legal medicine*. 4 (118). 188-189.
- Stern, S. T., Bruno, M. K., Horton, R. A., Hill, D. W., Roberts, J. C., Cohen, S. D. 2005. Contribution of acetaminophen-cysteine to acetaminophen nephrotoxicity II. Possible involvement of the  $\gamma$ -glutamyl cycle. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 202 (2). 160–171.
- Stull, V., Platz, J. 2020. Research and policy priorities for edible insects. *Sustainability science*. 15 (2). 633-645. DOI: 10.1007/s11625-019-00709-5.
- Toussaint, K., Yang, X. C., Zielinski, M. A., Reigle, K. L., Sacavage, S. D., Nagar, S., Raffa, R. B. 2010. What do we (not) know about how paracetamol (acetaminophen) works? *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 35 (6). 617–638.
- van Huis, A. 2020. Insects as food and feed, a new emerging agricultural sector: a review. *Journal of insects as food and feed*. (6). 27-44. DOI: 10.3920/JIFF2019.0017.
- Vrbová, M., Roušarová, E., Brůčková, L., Česla, P., Roušar, T. 2016. Characterization of acetaminophen toxicity in human kidney HK-2 cells. *Physiological Research*. 65 (4). 627–635.
- Zahera, H., Buters, J. T. M., Ward, J. M., Bruno, M., Stern, S. T., Lucas, A. M., Cohen, S., Gonzalezales, F. J. 1998. Protection against acetaminophen toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 double-null mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 152 (1). 193-199.
- Zahradník, J. 2008. Brouci. Aventinum. Praha. ISBN: 978-80-86858-43-2.
- Zásady správné zemědělské a výrobní praxe produkce hmyzu určeného pro lidskou spotřebu. 2018. In: Těšnov 17, 110 00 Praha 1.



## 9 Samostatné přílohy

Příloha 1: Naměřená výchozí data

Vzorek	Hmotnost hmyzu (g)	Množství larev na začátku pokusu (ks)	Hmotnost vzorku krmiva (g)	Hmotnost mrkve (g)	Množství larev na konci pokusu (ks)	Hmotnost nezkonsumovaného materiálu (g)	Hmotnost larev po pokusu (bez obalu) (g)
1 A	15,1	149	1	4,9	143	1,5	12,32
1 B	15,1	154	1,1	5	151	1,4	15,53
1 C	15,1	151	0,9	4,9	148	1,2	15
2 A	15,1	154	1,1	5	153	1,5	15,77
2 B	15,1	150	0,9	5	147	1,1	15,91
2 C	15,1	154	0,9	5	151	1,5	16
3 A	15,1	140	1	4,9	138	1,4	15,51
3 B	15,1	155	1	5	150	1,3	15,46
3 C	15,1	154	1,1	4,9	146	1,4	15,33
4 A	15,1	151	1	5	149	1,8	15,82
4 B	15,1	163	1,1	5	161	0,9	16,14
4 C	15,1	153	1	5	150	1,1	16,03
5 A	15,1	159	0,9	5	154	1,4	15,98
5 B	15,1	139	1	5,1	136	1,7	15,09
5 C	15,1	150	1	5	147	1,9	15,03
6 A	15,1	142	1,1	5,1	140	2	15,54
6 B	15,1	151	1,1	5	148	1,8	15,52
6 C	15,1	147	0,9	5	141	1,3	15,72
7 A	15,1	141	1,1	5,1	139	1,1	16,01
7 B	15,1	154	0,9	5	151	1	15,55
7 C	15,1	147	1	5	143	2	15,29
8 A	15,1	153	0,9	4,9	150	1,4	15,63
8 B	15,1	142	1	4,9	140	1,5	15,55
8 C	15,1	146	1	5	143	1,5	15,77
9 A	15,1	150	1,1	4,9	148	1,2	15,76
9 B	15,1	147	0,9	5	143	1,2	15,75
9 C	15,1	159	1	5,1	152	1,8	15,21
Průměry	15,1	150,1851852	1	4,988888889	146,7407407	1,440740741	15,48962963

Příloha 2: Hmotnosti 10ks a 1ks larev

Vzorek	Varianta	Hmotnost 10 ks (g)	Hmotnost 1 ks (g)
1	A	1,1528	0,11528
1	A	1,0818	0,10818
1	A	1,1828	0,11828
1	A	1,0814	0,10814
1	B	1,1667	0,11667
1	B	1,149	0,1149
1	B	1,0729	0,10729
1	B	1,2164	0,12164
1	C	0,9413	0,09413
1	C	1,1117	0,11117
1	C	1,0392	0,10392
1	C	1,2722	0,12722
2	A	1,1271	0,11271
2	A	1,1336	0,11336
2	A	1,1097	0,11097
2	A	1,0017	0,10017
2	B	1,2032	0,12032
2	B	1,1882	0,11882
2	B	1,0848	0,10848
2	B	0,9896	0,09896
2	C	1,0503	0,10503
2	C	1,2069	0,12069
2	C	1,065	0,1065
2	C	1,157	0,1157
3	A	1,0088	0,10088
3	A	1,1103	0,11103
3	A	0,9683	0,09683
3	A	1,1638	0,11638
3	B	1,1749	0,11749
3	B	1,0777	0,10777
3	B	1,0696	0,10696
3	B	1,1596	0,11596
3	C	1,0252	0,10252
3	C	1,1604	0,11604
3	C	1,0386	0,10386
3	C	1,1538	0,11538
4	A	1,0502	0,10502
4	A	1,1299	0,11299
4	A	1,0555	0,10555
4	A	0,9828	0,09828
4	B	1,0278	0,10278

4	B	1,1461	0,11461
4	B	0,8773	0,08773
4	B	0,97	0,097
4	C	1,1834	0,11834
4	C	1,1599	0,11599
4	C	0,972	0,0972
4	C	0,997	0,0997
5	A	0,9575	0,09575
5	A	1,1711	0,11711
5	A	0,852	0,0852
5	A	1,0889	0,10889
5	B	1,2448	0,12448
5	B	1,2103	0,12103
5	B	1,1103	0,11103
5	B	1,1994	0,11994
5	C	1,3557	0,13557
5	C	1,1489	0,11489
5	C	1,1516	0,11516
5	C	1,1428	0,11428
6	A	1,1261	0,11261
6	A	1,0357	0,10357
6	A	1,2837	0,12837
6	A	1,2209	0,12209
6	B	1,3145	0,13145
6	B	1,3461	0,13461
6	B	1,0631	0,10631
6	B	1,0647	0,10647
6	C	1,1823	0,11823
6	C	1,2712	0,12712
6	C	0,9587	0,09587
6	C	1,0457	0,10457
7	A	1,167	0,1167
7	A	1,2254	0,12254
7	A	0,9754	0,09754
7	A	1,2555	0,12555
7	B	1,2612	0,12612
7	B	1,2181	0,12181
7	B	1,1001	0,11001
7	B	1,0097	0,10097
7	C	1,2628	0,12628
7	C	1,2206	0,12206
7	C	1,2306	0,12306
7	C	1,1572	0,11572
8	A	1,3477	0,13477
8	A	1,1886	0,11886

8	A	0,9949	0,09949
8	A	1,1487	0,11487
8	B	1,1592	0,11592
8	B	1,0297	0,10297
8	B	1,188	0,1188
8	B	1,1736	0,11736
8	C	1,02	0,102
8	C	0,9849	0,09849
8	C	1,0638	0,10638
8	C	1,0348	0,10348
9	A	1,1247	0,11247
9	A	1,0916	0,10916
9	A	1,0058	0,10058
9	A	1,1832	0,11832
9	B	1,0227	0,10227
9	B	1,1215	0,11215
9	B	0,8875	0,08875
9	B	1,0108	0,10108
9	C	1,381	0,1381
9	C	1,386	0,1386
9	C	0,966	0,0966
9	C	1,108	0,1108
průměr		1,117597222	0,1117597222