

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Mikrobiologická kvalita jedlého hmyzu v závislosti na
teplotě odchovu**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Klára Sochorová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Roman Švejstl, PhD.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Mikrobiologická kvalita jedlého hmyzu v závislosti na teplotě odchovu" jsem vypracovala 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 24.7.2020 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Romanu Švejtilovi, PhD. za vedení mé diplomové práce, cenné rady a za pomoc v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala mé rodině za trpělivost a podporu během celého období mého studia.

Mikrobiologická kvalita jedlého hmyzu v závislosti na teplotě odchovu

Souhrn

Vzhledem ke stále rostoucí světové populaci roste i zájem o využívání hmyzu jako alternativního zdroje živin pro lidskou výživu především díky jeho nutričním vlastnostem, ale také z hlediska environmentálního. Hmyz obsahuje nutričně cenné látky a pro svůj vysoký obsah bílkovin je považován za jejich kvalitní alternativní zdroj. Nicméně, kromě těchto cenných látek může obsahovat alergeny, toxiny a patogenní mikroorganismy.

Tato diplomová práce se zabývá vlivem teploty odchovu jedlého hmyzu na jeho mikrobiologickou kvalitu. Vybraným druhem hmyzu byl potměnkou moučnou (*Tenebrio molitor*), který byl odchován v kontrolovaných podmínkách při teplotách 22 °C a 25 °C. Cílem této práce bylo stanovit počty mikroorganismů a identifikovat vybrané izoláty pomocí kultivačních metod a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie u obou odchovů.

Bylo zjištěno, že teplota odchovu statisticky významně ovlivňuje růst celkových počtů aerobních mikroorganismů ($P < 0,05$) a enterokoků ($P < 0,01$). U zbylých testovaných mikroorganismů se množství narostlých kolonií v závislosti na teplotě odchovu lišilo pouze statisticky nevýznamně ($P > 0,05$). Celkový počet aerobních mikroorganismů v larvách potměnky moučné při teplotě odchovu 22 °C činil $7,93 \pm 0,11 \log \text{KTJ/g}$, zatímco u teploty 25 °C $7,32 \pm 0,59 \log \text{KTJ/g}$. Celkový počet anaerobních mikroorganismů klesl ze $7,63 \pm 0,10 \log \text{KTJ/g}$ (22 °C) na $6,98 \pm 0,93 \log \text{KTJ/g}$ (25 °C). Rod *Bacillus* spp. představoval u teploty odchovu při 22 °C $4,03 \pm 0,62 \log \text{KTJ/g}$, naproti tomu u 25 °C $3,69 \pm 0,46 \log \text{KTJ/g}$. Počet kolonií rodu *Enterococcus* spp. byl stanoven na $6,89 \pm 0,06 \log \text{KTJ/g}$ při teplotě odchovu 22 °C, kdežto při 25 °C klesl na $5,84 \pm 0,61 \log \text{KTJ/g}$. U obou skupin nebyl zaznamenán výskyt patogenních bakterií *Salmonella* spp. a *E. coli*, avšak byla zjištěna přítomnost *Clostridium* spp. Po vyhodnocení identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie bylo prokázáno, že teplota odchovu ovlivňuje bakteriální diverzitu. Ve vzorcích hmyzu chovaném při 22 °C byly identifikovány rody *Lactococcus* a *Enterococcus*. Naopak tomu bylo u vzorků hmyzu odchovaném při teplotě 25 °C, kdy došlo k identifikaci rodů *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus* a *Proteus*.

Z námi získaných výsledků vyplývá, teplota odchovu má částečný vliv na druhovou skladbu i počet některých skupin mikroorganismů. Zároveň bylo prokázáno, že hmyz může být rezervoárem potenciálně patogenních bakterií rodů *Bacillus* a *Clostridium*. Přítomnost zejména těchto sporulujících bakterií by měla být předmětem dalšího výzkumu.

Klíčová slova: jedlý hmyz, bakterie, výživa člověka, bezpečnost potravin

Microbiological quality of edible insect in relation to rearing temperature

Summary

Due to growing global population, the interest in use of edible insect as an alternative source of nutrients is rising, primarily due to their nutritional properties, but also an from enviromental point of view. Edible insect contains important nutrients and thanks to their high protein content are considered as a good alternative source of protein. However, in addition to these valuable substances, the insects may contain allergens, toxins and/or pathogenic microorganisms.

The present thesis evaluates the impact of temperature on microbial quality of edible insects. The selected insect species was mealworm larvae (*Tenebrio molitor*), which were reared under controlled conditions at 22 °C and 25 °C. The counts of microorganisms were analyzed by cultivation methods and identified by MALDI–TOF mass spectrometry.

The results have shown that the rearing temperature significantly affects the counts of total aerobic bacteria ($P < 0,05$) and enterococci ($P < 0,01$). The counts of remaining tested groups of bacteria, differed only statistically non–significantly ($P > 0,05$). The counts of total aerobic microorganisms in mealworm at reared temperature of 22 °C were $7,93 \pm 0,11$ log CFU/g, while at 25 °C were $7,32 \pm 0,59$ log CFU/g. The total counts of anaerobic microorganisms decreased from $7,63 \pm 0,10$ log CFU/g (22 °C) to $6,98 \pm 0,93$ log CFU/g (25 °C). Genus *Bacillus* represented at 22 °C $4,03 \pm 0,62$ log CFU/g and at 25 °C $3,69 \pm 0,46$ log CFU/g. Counts of *Enterococcus* spp. colonies at 22 °C were $6,89 \pm 0,06$ log CFU/g and dropped at 25 °C to $5,84 \pm 0,61$ log CFU/g. There were no pathogenic microorganisms of *Salmonella* spp. and *E. coli* detected. However, the presence of *Clostridium* spp. was discovered.

Identification by MALDI–TOF mass spectrometry demonstrated that the rearing temperature has impact of bacterial diversity. The genera of *Lactococcus* and *Enterococcus* were identified as most abundant in samples at rearing temperature of 22 °C. In contrast, at 25 °C the genera of *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus* and *Proteus* were identified as most abundant.

The results show that rearing temperature has partial impact on genus and species composition and their abundance. Alongside it has been proved that insect can be a resevoir of potentially pathogenic microorganisms of *Bacillus* spp. and *Clostridim* spp. The presence of these spore–forming bacteria should be the subject of further research.

Keywords: edible insect, bacteria, human nutrition, food safety

Obsah

1 ÚVOD	1
2 VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	2
2.1 Cíl práce	2
2.2 Hypotéza	2
3 PŘEHLED LITERATURY	3
3.1 Hmyz jako potrava.....	3
3.1.1 Historie konzumace hmyzu	3
3.1.2 Současná konzumace hmyzu ve světě	4
3.1.2.1 Afrika.....	5
3.1.2.2 Latinská Amerika.....	5
3.1.2.3 Asie a Tichomoří	5
3.1.2.4 Západní civilizace.....	6
3.1.3 Nutriční aspekty jedlého hmyzu	7
3.1.3.1 Proteiny.....	7
3.1.3.2 Lipidy.....	8
3.1.3.3 Sacharidy	8
3.1.3.4 Mikronutrienty	9
3.1.4 Technologická úprava jedlého hmyzu	9
3.1.5 Benefity konzumace jedlého hmyzu.....	9
3.1.5.1 Vliv na zdraví člověka	9
3.1.5.2 Vliv na životní prostředí	10
3.1.6 Rizika konzumace jedlého hmyzu	10
3.1.6.1 Alergie	10
3.1.6.2 Biologická rizika.....	11
3.1.6.3 Fyzikální rizika	11
3.1.6.4 Chemická rizika	12
3.2 Mikrobiologická kvalita jedlého hmyzu	12
3.2.1 Bakterie.....	13
3.2.1.1 Obecná charakteristika vybraných rodů bakterií	13
3.2.1.2 Mikrobiota jedlého hmyzu.....	16
3.2.2 Plísně.....	17
3.2.2.1 Obecná charakteristika vybraných rodů plísní.....	17
3.2.2.2 Plísně a kvasinky v jedlém hmyzu.....	18
3.3 Vybraný druh jedlého hmyzu	19
3.3.1 Potemník moučný	19

3.3.1.1	Charakteristika	19
3.3.1.2	Potemník moučný jako potravina.....	19
3.4	Legislativa	21
4	MATERIÁL A METODY.....	22
4.1	Kultivace	22
4.1.1	Příprava vzorků hmyzu	22
4.1.2	Kultivace	23
4.1.3	Kultivace a stanovení <i>Salmonella</i> spp.	24
4.2	Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie	25
4.2.1	Příprava vzorků.....	25
4.2.2	Identifikace	26
4.3	Statistické vyhodnocení	27
5	VÝSLEDKY	28
5.1	Kultivační stanovení mikroorganismů.....	28
5.1.1	Celkový počet aerobních mikroorganismů	28
5.1.2	Celkový počet anaerobních mikroorganismů	28
5.1.3	<i>Bacillus</i> spp.....	28
5.1.4	<i>Enterococcus</i> spp.	29
5.1.5	<i>Salmonella</i> spp.....	29
5.2	Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie	30
5.2.1	Teplota odchovu při 22 °C.....	30
5.2.2	Teplota odchovu při 25 °C.....	31
5.2.3	<i>Clostridium</i> spp.....	31
6	DISKUZE	32
6.1	Celkový počet aerobních mikroorganismů	32
6.2	Celkový počet anaerobních mikroorganismů.....	32
6.3	<i>Bacillus</i> spp.	33
6.4	<i>Enterococcus</i> spp.	33
6.5	<i>Salmonella</i> spp.	34
6.6	<i>Clostridium</i> spp.	34
7	ZÁVĚR	35
8	SEZNAM LITERATURY	36
9	SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY	46

1 ÚVOD

Z demografického odhadů víme, že do roku 2050 bude na světě kolem devíti miliard lidí. Vzhledem k takto přibývající populaci ubývá zemědělské půdy, která navíc ztrácí svou kvalitu a udržitelnost. Díky nadměrnému lovu ve světových oceánech dochází k rapidnímu snižování rybí populace, a to se změnami klimatu a nedostatkem vody může mít velké důsledky na produkci potravin. I díky těmto skutečnostem roste poptávka po nových zdrojích potravy. Jedním z těchto zdrojů může být hmyz, který je již po staletí v mnoha zemích využíván jako potravina. Jedlý hmyz obsahuje nutričně cenné látky, které mohou být využity ve výživě člověka. Ve spoustě zemí je konzumace hmyzu velice populární a oblíbená. Hmyz je konzumován v mnoha formách – syrový, smažený, pražený nebo je ve formě prášku přidáván do pekárenských výrobků či v této době velice populárních proteinových tyčinek. Při chovu hmyzu pro lidskou spotřebu v kontrolovaných podmínkách a při jeho zpracování je podstatné dodržování důležitých opatření. Podle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin mohou při jeho konzumaci vznikat určitá rizika, která mají negativní vliv na zdraví člověka. Mezi velice diskutovanými tématy je mikrobiologická kvalita jedlého hmyzu a možnost, jak ji ovlivnit. Jedním z těchto vlivů by mohla být okolní teplota při odchovu. V této práci se budeme zabývat, zda má tento parametr vliv na mikrobiotu hmyzu jak z kvalitativního, tak z kvantitativního hlediska.

2 VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

2.1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo ověřit, zda má teplota vliv na bakteriální množství a diverzitu v jedlém hmyzu v závislosti na teplotě odchovu.

2.2 Hypotéza

Teplota bude mít vliv na množství a různorodost bakterií v jedlém hmyzu.

3 PŘEHLED LITERATURY

3.1 Hmyz jako potrava

Využívání hmyzu jako potraviny je odborně známé pod termínem entomofágie. Pochází z řeckého slova „éntomon“, které doslova znamená „rozdělení na segmenty“ a „phagein“, což představuje proces stravování (Dunkel & Payne 2016). Mnoho zvířat, jako jsou plazi nebo ptáci jsou entomofágní, stejně je tak tomu i u hmyzu. Obecně je však tento termín používán v souvislosti s lidskou výživou. V poslední době se můžeme setkat i s nově zavedeným termínem antropoentomofágie, který se vztahuje na použití hmyzu nebo z nich vytvořených produktů výhradně pro lidskou výživu (Costa-Neto & Dunkel 2016).

3.1.1 Historie konzumace hmyzu

Hmyz hrál daleko větší roli v kulturních dějinách lidstva, než je obecně uznáváno. V nejstarších civilizacích najdeme zmínku o použití hmyzu od základních potřeb, jako jsou potraviny a léčiva až po aplikaci v kosmetice, estetice, náboženství nebo vědě (Bodenheimer 1951).

Jeden z nejstarších spojení člověka s hmyzem je jeho využití jako potravy. Spotřeba hmyzu lidmi je historicky a geograficky starým, rozšířeným jevem (Costa-Neto & Dunkel 2016). Na základě archeologických a fosilních nálezů hrál hmyz významnou roli již ve stravě raných hominidů. Dokazuje to i nález ve Francii v departementu Ariège, kde byla nalezena bizoní kost, na které byla kromaňonským člověkem vyřezána kobylička (*Troglophilus* spp.) (Obrázek 1) a to před více než 10000 lety (Bellés 1997). Existuje dokonce důkaz, že některé první nástroje byly vyvinuty pro získání termitů z termiště (Dunkel & Payne 2016).

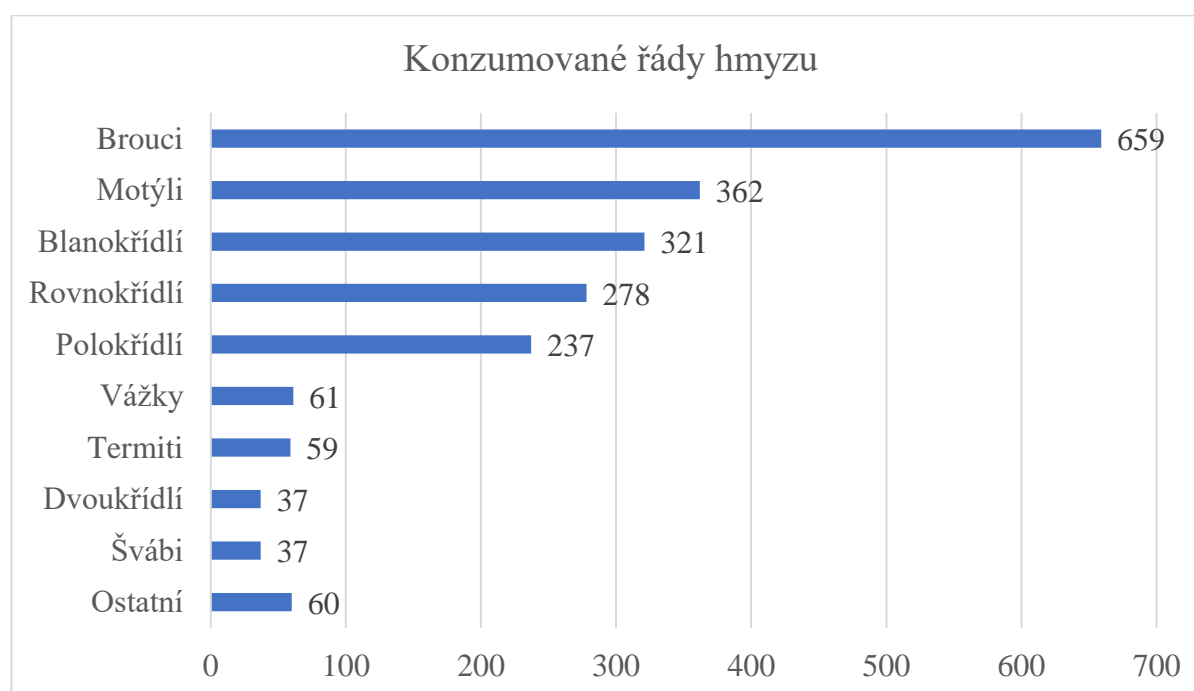


Obrázek 1 Fotografie bizoní kosti, na které byla kromaňonským člověkem vyřezána kobylička (*Troglophilus* spp.) (Di Russo & Sbordonì 1998).

Písemné zmínky o entomofágii se objevují také v nejstarších čínských kronikářských záznamech, mexických kodexech, kronikách přírodovědců a na starém papyru starobylého Egypta (Costa-Neto & Dunkel 2016). Praxe jíst hmyz je rovněž citována v náboženské literatuře – v křesťanské, židovské a islámské. Bible hovoří o kobyilkách jako o potravě jak ve Starém, tak v Novém zákoně, kde je popisováno, že pokrmem Jana Křtitele byly kobylinky a lesní med, nejspíše s odkazem na pouštní kobyliku *Schistocerca gregaria*. V islámské tradici je několik odkazů na požívání kobylek, mravenců, vši a termitů (Van Huis et al. 2013; Costa-Neto & Dunkel 2016). Židovská literatura zároveň odkazuje na přijetí entomofágie, a to ve formě konzumace košer kobylinky. Tato tradice přežila pouze v částech severní Afriky (Kemenczei et al. 2016).

3.1.2 Současná konzumace hmyzu ve světě

V současné době je využití hmyzu jako potravního zdroje přijímáno a praktikováno mnoha kulturami po celém světě a je odhadováno, že hraje hlavní roli ve stravě dvou milionu lidí, z nichž většina se nachází na jižní polokouli (Nonaka 2009; Dunkel&Payne 2016). Existuje i řada výzkumů, které podporují hmyz jako alternativní zdroj bílkovin společně s rostlinnými zdroji a produkty tzv. buněčného zemědělství¹. Díky nimž se entomofágie rozšiřuje do rozvinutých zemí s konvekční živočišnou výrobou, což zároveň slibuje lepší budoucí potravinový systém (Sexton et al. 2019).



Graf 1 Počet celosvětově konzumovaných druhů hmyzu (Karaš et al. 2019).

Mezi miliony druhů hmyzu je celosvětově konzumováno asi 2111 druhů hmyzu (Graf 1), z toho 547 druhů v Mexiku (Siemianowska et al. 2013). Mezi nejčastější konzumované druhy patří

¹Vědecké výzkumy zabývající se hledáním nových alternativních zdrojů bílkovin. Zaměřuje se na produkci zemědělských produktů pomocí molekulární biologie, tkáňového inženýrství a biotechnologie.

řády brouci (*Coleoptera*), motýli (*Lepidoptera*) a blanokřídli (*Hymenoptera*) (Karas et al. 2019). Historie spotřeby hmyzu je velice bohatá, hlavně v Africe, Asii, Americe a Austrálii. Většina hmyzu je konzumována v chudých zemích, kde je nedostatek výživných potravin (Siemianowska et al. 2013).

3.1.2.1 Afrika

Hmyz lze hojně nalézt na celém africkém kontinentu a pro mnoha afrických obyvatel se tak stává důležitým zdrojem potravy (Van Huis et al. 2013).

Dle Kitsa (1989) je v hlavním městě Demokratické republiky Kongo v Kinshase spotřebováno zhruba 96 tun housenek ročně. Housenky zde konzumuje asi 70 % z 8 milionů obyvatel Kinshasy, a to nejen kvůli jejich nutričnímu složení, ale hlavně kvůli chuti.

V subsaharské Africe je konzumováno přibližně 250 druhů hmyzu. Mezi nejvíce konzumovaný řád patří motýli (*Lepidoptera*), který zaujímá až 30 % ze spotřebovaného hmyzu. Dále jsou to řády rovnokřídli (*Orthoptera*) až 29 %, lomenokřídli (*Cleoptera*) 19 % a ze 22 % spotřebovaného hmyzu tvoří řády termitů (*Isoptera*), stejnokřídli (*Homoptera*), blanokřídli (*Hymenoptera*), ploštice (*Heteroptera*), dvoukřídli (*Diptera*) a vážky (*Odonata*) (van Huis 2003).

V oblastech východní a jižní Afriky je jako běžný zdroj potravy uváděna kobylka (*Ruspolia differens*). Hlavně v oblasti Viktoriina jezera, kde jsou kobylky známé pod pojmem „nsenene“ a jsou považovány za delikatesu (Huis et al. 2013). Z důvodu modernizace v 18. a 19. století došlo ve východní Africe ke kulturnímu potlačení domorodých kmenů a jejich zvyků obyvateli západních zemí. Kvůli tomu došlo v těchto oblastech k částečnému potlačení entomofágie (Van Huis et al. 2013).

3.1.2.2 Latinská Amerika

Na americkém kontinentu jsou pouze jen některé země jako Kolumbie, Mexiko nebo Brazílie, které uznávají entomofágie jako tisíciletou praxi (Maria et al. 2017). V těchto oblastech je nejvíce oblíbená larva brouka *Rhynchophorus ferrugineus* známá pod označením „palm weevil“ (Obrázek 2). Tyto larvy jsou proslulé svojí lahodnou chutí, a to díky vysokému obsahu tuku (Costa-Neto & Dunkel 2016). V Mexiku poptávka po jedlém hmyzu neustále roste, a to jak na domácí, tak i na mezinárodní úrovni. Mezi komercializovaný a významný druh hmyzu je zde považována larva nočního motýla *Comadia redtenbacheri*. Ta je známa i tím, že je přidávána do destilovaného alkoholového nápoje vyráběného z agáve – mezcal (Hernández-Flores et al. 2015).

3.1.2.3 Asie a Tichomoří

Použití hmyzu v oblasti Asie a Tichomoří má dlouholetou historii. Jedná se zde o jednu z tradičních snadno dostupných a výživných potravin (Adámková et al. 2017). V současné době se v této oblasti stal sběr hmyzu dalším zdrojem příjmu (Van Huis et al. 2013).

Japonská, čínská, vietnamská a thajská kuchyně patří mezi nejpoblárnější na světě. Tyto kultury zahrnují tradičně pokrmy výhradně z jedlého hmyzu a místními obyvateli jsou považovány za lahůdku (Dunkel & Payne 2016). V současnosti je v Thajsku přes 20 000

cvrčích farem, které zásobují venkov i město. I přes změnu zdejší kultury došlo na tomto území k zachování entomofágie, a to navzdory příchodu „vývojářů“ ze západního světa. V Japonsku, Číně, Vietnamu a na Korejském poloostrově patří mezi nejoblíbenější jedlý a na trzích prodáváný hmyz larvy bource morušového (*Bombyx mori*) a včelí plod (Costa-Neto & Dunkel 2016).

Mezi australskými domorodými kmeny jsou nejvíce oblíbené tzv. „witchetty grubs“, což je místní označení pro velké bílé larvy brouka *Endoxyla leucomochla*, které se živí dřevem. Jedná se o nejdůležitější hmyz v australské poušti, který je základem stravy tamních domorodých žen a dětí. Další vyhledávanou lahůdkou jsou mravenci rodu *Myrmecocystus*, kteří jsou známí pod termínem „honeypot ants“. Tito medoví mravenci jsou konzumovány především pro svoji sladkou chuť (Costa-Neto & Dunkel 2016).

3.1.2.4 Západní civilizace

Využití hmyzu se v evropském potravinářském průmyslu objevuje jen zřídka (Schlüter et al. 2016). Během neolitu se z oblasti tzv. úrodného půlměsíce (území dnešního Egypta, Turecka, Iráku, Jordánska, Sýrie, Izraele a Libanonu) rozšířilo zemědělství a domestikace zvířat i rostlin do oblasti Evropy. Nejvíce cennými druhy volně žijících živočichů byli velcí býložravci a všežravci, kteří se v tehdejší době hojně v této oblasti vyskytovali. Tato zvířata přinášela nejen značné množství masa, ale i kůži, vlnu, mléčné výrobky nebo pomoc při zemědělství. Díky užitečnosti těchto zvířat se domestikace hmyzu (kromě včel) nerozšířila, protože hmyz nemohl nabídnout stejné výhody. Z tohoto důvodu došlo v Evropě ke ztrátě zájmu o hmyz jako potraviny, než je tomu v jiných částech Země (Van Huis et al. 2013).

V současnosti je však hmyz předmětem rostoucího zájmu jako alternativního zdroje potravin (Schlüter et al. 2016). Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) proto vydal vědecké stanovisko „Rizikový profil týkající se produkce a spotřeby hmyzu jako potravin a krmiva“. V této zprávě zveřejňuje seznam druhů hmyzu, u kterých bylo zjištěno, že mají největší potenciál využití jako potravin a krmiva v Evropě:

1. moucha domácí (*Musca domestica*);
2. moucha bráněnka (*Hermetia illucens*);
3. potěmník moučný (*Tenebrio molitor*);
4. potěmník brazilský (*Zophobas atratus*);
5. potěmník stájový (*Alphitobius diaperinus*);
6. zavíječ voskový (*Galleria mellonella*);
7. zavíječ malý (*Achroia grisella*);
8. bourec morušový (*Bombyx mori*);
9. cvrček domácí (*Acheta domestica*);
10. cvrček krátkokřídle (*Gryllodesignatus*);
11. saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*);
12. saranče americká (*Schistocerca americana*) (Karaš et al. 2019).

Několik evropských zemí, jako je Belgie, Nizozemí nebo Švýcarsko, prohlásilo, že začne s produkcí a spotřebou některých druhů jedlého hmyzu. V roce 2015 řetězec supermarketů v Nizozemsku s více než 500 obchody začal s prodejem hamburgerů, řízků a nugget, které

obsahují asi 16 % mouky z larev potemníka moučného (*Tenebrio molitor*). V Nizozemí lze hmyz zakoupit i v supermarketech nebo objednat na internetu, ačkoliv ceny za tyto produkty jsou stále poměrně vysoké, v průměru 18,33 dolarů (zhruba 413 Kč) za 30g porci (Dunkel & Payne 2016; Van Huis 2016). V současné době prodává 13 britských firem hmyz v neochuceném, kořeněném nebo kandovaném stavu, včetně obřích opékaných mravenců a cvrčků (Dunkel & Payne 2016). Rovněž byly vyrobeny řady knih o vaření, které obsahují recepty hmyzu z celého světa nebo s místním hmyzem (Van Huis 2016).

V severní Americe není hmyz ještě zcela zahrnut do pravidelné stravy spotřebitelů (van der Fels-Klerx et al. 2018). Nicméně v USA byl zaveden vývoj produktů za použití cvrčků – proteinové tyčinky, cvrččí mouka a sušenky (Van Huis 2016). Cvrččí mouka je zde komerčně dostupná již od konce roku 2013 (Dunkel & Payne 2016).

Ovšem pro západní civilizaci jsou potraviny z hmyzu nebo jedlý hmyz jako takový stále neobvyklé a nevhodné, hlavně z etického hlediska (House 2018). Většina těchto obyvatel má spojenou konzumaci hmyzu se znechucením a primitivním chováním, což výrazně ovlivňuje stravovací návyky (Van Huis et al. 2013). Bylo však zaznamenáno, že v posledních pěti letech se začíná názor, že hmyz je „něco nechutného a primitivního“ v USA, Kanadě a Evropě pomalu měnit (Costa-Neto & Dunkel 2016).

3.1.3 Nutriční aspekty jedlého hmyzu

Výživná hodnota hmyzu může být velice různorodá. Vždy záleží na druhu hmyzu, stádía vývoje, chovu (teplota, vlhkost) a výživě (Kemenczei et al. 2016). Stejně jako u většiny potravin ovlivňuje nutriční složení i způsob přípravy hmyzu (smažení, vaření, sušení) (Van Huis et al. 2013). Obecně lze však říci, že je hmyz velice bohatý na obsah živin (Schlüter et al. 2016).

3.1.3.1 Proteiny

Proteiny představují v jedlém hmyzu hlavní makro nutriční složku (Rumpold & Schlüter 2013). V některých případech je obsah proteinů daleko vyšší v porovnání s jinými živočišnými produkty jako je vepřové, hovězí nebo drůbeží maso (Schlüter et al. 2016). Mnoho druhů hmyzu je tvořeno přibližně ze 60 % bílkovinami (Van Huis 2016). V Tabulce 1 je pro srovnání uveden obsah proteinu jednotlivých řádů hmyzu. Bessa et al. (2017) uvádí, že 100 g sušeného hmyzího masa obsahuje 148 % doporučené denní dávky bílkovin pro dospělého člověka (při 50 g/kg/den). Stravitelnost bílkovin je velmi variabilní, částečně proto, že je část aminokyselin vázána na chitin, polysacharid a složku exoskeletu hmyzu (Van Huis 2016). Proteiny nalezené u většiny druhů hmyzu jsou vysoce kvalitní a obsahují esenciální aminokyseliny, které odpovídají referenčním normám stanovenými Organizací pro výživu a zemědělství (FAO) a Světovou zdravotnickou organizací (WHO) (Payne et al. 2016). Bylo ovšem zjištěno, že bílkoviny z larvy bource morušového vykazovaly nižší kvalitu proteinů než kasein (Rumpold & Schlüter 2013). I přes to hmyz splňuje požadavky WHO pro aminokyseliny s vysokými hodnotami fenylalaninu, tyrosinu, tryptofanu, lysinu a threoninu, zejména hmyz z řádu *Orthoptera* (Schlüter et al. 2016).

Tabulka 1 Srovnání procentuálního zastoupení proteinu v jednotlivých řádech jedlého hmyzu (Van Huis et al. 2013).

Řád	Stádium vývoje	Obsah proteinu (%)
Lomenokřídlí (<i>Coleoptera</i>)	Dospělec, larva	23 - 66
Motýli (<i>Lepidoptera</i>)	Kukla, larva	14 - 68
Polokřídlí (<i>Hemiptera</i>)	Dospělec, larva	42 - 74
Stejnokřídlí (<i>Homoptera</i>)	Dospělec, larva, vajíčko	45 - 57
Blanokřídlí (<i>Hymenoptera</i>)	Dospělec, kukla, larva, vajíčko	13 - 77
Vážky (<i>Odonata</i>)	Dospělec, nymfa	46 - 65
Rovnokřídlí (<i>Orthoptera</i>)	Dospělec, nymfa	23 - 65

3.1.3.2 Lipidy

Lipidy představují druhou největší část nutričního složení hmyzu. Jejich obsah se pohybuje v rozmezí od 4,6 – 73,9 g tuku na 100 g sušených larev různého druhu hmyzu (Bessa et al. 2017). Uvádí se, že v larválních stádiích hmyzu je zastoupení tuku obecně vyšší, než ve stádiu dospělce (Rumpold & Schlüter 2013). Podle van Huis et al. (2016) představuje podíl lipidů v sušině larvy druhu *Rhynchophorus ferrugineus* 67 %, což je vyšší než u běžných potravin, jako je hovězí a drůbeží maso nebo vejce a mléko. Nejvyšší množství tuku je obsaženo v housence rodu *Paraneritatri angularis*, a to 77,00 % - 77,13 % (v sušině) (Rumpold & Schlüter 2013). Z dalších analýz vyplývá, že hmyz obsahuje značné množství nenasycených mastných kyselin, srovnatelným s drůbežím masem. Zároveň obsahuje vysoké zastoupení esenciálních omega-6 a omega-3 mastných kyselin (Bessa et al. 2017).

Stejně jako složení mastných kyselin se obsah cholesterolu u hmyzu liší podle jejich stravy. Rumpold & Schlüter (2013) popisují studii obsahu cholesterolu na 100 g vzorku (čerstvé hmotnosti) hmyzu shromážděného v Thajsku. Uvedli, že nejvyšší obsah cholesterolu se nacházel ve cvrčku domácím (105 mg / 100 g), bombajské kobylce (*Patangas uccincta*) (66 mg / 100 g) a brouka z čeledi vrubounovití (*Scarabaeidae*) (56 mg / 100 g). Naproti tomu 100 g čerstvých vajec obsahuje 372 mg cholesterolu. To je více než třikrát tolik cholesterolu vůči zmiňovanému hmyzu.

3.1.3.3 Sacharidy

Kromě bílkovin a lipidů obsahuje i velké množství sacharidů a to ve formě vlákniny (Kemenczei et al. 2016). Jak již bylo uvedeno výše, všechny druhy hmyzu obsahují polysacharidový chitin, polymer N-acetyl-D-glukosamin, jako součást exoskeletu (Krishnan et al. 2014). Obsah chitinu se pohybuje v rozmezí od 2,7 mg do 49,8 mg na kg čerstvého hmyzu. Chitin je řazen mezi vlákninu, která je člověkem nestravitelná. Avšak v tropických zemích, kde je hmyz pravidelně konzumován, je aktivita chitinázy vysoká. V západních zemích bohužel chitin ve stravě chybí, a proto je aktivita chitinázy nízká (Van Huis et al. 2013).

3.1.3.4 Mikronutrienty

Obsah minerálních látek se od jednotlivých druhů hmyzu výrazně liší. Většina hmyzu obsahuje málo vápníku z důvodu nemineralizovaného exoskeletu (Van Huis 2016). Výjimku tvoří larvy mouchy domácí (*Musca domestica*), jejichž podíl vápníku tvoří 2010 mg/ 100 g sušiny. Ostatní jedlé druhy hmyzu doporučenou denní dávku vápníku pro dospělé nesplňují (Rumpold & Schlüter 2013). Naproti tomu bylo zaznamenáno vysoké množství zinku a železa u cvrčků, termitů, tarantulí a housenek (Van Huis 2016). U cvrčků analýza prokázala také vysoký obsah sodíku, manganu, fosforu a draslíku (Mlcek et al. 2014). Další minerální látky obsáhlé ve hmyzu jsou selen, měď a hořčík (Kemenczei et al. 2016). Rumpold & Schlüter (2016) udávají, že brouci z řádu polokřídli (*Hemiptera*) a rovnokřídli (*Orthoptera*) jsou obzvláště bohatí na obsah hořčíku. Nicméně je zapotřebí více studií, které by pojednávaly o biologické dostupnosti minerálních látek z hmyzu pro člověka (Van Huis 2016).

Z vitaminů jsou nejvíce zastoupeny vitaminy skupiny B (riboflavin, biotin, kyselina listová a kyselina pantothenová), vitamin A, D, E a C (Kemenczei et al. 2016; Van Huis 2016).

3.1.4 Technologická úprava jedlého hmyzu

Navzdory některým případům konzumace syrového hmyzu, je hmyz obvykle konzumován již tepelně upravený. V tradiční entomofágii je jedlý hmyz upravován vařením, pražením nebo smažením. Stejně jako u jiných druhů potravin je tepelná úprava přínosná díky eliminaci některých patogenních mikroorganismů. Žádoucí je také u některých jedovatých druhů hmyzu, kde dochází tepelnou úpravou k inaktivaci jejich jedu (Grabowski et al. 2018). Nicméně tepelná úprava může negativně ovlivnit nutriční hodnotu hmyzu, hlavně ztrátu některých termolabilních vitaminů a minerálních látek (Caparros Megido et al. 2018).

V tropických zemích je obvykle konzumován celý tepelně upravený hmyz a je zde považován za lahůdku. Západní spotřebitelé však dávají přednost produktům, kde není hmyzí přísada viditelná. Mezi typické technologické úpravy patří mletí hmyzu na mouku, extrakce proteinů, tuku nebo chitinu (Karaš et al. 2019).

3.1.5 Benefity konzumace jedlého hmyzu

3.1.5.1 Vliv na zdraví člověka

Pro svůj cenný obsah nutričních látek má spotřeba hmyzu příznivý vliv na naše zdraví. Z hypotéz Costa-Neto & Dunkel (2016) vyplývá, že by hmyz mohl být cennou funkční potravinou. Byla totiž prokázána existence imunologických, analgetických, antibakteriálních, diuretických, anestetických a antirevmatických vlastností v tělech hmyzu. To by mohlo mít příznivý účinek na naše zdraví a v boji proti onemocnění.

Gessner et al. (2019) uvedli studii, kde byl zkoumán účinek konzumace hmyzu na hladinu lipidů v krvi. Z výzkumu vyplynulo, že došlo k jejímu výraznému snížení u hyperlipidemických potkanů, a to díky profilu aminokyselin. Yoon et al. (2015) uvedl, že po podávání larev japonského nosorožníka (*Allomyrina dichotoma*) myším trpících obezitou došlo ke snížení viscerálního tuku. Tyto studie by mohly mít farmaceutický potenciál ve vývoji výživových doplňků proti obezitě a poruchám metabolismu lipidů.

V Asii je běžně používán brouk *Ulomoides dermestoides* z čeledi poterníkovití. Ten je konzumován pro své léčivé účinky proti astmatu, potenci, artritidě, tuberkulóze a podráždění očí. Jeho protizánětlivé účinky byly laboratorně potvrzeny (Costa-Neto & Dunkel 2016). Obyvatelé Číny používají pečené pijáky tropické (*Rhipicephalus microplus*) jako lék pro děti proti planým neštovicím (Costa Neto 2005).

V brazilské lidové medicíně je běžně používán tzv. americký šváb (*Periplaneta americana*) k léčbě několika chorob. Z opékaného hmyzu se uvaří čaj, který je podáván proti astmatu, kolice a zácpě. V oblasti Matinhados Pretos a Feira de Santana je při léčbě bolesti v krku a astmatu podáván opékaný střihač (*Atta*) (Costa Neto 2005).

3.1.5.2 Vliv na životní prostředí

Rychlý růst světové populace představuje těžkou zátěž pro zemědělství a výrobu potravin. Spolu s růstem počtu obyvatel se poptávka po živočišných bílkovinách výrazně zvyšuje, avšak zvýšení produkce masa má významný vliv na životní prostředí. Téměř celé množství amoniaku, které způsobuje okyselení půdy a eutrofizaci vody, je produkováno zemědělským sektorem, a to až ze dvou třetin. Naproti tomu chov jedlého hmyzu představuje velmi nízkou ekologickou zátěž. Oproti konvenčně chovaným zvířatům nepotřebuje hmyz rozsáhlé zemědělské oblasti a díky odolnosti vůči suchu je chov šetrný i vůči spotřebě vody (Kemenczei et al. 2016). Navíc může být jako krmivo použito druhotných produktů, neboť hmyz hraje zásadní roli v biodegradaci organické hmoty, jako je bioodpad a hnůj (Van Huis et al. 2013; Gessner et al. 2019).

Mnoho druhů jedlého hmyzu je považováno za škůdce a představuje hrozbu pro zemědělské plodiny. Proto jsou pesticidy a insekticidy běžné v mnoha částech světa. Manuální sběr těchto škůdců by mohl nejen sloužit jako potrava a šetřit plodiny, ale také prospět životnímu prostředí tím, že sníží potřebu pesticidů (Van Huis et al. 2013).

3.1.6 Rizika konzumace jedlého hmyzu

Bezpečnost potravin (Food Safety) má zvláštní význam při řešení nových zdrojů potravin. S přínosem použití hmyzu při výrobě potravin a jejich složek jsou spojena mnohá rizika. Dokonce i při použití nevhodných druhů či stupňů vývoje hmyzu, špatné kulinářské úpravě nebo sběru hmyzu z nevhodných oblastí může dojít k problémům (Mlcek et al. 2014). Nicméně oblast bezpečnosti potravin a legislativa jsou stále ještě omezené (Vandeweyer et al. 2018). Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) a členské státy Evropské Unie, které tolerují jedlý hmyz jako potravinu, vypracovali v roce 2015 studie, které se těmito riziky zabývají (Kemenczei et al. 2016; Van Huis 2016). Rizikový profil se skládá z biologických rizik (bakterie, parazité, houby, priony), chemických rizik (těžké kovy, toxiny, rezidua pesticidů a léčiv), fyzikálních rizik, alergenů a nebezpečí souvisejících s životním prostředím (EFSA Scientific Committee 2016; Schlüter et al. 2016).

3.1.6.1 Alergie

Stejně jako jiné potraviny z rostlin nebo ostatních živočichů může mít hmyz a z něj vyrobené produkty alergenní potenciál. Symptomy alergických reakcí způsobených hmyzem se projevují

jako perorální alergie, svědění, ekzémy, dermatitidy, angioedém, kongescenebo astma, které může vyústit až k anafylaktickému šoku (Huis et al. 2013; van der Fels-Klerx et al. 2018). Potravinová alergie má dvě fáze. V první fázi se člověk stává citlivý na specifický potravinový alergen. Tato fáze je běžně bez příznaků. Ve druhé fázi, kdy je daná osoba opětovně vystavena příslušnému alergenů, může být vyvolána alergická reakce (Verhoeckx et al. 2016).

U jedlého hmyzu byl také potvrzen výskyt tzv. zkřížených alergií. Tento jev vzniká na základě podobnosti (v sekvenci aminokyselin) daných alergenů. Z tohoto důvodu mohou IgE protilátky imunitního systému, které byly vytvořeny proti určitému alergenů, reagovat stejně (Van Huis 2016). Například lidé s alergií na mořské plody mohou po konzumaci hmyzu pociťovat stejné alergické reakce. Stejně tak lidé alergičtí na roztoče. Tento jev je dán svalovým proteinem trypomysinem, což je nejvíce obsažený protein v těle členovců (Bessa et al. 2017). Tato látka je dobře známým panalergenem (látka velice podobná ostatním alergenům) u těchto živočichů (van der Fels-Klerx et al. 2018). Van der Fels-Klerx et al. (2018) uvedli studii, která potvrdila souvislost přítomnosti tohoto proteinu s vyvolanou alergickou reakcí při konzumaci potměníka moučného (*Tenebrio molitor*) a potměníka brazilského (*Zophobas morio*). Kontrolované testy citlivosti kůže používající sedm různých extraktů hmyzích bílkovin ukázaly, že 30 % předtím alergických pacientů a 25 % nealergických pacientů vykazuje citlivost alespoň na jeden extrakt z hmyzu. Pacienti v této studii nikdy předtím nekonzumovali hmyz, proto se předpokládá, že jejich citlivost byla v důsledku předchozí expozice alergenům hmyzu (inhalace, kontakt, náhodná spotřeba) nebo zkřížené reaktivity mezi alergenem hmyzu a potenciální alergen korýšů (Bessa et al. 2017). V Číně, kde je spotřeba hmyzu považována za pochoutku, byly hlášeny případy alergických reakcí po konzumaci larev bource morušového, od mírných reakcí až po závažnější případy anafylaktického šoku (Bessa et al. 2017). Kromě těchto případů byl objeven nový alergen u cvrčka polního, nazván prekurzor hexamerin 1B. Strukturou je podobný hemokyaninu, což je alergen běžně se vyskytující u krevet (Karaš et al. 2019). Naproti tomu mezi dobře známé patří alergie na včelí a vosí jed. Larvy včel se nedoporučují konzumovat jedincům alergičtí na pyl, protože ho mohou samy obsahovat (Huis et al. 2013).

Předpokládá se, že by některé tepelné úpravy hmyzu mohly snížit alergenitu bílkovin, ale této problematice je ještě nutné věnovat další výzkum. Je však důležité rozlišovat, zda se jedná skutečně o potravinovou alergii nebo možnou chemickou kontaminaci hmyzu (van der Fels-Klerx et al. 2018).

3.1.6.2 Biologická rizika

Hmyz obsahuje širokou škálu mikroorganismů, které mohou být patogenní pro člověka. Kromě toho se v něm mohou vyskytovat parazité nebo jejich larvy. Doposud však neexistují důkazy, že by hmyz obsahoval patogenní viry nebo priony (van der Fels-Klerx et al. 2018). Mikrobiologie potravin je rozhodujícím faktorem v bezpečnosti potravin jedlého hmyzu (Grabowski et al. 2018). Této problematice bude věnována samostatná kapitola.

3.1.6.3 Fyzikální rizika

Největší fyzikální riziko spojené s konzumací hmyzu je nebezpečí udušení částmi jeho těla. Proto je doporučováno, obzvláště dětem a seniorům, nekonzumovat hmyz jako celek, ale ve formě mouk (Marone 2016).

V Demokratické republice Kongo bylo zaznamenáno, že konzumace kobylek a sarančat bez odstranění nohou způsobuje zácpu. Podobně, ve východní Jávě v Indonésii, bylo zjištěno, že pacienti, kteří konzumovali velké množství pražených brouků (*Lepidiota* spp.), trpěli úplnou zácpou. Díky nahromaděným nestrávitelným zbytkům chitinu uvnitř střev museli podstoupit chirurgický zákrok, což je v těchto případech jediné možné řešení (Van Huis et al. 2013).

3.1.6.4 Chemická rizika

Několik studií naznačilo, že hmyz je vysoce citlivý na bioakumulaci chemických kontaminantů z krmiva, substrátu nebo vody (Purschke et al. 2017). Takové chemické látky zahrnují mimo jiné těžké kovy, zbytky veterinárních léčiv nebo organohalogenové sloučeniny (van der Fels-Klerx et al. 2018). Kromě toho může jedlý hmyz obsahovat vyšší než přijatelné úrovně reziduí v důsledku častého používání pesticidů (Mlcek et al. 2014). V důsledku bioakumulace toxických látek může docházet ke kontaminaci potravin a krmiv z hmyzu. Hlavní chemická cesta expozice je prostřednictvím substrátu, na kterém se hmyz chová, a proto se příslušné chemické látky liší (van der Fels-Klerx et al. 2018). Bylo prokázáno, že u larev potměníka moučného chovaného na znečištěné půdě byl vysoký výskyt koncentrace olova a kadmia, která se lineárně zvyšovala s dobou expozice. Další výzkum o bioakumulaci těžkých kovů potvrdil, že larvy krmeny kukuřičnou potravou s obsahem kadmia, olova a zinku obsahují kadmium. Úroveň nahromaděného kadmia byla dokonce vyšší než v substrátu, zatímco olovo a zinek nahromaděny nebyly (Purschke et al. 2017). Studie u larev zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) také prokázala různá množství toxických látek. Ve vzorcích byla zjištěna přítomnost polychlorovaných bifenyly, dioxinů, pesticidů, toluenu, mědi a zinku (Murefu et al. 2019). Problém by mohl také nastat u hmyzu chovaného na zemědělském odpadu, kde by mohl být vystaven mykotoxinům, stejně jako reziduí veterinárních léčiv z chovu na hnoji (van der Fels-Klerx et al. 2018). Byly zaznamenány případy, kdy došlo po konzumaci hmyzu k otravám nebo botulismu, a to z důvodu obsahu aflatoxinů (Karaš et al. 2019). Ovšem studie Purschke et al. (2017) prokázala, že se v larvální tkáni potměníka moučného chovaného na kontaminovaném substrátu mykotoxiny ani pesticidy neakumulovaly. Určitý hmyz může produkovat toxiny jako obranný mechanismus (Karaš et al. 2019). Látky, které souvisí se zabarvením povrchu těla hmyzu zřejmě slouží jako obranná žlázová sekrece. Tyto látky mohou být potencionálně toxické a představují nebezpečí pro citlivé jedince. Příkladem může být karmínové barvivo (známé pod označením E120) získávané ze sušených těl samiček červce nopálového (*Dactylopius coccus*), které se často používá v džusech, jogurtech, cukrovinkách a kosmetice. Jeho konzumace je často spojována s anafylaktickým šokem (Marone 2016). Další příklady chemických látek produkovaných hmyzem jsou kyanogenní glykosidy, steroidy, pedein, inhibiční enzymy nebo přírodní neurodepresiva (čeleď tesaříkovití). Spotřeba tohoto hmyzu může vést k nevolnostem, zvracením nebo poruchám zraku (Rumpold & Schlüter 2013; Marone 2016).

3.2 Mikrobiologická kvalita jedlého hmyzu

Účelem zpracování a přípravy potravin je poskytovat spotřebiteli bezpečné, zdravé a výživné potraviny. Bezpečnost potravin ohledně mikrobiální aktivity v jedlém hmyzu je velice důležitá, a to z důvodu průmyslového využití celého těla včetně trávicího traktu. Většina

mikroorganismů přítomných v jedlém hmyzu je totiž považována za škodlivé pro člověka a jsou příčinou znehodnocování a kažení potravin (Marshall et al. 2016). Na základě nedávných vědeckých poznatků Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) uvedl, že možná mikrobiologická hrozba hmyzu přijatého pro spotřebu je srovnatelná s ostatními hrozbami spojenými s živočišnými bílkovinami (Karaš et al. 2019).

Podle mnoho průzkumných studií bylo dokázáno, že čerstvý hmyz obsahuje nepřehledné množství životaschopných mikroorganismů (archea, bakterie, plísňe, kvasinky, prvoky). Tyto mikroorganismy společně tvoří mikrobiotu jedlého hmyzu (Marshall et al. 2016; van der Fels-Klerx et al. 2018). Tato mikrobiota je nezbytná pro metabolismus a přežití hmyzu a je odrazem životního stylu v přírodě nebo v chovu (EFSA Scientific Committee 2016).

Obecně platí, že tomuto riziku lze do jisté míry předcházet dodržováním hygienických opatření při chovu hmyzu (použitý substrát a zemědělské prostředí), zpracování a skladování. Dále je důležité tepelné opracování před samotnou konzumací a vyprázdnění trávicího traktu hmyzu (EFSA Scientific Committee 2016).

3.2.1 Bakterie

Dle článku EFSA Scientific Committee (2016) je mikrobiota jedlého hmyzu obvykle nejvíce tvořena bakteriemi rodu *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus* a *Streptococcus*. V následujících podkapitolách bude uvedena obecná charakteristika zmíněných rodů bakterií a konkrétní případy výskytu v jedlém hmyzu.

3.2.1.1 Obecná charakteristika vybraných rodů bakterií

Acinetobacter

Rod *Acinetobacter* představuje striktně aerobní gram-negativní psychrofilní tyčinky (Bendinelli et al. 2008; Rossi 2016). Dokáží růst v širokém rozsahu teplot, nejlépe však při teplotách 20 °C – 30 °C. Acinetobakterie se vyskytují v půdě, vodě, odpadních vodách a široké škále potravin, včetně drůbežího a červeného masa a mléčných výrobků. Byly izolovány i z lidské kůže (Kämpfer 2014). Tyto bakterie způsobují onemocnění močových cest, pneumonii nebo vznik infekce při poranění kůže (Bendinelli et al. 2008). Díky této skupině bakterií dochází ke znehodnocení masa provázeno zápachem a slizem na povrchu (Rossi 2016).

Bacillus

Bakterie rodu *Bacillus* jsou široce zastoupeny v životním prostředí a jsou běžnými kontaminanty potravin. Jedná se o grampozitivní, aerobní tyčinky, některé druhy však mohou být fakultativně anaerobní. Jsou sporulující, tzn., že tvoří endospory, které jsou odolné vůči teplotám, UV záření, vysokému hydrostatickému tlaku, chemickému ošetření apod. (Carlin 2016). Většina druhů (*B. clausii*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*) je nepatogenních pro člověka a některé jsou využívány jako probiotické kultury v komerčních výživových doplncích. Mezi patogenní druhy se např. řadí *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*, *B. thuringiensis* (Delbrassinne & Mahillon 2016). Tyto druhy produkují toxiny, díky nimž může docházet po požití kontaminované potravin

k průjmům a zvracení. *B. anthracis* způsobuje onemocnění zvané antrax, které je především onemocněním zvířat, nicméně může docházet k přenosu na člověka po požití mléka či masa z infikovaných zvířat (Jenson 2014).

Escherichia

Escherichia je rod bakterií, který je řazen do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o gramnegativní, nesporulující tyčinky, které jsou důležitými potravinovými patogeny a indikátory fekálně znečištěné vody (Batt 2014). Mezi nejznámější druhy se řadí *E. coli*, dále jsou pak popsány např. *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, a *E. vulneris* (Fanning et al. 2016). *E. coli* se řadí mezi komenzální organismus, který tvoří součást mikrobioty lidí a zvířat. Tyto mikroorganismy typicky kolonizují gastrointestinální trakt dětí během několika hodin po porodu a zřídka způsobují onemocnění. Existuje však několik vysoce adaptovaných kmenů *E. coli*, které získaly specifické virulentní atributy. Díky tomu mají zvýšenou schopnost přizpůsobit se novému prostředí a umožňují jim vyvolat široké spektrum onemocnění jako otravy z kontaminovaného jídla s těžkými žaludečními křečemi, vodnaté nebo krvavé průjmy, zvracení a nevolnost (Kaper et al. 2004). Mezi závažné komplikace, které se mohou objevit, patří selhání ledvin, záchvaty a mrtvice (Fanning et al. 2016). Patogenní *E. coli* jsou rozděleny do čtyř hlavních kmenů, a to podle způsobu virulence. Nejběžnější je enteropatogenní (EPEC) *E. coli*, která je spojená s těžkými průjmy kojenců. Jiné virulentní skupiny zahrnují enteroinvazivní (EIEC) *E. coli*, enterotoxigenní (ETEC) *E. coli* a enterohemoragická (EHEC) *E. coli* (Smith & Fratamico 2016). Typ EHEC je schopen vyvolat jednu z nejzávažnějších forem onemocnění, což způsobuje hemolyticko-uremický syndrom. Tyto kmeny produkují enterohemolysin a shiga toxiny. Kmeny EIEC zase způsobují závažnou formu onemocnění tím, že jsou schopny pronikat do střevních buněk (Batt 2014).

Lactobacillus

Lactobacillus je rod grampozitivních, fakultativně anaerobních či mikroaerofilních nesporulujících bakterií (J. B. Wood & Holzapfel 1995). Laktobacily jsou známy jako bakterie mléčného kvašení. Díky nim dochází k fermentaci sacharidů (glukózy a laktózy) na kyselinu mléčnou. Proto jsou intenzivně využívány v potravinářském průmyslu při výrobě fermentovaných výrobků (jogurt, kefír, acidofilní mléko, tvaroh, sýry apod.) (Mozzi 2016). Tyto mikroorganismy běžně tvoří mikrobiom člověka (J. B. Wood & Holzapfel 1995). Druh *L. acidophilus* je obvykle používán jako součást probiotik (Neish 2017).

Micrococcus

Tento rod zastupují grampozitivní, nesporulující, aerobní bakterie z čeledi *Micrococcaceae*. Mají kokovité buňky, které jsou uspořádány v tetradách a nepravidelných shlucích a vykazují pozitivní reakci na katalázový test (Kocur et al. 2006). Druhy mikrokoků se běžně vyskytují ve velkém množství v suchozemských a vodních ekosystémech, včetně půdy, sladké a mořské vody nebo písku. Primárním prostředím mikrokoků je pokožka teplokrevných zvířat, včetně lidí (Nuñez 2014). Rod *Micrococcus* není považován za patogenní. Bylo ovšem popsáno, že mikrokoky jsou často spojeny s infekcí močového měchýře (Kocur et al. 2006). Fyziologické vlastnosti tohoto rodu, kdy dokáží růst při vodní aktivitě 0,85 a přežívají pasterizaci mléka

(75 °C po dobu 15 s), umožňují kolonizaci zpracovaných potravin, jako jsou konzervovaná masa, fermentované výrobky a mléčné výrobky (Nuñez 2014).

Proteus

Bakterie rodu *Proteus* se obvykle vyskytují v přírodě a jsou často spojeny s lidmi, jelikož působí jako oportunní patogeny a způsobují řadu infekčních onemocnění (infekce močových cest, meningitida, gastroenteritida) (Kushwaha et al. 2014). Tento rod patří do čeledi *Enterobacteriaceae*, proto se jedná o gramnegativní, nesporulující, oxidázově negativní a fakultativně anaerobní bacily (Barson & Antonara 2018). Druhy těchto bakterií jsou v přírodě široce zastoupeny a tvoří důležitou roli při rozkladu organické hmoty. Vyskytují se v odpadních vodách, výkalech a ve shnilém mase (Kushwaha et al. 2014).

Pseudomonas

Rod *Pseudomonas*, patřící do čeledi *Pseudomonadaceae*, představuje gramnegativní aerobní tyčinky (Dodd 2014). Tento rod je úzce spojován s kontaminací a tvorbou biogenních aminů v mase, masných výrobcích, vejcích, ovoci, zelenině a fermentovaných potravinách (Nuñez & Medina 2016). Vzhledem ke schopnosti vytváření biofilmu mohou být tyto mikroorganismy problémem v potrubních systémech, dokonce i v systémech chlorovaných vod. Mezi nejvýznamnější lidský patogen patří druh *P. aeruginosa* (Dodd 2014). Druhy *P. syringae* a *P. morsprunorum* jsou známými patogeny ovocných stromů, které způsobují bakteriální korovou nekrózu peckovin (Loescher 2016).

Salmonella

Rod *Salmonella* patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o velkou skupinu gramnegativních, fakultativně anaerobních tyčinek, z nichž mnohé jsou známy jako lidské patogeny. V současné době jsou známy dva druhy – *S. enterica* a *S. bongori*. Většina patogenních salmonel patří do druhu *S. enterica*, který je dále rozdělen do několika poddruhů (Dykes 2016). Salmonely mohou růst v rozmezí 2 až 54 °C, optimální teplota pro růst je však 37 °C (Cox & Pavic 2014). Salmonela je celosvětově významný lidský patogen a má za následek výskyt četných onemocnění a úmrtí každý rok. Toto onemocnění je známé jako salmonelóza. Mezi příznaky patří vodnatý průjem, nevolnost, bolest břicha, horečka a bolest hlavy (Dykes 2016). Potenciální zdroje infekce jsou četné, jelikož bylo zjištěno, že tyto bakterie přetrvávají v širokém spektru prostředí a hostitelů, včetně potravin živočišného původu, ovoce a zeleniny, luštěnin, ořechů, domácích zvířat a plazů (Lynne et al. 2016).

Staphylococcus

Rod *Staphylococcus* je významný zástupce čeledi *Staphylococcaceae*. Tyto grampozitivní bakterie mají tvar koků a jsou fakultativně anaerobní (výjimku tvoří druh *S. aureus* subsp. *anaerobius* a *S. saccharolyticus*, u kterých je uváděn rychlejší růst za aerobních podmínek) (Heyrman et al. 2009). Tyto bakterie jsou všudypřítomné a široce rozšířené v přírodě, přičemž některé obývají jako komenzálové kůži a sliznici teplokrevných živočichů a lidí. Mohou být také izolovány ze širokého spektra potravin, jako je maso, mléko, sýry, ale také z povrchů nábytku a nádobí (Morente et al. 2016). Mezi nejvýznamnější druhy se řadí *S. aureus*

a *S. epidermidis* (Heyrman et al. 2009). *S. aureus* je druh důležitých patogenních bakterií, které mohou svojí produkcí enterotoxinů vyvolat otravy z kontaminovaných potravin (Walker-York-Moore et al. 2017). Heyrman et al. (2009) uvádí, že v padesátých letech minulého století způsobil značnou úmrtnost pacientů. Mezi hlavní infekce způsobené tímto druhem patří impetigo, pneumonie, meningitida, akutní endokarditida, furunkl, hnisavé záněty kůže apod. Druhy *S. xylosus*, *S. carnosus* a *S. equorum* mají pozitivní vliv na fermentační procesy a sensorické vlastnosti potravin. Často jsou využívány jako součást startovacích kultur při fermentaci masa a sýrů (Morente et al. 2016).

Streptococcus

Tyto grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující bakterie mají tvar koků, které jsou typicky uspořádány v řetízcích. Patří do čeledi *Streptococcaceae*. Mnoho ze známých druhů jsou důležitými patogeny zvířat i člověka (J. B. Wood & Holzapfel 1995). Druh *S. thermophilus* se využívá jako hlavní startovací kultura při výrobě jogurtů a sýrů. Společně s rody *Bifidobacteria* a *Lactobacillus* se používá jako probiotikum, kde zvyšuje jejich účinnost (Delorme 2008).

3.2.1.2 Mikrobiota jedlého hmyzu

U cvrčka domácího (*Acheta domestica* L.) byly nalezeny bakterie rodu *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Bacterioides*, a *Fusobacterium*. Tato mikrobiota může mít u cvrčků významný vliv na trávení sacharidů, proteinů a lipidů. Nicméně se toto zastoupení odvíjí od způsobu stravy (Marshall et al. 2016).

Další studie analyzovala vzorky cvrčků (sušené, v prášku), kobylek (sušené) a larvy potměníka moučného (sušené). Z mikrobiologické analýzy vyplynulo, že zde byly přítomné bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* a druhu *Clostridium perfringens*, zatímco testy na *Salmonella* spp. a *Listeria monocytogenes* byly negativní (Garofalo et al. 2017).

Ve hmyzu, který byl v kontaktu s infikovanou drůbeží, byl izolován rod *Campylobacter*. Nicméně z experimentů vyplynulo, že tento rod bakterií může u hmyzu přežít jen krátkodobě (EFSA Scientific Committee 2016).

Z mikrobiologické analýzy smaženého a okořeněného saranče stěhovavého (*Locusta migratoria*) vyplynulo, že nalezené počty mikroorganismů byly výrazně nižší oproti sušenému. Vzorky však stále obsahovaly čeleď *Enterobacteriaceae* (1,0 log KTJ/g), *Staphylococcus* (2,5 log KTJ/g) a *Bacillus* (3,0 log KTJ/g). Tyto vzorky byly ovšem negativní na *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* (Grabowski & Klein 2017a).

Marshall et al. (2016) uvedl, že z larev potměníka stájového (*Alphitobius diaperinus*) byly izolovány bakterie *E. coli*, *Citrobactersedlakii*, *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp. a *Bacillus subtilis*.

U larvy potměníka moučného (*Tenebrio molitor*) byly identifikovány rody *Actinobacillus*, *Propionibacterium*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Coxiella*, *Dermabacter*, *Brachybacterium*, *Clavibacter*, *Staphylococcus* a *Exiguobacterium* (Marshall et al. 2016; Garofalo et al. 2017; Fasolato et al. 2018).

Při studii cvrčka dvojskvrnného (*Gryllus bimaculatus*) a larvy potemníka brazilského (*Zophoba satratus*) byla zjištěna přítomnost bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, rodu *Staphylococcus*, *Bacillus* a druhu *Pseudomonas aeruginosa* (Grabowski & Klein 2017b).

V běžně konzumovaných druzích nosorožků (*Oryctus monocerus*, *Oryctus owariensis* a *Oryctus boas*) v západní Africe byly nalezeny patogenní bakterie *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Bacillus cereus* (Huis et al. 2013).

3.2.2 Plísňe

Plísňe produkují entomopatogenní toxiny, které obvykle způsobují úmrtnost hmyzu. Hmyz však může být nositel plísni a kvasinek, které mohou být potencionálním patogenem pro zvířata i člověka (EFSA Scientific Committee 2016). Obvykle se vyskytující plísňe v jedlém hmyzu bývají rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* a *Candida*, které mohou být součástí povrchu hmyzu nebo jeho trávicího traktu (Schlüter et al. 2016). V následující podkapitole bude uvedena stručná charakteristika těchto rodů plísni a konkrétních případů výskytů v jedlém hmyzu.

3.2.2.1 Obecná charakteristika vybraných rodů plísni

Alternaria

Rod *Alternaria* (česky čern) je řazen mezi běžné plísňe. Kolonie jsou obvykle olivově černé barvy. Tento rod napadá a způsobuje škody na zemědělských produktech, včetně obilných zrn (zejména pšenici, ječmen, čirok), ovoce a zeleniny. Kromě toho je několik druhů schopno produkce sekundárních metabolitů, které jsou považovány za fytotoxiny a mohou být škodlivé jak pro zvířata, tak i pro člověka (Patriarca et al. 2014). Ty mohou způsobovat slinění, zvracení, křeče nebo gastrointestinální krvácení (Moretti & Sarrocco 2016).

Aspergillus

Tento rod (česky kropidlák) patří do řádu *Eurotiales* a zahrnuje celou řadu všudypřítomných hub, které často kontaminují skladovaná obilná zrna a širokou škálu dalších potravin (Moretti & Sarrocco 2016). Tvoří rychle rostoucí kolonie obvykle zbarvené bíle, žlutě, hnědě až černě. Pro člověka patogenní jsou druhy *A. flavus* a *A. parasiticus*, které jsou schopny produkovat karcinogenní aflatoxiny (Chang et al. 2014). Mezi tyto látky se řadí aflatoxin B1, B2, G1 a G2, které můžeme nalézt v celé řadě komodit jako jsou ořechy, kukuřice nebo sušené fíky. *A. ochraceus*, který se vyskytuje hlavně na obilných a kávových zrnech, produkuje ochratoxin A, který je silným neurotoxinem (Moretti & Sarrocco 2016). Naproti těmto druhům má *A. oryzae* (česky kropidlák rýžový) mnoho komerčních využití v potravinářství. Hraje důležitou roli při výrobě tradičních asijských fermentovaných potravin, jako je saké, sójová omáčka a miso. Kromě toho se také využívá při výrobě průmyslových enzymů pro zpracování potravin (Gomi 2014).

Candida

Rod *Candida* (česky kandida) je rod z řádu *Saccharomycetales* tvořící kolonie s krémovým až nažloutlým zbarvením. Rozmnožuje se vegetativně (dělením, pučením) a vytváří pravé

mycelium nebo pseudomycélium (Hommel 2014). Tyto kvasinky jsou široce rozšířeny v přírodních a umělých stanovištích. Dlouhodobě se využívají při zpracování potravin, včetně výroby vína, kvásku, mléčných výrobků, masa a uzenin. Důležitou roli hrají i při kažení potravin (Sutherland et al. 2014).

Fusarium

Fusarium (česky srpatka) je rod z řádu *Ascomycetes* zahrnující vysoký počet rostlinných patogenních druhů. Tvoří vícebuněčné zakřivené makrokonidie. Kolonie druhů *Fusarium* jsou charakteristickými rychlým růstem a sametovým flokózním myceliem (Thrane 2014). Tyto druhy způsobují onemocnění několika zemědělsky významných plodin, včetně obilovin. Mnoho z nich produkuje širokou škálu mykotoxinů (Moretti & Sarrocco 2016). Toxiny produkované tímto rodem jsou deoxynivalenol, zearalenon, fumonismy B1 a B2 a toxiny T-2 a HT-2 (Picó 2016). T-2 toxin je jeden z nejvíce akutně jedovatých, produkovaný hlavně *F. sporotrichioides* a *F. langsethiae* běžně se vyskytujícími na obilovinách (např. ječmen a pšenice). Nemoci spojené s konzumací obilovin kontaminovaných T-2 zahrnují nevolnost, zvracení, nekrotické léze, těžký hemoragický průjem a hemoragii v mnoha tělesných orgánech. T-2 toxin je také silným imunosupresivem (Moretti & Sarrocco 2016).

Penicillium

Penicillium (česky štětičkovec) je velice důležitý rod plísni řazen do řádu *Eurotiales*. Kolonie tohoto rodu jsou obvykle sametové a bíle zbarvené s tmavým středem (Pitt 2014). Štětičkovec je v přírodě široce rozšířen. Obvykle se nachází jako saprotrof v půdě, částech rostlin nebo v rozkládající se organické hmotě (Moretti & Sarrocco 2016). Tento rod je významným producentem mykotoxinů a způsobuje kažení potravin (Pitt 2014). Dokáže kontaminovat uložené potraviny při nízkých teplotách, jelikož se jedná o psychrofilní rod schopný růstu při 0 °C. *Penicillium* zahrnuje kolem 100 toxigenních druhů a rozsah známých produkovaných mykotoxinů je širší než u jiných toxigenních plísňových rodů, jako je *Aspergillus* a *Fusarium* (Moretti & Sarrocco 2016). Nejznámějším mykotoxinem je patulin, který byl nalezen v kontaminovaných jablkách, hruškách, zelenině, obilovinách a sýrech. Je považován za karcinogen (Picó 2016). Kromě těchto kontaminantů jsou některé druhy po staletí využívány při výrobě plísňových sýrů (*P. camemberti*) a fermentovaných salámů (*P. nalgiovense*, *P. chrysogenum*) (Frisvad 2014). Druh *P. chrysogenum* je známý produkcí penicilinu (Pitt 2014).

3.2.2.2 Plísně a kvasinky v jedlém hmyzu

V čerstvém, lyofilizovaném a zmrazeném hmyzu (potemník moučný, saranče stěhovavá) bylo nalezeno značné množství kvasinek a plísni (EFSA Scientific Committee 2016).

Mikrobiologický rozbor sušených tzv. mopanových housenek (*Imbrasia belina*), které jsou často konzumovány v mnoha afrických zemích prokázal přítomnost plísni. Nejčastější izoláty plísni byly druhy *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* a *Phycomycetes* (Mpuchane et al. 1996).

Z výsledků studie provedené na housenkách motýla druhu *Bunaeaalctinoe* se ukázalo, že obsahují plísně rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* a jejich mykotoxiny (Murefu et al. 2019).

Ze studií, kdy byly analyzovány vzorky cvrčků a kobylek vyplynulo, že většina nalezených plísní patřila do rodu *Aspergillus* a *Tetrapisispoda*. V případě larvy potemníka moučného byly izolovány nejběžnější rody *Candida*, *Pichia* a *Debaromyomyces* (Roncolini et al. 2018).

Roncolini et al. (2018) zároveň uvádí, že doposud existuje jen málo studií týkající se plísňové kontaminace jedlého hmyzu.

3.3 Vybraný druh jedlého hmyzu

3.3.1 Potemník moučný

3.3.1.1 Charakteristika

Pro samotnou analýzu byl vybrán jako zástupce jedlého hmyzu potemník moučný. Potemník moučný (*Tenebrio molitor* Linnaeus), jehož larvální stádium je často označováno pod pojmem moučný červ, je řazen do čeledi potemníkovití (*Tenebrionidae*) (Mariod et al. 2017). Jedná se o synantropní druh, který se v přírodě vyskytuje v ptačích hnízdech a ve starých listnatých stromech. Tento druh prochází čtyřmi vývojovými stádii života – vajíčko, larva, kukla a imago. Larvy měří přibližně 2,5 cm, zatímco dospělec zhruba 1,8 cm (Obrázek 2) (Bryning et al. 2005). Původem evropský hmyz je v současnosti přítomný po celém světě. Jeho larva a imago je považována za škůdce obilí, mouky a moučných produktů. Nejen, že se živí skladovanými potravinami, ale zároveň je kontaminují exkrementy, benzochinony nebo alkeny (Halloran et al. 2018).

3.3.1.2 Potemník moučný jako potravina

Potemník se snadno rozmnožuje a má cenný proteinový profil. Z těchto důvodů bývají larvy součástí krmiv pro domácí zvířata, hlodavce, ptáky, ryby a plazy. Obvykle je jako krmivo použito ve formě prášku, v konzervách nebo sušených či živých larev (Mariod et al. 2017). Dle Oonincxe et al. (2012) je evropská produkce tohoto hmyzu vyšší než produkce mléka nebo kuřecího masa a obdobná jako u vepřového a hovězího masa.

Díky vysokému obsahu nutričních a minerálních látek je jeho využití rovněž rozšířeno i do oblasti lidské výživy. Dle Mariod et al. (2017) se výživová hodnota živé larvy potemníka moučného sestává z 20 % bílkovin, 13 % tuku, 2 % vlákniny a 62 % vlhkosti. Zatímco u sušených larev je to 53 % bílkovin, 28 % tuku, 6 % vlákniny a 5 % vlhkosti. V larvách byl nalezen i vysoký obsah minerálních látek - hořčík (87,5 mg / 100 g), zinek (4,2 mg / 100 g), železo (3,8 mg / 100 g), měď (0,78 mg / 100 g) a mangan (0,44 mg / 100 g). Obsah nutričních látek je ve srovnání s hovězím masem téměř podobný (Tabulka 2) (Van Huis et al. 2013). Larvy se konzumují pečené, smažené nebo jako součást salátů, dezertů či pečiva (Mariod et al. 2017). Na internetu lze nalézt z potemníka rozsáhlý výběr receptů od palačinek, hamburgerů po pizzy nebo tacos.



Obrázek 2 Dospělý (vlevo) a larva (vpravo) potměníka moučného. Zdroj: https://en.wikipedia.org/wiki/Mealworm#/media/File:Tenebrio_molitor_MHNT.jpg; <http://www.rainbowmealworms.net/500-mealworms/> .

Tabulka 2 Porovnání nutričních látek v potměníku moučném a hovězím maso (Huis et al. 2013; Mariod et al. 2017).

	<i>Tenebrio molitor</i>	Hovězí maso	
Celková energie (kcal/kg)	2056	2820	
Proteiny (% podíl sušiny)	53,0	55,0	
Esenciální aminokyseliny (g/kg sušiny)			
	Isoleucin	24,7	16,0
	Leucin	52,2	42,0
	Lysin	26,8	45,0
	Methionin	6,3	16,0
	Phenylalanin	17,3	24,0
	Threonin	20,2	25,0
	Tryptofan	3,9	-
	Valin	28,9	20,0
Tuky (% podíl sušiny)	28,0	41,0	
Esenciální mastné kyseliny (g/kg sušiny)			
	Linolová	91,3	10,2
	Linolenová	3,7	3,9
	Arachidonová	-	0,63
Neesenciální mastné kyseliny (g/kg sušiny)			
	Stearová	10,2	48
	Myristová	7,6	13
	Palmová	60,1	99
	Olejová	141,5	159

3.4 Legislativa

V členských zemích Evropské unie je od 1.1.2018 uvedeno v platnost nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 o nových potravinách. To jasně definuje hmyz a výrobky z něj jako novou potravinu (Bezpečnost potravin 2018). „Novou potravinou se rozumí potravina, která nebyla před 15.5.1997 uvedena na trh a použita pro lidskou spotřebu bez ohledu na datum přistoupení ke členským státům Evropské unie“ (Turck et al. 2016). V současné době (k datu 7. 6. 2018) jsou možné uvádět na trh tyto druhy hmyzu:

1. cvrček domácí – *Acheta domestica*;
2. cvrček krátkokřídlý – *Grylloides sigillatus*;
3. larvy potemníka moučného – *Tenebrio molitor*;
4. larvy potemníka stájového – *Alphitobius diaperinus*;
5. saranče pustinná – *Schistocerca gregaria*;
6. saranče stěhovavá – *Locusta migratoria* (Bezpečnost potravin 2018).

Ministerstvo zemědělství publikovalo příručku „Zásady správné zemědělské a výrobní praxe produkce hmyzu určeného pro lidskou spotřebu“, kde uvádí doporučená mikrobiologická kritéria v chovném hmyzu, která vychází z dříve platných evropských právních předpisů. Ty jsou uvedeny v Tabulce 3. Dále jsou zde uvedena opatření při chovu a zpracování hmyzu pro lidskou spotřebu (Ministerstvo zemědělství 2018).

Tabulka 3 Přípustná doporučená mikrobiologická kritéria v jedlém hmyzu (Ministerstvo zemědělství 2018).

Mikroorganismus	Maximální přípustná hodnota [KTJ]	Množství výrobku [g] nebo [ml]
<i>Salmonella</i> spp.	0	25
Mezofilní aerobní bakterie	10 ⁵	1
<i>Enterobacteriaceae</i>	10 ²	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	1

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Kultivace

Kultivace je proces rozmnožování organismů poskytováním správných podmínek prostředí. Rostoucí mikroorganismy si vytvářejí repliky samy sebe a k tomu vyžadují přítomnost prvků, které k tomuto kroku potřebují. Živiny musí tyto prvky poskytovat v metabolicky přístupné formě. Kromě toho organismy potřebují metabolickou energii k syntéze makromolekul a udržení nezbytných chemických gradientů přes jejich membrány. Faktory, které musí být během růstu kontrolovány, zahrnují živiny, pH, teplotu, provzdušňování, koncentraci soli a iontovou sílu média (Brooks et al. 2012).

4.1.1 Příprava vzorků hmyzu

Jako vzorek analyzovaného hmyzu byly vybrány larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) (Obrázek 3), které byly odchovány v Národním referenčním pracovišti v centru epidemiologie a mikrobiologie Státního zdravotního ústavu v Praze. Larvy byly odchovány při teplotě 22 °C a 25 °C.



Obrázek 3 Larvy potemníka moučného, které byly vybrány pro samotnou analýzu (Autor 2019).

Larvy v kontrolní skupině byly usmrceny mechanicky ve třecí misce, larvy v pokusných skupinách byly usmrceny přelitím vroucí vodou. Poté byly larvy zhomogenizovány ve třecí misce a po 1 g byly asepticky převedeny do sterilních zkumavek s ředícím médiem (5 g / l; Oxoid), tryptonem (5 g / l; Oxoid), kvasničným extraktem (2,5 g / l; Oxoid), Tweenem 80 (0,5 ml / l; Sigma-Aldrich) a L-cysteinem (0,25 g / l; Sigma-Aldrich). Z těchto vzorků byla

následně vytvořena decimální ředící řada, ze které bylo odebráno po 1 ml z každého ředění a toto množství bylo zaočkováno na Petriho misku s kultivačním médiem (vyjma rozboru klostridií, který je uveden níže). Použité typy kultivačních médií pro jednotlivé druhy bakterií jsou znázorněny v Tabulce 4. Očkování na Petriho misky probíhalo buď přelitím (celkový počet anaerobních a aerobních bakterií, bakterií mléčného kvašení a stafylokoků) nebo roztěrem (počet enterokoků, bacilů, *Escherichia coli* a *Salmonella* spp.) na příslušnou půdu. Pro stanovení *Clostridium* spp. bylo použito pomnožovací metody, nejprve bylo odebráno 0,1 ml z prvního ředění a poté naočkováno do lahvičky, která obsahovala Cooked meat medium.

Tabulka 4 Typy použitých kultivačních médií u příslušných mikroorganismů.

Mikroorganismy	Kultivační médium
Celkové počty aerobních mikroorganismů	Nutrient agar
Celkové počty anaerobních mikroorganismů	Wilkins + Soyabean agar
Bakterie mléčného kvašení	MRS agar
Stafylokoky	Staphylococcus medium
Bacily	Bacillus cereus selective agar
Entorokoky	Slanetz and Bartley agar
<i>Escherichia coli</i>	Tryptone Bile X-Glucunoride agar (TBX)
<i>Salmonella</i>	Salmonella Shigella agar (SS)
Klostridie	Cooked Meat Medium

4.1.2 Kultivace

Samotná kultivace probíhala buď aerobně nebo anaerobně v závislosti na analyzované skupině mikroorganismů. Vzorky pro zjištění výskytu celkových počtů anaerobních mikroorganismů, bakterií mléčného kvašení a klostridií byly kultivovány anaerobně pomocí AnaeroGen Plus 3,5 l (Oxoid™) 48 hod při 37 °C. Ostatní mikroorganismy byly kultivovány aerobně v termostatu po dobu 48 hod při 37 °C. S výjimkou *E. coli* (24 hod při 37 °C), bacilů (24 hod při 30 °C) a plísní i kvasinek (48 hod při 30 °C).

Pro analýzu klostridií byly lahvičky se vzorky inkubovány 2 dny při 37 °C a následně 14 dní při pokojové teplotě za účelem sporulace potenciálně přítomných klostridií. Dochází tak k vytvoření endospor, které produkují *Clostridium* spp. produkuje. Poté byly lahvičky se vzorky pasterovány při teplotě 80 °C po dobu 30 min. Po pasteraci byly vzorky naočkovány na selektivní médium Reinforced Clostridial Agar (Oxoid) a dále kultivovány anaerobně při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin.

Po kultivaci byly v jednotlivých vzorcích vyhodnoceny počty kolonií (Obrázek 4). Vybrané kolonie byly izolovány (každá kultura přenesena zvlášť sterilní kličkou do živného média) a pomnoženy při 37 °C po dobu 24 hod. Jako živné médium pro izolované anaerobní mikroorganismy byl použit Wilkins-Chalgren Anaerob Agar (43 g/l; Oxoid) s přísadkou Veggietones Soya Peptone (5 g/l; Oxoid), L-Cysteinu (0.5 g/l; Sigma-Aldrich) a Tweenu 80 (1 ml/l; Sigma-Aldrich). Pro izolované aerobní mikroorganismy byl použit Nutrient Broth

s přidavkem glukosy (10 g/l). Následně byla provedena identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.



Obrázek 4 Petriho misky po kultivaci s narostlými koloniemi, připraveny pro vyhodnocení (Autor 2019).

4.1.3 Kultivace a stanovení *Salmonella* spp.

Ke stanovení přítomnosti rodu *Salmonella* spp. bylo použito modifikované metodiky podle normy ČSN EN ISO 6579-1:2017. Vzorčky byly inokulovány po 1 g do Erlenmayerovy baňky s pufovanou peptonovou vodou. Tato směs byla následně inkubována při 37 °C po dobu 24 hod. Z této směsi bylo přeočkováno 0,1 ml inokula do baňky se selektivní půdou (Rappaport-Vassiliadis bujon), a následovala inkubace při 37 °C po dobu 48 hod. Poté bylo 0,1 ml inokula rozetřeno na SS agar (Tabulka 3) a misky byly kultivovány aerobně v termostatu při 37 °C po dobu 48 hod.

Po kultivaci byl pro stanovení použit latexový aglutinační test pomocí testovací soupravy *Salmonella* Test Kit (Oxoid™) (Obrázek 5). Principem této metodiky je vznik sraženiny, jestliže vzorek obsahuje specifický antigen či protilátku, která je navázána na povrch latexových částic (Wanger et al 2017). Při pokojové teplotě došlo k promíslení lahvičky s reagenty. Dále byla na jednu pozici testovací karty nanesena kapka testovacího činidla a na druhou kontrolní činidlo. Narostlé kolonie byly následně naneseny a smíseny s těmito reagenty po dobu 2 minut se současným krouživým pohybem karty za účelem promíchání. Po uplynutí této doby bylo možné pozorovat pozitivní či negativní reakci. Při negativní reakci nevzniká žádná sraženina a při pozitivní dochází k aglutinaci s testovacím činidlem a k žádné aglutinaci s kontrolním činidlem. Pokud dochází ke vzniku sraženiny na obou kruzích, jedná se o neinterpretovanou reakci a test se musí provést znovu.



Obrázek 5 Testovací souprava Salmonella Test Kit pro stanovení *Salmonella* spp. Zdroj: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DR1108A#/DR1108A>.

4.2 Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

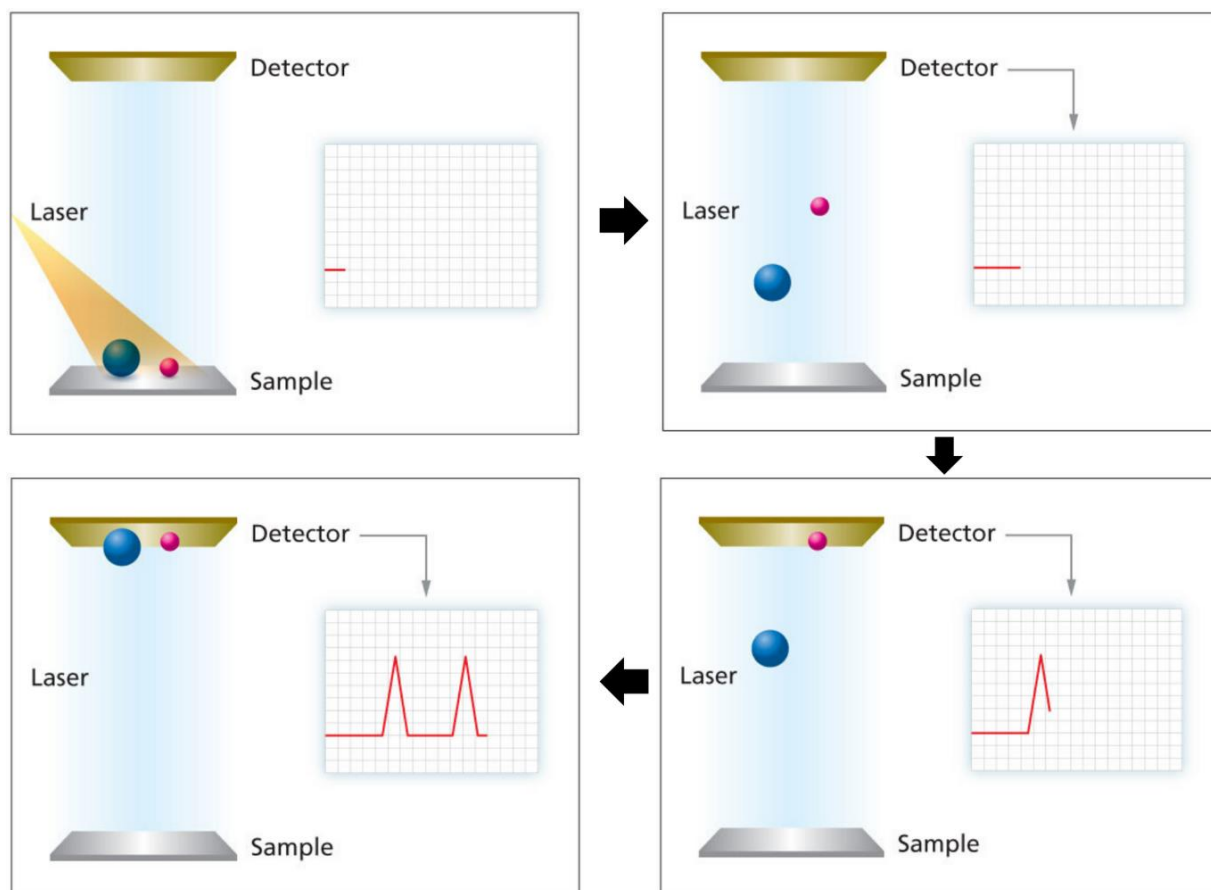
K identifikaci byl použit MALDI-TOF hmotnostní spektrometr AutoFlex Speed (Bruker Daltonik, Německo) pomocí metody extrakce ethanolem a kyselinou mravenčí (Schulthess et al., 2013).

4.2.1 Příprava vzorků

Do čisté Eppendorfky bylo napipetováno 300 μ l 70% ethanolu, následně přeneseno půdy 5 mg – 10 mg narostlé kolonie a vše důkladně promícháno pomocí vortexu. Dále tato směs centrifugována při 14000 otáčkách/ min po dobu 3 min. Ze stočených vzorků byl slit supernatant a pelet byl ponechán několik minut schnout při laboratorní teplotě. K peletu bylo následně přidáno 30 μ l kyseliny mravenčí (70%) a stejné množství acetonitrilu (100%) a celé důkladně promícháno. Takto připravený vzorek se po dobu 3 min centrifugoval při 14000 ot. / min. Vzniklý supernatant se v množství 1 μ l nanesl na čistou MALDI destičku MTP 384 Polished Steel TF Target a nechal zaschnout na vzduchu při laboratorní teplotě. Poté se ihned zaschnutý supernatant překryl 1 μ l roztokem MALDI matrice (kyselina α -kyano-4-hydroxycinnamová rozpuštěná v acetonitrilu, vodě a kyselině trifluoroctové - 50: 47,5: 2,5) a po zaschnutí byl připraven k identifikaci.

4.2.2 Identifikace

Identifikace byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF (Bruker Daltonik, Německo) za využití softwaru MALDI Biotyper RTC 3.0 (Bruker Daltonik). Pomocí této ionizační techniky, která využívá laserovou energii k ionizaci vzorku smíchaného s odpovídající matricí, je možné vypočítat rychlost letu jednotlivých molekul ve vzorku obsažených a díky tomu analyzovat příslušný vzorek (Obrázek 6) (Hillenkamp et al. 1991).



Obrázek 6 Princip hmotnostního spektrometru MALDI-TOF. Po ionizaci vzorku je zaznamenána rychlost jednotlivých molekul na detektor a zanalyzována pomocí softwaru MALDI Biotyper RTC 3.0. Zdroj: <https://www.shimadzu.com/an/lifescience/maldi/princpl1.html>.

Po vysušení při pokojové teplotě byla destička vložena do hmotnostního spektrometru a měřena v pozitivním lineárním režimu v detekčním hmotnostním rozsahu 2 – 20 kDa.

Pro kvalitativní vyhodnocení byly vyloučeny vzorky, které nebyly správně identifikovány a vzorky, které dosáhly méně než 1 800 MALDI Biotyper skóre. Vyloučeny byly také vzorky s více než 1 800 skóre, které ale obsahovaly identifikační skóre pro jiné druhy, které se lišilo o méně než 0,200.

Tento přístup byl použit na základě pokynů výrobce. MALDI Biotyper skóre mezi 1.700 a 1.999 označoval pravděpodobnou identifikaci rodu, skóre mezi 2.000 a 2.299 označoval bezpečnou identifikaci rodu a pravděpodobnou identifikaci druhu a skóre nad 2 300 značil bezpečnou identifikaci rodu i druhu (Svejstl et al. 2018).

V této práci je míra pravděpodobnosti značena:

1. $1,700 - 1,999$ = pravděpodobná identifikace rodu,
2. $2,000 - 2,299$ = bezpečná identifikace rodu, pravděpodobná identifikace druhu,
3. $2,300 - 3,000$ = vysoce pravděpodobná identifikace na úrovni druhu.

4.3 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení pro určení existence statisticky významných rozdílů mezi jednotlivými vzorky mikrobiologického rozboru bylo provedeno pomocí statistického programu Statgraphic Centurion XV za použití dvouvýběrového t-testu s rovností rozptylů s nejmenší hladinou významnosti $P = 0,05$.

5 VÝSLEDKY

5.1 Kultivační stanovení mikroorganismů

Na základě uvedené metodiky byly po ukončení kultivace stanoveny a zaznamenány počty kolonií mikroorganismů v log KTJ/g do Tabulky č. 5.

Tabulka 5 Stanovený počet mikroorganismů po ukončení kultivace v larvách potměníka moučného uvedený v log KTJ/g. Hvězdička (*) značí statisticky významný rozdíl mezi teplotami odchovu, přičemž * je pro $P < 0,05$ a ** je pro $P < 0,01$. Přesné P hodnoty jsou uvedeny v pravém sloupci.

Stanovený ukazatel	log KTJ/g		
	22 °C	25 °C	P
Celkový počet aerobních mikroorganismů	7,92 ± 0,11 *	7,32 ± 0,59	0,021
Celkový počet anaerobních mikroorganismů	7,63 ± 0,10	6,98 ± 0,93	0,091
<i>Bacillus</i> spp.	4,03 ± 0,62	3,69 ± 0,46	0,068
<i>Enterococcus</i> spp.	6,89 ± 0,06 **	5,84 ± 0,61	0,001

Z výsledků z tabulky č. 5 je patrné, že došlo k redukcí v počtu mikroorganismů při teplotě odchovu 25 °C oproti nižší teplotě odchovu (22 °C). Jednotlivé výsledky u testovaných skupin mikroorganismů budou popsány v následujících podkapitolách.

5.1.1 Celkový počet aerobních mikroorganismů

Po ukončení kultivace byl zaznamenán nejvyšší nárůst u kmenů aerobních mikroorganismů. Jejich výskyt činil u vzorků larev odchovaných při teplotě 22 °C 7,92 ± 0,11 log KTJ/g oproti teplotě odchovu 25 °C, kde tento počet činil 7,32 ± 0,59 log KTJ/g. Dle statistického šetření byl mezi těmito vzorky zaznamenán významný statistický rozdíl ($P = 0,021$). Mezi zkoumanými kmeny mikroorganismů zde došlo k nejnižší redukcí narostlých kolonií v závislosti na teplotě odchovu.

5.1.2 Celkový počet anaerobních mikroorganismů

U kmenů anaerobních mikroorganismů došlo k nárůstu kolonií při 22 °C odchovu larev potměníka moučného na 7,63 ± 0,10 log KTJ/g. Při vyšší teplotě odchovu (25 °C) dosahoval nárůst 6,98 ± 0,93 log KTJ/g. Přestože byl nárůst kolonií po kultivaci nižší, byl tento rozdíl statisticky nevýznamný ($P = 0,091$).

5.1.3 *Bacillus* spp.

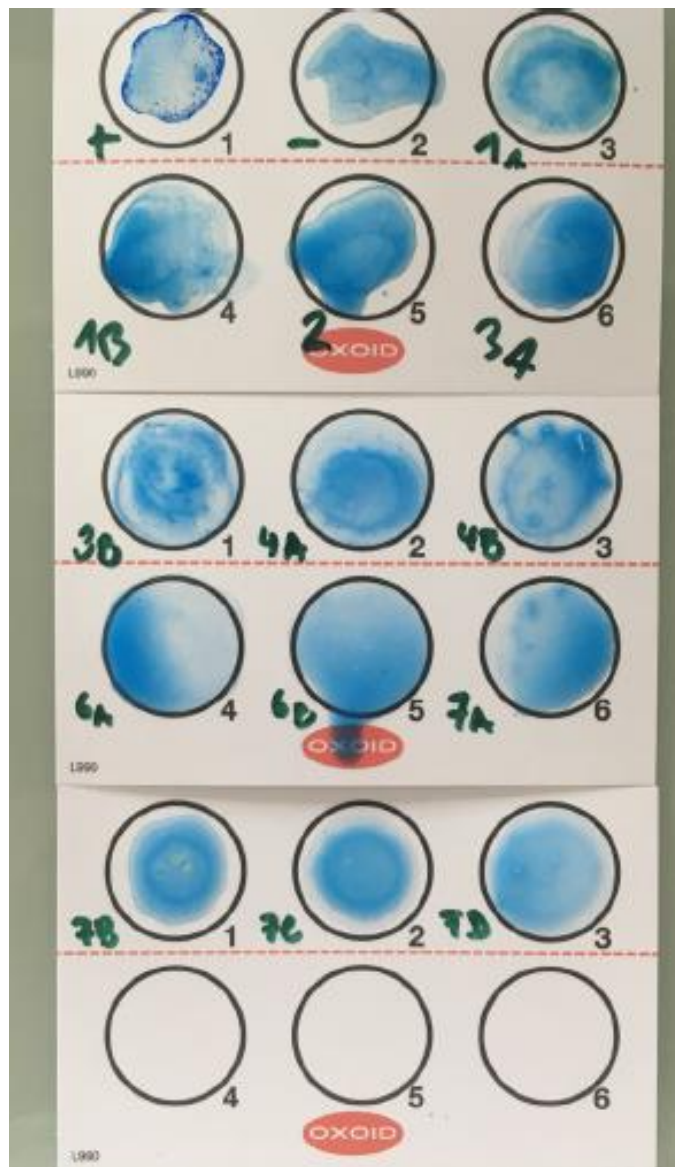
Z výsledků v tabulce č. 5 je zřejmé, že u rodu *Bacillus* také nedošlo dle statistického vyhodnocení k prokázání významného statistického rozdílu ($P = 0,068$) mezi vzorky odchovaných při nižší teplotě (22 °C) oproti vyšší teplotě odchovu (25 °C). U teploty odchovu při 22 °C činil jejich výskyt 4,04 ± 0,63 log KTJ/g ve srovnání s teplotou odchovu při 25 °C, kde byl nárůst kolonií těchto mikroorganismů 3,70 ± 0,46 log KTJ/g.

5.1.4 *Enterococcus* spp.

Po ukončení kultivace byl u rodu *Enterococcus* stanoven počet kolonií na $6,89 \pm 0,07 \log \text{KTJ/g}$ ($22 \text{ }^\circ\text{C}$). Při vyšší teplotě odchovu ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) byl počet kolonií snížen na $5,85 \pm 0,61 \log \text{KTJ/g}$. Zde statistické šetření prokázalo, že je mezi teplotami odchovu larev potměníka moučného a vliv na jeho mikrobiální aktivitu statisticky významný rozdíl ($P = 0,001$).

5.1.5 *Salmonella* spp.

Po ukončení kultivace byly kolonie na SS agaru, které vizuálně připomínaly kolonie salmonel, podle návodu od výrobce (Oxoid) testovány pomocí latexového aglutinačního testu (Obrázek č. 7).



Obrázek 7 Výsledky aglutinačního testu. Nahoře je provedena pozitivní (+) a negativní (-) kontrola, dále testované vzorky (1-7) (Autor 2019).

Žádný testovaný izolát nevykazoval vznik sraženiny jako tomu bylo u pozitivní testovací kontroly (Obrázek 7). Z provedeného aglutinačního testu tedy vyplynulo, že všechny izoláty (teplota odchovu 22 °C i 25 °C) z larev zkoumaného jedlého hmyzu byly negativní na přítomnost bakterie rodu *Salmonella*.

5.2 Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Identifikace byla provedena dle výše uvedené metodiky. Z testovaných 63 vzorků byly identifikovány bakteriální druhy nebo alespoň rody v celkem ve 21 vzorcích. Ostatní vzorky nebyly identifikovány průkazně, nebo byly vyloučeny z důvodu nízkého identifikačního skóre (< 1,700).

V tabulce č. 6 jsou uvedeny bakteriální druhy, které byly stanoveny pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Tabulky s jejich identifikačním skóre se nachází v přílohách (Tabulka 7 a Tabulka 8).

Tabulka 6 Výsledky z MALDI – TOF hmotnostní spektrometrie. V tabulce jsou uvedeny druhy aerobních a anaerobních mikroorganismů, které byly identifikovány při teplotách odchovu 22 °C a 25 °C. Četnost nám udává, kolikrát byl konkrétní rod nebo druh v dané skupině identifikován.

Kultivační médium	Druh	Četnost
22 °C		
Pro aerobní mikroorganismy	<i>Enterococcus phoeniculicola</i>	1
Pro aerobní mikroorganismy	<i>Lactococcus garvieae</i>	2
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Lactococcus garvieae</i>	5
25 °C		
Pro aerobní mikroorganismy	<i>Proteus</i> sp.	1
Pro aerobní mikroorganismy	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Enterobacter aerogenes</i>	5
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Enterococcus</i> sp.	1
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Proteus</i> sp.	1
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Enterococcus faecium</i>	1

5.2.1 Teplota odchovu při 22 °C

Ve vzorcích hmyzu po kultivaci odchovaného při teplotě 22 °C se vyskytovaly dle MALDI-TOF bakteriální rody *Enterococcus* a *Lactococcus*.

Z uvedených rodů měl nejvyšší identifikační skóre rod *Enterococcus*, z čehož vyplývá, že došlo k jeho bezpečné identifikaci. Zároveň ale nedošlo u tohoto rodu k vysoce pravděpodobné identifikaci druhu.

Rod *Lactococcus* byl dle MALDI-TOF identifikován ve vzorcích čteněji, současně však nedošlo dle míry identifikačního skóre k bezpečnému určení tohoto rodu.

5.2.2 Teplota odchovu při 25 °C

Dle výsledků kultivace a hmotnostní spektrometrie došlo ve vzorcích hmyzu při odchovu při 25 °C k výskytu těchto bakteriálních rodů – *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus* a *Proteus*. V porovnání s teplotou odchovu při 22 °C došlo k rozmanitějšímu zastoupení jednotlivých bakteriálních rodů. Zároveň došlo k vyloučení rodu *Lactococcus*, který nebyl při této teplotě odchovu identifikován.

Dle míry identifikačního skóre byl bezpečně potvrzen výskyt rodů *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus* a *Proteus*. Přičemž byl rod *Enterobacter* identifikován nejčastěji. Naproti tomu u rodu *Acinetobacter* došlo spíše k pravděpodobné identifikaci tohoto rodu.

5.2.3 *Clostridium* spp.

Podle výsledků MALDI-TOF došlo k identifikaci přítomnosti *Clostridium* spp. u obou námi zkoumaných skupin.

U teploty odchovu 22 °C byly pravděpodobně identifikovány druhy *C. cochlearium* a *C. novyi*. Z toho druh *C. cochlearium* byl identifikován s nejvyšším identifikačním skóre 1,974. Zatímco druh *C. novyi* byl detekován s nejvyšším identifikačním skóre 2,035.

Při teplotě odchovu 25 °C byly opět byly identifikovány druhy *C. novyi* a *C. cochlearium*. Dle skóre (2,306) došlo k vysoké pravděpodobnosti výskytu na úrovni druhu u *C. cochlearium*, zatímco u *C. novyi* dosáhlo 1,926.

6 DISKUZE

6.1 Celkový počet aerobních mikroorganismů

Odborná literatura udává, že se počet celkových aerobních mikroorganismů pohybuje v rozmezí od $7,9 \pm 0,2$ log KTJ/g do $8,0 \pm 0,3$ log KTJ/g (Stoops et al. 2016; Wynants et al. 2017). Při kontrolované teplotě odchovu 22 °C došlo u námi zkoumaných larev moučných červů k nárůstu celkového počtu aerobních mikroorganismů na $7,92 \pm 0,11$ log KTJ/g. Tento výsledek koresponduje s výše uvedenými výzkumy. Naproti tomu při teplotě odchovu 25 °C byl zaznamenán úbytek narostlých kolonií na $7,32 \pm 0,59$ log KTJ/g. Příčinou tohoto rozdílu může být nesrovnalost při přípravě vzorků na analýzu, která mohla způsobit pokles celkového počtu přítomných mikroorganismů vzhledem k tomu, že skupiny podle teploty byly analyzovány samostatně.

Z výsledků MALDI–TOF vyplynulo, že z aerobních mikroorganismů se ve vzorcích moučných červů při teplotě odchovu 22 °C objevily rody *Enterococcus* (tento rod bude diskutován v samostatné kapitole níže) a *Lactococcus*. Je důležité zmínit, že byly brány izoláty z nejvyšších ředění, tudíž identifikované mikroorganismy z médií pro celkové počty jak aerobních, tak anaerobních bakterií patří mezi nejhojněji zastoupené v námi testovaných vzorcích.

Podle vědeckých studií byl zaznamenán výskyt rodu *Lactococcus* v sarančatech (*Ruspolia differens*), larvách potměníka hnědého (*Tribolium castaneum*) a larvách potměníka skladištního (*Tribolium confusum*) (Boiocchi et al. 2017; Ssepuuya et al. 2019; Fredensborg et al. 2020). Tento rod se řadí mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy. Je významným zástupcem bakterií mléčného kvašení (BMK) a může mít příznivý vliv na lidské zdraví (Tavares & Malcata 2016). K těmto prospěšným zdravotním účinkům BMK patří prevence či zmírnění laktóзовé intolerance, průjmů, zácpy, infekcí, střevních poruch a některých druhů rakoviny (del Carmen et al. 2012).

Na základě identifikace vzorků potměníka moučného při teplotě odchovu 25 °C byly zjištěny bakteriální rody *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus* a *Proteus*.

Výskyt rodu *Acinetobacter* byl potvrzen v jedlém hmyzu dle EN & DB (2016), kde byl prokázán u larvy motýla *Bunaea alcinoe*. Rod *Acinetobacter* se vyskytuje ve půdě, odpadních vodách a potravinách (maso a mléčné výrobky) a je řazen mezi mikroorganismy znehodnocující maso. Tyto bakterie způsobují infekce močových cest nebo pneumonii (Kämpfer 2014). Fredensborg et al. (2020) uvádí vysoký výskyt rodu *Acinetobacter* u moučných červů společně s bakterií rodu *Enterobacter*.

6.2 Celkový počet anaerobních mikroorganismů

V této práci představuje počet narostlých kolonií anaerobních mikroorganismů při teplotě odchovu 22 °C $7,63 \pm 0,10$ log KTJ/g. Při teplotě 25 °C počet těchto kolonií klesl na $6,98 \pm 0,93$ log KTJ/g. Tyto počty jsou v souladu s výsledky z odborné literatury (Stoops et al. 2016; Grabowski & Klein 2017b; Roncolini et al. 2018).

Ze vzorků potměníka moučného odchovaných při teplotě 22 °C byly pomocí MALDI–TOF hmotnostní spektrometrie identifikovány rody *Enterococcus* a *Lactococcus*. Naproti tomu ve

vzorkách larev u teploty odchovu při 25 °C došlo k identifikaci těchto anaerobních rodů – *Enterobacter*, *Enterococcus* a *Proteus*.

Urbanek et al. (2020) ve své studii uvedl, že v larvách potemníka moučného převládal výskyt rodu *Enterobacter*, konkrétně druhu *E. hormaechei*, společně s druhem *Lactococcus garvieae*. Druh *E. hormaechei* zde představoval 32,65 % z celkových počtů narostlých mikroorganismů. Druh *L. garvieae* tvořil 30% zastoupení. V larvách moučných červů byl potvrzen vysoký výskyt *Enterobacter* spp. zároveň ve výzkumu podle Fredensborg et al. (2020).

Proteus patří mezi běžně se vyskytující bakteriální rody tvořící mikrobiotu jedlého hmyzu (Giaccone 2005; Marshall et al. 2016). Tyto anaerobní mikroorganismy se obvykle vyskytují v přírodě (odpadní vody, výkaly, shnilé maso) a způsobují řadu infekčních onemocnění (infekce močových cest, meningitida, gastroenteritida). Mezi významné druhy patří *P. vulgaris* a *P. mirabilis* (Kushwaha et al. 2014).

6.3 *Bacillus* spp.

Přítomnost rodu *Bacillus* v trávicím traktu potemníka moučného byla potvrzena ve studii od Liu et al. (2011). Toto tvrzení podporují i studie od Belluco et al. (2013) a Garofalo et al. (2017). V této práci byl výskyt rodu *Bacillus* spp. stanoven při odchovu 22 °C na $4,04 \pm 0,63$ log KTJ/g a při 25 °C na $3,70 \pm 0,46$ log KTJ/g. Což je méně, než je udáváno v odborné literatuře – $6,5 \pm 1,3$ log KTJ/g (Grabowski & Klein 2017a). Mezi tento rod patří řada lidských patogenů - *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* nebo *B. thuringiensis* (Delbrassinne & Mahillon 2016). U vzorků ostatních druhů hmyzu byla přítomnost *Bacillus cereus* potvrzena (Gashe et al. 1997). Tento bakteriální druh produkuje toxiny, díky nimž může docházet po pozření kontaminované potravin k průjmům a zvracení (Nuñez & Medina 2016). Grabowski & Klein (2017b) uvádí, že by počty kolonií tohoto druhu pro zachování bezpečnosti neměly přesáhnout 5 log KTJ/g. Na základě identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie byl ve vzorcích (teplota odchovu 25 °C) identifikován pravděpodobně druh *Bacillus licheniformis*, který je pro člověka nepatogenní a je využíván jako probiotická kultura v komerčních výživových doplňcích (Delbrassinne & Mahillon 2016).

6.4 *Enterococcus* spp.

Enterococcus spp. je řazen mezi dominantní rody přítomny v čerstvých vzorcích jedlého hmyzu (Garofalo et al. 2017; Roncolini et al. 2018; Osimani et al. 2018). Při teplotě odchovu 22 °C dosahoval počet enterokoků v larvách moučných červů $6,89 \pm 0,06$ log KTJ/g. Zatímco u teploty odchovu při 25 °C byl snížen na $5,48 \pm 0,61$ log KTJ/g. Dle odborné literatury je počet rodu *Enterococcus* v jedlém hmyzu stanoven na 3,0 – 7,48 log KTJ/g (Martin & Mundt 1972). Enterokoky jsou fakultativně anaerobní, grampozitivní kokovité mikroorganismy. Patří mezi bakterie mléčného kvašení a některé kmeny jsou řazeny mezi probiotické kultury (Behare et al. 2015). Stoops et al. (2016) ve své práci uvedli, že se počet BMK v larvách potemníka moučného pohyboval $7,5 - 7,6 \pm 0,1$ log KTJ/g. Oproti tomu v sarančatech stanovili počet BMK od $7,6 \pm 0,3$ log KTJ/g do $8,5 \pm 0,5$ log KTJ/g. Některé druhy tohoto rodu jsou zároveň řazeny mezi podmíněné lidské patogeny, které mohou způsobovat infekce močových cest, dutiny ústní nebo gynekologické záněty (Schleifer 2009).

6.5 *Salmonella* spp.

Ve všech námi testovaných vzorcích potměníka moučného nebyl zaznamenán výskyt *Salmonella* spp. Tento výsledek koresponduje s provedenými výzkumy, kde nedošlo k identifikaci *Salmonella* spp. ani u jiných testovaných druhů hmyzu (Huis et al. 2013; Giaccone 2005; Grabowski & Klein 2017a; Osimani et al. 2018). Vzhledem k tomu, že je *Salmonella* považována za celosvětově významný lidský patogen a má za následek onemocnění, které je známé jako salmonelóza (Dykes 2016), je doporučováno, aby docházelo k tepelné úpravě hmyzu před samotnou konzumací (např. vaření či smažení), čímž dochází k její inaktivaci (Giaccone 2005).

6.6 *Clostridium* spp.

V námi zkoumaných vzorcích jedlého hmyzu byla potvrzena pomocí MALDI–TOF hmotnostní spektrometrie přítomnost rodu *Clostridium* v obou sledovaných skupinách. Klostridie se skládají z velké heterogenní skupiny grampozitivních bakterií vytvářejících spóry, které rostou výhradně za anaerobních podmínek (Alou et al. 2018). Jedná se o významný lidský patogen, kde nejnebezpečnějším zástupcem tohoto rodu představuje druh *Clostridium botulinum*. Tento druh se vyznačuje produkcí botulotoxinu, což neurotoxin, způsobující botulismus (Sakaguchi 1982). Přítomnost rodu *Clostridium* spp. v larvách potměníka moučného potvrzuje studie dle Stoops et al. (2016), podle kterých tvoří ve vzorkách larev chovaných v kontrolovaných podmínkách odchovu při teplotě 28 °C 3,5% zastoupení z celkového počtu zkoumaných mikroorganismů.

Námi identifikovaný druh *Clostridium cochlearium* je běžně izolován z půdy, ústní dutiny, lidských výkalů a krabího masa. Optimální teplota růstu *C. cochlearium* je 37 °C (Schleifer 2009). Je tedy možné, že u námi zkoumaných vzorků hmyzu mohlo dojít ke kontaminaci z půdy touto bakterií.

Další námi identifikovaným druhem byl *Clostridium novyi*. Tento druh se nachází ve stolici a v půdě. Řadí se mezi patogenní mikroorganismy a je rozlišován podle typu toxinů (A, B, nepatogenní C), které produkuje. *C. novyi* způsobuje řadu onemocnění u zvířat a u člověka (Schleifer 2009). Peck et al. (2011) uvádí, že tento druh vykazuje genetickou a fyziologickou podobnost s *C. botulinum*. Naproti tomu Staedtke et al. (2016) ve svém výzkumu zmínil, že by tento druh mohl mít vysoký potenciál jako léčivo při onemocnění rakovinou.

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci bylo zkoumáno množství a diverzita mikroorganismů v jedlém hmyzu, konkrétně v larvách potemníka moučného (*Tenebrio molitor*), v závislosti na teplotě odchovu v kontrolovaných podmínkách při 22 °C a 25 °C.

Bylo zjištěno významně vyšší množství celkového počtu mikroorganismů a enterokoků u larev chovaných při 22 °C.

Díky výsledkům identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie bylo mezi jednotlivými vzorky vyzorováno, že rodové zastoupení nejvíce se vyskytujících mikroorganismů se mezi teplotami odchovu lišilo. Zároveň nedošlo u obou skupin k prokázání patogenních bakterií *Salmonella* spp. a *E. coli.*, nicméně přítomnost rodu *Clostridium* spp. byla potvrzena.

Teplota odchovu tedy částečně ovlivňuje počet a druhovou skladbu skupin mikroorganismů. Na základě těchto výsledků tedy můžeme dojít k závěru, že hypotéza, formulována na začátku této diplomové práce, se částečně potvrdila.

V západních zemích je konzumace hmyzu stále považována za exotickou, avšak v posledních letech dochází k vývoji nových trendů a roste tak zájem o využití jedlého hmyzu v oblasti výživy člověka. Vzhledem k tomuto faktu je zapotřebí dalších studií týkajících se chovu a zpracování jedlého hmyzu se zvláštním zřetelem na patogenní a potenciálně patogenní rody bakterií.

8 SEZNAM LITERATURY

- Adámková A, Mlček J, Kouřimská L, Borkovcová M, Bušina T, Adámek M, Bednářová M, Krajsa J. 2017. Nutritional potential of selected insect species reared on the island of Sumatra. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **14**:1–10.
- Alou MT et al. 2018. Taxonogenomic description of four new *Clostridium* species isolated from human gut: ‘*Clostridium amazonitimonense*’, ‘*Clostridium merdae*’, ‘*Clostridium massilidielmoense*’ and ‘*Clostridium nigeriense*.’ *New Microbes and New Infections* **21**:128–139.
- Barson WJ, Antonara S. 2018. *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* Species. Pages 833–835.e1 *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* Fifth Edit. Elsevier Inc. DOI: 10.1016/B978-0-323-40181-4.00144-4.
- Batt CA. 2014. *ESCHERICHIA COLI* | *Escherichia coli*. Pages 688–694 in C. A. Batt and M. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford.
- Behare P, Kumar H, Mandal S. 2015. *Yogurt: Yogurt Based Products*. Pages 625–631 *Encyclopedia of Food and Health*.
- Bellés X. 1997. Los insectos y el hombre prehistoric. *Bull. Entomol. Soc. Aragonesa* **20**:319–325.
- 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. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* **12**, 296–313.
- Bendinelli M, Friedman H, Bergogne-Bérézin E. 2008. *Acinetobacter* Biology and Pathogenesis. Springer, New York, NY.
- Bessa LW, Pieterse E, Sigge G, Hoffman LC. 2017. *Insects as human food; from farm to fork*. *Journal of the science of food and agriculture*. England.
- Bodenheimer FS. 1951. *History of Entomophagy*. Page In: *Insects as Human Food*.
- Boiocchi F, Porcellato D, Limonta L, Picozzi C, Vigentini I, Locatelli DP, Foschino R. 2017. Insect frass in stored cereal products as a potential source of *Lactobacillus sanfranciscensis* for sourdough ecosystem. *Journal of applied microbiology* **123**:944–955. England.
- Brooks G, Carrol KC, Butel J, Morse S. 2012. *Jawetz, Melnick & Adelberg’s Medical Microbiology*, 26th edition. McGraw-Hill Education / Medical.
- Bryning GP, Chambers J, Wakefield ME. 2005. Identification of a sex pheromone from male yellow mealworm beetles, *Tenebrio molitor*. *Journal of chemical ecology* **31**:2721–2730. United States.

- Caparros Megido R et al. 2018. Effect of household cooking techniques on the microbiological load and the nutritional quality of mealworms. *Food Research International* **106**:503–508. Elsevier Ltd. Available from <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.002>.
- Carlin F. 2016. *Bacillus cereus* and Other *Bacillus* sp. Causing Foodborne Poisonings, Detection of. Pages 301–306 in B. Caballero, P. M. Finglas, and F. Toldrá, editors. *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472000519>.
- Chang P-K, Horn BW, Abe K, Gomi K. 2014. ASPERGILLUS | Introduction. Pages 77–82 in C. A. Batt and M. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300000100>.
- Costa-Neto EM, Dunkel F V. 2016. Insects as Food: History, Culture, and Modern Use around the World. Pages 29–60 in A. T. Dossey, J. A. Morales-Ramos, and M. G. Rojas, editors. *Insects as Sustainable Food Ingredients*. Academic Press, San Diego. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128028568000028>.
- Costa Neto E. 2005. Entomotherapy, or the Medicinal Use of Insects. Page *Journal of Ethnobiology*.
- Cox JM, Pavic A. 2014. SALMONELLA | Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology* **3**:322–331. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847300002949>.
- del Carmen, S., de Moreno de LeBlanc, A., Miyoshi, A., Azevedo, V., Bermudez-Humaran, L., Langella, P., LeBlanc, J., 2012. Anti-inflammatory properties of genetically modified lactic acid bacteria. In: Watson, R.R., Ronald, R., Preedy, V.R. (Eds.), *Bioactive Food as Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*. Academic Press, Cambridge, MA, pp. 680.
- Delbrassinne L, Mahillon J. 2016. *Bacillus*: Occurrence. Pages 307–311 in B. Caballero, P. M. Finglas, and F. Toldrá, editors. *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472000507>.
- Delorme C. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology* **126**:274–277.
- Di Russo C, Sbordoni V. 1998. Gryllacridoidea. Pages 969–977 *Encyclopedia Biospeologica*.
- Dodd CER. 2014. *Pseudomonas*: Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* **3**:244–247.
- Dunkel F V, Payne C. 2016. Chapter 1 - Introduction to Edible Insects. Pages 1–27 in A. T. Dossey, J. A. Morales-Ramos, and M. G. Rojas, editors. *Insects as Sustainable Food Ingredients*. Academic Press, San Diego. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128028568000016>.

- Dykes GA. 2016. Salmonella: Detection. Pages 689–694 in B. Caballero, P. M. Finglas, and F. B. T.-E. of F. and H. Toldrá, editors. Encyclopedia of Food and Health. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472006061>.
- EFSA Scientific Committee. 2016. Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA Journal* **13**:4257.
- EN A, DB KK. 2016. Nutritional Composition and Microbiology of Some Edible Insects Commonly Eaten in Africa, Hurdles and Future Prospects: A Critical Review. *Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene* **01**:1–7.
- Fanning S, Rogers L, Power K, Gaora PÓ. 2016. Escherichia coli and Other Enterobacteriaceae: Occurrence and Detection. Pages 545–551 in B. Caballero, P. M. Finglas, and F. Toldrá, editors. Encyclopedia of Food and Health. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472002592>.
- Fasolato L, Cardazzo B, Carraro L, Fontana F, Novelli E, Balzan S. 2018. Edible processed insects from e-commerce: Food safety with a focus on the Bacillus cereus group. *Food Microbiology* **76**:296–303. Elsevier Ltd. Available from <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.008>.
- Fredensborg BL, Fossdal í Kálvalið I, Johannesen TB, Stensvold CR, Nielsen H V, Kapel CMO. 2020. Parasites modulate the gut-microbiome in insects: A proof-of-concept study. *PLOS ONE* **15**:e0227561. Public Library of Science. Available from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227561>.
- Frisvad JC. 2014. PENICILLIUM | Penicillium/Penicillia in Food Production. Pages 14–18 in C. A. Batt and M. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300002494>.
- 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. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.012>.
- Gashe, Berhanu A., et al., 1997. The microbiology of phane, an edible caterpillar of the emperor moth, Imbrasia belina. *J. Food Prot.* **60** (1), 1376–1380.
- Gessner DK, Schwarz A, Meyer S, Wen G, Most E, Zorn H, Ringseis R, Eder K. 2019. Insect Meal as Alternative Protein Source Exerts Pronounced Lipid-Lowering Effects in Hyperlipidemic Obese Zucker Rats:1–12. Oxford University Press.
- Giaccone, V. 2005. Hygiene and health features of “minilivestock”. In M.G. Paoletti, ed. Ecological implications of minilivestock; role of rodents, frogs, snails, and insects for sustainable development, pp. 579–598. New Hampshire, Science Publishers.
- Gomi K. 2014. ASPERGILLUS | Aspergillus oryzae. Pages 92–96 in C. A. Batt and M. L. B.

- T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300000112>.
- Grabowski NT, Franco Olivas J, Galván Lozano D, Kehrenberg C, Aguilar DG. 2018. Assessment of pasteurisation of edible insects using enzymatic tests (activity of alkaline phosphatase and lactoperoxidase) applied in dairy products. *Food Science and Technology International* **0**:1–6.
- Grabowski NT, Klein G. 2017a. Microbiology of processed edible insect products – Results of a preliminary survey. *International Journal of Food Microbiology* **243**:103–107. Elsevier B.V. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.005>.
- Grabowski NT, Klein G. 2017b. 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**:17–23.
- Halloran A, Flore R, Vantomme P, Roos N. 2018. *Edible Insects in Sustainable Food Systems* 1st ed. Springer International Publishing. Available from https://www.researchgate.net/profile/Karsing_Megu/publication/325133379_An_Ethnographic_Account_of_the_Role_of_Edible_Insects_in_the_Adi_Tribe_of_Arunachal_Pradesh_North-East_India/links/5b1e1d63aca272021cf586a2/An-Ethnographic-Account-of-the-Role-of-Edib.
- Hernández-Flores L, Llanderal-Cázares C, Guzmán-Franco AW, Aranda-Ocampo S. 2015. Bacteria Present in *Comadia redtenbacheri* Larvae (Lepidoptera: Cossidae). *Journal of Medical Entomology* **52**:1150–1158.
- Heyrman J, De Vos P, Logan N. 2009. Volume 3: The Firmicutes. Page 1317 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Available from <http://moscow.sci-hub.bz/2f9a77368ec03cf6b24aeba25c820745/10.1007%40978-0-387-68489-5.pdf>.
- Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. 1991. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical Chemistry* **63**:1193A–1203A. Available from <https://univpn.univie.ac.at/+CSCO+00756767633A2F2F63686F662E6E70662E626574+/doi/abs/10.1021/ac00024a002>.
- Hommel RK. 2014. CANDIDA | Introduction. Pages 367–373 in C. A. Batt and M. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300000550>.
- House J. 2018. Modes of Eating and Phased Routinisation: Insect-Based Food Practices in the Netherlands. *Sociology* **0**:1–17. Available from <https://doi.org/10.1177/0038038518797498>.
- Huis A Van, Itterbeek J Van, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G, Vantomme P. 2013. Edible insects: Future prospects for food and feed security.

- J. B. Wood B, Holzapfel W. 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic and Professional, London.
- Jenson I. 2014. BACILLUS | Introduction. Pages 111–117 in C. A. Batt and M. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300000185>.
- Kämpfer P. 2014. Acinetobacter. Pages 11–17 in C. A. Batt and M. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300000021>.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. Pathogenic Escherichia coli. Nature Reviews Microbiology 2:123. Nature Publishing Group. Available from <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>.
- Karaś M, Zielińska E, Jakubczyk A, Zieliński D, Baraniak B. 2019. Edible Insects as Source of Proteins.
- Kemenczei Á, Izsó T, Bognár L, Kasza G. 2016. Insects as “new” foods (Rovarok mint “új” élelmiszerek). Elelmiszervizsgalati Kozlemenyek 62:1106–1119.
- Kocur M, Kloos WE, SCHLEIFER K-H. 2006. The Genus Micrococcus. Pages 961–971 The Prokaryotes. Springer, New York, NY. Available from <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00063/abstract%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=187193&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://link.springer.com/10.1007/0-387-30743-5%5Cnhttp://www.scopus.com/inwa>.
- Krishnan M, Bharathiraja C, Pandiarajan J, Prasanna VA, Rajendhran J, Gunasekaran P. 2014. Insect gut microbiome – An unexploited reserve for biotechnological application. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 4:S16–S21. Available from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S222116911530232X>.
- Kushwaha K, Babu D, Juneja VK. 2014. Proteus. Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition 3:238–243.
- Liu, Yu-Sheng, et al., 2011. Isolation and identification of intestinal bacterial flora of yellow mealworm. Chinese J. Microecol. 23 (10), 894–896.
- Loescher W. 2016. Cherries (Prunus spp.): The Fruit and Its Importance. Pages 10–13 in B. Caballero, P. M. Finglas, and F. Toldrá, editors. Encyclopedia of Food and Health. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472001380>.
- Lynne AM, Foley SL, Han J. 2016. Salmonella: Properties and Occurrence. Pages 695–700 in B. Caballero, P. M. Finglas, and F. B. T.-E. of F. and H. Toldrá, editors. Encyclopedia of Food and Health. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472006085>.

- Maria I, Macedo I, Rossetti Veloso R, Adso H, Medeiros F, Do Rosário De Fátima Padilha M, Da G, Ferreira S, Kazue N, Shinohara S. 2017. Entomophagy in different food cultures.
- Mariod AA, Mirghani MES, Hussein I. 2017. Chapter 50 - *Tenebrio molitor* Mealworm. Unconventional Oilseeds and Oil Sources:331–336. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128094358000500>.
- Martin JD, Mundt JO. 1972. Enterococci in insects. *Applied microbiology* 24:575–80. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4628796> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC380616>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0163725882900614>.
- Marone PA. 2016. Chapter 7 - Food Safety and Regulatory Concerns. Pages 203–221 in A. T. Dossey, J. A. Morales-Ramos, and M. G. Rojas, editors. *Insects as Sustainable Food Ingredients*. Academic Press, San Diego. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128028568000077>.
- Marshall DL, Dickson JS, Nguyen NH. 2016. Chapter 8 - Ensuring Food Safety in Insect Based Foods: Mitigating Microbiological and Other Foodborne Hazards. Pages 223–253 in A. T. Dossey, J. A. Morales-Ramos, and M. G. Rojas, editors. *Insects as Sustainable Food Ingredients*. Academic Press, San Diego. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128028568000089>.
- Ministerstvo zemědělství. 2018. Zásady správné zemědělské a výrobní praxe produkce hmyzu určeného pro lidskou spotřebu. Ministerstvo zemědělství ČR, Praha.
- Mlcek J, Rop O, Borkovcova M, Bednarova M. 2014. A comprehensive look at the possibilities of edible insects as food in Europe - A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **64**:147–157.
- Morente EO, Ruiz AG del P, Pulido R. 2016. *Staphylococcus*: Detection. Pages 128–132 *Encyclopedia of Food and Health*.
- Moretti A, Sarrocco S. 2016. Fungi. Pages 162–168 in B. Caballero, P. M. Finglas, and F. Toldrá, editors. *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012384947200341X>.
- Mozzi F. 2016. Lactic Acid Bacteria. Pages 501–508 in B. Caballero, P. M. Finglas, and F. Toldrá, editors. *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472004141>.
- Murefu TR, Macheke L, Musundire R, Manditsera FA. 2019. Safety of wild harvested and reared edible insects: A review. *Food Control* **101**:209–224. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713519301021>.
- Neish AS. 2017. Chapter 6 - Probiotics of the *Acidophilus* Group: *Lactobacillus acidophilus*, *delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *johnsonii*. Pages 71–78 in M. H. Floch, Y. Ringel, and

- W. A. Walker, editors. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*. Academic Press, Boston. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128040249000069>.
- Nuñez M. 2014. *Micrococcus*. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* **2**:627–633.
- Nuñez M, Medina M. 2016. *Biogenic Amines*. Page Reference Module in Food Science. Elsevier. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965006405>.
- Osimani A et al. 2018. The bacterial biota of laboratory-reared edible mealworms (*Tenebrio molitor* L.): From feed to frass. *International journal of food microbiology* **272**:49–60. Netherlands.
- Patriarca A, Vaamonde G, Pinto VF. 2014. *Alternaria*. Pages 54–60 in C. A. Batt and M. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300000070>.
- Payne CLR, Scarborough P, Rayner M, Nonaka K. 2016. Are edible insects more or less “healthy” than commonly consumed meats? A comparison using two nutrient profiling models developed to combat over- and undernutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* **70**:285–291. Nature Publishing Group. Available from <http://dx.doi.org/10.1038/ejcn.2015.149>.
- Peck MW, Stringer SC, Carter AT. 2011. *Clostridium botulinum* in the post-genomic era. *Food microbiology* **28**:183–191. Elsevier.
- Picó Y. 2016. *Mycotoxins: Occurrence and Determination*. Pages 35–42 in B. Caballero, P. M. Finglas, and F. Toldrá, editors. *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472004797>.
- Pitt JI. 2014. *PENICILLIUM | Penicillium and Talaromyces:: Introduction*. Pages 6–13 in C. A. Batt and M. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300002482>.
- Purschke B, Scheibelberger R, Axmann S, Adler A, Jäger H. 2017. Impact of substrate contamination with mycotoxins, heavy metals and pesticides on the growth performance and composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) for use in the feed and food value chain. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* **34**:1410–1420. Taylor & Francis. Available from <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2017.1299946>.
- Roncolini A, Osimani A, Garofalo C, Aquilanti L, Milanovia V, Sabbatini R, Clementi F. 2018. The potential of edible Insects: Microbiological features. *Industrie Alimentari*.
- Rossi M. 2016. *Chilled Foods: Packaging Under Vacuum*. Pages 23–27 in B. Caballero, P. M.

- Finglas, and F. Toldrá, editors. Encyclopedia of Food and Health. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012384947200146X>.
- Rumpold BA, Schlüter OK. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition and Food Research* **57**:802–823.
- Sakaguchi G. 1982. Clostridium botulinum toxins. *Pharmacology & Therapeutics* 19:165–194. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0163725882900614>.
- Schleifer KH. (2009) Phylum XIII. *Firmicutes* Gibbons and Murray 1978, 5 (*Firmacutes* [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). In: De Vos P. et al. (eds) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer, New York, NY.
- Schlüter O, Rumpold B, Holzhauser T, Roth A, Vogel RF. 2016. Safety aspects of the production of foods and food ingredients from insects. *Molecular Nutrition & Food Research* **61**:1–29.
- Siemianowska E, Kosewska A, Aljewicz M, Skibniewska KA, Polak-Juszczak L, Jarocki A, Jędras M. 2013. Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food. *Agricultural Sciences* **04**:287–291. Available from <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/as.2013.46041>.
- Smith JL, Fratamico PM. 2016. *Escherichia coli* and Other Enterobacteriaceae: Food Poisoning and Health Effects. Pages 539–544 in B. Caballero, P. M. Finglas, and F. Toldrá, editors. *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472002609>.
- Ssepuuya 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. England.
- Staedtke V, Roberts NJ, Bai R-Y, Zhou S. 2016. Clostridium novyi-NT in cancer therapy. *Genes & Diseases* **3**:144–152. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352304216000064>.
- 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. England.
- Sutherland JB, Cornelison C, Crow SA. 2014. CANDIDA | *Yarrowia lipolytica* (*Candida lipolytica*). Pages 374–378 in C. A. Batt and M. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300000562>.
- Svejstil R, Salmonová H, Čížková J. 2018. Analysis of Cutaneous Microbiota of Piglets with Hereditary Melanoma. *Scientia Agriculturae Bohemica* **49**:285–290.

- Tavares T, Malcata FX. 2016. Whey and Whey Powders: Fermentation of Whey. Pages 486–492 in B. Caballero, P. M. Finglas, and F. B. T.-E. of F. and H. Toldrá, editors. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472007492>.
- Thrane U. 2014. Fusarium. Pages 76–81 in C. A. Batt and M. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, Oxford. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300001415>.
- Turck D et al. 2016. Guidance on the preparation and presentation of an application for authorisation of a novel food in the context of Regulation (EU) 2015/2283. EFSA Journal **14**.
- Urbanek AK, Rybak J, Wróbel M, Leluk K, Mirończuk AM. 2020. A comprehensive assessment of microbiome diversity in *Tenebrio molitor* fed with polystyrene waste. Environmental Pollution **262**:114281. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749119372185>.
- Van der Fels-Klerx HJ, Camenzuli L, Belluco S, Meijer N, Ricci A. 2018. Food Safety Issues Related to Uses of Insects for Feeds and Foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **17**:1172–1183.
- Van Huis A. 2003. Insects as Food in sub-Saharan Africa. Insect Science and Its Application **23**:163–185. Cambridge University Press. Available from <https://www.cambridge.org/core/article/insects-as-food-in-sub-Saharan-africa/D4ED5C530A2601FA08AF4F2FBE50BE83>.
- Van Huis A. 2016. Edible insects are the future? Proceedings of the Nutrition Society **75**:294–305.
- Van Huis A, Van Itterbeeck J, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G, Vantomme P. 2013. Edible Insects - Future prospects for food and feed security. Page Fao Forestry Papers.
- 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**:1–27.
- Verhoeckx K, Broekman H, Knulst A, Houben G. 2016. Allergenicity assessment strategy for novel food proteins and protein sources. Regulatory toxicology and pharmacology : RTP **79**:118–124. Netherlands.
- Walker-York-Moore L, Moore SC, Fox EM. 2017. Characterization of enterotoxigenic *Bacillus cereus* sensu lato and *Staphylococcus aureus* isolates and associated enterotoxin production dynamics in milk or meat-based broth. Toxins **9**:1–15.
- Wynants E, Crauwels S, Lievens B, Luca S, Claes J, Borremans A, Bruyninckx L, Van Campenhout L. 2017. Effect of post-harvest starvation and rinsing on the microbial numbers and the bacterial community composition of mealworm larvae (*Tenebrio*

molitor). *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **42**:8–15. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S146685641630741X>.

Yoon Y-I, Chung MY, Hwang J-S, Han MS et al. (2015). *Allomyrinadichotoma* (Arthropoda: Insecta) larvae confer resistance to obesity in mice fed a high-fat diet. *Nutrients* **7**, 1978–1991. *Bezpečnost potravin*. 2018. Hmyz. Informační centrum bezpečnosti potravin. Available from <https://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/hmyz.aspx> (accessed March 2019).

9 SAMOSTATNÉ PŘÍLOHY

Tabulka 7 Výsledky identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie vzorků odchovu při 22 °C.

Kultivační médium	Druh	Skóre
Pro aerobní mikroorganismy	<i>Enterococcus phoeniculicola</i>	2,249
Pro aerobní mikroorganismy	<i>Lactococcus garvieae</i>	1,869
Pro aerobní mikroorganismy	<i>Lactococcus garvieae</i>	1,851
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Lactococcus garvieae</i>	1,967
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Lactococcus garvieae</i>	1,941
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Lactococcus garvieae</i>	1,917
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Lactococcus garvieae</i>	1,880
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Lactococcus garvieae</i>	1,864
Pro klostridie	<i>Clostridium novyi</i>	2,035
Pro klostridie	<i>Clostridium cochlearium</i>	1,974
Pro klostridie	<i>Clostridium novyi</i>	1,961
Pro klostridie	<i>Clostridium novyi</i>	1,957
Pro klostridie	<i>Clostridium novyi</i>	1,945
Pro klostridie	<i>Clostridium cochlearium</i>	1,926
Pro klostridie	<i>Clostridium novyi</i>	1,923
Pro klostridie	<i>Clostridium novyi</i>	1,867

Tabulka 8 Výsledky identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie vzorků odchovu při 22 °C.

Kultivační médium	Druh	Skóre
Pro aerobní mikroorganismy	<i>Proteus</i> sp.	2,085
Pro aerobní mikroorganismy	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1,898
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2,280
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2,115
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2,091
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Enterococcus</i> sp.	2,009
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Proteus</i> sp.	1,990
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,988
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,899
Pro anaerobní mikroorganismy	<i>Enterococcus faecium</i>	1,803
Pro klostridie	<i>Clostridium cochlearium</i>	2,306
Pro klostridie	<i>Bacillus licheniformis</i>	2,134
Pro klostridie	<i>Clostridium novyi</i>	1,926
Pro klostridie	<i>Clostridium novyi</i>	1,918