

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Mikroorganismy v hmyzích produktech určených pro  
potravinářské účely**

**Diplomová práce**

**Bc. Marek Hauk**

**Výživa a potraviny**

**Ing. Roman Švejtil, Ph.D.**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Mikroorganismy v hmyzích produktech určených pro potravinářské účely" jsem vypracoval 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 autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 4. 2023

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu práce Ing. Romanu Švejtilovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, pomoc v laboratoři, cenné rady a připomínky při psaní této diplomové práce. Dále bych rád poděkoval mé rodině a blízkým za trpělivost a podporu během celého období mého studia.

# Mikroorganismy v hmyzích produktech určených pro potravinářské účely

## Souhrn

Současný světový vývoj v souvislosti s populačním růstem a změnou klimatu vede k potřebě hledat alternativní zdroje potravy a kvalitních bílkovin, ale i dalších živin. Jedlý hmyz splňuje nejen požadavky nutriční, neboť obsahuje kvalitní bílkoviny, nenasycené mastné kyseliny, vitaminy a minerální látky či vlákninu. Je také šetrnější z hlediska ekologického vzhledem nízké náročnosti na půdu a vysoké konverzi krmiva. Na druhou stranu je nutné brát v potaz otázky hygienické či chemické bezpečnosti nebo alergií.

Cílem této práce bylo stanovení počtu a identifikace mikroorganismů v tepelně upravených vzorcích larev potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) a dospělců cvrčka domácího (*Acheta domestica*). Vzorky byly tepelně upraveny spařením či zmražením a následně také mikrovlnně, kontrolní skupinou byly vzorky bez mikrovlnného ošetření. Bylo využito klasických kultivačních metod s pomocí neselektivních i selektivních pěstebních médií.

Skupina mezofilních aerobních bakterií byla přítomna v množství  $5,71 \pm 0,01$  log KTJ/g až  $7,9 \pm 0,01$  log KTJ/g, mikrovlnné ošetření mělo významný vliv na jejich množství ( $P < 0,01$  až  $P = 0,02$ ). Skupina aerobních sporulujících bakterií byla obsažena v rozmezí  $3,51 \pm 0,03$  log KTJ/g až  $5,79 \pm 0,01$  log KTJ/g, mikrovlnné ošetření mělo významný vliv ( $P < 0,01$ ) kromě vzorků spařených potemníků, kde nebyl po mikrovlnném ošetření stanoven statisticky významný rozdíl, ( $P = 0,77$ ). Druh *Bacillus cereus* byl ve většině vzorků pouze detekován na úrovni 1 log KTJ/g s výjimkou vzorků spařených potemníků ( $1,5 \pm 0,02$  log KTJ/g) a zmražených cvrčků ( $3,63 \pm 0,03$  log KTJ/g). Přítomnost čeledi *Enterobacteriaceae* se pohybovala v množství 1,3 log KTJ až  $5,85 \pm 0,01$  log KTJ se statisticky významným rozdílem mezi mikrovlnně ošetřenými a neošetřenými vzorky ( $P < 0,01$ ). Skupina koaguláza pozitivních stafylokoků byla přítomna v největším množství ve vzorcích pouze spařených cvrčků ( $1,59 \pm 0,01$  log KTJ), v ostatních vzorcích byla v menším množství či pod hranicí detekce, mikrovlnné ošetření mělo významný vliv ( $P < 0,01$ ). Skupina koliformních bakterií se pohybovala v rozmezí pod hranicí detekce až  $5,84 \pm 0,01$  log KTJ/g (pouze zmražené vzorky cvrčka), mikrovlnné ošetření mělo významný vliv ( $P < 0,01$ ). Potenciálně patogenní rody *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Salmonella* spp. nebyly detekovány s jedinou výjimkou přítomnosti salmonely u pouze zmražených cvrčků. Rod *Clostridium* byl identifikován pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie ve třech případech.

Doporučená mikrobiologická kritéria byla u všech vzorků splněna pouze v případě *Staphylococcus aureus*, ostatní požadavky na salmonely, mezofilní aerobní bakterie a *Enterobacteriaceae* byly splněny pouze v některých případech. Zároveň bylo potvrzeno až na jednu výjimku, že mikrovlnné ošetření má významný vliv na mikrobiální kvalitu jedlého hmyzu.

**Klíčová slova:** Bezpečnost potravin; jedlý hmyz; bakterie, patogen, výživa člověka.

# Microorganisms in insect products intended for food purposes

## Summary

Current world development in connection with population growth and climate change leads to the need to look for alternative sources of food and quality proteins, as well as other nutrients. Edible insects not only meet nutritional requirements, as they contain high-quality proteins, unsaturated fatty acids, vitamins and minerals or fibre. They are also more environmentally friendly due to its low demands on land and high feed conversion. On the other hand, it is necessary to consider issues of hygienic or chemical safety or allergies.

The aim of this work was to determine the counts and identity of microorganisms in processed samples of larvae of the mealworm (*Tenebrio molitor*) and adults of the house cricket (*Acheta domesticus*). The samples were heat-treated by scalding or freezing and subsequently microwaved, the control group was samples without microwave treatment. Classical cultivation methods were used with the help of non-selective and selective growing media.

The group of mesophilic aerobic bacteria was present in the amount of  $5,71 \pm 0,01$  log CFU/g to  $7,9 \pm 0,01$  log CFU/g, microwave treatment had a significant effect on their amount ( $P < 0,01$  to  $P = 0,02$ ). The group of aerobic sporulating bacteria was contained in the range of  $3,51 \pm 0,03$  log CFU/g to  $5,79 \pm 0,01$  log CFU/g, the microwave treatment had a significant effect ( $P < 0,01$ ), except for the samples of steamed mealworms, where no statistically significant difference was determined after microwave treatment, ( $P = 0,77$ ). The species *Bacillus cereus* was only detected at the level of 1 log CFU/g in most samples, except for the samples of steamed mealworms ( $1,5 \pm 0,02$  log CFU/g) and frozen crickets ( $3,63 \pm 0,03$  log CFU/g). The presence of the family *Enterobacteriaceae* ranged from 1,3 log CFU to  $5,85 \pm 0,01$  log CFU with a statistically significant difference between microwave-treated and untreated samples ( $P < 0,01$ ). The group of coagulase-positive staphylococci was present in the largest amount in the samples of only steamed crickets ( $1,59 \pm 0,01$  log CFU), in the other samples it was in a smaller amount or below the detection limit, microwave treatment had a significant effect ( $P < 0,01$ ). The group of coliform bacteria ranged below the detection limit up to  $5,84 \pm 0,01$  log CFU/g (frozen cricket samples only), microwave treatment had a significant effect ( $P < 0,01$ ). Potentially pathogenic genera *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. were not detected with the single exception of the presence of salmonella in only frozen crickets. The genus *Clostridium* was identified by MALDI-TOF mass spectrometry in three cases.

Recommended microbiological criteria were met in all samples only in the case of *Staphylococcus aureus*, other requirements for salmonella, mesophilic aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* were met only in some cases. At the same time, it was confirmed, with

one exception, that microwave treatment has a significant effect on the microbial quality of edible insects.

**Keywords:** Food safety; edible insect; bacteria, pathogen, human nutrition.

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>9</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Hypotéza.....</b>	<b>10</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Hmyz jako potravina či krmivo.....</b>	<b>11</b>
3.1.1 Nutriční složení hmyzu.....	12
3.1.1.1 Bílkoviny a aminokyseliny.....	13
3.1.1.2 Tuky a mastné kyseliny.....	14
3.1.1.3 Mikronutrienty .....	14
3.1.2 Vliv konzumace jedlého hmyzu na zdraví.....	15
3.1.2.1 Pozitivní faktory .....	15
3.1.2.2 Negativní faktory .....	16
3.1.3 Úprava jedlého hmyzu a její vliv na hygienickou a nutriční kvalitu.....	17
3.1.4 Hmyz jako krmivo pro zvířata .....	19
<b>3.2 Ekologické aspekty chovu hmyzu .....</b>	<b>20</b>
3.2.1 Mikrobiologické aspekty jedlého hmyzu a hmyzích výrobků.....	21
3.2.1.1 Antibiotická rezistence .....	23
3.2.2 Aspekty chemické bezpečnosti jedlého hmyzu .....	23
3.2.2.1 Mykotoxiny .....	24
<b>4 Metodika.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Podmínky chovu hmyzu a příprava vzorků .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2 Kultivace a stanovení.....</b>	<b>26</b>
4.2.1 <i>Bacillus cereus</i> .....	27
4.2.2 <i>Enterobacteriaceae</i> .....	28
4.2.3 <i>Escherichia coli</i> .....	28
4.2.4 Koaguláza pozitivní stafylokoky a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
4.2.5 Koliformní bakterie .....	29
4.2.6 Mezofilní aerobní bakterie .....	29
4.2.7 Aerobní sporulující bakterie .....	29
4.2.8 <i>Clostridium</i> spp. ....	29
4.2.9 <i>Salmonella</i> spp.....	30
<b>4.3 Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie .....</b>	<b>30</b>
4.3.1 Příprava vzorků .....	31
4.3.2 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie .....	31

4.4	Statistické vyhodnocení .....	32
5	Výsledky .....	33
5.1	Kultivační stanovení mikroorganismů.....	33
5.1.1	<i>Bacillus cereus</i> .....	34
5.1.2	<i>Enterobacteriaceae</i> .....	34
5.1.3	<i>Escherichia coli</i> .....	35
5.1.4	Koaguláza pozitivní stafylokoky a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	35
5.1.5	Koliformní bakterie .....	35
5.1.6	Mezofilní aerobní bakterie .....	35
5.1.7	Aerobní sporulující bakterie .....	35
5.1.8	<i>Clostridium</i> spp. ....	36
5.1.9	<i>Salmonella</i> spp.....	36
6	Diskuse .....	37
6.1	<i>Bacillus cereus</i> .....	37
6.2	<i>Enterobacteriaceae</i> .....	37
6.3	<i>Escherichia coli</i> a koliformní bakterie .....	38
6.4	Koaguláza pozitivní stafylokoky a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39
6.5	Mezofilní aerobní bakterie .....	40
6.6	Aerobní sporulující bakterie .....	41
6.7	<i>Clostridium</i> spp.....	41
6.8	<i>Salmonella</i> spp. ....	42
6.9	Vliv tepelného opracování na hygienickou kvalitu .....	42
7	Závěr .....	44
8	Seznam použité literatury .....	45
9	Seznam tabulek a grafů .....	51
10	Samostatné přílohy .....	I



# 1 Úvod

V dnešní době se lidstvo vypořádává s problémy spojenými s globální změnou klimatu, která je nejen ovlivňována růstem světové populace a s tím souvisejícím nárůstem poptávky po potravinách živočišného původu, zejména pak masem a mlékem. V rozvinutých zemích je problémem spíše otázka zdravého životního stylu a civilizačních chorob, často spojených s přílišnou konzumací nevhodných potravin.

Jedním z možných řešení je například snižování spotřeby živočišných produktů. Další možností se stává konzumace alternativních potravin jako jsou řasy, houby, laboratorně pěstované maso či hmyz a hmyzí výrobky. Udává se, že hmyz je alternativní zdroj kvalitních bílkovin i dalších živin, který je navíc efektivnější, a tedy i ekologičtější na produkci než klasický chov hospodářských zvířat. V zemích Evropské unie je hmyz legislativně uznáván jako potravina až od roku 2018, avšak v mnoha jiných částech světa je běžně konzumován.

Na druhou stranu se jedná o potravinu živočišného původu a ty mají větší tendenci k tomu snadněji podléhat zkáze. Proto je důležité věnovat větší pozornost bezpečnosti potravin hmyzího původu, mikrobiologické kvalitě i z hlediska možné přítomnosti patogenních mikroorganismů a také trvanlivosti.

V teoretické části se práce zabývá poznatky o jedlém hmyzu a jeho konzumaci, jeho nutričních kvalitách, benefitech i rizicích pro zdraví, úpravě a jeho vlivu na nutriční i hygienickou kvalitu. Dále možnostmi jeho využití jako krmiva pro hospodářská zvířata, ekologickými aspekty a také aspekty mikrobiologické a chemické bezpečnosti.

Praktická část je zaměřena na výskyt a identifikaci různých skupin mikroorganismů ve vzorcích larev potměníka moučného (*Tenebrio molitor*) a dospělce cvrčka domácího (*Acheta domestica*) v závislosti na tepelné úpravě.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Jedlý hmyz obsahuje cenné nutriční látky, které mohou být využity ve výživě člověka. Vzhledem k rostoucí světové populaci roste poptávka po nových zdrojích potravy. Jedním z těchto zdrojů může být jedlý hmyz. Jedlý hmyz může být chován v kontrolovaných podmínkách, je však nutné dodržovat hygienu chovu a správný způsob zpracování, aby byla dodržena mikrobiologická nezávadnost. Cílem práce byla identifikace a stanovení počtu mikroorganismů v jedlém hmyzu určeném pro potravinářské účely.

### **2.1 Hypotéza**

Hypotézou je, že zjištěné počty mikroorganismů budou splňovat hygienické limity pro živočišné produkty.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Hmyz jako potravina či krmivo

Hmyz je považován za potravinu budoucnosti, neboť se jedná o udržitelný zdroj živočišných bílkovin a dalších živin. Zároveň se však nejedná o něco nového v historii lidského stravování. Stejně jako u řady ostatních primátů se zřejmě i u člověka jednalo o normální součást jídelníčku. Ačkoliv v západních zemích jde o něco nového a neobvyklého, v jiných koutech Země se jedná o normální a tradiční potravinu (Japonsko), či dokonce delikatesu (Itálie a jejich sýry s živými larvami). Spíše se zdá, že entomofágie, tedy požívání hmyzu, je u lidí normou než výjimkou (Raubenheimer & Rothman 2013).

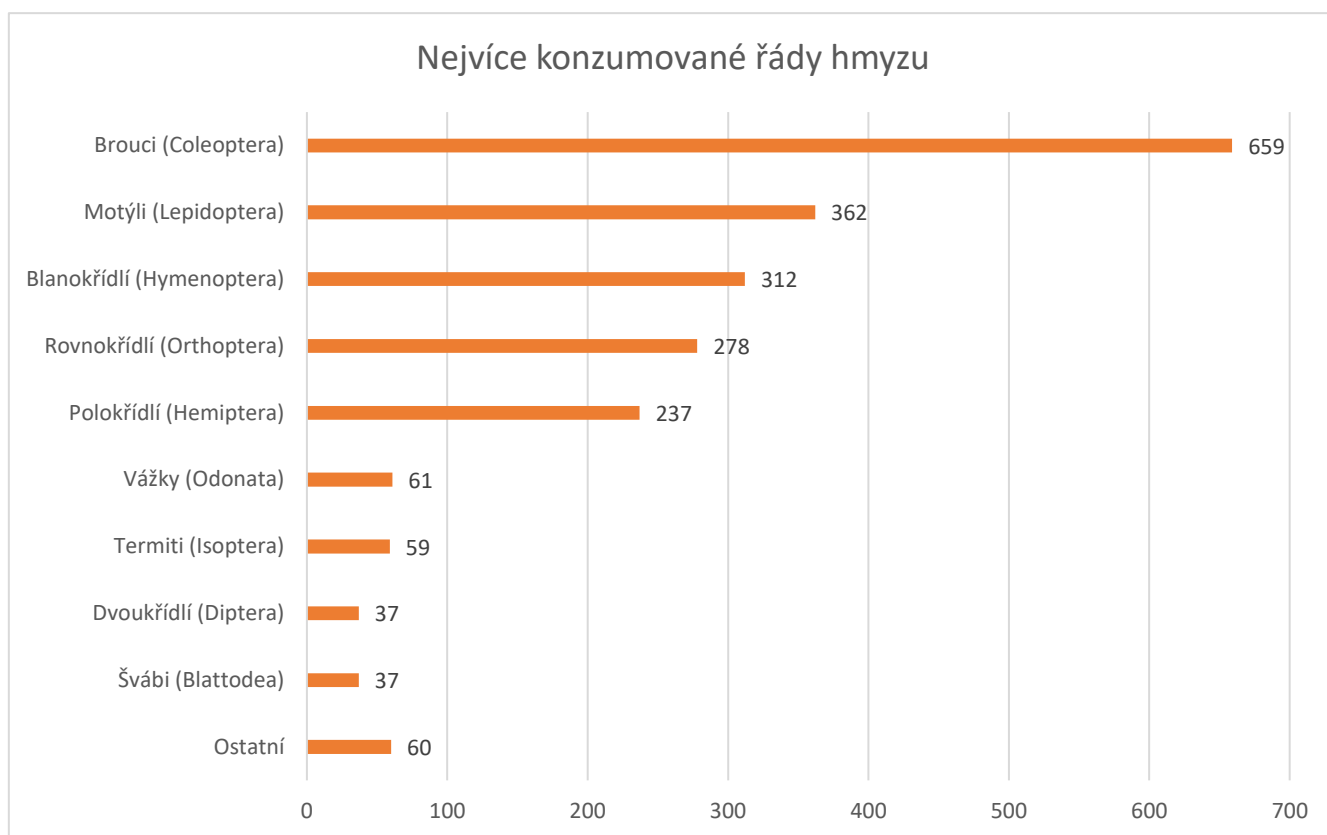
Dalšími výhodami, kromě nutričních a ekologických oproti konvenčnímu chovu hospodářských zvířat je bezpochyby rychlá reprodukce, vysoká využitelnost krmiva a nižší potřeba prostoru. Avšak většina konzumovaného hmyzu stále pochází především ze sběru v přírodě, kde je jeho dostupnost závislá na sezóně a lokalitě (Klunder et al. 2012).

Udává se, že celosvětově se konzumuje téměř 2111 druhů hmyzu (Zielińska et al. 2017). Největším konzumentem hmyzu jsou kontinenty Ameriky, kde konzumují až 679 druhů hmyzu, dále pak Afrika (524 druhů) a Asie (349 druhů). Zejména v rovníkové Africe představuje hmyz více než 50 % živočišného proteinu ve stravě. Další výhodou hmyzu je jeho bezpečný a nenáročný sběr.

Největší skupinu konzumovaného hmyzu představuje řád brouci (*Coleoptera*), až - 659 druhů, dále motýli (*Lepidoptera*) – 362 druhů, blanokřídlí (*Hymenoptera*) – 312 druhů a rovnokřídlí (*Orthoptera*) – 278 druhů. Dále také řády: polokřídlí (*Hemiptera*), vážky (*Odonata*), termity (*Isoptera*), dvoukřídlí (*Diptera*), či švábi (*Blattodea*) viz graf č. 1. Obecně platí, že je nejvýhodnější hmyz konzumovat, pokud je ve fázi vývoje, kdy má největší tělo a zároveň také co nejmenší exoskelet. Běžně se konzumují larvy a kukly, ale dospělci mohou být také využiti.

Kromě samotného hmyzu lze konzumovat také jeho produkty. Nejznámějším a zároveň i v západních zemích běžně rozšířeným produktem je med, tedy koncentrovaný nektar a ostatní produkty včely medonosné (*Apis mellifera*) (Raubenheimer & Rothman 2013).

Rozeznáváme také několik možností, jak hmyz konzumovat. Buď se jí hmyz celý, tak jak je sebrán, nebo v podobě mouky či pasty, nebo jako extrakt či proteinový izolát. Celý hmyz se často podává smažený nebo sušený, ale může se podávat také živý, nebo vařený. Farmově chovaný hmyz se mnohdy dále zpracovává sušením a přeměnou na prášek, který se dá využívat na obohacování jiných potravin, ale i krmiv, jež mohou být chudé na některé nutrienty. Například v Africe se používá prášek z termitů (*Macrotermes* spp.) na obohacování čiroku, který obsahuje málo tuku a také některých esenciálních aminokyselin (Klunder et al. 2012). Hmyzí mouka, která má větší možnost využití kvůli své lepší přijatelnosti u konzumentů, na rozdíl od celého hmyzu díky své jemné chuti, vůni a barvě, se také může využívat na obohacování celé řady potravin. Například pečiva a chlebů, sušenek, těstovin, čokolády, cukrovinek, klobás či mletého masa (Kooh et al. 2020).



**Graf č. 1:** Počet konzumovaných druhů v rámci řádu hmyzu (Zielińska et al. 2019)

Kromě tradičního sběru hmyzu ve volné přírodě, se dnes moderní přístupy spíše zaměřují na farmový chov. Ačkoliv existují stovky druhů hmyzu uznaných ke konzumaci, největší potenciál k chovu ve velkém má čeleď cvrčkovití (*Gryllidae*) a potemníkovití (*Tenebrionidae*) (Grabowski & Klein 2017a). Konkrétně se jedná o druhy: potemník moučný (*Tenebrio molitor*), bráněnka (*Hermetia illucens*) a cvrček domácí (*Acheta domesticus*).

### 3.1.1 Nutriční složení hmyzu

Udává se, že složení masy hmyzího těla odpovídá složení masa ostatních hospodářských zvířat. Ačkoliv výrazně také záleží na druhu a stádiu životního cyklu, obsah hrubého proteinu se pohybuje mezi 40 až 75 % v sušině (Klunder et al. 2012), což je srovnatelná či vyšší hodnota v porovnání s masem, mlékem, vejci či sójou.

Většina hmyzích druhů obsahuje mnoho živin, které jsou nezbytné pro lidskou výživu, včetně tuků, bílkovin, vitamínů, minerálních látek i vlákniny. Složení živin je potom srovnatelné s jinými tradičně konzumovanými potravinami, ať živočišného či rostlinného původu. Dále hmyz také splňuje denní energetické a nutriční požadavky, neboť obsahuje polynenasycené i mononenasycené mastné kyseliny, esenciální aminokyseliny, dále zinek, železo a vlákninu (Belluco et al. 2013).

**Tabulka č. 1:** Přibližné procentuální složení živin ve vybraných druzích jedlého hmyzu (Raksakantong et al. 2010)

Druh hmyzu	Proteiny	Lipidy	Sacharidy	Vláknina	Popeloviny
<i>Termes</i> sp.	42,63	36,55	12,34	6,14	2,34
<i>Brachytrupes portentosus</i> Lichtenstein	48,69	20,60	9,74	11,61	9,36

### 3.1.1.1 Bílkoviny a aminokyseliny

Zejména obsah bílkovin je zajímavý, neboť se udává, že jedlý hmyz je na bílkoviny bohatší než sója (která patří k nejlepším zdrojům rostlinných bílkovin), a je srovnatelný s obsahem bílkovin v tradičních potravinách živočišného původu jako je kuřecí, hovězí či rybí maso (Raheem et al. 2019). Dobrým ukazatelem je také EAAS<sup>1</sup>, které by mělo mít v lidské stravě hodnotu 40 %, u hmyzu se jeho hodnota pohybuje mezi 46 až 96 %. Mezi esenciální aminokyseliny, které jsou zde ve větším množství obsaženy patří leucin a lysin. Na druhou stranu obsah metioninu, serinu a tryptofanu může být nižší než v jiných potravinách, jako například vejcích (Azagoh et al. 2016).

**Tabulka č. 2:** Obsah vybraných aminokyselin (g / 16 g dusíku) v larvách *Tenebrio molitor* (Azagoh et al. 2016)

Aminokyselina	Obsah v larvách
Esenciální	
Leucin	6,2
Lysin	5,4
Fenylalanin + tyrosin	7,0
Valin	5,4
Methionin	0,7
Tryptofan	1,2
Neesenciální	
Alanin	6,6
Glutamová kyselina	8,3
Arginin	4,2
Serin	4,0

<sup>1</sup> EAAS neboli Essential amino acid score je hodnota získaná metodou měření kvality bílkovin v lidské stravě. Je založená na srovnání koncentrace první limitující aminokyseliny v testovaném proteinu s koncentrací této aminokyseliny v referenčním vzorku (Tome & Miller 2000).

### 3.1.1.2 Tuky a mastné kyseliny

Co se týče obsahu tuků, je jedlý hmyz především dobrým zdrojem nenasycených tuků, především polynenasycených mastných kyselin (PUFA) jako jsou kyseliny linolenová a linolová. Na druhou stranu neobsahuje kyseliny eikosapentaenovou (EPA) a dokosahexaenovou (DHA), které se vyskytují především v rybách. V jedlém hmyzu také nalezneme také menší množství cholesterolu. Zejména hmyz z řádu *Orthoptera* obsahuje pouze 13,4 % tuku v sušině, což je méně, než je obvyklé u potravin živočišného původu (Kinyuru et al. 2015; Dobermann et al. 2017).

**Tabulka č. 3:** Procentuální zastoupení vybraných mastných kyselin oproti celkovému obsahu mastných kyselin ve dvou druzích jedlého hmyzu (Raksakantong et al. 2010)

Mastné kyseliny	<i>Termes sp.</i>	<i>Brachytrupes portentosus</i> Lichtenstein
C18:0	31,90	35,79
Nasyčené celkem	32,83	37,54
C16:1	0,19	0,71
C18:1	1,86	3,40
Mononenasycené celkem	2,06	4,11
C20:3n - 6	8,90	7,94
C20:4n - 6	56,01	50,43
Polynenasycené celkem	65,25	58,37

### 3.1.1.3 Mikronutrienty

Hmyz je také dobrým zdrojem vitamínů skupiny B, železa, zinku, vápníku a sodíku. Zejména cvrčci mají vysoký obsah železa, až třikrát více než hovězí maso. Navíc se jedná o hemovou formu, která je pro člověka snadněji stravitelná než rostlinné formy železa. Cvrčci jsou též bohatým zdrojem vitamínu B12, thiaminu, riboflavinu a kyseliny listové, dále i vitamínu A a C. Chitin, který se nachází v exoskeletu je potom dobrým zdrojem nestravitelné vlákniny, která může mít pozitivní vliv na imunitu. Obsah jednotlivých živin však dosti záleží na faktorech prostředí, jako je potrava i vnitřních faktorech, jako je fáze životního cyklu či pohlaví. Všechny tyto živiny mohou být z hmyzu izolovány a následně užívány jako doplňky stravy (Payne et al. 2016).

Je udáváno, že některé druhy hmyzu, jako například cvrček domácí (*Acheta domesticus*) jsou dokonce více výživné než klasické maso hospodářských zvířat. To především díky obsahu celkové energie, sacharidů, nenasycených mastných kyselin a sodíku. I z tohoto důvodu nemusí být některé druhy jedlého hmyzu zcela ideální v boji s nemocemi spojenými s nadměrným příjmem potravy. Na druhou stranu může být jedlý hmyz vhodný v případech podvýživy, zejména díky vysokému obsahu mikronutrientů (Payne et al. 2016).

Kvůli své nutriční kvalitě má široké spektrum využití také hmyzí moučka. Od boje s podvýživou dětí v rozvojových zemích a jejího přidávání do kaše pro děti, přes proteinové nápoje pro sportovce zaměřené na nárůst svalové hmoty, až po zeleninové burgery, které jsou náhradou klasických z hovězího masa (Kooh et al. 2020).

### 3.1.2 Vliv konzumace jedlého hmyzu na zdraví

#### 3.1.2.1 Pozitivní faktory

Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, jedlý hmyz je nutričně velmi zajímavý. Některé z uvedených živin mohou mít zároveň příznivý vliv nejen na zdraví člověka. Zejména se jedná o obsah chitinu, což je polymer 1,4-N-acetylglukosaminu a primární složka hmyzího exoskeletu. Pro člověka je nestavitelný a plní tedy úlohu vlákniny. Obsah této vlákniny je srovnatelný s obsahem vlákniny v celém obilném zrna. Hlavním pozitivním vlivem chitinu je optimalizace střevního mikrobiomu a selektivní podpora růstu probiotických bakterií, jako např. *Bifidobacterium animalis*, dále pak inhibice patogenů a zlepšení funkce střevní bariéry. Probiotika také interagují s imunitním systémem a mají antagonistickou aktivitu vůči enteropatogenním organismům. Faktor, který přispívá ke zlepšení stavu střevního mikrobiomu je produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem. Ty slouží jako signální molekuly mezi mikrobiotou a hostitelem, ovlivňují střevní integritu, homeostázu glukózy, metabolismus lipidů, regulují chuť k jídlu a imunitní funkce (Stull et al. 2018).

Dalšími významnými látkami obsaženými v jedlém hmyzu jsou biologicky aktivní peptidy. Tyto peptidy uvolňované během trávení jsou malé molekuly s prospěšnými účinky, například antioxidantní, antihypertenzní, protizánětlivou, antimikrobiální nebo hypocholesterolemickou. Biologicky aktivní peptidy byly objeveny především v mléce a mléčných výrobcích či rostlinných proteinech. Výzkum Zielińska et al. (2017) o protizánětlivých vlastnostech tepelně ošetřeného hmyzu ukázal, že ošetření teplem zvyšuje množství těchto biologicky aktivních látek. Hmyzí hydrolyzáty obsahující tyto peptidové frakce tak mohou snižovat množství volných radikálů v těle a tím snižovat riziko oxidačního stresu a zánětu. Potenciálně tedy mohou hmyzí moučky a jejich peptidové hydrolyzáty snižovat riziko kardiovaskulárních chorob, karcinomů či cukrovky, které jsou spojeny s oxidačním stresem a chronickým zánětem (Messina et al. 2019).

Velký obsah vitamínů a minerálních látek v jedlém hmyzu navíc představuje další potenciální přínosy pro zdraví. Obsah vitamínu B12 v cvrčcích může poskytovat dobrou prevenci anémie, problémů nervové soustavy související s nedostatkem vitamínu B12 či vysoké hladiny homocysteinu, což je aminokyselina spojená rozvojem kardiovaskulárních chorob. Díky vysokému obsahu vápníku může mít podíl jedlého hmyzu ve stravě pozitivní vliv na minerální hustotu kostí s tak snížit riziko kostních fraktur (Nowakowski et al. 2020).

Další oblastí využití jedlého hmyzu (související se zdravím člověka) mohou představovat doplňky stravy pro sportovce, a to zejména při budování svalové hmoty díky vysokému obsahu proteinů. Studie Vangsoe et al. (2018) zjistila, že doplněk stravy izolovaný z jedlého hmyzu, má

při tréninku sportovců účinky srovnatelné s podobnými doplňky stravy získanými z jiných zdrojů například syrovátky, kaseinu či sóji.

### 3.1.2.2 Negativní faktory

#### **Alergie**

Negativním vlivem na zdraví jsou potenciální potravinové alergie na jedlý hmyz. Potravinovou alergií zprostředkovanou imunoglobulinem třídy E lze popsat jako nežádoucí reakci imunitního systému na specifické proteiny v potravinách, které jsou obvykle neškodné. Odhaduje se, že 3–10 % dospělých a 8 % dětí na celém světě má potravinovou alergií, přičemž většina reakcí je způsobena mlékem, vejci, arašídů, ořechy, rybami, sójou, pšenicí nebo koryši. Tyto reakce zprostředkované imunoglobulinem třídy E se objevují po konzumaci potravin s nástupem do 2 hodin, přičemž jejich projevy se pohybují od izolovaných kožních nebo břišních příznaků až po potenciální fatální reakce, jako je anafylaxe (Belluco et al. 2013; Ribeiro et al. 2021).

Jedlý hmyz může obsahovat strukturně podobné proteiny jako koryši, a tak může vznikat zkřížená alergie. Domácí roztoči se uvádějí jako druhý hlavní zdroj alergie tohoto typu. Jako hlavní proteiny odpovědné za tuto alergií se označují tropomyosin a argininkináza. Tepelná úprava či přidání enzymů by mohlo být řešením, avšak nemá na alergenicitu jedlého hmyzu příliš velký vliv, podobně jako je tomu u alergenů koryšů. Udává se, že jedlý hmyz je odpovědný za 4,2–19,4 % případů potravinových alergií v Asii. Bylo také prokázáno, že jedinci vystavení delší dobu konzumaci *Tenebrio molitor* se mohou stát citlivější a následně se u nich může vyvinout potravinová alergie na tento hmyz. Není však jisté, jestli tato senzibilizace je druhově specifická, nebo může vést ke společné senzibilizaci s jinými druhy hmyzu nebo dokonce i koryši (Beaumont et al. 2019; Ribeiro et al. 2021).

#### **Parazité**

Dalším negativním faktorem a potenciálním nebezpečím jedlého hmyzu na zdraví člověka jsou parazité. Parazité nejenom že způsobují značné ztráty v produkci, ale mohou být také ohrožením pro zdraví lidí i hospodářských a exotických zvířat. Studie Galecki & Sokol (2019) sledovala výskyt parazitů u hmyzu ze tří set farmových chovů z různých států. Výskyt různých vývojových stádií parazitů byl zjištěn ve 244 případech. Ve 206 případech se jednalo o parazity patogenní pouze pro hmyz, ve 106 pro zvířata a v 91 případech se jednalo o parazity potenciálně patogenní pro člověka. Bylo nalezeno široké spektrum různých druhů parazitů, avšak mezi nejvíce zastoupené druhy parazitů patřily *Nosema* spp., *Gregarine* spp., což jsou parazité hmyzu, dále *Cryptosporidium* spp. či *Isoospora* spp., což jsou parazité zvířat a člověka.

Nosemóza je nemoc, která napadá převážně cvrčky a sarančata a je způsobena mikrosporidii. V přírodě působí jako regulátor počtu tohoto hmyzu, avšak v chovech je nežádoucí. *Gregarine* spp. (hromadinky) jsou parazitické prvoci, kteří využívají živiny přijímané



hostitelem, ohrožují jeho imunitní funkce a zvyšují úmrtnost. Kryptosporidie způsobují onemocnění kryptosporidiózu projevující se nebezpečným průjmem. Ačkoliv jsou známé jako parazité obratlovců, byly nalezeny i u hmyzu, který by mohl sloužit jako mechanický vektor. Některé druhy hmyzu (dokonce i *Tenebrio molitor*) může nést infekční oocysty na svém povrchu a může tak představovat zdravotní riziko. Isospory patřící do třídy kokidií jsou prvoci způsobující nebezpečné střevní onemocnění pro člověka i zvířata projevující se vodnatým průjmem. Mohou se vyskytovat na povrchu i ve střevech hmyzu a jejich výskyt v chovech je pravděpodobně způsoben špatnou hygienou. Ačkoliv ve volné přírodě nezpůsobují parazitické prvoci svým hostitelům velké problémy, masové podmínky chovu mohou mít potenciál zvyšovat zátěž těmito parazity. V případě bource morušového či včely medonosné, kteří mají za sebou delší historii intenzivního chovu, způsobují parazité velké problémy i škody (Besette & Williams 2022).

Jako mezihostitele využívají hmyz také tasemnice ve stádiu cysticerků, například druhy *Dipylidium caninum*, *Hymenolepis diminuta*, či *Raillietina cestitillus*. Hmyz má sice vyvinuté imunitní mechanismy, které inhibují vývoj těchto parazitů, avšak tasemnice mohou vyvolat významné změny chování hmyzu, jako je pokles aktivity či fotofobní chování. Tyto změny chování mohou přispět k pozření hmyzu napadeného cysticerkoidy definitivním hostitelem. Tepelné zpracování jako je vaření, uzení či mražení však může různé vývojové formy parazitů inaktivovat. Z těchto poznatků vyplývá, že konzumace farmově chovaného jedlého hmyzu může zvýšit riziko setkání člověka s patogenními parazity, pokud hmyz není řádně tepelně opracován (Galecki & Sokol 2019).

Dalším rizikem spojeným s konzumací jedlého hmyzu může být přítomnost patogenních mikroorganismů. Toto téma je zmíněné v samostatné kapitole, stejně jako téma chemické bezpečnosti spojené s obsahem těžkých kovů, perzistentních organických polutantů atd.

### **3.1.3 Úprava jedlého hmyzu a její vliv na hygienickou a nutriční kvalitu**

Aby se prodloužila trvanlivost potravin, používají se různé metody konzervace. Stejně tak je tomu i u hmyzu a produktů z něj vyrobených. Mezi tradiční metody patří vaření, sušení na slunci, či pražení, mezi moderní metody řadíme lyofilizaci, tedy sušení mrazem. Často však dochází k pouhé inaktivaci mikrobů, nejsou tedy usmrceni a pokud dojde k rehydrataci jsou mikroorganismy opět ve vegetativní formě.

Mezi nejstarší a celosvětově využívanou metodu konzervace nejen hmyzu, ale i ostatních potravin rostlinného i živočišného původu patří sušení. Tradiční je sušení sluncem, ale v dnešní době se využívají sušičky bubnové, sprejové či odparky. Nejdříve je potravina zahřáta, aby byl deaktivován co největší počet mikroorganismů, následně je aplikováno suché teplo za účelem odpaření vody obsažené v potravine. Při lyofilizaci voda sublimuje při nízkých teplotách a za vakuových podmínek. Z hlediska konzervace je sušení vhodnou metodou, neboť snižuje aktivitu vody, což omezí využitelnost potravin pro mikroorganismy a jejich enzymy a zvyšuje údržnost potravin.

Aktivita vody ( $a_w$ ) je jedním z faktorů ovlivňujících mikrobiální růst. Bakterie a kvasinky ho ukončují přibližně na hodnotě  $a_w = 0,90$  a plísně  $a_w = 0,65$ . Pouhé sušení však mikroorganismy pouze deaktivuje, neusmrtí je. Zvláště pro sporulující mikroby je tento způsob konzervace nedostačující, i když se jedná o průmyslové sušení. Výhodou sušení je však možnost skladování usušené potraviny při pokojových teplotách, nikoliv teplotách chladících či mrazících (Grabowski & Klein 2017a).

Studie Vandeweyer et al. (2017) sledovala efekt blanšírování larev *Tenebrio molitor*, po kterém následovalo skladování v chladu či průmyslové sušení v mikrovlnné troubě, na mikrobiální zátěž. Obvykle se potměnící mrazí, čímž jsou usmrčeni a dále mohou být lyofilizováni. Tyto postupy sice umožňují dlouhodobé skladování a přepravu, jsou to však poměrně drahé technologie. Výsledkem bylo, že samotné blanšírování či blanšírování s následným mikrovlnným sušením má podobný efekt jako pasterizace, tedy že usmrtí vegetativní buňky, avšak spory nikoliv. Dále bylo zjištěno že blanšírované larvy mohou být skladovány v chladírenských podmínkách po dobu nejméně šesti dní bez opětovného výrazného nárůstu mikrobiálních počtů.

Důležitou otázkou tepelného zpracování jedlého hmyzu je nejen inaktivace či usmrcení mikroorganismů, ale i vliv na nutriční kvalitu. Vaření a zejména smažení zlepšuje senzoryckou kvalitu potravin prostřednictvím tvorby aromatických sloučenin, atraktivních barev, kůry a textury. Vaření dále také zlepšuje hygienickou kvalitu inaktivací patogenních mikroorganismů, stravitelnost a biologickou dostupnost některých živin. Na druhou stranu tento typ zpracování má také negativní vliv na nutriční hodnotu v podobě proteolýzy, lipolýzy, oxidace lipidů a ztráty vitamínů citlivých na teplo a oxidaci či minerálních látek rozpustných ve vodě (Caparros Megido et al. 2018).

Možnými účinky vaření na bílkoviny v potravinách jsou denaturace bílkovin, modifikace či destrukce aminokyselin a Maillardova reakce. Tepelné zpracování může vést proteiny k interakci s jinými proteiny nebo oxidačními činidly, cukry, polyfenoly, taniny či rozpouštědly. Obvykle se také zvyšuje jejich stravitelnost tím, že denaturují a jsou náchylnější k enzymatickému štěpení rozbalováním polypeptidových řetězců nebo inaktivací antinutričních sloučenin, zejména inhibitorů trypsinu.

Jedlý hmyz, podobně jako maso, obsahuje určité množství lipidů a mastných kyselin, které mohou být modifikovány procesem vaření. Studie Tiencheu et al. (2013) ukázala, že sušení na slunci, vaření a pražení nejvíce zvyšují oxidaci lipidů u larev rodu *Rhyncophorus phoenicis*. Naopak procesy chlazení, mražení a uzení jsou nejlepší metody pro uchování lipidů. Oxidace lipidů může vést k nežádoucím ztrátám mastných kyselin. Nejběžnějším typem oxidace při zpracování masa a masných výrobků je autooxidace. Mononenasyčené a polynenasycené mastné kyseliny jsou autooxidovány při pokojové teplotě, zatímco nasycené mastné kyseliny podléhají autooxidaci až při vyšší teplotě spojených s tepelnou úpravou.

Studie Caparros Megido et al. (2018) zkoumala různé typy tepelné úpravy *Tenebrio molitor* a jejich vliv na hygienickou a nutriční kvalitu. Bylo zjištěno, že neúčinnější technikou ke snížení mikrobiální zátěže při současném zachování vysoké hladiny stravitelnosti proteinů a polynenasycených mastných kyselin bylo vaření a vaření ve vakuu. Nevýhodou však může

být velmi měkká a šťavnatá struktura, neboť konzumenti preferují křupavost. Křupavou strukturu a velmi účinné snížení mikrobiální zátěže lze dosáhnout smažením, nevýhodou je však velmi vysoký obsah lipidů.

### 3.1.4 Hmyz jako krmivo pro zvířata

Možností, jak využít hmyz je nejen jako potraviny pro člověka, ale také jako krmivo pro zvířata. Avšak v Evropské unii je hmyz považován za hospodářské zvíře, což znamená, že se nesmí používat jako krmivo pro přežvýkavce a monogastriční zvířata. Výjimkami jsou zvířata chovaná jako domácí mazlíčci, kožešinová zvířata a akvakultury (European Commission 2017).

Zejména u akvakultur je velký potenciál k využití jedlého hmyzu jako krmiva z několika důvodů. Náklady na krmiva pro akvakultury představují 40–70 % všech nákladů na vyprodukované ryby a jsou zvláště vysoké v chovech masožravých ryb, které vyžadují větší množství proteinů. Sója a další suchozemské rostliny bohaté na proteiny a lipidy byly začleněny do krmiva ryb v akvakulturách, aby nahradily rybí moučku a rybí olej, které byly dříve využívány. Avšak přítomnost antinutričních látek v těchto rostlinných krmivech může způsobovat záněty trávicího traktu a sníženou využitelnost krmiva. Také vzhledem k rostoucí lidské populaci je vyvíjen větší tlak na využívání orné půdy k jiným účelům než pro pěstování krmných plodin. Dalším pozitivním faktorem vzhledem k využívání hmyzu jako krmiva v akvakulturách je nejen fakt, že hmyz má vysoký obsah proteinů a lipidů, ale je také přirozenou součástí stravy jak sladkovodních tak mořských ryb (Henry et al. 2015).

Přestože pro jiná hospodářská zvířata není použití hmyzu jako krmiva ve státech Evropské unie zatím povoleno, jsou jeho vlastnosti zkoumány. Studie Borrelli et al. (2017) zjišťovala možnosti využití larev *Hermetia illucens* jako krmiva pro nosnice a jejich vliv na zdraví a kvalitu produkce. Podobně jako u akvakultur jednou z výhod je, že hmyz je přirozenou součástí stravy kura domácího. Jako hlavní pozitivní vliv hmyzu na zdraví nosnic je považován obsah chitinu, přirozeně se vyskytujícího polysacharidu. Chitin není tráven, takže se dostává až do tlustého střeva, kde je fermentován zdejší mikrobiotou. Zdá se, že chitin má pozitivní vliv na složení střevní mikrobioty, tím že má bakteriostatický efekt na gramnegativní bakterie (například *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae* a *Bacteriodes fragile*).

Začleněním hmyzu do krmiva nosnic by se tudíž mohla snížit potřeba užívání antibiotik v drůbežářském průmyslu a s tím spojené další negativní jevy, jako je například antibiotická rezistence. Chitin v rámci pozitivního vlivu na střevní mikrobiotu hraje také důležitou roli v produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem. Kupříkladu butyrát je důležitým zdrojem energie pro epitelální buňky tlustého střeva. Dále je také sledován pozoruhodný vliv chitinu na snížený obsah cholesterolu a triglyceridů v krevním séru, ale i ve vejcích. Celkově se jedná o velmi zajímavý zdroj potravy s mnoha benefity, nejen pro člověka (Borrelli et al. 2017).

### 3.2 *Ekologické aspekty chovu hmyzu*

Jak již bylo zmíněno, lidská populace a její poptávka po živočišných produktech stoupá. Jedlý hmyz může být jedním z řešení, neboť přináší kromě svých nutričních benefitů též výhody týkající se menší ekologické zátěže na životní prostředí. Má tedy potenciál fungovat jako udržitelnější zdroj živočišných bílkovin v lidské stravě. Hmyz je především účinnější při přeměně krmiva na rozdíl od běžně chovaných hospodářských zvířat, ať se jedná o prasata, hovězí dobytek či drůbež. Na rozdíl od těchto hospodářských druhů, hmyz nevyžaduje krmení na bázi zrnin, které jsou dnes ve velkém využívány ke krmení zvířat (Nowakowski et al. 2020).

Z těchto důvodů je chov hmyzu méně náročný na využívání orné půdy a její znečišťování. Udává se, že až 30 % povrchu Země je využíváno živočišným sektorem. Chov hmyzu je také více šetrný z hlediska spotřeby vody. Spotřeba vody na produkci jednoho gramu cvrččího proteinu je 0,7–0,8 g, zatímco na gram hovězího proteinu to je přibližně 16,8 g. Podobné je to s produkcí skleníkových plynů, kdy na produkci jednoho kilogramu cvrččí hmoty je vyprodukováno 0,1 g methanu a 7,6 g CO<sub>2</sub>, u skotu je to 114 g methanu a 285 g CO<sub>2</sub> (Mason et al. 2018).

Produkce skleníkových plynů je považována za významnou příčinu změny klimatu. Nejvýznamnějšími skleníkovými plyny jsou oxid uhličitý (CO<sub>2</sub>), metan (CH<sub>4</sub>) a oxid dusný (N<sub>2</sub>O). Od konce 18. století se koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře zvýšila o 30 % a koncentrace metanu o 50 %, přičemž metan a oxid dusný mají podstatně větší skleníkový efekt než oxid uhličitý. Chov hospodářských zvířat způsobuje až 9 % emisí CO<sub>2</sub>, 35–40 % CH<sub>4</sub> a 65 % N<sub>2</sub>O, celkově až 18 % emisí skleníkových plynů. Přestože N<sub>2</sub>O nemusí vznikat přímo v chovech, je vytvářen půdními bakteriemi z amoniaku (NH<sub>3</sub>), který se nachází hnoji či močůvce. Kromě těchto environmentálních problémů čelí odvětví chovu hospodářských zvířat výzvám v podobě antibiotických rezistencí, zoonóz či welfare zvířat. Zařazení jedlého hmyzu do jídelníčku může tedy být částečným řešením těchto otázek (Oonincx et al. 2010; Lumanlan et al. 2022).

Další výhodou jedlého hmyzu je jeho schopnost přeměnit rostlinný odpad z potravin, který má nízký obsah proteinů a lipidů na živočišný produkt obsahující kvalitní proteiny i lipidy. Ten může být také dále využit i jako krmivo pro jiné chovy zvířat, jako jsou například akvakultury či drůbežářský průmysl. Důležitým aspektem je však také možnost využití v oblastech trpících nedostatkem potravin a hladem. Tím trpí jeden ze čtyř lidí na celém světě. Rostoucí globální potravinová krize a nedostatek živin v každodenní stravě mohou způsobit zdravotní problémy, jakými jsou podvýživa či špatná imunita. Nízký příjem proteinů a esenciálních aminokyselin ve stravě je celosvětový problém, jenž způsobuje špatný růst dětí, ztrátu svalové hmoty, únavu a těžkou podvýživu. Jedlý hmyz je levným zdrojem obživy s vysokým obsahem proteinů a vyváženým profilem aminokyselin a moučka z něj lze využívat k obohacování k různým obilným produktům (Lumanlan et al. 2022).

### 3.2.1 Mikrobiologické aspekty jedlého hmyzu a hmyzích výrobků

Přestože je tedy hmyz poměrně využívanou a známou potravinou, jeho mikrobiologická bezpečnost je poněkud nejasná. Hmyz je podobně jako ostatní živočišné produkty bohatý na živiny a vlhkost a poskytuje tedy dobré podmínky pro přežití a růst mikroorganismů. A přestože existuje řada různých způsobů tepelné úpravy, obvykle se konzumují celá těla, která obsahují střevní mikrobiom, jenž může výrazně ovlivnit výslednou mikrobiologickou kvalitu potravin (Klunder et al. 2012). Jedlý hmyz tak může být zdrojem patogenních bakterií, plísní, ale jak bylo zmíněno i prvoků a jiných parazitů, které mohou být ve vysokých počtech obsaženy v trávicím traktu (Grabowski & Klein 2017b).

Avšak navzdory celkem velkému počtu bakterií, které byly v hmyzích produktech nalezeny, nikdy se nejednalo o skutečně nebezpečné patogeny jako je *Listeria monocytogenes*, pouze vzácně pak *Salmonella* spp. či *Escherichia coli* (Fernandez-Cassi et al. 2018).

Naopak hlavními patogeny hmyzích produktů jsou *Staphylococcus aureus*, patogenní *Clostridium* spp. a patogenní druhy *Bacillus cereus*. Na druhou stranu je známo méně informací týkajících se jiných patogenů mikrobiálního původu jako jsou houby, viry, prvoci či priony. Kromě fyzikálních a chemických požadavků na bezpečnost musí všechny potraviny splňovat požadavky na biologickou bezpečnost. Přestože se v poslední době biologická bezpečnost hmyzích produktů řeší, je obtížné vyvodit nějaké závěry. Zejména z důvodu, že neexistuje žádný pevný legislativní rámec pro využití hmyzu jako krmiva či potravin. Analogické převzetí mikrobiálních kritérií z jiných druhů potravin (např. obsažených v nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny) (European Commission 2005) na hmyz není úplně příhodné, neboť hmyzí patogeny mohou vykazovat jiný růstový vzorec a fyziologické chování ve vztahu k patogenním organismům, které se vyskytují v běžných potravinách živočišného původu. Jedná se například o sporulaci či klíčení spor vzhledem k jiným vnějším a vnitřním podmínkám.

Mezi nejčastější a nejvýznamnější patogeny živočišných produktů patří salmonely, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* a *Campylobacter* spp.

Podle nařízení Evropské unie „General food law“ musí být potraviny uváděné na trh bezpečné, to znamená nesmí být zdraví škodlivé, či nevhodné pro lidskou spotřebu. To v praxi znamená zavedení Systému analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů (tzv. HACCP), dále pak zásad správné výrobní a hygienické praxe. V roce 2019 byla také vytvořena příručka „International Platform of Insects for Food and Feed“, která vysvětluje obecné principy metody HACCP v chovu hmyzu (Kooh et al. 2020). Zároveň však v současnosti neexistuje evropská legislativa týkající se specifických mikrobiálních kritérií pro celý hmyz či hmyzí produkty určené k lidské spotřebě (Fernandez-Cassi et al. 2018).

Aby bylo možné lépe porozumět mikrobiologii hmyzu, je dobré objasnit některé faktory které ji ovlivňují. Jedná se o několik faktorů, jenž mohou ovlivňovat mikrobiální zatížení hmyzích produktů a zároveň složení této mikrobioty. Ať jde již o samotné krmivo pro hmyz, které je důležitou složkou ovlivňující mikrobiotu hmyzu, může však také představovat potenciální zdroj nebezpečných mikrobů nebo mykotoxinů. Dalšími faktory mohou být

prostředí chovu a výrobní postupy. Důležitým faktorem je také další tepelná úprava, která má zásadní vliv na údržnost konečných produktů (Vandeweyer et al. 2018). Ve snaze maximálně recyklovat a přispívat k cirkulární ekonomice někteří doufají v možnost chovu hmyzu na levných substrátech, jako jsou kuchyňské odpady, odpady z výroby potravin, či hnůj. I z tohoto hlediska je důležité prozkoumat rizika spojená s patogeny, které by se zde mohly vyskytovat (Vandeweyer et al. 2021).

Studie Stoops et al. (2016) sledovala mikrobiom čerstvých larev *Tenebrio molitor* a *Locusta migratoria migratorioides* a to jak z hlediska kvalitativního, tak kvantitativního. Jako nejvíce zastoupené mikroorganismy se ukázaly čeledi *Enterobacteriaceae* a bakterie mléčného kvašení, ale byly přítomné i bakteriální spory, kvasinky a plísňe. Zejména přítomnost plísni může přinášet riziko pro potravinovou bezpečnost, neboť mohou být produkovány sekundární metabolity v podobě mykotoxinů. Jako nejvíce zastoupený bakteriální rod u larev potměníka byl zjištěn rod *Propionibacterium*, ale v menší množství byly zjištěny i patogenní rody *Haemophilus*, *Staphylococcus* a *Clostridium*. U larev saranče byly zjištěny především rody *Weissella*, *Lactococcus* a *Enterococcus*. Čerstvé larvy potměníka moučného a saranče stěhovavé vykazaly poměrně velkou kontaminaci mikroorganismy, a to i některými patogeny.

Studie Mancini et al. (2019) sledovala výskyt *Listeria monocytogenes* u larev jednoho z nejvíce uvažovaného druhu pro lidskou výživu *Tenebrio molitor*. *Listeria monocytogenes* je saprofytní všudypřítomná grampozitivní nesporeující bakterie, která se může objevit v chovu a tím následně vážně ohrozit bezpečnost produktů. Tento mikroorganismus je schopen dlouhou dobu přežít v prostředí a kontaminovat vodu, půdu, siláž a následně rostlinné i živočišné produkty. Může být zodpovědná za listeriózu, což je závažné onemocnění, které je považováno za jedno z hlavních alimentárních onemocnění na světě a může způsobit až smrt. V provedené studii byly larvy potměníka chovány na substrátu infikovaném listerií. Na larvách nebyly pozorovány žádné změny morfologie, chování, vývoje ani úmrtnost. Dále byl zkoumán vliv promývací procedury, která koncentrace listerií příliš neovlivnila na rozdíl od vylačnění, které snížilo jejich koncentraci. Jako nejvíce účinná se však ukázala metoda vaření při teplotě 150° po dobu deseti minut. Za důležitý výsledek lze považovat, že lze larvy chovat na infikovaném substrátu bez většího vlivu na jejich zdraví a ztráty produkce.

Studie Wynants et al. (2017) sledovala vliv lačnění a oplachu na mikrobiální zátěž larev *Tenebrio molitor*. Larvy potměníka bývají průmyslově chovány při teplotách 28 až 30 °C a relativní vlhkosti 60 %, krmný substrát se skládá z otrub smíchaných s moukou nebo krmivech pro kuřata, doplněné mrkvemi, bramborami a vodou. Po osmi až deseti týdnech chovu jsou larvy sklizeny a den či dva lačněny, aby se vyprázdnil jejich trávicí trakt. Poté se opláchnou vlažnou až teplou vodou a usmrtí zmrazením. Tyto procedury se provádí za účelem zvýšení hygienické a mikrobiální kvality jedlého hmyzu. Výsledky této studie však ukázaly, že lačnění, oplachování či kombinace obojího nijak razantně mikrobiální zátěž nesnižuje.

*Tenebrio molitor* a jeho mikrobiální zátěž sledovala také studie Osimani et al. (2018). Tato studie sledovala bakteriální složení v celém výrobním řetězci tedy nejen v larvách, ale také v krmivu, kterým byla pšeničná mouka, a také v trusu. K tomu byly využity techniky analýzy počítání životaschopných bakterií, PCR-DGGE a Illumina sekvenování. Výsledky ukázaly

nízkou bakteriální kontaminaci pšeničné mouky, zatímco larvy a trus vykazovaly vysoké množství bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, bakterií mléčného kvašení a několika druhů mezofilních aerobů. Jednalo se především o rody *Enterobacter* spp., *Erwinia* spp., *Enterococcus* spp. a *Lactococcus* spp. Ve všech vzorcích byly také v menší míře detekovány sporotvorné bakterie. Naopak patogenní bakterie jejichž výskyt byl také sledován (*Coxiella burnetii*, *Pseudomonas aeruginosa* a Shiga toxin produkující *Escherichia coli*), nebyly detekovány. Přesto se nedá doporučit konzumace čerstvých larev vzhledem k tomu, že se konzumují celé, ale je doporučena jejich tepelná úprava.

#### 3.2.1.1 Antibiotická rezistence

V současnosti je také velkým tématem otázka jednoho z největších rizik pro zdravotnictví a tím je antibiotická rezistence a vliv živočišného průmyslu na ni. Jako antibiotická rezistence se označuje schopnost bakterie přežít v koncentraci antibiotika, která je jinak inhibiční vůči bakteriím patřícím ke stejnému druhu. Udává se, že v živočišném průmyslu je spotřebováno dvakrát více antibiotik, než kolik se spotřebuje v lidské medicíně, přestože v mnoha zemích je jejich využití jako růstových stimulátorů zakázáno. Protože se antibiotika mohou používat i v chovech jedlého hmyzu za léčebným účelem, může být jedlý hmyz rezervoárem mikrobů s vyvinutou antibiotickou rezistencí (Rawat et al. 2023).

U poterníků moučných a sarančat byly nalezeny geny pro antibiotickou rezistenci na karbapenemy, tetracykliny, makrolidy i vankomyciny, které jsou považovány za antibiotika poslední možnosti pro grampozitivní bakteriální infekce u lidí. Některé tyto geny byly zjištěny i u hmyzu, který byl chován na dietě bez antibiotik a lze tedy předpokládat, že se jedná o přenašeče antibiotické rezistence. Rizikem může být také využití hmyzu jako krmiva pro hospodářská zvířata. Pokud není hmyz tepelně upraven může být přenašečem této rezistence. Tepelná úprava však tato rizika pravděpodobně snižuje (Osimani et al. 2017).

Přesto co se týká bakteriálního složení, je poměrně známé a prozkoumané na rozdíl od dalších biologických rizik, jakými jsou přenos virů, prionů, mikrobiologických hub či parazitů, jejichž obsah v hmyzích produktech je mnohem méně prozkoumán (Vandeweyer et al. 2021).

#### 3.2.2 Aspekty chemické bezpečnosti jedlého hmyzu

Kromě otázky mikrobiologické bezpečnosti jedlého hmyzu je také důležitá otázka chemické bezpečnosti, to znamená rizika spojená s obsahem toxinů, pesticidů, těžkých kovů či perzistentních chemických sloučenin. Podobně jako ostatní živočichové může hmyz tyto chemické sloučeniny akumulovat, neboť jsou obecně poměrně stabilní a obtížně se odstraňují či redukuje různými zpracovatelskými metodami jako je například tepelná úprava. Pokud se tedy tyto kontaminanty naakumulují v hmotě jedlého hmyzu, může to potenciálně představovat problém, ať již v rámci tukových či proteinových frakcí jedlého hmyzu nebo produktů z něj získaných (Meyer et al. 2021).

Druh hmyzu, fáze vývoje, metody chovu a zejména zvolené krmivo (zdroj živin), to vše může mít vliv na výskyt a akumulaci kontaminantů v jedlém hmyzu určeném k potravinářským účelům. Studie Poma et al. (2017) sledovala výskyt různých kontaminantů jako jsou například polychlorované bifenylly, retardanty hoření, dioxiny, rezidua pesticidů a těžkých kovů u různých druhů hmyzu (*Galleria mellonella*, *Locusta migratoria* či *Tenebrio molitor*). Bylo zjištěno, že ačkoliv může jedlý hmyz tyto kontaminanty obsahovat, jejich úroveň zatížení je nižší nebo srovnatelná s jinými potravinami živočišného původu jako jsou maso, ryby a mořské plody či vejce a jsou tedy bezpečné pro lidskou spotřebu. Naopak bylo zjištěno, že hmyz může být dobrým zdrojem některých mikroprvků jako je měď či zinek.

Hlavní dva zdroje přítomnosti nebezpečných chemických sloučenin u hmyzu je produkce různých přírodních toxických látek přímo samotným hmyzem v určité fázi jeho vývoje nebo jejich příjem skrze půdu a potravu. Podle současné legislativy (Nařízení Komise (ES) č. 68/20136, Nařízení (ES) č. 767/2009 a Nařízení Komise (ES) č. 1069/20097) (European Commission 2009a, 2009b, 2013) je hmyz považován za hospodářské zvíře, a proto neumožňuje použití určitých substrátů jako je hnůj, kuchyňský odpad a zbytky potravin živočišného původu. Mezi hlavní krmiva, která se v současnosti používají v evropské produkci hmyzu tak patří především komerční krmiva pro hospodářská zvířata (především slepice), zbytky potravin rostlinného původu či získaný rostlinný materiál, kterým se hmyz živí přirozeně v přírodě (Poma et al. 2017).

Studie Liu et al. (2021) sledovala, že dalším faktorem ovlivňujícím obsah persistentních organických polutantů může být metamorfóza. Bylo zjištěno, že u některých druhů hmyzu se během přeměny ze stádia larvy do stádia dospělce obsah těchto toxických látek v těle snižuje, zatímco u jiných druhů naopak zvyšuje.

Kromě toxických látek, které se do těla hmyzu mohou dostat jako polutanty, tedy látky vyprodukované člověkem a které se zpravidla do těla hmyzu dostanou příjmem potravy, může hmyz obsahovat toxické látky, které si sám přirozeně syntetizuje. Bylo by tedy vhodné hmyz rozlišovat na vhodný ke konzumaci a nevhodný, podobně jako rozlišujeme ve světě hub. Hmyz produkuje tyto toxické látky často jako obranu před predátory (například *Apis mellifera*, *Formica rufa*). Mezi nebezpečné látky, které hmyz může obsahovat patří například metabolické steroidy (včetně testosteronu a dihydrotestosteronu), které se nachází u brouků čeledi *Dytiscidae*. Při časté konzumaci mohou způsobovat zpomalení růstu, otoky, maskulinizaci žen či žloutenku. Řády *Coleoptera* a *Lepidoptera* mohou obsahovat kyanogenní sloučeniny, jež způsobují inhibici některých enzymů jako je sukcinátdehydrogenáza a karboanhydráza, či některé metabolické dráhy, jako je oxidativní fosforylace (Belluco et al. 2013).

### 3.2.2.1 Mykotoxiny

Zajímavé je také téma mykotoxinů a jedlého hmyzu. Mykotoxiny jsou široké spektrum chemických sloučenin, které vznikají sekundárním metabolismem různých druhů hub, které infikují různé plodiny před či po sklizni. Mykotoxiny mají velkou chemickou diverzitu a vykazují široké spektrum nežádoucích účinků u člověka i hospodářských zvířat. Také mohou v tělech



rostlin, živočichů i mikrobů podléhat biotransformacím jejichž produkty mohou mít podobnou či vyšší toxicitu. Ačkoliv je výskyt mykotoxinů v potravinách i krmivech regulován legislativními nařízeními, nelze jejich výskyt v krmivech vyloučit, stejně jako jejich následná akumulace v tělech jedlého hmyzu (Leni et al. 2019).

Studie Leni et al. (2019) sledovala výskyt mykotoxinů u *Alphitobius diaperinus* a *Hermetia illucens* chovaných na přirozeně kontaminovaných zdrojích potravy. Byl sledován výskyt mykotoxinů deoxynivalenolu, fumonisinů 1 a 2 a zearalenonu. Tato studie zjistila, že larvy hmyzu měly nižší zatížení mykotoxiny než původní substrát, na kterém byly chovány. Dochází tedy k buď k degradaci a vylučování či biotransformaci těchto mykotoxinů.

Studie Niermans et al. (2019) sledovala výskyt zearalenonu u larev *Tenebrio molitor*. Zearalenon je se svými metabolity považován za endokrinní disruptor díky své chemické struktuře, která se podobá ženskému pohlavnímu hormonu 17 $\beta$ -estradiol a je tak pro něj možné se vázat na estrogenový receptor. Zdá se, že u hmyzu tak nemá žádné zjevné cílové místo související s estrogenem. Ukazuje se však, že jeho vysoké koncentrace mohou mít slabý antagonistický vliv vůči ekdysonu, což je steroidní hormon, nacházející se u hmyzu ovlivňující vývoj a metamorfózu. Studie ukázala, že larvy *Tenebrio molitor* mají velkou toleranci k potravě kontaminované zearalenonem. Můžou být chované na této stravě bez toho, aby vzrostla úmrtnost, a dokonce u těchto larev vzrostl váhový přírůstek oproti larvám chovaným na stravě bez mykotoxinů. Strava s mykotoxiny také vykazovala pro larvy větší atraktivitu a zearalenon ani jeho metabolity nebyly v larvách objeveny.

## 4 Metodika

V praktické části diplomové práce byla provedena analýza mikrobioty hmyzu vhodného k potravinářským účelům. Pomocí kultivačních metod byly stanoveny počty vybraných rodů bakterií včetně potenciálně patogenních. Získaná data byla statisticky vyhodnocena a porovnána s údaji v odborné literatuře.

### 4.1 Podmínky chovu hmyzu a příprava vzorků

Jako vzorek byly vybrány dva druhy nejčastěji konzumovaných druhů hmyzu, tedy larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) a dospělci cvrčka domácího (*Acheta domestica*). Hmyz pocházel z inšpektoria na Fakultě agrobiologie, přírodních a potravinových zdrojů České zemědělské univerzity. Byl chován krabicovým chovem v malé místnosti při teplotě  $27 \pm 1$  °C, vlhkost neudávána, světelný režim 12 hodin světla, 12 hodin tmy. Potrava potemníků se sestávala z otrub, jablek a mrkve, potrava cvrčků z krmné směsi pro brojlery založené na sóji, voda byla podávána ve formě hydrogelu. Vzorky hmyzu byly následně rozděleny podle usmrcení a úpravy do čtyř skupin:

- a) pouze zmražené (-18 °C po dobu 24 hodin)
- b) zmražené a zároveň tepelně upravené v mikrovlnné troubě (800 W, potemníci cca 10 minut, cvrčci cca 8 minut)
- c) spařené (100 °C po dobu 1 minuty)
- d) spařené a zároveň upravené v mikrovlnné troubě (800 W, potemníci cca 10 minut, cvrčci cca 8 minut).

Takto upravené vzorky jedlého hmyzu byly asepticky zhomogenizovány ve třecí misce a následně byl odvážen jeden gram vzorku a asepticky převeden do sterilní zkumavky s ředícím médiem. Směs je složená z tryptonu 5 g/l, nutrient broth no.2 5 g/l, kvasničného extraktu 2,5 g/l, tween 80 0,5 g/l (vše Oxoid, UK) a L-cysteinu 0,25 g/l (Merck, DE). Následně byly vzorky decimálně naředěny do hodnoty  $10^{-6}$ . Všechny sledované skupiny mikroorganismů byly stanovovány klasickými kultivačními metodami podle standardních postupů a norem.

### 4.2 Kultivace a stanovení

Kultivace mikroorganismů je proces, při kterém probíhá jejich množení v laboratorních podmínkách, v růstových médiích takzvaně *in vitro*. Je potřebné jim poskytnout ideální podmínky, to znamená ideální teplotu, pH prostředí, zdroj živin, aerobní či anaerobní prostředí a podobně. Výběrem různých kultivačních podmínek lze vyselektovat dané spektrum mikroorganismů, které má vyrůst. Často bývají využívány selektivní kultivační půdy, které umožňují růst vybrané skupině mikroorganismů (Bursová et al. 2014).

**Tabulka č. 4:** Kultivační médium, čas, metoda a podmínky kultivace

Druh mikroorganismu	Kultivační médium	Čas	Podmínky kultivace	Metoda
<i>Bacillus cereus</i>	Bacillus cereus agar base (Oxoid, UK)	24 h	30 °C (aerobně)	ČSN EN ISO 7932
<i>Enterobacteriaceae</i>	Violet red bile glucose agar (Oxoid, UK)	24 h	37 °C (aerobně)	ČSN ISO 21528-2
<i>Escherichia coli</i>	Tryptone Bile X-Glucuronide (Oxoid, UK)	24 h	37 °C (aerobně)	ČSN ISO 16649-2
Koaguláza pozitivní stafylokoky a <i>Staphylococcus aureus</i>	Baird-Parker agar base (Oxoid, UK)	24–48 h	37 °C (aerobně)	ČSN EN ISO 6888-1
Koliformní bakterie	Violet red bile agar with lactose (Oxoid, UK)	24 h	37 °C (aerobně)	Přelití
Mezofilní aerobní	Standard plate count agar (Oxoid, UK)	72 h	30 °C (aerobně)	Přelití
Aerobní sporulující	Trypton-sójový agar (Oxoid, UK)	24 h	30 °C (aerobně)	Přelití
<i>Clostridium</i> spp.	Cooked Meat Medium (Oxoid, UK), Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar (Oxoid, UK)	48 h a 48 h	37 °C (anaerobně)	Pomnožovací
<i>Salmonella</i> spp.	Rappaport-Vassiliadis (Oxoid, UK), Salmonella Shigella (Oxoid, UK)	18 h, 48 h, 24 h	37 °C (aerobně)	ČSN EN ISO 6579-1

#### 4.2.1 *Bacillus cereus*

Dle normy ČSN EN ISO 7932 (2005) byl pro izolování a stanovení druhu *Bacillus cereus* připraven Bacillus cereus agar base (Oxoid, UK). Směs je složená z 15 g/l agaru, 1 g/l peptonu, mannitolu 10 g/l, chloridu sodného 2 g/l, síranu hořečnatého 0,1 g/l, hydrogenfosforečnanu sodného 2,5 g/l, dihydrogenfosforečnanu draselného 0,25 g/l, bromotymolové modré 0,12 g/l a 10 g/l pyruvátu sodného. Prášek byl následně přenesen do zkumavky důsledně promíchán, zkumavka vložena do autoklávu a nechána v teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Následně bylo médium ochlazeno na cca 45–50 °C a asepticky obohaceno o polymyxin a žloutkovou emulzi, zamícháno a nalito do sterilních Petriho misek.

Stanovení tohoto významného podmíněného patogenu je založené na důkazu lecitinázy na masopeptonovém agaru s vaječným žloutkem. Selektivita a diagnostická hodnota je zvýšena díky přidání mannitolu a polymyxinu. Z prvního ředění byl na povrch tří připravených ploten s obohaceným Bacillus cereus agarem přenesen 1 ml a rozetřen pomocí sterilní mikrobiologické „hokejky“. Kultivace probíhala 24 hodin v aerobním prostředí při teplotě 30 °C. Konfirmace se provádí pomocí testu průkazu hemolýzy na agaru s ovčí krví. Byly

vybrány typické kolonie, které se naočkují ovčí krví a inkubuje se 24 hodin při teplotě 30 °C. Vyhodnotí se hemolytická reakce.

#### **4.2.2 *Enterobacteriaceae***

Dle normy ČSN ISO 21528-2 (2018) byl jako selektivní médium pro čeled' *Enterobacteriaceae* připraven Violet red bile glucose agar (Oxoid, UK). Tato směs je složena z agaru 12 g/l, glukózu 10 g/l, peptonu 7 g/L, NaCl 5 g/l, kvasničného extraktu 3 g/l, žlučové soli č. 3 1,5 g/l, neutral red 0,03 g/l a crystal violet 0,002 g/l. Prášek byl převeden do zkumavky, promíchán a následně byl roztok zahřát, aby došlo k úplnému rozpuštění. Z prvního ředění byl 1 ml přenesen na tři připravené plotny s Violet red bile glucose agarem a rozetřen sterilní mikrobiologickou „hokejkou“. Po utužení byla Petriho miska otočena dnem vzhůru. Kultivace probíhala za aerobních podmínek po 24 hodin při teplotě 37 °C. Po ukončení kultivace se spočítaly typické růžovočervené či fialové kolonie na miskách.

#### **4.2.3 *Escherichia coli***

Dle normy ČSN ISO 16649-2 (2003) byl jako selektivní médium pro stanovení druhu *Escherichia coli* připraven Tryptone Bile X-Glucuronide (Oxoid, UK). Tato směs je složena z agaru 15 g/l, tryptonu 20 g/l, žlučové soli č.3 1,5 g/l a X-glukuronidu 0,075 g/l. Prášek je převeden do zkumavky a sterilován v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C. Po zchlazení na cca 50 °C je toto médium rozlito do sterilních Petriho misek. Z prvního ředění je asepticky přenesen 1 ml na tři připravené plotny s Tryptone Bile X-Glucuronide a rozetřen sterilní mikrobiologickou „hokejkou“. Kultivace probíhala za aerobních podmínek po 24 hodin při teplotě 37 °C. Za specifickou biochemickou reakci druhu *Escherichia coli* je považována syntéza enzymu  $\beta$ -D-glukuronidáza, který je schopný štěpit X- $\beta$ -D-glukuronid. Proto není vyžadován konfirmační test. Po ukončení kultivace byly spočítány modré kolonie.

#### **4.2.4 Koaguláza pozitivní stafylokoky a *Staphylococcus aureus***

Dle normy ČSN EN ISO 6888-1 (2022) byl jako selektivní médium pro selektivní stanovení koaguláza pozitivních stafylokoků a rodu *Staphylococcus aureus* připraven Baird-Parker agar base (Oxoid, UK). Tato směs je složena z agaru 20 g/l, tryptonu 10 g/l, prášku „Lab-Lemco“ 5 g/l, kvasničného extraktu 1 g/l, pyruvátu sodného 10 g/l, glycinu 12 g/l, chloridu lithného 5 g/l. Prášek byl zahřát v destilované vodě, kvůli lepšímu rozpuštění a následně sterilován v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C. Následně byl roztok zchlazen na 50 °C, přidána žloutková emulze a 3,5% teluričitan draselný, dobře promíchán a rozlit do Petriho misek. Z prvního ředění byl asepticky převeden 1 ml na tři připravené plotny s Baird-Parker agarem a rozetřen sterilní mikrobiologickou „hokejkou“. Následně byly naočkované plotny otočeny dnem vzhůru a aerobně kultivovány po dobu 24 až 48 hodin při 37 °C. Typické kolonie mají černou či šedou barvu, jsou lesklé a vypouklé. Poté byl proveden koagulázový test. Koagulázová aktivita se testovala pomocí Staphylase test kit (Oxoid, UK). Pozitivním výsledkem by bylo shlukování suspenzí testovaných buněk během míchání.

#### 4.2.5 Koliformní bakterie

Dle návodu byl připraven Violet red bile agar with lactose (Oxoid, UK) jako selektivní médium pro izolaci a stanovení koliformních bakterií. Tato směs je složena z agaru 15 g/l, peptonu 7 g/l, NaCl 5 g/l, kvasničného extraktu 3 g/l, laktózy 10 g/l, žlučových solí 1,5 g/l, Neutral red 0,03 g/l a Violet crystal 0,002 g/l. Sypká směs se rozpustí v destilované vodě a pár sekund povaří do rozpuštění, nesteriluje se v autoklávu. Následně se roztok zchladí a rozlévá do Petriho misek. Z prvního ředění byl asepticky rozdělen 1 ml na tři připravené plotny Violet red bile with lactose agarem a rozetřen sterilní mikrobiologickou „hocejkou“. Následně byly naočkované plotny otočeny dnem vzhůru a aerobně kultivovány po dobu 24 hodin při 37 °C. Počítány byly typické kolonie mající fialovou nebo růžovou barvu s nafialovělým halem.

#### 4.2.6 Mezofilní aerobní bakterie

Dle návodu byl připraven Standard plate count agar (Oxoid, UK). Jednotlivé složky (trypton 5 g/l, kvasničný extrakt 2,5 g/l, glukóza 1 g/l, agar 9 g/l) se po zvážení přidávají do destilované vody, směs zahřívá až do rozpuštění. Následně je zkumavka sterilována v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C. Z příslušného ředění se 0,5 ml převádí do malé (6 mm) Petriho misky a zalívá Standard plate count agarem, promíchá krouživým pohybem a nechává ztuhnout při pokojové teplotě. Po ztuhnutí se Petriho miska otočí dnem vzhůru a kultivuje při aerobních podmínkách po dobu 72 hodin při 30 °C. Po skončení kultivace se spočítají všechny kolonie bez ohledu na barvu, velikost a tvar.

#### 4.2.7 Aerobní sporulující bakterie

Pro kultivaci běžných aerobních a fakultativně anaerobních bakterií se využívá trypton-sójový agar (Oxoid, UK). V tomto případě byl využit pro kultivaci aerobních sporulujících bakterií. Dehydratovaná směs připravená výrobcem je složena z agaru 15 g/l, pankreatického digestu kaseinu 15 g/l, peptonu ze sóji 5 g/l, chloridu sodného 5 g/l. Směs se smíchá s destilovanou vodou a zahřívá do rozpuštění. Následně se zkumavky sterilují v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C. Vzorky byly pasterovány ve vodní lázni po dobu 10 minut při teplotě 85 °C pro inaktivaci vegetativních forem bakterií. Z příslušného ředění bylo 0,5 ml převedeno do sterilních Petriho misek a zalito trypton-sójovým agarem, kultivováno při aerobních podmínkách po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C. Počítají se všechny kolonie.

#### 4.2.8 *Clostridium* spp.

Pro růst a kultivaci anaerobních organismů, zejména však rodu *Clostridium* je významný Cooked Meat Medium (Oxoid, UK). Směs je složena ze srdečního svalu 454 g/l, peptonu 10 g/l, prášku „Lab-Lemco“ 10 g/l, chloridu sodného 5 g/l a glukózy 2 g/l. Vše se navází do zkumavky, rozpustí v destilované vodě a steriluje v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C a pomalu zchladí. Pro testování antimikrobiální citlivosti anaerobních organismů a obecný růst se používá médium Wilkins–Chalgren Anaerobe Agar (Oxoid, UK). Směs se skládá z tryptonu 10 g/l, želatinového peptonu 1 g/l, výtažku z kvasnic 5 g/l, glukózy 1 g/l, chloridu

sodného 5 g/l, L-argininu 1 g/l, pyruvátu sodného 1 g/l, menadionu 0,0005 g/l a heminu 0,005 g/l. Směs se naváží, rozpustí v destilované vodě, rozdělí do penicilinek a steriluje v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C. Pro stanovení rodu *Clostridium* se používá pomnožovací metoda. Množství 0,1 ml prvního ředění vzorku je inkubováno anaerobně v Cooked Meat Medium (Oxoid, UK) po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C v penicilinkách s CO<sub>2</sub> atmosférou. Poté se vzorky ponechají 14 dní při pokojové teplotě, kvůli vytvoření endospor. Následně jsou pasterovány po dobu 10 minut při teplotě 85 °C, nanесeny na Petriho misky na Wilkins–Chalgren Anaerobe Agar (Oxoid, UK) a kultivovány po dobu 48 hodin při 37 °C v anaerobní atmosféře AnaeroGen Plus (Oxoid, UK). Konfirmace kolonií, které narostly, byla provedena pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (Bruker Daltonics, DE) s využitím MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1 a knihovny Bruker Taxonomy.

#### **4.2.9 *Salmonella* spp.**

Pro stanovení přítomnosti bakterií rodu *Salmonella* byla využita metodika normy ČSN EN ISO 6579-1 (2020). Bujón Rappaport-Vassiliadis (Oxoid, UK) byl rehydratován podle návodu. Pro izolaci rodu *Salmonella* byl připraven agar Salmonella Shigella (Oxoid, UK). Směs obsahuje agar 15 g/l, prášek „Lab-Lemco“ 5 g/l, pepton 5 g/l, laktózu 10, žlučové soli 8,5 g/l, citrát sodný 10 g/l, thiosíran sodný 8,5 g/l, citrát železitý 1 g/l, brilantně zelenou 0,00033 g/l a neutrální červenou 0,025 g/l. Směs byla navážena a rozpuštěna v destilované vodě, zahřáta tak aby se rozpustila, zchlazena a nalita do sterilních Petriho misek. Navážilo se 25 g vzorku, převedeno do 225 ml pufované peptonové vody, sloužící jako neselektivní pomnožovací médium. Kultivace probíhala po dobu 18 hodin při 37 °C. Poté bylo 0,1 ml vzorku přeneseno do semiselektivního Rappaport-Vassiliadis (Oxoid, UK) bujónu a dále kultivováno po dobu 48 hodin při teplotě 37 °C. Následně byl vzorek natřen na selektivní Salmonella Shigella agar (Oxoid, UK) a dále kultivován 24 hodin při 37 °C. V případě výskytu tvoří *Salmonella* spp. na agaru světlé kolonie s černým středem. Tyto kolonie byly dále použity pro konfirmační latexový aglutinační test (Oxoid, UK).

### **4.3 Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie**

Velmi přesnou a rychlou metodou, kterou lze aplikovat na identifikaci širokého spektra mikroorganismů, jež je schopna rozlišit na rodovou, druhovou ale také až kmenovou úroveň, je MALDI-TOF MS (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací v kombinaci s detektorem doby lety neboli Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry). Díky takto přesným stanovením můžeme monitorovat patogenní mikroorganismy v životním prostředí, v potravinách či klinické diagnostice (Huong & Kopel 2014). V praktické části této práce byl pro identifikaci narostlých mikroorganismů využit přístroj MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonik, DE) s využitím MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1 a knihovny Bruker Taxonomy.

MALDI-TOF MS je šetrnou spektrofotometrickou ionizační technikou umožňující určení celých kultivovaných bakterií či surových bakteriálních extraktů na základě analýzy bílkovin a peptidů, nukleových kyselin či nízkomolekulárních anorganických a organických látek. Stejně jako jiné typy hmotnostních spektrometrů je složen ze tří funkčních jednotek: zdroje pro ionizaci a přenos iontů analytu do plynné fáze, hmotnostního analyzátoru pro separaci iontů podle poměru hmotnosti a náboje a detekčního zařízení pro monitoring iontů (Biswas & Rolain 2013). Výhodou této metody je, že je vyžadována jenom minimální příprava, neboť je možné přímé nanesení nakultivovaných bakterií na MALDI destičku, která je vyrobena z nerezové oceli. Pro správné stanovení je důležité vhodně zvolit koncentraci matrice a organických rozpouštědel. Matrice (nejčastěji jsou využívány směsné roztoky obsahující acetonitril, aceton, kyselinu mravenčí či trifluoroctovou, nebo vodu) má za účel ochránit analyt před přímou ionizací laserem.

Pro nanesení vzorků na MALDI destičku se využívají tři metody:

- a) „Dried-droplet“ – směs vzorku a matrice je nanesena společně, umožňuje detekci vysokomolekulárních látek,
- b) „Two-layer“ – nejprve je nanesena kapka směsi matrice s rozpouštědlem a po zaschnutí je navrstvena směs vzorku a matrice,
- c) „Bottom-layer“ – nejdříve je nanesen rozpuštěný vzorek, po jeho zaschnutí je nanesen stejný objem matrice (Vaidyanathan et al. 2002).

V praktické části této práce byla využita metoda „Bottom layer“.

#### **4.3.1 Příprava vzorků**

Příprava vzorků pro MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii byla provedena na základě protokolu dodaného od výrobce. Do čisté Eppendorfy bylo napipetováno 300 µl 70% roztoku ethanolu, do kterého bylo sterilní kličkou přeneseno 5–10 mg sledovaného biologického materiálu a vše bylo důsledně promícháno. Následně byly vzorky centrifugovány ve vortexu po dobu 3 minut při 14 000 otáček/minutu. Po ukončení centrifugace byl vzniklý supernatant odstraněn a usazený pelet byl při laboratorní teplotě nechán do vyschnutí. Poté bylo k peletu přidáno 30 µl 70% kyseliny mravenčí a 30 µl 100% acetonitrilu, směs byla pipetou zhomogenizována a následně opět 3 minuty centrifugována. Vzniklý supernatant byl v množství 1 µl nanesen na čistou MALDI destičku MTP 384 Steel Polished TF Target (Bruker Daltonics) a po zaschnutí byla nanesena MALDI matrice (kyselina *α*-kyano-4-hydroxycinnamová rozpuštěná v acetonitrilu, vodě a kyselině trifluoroctové – 50:47,5:2,5) také v množství 1 µl. Po zaschnutí matrice byla provedena identifikace pomocí přístroje MALDI-TOF (Bruker Daltonics).

#### **4.3.2 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie**

Po umístění vzorku na jednotlivé spoty destičky, překrytí maticí a následném vysušení dojde na destičce k rychlé ko-krytalizaci v prostorovém poli. Destička je následně vložena do přístroje. V něm je aplikováno laserové záření na krystaly matrice, které absorbují energii (Biswas & Rolain 2013). Vypařováním matrice s sebou bere i molekuly vzorku a dochází

k ionizaci molekul pomocí  $H^+$  od matrice. K výsledné detekci doby letu iontů dochází díky tomu, že mezi destičku a vstupní štěrbinu analyzátoru TOF je aplikované extrakční napětí, pomocí kterého dochází k rozdělení nabitých molekul ve vakuu podle jejich molekulové hmotnosti v elektromagnetickém poli. Ve spektrálních kanálech jsou následně elektronicky měřeny a převáděny na výsledné zobrazení v hmotnostních spektrech, která jsou specifická pro každý testovaný mikroorganismus (Singhal et al. 2015). Poté se určuje shoda s databází Bruker taxonomy pomocí software MALDI Biotyper RTC (Real Time Classification) a je tak určena identita sledovaného mikroorganismu podle tříd spolehlivosti.

**Tabulka č. 5:** Třídy spolehlivosti v MALDI Biotyper

Rozsah	Charakteristika
2.00 – 3.00	Identifikace s vysokou mírou jistoty
1.70 – 1.99	Identifikace s nízkou mírou jistoty
0.00 – 1.69	Identifikaci organismu nelze provést

#### 4.4 Statistické vyhodnocení

Ke statistickému vyhodnocení byl využit program Statistica (StatSoft, TIBCO Software). Pro zjištění statisticky významných rozdílů vzorků mikrobiologického rozboru oproti kontrole (bez mikrovlnného ošetření) byl využit dvouvýběrový t-test s rovností rozptylů s nejnižší hladinou významnosti  $P = 0,05$ .



## 5 Výsledky

### 5.1 Kultivační stanovení mikroorganismů

Podle výše zmíněné metodiky, byly po ukončení kultivace stanoveny a zaznamenány počty kolonií mikroorganismů ve vzorcích potměníka moučného a cvrčka domácího. Uváděné hodnoty jsou v jednotkách log KTJ/g a znázorněny v tabulkách č. 6 a 7.

**Tabulka č. 6:** Stanovený počet mikroorganismů po ukončení kultivace v larvách potměníka moučného uvedený v log KTJ/g. Hodnoty jsou průměry tří opakování. Přesné hodnoty P jsou také v tabulce uvedeny.

Stanovovaný parametr	Spařené (bez ošetření)	Spařené (s mikrovlnným ošetřením)	P	Zmražené (bez ošetření)	Zmražené (s mikrovlnným ošetřením)	P
<i>Bacillus cereus</i>	1,50 ± 0,02	1,00 ± 0,00	-	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	4,75 ± 0,01	<1,00 ± 0,00*	<0,01	5,85 ± 0,01	1,30 ± 0,00*	<0,01
<i>Escherichia coli</i>	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	-	<1 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	-
Koaguláza pozitivní stafylokoky	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	-	1,43 ± 0,04	<1,00 ± 0,00*	<0,01
<i>Staphylococcus aureus</i>	negativní	negativní	-	negativní	negativní	-
Koliformní bakterie	4,77 ± 0,01	<1,00 ± 0,00*	<0,01	4,80 ± 0,01	1,33 ± 0,03*	<0,01
Mezofilní aerobní	6,81 ± 0,01	5,75 ± 0,01*	<0,01	7,90 ± 0,01	5,71 ± 0,01*	<0,01
Aerobní sporulující	3,57 ± 0,01	3,57 ± 0,02	0,77	5,79 ± 0,01	3,51 ± 0,03*	<0,01
<i>Clostridium</i> spp.	negativní	negativní	-	negativní	negativní	-
<i>Salmonella</i> spp.	0/25 g	0/25 g	-	0/25 g	0/25 g	-

\* statisticky významný rozdíl oproti kontrole (bez ošetření)

**Tabulka č. 7:** Stanovený počet mikroorganismů po ukončení kultivace ve vzorcích cvrčka domácího uvedený v log KTJ/g. Hodnoty jsou průměry tří opakování. Přesné hodnoty P jsou uvedeny v pravém sloupci.

Stanovovaný parametr	Spařené (bez ošetření)	Spařené (s mikrovlnným ošetřením)	P	Zmražené (bez ošetření)	Zmražené (s mikrovlnným ošetřením)	P
<i>Bacillus cereus</i>	<1 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	3,63 ± 0,03	1,00 ± 0,00	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,48 ± 0,02	<1,00 ± 0,00*	<0,01	4,71 ± 0,01	1,33 ± 0,03*	<0,01
<i>Escherichia coli</i>	<1,00 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	-	<1 ± 0,00	<1,00 ± 0,00	-
Koaguláza pozitivní stafylokoky	1,59 ± 0,01	<1,00 ± 0,00*	<0,01	1,33 ± 0,03	<1,00 ± 0,00*	<0,01
<i>Staphylococcus aureus</i>	negativní	negativní	-	negativní	negativní	-
Koliformní bakterie	3,59 ± 0,01	<1,00 ± 0,00*	<0,01	5,84 ± 0,01	<1,00 ± 0,00*	<0,01
Mezofilní aerobní	5,76 ± 0,01	5,73 ± 0,01*	0,02	7,9 ± 0,01	5,73 ± 0,01*	<0,01
Aerobní sporulující	4,61 ± 0,02	3,53 ± 0,03*	<0,01	5,72 ± 0,02	3,58 ± 0,01*	<0,01
<i>Clostridium</i> spp.	pozitivní	negativní	-	negativní	pozitivní	-
<i>Salmonella</i> spp.	0/25 g	0/25 g	-	pozitivní	0/25 g	-

\* statisticky významný rozdíl oproti kontrole (bez ošetření)

### 5.1.1 *Bacillus cereus*

Po ukončení kultivace byl nejvyšší nárůst *Bacillus cereus* zaznamenán ve všech vzorcích, avšak z důvodu nárůstu přes celou miskou u většiny vzorků nebylo možno provést přesné vyhodnocení. U takovýchto vzorků je uvedena hodnota 1 log KTJ/g dle ředění ve kterém se nárůst vyskytl. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán ve vzorku cvrčka domácího ošetřeného pouze zmražením, kde výskyt činil 3,63 ± 0,03 log KTJ/g. Počitatelný výskyt byl zaznamenán také ve vzorku potměníka ošetřeného pouze metodou spaření, kde výskyt činil 1,5 ± 0,02 log KTJ/g.

### 5.1.2 *Enterobacteriaceae*

Z tabulek č. 6 a 7, lze vidět, že mikrovlnné ošetření má statisticky významný vliv na množství bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* (P < 0,01). Bakterie této čeledi byly zaznamenány ve vzorcích potměníků ošetřených pouze spařením (4,75 ± 0,01 log KTJ/g), u vzorku spařeného a mikrovlnně ošetřeného se žádné kolonie neprokázaly. Podobně tak ve vzorcích ošetřených pouze zmražením byly hodnoty vyšší (5,85 ± 0,01 log KTJ/g) než u vzorků zmražených a ošetřených mikrovlnně (1,3 ± 0 log KTJ/g). Ve vzorcích cvrčků ošetřených pouze spařením se vyskytovalo 1,48 ± 0,02 log KTJ/g, u spařených a mikrovlnně ošetřených se kolonie neprokázaly, u vzorků zmražených bez ošetření se vyskytovalo 4,71 ± 0,01 log KTJ/g a u vzorků se mikrovlnným ošetřením 1,33 ± 0,03 log KTJ/g.

### 5.1.3 *Escherichia coli*

Po ukončení kultivace u vzorků jak potemníka, tak cvrčka nebyly zaznamenány kolonie *Escherichia coli*, neboť nebyl překročen limit detekce (1 log KTJ/g).

### 5.1.4 Koaguláza pozitivní stafylokoky a *Staphylococcus aureus*

Provedením kultivace a koagulázového testu nebyla u žádného ze vzorků potemníků a cvrčků zjištěna přítomnost bakterií rodu *Staphylococcus aureus*. Na rozdíl od skupiny koaguláza pozitivních stafylokoků, jejichž přítomnost byla zjištěna u vzorků pouze zmražených potemníků ( $1,43 \pm 0,04$  log KTJ/g), pouze spařených cvrčků ( $1,59 \pm 0,01$  log KTJ/g) a pouze zmražených cvrčků ( $1,33 \pm 0,03$  log KTJ/g). U všech vzorků, které byly ošetřeny mikrovlnně se nevyskytovaly vůbec, nebo nebyl překročen limit detekce (1 log KTJ/g).

### 5.1.5 Koliformní bakterie

Přítomnost koliformních bakterií byla zjištěna u všech vzorků, které nebyly mikrovlnně ošetřeny. V případě vzorků pouze spařených potemníků se jednalo o hodnotu  $4,77 \pm 0,01$  log KTJ/g, pouze zmražených  $4,8 \pm 0,01$  log KTJ/g, ale také zmražených a mikrovlnně ošetřených  $1,33 \pm 0,03$  log KTJ/g. U vzorků cvrčků byly zjištěny následující hodnoty: pouze spařené  $3,59 \pm 0,01$  log KTJ/g, pouze zmražené  $5,84 \pm 0,01$  log KTJ/g. Cvrččí vzorky ošetřené mikrovlnně nevykazovaly přítomnost koliformních bakterií. Zároveň byly zjištěny také statisticky významné rozdíly mezi porovnávanými skupinami ( $P < 0,05$ ).

### 5.1.6 Mezofilní aerobní bakterie

Přítomnost mezofilních aerobních bakterií byla zjištěna ve všech vzorcích potemníků i cvrčků. U vzorků potemníků se hodnoty pohybovaly v rozmezí  $5,71 \pm 0,01$  log KTJ/g až  $7,9 \pm 0,01$  log KTJ/g a zároveň byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi porovnávanými skupinami ( $P < 0,05$ ). U vzorků cvrčků byly hodnoty stanoveny v rozmezí  $5,73 \pm 0,01$  log KTJ/g až  $7,9 \pm 0,01$  log KTJ/g, také byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi porovnávanými skupinami ( $P < 0,05$ ).

### 5.1.7 Aerobní sporulující bakterie

Přítomnost aerobních sporulujících bakterií byla také zjištěna ve všech vzorcích potemníků a cvrčků. U vzorků potemníků se hodnoty pohybovaly v rozmezí  $3,51 \pm 0,03$  log KTJ/g až  $5,79 \pm 0,01$  log KTJ/g, byly zjištěny také statisticky významné rozdíly mezi porovnávanými skupinami ( $P < 0,05$ ), s výjimkou vzorků spařených, kde hodnota  $P$  činila 0,77. U vzorků cvrčků byly stanoveny hodnoty v rozmezí  $3,53 \pm 0,03$  log KTJ/g až  $5,72 \pm 0,02$  log KTJ/g, také byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi porovnávanými skupinami ( $P < 0,05$ ).

### 5.1.8 *Clostridium* spp.

Po ukončení kultivace byly narostlé kolonie identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie podle výše popsané metodiky. Pozitivní byly vzorky zmražených a mikrovlnně ošetřených cvrčků a pouze spařených cvrčků. S vysokou mírou jistoty byl identifikován rod *Clostridium drakei*, s nízkou mírou jistoty pak *Clostridium sphenoides*.

**Tabulka č. 8:** Bakteriální druhy a jejich identifikační skóre, stanoveny pomocí MALDI-TOF, hmotnostní spektrometrie

Vzorek	Identifikovaný druh	Skóre
<i>Acheta domesticus</i> (jen spařený)	<i>Clostridium sphenoides</i>	1,49
<i>Acheta domesticus</i> (jen spařený)	<i>Clostridium sphenoides</i>	1,70
<i>Acheta domesticus</i> (zmražený s mikrovlnným ošetřením)	<i>Clostridium drakei</i>	2,21

### 5.1.9 *Salmonella* spp.

Po ukončení kultivace na SS agaru byly světlé kolonie s černým středem, které vizuálně připomínaly kolonie salmonel, odebrány a byl proveden aglutinační test. Vzorek cvrčků ošetřených pouze zmražením jako jediný vykázal sraženinu, a tedy pozitivitu na přítomnost bakterií rodu *Salmonella*.

## 6 Diskuse

### 6.1 *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* je grampozitivní aerobní sporotvorná bakterie, kterou lze běžně nalézt v půdě, na zelenině, ale také v mnoha syrových a zpracovaných potravinách. Jak uvádí Grabowski & Klein (2017b), je *Bacillus cereus* klasickým patogenem, který může způsobovat otravy jídlem při obsahu  $> 6 \log$  KTJ/g. Jeho některé kmeny mohou produkovat toxiny, které způsobují dva typy onemocnění. První a známější je charakterizováno bolestí břicha a nekrvavými průjmy, které má inkubační dobu 4 až 16 hodin po požití, se symptomy, které přetrvávají až 24 hodin. Druhé je charakterizované akutním záchvatem nevolnosti a zvracením, které nastává během 1 až 5 hodin po konzumaci (Tallent et al. 2021). Na druhou stranu ne všechny kmeny jsou patogenní. *Bacillus cereus* je také velmi odolný, vysoce termorezistentní a může přežívat i pasterační metody, záleží tedy do značné míry na kombinaci teploty a času.

Studie Fasolato et al. (2018) stanovila nejvyšší obsah *B. cereus* ve vzorcích krtonožek v množství  $6,6 \log$  KTJ/g, u vzorků bource byl medián nižší než  $4 \log$  KTJ/g. Ačkoliv není stanovena žádná regulace na mikrobiologická kritéria, je podle těchto autorů množství  $5 \log$  KTJ/g *B. cereus* považováno za bezpečnou prahovou hodnotu. Tato hodnota je však značně vyšší než hodnota, kterou za bezpečnou stanovila EFSA. EFSA vyžaduje obsah *B. cereus* v mražených a sušených potměnících a cvrčcích méně než  $2 \log$  KTJ/g (Turck et al. 2021a, 2021b).

V praktické části této práce byl po ukončení kultivace nejvyšší nárůst zaznamenán ve vzorku cvrčka domácího ošetřeného pouze zmražením, kde hodnota činila  $3,63 \pm 0,03 \log$  KTJ/g. Vyšší výskyt byl zaznamenán také u vzorku potměníka ošetřeného pouze metodou spaření, kde výskyt činil  $1,5 \pm 0,02 \log$  KTJ/g. Všechny ostatní vzorky nepřesáhly limit detekce metody ( $1 \log$  KTJ/g). Dá se tak předpokládat, že mikrovlnné ošetření může mít na počet bakterií rodu *Bacillus* vliv. Ačkoliv nebyla překročena hodnota  $5 \log$  KTJ/g, hodnota stanovená EFSA byla překročena ve dvou případech. Vzorky hmyzu analyzované v této práci tak (s výjimkou dvou případů) lze považovat z hlediska rizika nákazy *B. cereus* za bezpečné.

### 6.2 *Enterobacteriaceae*

Čeleď *Enterobacteriaceae* je rodově a druhově bohatá skupina zahrnující známé patogenní rody *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* či *Escherichia coli* (patogenní jsou jen některé kmeny). Jedná se však především o gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinky, z většiny se vyskytující v trávicím traktu obratlovců v podobě přirozeného mikrobiomu. Jejich přítomnost tedy může značit fekální znečištění (Feng et al. 2020). Jako doporučené mikrobiologické kritérium vycházející z dříve platných evropských předpisů lze považovat limitní hodnotu  $2 \log$  KTJ/g (European Commission 2005).

Studie Stoops et al. (2016) sledovala výskyt různých druhů mikroorganismů v čerstvých vzorcích potměnků a cvrčků. Výsledek sledování byl u obou skupin jedlého hmyzu podobných a nacházel se v rozmezí 6,8–7,6 log KTJ/g. Tedy výrazně nad limitní hodnotou mikrobiologických kritérií. Takovéto hodnoty mohou ukazovat na znečištění pocházející z prostředí chovu a mohou být potenciálním rizikem při konzumaci. Na druhou stranu je nutné zmínit, že v tomto případě nebyla provedena žádná tepelná úprava, která by přispěla k redukci mikrobiální zátěže.

Studie Klunder et al. (2012) porovnávala mikrobiologickou kvalitu vzorků potměnků a cvrčků v závislosti na tepelné úpravě. U čerstvého vzorku potměnka bylo množství *Enterobacteriaceae* stanoveno 6,8 log KTJ/g, u vařených vzorků již bylo pod hranicí detekce. U čerstvých vzorků cvrčka bylo stanoveno 4,2 log KTJ/g a u vařených pod hranicí detekce. Lze tedy konstatovat, že tepelná úprava má vliv na obsah mikrobů v jedlém hmyzu.

V praktické části této práce bylo také zjištěno, že mikrovlnné ošetření má statisticky významný vliv na množství bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Bakterie této čeledi byly zaznamenány ve vzorcích potměnků ošetřených pouze spařením ( $4,75 \pm 0,01$  log KTJ/g), tyto hodnoty by tedy neodpovídaly doporučenému mikrobiologickému kritériu. U vzorků potměnků spařených a mikrovlnně ošetřených se žádné kolonie neprokázaly. Podobně tak ve vzorcích potměnků ošetřených pouze zmražením byly hodnoty vyšší ( $5,85 \pm 0,01$  log KTJ/g) a opět by tedy mikrobiologickým kritériím neodpovídaly, než u vzorků zmražených a ošetřených mikrovlnně ( $1,3 \pm 0$  log KTJ/g), které jsou v limitu. Ve vzorcích cvrčků ošetřených pouze spařením se vyskytovalo  $1,48 \pm 0,02$  log KTJ/g, u spařených a mikrovlnně ošetřených se kolonie neprokázaly, čímž oba způsoby ošetření splňují limit. U vzorků cvrčků zmražených bez ošetření se vyskytovalo  $4,71 \pm 0,01$  log KTJ/g, tedy množství překračující mikrobiologické kritérium a u vzorků s mikrovlnným ošetřením  $1,33 \pm 0,03$  log KTJ/g. EFSA vyžaduje obsah rodu *Enterobacteriaceae* ve vzorcích mražených a sušených potměnků a cvrčků méně než 2 log KTJ/g (Turck et al. 2021a, 2021b). Výsledky této práce toto množství překračují.

Vliv spaření a mikrovlnného ošetření na množství bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* ve vzorcích potměnků sledovala také studie Vandeweyer et al. (2017). Vzorky bez ošetření měly nejvyšší hodnoty ( $7,4 \pm 0,4$  log KTJ/g), všechny ostatní vzorky, které byly tepelně ošetřeny spařením a zároveň mikrovlnně měly hodnoty pod hranicí detekce (1 log KTJ/g). Tyto výsledky odpovídají hypotéze, že tepelné ošetření má vliv na mikrobiální kontaminaci jedlého hmyzu.

### **6.3 *Escherichia coli* a koliformní bakterie**

Jak již bylo zmíněno výše, *Escherichia coli* se řadí do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se tedy o gramnegativní, fakultativně anaerobní nesporulující bakterii. Stejně jako ostatní bakterie z této čeledi patří mezi běžnou součást střevního mikrobiomu a její přítomnost je tedy indikací fekálního znečištění. Existují kmeny, které jsou pro člověka prospěšné, ale i oportunitně patogenní kmeny, které mohou způsobovat infekce u oslabených jedinců, ale také patogenní, které způsobují gastrointestinální onemocnění (Feng et al. 2020).

Studie Grabowski & Klein (2017c) sledovala výskyt mikrobiální zátěže u mnoha druhů jedlého hmyzu (*Acheta domesticus*, *Gryllus assimilis*, *Gryllus bimaculatus*, *Locusta migratoria*, *Blattica dubia*, *Galleria mellonella*, *Chilecomadia moorei*, *Pachnoda marginata*, *Tenebrio molitor*). Hmyz byl usmrčen zmražením, žádná další tepelná úprava nebyla provedena. Žádný ze vzorků nebyl pozitivní na obsah *Escherichia coli*.

S těmito výsledky korespondují i výsledky praktické části této práce, neboť po ukončení kultivace u vzorků jak potměníka, tak cvrčka nebyly zaznamenány bakterie rodu *Escherichia coli* buď vůbec, nebo nebyl přesažen limit detekce (1 log KTJ/g). Tyto výsledky splňují požadavky, které EFSA vyžaduje na obsah *Escherichia coli* ve vzorcích mražených a sušených potměníků a cvrčků a které by měly být méně než <1,7 log KTJ/g (Turck et al. 2021a, 2021b).

Skupina koliformních bakterií také patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jejich přítomnost v potravinách většinou indikuje špatnou hygienickou kvalitu. V praktické části této práce byla přítomnost skupiny koliformních bakterií byla zjištěna u všech vzorků, které nebyly mikrovlnně ošetřeny. Stanovené hodnoty se pohybovaly v rozmezí  $1,33 \pm 0,03$  log KTJ/g až  $5,84 \pm 0,01$  log KTJ/g. Zároveň byly zjištěny také statisticky významné rozdíly mezi porovnávanými skupinami ( $P < 0,05$ ). Studie Nyangena et al. (2020) zmiňuje, že u vzorků jedlého tepelně neupraveného hmyzu, byla zjištěna přítomnost koliformních bakterií (*Escherichia coli*, *Klebsiella* a *Enterobacter* spp.). Studie Banjo et al. (2006) sledovala mikrobiologickou kvalitu u *Oryctes monocerus*. Počty koliformních bakterií na povrchu těla jedlého hmyzu byly stanoveny na 5,84 log KTJ/g, ve vnitřnostech pak 6,08 log KTJ/g. Tyto výsledky jsou srovnatelné s výsledky získanými v praktické části této práce.

#### **6.4 Koaguláza pozitivní stafylokoky a *Staphylococcus aureus***

Rod *Staphylococcus* se dělí v závislosti na schopnosti koagulovat plasmu pomocí plasmokoagulázového testu na koaguláza pozitivní (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*) a koaguláza negativní (*Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*). Jedná se o grampozitivní, aerobní a fakultativně anaerobní nesporeující bakterie. *S. aureus* je vysoce citlivý na tepelné zpracování a téměř všechny dezinfekční prostředky. Přítomnost tohoto rodu nebo jeho enterotoxinů v potravinách je tedy obecně známkou špatné hygieny. Ačkoliv je součástí normálního mikrobiomu kůže či sliznic člověka, může způsobovat těžké alimentární otravy (Tallent et al. 2019).

Studie Fasolato et al. (2018), která sledovala mikrobiální bezpečnost u vzorků potměníků, cvrčků, krtonožek a bourců morušových uvádí, že ani jeden z testovaných vzorků nebyl pozitivní na přítomnost *S. aureus*.

Na druhou stranu studie Garofalo et al. (2017) sledovala mikrobiální bezpečnost u vzorků jedlého hmyzu, který byl vařený a sušený, jednalo se o cvrčky a prášek z nich, celá sarančata a celé larvy potměníků. Ve všech zmíněných vzorcích byl detekován rod *Staphylococcus*.

V praktické části této práce byla provedena kultivace a koagulázový test. U žádného vzorku potměníků a cvrčků nebyla zjištěna přítomnost *Staphylococcus aureus*, což splňuje

mikrobiologická kritéria, podle kterých nesmí být *S. aureus* zjištěn v 1 g či 1 ml vzorku. Na druhou stranu skupina koaguláza pozitivních stafylokoků byla stanovena u některých vzorků. Jednalo se o vzorky pouze zmražených potemníků ( $1,43 \pm 0,04$  log KTJ/g), pouze spařených cvrčků ( $1,59 \pm 0,01$  log KTJ/g) a pouze zmražených cvrčků ( $1,33 \pm 0,03$  log KTJ/g). U všech vzorků, které byly ošetřeny mikrovlnně se nevyskytovaly vůbec, nebo nebyl přesážen limit detekce (1 log KTJ/g). EFSA vyžaduje obsah skupiny koaguláza pozitivních stafylokoků ve vzorcích mražených a sušených potemníků a cvrčků méně než 2 log KTJ/g (Turck et al. 2021a, 2021b). Výsledky této práce tyto hodnoty překračují pouze v několika případech.

## 6.5 Mezofilní aerobní bakterie

V praktické části této práce byl kmen mezofilních aerobních bakterií zjištěn ve všech vzorcích potemníků i cvrčků. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí  $5,71 \pm 0,01$  log KTJ/g až  $7,9 \pm 0,01$  log KTJ/g a zároveň byly stanoveny statisticky významné rozdíly mezi porovnávanými skupinami ( $P < 0,05$ ). U všech vzorků nebyla splněna doporučená mikrobiologická kritéria. Ta pro mezofilní aerobní bakterie činí 5 log KTJ/g či ml výrobku. Avšak u všech vzorků, které byly mikrovlnně ošetřeny, byly hodnoty statisticky významně nižší oproti skupinám, které toto ošetření nepodstoupily.

Tyto výsledky odpovídají výsledkům v odborné literatuře. Studie Vandeweyer et al. (2017) sledovala vliv spaření a následného mikrovlnného ošetření na vzorky potemníků. Nejvyšší hodnoty dosahovaly čerstvé vzorky (8,1 log KTJ/g), naopak nejnižší hodnoty byly stanoveny u vzorků, které byly spařeny a následně 16 či 20 minut mikrovlnně ošetřeny ( $1,3 \pm 0,2$  log KTJ/g).

Tyto výsledky podporují také výsledky studie Klunder et al. (2012), která sledovala vliv tepelného ošetření na mikrobiologickou kvalitu vzorků potemníků a cvrčků. Vzorky čerstvého jedlého hmyzu obsahovaly výrazně vyšší množství (potemníci 7,7 log KTJ/g, cvrčci 7,2 log KTJ/g), než vzorky tepelně opracované. Zároveň tyto hodnoty také nesplňují doporučená mikrobiologická kritéria. Vzorky vařeného i pečeného potemníka obsahovaly již pouze 1,7 log KTJ/g. Podobně jako vzorky vařených ( $1,7$  log KTJ/g) a restovaných ( $2,7$  log KTJ/g) cvrčků.

Podobně vysoké hodnoty mikrobiologické kontaminace vzorků čerstvých potemníků potvrzuje také studie Osimani et al. (2018). Celkové počty mezofilních aerobů se pohybovaly mezi  $5,5 \pm 0,2$  log KTJ/g až  $8,7 \pm 0,1$  log KTJ/g.

Vliv tepelné úpravy na množství mikrobiální kontaminace skupinou mezofilních aerobních bakterií potvrzuje také studie Garofalo et al. (2017). Tato studie zkoumala vzorky cvrčků, sarančat a potemníků, které byly vařené a sušené. Nejvyšší hodnota byla stanovena ve vzorku cvrččí mouky ( $4,80 \pm 0,06$  log KTJ/g), dále celých cvrčků ( $4,50 \pm 0,11$  log KTJ/g), sarančat ( $2,43 \pm 0,12$  log KTJ/g) a nejméně ve vzorcích larev potemníka ( $< 2$  log KTJ/g). Zároveň tyto hodnoty splňují doporučená mikrobiologická kritéria.



## 6.6 Aerobní sporulující bakterie

Sporulující bakterie jsou obecně spojené s přítomností v půdě či jako součást prachových částic. Jejich přítomnost v potravinách může představovat závažný problém, neboť jsou schopné produkovat endospory, které jsou značně odolné vůči různým způsobům eliminace (teplo, dehydratace, radiační záření či chemikálie). Pokud je potravina nedostatečně tepelně upravena, následně chlazená a skladována, mohou tyto spory vyklíčit a množit se. Jedlý hmyz může být kontaminován sporulujícími bakteriemi z půdy, prostředí chovu či krmiva (Garofalo et al. 2019).

Studie Osimani et al. (2018), která zkoumala vzorky čerstvých potměnků, stanovila množství sporulujících bakterií v rozmezí  $3,0 \pm 0,1$  log KTJ/g až  $3,7 \pm 0,2$  log KTJ/g.

Podobné výsledky byly získány v praktické části této práce, když byl kmen aerobních sporulujících bakterií zjištěn ve všech vzorcích potměnků a cvrčků. Stanovené hodnoty se pohybovaly v rozmezí  $3,51 \pm 0,03$  log KTJ/g až  $5,79 \pm 0,01$  log KTJ/g. Byly určeny také statisticky významné rozdíly mezi porovnávanými skupinami ( $P < 0,05$ ), s výjimkou vzorků spařených potměnků ( $P = 0,77$ ). Z těchto výsledků lze pozorovat, že provedené mikrovlnné ošetření má vliv na obsah spor především u zmražených vzorků, neboť u spařených došlo k inaktivaci části sporulujících již při procesu spaření. Na rezistentní spory poté provedené mikrovlnné ošetření již nemělo významný vliv. Tyto výsledky podporuje také studie Vandeweyer et al. (2017), která stanovila obsah aerobních sporulujících mikroorganismů ve vzorcích potměnků po provedeném blanšírování na  $1,4 \pm 0,2$  log KTJ/g. Po následném mikrovlnném ošetření, které trvalo 20 minut byla hodnota stejná.

Vliv tepelné úpravy na množství sporulujících bakterií zkoumala také studie Klunder et al. (2012). Ve vzorcích čerstvých potměnků ( $2,1$  log KTJ/g) a cvrčků ( $3,6$  log KTJ/g) bylo zjištěno vyšší množství než u vzorků vařených ( $< 1$  log KTJ/g) a pečených potměnků ( $1,6$  log KTJ/g) a vařených a restovaných cvrčků (oba způsoby tepelné úpravy  $1,5$  log KTJ/g). Lze tedy předpokládat, že tepelná úprava má jistý vliv na množství sporulujících bakterií ve vzorcích jedlého hmyzu.

## 6.7 *Clostridium spp.*

*Clostridium spp.* je velký heterogenní bakteriální rod, jehož zástupci jsou grampozitivní, mezofilní, anaerobní a sporulující. Přestože je jedním z nejvíce zastoupených rodů v lidském střevním mikrobiomu, zároveň se někteří zástupci tohoto rodu řadí také k významným lidským patogenům. Nejnebezpečnějším zástupcem tohoto rodu je *Clostridium botulinum*, vyznačující se produkcí neurotoxinu botulinu, který způsobuje botulismus (Alou et al. 2018). Toto onemocnění, ačkoliv je vzácné, má velmi vysokou mortalitu. *C. botulinum* je široce rozšířené v půdě, sedimentech oceánů či jezer, odkud mohou následně být kontaminovány ryby či jiné mořské plody. Na druhou stranu i když potravina může obsahovat *C. botulinum*, nemusí nutně také způsobit botulismus. Pokud bakterie nemají vhodné podmínky k růstu, neprodukují toxiny (Solomon & Timothy Lilly 2001).

Studie Garofalo et al. (2017) detekovala přítomnost *Clostridium* spp. u všech vzorků s výjimkou sarančat. Jednalo se o vzorky cvrčků a prášek z nich a celé larvy potěmníků. Přítomnost klostridií ve vzorcích potěmníků potvrzuje také studie Stoops et al. (2016), či ve vzorcích chroustů studie Egert et al. (2005).

V praktické části této práce byl rod *Clostridium* identifikován pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie ve třech případech. Byla zjištěna pozitivní přítomnost klostridií ve vzorcích cvrčků, konkrétně se jednalo o *Clostridium drakei* (zmražené a mikrovlnně ošetřené) a *Clostridium sphenoides* (jen spařené), který ale kvůli nízkému skóre identifikace (<2,00) nelze bezpečně identifikovat na úroveň druhu. EFSA stanovila limitní hodnotu *Clostridium perfringens* v 1 g vzorků mražených a sušených potěmníků a cvrčků 1 log KTJ/g (Turck et al. 2021a, 2021b), což výsledky této práce splňují, neboť *Clostridium perfringens* nebyl v praktické části této práce detekován v žádném vzorku. Přítomnost klostridií v mikrovlnně ošetřených zamražených vzorcích ale značí, že je třeba věnovat této sporující bakterii i nadále pozornost v souvislosti s jedlým hmyzem.

## **6.8 *Salmonella* spp.**

V praktické části této práce byly po ukončení kultivace na SS agaru světlé kolonie s černým středem, které vizuálně připomínaly kolonie salmonel, odebrány a byl proveden aglutinační test. Vzorek cvrčků ošetřených pouze zmražením jako jediný vykázal sraženinu, a tedy pozitivitu na přítomnost bakterií rodu *Salmonella* což je v nesouladu s platnými mikrobiologickými kritérii, podle kterých nesmí být přítomna ve 25 g či 25 ml výrobku. Také EFSA stanovila, že *Salmonella* spp. nesmí být přítomna ve 25 g mražených a sušených potěmníků a cvrčků (Turck et al. 2021a, 2021b).

S těmito výsledky také nejsou v souladu výsledky z odborné literatury. Ve výsledcích studií nebyla přítomnost bakterií rodu *Salmonella* potvrzena ani u jednoho z testovaných vzorků (Yoo et al. 2013; Garofalo et al. 2017; Osimani et al. 2018).

Na druhou stranu studie De Smet et al. (2021) sledovala výskyt rodu *Salmonella* u rodu jedlého hmyzu *Hermetia illucens*, kterému bylo předkládáno krmivo kontaminované salmonelami. Tato kontaminace se následně projevila i ve vzorcích jedlého hmyzu. Z tohoto důvodu je tedy důležité dbát i na mikrobiologickou bezpečnost předkládaného krmiva chovanému jedlému hmyzu. Podobné výsledky potvrdila studie Wynants et al. (2019), ve které bylo předkládáno kontaminované krmivo potěmníkům. Ačkoliv se jedná o patogenní bakterii, na chov jedlého hmyzu, jeho vývoj a váhový přírůstek nemá její přítomnost pozorovatelný vliv. Na druhou stranu salmonely zůstávají přítomné ve vzorcích jedlého hmyzu až po sedm dní po podání kontaminovaného krmiva. Z tohoto důvodu je doporučeno provádět tepelnou úpravu před přímou konzumací.

## **6.9 Vliv tepelného opracování na hygienickou kvalitu**

V praktické části této práce byl sledován vliv tepelné úpravy na mikrobiologickou kvalitu larev potěmníků a dospělců cvrčků. Byly porovnávány vzorky pouze spařené a pouze zmražené

se vzorky, které navíc prodělaly mikrovlnné ošetření. U všech vzorků byl prokázán statisticky významný vliv mikrovlnného ošetření na sledované parametry, s výjimkou kategorie aerobních sporulujících bakterií u vzorků potemníků usmrčených spařením. Z toho lze usuzovat, že spaření část spor inaktivovalo a mikrovlnné ošetření na zbylé spory nemělo vliv. Druhou skupinou byly vzorky pouze zmražené, které byly porovnávány se vzorky, které navíc prodělaly také mikrovlnné ošetření. U všech testovaných mikrobiologických ukazatelů, včetně kategorie aerobních sporulujících, byl prokázán významný vliv mikrovlnného ošetření.

Studie Vandeweyer et al. (2017) sledovala efekt blanšírování a následného mikrovlnného ošetření u vzorků larev potemníků. Výsledkem bylo, že samotné blanšírování či blanšírování s následným mikrovlnným sušením má podobný efekt jako pasterace, tedy že usmrtí vegetativní buňky, avšak nikoliv spory. Studie Vandeweyer et al. (2018) pak také sledovala výskyt mikroorganismů u mražených cvrčků. Celkové počty byly stanoveny na  $2,2 \pm 0,1 \log \text{KTJ/g}$ , *Enterobacteriaceae* na méně než  $1 \log \text{KTJ/g}$  a sporulující bakterie na  $2,2 \log \text{KTJ/g}$ , což jsou hodnoty nižší, než které byly zjištěny v praktické části této práce.

Studie Caparros Megido et al. (2018) zkoumala různé typy tepelné úpravy potemníků a jejich vliv na hygienickou kvalitu. Bylo zjištěno, že nejúčinnější technikou ke snížení mikrobiální zátěže bylo vaření a vaření ve vakuu. Nevýhodou však může být velmi měkká a šťavnatá struktura, neboť konzumenty je preferována křupavost. Křupavé struktury a velmi účinného snížení mikrobiální zátěže lze dosáhnout smažením, nevýhodou však je vyšší obsah lipidů. Jako málo účinné se ukázalo pečení v troubě, ať již po dobu 15 či 30 minut. Studie Mancini et al. (2019), která sledovala výskyt *Listeria monocytogenes* u vzorků potemníků však tyto výsledky zcela nepotvrzuje. V provedené studii byly larvy potemníka chovány na substrátu infikovaném listerií. Byl zkoumán vliv promývací procedury, která koncentrace listerií příliš neovlivnila, na rozdíl od vylačnění, které snížilo jejich koncentraci. Avšak jako nejvíce účinná se ukázalo pečení v troubě při teplotě  $150^\circ$  po dobu deseti minut, které inaktivovalo veškeré buňky listerií.

## 7 Závěr

Jedlý hmyz, patřící do skupiny takzvaných „Novel foods“, má zajisté celou řadu pozitivních i negativních faktorů. Mezi pozitivní patří kvalitní výživové hodnoty díky vysokému obsahu proteinů, nenasycených mastných kyselin, vitaminů, minerálních látek či vlákniny. Na druhou stranu existují i určitá rizika spojená s jeho konzumací, mezi která lze zařadit i mikrobiologickou kvalitu. V praktické části této diplomové práce bylo zkoumáno množství a diverzita mikroorganismů obsažených v nejčastěji využívaných druzích jedlého hmyzu, konkrétně v larvách potměníka moučného (*Tenebrio molitor*) a dospělých cvrčka domácího (*Acheta domestica*) při různých způsobech tepelného opracování se zvláštním zřetelem na mikrobiologické ošetření.

Z výsledků provedených pokusů můžeme potvrdit, že cíle práce, tedy identifikace a stanovení počtu mikroorganismů, byly splněny. Na druhou stranu hypotéza, že zjištěné počty mikroorganismů budou splňovat hygienické limity pro živočišné produkty nebyla potvrzena. Ačkoliv doporučená mikrobiologická kritéria pro skupiny mikroorganismů *Salmonella* spp., mezofilní aerobní bakterie a *Enterobacteriaceae* byla u některých vzorků splněna, některé tuto hranici překračovaly. Pouze parametry pro *Staphylococcus aureus* splňovaly všechny vzorky.

Na základě těchto výsledků lze tvrdit, že ačkoliv je jedlý hmyz bezesporu zajímavou a do budoucna slibnou potravinou, je nutné dbát na hygienickou kvalitu a také dobré tepelné opracování, které tuto kvalitu zvyšuje.

## 8 Seznam použité literatury

- Alou MT et al. 2018. Taxonogenomic description of four new *Clostridium* species isolated from human gut: 'Clostridium amazonitimonense', 'Clostridium merdae', 'Clostridium massidielmoense' and 'Clostridium nigeriense.' *New Microbes and New Infections* **21**:128–139. Elsevier Ltd. Available from <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.11.003>.
- Azagoh C, Ducept F, Garcia R, Rakotozafy L, Cuvelier ME, Keller S, Lewandowski R, Mezdoor S. 2016. Extraction and physicochemical characterization of *Tenebrio molitor* proteins. *Food Research International* **88**:24–31. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.010>.
- Banjo A., Lawal O., Adeyemi A. 2006. The Microbial fauna associated with the larvae of *Oryctes monocerus*. *Journal of applied sciences research* **2**:837–843.
- Beaumont P, Courtois J, Van der Brempt X, Tollenaere S. 2019. Food-induced anaphylaxis to *Tenebrio molitor* and allergens implicated. *Revue Francaise d'Allergologie* **59**:389–393. Elsevier Masson SAS. Available from <https://doi.org/10.1016/j.reval.2019.06.001>.
- Belluco S, Losasso C, Maggioletti M, Alonzi CC, Paoletti MG, Ricci A. 2013. Edible insects in a food safety and nutritional perspective: A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **12**:296–313.
- Besette E, Williams B. 2022. Protists in the Insect Rearing Industry: Benign Passengers or Potential Risk? *Insects* **13**:1–32.
- Biswas S, Rolain J. 2013. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture **92**:14–24.
- Borrelli L, Coretti L, Dipineto L, Bovera F, Menna F, Chiariotti L, Nizza A, Lembo F, Fioretti A. 2017. Insect-based diet, a promising nutritional source, modulates gut microbiota composition and SCFAs production in laying hens. *Scientific Reports* **7**:1–11. Springer US. Available from <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-16560-6>.
- Bursová Š, Necidová L, Dušková M. 2014. Mikrobiologie Potravin a Mikrobiologické Laboratorní Metody. *Obečná Mikrobiologie*:114.
- Caparros Megido R et al. 2018. Effect of household cooking techniques on the microbiological load and the nutritional quality of mealworms (*Tenebrio molitor* L. 1758). *Food Research International* **106**:503–508.
- De Smet J, Vandeweyer D, Van Moll L, Lachi D, Van Campenhout L. 2021. Dynamics of *Salmonella* inoculated during rearing of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*). *Food Research International* **149**:110692. Elsevier Ltd. Available from <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110692>.
- Dobermann D, Swift JA, Field LM. 2017. Opportunities and hurdles of edible insects for food and feed. *Nutrition Bulletin* **42**:293–308.
- Egert M, Stingl U, Bruun LD, Pommerenke B, Brune A, Friedrich MW. 2005. Structure and topology of microbial communities in the major gut compartments of *Melolontha melolontha* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied and Environmental Microbiology* **71**:4556–4566.
- European Commission. 2005. No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological

- criteria for foodstuffs. Pages 1–26 Official Journal of the European Union. Available from <chrome-extension://efaidnbnmnibpcjpcglclefindmkaj/https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=EN>.
- European Commission. 2009a. Regulation (EC) No 767/2009 of the European Parliament and of the Council of 13 July 2009 on the placing on the market and use of feed. Official Journal of the European Union:L 229/1-28.
- European Commission. 2009b. Regulation (EC) No 1069/2009. Official Journal of the European Union **300**:1–33.
- European Commission. 2013. No 68/2013 of 16 January 2013 on the Catalogue of feed materials. OJ L 29, 30.1.2013, p. 1–6. Co:1–64.
- European Commission. 2017. Commission Regulation (EU) 2017/ 893 - of 24 May 2017 - amending Annexes I and IV to Regulation (EC) No 999 / 2001 of the European Parliament and of the Council and Annexes X, XIV and XV to Commission Regulation (EU) No 142 / 2011 as regards the provision. Official Journal of the European Union **60**:92–116. Available from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0893&rid=1>.
- 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>.
- Feng P, Weagant SD, Grant MA, Burkhardt W. 2020. BAM Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria | FDA. FDA BAM Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria:1–18. Available from <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria%0Ahttps://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria#conventional>.
- Fernandez-Cassi X, Supeanu A, Jansson A, Boqvist S, Vagsholm I. 2018. Novel foods: A risk profile for the house cricket (*acheta domesticus*). *EFSA Journal* **16**:1–15.
- Galecki R, Sokol R. 2019. A parasitological evaluation of edible insects and their role in the transmission of parasitic diseases to humans and animals. *PLoS ONE* **14**:1–19.
- Garofalo C, Milanović V, Cardinali F, Aquilanti L, Clementi F, Osimani A. 2019. Current knowledge on the microbiota of edible insects intended for human consumption: A state-of-the-art review. *Food Research International* **125**:108527. Elsevier. Available from <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108527>.
- Garofalo C, Osimani A, Milanović V, Taccari M, Cardinali F, Aquilanti L, Riolo P, Ruschioni S, Isidoro N, Clementi F. 2017. The microbiota of marketed processed edible insects as revealed by high-throughput sequencing. *Food Microbiology* **62**:15–22.
- Grabowski NT, Klein G. 2017a. 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.
- Grabowski NT, Klein G. 2017b. 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. 2017c. Microbiological analysis of raw edible insects. *Journal of Insects as Food and Feed* **3**:7–14.
- Henry M, Gasco L, Piccolo G, Fountoulaki E. 2015. Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. *Animal Feed Science and Technology* **203**:1–22. Elsevier B.V. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.03.001>.
- Huong TT, Kopel P. 2014. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS:64–66.
- Kinyuru JN, Mogendi JB, Riwa CA, Ndung'u NW. 2015. Edible insects-A novel source of essential nutrients for human diet: Learning from traditional knowledge. *Animal Frontiers* **5**:14–19.
- Klunder HC, Wolkers-Rooijackers J, Korpela JM, Nout MJR. 2012. Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control* **26**:628–631. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.013>.
- Kooh P, Jury V, Laurent S, Audiat-Perrin F, Sanaa M, Tesson V, Federighi M, Boué G. 2020. Control of biological hazards in insect processing: Application of HACCP method for yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) powders. *Foods* **9**.
- Leni G, Cirlini M, Jacobs J, Depraetere S, Gianotten N, Sforza S, Dall'Asta C. 2019. Impact of naturally contaminated substrates on alphitobius diaperinus and hermetia illucens: Uptake and excretion of mycotoxins. *Toxins* **11**.
- Liu YE, Luo XJ, Liu Y, Zeng YH, Mai BX. 2021. Bioaccumulation of legacy and emerging organophosphorus flame retardants and plasticizers in insects during metamorphosis. *Journal of Hazardous Materials* **406**:124688. Elsevier B.V. Available from <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124688>.
- Lumanlan JC, Williams M, Jayasena V. 2022. Edible insects: environmentally friendly sustainable future food source. *International Journal of Food Science and Technology* **57**:6317–6325.
- Mancini S, Paci G, Ciardelli V, Turchi B, Pedonese F, Fratini F. 2019. *Listeria monocytogenes* contamination of *Tenebrio molitor* larvae rearing substrate: Preliminary evaluations. *Food Microbiology* **83**:104–108. Elsevier Ltd. Available from <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.006>.
- Mason JB et al. 2018. Fostering strategies to expand the consumption of edible insects: The value of a Tripartite coalition between academia, industry, and government. *Current Developments in Nutrition* **2**:1–5.
- Messina CM, Gaglio R, Morghese M, Tolone M, Arena R, Moschetti G, Santulli A, Francesca N, Settanni L. 2019. Microbiological profile and bioactive properties of insect powders used in food and feed formulations. *Foods* **8**:1–16.
- Meyer AM, Meijer N, van den Hil EFH, van der Fels-Klerx HJ. 2021. Chemical food safety hazards of insects reared for food and feed. *Journal of Insects as Food and Feed* **7**:823–831.
- Niermans K, Woyzichovski J, Kröncke N, Benning R, Maul R. 2019. Feeding study for the mycotoxin zearalenone in yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae—investigation of

- biological impact and metabolic conversion. *Mycotoxin Research* **35**:231–242. *Mycotoxin Research*.
- Nowakowski AC, Miller AC, Miller ME, Xiao H, Wu X. 2020. Potential health benefits of edible insects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **0**:1–10. Taylor & Francis. Available from <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1867053>.
- Nyangena DN, Mutungi C, Imathiu S, Kinyuru J, Affognon H, Ekesi S, Nakimbugwe D, Fiaboe KKM. 2020. Effects of Traditional Processing Techniques on the Nutritional and Microbiological Quality of Four East Africa. *Foods* **9**:574.
- Oonincx DGAB, van Itterbeeck J, Heetkamp MJW, van den Brand H, van Loon JJA, van Huis A. 2010. An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *PLoS ONE* **5**:1–7.
- 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.
- Osimani A, Cardinali F, Aquilanti L, Garofalo C, Roncolini A, Milanović V, Pasquini M, Tavoletti S, Clementi F. 2017. Occurrence of transferable antibiotic resistances in commercialized ready-to-eat mealworms (*Tenebrio molitor* L.). *International Journal of Food Microbiology* **263**:38–46.
- 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.
- Poma G, Cuykx M, Amato E, Calaprice C, Focant JF, Covaci A. 2017. Evaluation of hazardous chemicals in edible insects and insect-based food intended for human consumption. *Food and Chemical Toxicology* **100**:70–79. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.006>.
- Raheem D, Raposo A, Oluwole OB, Nieuwland M, Saraiva A, Carrascosa C. 2019. Entomophagy: Nutritional, ecological, safety and legislation aspects. *Food Research International* **126**:108672. Elsevier. Available from <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108672>.
- Raksakantong P, Meeso N, Kubola J, Siriamornpun S. 2010. Fatty acids and proximate composition of eight Thai edible terricolous insects. *Food Research International* **43**:350–355. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.014>.
- Raubenheimer D, Rothman JM. 2013. Nutritional ecology of entomophagy in humans and other primates. *Annual Review of Entomology* **58**:141–160.
- Rawat N, Anjali, Shreyata, Sabu B, Jamwal R, Devi PP, Yadav K, Raina HS, Rajagopal R. 2023. Understanding the role of insects in the acquisition and transmission of antibiotic resistance. *Science of the Total Environment* **858**:159805. Elsevier B.V. Available from <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159805>.
- Ribeiro JC, Sousa-Pinto B, Fonseca J, Fonseca SC, Cunha LM. 2021. Edible insects and food safety: allergy. *Journal of Insects as Food and Feed* **7**:833–847.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry : an



- emerging technology for microbial identification and diagnosis **6**:1–16.
- Solomon HM, Timothy Lilly J. 2001. BAM Chapter 17: Clostridium botulinum | FDA. Food Drug Administration:1–27. Available from <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-17-clostridium-botulinum>.
- 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. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.010>.
- Stull VJ, Finer E, Bergmans RS, Febvre HP, Longhurst C, Manter DK, Patz JA, Weir TL. 2018. Impact of Edible Cricket Consumption on Gut Microbiota in Healthy Adults, a Double-blind, Randomized Crossover Trial. *Scientific Reports* **8**:1–13. Springer US. Available from <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-29032-2>.
- Tallent S, Hait J, Bennett RW, Lancette GA. 2019. BAM Chapter 12: Staphylococcus aureus | FDA:1–6. Available from <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus>.
- Tallent SM, Knolhoff A, Rhodehamel EJ, Harmon SM, Bennett RW. 2021. BAM Chapter 14: Bacillus cereus. *Fda Bam*:1–15. Available from <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-14-bacillus-cereus>.
- Tiencheu B, Womeni HM, Linder M, Mbiapo FT, Villeneuve P, Fanni J, Parmentier M. 2013. Changes of lipids in insect (*Rhynchophorus phoenicis*) during cooking and storage. *European Journal of Lipid Science and Technology* **115**:186–195.
- Tome D, Miller GD. 2000. Criteria and significance of dietary protein sources in humans: Preface. *Journal of Nutrition* **130**:1865–1867.
- Turck D et al. 2021a. Safety of frozen and dried formulations from whole yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* **19**.
- Turck D et al. 2021b. Safety of frozen and dried formulations from whole house crickets (*Acheta domesticus*) as a Novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* **19**.
- Vaidyanathan S, Winder CL, Wade SC, Kell DB. 2002. Sample preparation in matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry of whole bacterial cells and the detection of high mass ( > 20 kDa ) proteins:1276–1286.
- Vandeweyer D, De Smet J, Van Looveren N, Van Campenhout L. 2021. Biological contaminants in insects as food and feed. *Journal of Insects as Food and Feed*:1–16.
- Vandeweyer D, Lenaerts S, Callens A, Van Campenhout L. 2017. Effect of blanching followed by refrigerated storage or industrial microwave drying on the microbial load of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Food Control* **71**:311–314. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.011>.
- 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**.

- Vangsoe MT, Joergensen MS, Heckmann LHL, Hansen M. 2018. Effects of insect protein supplementation during resistance training on changes in muscle mass and strength in young men. *Nutrients* **10**.
- 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 and Emerging Technologies* **42**:8–15. Elsevier. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2017.06.004>.
- Wynants E, Froninckx L, Van Miert S, Geeraerd A, Claes J, Van Campenhout L. 2019. Risks related to the presence of *Salmonella* sp. during rearing of mealworms (*Tenebrio molitor*) for food or feed: Survival in the substrate and transmission to the larvae. *Food Control* **100**:227–234. Elsevier. Available from <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.01.026>.
- Yoo J, Hwang JS, Goo TW, Yun EY. 2013. Comparative analysis of nutritional and harmful components in Korean and Chinese mealworms (*Tenebrio molitor*). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* **42**:249–254.
- Zielińska E, Baraniak B, Karaś M. 2017. Antioxidant and anti-inflammatory activities of hydrolysates and peptide fractions obtained by enzymatic hydrolysis of selected heat-treated edible insects. *Nutrients* **9**:1–14.
- Zielińska E, Karaś M, Jakubczyk A, Zieliński D, Baraniak B. 2019. Edible Insects as Source of Proteins. Page Reference Series in Phytochemistry.

## 9 Seznam tabulek a grafů

<b>Tabulka č. 1:</b> Přibližné procentuální složení živin ve vybraných druzích jedlého hmyzu .....	13
<b>Tabulka č. 2:</b> Obsah vybraných aminokyselin (g / 16 g dusíku) v larvách <i>Tenebrio molitor</i> ....	13
<b>Tabulka č. 3:</b> Procentuální zastoupení vybraných mastných kyselin oproti celkovému obsahu mastných kyselin ve dvou druzích jedlého hmyzu .....	14
<b>Tabulka č. 4:</b> Kultivační médium, čas, metoda a podmínky kultivace.....	27
<b>Tabulka č. 5:</b> Třídy spolehlivosti v MALDI Biotyper .....	32
<b>Tabulka č. 6:</b> Stanovený počet mikroorganismů po ukončení kultivace v larvách potměníka moučného uvedený v log KTJ/g.. .....	33
<b>Tabulka č. 7:</b> Stanovený počet mikroorganismů po ukončení kultivace ve vzorcích cvrčka domácího uvedený v log KTJ/g. ....	34
<b>Tabulka č. 8:</b> Bakteriální druhy a jejich identifikační skóre, stanoveno pomocí MALDI-TOF, hmotnostní spektrometrie .....	36
<b>Tabulka č. 9:</b> Naměřené hodnoty vzorku <i>Tenebrio molitor</i> spařené (log KTJ/g).....	I
<b>Tabulka č. 10:</b> Naměřené hodnoty vzorku <i>Tenebrio molitor</i> spařené a mikrovlnně ošetřené (log KTJ/g) .....	I
<b>Tabulka č. 11:</b> Naměřené hodnoty vzorku <i>Tenebrio molitor</i> zmražené (log KTJ/g) .....	II
<b>Tabulka č. 12:</b> Naměřené hodnoty vzorku <i>Tenebrio molitor</i> zmražené a mikrovlnně ošetřené (log KTJ/g) .....	II
<b>Tabulka č. 13:</b> Naměřené hodnoty vzorku <i>Acheta domesticus</i> spařené (log KTJ/g) .....	III
<b>Tabulka č. 14:</b> Naměřené hodnoty vzorku <i>Acheta domesticus</i> spařené a mikrovlnně ošetřené (log KTJ/g) .....	III
<b>Tabulka č. 15:</b> Naměřené hodnoty vzorku <i>Acheta domesticus</i> zmražené (log KTJ/g) .....	IV
<b>Tabulka č. 16:</b> Naměřené hodnoty vzorku <i>Acheta domesticus</i> zmražené a mikrovlnně ošetřené (log KTJ/g) .....	IV



## 10 Samostatné přílohy

**Tabulka č. 9:** Naměřené hodnoty vzorku *Tenebrio molitor* spařené (log KTJ/g)

Stanovovaný parametr	1. opakování	2. opakování	3. opakování	Průměr	Směrodatná odchylka
<i>Bacillus cereus</i>	1,48	1,52	1,5	1,5	0,02
<i>Enterobacteriaceae</i>	4,75	4,74	4,75	4,75	0,005774
<i>Escherichia coli</i>	<10	<10	<10	<10	-
Koaguláza pozitivní stafylokoky	<10	<10	<10	<10	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	-
Koliformní bakterie	4,78	4,76	4,77	4,77	0,01
Mezofilní aerobní	6,81	6,8	6,81	6,81	0,005774
Aerobní sporulující	3,58	3,56	3,57	3,57	0,01
<i>Clostridium spp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Salmonella spp.</i>	0/25 g	0/25 g	0/25 g	-	-

**Tabulka č. 10:** Naměřené hodnoty vzorku *Tenebrio molitor* spařené a mikrovlnně ošetřené (log KTJ/g)

Stanovovaný parametr	1. opakování	2. opakování	3. opakování	Průměr	Směrodatná odchylka
<i>Bacillus cereus</i>	detekováno	detekováno	detekováno	-	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	<10	<10	<10	<10	-
<i>Escherichia coli</i>	<10	<10	<10	<10	-
Koaguláza pozitivní stafylokoky	<10	<10	<10	<10	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	-
Koliformní bakterie	<10	<10	<10	<10	-
Mezofilní aerobní	5,75	5,74	5,75	5,75	0,005774
Aerobní sporulující	3,59	3,56	3,57	3,57	0,015275
<i>Clostridium spp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Salmonella spp.</i>	0/25 g	0/25 g	0/25 g	-	-

**Tabulka č. 11:** Naměřené hodnoty vzorku *Tenebrio molitor* zmražené (log KTJ/g)

Stanovovaný parametr	1. opakování	2. opakování	3. opakování	Průměr	Směrodatná odchylka
<i>Bacillus cereus</i>	detekováno	detekováno	detekováno	-	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	5,85	5,84	5,85	5,85	0,005774
<i>Escherichia coli</i>	<10	<10	<10	<10	-
Koaguláza pozitivní stafylokoky	1,47	1,39	1,44	1,43	0,040415
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	-
Koliformní bakterie	4,81	4,8	4,8	4,8	0,005774
Mezofilní aerobní	7,91	7,89	7,9	7,9	0,01
Aerobní sporulující	5,8	5,79	5,79	5,79	0,005774
<i>Clostridium</i> spp.	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	0/25 g	0/25 g	0/25 g	-	-

**Tabulka č. 12:** Naměřené hodnoty vzorku *Tenebrio molitor* zmražené a mikrovlnné ošetřené (log KTJ/g)

Stanovovaný parametr	1. opakování	2. opakování	3. opakování	Průměr	Směrodatná odchylka
<i>Bacillus cereus</i>	detekováno	detekováno	detekováno	-	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,3	1,3	1,3	1,3	0
<i>Escherichia coli</i>	<10	<10	<10	<10	-
Koaguláza pozitivní stafylokoky	<10	<10	<10	<10	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	-
Koliformní bakterie	1,3	1,36	1,33	1,33	0,03
Mezofilní aerobní	5,72	5,71	5,71	5,71	0,005774
Aerobní sporulující	3,49	3,54	3,52	3,51	0,025166
<i>Clostridium</i> spp.	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	0/25 g	0/25 g	0/25 g	-	-

**Tabulka č. 13:** Naměřené hodnoty vzorku *Acheta domestica* spařené (log KTJ/g)

Stanovovaný parametr	1. opakování	2. opakování	3. opakování	Průměr	Směrodatná odchylka
<i>Bacillus cereus</i>	detekováno	detekováno	detekováno	-	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,49	1,46	1,48	1,48	0,015275
<i>Escherichia coli</i>	<10	<10	<10	<10	-
Koaguláza pozitivní stafylokoky	1,6	1,58	1,59	1,59	0,01
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	-
Koliformní bakterie	3,6	3,58	3,59	3,59	0,01
Mezofilní aerobní	5,77	5,75	5,76	5,76	0,01
Aerobní sporulující	4,62	4,59	4,61	4,61	0,015275
<i>Clostridium</i> spp.	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	0/25 g	0/25 g	0/25 g	-	-

**Tabulka č. 14:** Naměřené hodnoty vzorku *Acheta domestica* spařené a mikrovlnně ošetřené (log KTJ/g)

Stanovovaný parametr	1. opakování	2. opakování	3. opakování	Průměr	Směrodatná odchylka
<i>Bacillus cereus</i>	detekováno	detekováno	detekováno	-	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	<10	<10	<10	<10	-
<i>Escherichia coli</i>	<10	<10	<10	<10	-
Koaguláza pozitivní stafylokoky	<10	<10	<10	<10	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	-
Koliformní bakterie	<10	<10	<10	<10	-
Mezofilní aerobní	5,74	5,72	5,73	5,73	0,01
Aerobní sporulující	3,56	3,51	3,54	3,53	0,025166
<i>Clostridium</i> spp.	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	0/25 g	0/25 g	0/25 g	-	-

**Tabulka č. 15:** Naměřené hodnoty vzorku *Acheta domesticus* zmražené (log KTJ/g)

Stanovovaný parametr	1. opakování	2. opakování	3. opakování	Průměr	Směrodatná odchylka
<i>Bacillus cereus</i>	3,65	3,6	3,63	3,63	0,025166
<i>Enterobacteriaceae</i>	4,72	4,7	4,71	4,71	0,01
<i>Escherichia coli</i>	<10	<10	<10	<10	-
Koaguláza pozitivní stafylokoky	1,36	1,3	1,33	1,33	0,03
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	-
Koliformní bakterie	5,85	5,83	5,84	5,84	0,01
Mezofilní aerobní	7,91	7,9	7,9	7,9	0,005774
Aerobní sporulující	5,73	5,7	5,72	5,72	0,01528
<i>Clostridium</i> spp.	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	detekováno	detekováno	-	-	-

**Tabulka č. 16:** Naměřené hodnoty vzorku *Acheta domesticus* zmražené a mikrovlnně ošetřené (log KTJ/g)

Stanovovaný parametr	1. opakování	2. opakování	3. opakování	Průměr	Směrodatná odchylka
<i>Bacillus cereus</i>	detekováno	detekováno	detekováno	-	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,36	1,3	1,33	1,33	0,03
<i>Escherichia coli</i>	<10	<10	<10	<10	-
Koaguláza pozitivní stafylokoky	<10	<10	<10	<10	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	-
Koliformní bakterie	<10	<10	<10	<10	<10
Mezofilní aerobní	5,74	5,73	5,73	5,73	0,005774
Aerobní sporulující	3,59	3,57	3,58	3,58	0,01
<i>Clostridium</i> spp.	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	0/25 g	0/25 g	0/25 g	-	-