

UNIVERZA V LJUBLJANI  
VETERINARSKA FAKULTETA

**VPLIV RAZLIČNIH SUBSTRATOV NA RAST,  
HRANILNO VREDNOST IN MIKROBIOLOŠKO  
SLIKO LIČINK ČRNE VOJAŠKE MUHE (*Hermetia  
illucens*)**

**INFLUENCE OF DIFFERENT GROWING  
SUBSTRATES ON GROWTH, NUTRIENT AND  
MICROBIAL COMPOSITION OF BLACK SOLDIER  
FLY LARVAE (*Hermetia illucens*)**

Zoja Verlič

Ljubljana, 2021



UNIVERZA V LJUBLJANI  
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK: 591.53:591.342:595.772:641.1:57.083:543(043.2)

**VPLIV RAZLIČNIH SUBSTRATOV NA RAST, HRANILNO  
VREDNOST IN MIKROBIOLOŠKO SLIKO LIČINK ČRNE  
VOJAŠKE MUHE (*Hermetia illucens*)**

**INFLUENCE OF DIFFERENT GROWING SUBSTRATES ON  
GROWTH, NUTRIENT AND MICROBIAL COMPOSITION  
OF BLACK SOLDIER FLY LARVAE (*Hermetia illucens*)**

Zoja Verlič

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom, pod mentorstvom izr. prof. dr. Brede Jakovac Strajn in somentorstvom doc. dr. Urške Jaminkar Ciglencečki na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje.

Ljubljana, 2021

## IZVLEČEK

**Ključne besede:** Prehrana živali; krma; hranilna vrednost; ličinke – kemija – mikrobiologija; rast in razvoj – fiziologija; analitična kemija; Simuliidae.

V prihodnosti bi črna vojaška (bojevniška) muha ali *Hermetia illucens* lahko pomenila nov vir beljakovin v prehrani ljudi in živali, zato smo v naši raziskavi ličinke *H. illucens* 34 dni gojili v naravnih klimatskih razmerah (temperatura zraka je bila  $23,4 \pm 3,8$  °C in relativna vlažnost  $82,9 \pm 11,4$  %) na treh različnih substratih: gospodinjskih odpadkih (GO), pivskih tropinah (PT) in pšeničnih otrobih (PO). Vzorce ličink in substrata smo analizirali na surove beljakovine (SB), surove maščobe (SM), vlago, pepel in surovo vlaknino, vsebnost 14 elementov in maščobnih kislin. 20. dan poskusa smo v substrate pričeli dodajati kalcij (Ca). Ličinke na PO so rastle izredno slabo in dosegle maso  $0,036 \pm 0,010$  g, ličinke na GO in PT pa  $0,271 \pm 0,031$  g in  $0,147 \pm 0,041$  g. Vsebnost SB v ličinkah je bila od 41 % (GO) do 52,5 % (PO) v suhi snovi (SS), vsebnost SM pa je bila največja v ličinkah, gojenih na GO (36,68 %). Vsebnost Ca se je po dodatku povečala na skoraj 8 % v ličinkah, gojenih na PO in PT. Največ lavrinske kisline je bilo v ličinkah, gojenih na PT (51,94 % v SM). Vzorci so bili negativni na *Salmonella* spp., vsebovali pa so enterobakterije. *E. coli* smo pri zadnjem vzorčenju potrdili v vseh vzorcih.

## ABSTRACT

**Key words:** Animal nutrition; animal feed; nutritive value; larva – chemistry – microbiology; growth and development – physiology; chemistry analytic; Simuliidae.

Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) is a promising new protein source for food and feed. In our research, we reared *H. illucens* larvae for 34 days in a natural environment (air temperature  $23.4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3.8\text{ }^{\circ}\text{C}$  and relative humidity  $82.9\text{ \%} \pm 11.4\text{ \%}$ ) on three different organic substrates: kitchen waste (KW), brewers' grains (SG) and wheat bran (WB). We analyzed the substrates and larvae samples for their nutritional value, specifically crude protein, crude fats, crude ash, crude fibre, moisture content, mineral composition (14 different elements) and a fatty acid profile. Furthermore, we added calcium to the substrates on the 20th day of the experiment. Larvae reared on CF grew slowly, gaining  $0.036\text{ g} \pm 0.010\text{ g}$ , whereas larvae reared on SG and KW gained  $0.147\text{ g} \pm 0.041\text{ g}$  and  $0.271\text{ g} \pm 0.031\text{ g}$ , respectively. Protein content in larvae varied between 41 (KW) and 52,5 (WB) % DM, but crude fats were highest in larvae reared on KW (36,7%). After addition, Ca content increased to 8 % in larvae reared on SG and WB. Lauric acid was highest in larvae reared on CF (51,9 % DM). All samples were negative for *Salmonella* spp. but not for *Enterobacteriaceae* and *E.coli*.

## KAZALO VSEBINE

|          |                                                                                             |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>UVOD .....</b>                                                                           | <b>13</b> |
| 1.1      | ŽUŽELKE V PREHRANI LJUDI IN ŽIVALI .....                                                    | 14        |
| 1.1.1    | Izzivi v industrializaciji vzreje žuželk.....                                               | 16        |
| 1.2      | ČRNA BOJEVNIŠKA (VOJAŠKA) MUHA ( <i>HERMETIA ILLUCENS</i> ) KOT NOV VIR<br>BELJAKOVIN ..... | 18        |
| 1.2.1    | Opis in življenjski cikel.....                                                              | 18        |
| 1.2.2    | Zgradba in gastrointestinalni trakt <i>H. illucens</i> .....                                | 20        |
| 1.2.3    | Hranilna vrednost <i>H. illucens</i> .....                                                  | 23        |
| 1.2.4    | Uporaba <i>H. illucens</i> pri kompostiranju .....                                          | 27        |
| 1.2.5    | Način reje <i>H. illucens</i> .....                                                         | 29        |
| 1.3      | VARNOST UPORABE LIČINK <i>H. ILLUCENS</i> .....                                             | 30        |
| 1.3.1    | Mikrobiološka tveganja.....                                                                 | 30        |
| 1.3.2    | Kemijska tveganja .....                                                                     | 32        |
| 1.4      | ZAKONODAJA.....                                                                             | 34        |
| 1.5      | UPORABA LIČINK <i>H. ILLUCENS</i> V PREHRANI ŽIVALI.....                                    | 37        |
| <b>2</b> | <b>NAMEN DELA IN HIPOTEZE .....</b>                                                         | <b>40</b> |
| <b>3</b> | <b>MATERIALI IN METODE .....</b>                                                            | <b>41</b> |
| 3.1      | MATERIALI.....                                                                              | 41        |
| 3.1.1    | Substrati za gojenje ličink <i>H. illucens</i> .....                                        | 41        |
| 3.1.2    | Ličinke <i>H. illucens</i> .....                                                            | 41        |
| 3.2      | METODE .....                                                                                | 45        |
| 3.2.1    | Vzorčenje ličink in substrata .....                                                         | 45        |
| 3.2.2    | Merjenje fizikalnih parametrov ličink <i>H. illucens</i> .....                              | 47        |
| 3.2.3    | Kemijske analize .....                                                                      | 47        |
| 3.2.4    | Mikrobiološke analize .....                                                                 | 52        |
| 3.2.5    | Statistična analiza.....                                                                    | 54        |
| <b>4</b> | <b>REZULTATI .....</b>                                                                      | <b>55</b> |
| 4.1      | METEOROLOŠKI PODATKI MED POSKUSOM .....                                                     | 55        |
| 4.2      | REZULTATI FIZIKALNIH PARAMETROV .....                                                       | 55        |
| 4.3      | REZULTATI KEMIJSKIH ANALIZ SUBSTRATOV IN LIČINK.....                                        | 57        |
| 4.3.1    | Hranilne snovi v substratih, določenih za gojenje <i>H. illucens</i> .....                  | 57        |
| 4.3.2    | Vsebnost vlage v ličinkah in substratih.....                                                | 59        |
| 4.3.3    | Vsebnosti hranilnih snovi v ličinkah, gojenih na gospodinjskih odpadkih.....                | 59        |
| 4.3.4    | Vsebnosti hranilnih snovi v ličinkah, gojenih na pivskih tropinah .....                     | 63        |
| 4.3.5    | Vsebnosti hranilnih snovi v ličinkah, gojenih na pšeničnih otrobih .....                    | 67        |
| 4.4      | RAZLIKE MED PREISKOVANIMI PARAMETRI.....                                                    | 71        |

|       |                                                                           |     |
|-------|---------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.5   | KORELACIJE MED PARAMETRI V SUBSTRATU IN LIČINKAH <i>H. ILLUCENS</i>       | 73  |
| 4.6   | REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH PREISKAV .....                                   | 74  |
| 4.6.1 | Preiskava na <i>Salmonella</i> spp. ....                                  | 74  |
| 4.6.2 | Ugotavljanje števila enterobakterij.....                                  | 74  |
| 4.6.3 | Preiskava na število bakterij <i>E. coli</i> .....                        | 75  |
| 5     | RAZPRAVA .....                                                            | 77  |
| 6     | SKLEPI .....                                                              | 88  |
| 7     | POVZETEK.....                                                             | 89  |
| 8     | SUMMARY.....                                                              | 94  |
| 9     | ZAHVALE .....                                                             | 98  |
| 10    | LITERATURA .....                                                          | 99  |
| 11    | PRILOGE .....                                                             | 105 |
| 11.1  | REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH ANALIZ SUBSTRATA: PŠENIČNI OTROBI.....           | 115 |
| 11.2  | REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH ANALIZ LIČINK, GOJENIH NA PŠENIČNIH OTROBIH..... | 115 |
| 11.3  | REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH ANALIZ SUBSTRATA: GOSPODINJSKI ODPADKI .....     | 116 |
| 11.4  | REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH ANALIZ LIČINK, GOJENIH NA GOSPODINJSKIH ODPADKIH | 116 |
| 11.5  | REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH ANALIZ SUBSTRATA: PIVSKE TROPINE .....           | 117 |
| 11.6  | REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH ANALIZ LIČINK, GOJENIH NA PIVSKIH TROPINAH.....  | 117 |

## KAZALO TABEL

|                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Podatki iz literature o vsebnosti hranilnih snovi v ličinkah (v fazi prepupe) <i>H. illucens</i> .....                                                   | 25 |
| Tabela 2: Urnik hranjenja z dodanimi količinami substrata (g).....                                                                                                 | 44 |
| Tabela 3: Hranilna sestava substratov v % na SS .....                                                                                                              | 58 |
| Tabela 4: Prikaz statistično značilnih razlik v fizikalnih lastnostih in kemijskih analizah ličink <i>H. illucens</i> , gojenih na treh različnih substratih ..... | 72 |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1: Vpliv proizvodnje beljakovin na okolje .....                                                                                                      | 15 |
| Slika 2: Poraba krme pri različnih rejnih živalih.....                                                                                                     | 15 |
| Slika 3: Izkoristljivost žuželk in drugih rejnih živali v prehrani .....                                                                                   | 16 |
| Slika 4: Življenjski cikel <i>H. illucens</i> .....                                                                                                        | 19 |
| Slika 5: Osnovna anatomija odrasle <i>H. illucens</i> .....                                                                                                | 20 |
| Slika 6: Delitev črevesja <i>H. illucens</i> .....                                                                                                         | 22 |
| Slika 7: Metabolizem molekul v črevesju <i>H. illucens</i> .....                                                                                           | 22 |
| Slika 8: Primerjava vsebnosti beljakovin v žuželah (moka čričkov) in drugih živalskih virih hrane .....                                                    | 24 |
| Slika 9: Primerjava vsebnosti beljakovin, železa in kalcija med 100 g žuželk in drugih rejnih živali (perutnina, govedo in prašiči).....                   | 24 |
| Slika 10: Primerjava proizvodnje toplogrednih plinov (A), porabe energije (B) in porabe prostora (C) med mokaži in ostalimi pogostimi viri beljakovin..... | 27 |
| Slika 11: Povprečna količina toplogrednih plinov, ki nastanejo pri proizvodnji 1 kg različnih virov beljakovin.....                                        | 28 |
| Slika 12: Steklena posoda po zaključenem obdobju inkubacije .....                                                                                          | 42 |
| Slika 13: Začetna kolonija v substratu na začetku reje, v plastični posodi .....                                                                           | 42 |
| Slika 14: Ličinke <i>H. illucens</i> po osmih dneh reje .....                                                                                              | 44 |
| Slika 15: Ličinke <i>H. illucens</i> na zadnji dan eksperimenta .....                                                                                      | 45 |
| Slika 16: Shema poskusa (PO – pšenični otrobi; GO – gospodinjski odpadki; PT – pivske tropine) s časovnico odvzema vzorcev.....                            | 46 |
| Slika 17: Meteorološki podatki med poskusom .....                                                                                                          | 55 |
| Slika 18: Izmerjena masa ličink <i>H. illucens</i> (g) v poskusu (PO – pšenični otrobi, GO – gospodinjski odpadki, PT – pivske tropine).....               | 56 |
| Slika 19: Izmerjena dolžina ličink <i>H. illucens</i> (mm) v poskusu (PO – pšenični otrobi, GO – gospodinjski odpadki, PT – pivske tropine).....           | 56 |
| Slika 20: Izmerjena širina ličink <i>H. illucens</i> (mm) v poskusu (PO – pšenični otrobi, GO – gospodinjski odpadki, PT – pivske tropine).....            | 57 |
| Slika 21: Vsebnost vlage v substratih in ličinkah <i>H. illucens</i> (PO – pšenični otrobi, GO – gospodinjski odpadki, PT – pivske tropine).....           | 59 |

|                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 22: Vsebnost surovih beljakovin (SB), surovih maščob (SM), surovih vlaknin (SV) in pepela v ličinkah <i>H. illucens</i> , gojenih na gospodinjskih odpadkih, (% na SS). Dodatna rdeča črta prikazuje delež pepela po dodatku Ca..... | 60 |
| Slika 23: Vsebnost makroelementov (Ca, P, Na, K in Mg) v ličinkah <i>H. illucens</i> , gojenih na gospodinjskih odpadkih, (% na SS). Zgornja rdeča črta prikazuje vrednosti po dodajanju Ca v substrat. ....                               | 61 |
| Slika 24: Vsebnost Co, Fe, Mn in Se v ličinkah, gojenih na gospodinjskih odpadkih, (% na SS) .....                                                                                                                                         | 61 |
| Slika 25: Vsebnost As, Cd, Cu, Pb in Zn v ličinkah <i>H. illucens</i> , gojenih na gospodinjskih odpadkih, (% na SS).....                                                                                                                  | 62 |
| Slika 26: Vsebnost omega 3 in omega 6 maščobnih kislin ter lavrinske kisline v ličinkah <i>H. illucens</i> , gojenih na gospodinjskih odpadkih, (% v SM).....                                                                              | 63 |
| Slika 27: Vsebnost surovih beljakovin (SB), surovih maščob (SM), surovih vlaknin (SV) in pepela v ličinkah <i>H. illucens</i> , gojenih na pivskih tropinah, (% na SS). Dodatna rdeča črta prikazuje delež pepela po dodatku Ca.....       | 64 |
| Slika 28: Vsebnost makroelementov (Ca, P, Na, K in Mg) v ličinkah <i>H. illucens</i> , gojenih na pivskih tropinah, (% na SS). Zgornja rdeča črta prikazuje vrednosti pri dodajanju Ca v substrat. ....                                    | 65 |
| Slika 29: Vsebnost Co, Fe, Mn in Se v ličinkah <i>H. illucens</i> , gojenih na pivskih tropinah, (% na SS).....                                                                                                                            | 65 |
| Slika 30: Vsebnost As, Cd, Cu, Pb in Zn v ličinkah <i>H. illucens</i> , gojenih na pivskih tropinah, (% na SS). ....                                                                                                                       | 66 |
| Slika 31: Vsebnost omega 3 in omega 6 maščobnih kislin ter lavrinske kisline v ličinkah <i>H. illucens</i> , gojenih na pivskih tropinah, (% v SM).....                                                                                    | 67 |
| Slika 32: Vsebnost surovih beljakovin (SB), surovih maščob (SM), surovih vlaknin (SV) in pepela v ličinkah <i>H. illucens</i> , gojenih na pšeničnih otrobih, (% na SS). Dodatna rdeča črta prikazuje vsebnost pepela po dodatku Ca. ....  | 68 |
| Slika 33: Vsebnost makroelementov (Ca, P, Na, K in Mg) v ličinkah <i>H. illucens</i> , gojenih na pšeničnih otrobih, (% na SS). Zgornja rdeča črta prikazuje vrednosti po dodajanju Ca v substrat. ....                                    | 69 |
| Slika 34: Vsebnost Co, Fe, Mn in Se v ličinkah <i>H. illucens</i> , gojenih na pšeničnih otrobih, (% na SS). ....                                                                                                                          | 69 |

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 35: Vsebnost As, Cd, Cu, Pb in Zn v ličinkah <i>H. illucens</i> , gojenih na pšeničnih otrobih, (% na SS).....                                     | 70 |
| Slika 36: Vsebnost omega 3 in omega 6 maščobnih kislin ter lavrinske kisline v ličinkah <i>H. illucens</i> , gojenih na pšeničnih otrobih, (% v SM)..... | 71 |
| Slika 37: Razlika v vsebnosti Ca v ličinkah <i>H.illucens</i> po dodatku Ca (zeleno). ....                                                               | 73 |

## SEZNAM PRILOG

Priloga 1: Rezultati hranilne vrednosti ličink in substrata (Weendska analiza in analiza elementov)

Priloga 2: Izračuni korelacij

Priloga 3: Mikrobiološki rezultati

## OKRAJŠAVE

|                           |                                                                    |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>Al</b>                 | aluminij                                                           |
| <b>As</b>                 | arzen                                                              |
| <b>AMP</b>                | antimikrobni peptidi                                               |
| <b>B:OH</b>               | razmerje beljakovine:ogljikovi hidrati                             |
| <b>BPW</b>                | purferirana peptonska voda                                         |
| <b>BSF</b>                | Black soldier fly                                                  |
| <b>Ca</b>                 | kalcij                                                             |
| <b>CaCO<sub>3</sub></b>   | kalcijev karbonat                                                  |
| <b>CF</b>                 | chicken feed                                                       |
| <b>cfu</b>                | colony forming units                                               |
| <b>Cd</b>                 | kadmij                                                             |
| <b>Cr</b>                 | krom                                                               |
| <b>Cu</b>                 | baker                                                              |
| <b>C10:0</b>              | dekanojska kislina                                                 |
| <b>C12:0</b>              | lavrinska kislina                                                  |
| <b>C16:0</b>              | heksadekanojska kislina                                            |
| <b>C18:2n6c</b>           | oktadekanojska kislina                                             |
| <b>ČBM</b>                | Črna bojovniška (vojaška) muha                                     |
| <b>DM</b>                 | dry matter                                                         |
| <b>DNA</b>                | deoksiribonukleinska kislina                                       |
| <b>EFSA</b>               | Evropska agencija za varnost hrane; European Food Safety Authority |
| <b>EU</b>                 | Evropska Unija                                                     |
| <b><i>E. faecalis</i></b> | <i>Enterococcus faecalis</i>                                       |
| <b><i>E. coli</i></b>     | <i>Escherichia coli</i>                                            |
| <b>FA</b>                 | konverzijski faktor                                                |
| <b>FAO</b>                | Food and Agriculture Organization                                  |
| <b>Fe</b>                 | železo                                                             |
| <b>FID</b>                | plamensko ionizacijski detektor                                    |
| <b>GC</b>                 | plinska kromatografija                                             |
| <b>GO</b>                 | gospodinjski odpadki                                               |

|                                    |                                                            |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b><i>H. illucens</i></b>          | <i>Hermetia illucens</i>                                   |
| <b>HCl</b>                         | klorovodikova kislina                                      |
| <b>HNO<sub>3</sub></b>             | dušikova kislina                                           |
| <b>Hg</b>                          | živo srebro                                                |
| <b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> | žveplena kislina                                           |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>  | vodikov peroksid                                           |
| <b>ICP-MS</b>                      | metoda indukcijsko sklopljene plazme z masno detekcijo     |
| <b>IPIFF</b>                       | International Platform of Insects for Food and Feed        |
| <b>K</b>                           | kalij                                                      |
| <b>KOH</b>                         | kalijev hidroksid                                          |
| <b>KW</b>                          | kitchen waste                                              |
| <b>MALDI-TOF</b>                   | Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight |
| <b>Mg</b>                          | magnezij                                                   |
| <b>MK</b>                          | maščobna kislina                                           |
| <b>MKTTn</b>                       | Muller Kaufmann tetrationsatni bujon z novobiocinom        |
| <b>Mn</b>                          | mangan                                                     |
| <b>N</b>                           | dušik                                                      |
| <b>Na</b>                          | natrij                                                     |
| <b>Ni</b>                          | natrijev hidroksid                                         |
| <b>NaOH</b>                        | nikelj                                                     |
| <b>NMK</b>                         | nasičene maščobne kisline                                  |
| <b>OH</b>                          | ogljikovi hidrati                                          |
| <b>P</b>                           | fosfor                                                     |
| <b>PAH</b>                         | policiklični aromatski ogljikovodiki                       |
| <b>Pb</b>                          | svinec                                                     |
| <b>PCB</b>                         | poliklorirani bifenili                                     |
| <b>PO</b>                          | pšenični otrobi                                            |
| <b>PT</b>                          | pivske tropine                                             |
| <b>PVC</b>                         | polivinilklorid                                            |
| <b>PŽB</b>                         | predelane živalske beljakovine                             |
| <b>Rf</b>                          | faktor odzivnosti detektorja                               |
| <b>RVS</b>                         | bujon Rappaport-Vassiliadis s sojo                         |

|              |                                          |
|--------------|------------------------------------------|
| <b>S</b>     | žveplo                                   |
| <b>SB</b>    | surove beljakovine                       |
| <b>Se</b>    | selen                                    |
| <b>SG</b>    | brewer's spent grain                     |
| <b>SM</b>    | surove maščobe                           |
| <b>SP</b>    | surov pepel                              |
| <b>SV</b>    | surove vlaknine                          |
| <b>UNPD</b>  | United Nations Population Division       |
| <b>TBX</b>   | Tryptone Bile X-glucuronide              |
| <b>TSE</b>   | transmisivne spongiformne encefalopatije |
| <b>VNMK</b>  | večkrat nenasičene maščobne kisline      |
| <b>VRBGA</b> | vijolično rdeči žolčni agar z glukozo    |
| <b>WB</b>    | wheat bran                               |
| <b>Zn</b>    | cink                                     |
| <b>ŽSP</b>   | živalski stranski proizvodi              |
| <b>XLD</b>   | ksiloza lizin deoksiholatni agar         |
| <b>°C</b>    | stopinj Celzija                          |

## 1 UVOD

Po napovedih UNPD (United Nations Population Division) naj bi bilo do leta 2050 na Zemlji 9,7 milijarde prebivalcev, leta 2100 pa 11,2 milijarde (Schrögel in Wätjen, 2019). Za takšno število prebivalcev se bo morala današnja proizvodnja hrane podvojiti. Izziv, s katerim se ob tem srečujemo, je pomanjkanje prostora. Slednje spremlja tudi dejstvo, da intenziviranje današnjega načina kmetovanja ni ekološko oziroma trajnostno. Soočamo se s prevelikim ulovom rib, zato se oceani praznijo, globalno segrevanje ima že posledice na vsakdanje življenje (van Huis in sod., 2013). Pomanjkanje koruze, riža, pšenice in soje v prihodnosti je ocenjeno na približno 67 %, 42 %, 38 % in 55 %. Število podhranjenih prebivalcev se je v državah v razvoju povečalo za približno 805 milijonov, kar bi lahko povzročilo večje tveganje za izbruhe lokalnih, nacionalnih in globalnih bolezni (Liu in sod., 2017). Na svetu naj bi bila okoli 1 milijarda ljudi, ki so kronično podhranjeni, kar je dodaten razlog za spremembo načina prehranjevanja in pridelovanja hrane (van Huis in sod., 2013).

Ob podatkih o pomanjkanju hrane v prihodnosti pa ne moremo mimo dejstva, da velikih količin hrane ne uporabimo ali jih odvržemo. Že leta 2011 je Organizacija Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO; Food and Agriculture Organization) objavila podatke, da zavržemo na svetu približno 1,3 milijarde ton hrane. V nedavni raziskavi so ocenili, da se približno 24,8 % pridelane biomase porabi za človeško prehrano (Alexander in sod., 2017), preostalo pa za rejne živali in intenziviranje njihove prireje. Do leta 2050 naj bi potreba po virih beljakovin narasla za kar 75 %, kar pomeni, da je potrebno najti nove vire, poseči po ne živalskih beljakovinah ali še bolj intenzivirati rejo gospodarsko pomembnih živali. Ta trenutek se srečujemo še s paradoksom, da velika izbira hrane, ljudem na voljo, vodi v njihovo večjo izbirčnost in še dodatno zavračanje hrane. V prihodnosti se bo vsa ta izguba hranilnih snovi na ravni proizvodnje in potrošnikov začela odražati na zmogljivosti našega okolja, da se regenerira (Smet in sod., 2018).

Krma, ki je varna in primerne kakovosti, predstavlja prioriteto živinorejcem, proizvajalcem krme in pristojnim organom. Pri uporabi alternativnih, to je novih sestavin krme, razvoju novih izdelkov in inovativnih trendih hranjenja se vedno pojavijo pomisleki; še posebno, če govorimo o novih virih beljakovin, ki bi jih v prihodnosti pridobivali iz žuželk (Boccazzi in sod., 2017).

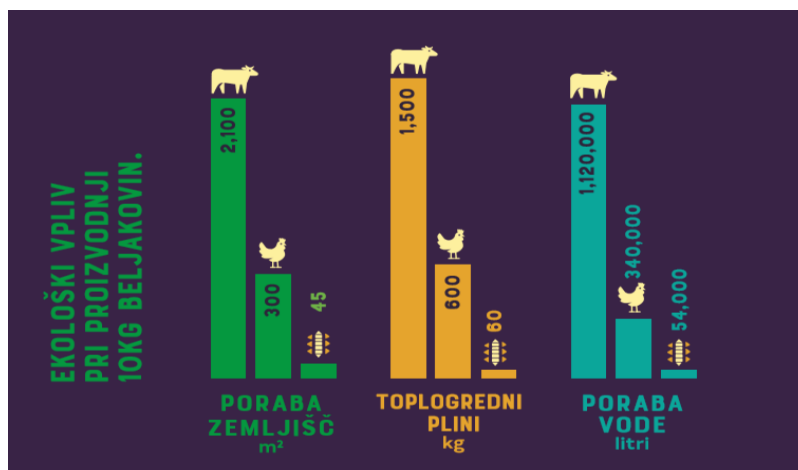
## 1.1 ŽUŽELKE V PREHRANI LJUDI IN ŽIVALI

Entomofagija je izraz, ki pomeni prehranjevanje z žuželkami (Wang in Shelomi, 2017). Žuželke se v prehrani ljudi uporabljajo že dolga leta, vendar jih nekatere družbe sprejemajo kot tabu. Približno dve milijardi ljudi ima žuželke v vsakodnevni prehrani, uporablja pa se najmanj 1900 različnih vrst (van Huis in sod., 2013).

Žuželke sodijo med artropode (členonožce), za katere je značilen hitinski eksoskelet, tro-delno telo (glava, toraks in abdomen), trije pari nog, sestavljene oči in dve anteni. So ene izmed najbolj raznolikih skupin živali na našem planetu. Opisanih je več kot milijon vrst, kar je tudi več kot polovica vseh opisanih živih organizmov. Najdemo jih v vseh habitatih, tudi v morjih. So hladnokrvne živali, ki se med razvojem preobrazijo (metamorfoza), kar jim poleg edinstvenega organskega sistema omogoča tudi prilagajanje na različne okoljske dejavnike. Njihova reprodukcija je hitra in ne zahteva starševske oskrbe (van Huis in sod., 2013).

Ličinke žuželk so ponekod vir hrane za udomačene živali, kot so ribe in perutnina. V zahodni Keniji je pobiranje termitov iz narave za prehrano kokoši znano že dolgo časa, medtem ko v Gani marsikateri dom vzdržuje lasten termitnjak, iz katerega vsako jutro nahranijo pegatke še pred sončnim vzhodom. Tako spodbujajo njihovo naravno obnašanje pri iskanju hrane (Nyakeri in sod., 2017).

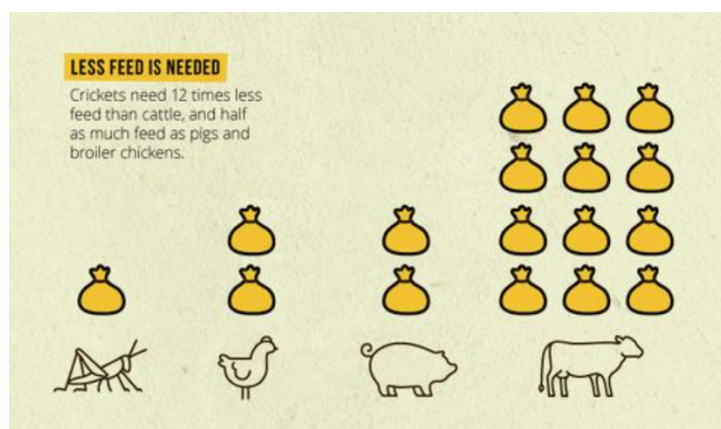
Pogosto se na žuželke gleda kot na škodljivce in uničevalce naših pridelkov, vendar je v resnici ravno obratno. Imajo pomembno ekološko vlogo; so polinatorji, sodelujejo pri reprodukciji rastlin in izboljšujejo zemljino pestrost zaradi izboljšane biološke razgradljivosti. Organsko snov odmrlih rastlin predelajo do te mere, da je izkoristljiva za glive in bakterije, ki zagotovijo zemlji nov vir hranilnih snovi. Žuželke, primerne za agro-ekosisteme, predstavljajo tudi naravne sovražnike različnim škodljivcem (van Huis in sod., 2013). Poleg tega rastejo in uspevajo brez natančnih vzrejalšč in niso rezervoar patogenov (Wang in Shelomi, 2017). Večja reja ličink ni grožnja za okolje, saj potrebujemo za gojenje zelo malo prostora, zato ne uničujemo naravnega habitata drugim vrstam (Sogari in sod., 2019) (Slika 1).



Slika 1: Vpliv proizvodnje beljakovin na okolje

Vir slike: <https://www.eko-brlog.com/zuzelke-v-prehrani-psov-tabu-ali-prihodnost/>

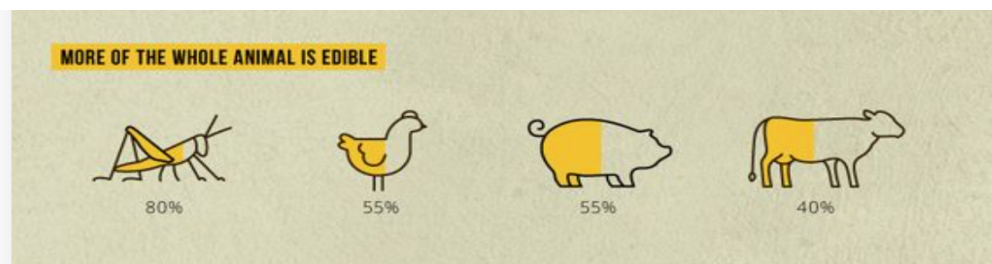
Za pridobitev enega kilograma visoko kakovostnih živalskih beljakovin (iz reje prašičev, goveda ali perutnine) je potrebnih 6 kg rastlinskih beljakovin (npr. sojine moke), medtem ko je ta konverzija za insekte precej manjša (van Huis in sod., 2013) (Slika 2).



Slika 2: Poraba krme pri različnih rejnih živalih

Vir slike: <https://eatsens.com>

Poleg tega so žuželke izkoristljive do 80 %, medtem ko pri perutnini in prašičih uporabimo samo 55 %, pri govedu pa le 40 % živali (van Huis in sod., 2013) (Slika 3).



Slika 3: Izkoristljivost žuželk in drugih rejnih živali v prehrani

Vir slike: <https://eatsens.com>

Žuželke dajejo ljudem tudi med, svilo in druge medicinske snovi, potrebne za zdravljenje določenih bolezni. Njihova vloga je prežeta v tradicijah, kulturah, okraskih, filmih, umetnosti ter literaturi (van Huis in sod., 2013).

Večino žuželk se lahko zaužije v prvotni obliki, vendar se jih lahko tudi predela v drugačne oblike. Izvedemo lahko ekstrakcijo beljakovin, maščob, mineralov in vitaminov. Vendar so ti postopki trenutno še predragi za vsakodnevno uporabo (van Huis in sod., 2013).

### 1.1.1 Izzivi v industrializaciji vzreje žuželk

Z naraščanjem ozavešanja o prihodnosti našega planeta narašča tudi pripravljenost sprejemanja novih kulinarčnih rešitev (Wang in Shelomi, 2017). Po eni strani se soočamo s predsodki o reji in okusnosti žuželk, po drugi strani pa potrošnike vseeno privablja dejstvo, da žuželke, ki dobro uspevajo na organskih odpadkih, zmanjšujejo okoljsko ogljikovo onesnaževanje in obenem povečujejo svojo hranilno vrednost (van Huis in sod., 2013). Zato je povpraševanje po žužkah naraslo do takšne mere, da je preraslo sposobnost njihove vzreje (Wang in Shelomi, 2017). V prihodnosti bo potrebno vložiti več kapitala, saj je ugotavljanje najučinkovitejšega načina proizvodnje še vedno v razvoju, spremlja pa ga neprestan pritisk za doseganje ekonomske enakovrednosti pridelavi rastlin in mesa (van Huis in sod., 2013).

Trenutno je večina žuželk še vedno nabranih v divjini, narašča pa število manjših, družinskih podjetij, kjer gojijo žuželke predvsem za prehrano domačih ljubljencev, mesojedih plazilcev in drugih insektojedih živali. Gojitev insektov bi lahko v državah v razvoju, kjer revščina še

vedno predstavlja vsakodnevni življenjski problem, pomagala pri odpiranju delovnih mest in izboljšanju življenjskega standarda (van Huis in sod., 2013).

Po mnenju Mednarodne platforme za žuželke za hrano in krmo (International Platform of Insects for Food and Feed; IPIFF) se bo industrija proizvodnje žuželk, in sicer v smislu proizvodnje novega vira beljakovin, morala soočiti s tremi glavnimi izzivi, da bo lahko v celoti izkoristila svoj potencial (Sogari in sod., 2019).

Najprej se bo morala proizvodnja žuželk znatno povečati, kajti trenutna tržna cena obrokov iz žuželk še ni dovolj konkurenčna. Poleg tega je obseg proizvodnje ribje moke in visokokakovostnega izvlečka sojine moke tisočkrat večji od beljakovinskih izdelkov, pridobljenih iz ličink. Rejci žuželk bodo morali s povečanjem obsega proizvodnje povečati tudi cenovno konkurenčnost in stabilnost svojih izdelkov v primerjavi z izdelki iz drugih virov beljakovin. Pri tem pričakujejo, da bodo pri doseganju tega cilja bistveno pripomogli avtomatizacija in nadzorovani sistemi pridelave (Sogari in sod., 2019).

Drugič, živinorejci v EU morajo redno izpolnjevati pričakovanja potrošnikov glede varnih, hranljivih in visokokakovostnih proizvodov živalskega izvora, poleg tega pa se še spoprijemati z družbenimi izzivi, kot je zmanjšanje uporabe antibiotikov zaradi vedno večje odpornosti bakterij. Rejci ličink bodo morali dokazati, da sledijo enakim standardom in iz žuželk proizvajati dovolj hranljive in visokokakovostne izdelke, ki bodo zadovoljivi za potrošnika (Sogari in sod., 2019).

Končni izziv predstavlja še splošna živilska in krmna zakonodaja, ki jo morajo upoštevati tudi proizvajalci žuželk. V državah EU so možnosti uporabe in hranjenja žuželk še vedno omejene. Evropska agencija za varnost hrane (EFSA) je 13. 1. 2021 uvrstila na seznam hrane, varne za človeško uživanje, posušene ličinke velikega mokača (*Tenebrio molitor*), ki je postal prva žuželka na tem seznamu. Trenutno ni dovoljeno uporabljati žuželk kot krmo za perutnino in prašiče, poleg tega jih ne smemo hraniti z nekdanjimi živili, ki vsebujejo meso, ribe, ali z odpadno hrano iz restavracij ali gostinskih obratov. Vzreja ličink je dovoljena samo s surovinami, ki imajo status krme (Sogari in sod., 2019).

## 1.2 ČRNA BOJEVNIŠKA (VOJAŠKA) MUHA (*Hermetia illucens*) KOT NOV VIR BELJAKOVIN

Med žuželke, primerne kot nov vir beljakovin, sodi tudi črna bojvniška ali črna vojaška muha muha (*Hermetia illucens*, ČBM), ki ima veliko sposobnost pretvarjanja organskega materiala v lastno biomaso (Bogataj, 2018).

### 1.2.1 Opis in življenjski cikel

ČBM je pogosta in geografsko precej razširjena muha iz družine Stratiomyidae, v kateri se nahaja 2620 poznanih vrst (Bogataj, 2018). Originalno izhaja iz Južne Amerike, z globalizacijo pa se je razširila po vsem svetu, predvsem v tropska in zmerna podnebja. V Evropi je bila prvič opažena na Malti, to je leta 1926, danes pa je prisotna tudi v Sloveniji (Volk, 2018).

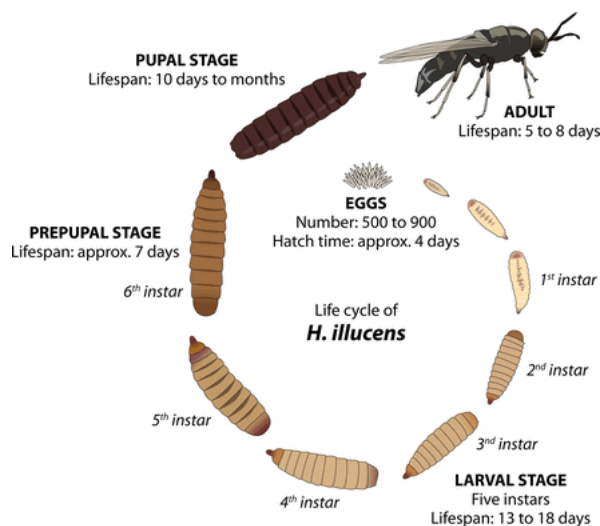
Taksonomija *H. illucens*:

- Kraljestvo: Animalia
- Deblo: Arthropoda
- Razred: Insecta
- Red: Diptera
- Družina: Stratiomyidae
- Rod: *Hermetia*
- Vrsta: *H. illucens* (Bogataj, 2018)

Odrasli osebki so lahko različnih barv, od rumene, zelene do modro črne. Njihova značilnost je, da oponašajo izgled drugih žuželk, npr. os in čebel (Bogataj, 2018).

Odrasle muhe ne potrebujejo hrane za preživetje. Te ne sodijo med škodljivce, saj jih ne najdemo v domovih ljudi, poleg tega pa živijo relativno kratek čas. Življenjski cikel, dolg približno 40-45 dni, je sestavljen iz štirih faz: odrasle muhe, jajčeca, ličinke in prepupe/pupe (Bogataj, 2018). V naravi odlaga samička *H. illucens* jajčeca v bližino vlažnega organskega materiala. Na kmetijskih območjih izbira prostore, kjer skladiščijo gnoj; v urbanih območjih pa kompostnike ali smetišča. Parjenje se navadno prične že drugi dan po izvalitvi odrasle živali.

Samček preži na rastlini na samico, in ko jo opazi, se parita v zraku. Samička nato izleže od 500 do 900 jajčec, ovalne oblike, kremno bele barve. V dolžino merijo 1 mm. Po štirih dneh se iz njih izležejo ličinke, ki so prav tako kremno bele do rumene barve, imajo pa močna usta za žvečenje organskih hranil. Med razvojem, ki traja 14 dni, se ličinke 6x levijo in na koncu cikla dosežejo dolžino do 27 mm in širino do 6 mm. Po končani levitvi in po končanem konstantnem prehranjevanju se ličinke umaknejo na miren in varen prostor, kjer začnejo pupacijo. Pravimo, da so v stanju prepupe. V tem času oblikujejo puparij, znotraj katerega se razvijajo v pupo. Eksoskelet potemni, v odraslo žival pa se preobrazi v obdobju 14 dni. Dolžino odraslega življenja pogojujeta temperatura in vlaga, namreč pri višjih poletnih temperaturah živi samo 5-8 dni, pri sobni temperaturi pa lahko preživi do dva tedna (Volk, 2018) (Slika 4).



Slika 4: Življenjski cikel *H. illucens*

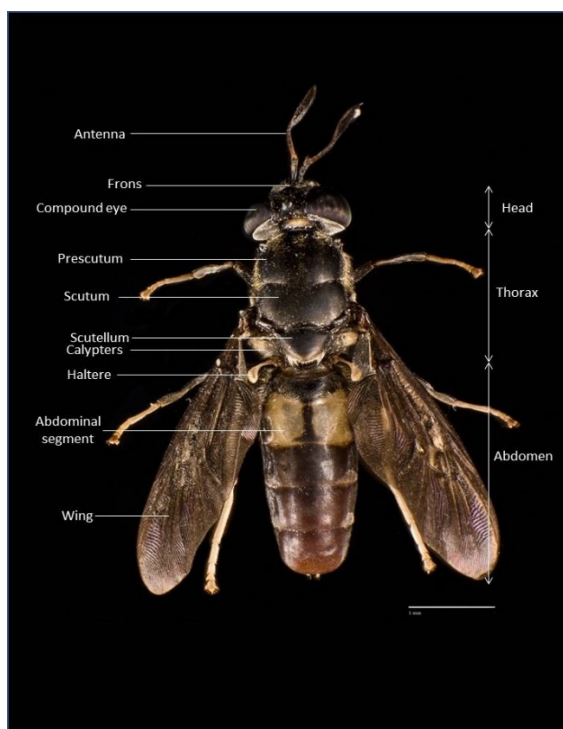
Vir slike: Bogataj, 2018

Prisotnost različnih vrst mikroorganizmov v okolju vpliva na njihovo obnašanje pri odlaganju jajčec in iskanju primerne substrata za rast. Če je na substratu ličinka hrošča *Alphitobius diaperinus*, to ČBM odvrača od odlaganja jajčec (Smet in sod., 2018).

Imunski odziv ČBM temelji na kombinaciji celične in humoralne imunosti. Hemolimfne celice opravljajo nalogo fagocitoze, nodulacije in enkapsulacije patogenov; fenoloksidaze, antimikrobni peptidi (AMP) in proteini pa predstavljajo aktivni del humoralnega odgovora (Bogataj, 2018).

### 1.2.2 Zgradba in gastrointestinalni trakt *H. illucens*

ČBM meri v dolžino 15–20 mm. Ima sestavljene oči, sorazmerno velike in zeleno obarvane z naključno razporejenimi vijoličnimi progami. Progavost ne vpliva na vid živali, temveč sodeluje pri njenem obnašanju signalizacije sovrstnikom. Oko sestavlja več ponavljajočih se organizacijskih enot, imenovanih omatidiji. Na vrhu glave, to je med sestavljenima očesoma, ima še tri pikčaste oči v obliki enakostraničnega trikotnika. Kranialno na glavi se nahajajo antene iz treh podaljškov, distalni segmenti nog pa so beli (Volk, 2018) (Slika 5).



Slika 5: Osnovna anatomija odrasle *H. illucens*

Od vrha do dna se vrstijo: antene, pikčaste oči, sestavljeni očesi, trije obroči prsnega koša (prescutum, scutum in scutellum), obroči trebušnega predela in krila.

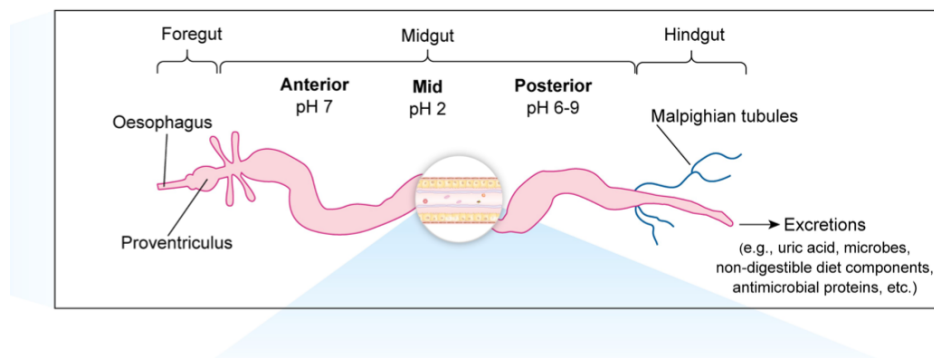
Vir slike: Volk, 2018

Kutikula je črna in ima dve prosojni okenci, ki sta na prvem segmentu abdomna (Volk, 2018). Njihovo telo je v večini sestavljeno iz beljakovin, maščob in hitina, ki tvori eksoskelet (Smet in sod., 2018). Monomer ogljikovih hidratov (OH), glukozo, uporabijo ličinke tako za izgradnjo tkiv kot tudi za energijo. Aminokisline sodelujejo pri oblikovanju tkiv, hormonov in transportnih beljakovin, od katerih jih je deset esencialnih specifičnih za žuželke. Maščobe so vir energije, sodelujejo pa tudi pri zgradbi celične membrane in organel. Pomembne so tudi pri

produkciji hormonov. Pri razvoju ličinke pomembno sodelujejo steroli, vitamini in minerali (Gold in sod., 2018).

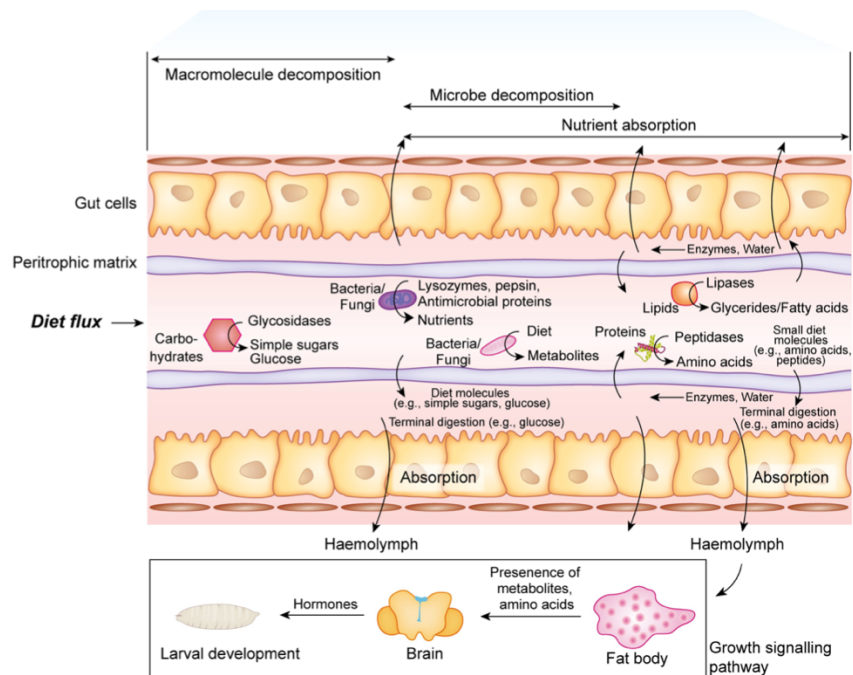
Ličinke se hranijo skozi odprtini, ustom podobni, na anteriornem delu njihovega podolgovatega telesa. Pogoltnejo lahko tekočino in trdno snov, in sicer brez omejene velikosti delcev. Hrana potuje skozi požiralnik v votlino, podobno želodcu, ki ima drobilno nalogo, ter nato v črevo. Ta predstavlja najpomembnejši del prebave (Gold in sod., 2018). Deljen je na tanko in debelo črevo, tanko pa na tri dele: sprednji, srednji in zadnji del (Slika 6). Vsi deli vsebujejo kolonije bakterij in protozojev, ki se med seboj razlikujejo. Vplivajo na spodbujanje prebave specifičnih organskih komponent in na razvoj spola (Bogataj, 2018). Sluznica črevesja je sestavljena iz visokocilindričnega epitelija, ki se zaradi intenzivnega metabolizma neprestano obnavlja.

Njegove odmrle celice tvorijo plast, imenovano peritrofična membrana, in ločuje dele tankega črevesja, da lahko poteka v posameznih delih različna encimska razgradnja. Večina encimov se nahaja v zadnjem, to je posteriornem delu tankega črevesja. Hrana pride po zaužitju najprej v endoperitrofičnem predelu, torej v volumnu črevesja, v stik z encimi, ki katalizirajo makromolekule. Na tem mestu sodelujejo encimi amilaza, maltaza, pepsin in tripsin ter lipaza in fosfolipaza, odvisno od substrata, na katerem rastejo ličinke. Šele, ko so molekule dovolj majhne, lahko prestopijo peritrofično membrano in preidejo v ektoperitrofični del črevesja, od tod pa v hemolimfo. Malfigijeve cevčice, locirane na prehodu iz tankega v debelo črevo, imajo vlogo ledvic in so povezane s hemolimfo (Slika 7). Tako predstavljajo pomemben del pri ohranjanju ravnotežja hranilnih snovi, vode in ionov. Na tem mestu pride tudi do izmenjave dušikovih snovi (urične kisline) ter drugih stranskih presnovnih produktov, ki bi lahko škodovali prebavi. Hemolimfa opravlja pri žuželkah enake naloge kot kri pri vretenčarjih in omogoča prenos hranilnih snovi po telesu. Te se nato akumulirajo v maščobni del ličinke in vplivajo na maščobno sestavo in metabolizem. Pri prebavi celuloze in hemiceluloze jim pomaga tudi bakterijska mikroflora, saj v črevesju ni encimov za njihovo razgradnjo. Mikroflora proizvaja celulazo in pektinazo. Vse molekule, ki se ne predelajo, resorbirajo, razgradijo, vsi metaboliti ter AMP nato potujejo do konca črevesja in se izločijo skozi odprtino na posteriornem delu ličinke. Ličinke ČBM se neprestano prehranjujejo. Iz raziskav je znano, da potrebuje hrana za prehod skozi črevesje približno 60-180 minut (Gold in sod., 2018).



Slika 6: Delitev črevesja *H. illucens*

Vir: Gold in sod., 2018



Slika 7: Metabolizem molekul v črevesju *H. illucens*

Vir: Gold in sod., 2018

Pri prebavi sta pomembna dejavnika tudi pH in kisik. Vplivata namreč na delovanje encimov in na številčnost mikroflore. Tanko črevo ima aerobne in anaerobne predele prebave. Obstajajo odprtine, ki se povezujejo z respiratornim sistemom in tako dovajajo molekule kisika z aktivnim transportom ali dilucijo skozi membrano na določena mesta v črevesju. Najbolj kranialni del

tankega črevesja je pH nevtralen (pH 7), sledi močno kislo okolje (pH 2) in se konča z alkalnim (pH 6,3-9,3) (Gold in sod., 2018).

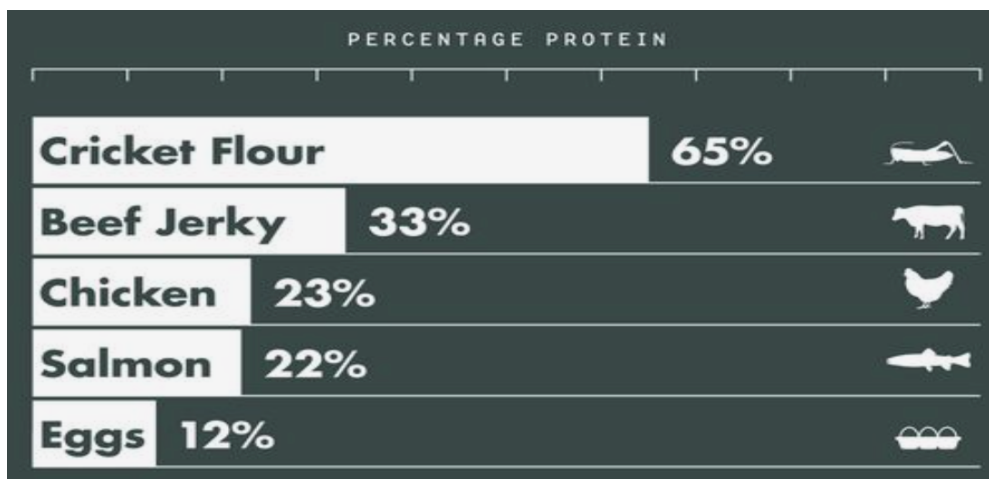
Metabolizem je tesno povezan s hormoni. Posamezne stopnje ličinkinega razvoja so prilagojene razgradnji organskega materiala in hranilnih snovi, ki jih potrebuje ličinka na posamezni stopnji. Hitrost hranjenja je odvisna od sladkorjev v substratu in od vpliva hormonov, ki vplivajo na njen apetit (Gold in sod., 2018).

Jeon in sod. (2011) so ugotavljali mikrobiološko združbo v črevesju ČBM. Mikrobiota se je razlikovala glede na prehrano, v največji meri pa so bile zastopane *Bacterioidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* in *Fusobacteria*. Leta 2013 so Zheng in sod. s pomočjo 16S rRNA gena raziskovali raznolikost bakterijske mikroflore ličink med različnimi stadiji rasti. Ličinke so vzrejali na Gainesville dieti (20 % koruze, 30 % lucerne in 50 % pšeničnih otrobov), vzorce bakterijske DNA pa jemali iz ličinke, prepupe, pupe, odrasle muhe in jajčec. Ugotovljene so bile naslednje bakterije: v fazi jajčeca (54 %) in prepupe (41,7 %) je prevladoval rod *Proteobacteria*. V obdobju ličinke (54,4 %), pupe (46,3 %) in odrasle muhe (40,5 %) pa je prevladoval rod *Bacterioidetes*. Okoli 78 % vseh razredov so bili skozi vse stadije razvoja *Gammaproteobacteria*, *Sphingobacteria*, *Flavobacteria* in *Actinobacteria*.

V črevesju ČBM so dokazali tudi glive. Najbolj zastopani vrsti sta bili *Pichia*, *Geotrichum* in *Trichosporon*, verjetno zaradi lastnih antimikrobnih lastnosti, ki preprečujejo rast drugih vrst gliv (Bogataj, 2018).

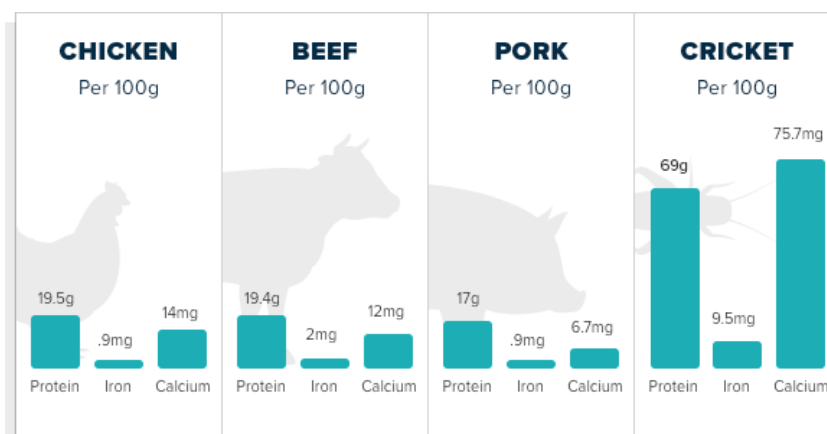
### 1.2.3 Hranilna vrednost *H. illucens*

Ličinke ČBM vsebujejo povprečno na suho snov 32-58 % beljakovin, 4,8-5,11 % kalcija (Ca) in 0,6 % fosforja (P) ter 29-35 % maščob, med katerimi je večji delež nasičenih maščob (Wang in Shelomi, 2017). Na vsebnost hranilnih snovi vpliva stadij žuželke in habitat, v katerem raste (van Huis in sod., 2013) (Sliki 8 in 9).



Slika 8: Primerjava vsebnosti beljakovin v žuželah (moka čričkov) in drugih živalskih virih hrane

Vi sliker: <https://exoprotein.com>



Slika 9: Primerjava vsebnosti beljakovin, železa in kalcija med 100 g žuželk in drugih rejnih živali (perutnina, govedo in prašiči)

Vir slike: <http://www.eatgrub.co.uk>

Ličinke ČBM ne morejo same prebaviti vlaknin iz hrane, zato jim pri tem pomagajo črevesne bakterije. Beljakovine se v črevesju razgradijo s pomočjo peptidaz do aminokislin, ki se absorbirajo v črevesne epitelne celice. Gold. in sod. (2018) so ugotovili, da imajo ličinke večjo maso, če so gojene na substratu z večjo vsebnostjo beljakovin. Poleg tega so bolj uspešne pri konverziji substrata, vsebujejo večji delež beljakovin in manjši delež maščob. Čas rasti do faze prepupe je krajši. Ličinke, ki so gojene na substratu z nižjo vsebnostjo beljakovin, imajo daljši čas razvoja, so manjše in vsebujejo več maščobe, še posebno v primeru, ko je v substratu več ogljikovih hidratov (Gold in sod., 2018).

Ogljikovi hidrati so v tesni povezavi z deležem maščobe v ličinkah. V primeru, da jih gojimo na substratu z nizko vsebnostjo beljakovin in velikim deležem ogljikovih hidratov, bodo te pretvorile in naložile ogljikove hidrate v maščobni del telesa. Iz tega sledi, da bodo ličinke, gojene na substratu iz sadja, vsebovale večji delež maščob v primerjavi z ličinkami, gojenimi na substratu iz zelenjave. Njihov krajši čas razvoja bo pri dieti, ki ima razmerje beljakovine : ogljikovi hidrati 1 : 1- 4 : 1. Vendar pa bo masa ličink večja (in večji delež maščob) pri razmerju 1 : 2-1 : 4 (Gold in sod., 2018).

Na hranilno vrednost ličink vplivajo tudi drugi faktorji, kot so njihova genetika in starost, odmerki odpadka na ličinko, pogostost hranjenja, temperatura ter vlaga v okolju in trajanje reje (Gold in sod., 2018). Vpliv starosti na vsebnost hranilne vrednosti ličink so raziskovali tudi Nyakeri in sod. (2017). Ugotovili so, da se s starostjo zmanjšuje vsebnost beljakovin v ličinkah ne glede na uporabljen substrat. To je verjetno posledica sklerotizacije, procesa, ki povzroči encimsko razgradnjo beljakovin za izgradnjo hitina v eksoskeletu. Zato naj bi bil najbolj idealen čas pobiranja ličink, preden razvijejo trd zunanji eksoskelet. V omenjenem poskusu (Nyakeri in sod., 2017) so prepupe pobrali 16. dan razvoja, se pravi v času, ko je imelo približno 90 % ličink prepup v najboljšem ravnovesju med maso in minimalnim nivojem hitina.

Tabela 1: Podatki iz literature o vsebnosti hranilnih snovi v ličinkah (v fazi prepupe) *H. illucens*

|                 | Liu in sod., 2016                   | Newton in sod., 2005 | Newton in sod., 2005 | Nyakeri in sod., 2017 | Nyakeri in sod., 2017 | Shumo in sod., 2019  | Shumo in sod., 2019 | Sprangers in sod., 2017             | Sprangers in sod., 2017 | Sprangers in sod., 2017     |
|-----------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|
|                 | Popolna krmna mešanica za perutnino | Perutninski gnoj     | Praščiji gnoj        | Gospodinjski odpadki  | Pivske tropine        | Godpodinjski odpadki | Pivske tropine      | Popolna krmna mešanica za perutnino | Gospodinjski odpadki    | Zelenjavni biološki odpadki |
| SS (%)          | -                                   | -                    | -                    | -                     | -                     | 92,7                 | 84,6                | -                                   | -                       | -                           |
| VLAGA (%)       | -                                   | -                    | -                    | -                     | -                     | -                    | -                   | 61,3                                | 61,9                    | 59,0                        |
| SP (% v SS)     | 9,6                                 | 14,6                 | 16,6                 | -                     | -                     | 7,2                  | 6,2                 | 10,0                                | 2,7                     | 9,6                         |
| SV (% v SS)     | -                                   | 7,0                  | -                    | -                     | -                     | 38,9                 | 49,9                | -                                   | -                       | -                           |
| SB (% v SS)     | 40,4                                | 42,1                 | 43,2                 | 36,1                  | 43,0                  | 33,0                 | 41,3                | 41,2                                | 43,1                    | 39,9                        |
| SM (% v SS)     | 24,2                                | 34,8                 | 28,0                 | 35,9                  | 27,2                  | 34,3                 | 31,0                | 33,6                                | 38,6                    | 37,1                        |
| Na (% v SS)     | 0,1                                 | 0,1325               | 0,1260               | -                     | -                     | 0,2                  | 0,26                | 0,067                               | 0,068                   | 0,06                        |
| Mg (% v SS)     | -                                   | 0,39                 | 0,44                 | -                     | -                     | 0,33                 | 0,35                | 0,265                               | 0,246                   | 0,211                       |
| K (% v SS)      | -                                   | 0,69                 | 1,16                 | -                     | -                     | 0,57                 | 0,44                | 0,616                               | 0,598                   | 594                         |
| P (% v SS)      | 0,35                                | 1,51                 | 0,88                 | -                     | -                     | 0,41                 | 0,46                | 0,499                               | 0,408                   | 0,404                       |
| Ca (% v SS)     | 2,9                                 | 5,0                  | 5,36                 | -                     | -                     | 0,2                  | 0,17                | 2,87                                | 0,123                   | 2,872                       |
| Mn (mg/kg v SS) | -                                   | 246                  | 348                  | -                     | -                     | 900                  | 1100                | 220                                 | 20                      | 240                         |
| Fe (mg/kg v SS) | 2000                                | 1370                 | 776                  | -                     | -                     | 2200                 | 300                 | 350                                 | 110                     | 110                         |
| Cu (mg/kg v SS) | -                                   | 6                    | 26                   | -                     | -                     | 200                  | 500                 | 10                                  | 10                      | 10                          |
| Zn (mg/kg v SS) | 614                                 | 108                  | 271                  | -                     | -                     | 300                  | 300                 | 160                                 | 70                      | 70                          |

Legenda: ČBM: Črna bojovniška muha; SS: suha snov; SP: surov pepel; SV: surove vlaknine; SB: surove beljakovine; SM: surove maščobe; Na: natrij; Mg: magnezij; K: kalij; P: fosfor; Ca: kalcij; Mn: mangan; Fe: železo; Cu: baker; Zn: cink; S: žveplo

Liu in sod. (2017) so raziskovali spremembe v hranilnih vrednostih v različnih razvojnih stadijih ČBM. Po izvalitvi se je vsebnost surovih maščob (SM) v suhi snovi najprej zmanjšala s 15,8 % na 4 %, kar kaže, da lupina jajčec vsebuje zaradi preprečevanja izgube vlage več SM. Vsebnost SM se je nato v fazi ličinke postopoma povečevala in dosegla najvišji delež (28 %) v zreli ličinki, to je 14. dan, in fazi prepupe, nato pa se je v fazi pupe močno zmanjšala. To je lahko posledica disociacije maščob in porabe energije za metamorfozo. Med njo se oblikuje odrasla muha, ki nato zaključi parjenje in odloži jajčeca. Po metamorfozi in pojavu odraslih muh so ponovno ugotovili normalno raven SM, in sicer 30,6 % pri samicah in 32,2 % pri samcih.

Vsebnost surovih beljakovin (SB) v teh razvojnih fazah se je počasi zmanjševala. Najnižja vsebnost SB je bila 38 % v fazi ličinke (prvih 12 dni), najvišja pa v zgodnji fazi pupe. V zgodnji prepupi je bila vsebnost 40,2 %, v pozni prepupi 40,4 %, v zgodnji pupi 46,2 %, v pozni pupi 43,8 % in v odraslih samcih 43,8 % ter 44 % v odraslih samicah. Vsebnost SB je bila največja v postmortalni fazi odraslih muh, in sicer 57,6 %. Delež SM je bil v tem času 21,6 %. V nasprotju s spreminjanjem vsebnosti SB in SM na različnih stopnjah razvoja ličink pa je vsebnost surovega pepela (SP) od 4. dne pa do pozne pupe ostala približno enaka in je znašala od 7,8 % do 10,3 %. V vzorcih jajčec in odraslih muh je bila vsebnost pepela precej manjša. Samci so imeli višjo vsebnost beljakovin, maščob in pepela kot samice.

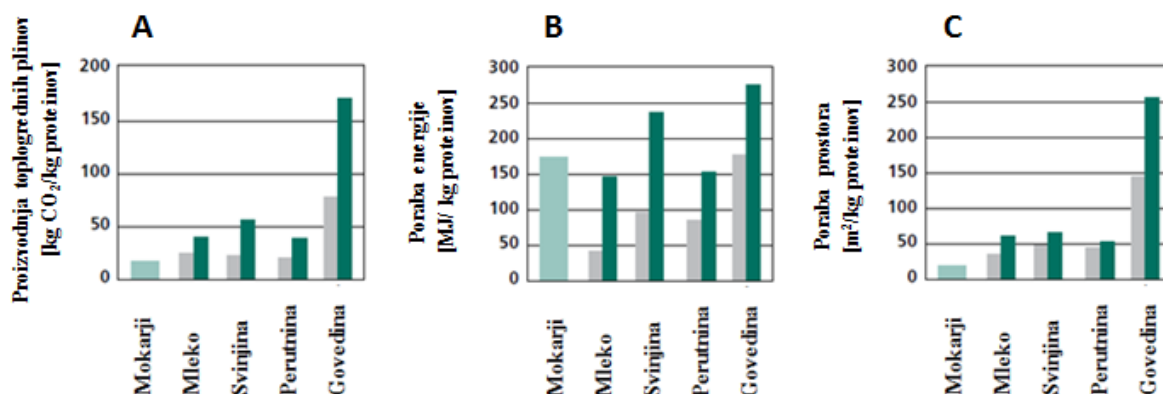
Vsebnost maščobnih kislin (MK) v različnih življenjskih obdobjih ČBM precej variira. Linolna kislina (18: 2,  $\omega$ -6) ter  $\alpha$ -linolenska kislina (18: 3,  $\omega$ -3) sta dosegli najvišjo vrednost, in sicer 31,4 % in 1,6 % deleža vseh maščobnih kislin na 6. dan razvoja ličink. Oleinska kislina (18: 1) je imela največji delež 4. dne razvoja ličink in je predstavljala približno 36,4 % SM, nato pa se je postopno zmanjševala do stanja odrasle muhe (Liu in sod., 2017).

Tudi vsebnost elementov je odvisna od substrata, na katerem gojimo ličinke ČBM, ki naj bi akumulirale Ca in magnezij (Mg), ne pa natrija (Na) ali žvepla (S). Vsebujejo še enkrat več Ca kot druge vrste insektov, to je 6,6-9,3 % v suhi snovi, medtem ko so vrednosti pri drugih žuželkah manj kot 1 %. Tudi drugih elementov je v primerjavi z drugimi vrstami ličink več (Wang in Shelomi, 2017).

V raziskavi Liu in sod. (2017) so bile prepupe bogate z vitaminom E in minerali (Ca, P, Na, železo (Fe) in cink (Zn)). Največ jih je bilo v zrelih ličinkah in zgodnjih prepupah. Visoka raven mineralov v ČBM podpira razmišljanje, da bi užitne žuželke lahko pomagale v boju proti pomanjkanju hrane v tistih državah, kjer prevladuje pomanjkanje mikrohranil (Liu in sod., 2017).

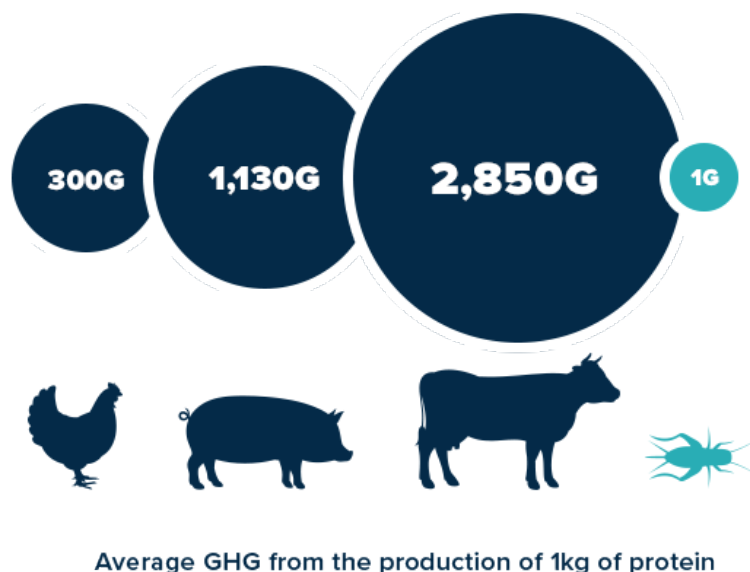
#### 1.2.4 Uporaba *H. illucens* pri kompostiranju

ČBM živi v bližini prašičjih, perutninskih in govejih farm, saj za svojo rast izkorišča gnoj. Poleg tega jo najdemo tudi na odpadkih iz predelave sadja, kave in zelenjave ter na odpadnih stranskih proizvodih, ki dnevno nastajajo v akvakulturi. Lahko rečemo, da neopazno rešuje okoljske probleme, saj zmanjšuje maso odpadkov, vsebnost vlage in inaktivira močne vonjave. Ugotovljeno je bilo, da ČBM zmanjša prosti P v govejem gnoju, ki ga govedo sprosti v okolje, in sicer za 61-70 % in dušik (N) za 30-50 %. V iztrebkih prašičev zmanjša P za 52 %, N za 71 % in kalij (K) za 52 %. Vsebnost elementov, kot so Ca, Fe, Mg, Na, Zn, aluminij (Al), kadmij (Cd), krom (Cr), baker (Cu), molibden (Mb) ter nikelj (Ni), pa za 38-93 %. Pozitivno doprinesejo k boljši higieni na farmah in zmanjšanju populacij škodljivih vrst žuželk. Povzamemo lahko, da ličinke ČMB zmanjšajo onesnaževanje za 50–60 % (van Huis in sod., 2013) (Slika 10 in 11).



Slika 10: Primerjava proizvodnje toplogrednih plinov (A), porabe energije (B) in porabe prostora (C) med mokarji in ostalimi pogostimi viri beljakovin

Vir slike: van Huis in sod., 2013



Slika 11: Povprečna količina toplogrednih plinov, ki nastanejo pri proizvodnji 1 kg različnih virov beljakovin

Vir slike: <http://www.eatgrub.co.uk>

V zadnjem času intenzivno proučujejo različne tehnologije uporabe ČBM v postopkih kompostiranja in predelave bioloških odpadkov. Njihova uspešnost je odvisna od sposobnosti predelave velikih količin organskega materiala v beljakovine in maščobe, pri čemer se zagotovi mikrobiološka in kemijska varnost (Gold in sod., 2018).

Zato je ČBM pomemben dejavnik trajnostnega gospodarstva (Wang in Shelomi, 2017). Nekateri ostanki lahko vsebujejo različne nezaželenne snovi in/ali privabljajo potencialne vektorje bolezni druge žuželke. Divje ČBM se tako že nekaj časa imenuje za »dobre upravljalce« takšnih odpadkov, saj zmanjšujejo emisije in odganjajo druge vrste žuželk (Wang in Shelomi, 2017). To je velikega pomena predvsem v državah v razvoju, kjer predstavljajo dnevni odpadki zaradi prevelikih stroškov tehnologije predelave veliko breme. Odpadki se nalagajo, razgradnji produkti pa onesnažujejo bližnjo okolico, kar ima posledice tudi na zdravje ljudi. Poleg tega se izgubljajo potencialne hranilne snovi in energija (Gold in sod., 2018).

Oblika krožnega gospodarstva z uporabo ČBM predstavlja možnost, da farme samostojno poskrbijo za odpadke (gnoj) in jim ni potrebno plačevati stroškov odvoza, kar je z vidika trajnostnega gospodarstva pozitivno za okolje, rejne živali in ljudi (Wang in Shelomi, 2017).

### 1.2.5 Način reje *H. illucens*

ČBM lahko raste na zelo različnih substratih organskih materialov, od živalskega gnoja do kuhinjskih in drugih odpadkov (Wang in Shelomi, 2017). Reja navadno poteka v posodah različnih velikosti, vendar morajo biti te enotne. Ličinke se med 4. in 9. dnevno prenese iz posodic, kjer so bile iz jajčec vzrejene na običajnem substratu (na primer krma za piščance); v posode z izmerjeno maso substrata. Ličinka se nato med razvojem šestkrat levi. V zadnjem stadiju, tako imenovani prepupi, so velike med 6 in 20 mm ter mase od 70 do 299 mg (Gold in sod., 2018). Zaradi njihovega naravnega obnašanja, da same zapustijo gojišče, izdelava sistema, ki jih vodi v skupno zbirališče, ni preveč zapletena. V prihodnosti lahko pričakujemo vedno večjo avtomatizacijo in industrializacijo reje (Wang in Shelomi, 2017).

Na lokacijah, kjer ČBM naravno prebivajo in so ustrezne klimatske razmere vse leto, gojenje ličink zahteva le malo časa in dela. V takšnih primerih imajo lahko kar odprte sisteme v bližini farm, kjer ličinke same iščejo odpadke (Wang in Shelomi, 2017).

Po podatkih iz literature je idealno razmerje porabe substrata in njegove predelave približno 3-5 kg/m<sup>2</sup>/dan. V tem primeru bi kolonija ČBM proizvedla 145 g/m<sup>2</sup> suhe snovi dnevno (Wang in Shelomi, 2017). Dnevno dodana količina substrata lahko pozitivno izboljša rast ali pa obratno, torej jo upočasni. Ugotovljeno je bilo, da ličinka dnevno zaužije med 25 in 500 mg substrata, odvisno od njegove vlažnosti, velikosti delcev, vsebnosti vlaknin ter velikosti in starosti ličink. Najbolj optimalna količina naj bi bila med 100 in 200 mg / ličinko / dan (Nyakeri in sod., 2017). Ličinke se najboljše razvijajo pri temperaturi 30 °C, vendar pri temperaturi 36 °C že poginejo (Wang in Shelomi, 2017). Po podatkih iz literature je najbolj optimalna vsebnost vlage v substratu med 60 in 70 % (Nyakeri in sod., 2017, Sprangers in sod., 2017, Wang in Shelomi, 2017).

Pri reji ČBM ne smemo pozabiti tudi na druge vidike, ki jih moramo upoštevati. Pri tem mislimo predvsem razmnoževanje odraslih muh. Za to je potreben ustrezen prostor, kjer se jih spodbuja k parjenju v zraku in odlaganju jajčec. Precej uspešne so tople grede ali neke vrste rastlinjaki, zagotoviti pa moramo tudi ustrezno svetlobo, saj se samec in samica navadno parita podnevi. Najbolj uspešna je uporaba ioniziranih luči (Wang in Shelomi, 2017).

Veliko pozornost pri reji pa je potrebno nameniti tudi ustreznosti posameznega substrata. Povečane koncentracije Zn lahko slabo vplivajo na njihovo rast (Wang Shelomi, 2017). Neustreznost substrata določimo tudi na podlagi njihovega obnašanja. Naravno so fotofobične in se večinoma zarinejo v globlje plasti substrata. Kadar poskušajo zlesti ven in so nemirne, kaže na nelagodje (Nyakeri in sod., 2017).

### 1.3 VARNOST UPORABE LIČINK *H. illucens*

Kot smo že omenili, ličinke ČBM izločajo v okolje manj toplogrednih plinov ter manj amonijaka kot govedo ali prašiči (Wang in Shelomi, 2017). V primerjavi z velikimi rejnimi živalmi predstavljajo manjši rizik prenosa zoonotičnih bolezni. Pomembna ugotovitev je tudi, da ličinke ČBM ne akumulirajo pesticidov ali mikotoksinov. Proizvajajo bakteriostatske, baktericidne in fungicidne spojine, s katerimi se v naravi branijo pred mikroorganizmi ter drugimi neugodnimi okoljskimi razmerami. Človek ne privlači odraslih ČBM. Ugotovljeno je bilo, da ČBM tekmuje v okolju z domačimi muhami (*Musca domestica*) in zmanjša njihovo število od 94 do 100 % (van Huis in sod., 2013).

Organski odpadki, na katerih se ličinka ČBM prehranjuje, lahko posredno vsebujejo različne škodljive snovi. V živalskem gnoju lahko najdemo ostanke farmacevtskih pripravkov, v pivovarniških odpadkih pa mikotoksine. V sadju in zelenjavi so pogosto ostanki pesticidov, v kuhinjskih odpadkih pa težke kovine ali drugi toksini, kot so dioksini, poliklorirani bifenili (PCB) ali policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH). Na splošno detoksifikacija takšnih molekul poteka s pomočjo citokroma P450 monooksigenaze in glutation-S-transferaze ter je v tesni povezavi s črevesno mikrofloro (Gold in sod., 2018).

#### 1.3.1 Mikrobiološka tveganja

V več raziskavah je bilo opisano, da gojenje ličinke ČBM na organskem materialu, ki vsebuje *Salmonella enteritidis* in *E. coli*, njihovo število zmanjšuje (Erickson in sod., 2004; Wang in Shelomi, 2017; Smet in sod., 2018). Ker ličinke ČBM rastejo v naravi na odpadnem organskem materialu, ki ima večjo vsebnost bakterij in gliv, mora ličinka imeti ustrezne mehanizme, s katerimi razgradi mikrobe in jih celo izkoristi za rast in razvoj. A če ličinke ostanejo predolgo

na substratu, v katerem se bakterije še vedno razmnožujejo, mikrobov ne uspejo v celoti razgraditi (Gold in sod., 2018).

Ključno vlogo pri razgradnji mikrobov ima ličinkin lastni metabolizem in črevesna mikrobiota (Gold in sod., 2018). Ker pa se okoli 80 % mikroflora ČBM spremeni med razvojem ličink, kadar substrat, na katerem so gojene, ostaja enak, črevesna mikrobiota ne more biti samo zrcalo kolonij bakterij v substratu, temveč morajo zraven sodelovati še drugi mehanizmi. S tem, ko se hranila, ki predstavljajo vir energije (npr. ogljikovi hidrati), razgradijo in absorbirajo že v sprednjem delu črevesja, ličinka prepreči, da bi jih kaj ostalo za bakterijske kolonije, ki se nahajajo v zadnjem delu črevesja (Smet in sod., 2018). K inaktivaciji naj bi po poročilih Erickson in sod. (2004) bistveno prispeval tudi pH v prebavilih. Ta je v sprednjem delu tankega črevesja blago kisel ( $< 7$ ), v njegovem srednjem delu zelo kisel ( $< 3$ ), nato pa s prehodom v debelo črevo naraste ( $> 8$ ). Vloga črevesne mikroflora je predvsem, da izloča AMP, kot so organske kisline in peptidi, ki inaktivirajo tekmovalne mikroorganizme (Gold in sod., 2018). Ker delujejo pri alkalnem pH, se nahajajo v zadnjem delu črevesja (Erickson in sod., 2004). K takšnemu skupnemu delovanju pripomorejo encimi celic mukoze srednjega dela črevesja, ki delujejo v nizkem pH. Razgradnja makromolekul in istočasna liza mikrobov omogoči ličinki dovoljšno mero hranil (Gold in sod., 2018).

Tako kot je pomemben pH v črevesju ličink ČBM, je pomemben tudi pH samega substrata, saj posredno vpliva na delovanje encimov in AMP-jev. Nižji kot je pH, učinkoviteje lahko inaktivirajo *E. coli* (Erickson in sod., 2004).

V raziskavi so Wang in Shelomi (2017) ugotovili, da nekatere bakterije iz substrata boljše vplivajo na rast ličink kot druge, posebno ugotovljena vrsta *Bacillus subtilis*. V raziskavi Gold in sod. (2018) je bilo ugotovljeno, da imajo ličinke različne mehanizme delovanja proti Gram + in Gram - bakterijam. Ker sta sprednji in zadnji del črevesja povezana z respiratornim sistemom, aktivni transport omogoča prenos kisika na posamezne dele črevesja. Tako se ustvari primerno okolje za razmnoževanje nekaterih vrst bakterij, hkrati pa tudi neprimerno okolje za nekatere druge vrste. V raziskavi so ugotovili, da je *E. faecalis* (Gram +) preživel, *E. coli* (Gram -) pa ne (Smet in sod., 2018). Uspešnost zmanjšanja številčnosti patogenih mikrobov naj bi bila odvisna tudi od temperature in sestave substrata (Smet in sod., 2018). V raziskavi Smet

in sod. (2018) je bila *E. coli* O157:H7 najbolj inaktivirana pri temperaturi 27-32 °C in precej manj pri 23 °C. Pri temperaturah, višjih od 32 °C, so bili patogeni sicer zmanjšani v številu, vendar je ta temperatura že vodila v pogin ličink. V raziskavi Erickson in sod. (2004) so ugotovili, da je pri temperaturi 23 °C bilo potrebnih dodatnih 14 dni za opazno zmanjšano vsebnost *E. coli* na količino, to je pred inkubacijo.

Smet in sod. (2018) so proučevali učinkovitost zaviranja rasti patogenih bakterij na različnih substratih. Najmočnejšo inhibicijo Gram - bakterij so opazili pri ličinkah, gojenih na substratu z veliko vsebnostjo beljakovin in celuloze, medtem ko so bile Gram + bakterije v večji meri inaktivirane na substratu z višjo vsebnostjo maščob. Izraženost AMP-jev je tako odvisna od prehrane (Smet in sod., 2018). Tudi Klamsteiner in sod. (2020) so proučevali, kako pomembna je raznovrstna vsebnost hranil v substratu, na katerem vzrejamo ličinke ČBM predvsem za njihovo rast. Bolj kot je substrat razgradljiv in višja, kot je vsebnost beljakovin, bolj učinkovit bo metabolizem ličink in izkoristek hranil (Klamsteiner in sod., 2020).

Črevesna mikrobiota ČBM je lahko, poleg vsega, vir encimov za uporabo v biotehnologiji, kot je na primer izkoristek gena za razgradnjo celuloze (Bogataj, 2018). V svoji raziskavi je Bogataj (2018) proučeval gastrointestinalni trakt ličink ČBM, kjer so odkrili določene AMP-je z zaviralnim delovanjem proti Gram + *Staphylococcus aureus*, Gram - *E. coli* ter glivam *Rhizoctonia solani* in *Sclerotinia sclerotiorum*. Ličinke ČBM proizvajajo tudi lavrično kislino (monolavrin), ki jo najdemo še v kokosovem mleku, olju ter naribanem kokosu. Pomembna je zaradi antimikrobnega in antiglivnega delovanja (Bogataj, 2018).

### 1.3.2 Kemijska tveganja

Previsoke koncentracije posameznih toksičnih elementov lahko delujejo nefrotoksično, nevrotoksično, povzročajo poškodbe pljuč ali alergijske reakcije in imajo lahko estrogene aktivnosti (Schrögel in Wätjen 2019).

Nekateri elementi so sestavni del razgradnje v črevesju. Sem sodijo Cu, Fe in Zn. Če je njihova koncentracija previsoka, se kopičijo v epitelih celicah črevesja, malfigijevih tubulih in maščobnih celicah ličink. Elementi, ki so toksični že v majhnih količinah, npr. Cd, svinec (Pb)

in živo srebro (Hg), se prav tako vgradijo v omenjene strukture s pomočjo proteinov metalotioneinov, ki omogočajo njihovo akumuliranje v lizosomih. Povečana absorpcija Cd poteka tudi skozi Ca-kanale v črevesju. Za ličinke ČBM je namreč značilno, da imajo lahko do 10-krat večjo vsebnost Ca kot druge vrste ličink, kar pomeni, da lahko akumulirajo tudi večje količine Cd (Gold in sod., 2018).

Diener in sod. (2015) so ugotavljali vpliv Cd, Pb in Zn na rast ličink ter končno akumulacijo v biomasi. Nobena od treh analiziranih težkih kovin ni vplivala niti na maso prepupe niti na čas razvoja in razmerje med spoloma. Kljub vsemu pa je bila v prepupi koncentracija težkih kovin v primerjavi z odraslimi muhami znatno višja. Vrednost Zn se je znižala v primerjavi z njegovo koncentracijo v krmi, čeprav so med rastjo ličink dodajali vedno večjo količino. Avtorji ta rezultat pripisujejo aktivni ureditvi prenosa znotrajceličnega Zn, saj se ta navadno kopiči v eksoskelet in se med levitvijo izgubi.

Ocena faktorjev bioakumulacije (koncentracija v organizmu deljena s koncentracijo v substratu) pokaže kopičenje težkih kovin v organizmu (Scrogel, 2019). Za Pb so bili določeni faktorji bioakumulacije  $<1$ , saj so koncentracije Pb iz raziskave Diener in sod. (2015) v ličinkah ostale manjše, kot je bila koncentracija v krmi. Po drugi strani pa so Maryanski in sod. (2001) ugotovili, da ličinke in prepupe kopičijo Cd s faktorjem bioakumulacije  $> 1$ . Kot možna obrambna reakcija proti povišanim koncentracijam Cd je bila ugotovljena aktivnost beljakovin iz družine HSP70 (Braeckman in sod., 1999; Schrögel in Wätjen, 2019). Diener in sod. (2015) so v ličinkah dokazali približno štirikrat nižje koncentracije Ni in Cr v primerjavi s substratom za hranjenje, nekoliko višje koncentracije pa v preostalem materialu, kar kaže na učinkovito izločanje. Prav tako niso ugotovili kopičenja arzena (As), kajti vrednosti v krmi, ličinkah in ostankih substrata so bile zelo primerljive. Hg se v ličinkah ni kopičil, saj je bila dobljena nekoliko večja koncentracija v substratu za gojenje kot v začetni krmi, kar potrjuje, da ličinke izločajo Hg.

Povečane koncentracije Cd in Cr v substratu povzročajo upočasnen razvoj ličink. Cd in Cr nimata škodljivih učinkov na njihovo preživetje (Lindqvist in sod., 1997; Gintenreiter in sod., 1993; Braeckman in sod., 1999; Biancarosa in sod., 2018). Cd se kopiči v ličinki in prepupi,

kar potrjujejo ugotovljene večje koncentracije v ličinkah kot v začetni krmi. Koncentracije Cr v ličinkah in prepupah pa so manjše od koncentracije v krmi (Schrögel in Wätjen, 2019).

Leta 2016 je Lalander s sod. raziskovala akumuliranje farmacevtskih in pesticidnih proizvodov. Ličinke so vzrejali na hrani za pse, in sicer v treh kompostnih sistemih: prvi je vseboval substrat s farmacevtskimi pripravki in pesticidi z ličinkami, drugi je bil brez ličink (kontrola) in tretji z ličinkami brez farmacevtskih pripravkov ter pesticidov. Inokulurali so tri farmacevtske pripravke (karbamazepin, roksitromicin in trimetoprim) in dva pesticida (azoksistrobin in propikonazol). Rezultati so pokazali, da je bil razpolovni čas za vseh pet substanc krajši pri sistemu z ličinkami, poleg tega pa v njih ni bilo akumuliranja. To bi lahko pomenilo veliko vlogo ČMB pri izločanju farmacevtskih pripravkov v okolje. Različni ksenobiotiki, kot so antibiotiki in pesticidi, predstavljajo zaradi svoje kompleksne strukture nevarnost v okolju, saj ostanejo zelo dolgo stabilni. Ne samo, da se lahko ličinke ČBM prehranjujejo na takšnem substratu, ugotovljene so bile skrajšane polovične dobe razgradnje teh pripravkov po njihovi predelavi v črevesju ličink. Takšen kompost bi se lahko ponovno uporabil brez nevarnosti kontaminacije okolja. Podobne značilnosti so bile ugotovljene tudi pri drugih vrstah žuželk (Smet in sod., 2018).

#### 1.4 ZAKONODAJA

Uporaba žuželk v prehranske in krme namene je v Evropi, kjer ni tradicionalne zgodovine entomofagije, novo področje, ki ga je potrebno ustrezno zakonsko urediti. Na prvem mestu je zagotavljanje varnosti potrošnikov, zato imamo v primeru odobritve nove hrane stroga pravila. Žuželke niso del Codex Alimentarius-a, dokumenta, v katerem je zbrano vse, kar sodi med hrano. Dokler žuželke ne bodo dodane, bo to imelo zelo velik vpliv na sprejetje pri potrošnikih in na prilagajanje zakonodaje (Wang in Shelomi, 2017).

Obstaja več sklopov zakonodaje, ki vplivajo na uporabo nevretenčastih vrst živali v krmne namene. Zakonodajno gledano, so »žuželke za krmo« vključene v tri sklope zakonodaje: o živalskih stranskih proizvodih, ki niso namenjeni prehrani ljudi (ŽSP; Živalski Stranski Proizvodi), zakonodajo o transmisivnih spongiformnih encefalopatijah (TSE) in krmno zakonodajo, pri čemer je potrebno upoštevati, v kakšni obliki bi bile žuželke uporabljene v

prehrani živali, pri kateri živalski vrsti bi se jih uporabilo v prehrani, postopek proizvodnje in/ali predelave, nadzor nad varnostjo takšnih proizvodov in podobno.

V skladu s 3. členom Uredbe 178/2002/ES se pod pojmom »krma« razumejo snovi ali izdelki (vključno z aditivi), ki so predelani, delno predelani ali nepredelani in ki se uporabljajo za krmljenje živali.

Med rejne živali se uvršča vsako žival, za katero človek skrbi, jo pita ali vzreja za proizvodnjo hrane, volne, perja, kože ali katerih koli drugih proizvodov, pridobljenih iz živali, ali za druge rejne živali (3(6)(a) člen Uredbe 1069/2009/ES). Vrste žuželk, gojene v EU, ne smejo biti patogene ali imeti drugih škodljivih učinkov na zdravje rastlin, živali ali ljudi, prav tako ne smejo biti opredeljene kot vektorji človeških, živalskih ali rastlinskih patogenov ter ne smejo biti zaščitene ali opredeljene kot invazivne tujerodne vrste.

Ob upoštevanju ocene tveganja ter mnenja EFSA je na seznamu sedem vrst žuželk, ki se jih lahko goji v EU in ki izpolnjujejo varnostne pogoje za proizvodnjo žuželk za namen uporabe v krmni verigi: hišni črček (*Acheta domesticus*), pasasti črček (*Grylloides sigillatus*), poljski črček (*Gryllus assimilis*), rumeni moka (*Tenebrio molitor*), manjši moka (*Alphitobius diaperinus*), črna bojvniška muha (*Hermetia illucens*) in navadna muha (*Musca domestica*); uredba določa tudi substrate, dovoljene za krmo žuželk (Sogari in sod., 2019).

Substrat za krmljenje gojenih žuželk lahko vsebuje samo proizvode neživalskega izvora ali proizvode živalskega izvora, ki jih je dovoljeno uporabljati za krmljenje rejnih neprežvekovalcev. Uporaba fekalij in ločene vsebine prebavnega trakta za krmo (substrata) žuželk je prepovedana (6. člen, v povezavi s 1. točko Priloge III, Uredbe 767/2009/ES). Uporaba določenih substratov, kot so gnoj, kuhinjski odpadki ali bivša živila, ki vsebujejo meso in ribe, ni dovoljena (11. člen Uredbe 1069/2009/ES).

Za krmljenje gojenih žuželk se lahko uporablja sledeči živalski substrat: ribja moka, proizvodi iz krvi neprežvekovalcev, kalcijev in trikalcijev fosfat živalskega izvora, hidrolizirane beljakovine iz neprežvekovalcev, hidrolizirane beljakovine iz kož prežvekovalcev, želatino in kolagen iz neprežvekovalcev, jajca in jajčne proizvode, mleko, proizvode na osnovi mleka,

proizvode, pridobljene iz mleka, in kolostrum, topljene maščobe in med. Glede uporabe rastlinskega substrata (npr. pivskih tropin, ostankov pivovarskega ječmena in kvasa ...) veljajo identična pravila kot za druge rejne živali.

Glavni proizvod reje ČBM so žive ličinke, ki se jih praviloma odda v predelovalni obrat, kjer se usmrtijo, in kot ŽSP kategorije 3 uporabijo za proizvodnjo predelanih živalskih beljakovin (PŽB) ali hrane za hišne živali.

Ko se ličinke usmrti (obdela s temperaturo – kuhanje ali zamrzovanje), začne veljati ŽSP-zakonodaja. V skladu s 3. členom Uredbe 1069/2009/ES se cela telesa ali dele živali, ki niso namenjeni prehrani ljudi, uvršča med ŽSP. V skladu z 10. členom Uredbe 1069/2009/ES so kopenski nevretenčarji uvrščeni med snovi kategorije 3. V proizvodnji krme za rejne in hišne živali se lahko uporabi kot surovino samo predelane snovi kategorije 3, ki morajo biti proizvedene v predelovalnih obratih. Odstopanje od splošnih pravil ŽSP- zakonodaje je znano za določene nerejne živali (živali v živalskih vrtovih, cirkuške živali, ličinke in črve za ribiške vabe, plazilce, ptice roparice, prostoživeče živali in trope lovskih psov).

Posamična krmila, sestavljena iz živalskih stranskih proizvodov ali jih vsebujejo, morajo izpolnjevati zahteve iz Uredbe 1069/2009/ES in Uredbe Komisije 142/2011/EU, za njihovo uporabo pri rejnih živalih pa veljajo prepovedi in omejitve v skladu z Uredbo 999/2001/EU. Žuželka – črna bojovniška muha - sodi med rejne živali (kot opredeljeno v 3(6)(a) členu Uredbe 1069/2009/ES), ki je odobrena za proizvodnjo predelanih živalskih beljakovin v skladu s točko dela A-oddelka 1. poglavja II. Prologe X-Uredbe 142/2011/EU (2.(m) točka Priloge I. Uredbe 999/2001/ES).

Kopenski nevretenčarji so vključeni v katalog posamičnih krmil (9.16.1 in 9.16.2 točka dela C- Priloge Uredbe Komisije 68/2013/EU), kjer je navedeno, da so lahko neobdelani ali obdelani (npr. v posušeni ali zamrznjeni obliki). Iz opisa proizvoda (na oznaki posamičnega krmila) mora biti razvidno, katera vrsta žuželk oziroma njihovih delov so bili uporabljeni. Podatki morajo vsebovati tudi življenjsko obdobje žuželk in vrsto obdelave ali predelave. V opisani obliki se žuželke lahko uporabljajo za prehrano živali, ki niso namenjene proizvodnji hrane.

Predelane živalske beljakovine iz gojenih žuželk imajo v krmni zakonodaji status posamičnega krmila in se jih pod posebnimi pogoji lahko uporablja v krmni verigi akvakulture in rib (9.4.1 točka dela C-Priloge Uredbe Komisije 68/2013/EU).

Živalska maščoba, proizvedena iz gojenih žuželk v skladu s standardom iz Sekcije 3. Poglavja II. Priloge X-Uredbe 142/2011/EU, ima v krmni zakonodaji status posamičnega krmila (9.2.1 točka dela C-Priloge Uredbe Komisije 68/2013/EU), in se lahko uporabi pri rejnih in nerejnih živalih. Za maščobo ne veljajo omejitve glede uporabe iz Uredbe 999/2001/ES pri rejnih živalih.

Pogoje glede uporabe žuželk in njihovih proizvodov za prehrano ljudi zajema Uredba o živilih EU 2015/2283. V skladu z njo so živila ali živilske sestavine iz žuželk opredeljene kot nove in še ne uporabljene za prehrano ljudi v EU pred 15. majem 1997 (Schrögel in Wätjen, 2019).

Pred dajanjem novih živil v promet je treba opraviti postopek odobritve v skladu s členom 10 Uredbe EU 2015/2283, ki vključuje oceno varnosti glede zdravja ljudi. Po drugi strani pa je tradicionalno hrano iz tretje države mogoče priglasiti v skladu s postopkom priglasitve, opisanim v členih 14 in 16, če je zagotovljena evidenca varne uporabe vsaj 25 let. V posebnem primeru gojenih žuželk za uporabo v prehrani ljudi je priporočljivo upoštevati potencialne nevarnosti z vidika mikrobne nevarnosti, kemijske nevarnosti, alergenega potenciala, nevarnosti za okolje in vpliva predelave in skladiščenja, kot je opredeljeno v mnenju EFSA (Schrögel in Wätjen, 2019).

## 1.5 UPORABA LIČINK *H. ILLUCENS* V PREHRANI ŽIVALI

Prehrana rejnih živali v EU temelji v veliki meri na uvoženih beljakovinskih virih, med njimi je najpomembnejša soja moka. Za gojenje soje potrebujemo veliko prostora, kar povzroča izgubo biodiverzitete, stroški pridelave pa so visoki. Moka iz žuželk, tudi iz ČBM, bi v prihodnosti lahko nadomestila sojino in ribjo moko kot vir beljakovin v prehrani živali. Do sedaj smo že večkrat omenili, da vsebujejo žuželke visoke vrednosti vseh esencialnih hranil. Gojili bi jih lahko tudi na gnoju in drugih odpadkih, kar bi omogočilo vzrejo v delno zaprtem krogu (Wang in Shelomi, 2017).

Ličinke ČBM lahko akumulirajo maščobo v svojem telesu, če vsebuje substrat večji delež maščob ali ogljikovih hidratov. Ekstrahirane maščobe so po maščobno kislinski sestavi bolj podobne ribjemu olju kot rastlinskemu. Prepupe vsebujejo veliko omega 3 maščobnih kislin, če v substrat dodajajo ribje ostanke (drobovino) (Wang in Shelomi, 2017). Sealey in sod. (2011) so ugotovili, da je krma iz ličink ČBM velik doprinos v trajnostno akvakulturo. Vzrok je proizvodnja beljakovinsko bogate biomase na beljakovinsko revnem substratu, kar je z ekonomskega vidika cenovno zelo ugodno.

Ličinke ČBM uporabljajo v prehrani perutnine kot delni nadomestek za koruzo ali sojo. Cullere in sod. (2016) niso ugotovili na brojlerjih pasme *Coturnix coturnix japonica* nobene razlike v njihovem prirastu ali masi prsnega mesa, poleg tega ni bilo razlik v okusu, oksidativnem statusu mesa ali vsebnosti holesterola. V skupini, ki so jo hranili z ličinkami ČBM, je bila boljša vrednost pomembnih aminokislin (aspartat, glutamin, alanin, serin, tirozin in treonin). Vendar so ugotovili zvišane vrednosti manj zaželenih nasičenih in mononenasičenih maščobnih kislin. Če ličinkam ČBM odstranimo maščobo, je nezaželenih maščobnih kislin precej manj, poleg tega pa se delež beljakovin poveča na približno 60 %. Ker pa proces ekstrakcije maščob zahteva čas, prostor in denar, ga ne moremo uporabljati v vseh rejah. Kljub temu velja, da je postopek ekstrakcije lahko zelo enostaven, zato bi ga v prihodnosti lahko močno optimizirali (Wang in Shelomi, 2017).

Podobne ugotovitve v raziskavi na brojlerjih pasme *Gallus gallus domesticus* sta opisala tudi Wang in Shelomi (2017). Vrednost maščob je bila nižja, saj so brojlerje krmili z ličinkami ČBM, ki so jim odstranili maščobo. Poleg tega so ugotovili, da so ličinke ČBM zelo zanimive in ješče za perutnino. Iz krme, v katero so dodali ličinke ČBM, so kokoši namerno izbirale ličinke. Tako ČBM predstavljajo dober dodatek perutninski prehrani, saj izboljšajo pokritje potrebe po beljakovinah (Wang in Shelomi, 2017).

Zaradi visoke vsebnosti maščob se lahko ČBM uporabi tudi za proizvodnjo biogoriva, njihov hitin pa za pridobivanje hitozana (van Huis in sod., 2013).

Ugotovljeno je bilo, da naj bi imele ličinke ČBM medicinsko prednost, ker delujejo nutraceutično. Srednjeveržne maščobne kisline, C12:0 (lavrinska kislina), ki jih vsebuje

veliko, naj bi imele probiotični efekt na mikrobioto rejnih živali in celo antibiotični efekt na bolj patogene bakterije v črevesju. Tako bi z ličinkami ČBM v živalski prehrani lahko zmanjšali potrebo po uporabi antibiotikov (Wang in Shelomi, 2017). Razvijajo dva načina uporabe imunskih lastnosti ČBM. Ena temelji na direktnem krmljenju ličink rejnim žival kot oblika probiotika. V tem primeru je potrebno zagotoviti, da antimikrobne molekule ostanejo stabilne med hranjenjem in metabolizmom. Druga oblika zajema ekstrakcijo teh substanc iz ličink in oblikovanje novega tipa antibiotika (Smet in sod., 2018).

## 2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

V nalogi smo v naravnih klimatskih razmerah gojili ličinke ČBM na treh različnih substratih: na gospodinjskih odpadkih, pivskih tropinah in na pšeničnih otrobih ter ugotavljali razlike v hranilni vrednosti, fizikalnih lastnostih in mikrobiološki kontaminaciji. Postavili smo naslednje hipoteze:

1. Ličinke ČBM lahko v poletnem času gojimo v naravnih klimatskih razmerah.
2. Največjo maso bodo dosegle ličinke na gospodinjskih odpadkih, na najbolj raznovrstnem substratu, ki vsebuje največ beljakovin in maščob.
3. Najslabše rezultate bodo dosegle ličinke, gojene na pšeničnih otrobih, ker ti vsebujejo veliko vlaknin.
4. Vsebnost beljakovin v ličinkah se po 12 dneh ne bo spreminjala, vsebnost maščob pa se bo povečevala s starostjo ličink.
5. Po dodatku Ca v substrat se bo vsebnost Ca v ličinkah značilno povečala.
6. Mikrobiološka slika bo najslabša pri ličinkah, gojenih na gospodinjskih odpadkih.

### 3 MATERIALI IN METODE

Poskus smo izvedli v prostorih in po protokolih gojenja ČBM podjetja Larvero d.o.o., ki nam je zagotovilo potrebno število jajčec in posledično ličink ČBM.

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Substrati za gojenje ličink *H. illucens*

Za rejo ličink ČBM smo uporabili tri organske substrate:

1. pšenične otrobe (PO),
2. gospodinjske odpadke (GO),
3. pivske tropine (PT).

Pšenične otrobe, proizvajalca Mlin Katić, smo kupili v Kmetijski zadrugi Radovljica. Pivske tropine smo dobili od Pivovarne Heineken. Kot vir gospodinjskih odpadkov smo uporabili biološke odpadke, doma proizvedene. Vsebovali so olupke sadja in zelenjave ter kose mesa.

Za pripravo substrata PO smo zmešali pšenične otrobe z vodo, in sicer v razmerju 1:1. GO smo zmleli na 2-3 cm velike kose.

Substrate smo skladiščili v zaprtem, temnem in hladnem prostoru. PT in GO smo skladiščili v nepredušno zaprtih plastičnih sodih, PO pa smo hranili v dobro zaprti originalni embalaži.

##### 3.1.2 Ličinke *H. illucens*

Proces reje ličink ČBM sestavljata dve fazi. V prvi smo pobrali sveže izležena jajčeca ČBM iz komore, v kateri se odvija parjenje muh. Jajčeca smo stehali ter pripravili 6 vzorcev mase, približno 1 g (1,03 g +/- 0,3 g). Vzorce smo položili na perforirani podstavek, tega pa na vrh PO. Substrat in podstavek z jajčeci smo položili v steklene posode z večkrat preluknjanim pokrovom, da je bilo zagotovljeno prezračevanje. Tako pripravljeno posodo smo pustili šest dni v temnem in toplem prostoru (26 +/- 3 °C). Po tem času so se v vseh steklenih posodah iz

jajčec izlegle ličinke ČBM, ki so predstavljale začetne kolonije (Slika 12). Sledila je druga faza reje, v kateri smo ličinke ČBM vzrejali na predvidenih substratih.



Slika 12: Steklena posoda po zaključenem obdobju inkubacije

V predhodno oštevilčene plastične posode (6 plastičnih posod, dolžine 60 cm, širine 40 cm in višine 12 cm) smo dodali začetne kolonije (Slika 13). Za vsak substrat smo imeli pripravljeni 2 posodi. V obdobju dveh tednov smo po potrebi hranili ličinke.



Slika 13: Začetna kolonija v substratu na začetku reje, v plastični posodi

20. dan poskusa smo populacijo ličink prepolovili v vseh šestih posodah in pol populacije ohranili v izvorni posodi, ki je imela oznako »/a«, drugo polovico pa smo jo prestavili v novo posodo z oznako »/b« (Slika 16). Tako smo podvojili število posod na 12, to je s ciljem, da preverimo vpliv bogatenja substrata s  $\text{CaCO}_3$  v obliki fino mletega prahu (Jata Emona). Ličinke v posodah z oznako »/a« so predstavljale referenco, saj smo jih do konca hranili z istim

substratom. V posodah »/b« pa smo substratu dodali še  $\text{CaCO}_3$ , in sicer v takšni količini, da je predstavljal 5 % mase substrata. Eksperiment smo zaključili po 34 dneh.

Ličinke ČBM smo gojili v omari, za to prilagojeni, v kateri je bila odprta ena stranica, s čimer smo zagotovili naravno prezračevanje. Poskus je torej potekal v naravnih razmerah, to je od 21. 7. do 24. 8. 2020 (34 dni).

V Preglednici 2 je naveden urnik hranjenja, to je po dnevih, in masa dodanega substrata.

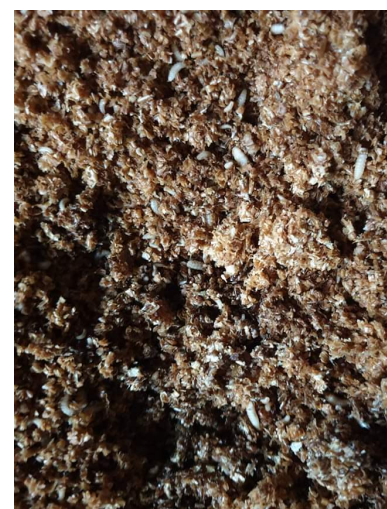
Termin hranjenja in količina dodanega substrata sta bila določena izkustveno in na podlagi trenutnega stanja v posodi. Ključna parametra sta bila delež nepredelanega substrata in velikost ličink. Trudili smo se, da bi v vse posode dodajali z enako časovno periodo enako količino substrata. To nam je v prvi tretjini poskusa še uspevalo, kasneje pa so bile prevelike razlike med posodami.

Tabela 2: Urnik hranjenja z dodanimi količinami substrata (g)

| Dan/<br>Posoda | 1/a<br>PO | 1/b<br>(Ca) | 2/a<br>PO | 2/b<br>(Ca) | 3/a<br>GO | 3/b<br>(Ca)  | 4/a<br>GO | 4/b<br>(Ca)   | 5/a<br>PT | 5/b<br>(Ca)  | 6/a<br>PT | 6/b<br>(Ca)  |
|----------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|--------------|-----------|---------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| 0              | 183       |             | 153       |             | 99        |              | 131       |               | 145       |              | 104       |              |
| 6              | 508       |             | 537       |             | 546       |              | 530       |               | 545       |              | 516       |              |
| 10             | 520       |             | 520       |             | 560       |              | 560       |               | 600       |              | 600       |              |
| 12             | 750       |             | 750       |             | 750       |              | 750       |               | 750       |              | 750       |              |
| 13             |           |             |           |             | 750       |              | 750       |               |           |              |           |              |
| 14             | 750       |             | 750       |             | 1500      |              | 1500      |               | 1000      |              | 1000      |              |
| 15             |           |             |           |             |           |              |           |               | 1022      |              |           |              |
| 16             | 500       |             | 650       |             | 2000      |              | 2000      |               |           |              | 1006      |              |
| 17             |           |             |           |             |           |              |           |               | 1600      |              |           |              |
| 18             | 1000      |             | 1000      |             |           |              | 2000      |               |           |              | 1600      |              |
| 20             | 750       | 750<br>(57) | 750       | 750<br>(38) | 1600      | 1600<br>(80) | 1600      | 1626<br>(101) | 1502      | 1575<br>(75) | 1503      | 1500<br>(75) |
| 22             |           |             | 750       |             |           |              |           |               |           |              |           |              |
| 24             | 750       | 750<br>(40) | 750       | 750<br>(40) | 1600      | 1600<br>(80) | 1600      | 1600<br>(80)  | 1500      | 1500<br>(75) | 1500      | 1500<br>(75) |
| 28             |           |             |           |             | 1460      | 1600<br>(89) | 1590      | 1479<br>(78)  | 632       | 579<br>(84)  | 624       | 529<br>(65)  |

Legenda: PO - pšenični otrobi; GO – gospodinjiski odpadki; PT – pивske tropine

Sliki 14 in 15 prikazujeta rejo ličink ČBM po osmih dneh in na koncu poskusa.



Slika 14: Ličinke *H. illucens* po osmih dneh reje

Na levi sliki so kot substrat uporabljene pивske tropine, v sredini so kuhinjski odpadki in na desni pšenični otrobi.



Slika 15: Ličinke *H. illucens* na zadnji dan eksperimenta

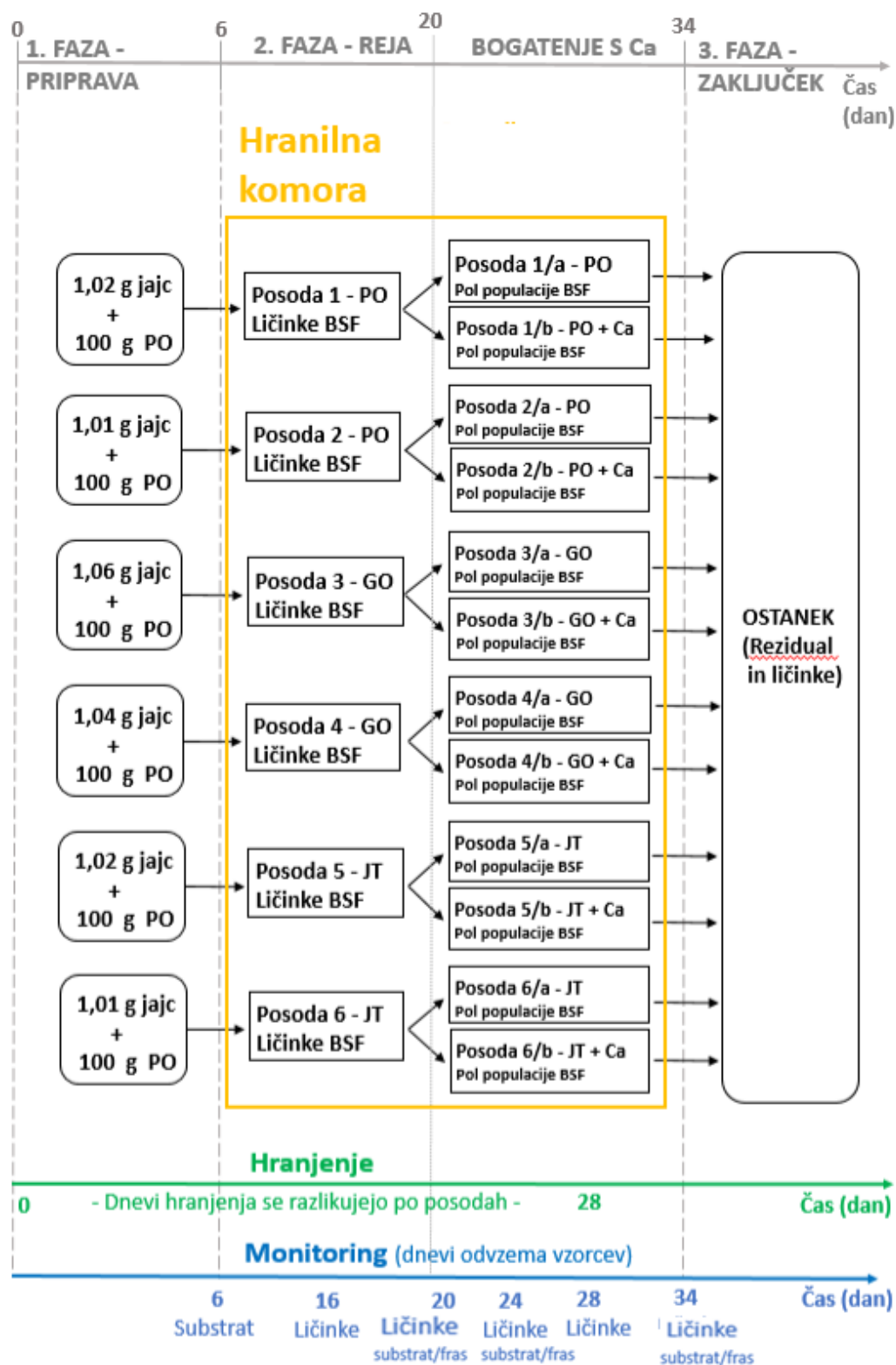
Na levi sliki so kot substrat uporabljene pивske tropine, v sredini so kuhinjski odpadki in na desni pšenični otrobi.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Vzorčenje ličink in substrata

Shema vzorčenja je predstavljena na Sliki 16. Na začetku poskusa smo vzorčili vse tri substrate. Kasneje smo substrat odvzeli še 20., 24. in 34. dan, vendar je bil kasneje substrat že pomešan z iztrebki ličink, odmrliimi ličinkami in njihovimi deli, zato ga imenujemo fras. Tega smo ločevali od ličink s sejanjem skozi posebej oblikovana sita.

Ličinke smo petkrat vzorčili, dvakrat pred začetkom bogatenja s  $\text{CaCO}_3$  in trikrat po njem. Vzorčenje na 20. dan smo izvedli na izvornih šestih posodah. Šele po tem smo kolonije v posodah prepolovili in prestavili v podvojene posode ter začeli z bogatenjem s  $\text{CaCO}_3$  v »b« posodah.



Slika 16: Shema poskusa (PO – pšenični otrobi; GO – gospodinjski odpadki; JT – pivske tropine) s časovnico odvzema vzorcev.

Vzorci ličink ali substrata/frasa so bili približno 100 g mase. Vzorčili smo v sterilne posode, postavljene na tehniko. Po doseženi masi 100 g smo vzorce zapakirali, pri čemer smo vzorce ličink pokrili s pokrovom, ki je imel majhni luknji, in tako omogočali izmenjavo plinov. Vzorce smo po odvzemu hranili na temperaturi od 1 do 8 °C ter jih v laboratorij dostavili v najkrajšem možnem času (v 24 urah). Del svežega vzorca smo uporabili takoj za mikrobiološke preiskave, preostanek pa zamrznili na -20 °C za kemijske analize.

### **3.2.2 Merjenje fizikalnih parametrov ličink *H. illucens***

Pri vsakem vzorčenju ličink smo izbrali še 15 ličink in izvedli meritve njihovih fizikalnih značilnosti (dolžine, širine in mase). Tem ličinkam smo nato s pomočjo tehtnice in kljunastega merila izmerili dolžino in širino ter stehali maso. S pomočjo digitalnega kljunastega merila smo izmerili dolžino in širino živih ličink. Ločljivost merilnika je bila 0,01 mm. Pri izvajanju meritev smo ličinke položili na mizo, da niso bile izpostavljene dodatnemu pritisku, ki bi lahko vplival na meritve. Za tehtanje smo uporabili certificirano tehtnico (Hyb-1000, Electronic balance) z ločljivostjo 0,01 g.

### **3.2.3 Kemijske analize**

Vzorce substratov, frasa in ličink smo analizirali na osnovne skupine hranilnih snovi (surove beljakovine, maščobe, vlaknina, pepel in vlaga), elemente (Na, Mg, P, K, Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Cd, Pb, As in Se) in maščobne kisline.

Odtaljene vzorce smo čez noč sušili na 60 °C, jih nato zmleli in uporabili za nadaljnje analize. V vzorcih smo določali vsebnost vlage, surovih beljakovin, maščob, pepela in vlaknin z metodami, opisanimi v Uredbi Komisije (ES) št. 152/2009, Priloga III (43). Elemente smo določali z metodo indukcijsko sklopljene plazme z masno detekcijo (ICP-MS).

#### **3.2.3.1 Določanje vlage**

Tehtič smo stehali skupaj s pokrovom natančno na 1 mg. V tehtič smo zatehtali 5 g vzorca, na 1 mg natančno in ga s pokrovom vred ponovno stehali. Odprt tehtič z vzorcem smo postavili za 4 ure v sušilnik s temperaturo  $103 \pm 2$  °C. Po končanem sušenju smo tehtič pokrili s

pokrovom in ga postavili v eksikator, da se je ohladil. Nato smo ga ponovno tehtali na 1 mg natančno. Iz dobljenih podatkov smo izračunali odstotek vlage v vzorcu.

#### 3.2.3.2 Določanje surovih beljakovin

V razklopno epruveto smo natehtali od 0,1 g do 1,0 g vzorca na 1 mg natančno. Dodali smo dve Kjeldahlovi tableti in 25 ml koncentrirane  $H_2SO_4$  ter vse premešali. Razklopne epruvete smo postavili v razklopni termoblok in jih segrevali do vrenja. Nadaljevali smo, dokler vzorci niso postali svetlozelene barve. Po spremembi barve smo jih pustili vreti še 2 uri. Ko so se ohladili, smo v vsako raztopino dodali 20 ml deionizirane vode. Razklopno epruveto smo nato vstavili v destilacijsko enoto Kjeldahlovega aparata. Destilacijo smo izvedli z dodajanjem 32 % NaOH. Nastale produkte smo lovili v vodno raztopino  $H_3BO_3$  in mešanico titrirali z 0,1 M HCl. Po končani titraciji smo iz dobljenih podatkov izračunali procenete surovih beljakovin v vzorcu.

#### 3.2.3.3 Določanje surovih maščob

V 250 ml erlenmajerico smo natehtali 2,5 g zmletga vzorca na 1 mg natančno. Dolili smo 20 ml koncentrirane HCl in 80 ml deionizirane vode in raztopino segreli do vrenja. Nato smo dodali še 10 g diatomejske zemlje in vrelnne steklene kroglice. Raztopino smo pustili vreti 1 uro. Po tem smo vzorce razredčili z nekaj vrele vode in še vroče filtrirali. Filtrni papir smo nato postavili v sušilnik za 1 uro, to je na temperaturo  $100 \pm 2$  °C. Steklene lončke, v katere smo lovili maščobe, smo tehtali. Po sušenju smo filtrirni papir vložili v stekleni tulec in ekstrahirali v Soxhletovem aparatu. Po končani ekstrakciji smo steklene lončke ponovno tehtali. Iz dobljenih podatkov smo izračunali odstotek surovih maščob v vzorcu.

#### 3.2.3.4 Določanje surovih vlaknin

V erlenmajerico smo natehtali 1 g vzorca na 1 mg natančno in dodali 150 ml 0,13 M  $H_2SO_4$ . Mešanico smo postavili na grelni ploščo in pustili vreti 30 min. V filtrirni lonček smo natehtali 1 g diatomejske zemlje in skozenj filtrirali pripravljeno raztopino. Vsebino lončka smo nato trikrat sprali s 30 ml vrele vode. Ostanek vzorca smo stresli v erlenmajerico in prilili

150 ml KOH. Mešanico smo ponovno postavili na grelni ploščo in pustili vreti 30 min. Vzorec smo prefiltrirali in trikrat sprali s 30 ml vrele vode. Ostanek smo sprali s 25 ml acetona in filtrat prenesli v žarilni lonček. Vzorec smo čez noč posušili v sušilniku, to je pri 130 °C, do konstantne mase. Nato smo ga ohladili v eksikatorju in stehtali. Vzorec smo nato žgali 45 minut pri temperaturi 475-500 °C. Ohlajenega smo ponovno stehtali. Iz dobljenih podatkov smo izračunali odstotek surovih vlaknin v njem.

### 3.2.3.5 Določanje surovega pepela

Stehtali smo žarilni lonček. Vanj smo nato natehtali 5 g vzorca na 1 mg natančno. Postavili smo ga v žarilno peč in ga žgali pri temperaturi 550 °C, in sicer do nastanka svetlosivega pepela. Lonček smo ohladili v eksikatorju in hladnega stehtali. Iz dobljenih podatkov smo izračunali odstotek surovega pepela v vzorcu.

### 3.2.3.6 Določanje elementov

V teflonski lonček smo natehtali 0,25 g vzorca na 1 mg natančno. V lonček smo dodali 5,0 ml HNO<sub>3</sub> in 1,0 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pustili stati eno uro. Lonček smo zaprli s pokrovčkom XP 1500 Plus in ga vstavili v visokotlačno posodo. Po dvanajst visokotlačnih posod z lončki smo postavili v mikrovalovni sistem in jih 20 minut segrevali na 200 °C. Ohlajene raztopine vzorcev smo iz lončkov kvantitativno prenesli v 100 ml merilne bučke in jih z deionizirano vodo dopolnili do oznake. Raztopine smo prefiltrirali in jih pred merjenjem primerno razredčili.

Za določanje vsebnosti elementov smo uporabili ICP masni spektrometer Varian 820-MS. Aparaturo smo pred vsako sekvenco optimizirali z delovno standardno raztopino VAR-TS-MS. Preverili smo stabilnost instrumenta, z optimizacijo smo zvišali odzive posameznih elementov in znižali interferenčne vplive iz poliatomskih ionov in dvojno nabitih ionov. Delovne standardne raztopine za pripravo umeritvenih krivulj smo pripravili z ustreznimi multielementnimi standardi (Merck, Darmstadt, Nemčija, in Inorganic Ventures, Lakewood, ZDA). Da bi se izognili znanim interferencam, smo izbrali naslednje izotope elementov: <sup>23</sup>Na, <sup>24</sup>Mg, <sup>31</sup>P, <sup>39</sup>K, <sup>44</sup>Ca, <sup>55</sup>Mn, <sup>57</sup>Fe, <sup>60</sup>Co, <sup>63</sup>Cu, <sup>66</sup>Zn, <sup>111</sup>Cd, <sup>206+7+8</sup>Pb, <sup>75</sup>As in <sup>78</sup>Se. Pri določanju As in Se smo za odpravo poliatomskih referenc uporabili CRI-modul z vodikom. Za korekcijo spektralnih

interferenc smo uporabili medelementne korekcijske algoritme, vnesene v procesirno metodo programa ICP-MS Expert.

### 3.2.3.7 Določanje maščobnih kislin

Za določanje maščobnih kislin smo uporabili maščobo, ki smo jo dobili po postopku, opisanem v Poglavju 3.2.3.3. V 15 ml epruveto smo natehtali približno 100 mg maščobe. Dodali smo ji 2 ml heksana in 1 ml 2 M KOH v metanola. Vzorec smo mešali 30 sekund in ga dali za 5 min v vodno kopel s temperaturo 70 °C, da je potekla hidroliza maščob, ki ji je sledila tvorba metilnih estrov maščobnih kislin. Vzorec smo nato ohladili, dodali 1,2 ml 1 M HCl ter nežno premešali. Nato smo dodali še 1 ml heksana in ponovno nežno premešali. Počakali smo, da se faze ločijo. Zgornjo fazo smo odpipetirali v vialo za analizo s plinsko kromatografijo.

Metilne estra maščobnih kislin smo analizirali s pomočjo plinske kromatografije (GC) s plamensko ionizacijskim detektorjem (FID). Celoten čas analize je bil 35 minut.

Analizni podatki:

- Instrument: Agilent Technologies 6890 Plus Series
- Kolona: HP-88 100 m x 0,25 mm x 0,2 mm
- Temperatura injektorja: 250 °C
- Injektor: split, razmerje 50 : 1
- Nosilni plin: helij, 1,4 ml/min konstanten pretok
- Temperaturni program: iz 140 °C na 145 °C 8 °C/min, 4 °C/min 220 °C, 10 °C/min 240 °C
- Temperatura detektorja FID: 260 °C
- "Makeup" plin: dušik
- Plina detektorja: vodik in sintetični zrak
- Volumen vzorca: 1 µl

Ker za enake koncentracije kislin v topilu ne dobimo enakih površin, moramo predhodno določiti faktorje odzivnosti detektorja (Rf) za posamezne metilne estre maščobnih kislin. Rf

smo določili s pomočjo kromatograma standardne raztopine mešanice 37 metilnih estrov maščobnih kislin (Supelco 37 FAME CRM47885).

$$R_f = \frac{m_i \times \sum A}{A_i \times \sum m}$$

$m_i$  – masa posameznega estra maščobne kisline v standardni raztopini

$\sum m$  – vsota mas vseh 37 estrov maščobnih kislin v standardni raztopini

$A_i$  – površina posameznega estra maščobne kisline

$\sum A$  – vsota površin vseh 37 estrov maščobnih kislin

Za preračun vsebnosti maščobnih kislin iz vsebnosti estrov maščobnih kislin smo uporabili še konverzijski faktor (FA):

$$FA_i = \frac{Mr_{MKi}}{Mr_{MEMKi}}$$

$Mr_{MKi}$  – relativna molekulska masa i-te maščobne kisline

$Mr_{MEMKi}$  – relativna molekulska masa metilnega estra i-te maščobne kisline

Utežni delež posamezne maščobne kisline (odstotek, ki ga predstavlja posamezna maščobna kislina glede na vse maščobne kisline, ki jih detektor zazna) v vzorcu smo določili na osnovi površin kromatograma,  $R_f$  in  $FA_i$ :

$$ut\%MK_i = \frac{Rf_i \times FA_i \times A_i}{\sum_{i=1}^n (Rf_i \times FA_i \times A_i)} \times 100$$

Iz podatkov o vsebnosti maščobe v vzorcu smo izračunali vsebnost maščobnih kislin v g/100 g vzorca.

Najvažnejše maščobne kisline, ki smo jih določali:

- C10:0 kaprinska kislina (dekanojska kislina),
- C12:0 lavrinska kislina (dodekanojska kislina),

- C14:0 miristinska kislina (tetradekanojska kislina),
- C14:1 miristoleinska kislina ((Z)-9-tetradecenojska kislina),
- C15:0 pentadekanojska kislina,
- C16:0 palmitinska kislina (heksadekanojska kislina),
- C17:0 margarinska kislina (heptadekanojska kislina),
- C17:1 cis-10-heptadekanojska kislina,
- C18:0 stearinska kislina (oktadekanojska kislina),
- C18:2n6c linolna kislina ((Z,Z)-9,12-oktadekadienojska kislina),
- C20:0 arašidna kislina (eikozanojska kislina),
- C18:3n6 gama-linolenska kislina ((Z,Z,Z)-6,9,12-oktadekatrienojska kislina),
- C18:3n3 alfa-linolenska kislina ((Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienojska kislina),
- sum C20:1n cis-11-eikozenojska in cis - 9-eikozenojska kislina
- C21:0 heneikozanojska kislina,
- C20:2 eikozadienojska kislina (cis-11,14-eikozadienojska kislina),
- C22:0 behenojska kislina (dokozenojska kislina),
- C20:4n6 adrenska kislina (cis-7,10,13,16-dokozatetraenojska kislina),
- C23:0 trikozenojska kislina,
- C22:5 eikozapentaenojska kislina (cis-5,8,11,14,17-eikozapentaenojska kislina),
- C22:6n3 dokozaheksaenojska kislina, DHA (cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenojska kislina).

#### 3.2.4 Mikrobiološke analize

Vzorci ličink smo v ustrezni embalaži dostavili v mikrobiološki laboratorij Enote za varno hrano na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani. Vsak vzorec je bil označen z zaporedno številko, ki ga je spremljala do konca preiskave.

Pred začetkom preiskav in odvzemom vzorca smo ličinke uspavali v zamrzovalniku na -18 °C. Embalažo smo odpirali aseptično, tako da smo pred odprtjem obrisali rob s 70 % etanolom. S sterilnim priborom (kovinsko žlico) smo odvzeli zahtevano maso vzorca v sterilno PVC vrečko. Vsaka analiza je zahtevala drugačno maso vzorca (preiskava na *Salmonella* spp. 25 g, na *Enterobacteriaceae* ter *E. coli* pa 10 g).

#### 3.2.4.1 Preiskava na bakterije vrste *Salmonella* spp.

Preiskavo smo izvajali skladno s standardom ISO 6579. 25 g vzorca ličink smo dodali 9-kratno količino neselektivnega obogatitvenega gojišča BPW (puferirana peptonska voda). Homogeniziran vzorec smo inkubirali od 16 do 20 ur pri  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . 0,1 ml homogenizirane suspenzije smo prenesli v selektivno obogatitveno gojišče RVS (bujon Rappaport-Vassiliadis s sojo; 10 ml) ter inkubirali 24 ur pri  $42\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . 1 ml homogenizirane suspenzije pa smo prenesli v drugo selektivno obogatitveno gojišče MKTTn (Muller Kaufmann tetrationsatni bujon z novobiocinom; 10ml) ter inkubirali 24 ur pri  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

#### *Izolacija in potrditev*

Po inkubaciji smo obogatitveno gojišče dobro premešali in suspenzijo s cepilno zanko precepili na dve selektivni gojišči: XLD (ksiloza lizin deoksiholatni agar) in Rambach agar. Plošče smo inkubirali 24 ur pri  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

Sledila je determinacija sumljivih kolonij na osnovi masne spektrometrije z aparaturo MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight).

#### 3.2.4.2 Preiskava na bakterije vrste *Enterobacteriaceae*

Preiskavo smo izvajali po postopku ISO 21528-2. Najprej smo pripravili osnovno raztopino, v katero smo 10 g vzorca ličink natehtali, dodali smo 9-kratno količino peptonske slane raztopine ter vzorec homogenizirali. Nato smo iz primarne suspenzije naredili še decimalne razredčitve  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  in  $10^{-6}$ . Iz primarne suspenzije smo odpipetirali 1ml in temu dodali 9 ml peptonske slane raztopine. Tako smo dobili razredčitev  $10^{-2}$ . Za nadaljnje razredčitve smo odpipetirali v prazne epruvete po 1ml suspenzije predhodne razredčitve in v vsaki dodali 9 ml peptonske slane raztopine, ki smo jo homogenizirali. Nato smo 1ml iz vsake razredčitve odpipetirali v prazne petrijevke in dodali 15 ml stopljenega, pri  $45\text{ °C}$  ohlajenega, gojišča VRBGA agar (vijolično rdeči žolčni agar z glukozo). Ko se je agar strdil, smo ga dodatno prelili s 5 ml gojišča, s čimer smo želeli preprečiti difuzno rast kolonij. Plošče smo nato inkubirali 48 ur pri  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  s pokrovom obrnjenim navzdol. Po inkubaciji smo z bakteriološko zanko zrasle kulture prenesli na krvni agar (Blood agar base No2; Oxoid) in inkubirali 24 ur na  $37\text{ °C}$ .

$\pm 1$  °C. Sledila je determinacija kolonij na osnovi masne spektrometrije z aparaturo MALDI-TOF.

#### 3.2.4.3 Ugotavljanje števila *E. coli*

Preiskavo smo izvajali po postopku ISO 16649-2. Najprej smo pripravili osnovno razredčitev po enakem postopku kot za preiskavo na enterobakterije. Prav tako smo na enak način pripravili še decimalne razredčitve  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  in  $10^{-4}$ . Prazne petrijevke smo ustrezno označili z datumom, zaporedno številko vzorca, razredčitvijo in imenom bakterije, katere vrsto smo preiskovali (*E. coli*). Z globinskim nasajanjem smo v vsako petrijevko odpipetirali po 1 ml ustrezne razredčitve. Prelili smo s stopljenim TBX agarjem, nežno premešali in počakali, da se je agar strdil. Tako pripravljene plošče smo inkubirali od 18 do 24 ur pri 44 °C. Sledilo je štetje kolonij, ki so bile značilno zeleno-modre barve in izračun rezultata.

#### 3.2.5 Statistična analiza

Podatki so bili zbrani in urejeni v programu Microsoft Excel 365. Izračun osnovnih opisnih statistik ter statistična analiza sta bila narejena v programu R 3.6.2 (R Core Team, 2019). Pri vseh statističnih testih je bila za statistično značilnost uporabljena mejna p vrednost, to je nižja od 0,05.

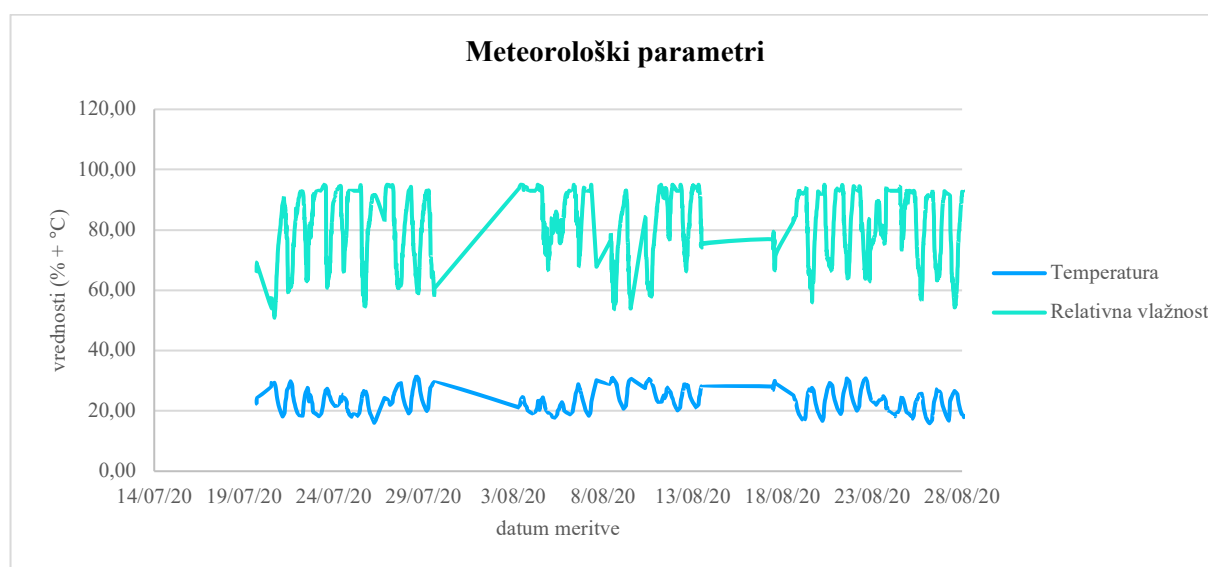
Razlike med parametri v ličinkah med skupinami na različnih substratih in za vsak čas meritve smo testirali z neparametričnim Kruskal-Wallisovim testom vsote rangov, saj podatki niso zadostili predpostavkam za uporabo parametričnih testov (podatki niso bili razporejeni normalno in/ali variance med skupinami niso bile enake). Razlike v vsebnosti Ca v ličinkah med skupino, ki ji je bil v substrat dodan Ca, smo testirali z parametričnim T-testom za neodvisne vzorce. Poleg tega smo izračunali korelacije med parametri v substratu in parametri v ličinkah. Korelacije so podane s Spearmanovim koeficientom korelacije, statistično značilnost pa smo določali glede na prilagojeno p vrednost, in sicer po Holmovi metodi. Interpretacija Spearmanovega koeficientom korelacije je naslednja: 0,00-0,19 – zelo nizka/šibka; 0,20-0,39 – nizka/šibka; 0,40-0,59 – srednja/zmerna; 0,60-0,70 – visoka/močna; 0,80-1,0 – zelo visoka/močna korelacija.

## 4 REZULTATI

Rezultati vseh opravljenih analiz substratov in ličink so prikazani v Prilogi 1.

### 4.1 METEOROLOŠKI PODATKI MED POSKUSOM

Najnižja izmerjena temperatura med poskusom je znašala 15,9 °C, najvišja pa 31,7 °C. Povprečna temperatura je bila tako 23,4 °C. Najnižja izmerjena relativna vlažnost je znašala 50,8 %, najvišja pa 95,0 %. Povprečna vlažnost je bila 82,9 % (Slika 17).



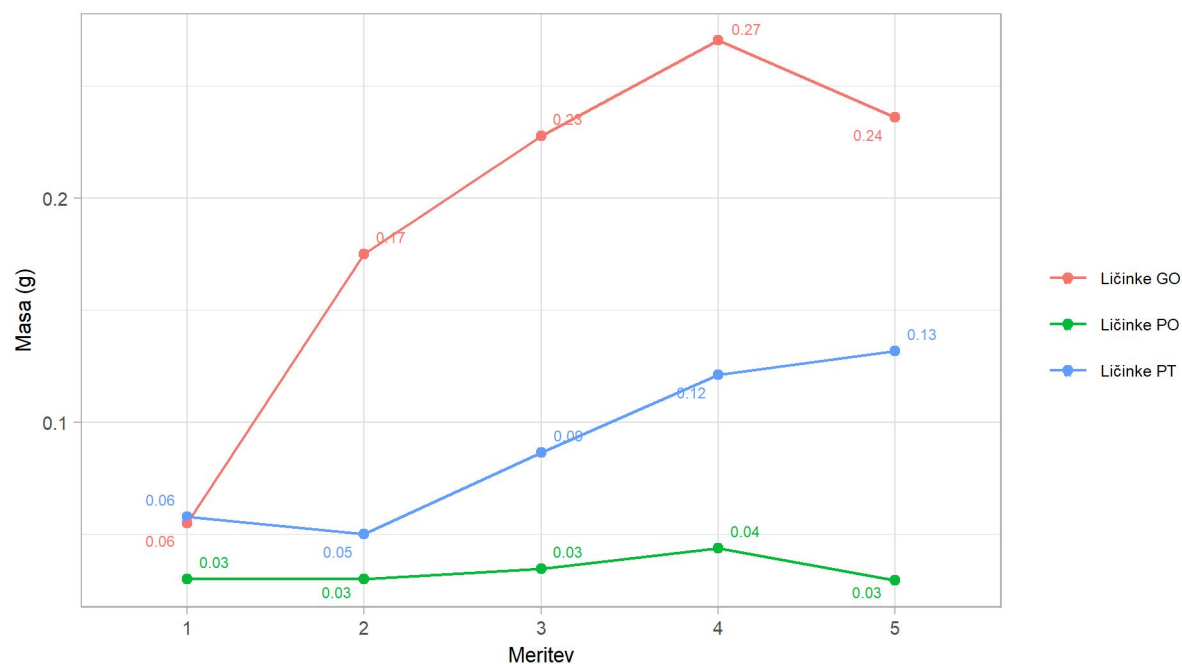
Slika 17: Meteorološki podatki med poskusom

V omari, kjer smo gojili ličinke ČBM, je bila povprečna temperatura zraka  $23,4 \pm 3,8$  °C in povprečna relativna vlažnost  $82,9 \pm 11,4$  %. V posameznem dnevu je temperatura zanihala za 10 °C, vlažnost pa za 30 %.

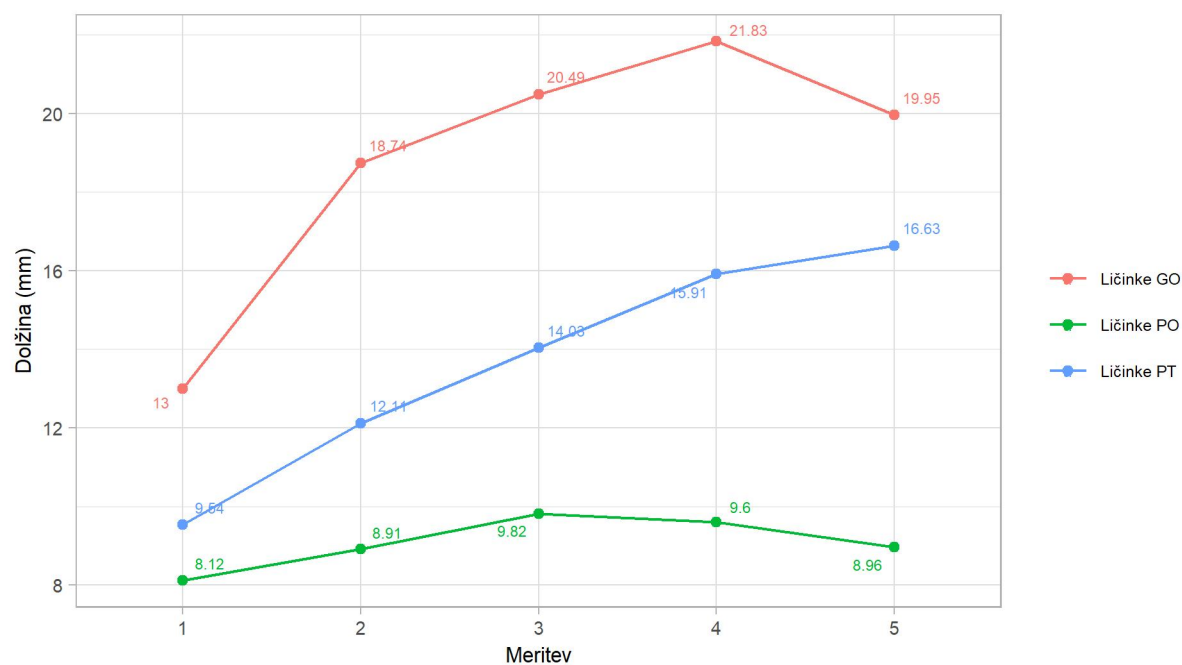
### 4.2 REZULTATI FIZIKALNIH PARAMETROV

Med poskusom so najbolj priraščale ličinke ČBM gojene na GO, najslabše pa ličinke, gojene na PO (Slike 18, 19 in 20). Ličinke ČBM, ki so rastle na GO in PO, so največjo maso dosegle pri 4. odvzemu ( $0,271 \pm 0,031$  g in  $0,036 \pm 0,010$  g), prav tako tudi največjo dolžino ( $21,381 \pm$

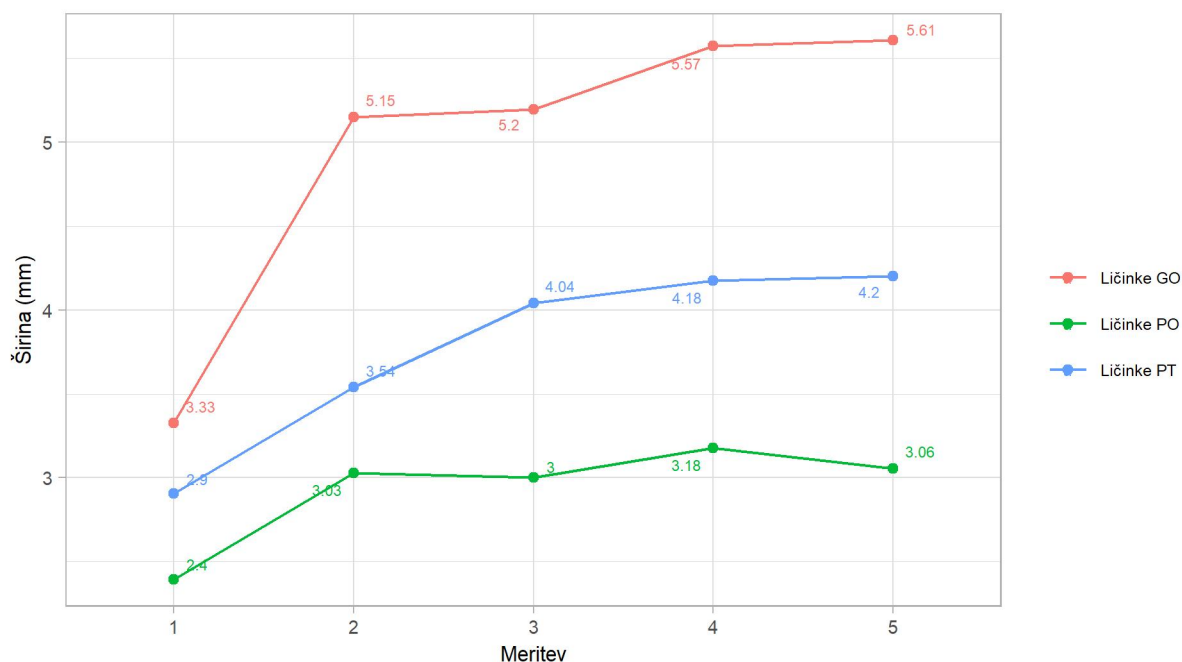
0,063 mm in  $9,614 \pm 1,215$  mm). Ličinke, gojene na PT, so največjo maso, dolžino in širino dosegle pri 5. odvzemu ( $0,137 \pm 0,041$  g,  $16,631 \pm 1,593$  mm in  $4,235 \pm 0,337$  mm).



Slika 18: Izmerjena masa ličink *H. illucens* (g) v poskusu (PO – pšenični otrobi, GO – gospodinjski odpadki, PT – pivske tropine)



Slika 19: Izmerjena dolžina ličink *H. illucens* (mm) v poskusu (PO – pšenični otrobi, GO – gospodinjski odpadki, PT – pivske tropine)



Slika 20: Izmerjena širina ličink *H. illucens* (mm) v poskusu (PO – pšenični otrobi, GO – gospodinjski odpadki, PT – pivske tropine)

Statistično značilne razlike v masi, dolžini in širini ličink, gojenih na različnih substratih, so se pojavile pri 3. odvzemu, in sicer med ličinkami, gojenimi na GO in PO ( $p < 0,05$ , Tabela 4).

#### 4.3 REZULTATI KEMIJSKIH ANALIZ SUBSTRATOV IN LIČINK

##### 4.3.1 Hranilne snovi v substratih, določenih za gojenje *H. illucens*

Substrati, določeni za gojenje ličink ČBM, so vsebovali različen delež vlage (Tabela 3). Največ vlage so vsebovale PT (82 %), najmanj pa PO (58,60 %). PT so vsebovale tudi največji delež SB (31,02 %), SM pa je bilo največ v GO (21,12 %). V vsebnosti elementov ni bilo bistvenih razlik, razen pri Mn in Zn, ki ju je bilo več v PO. Vsi substrati so vsebovali nizke koncentracije toksičnih elementov As, Pb in Cd.

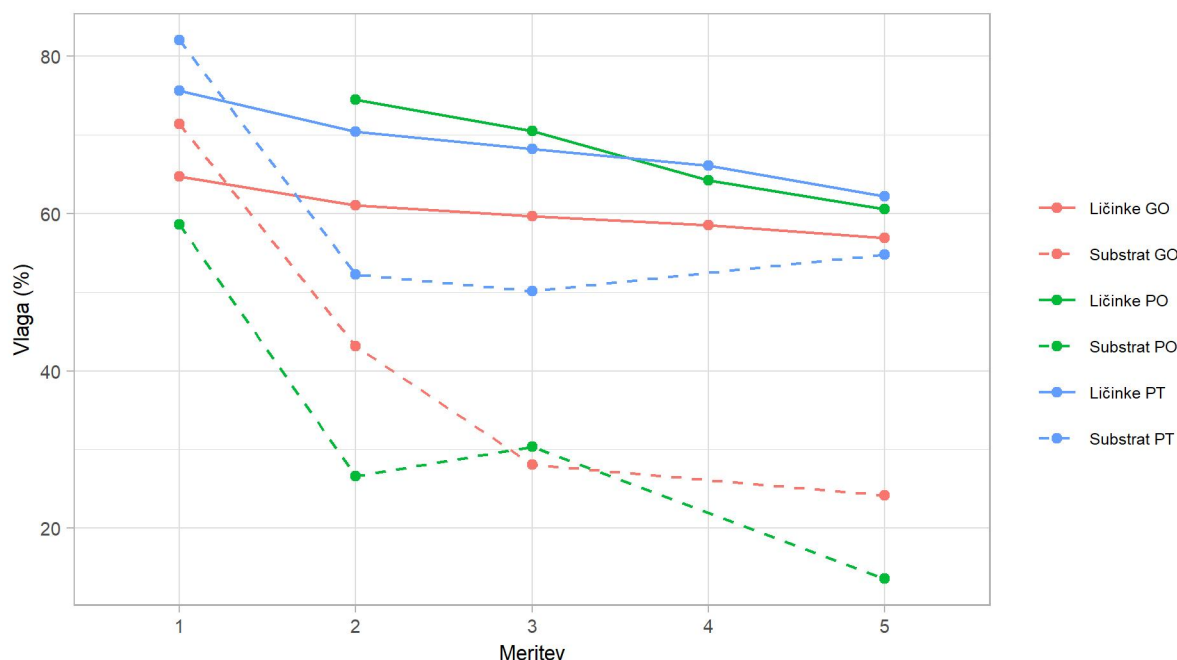
Tabela 3: Hranilna sestava substratov v % na SS

| parameter/vzorec | pšenični otrobi (PO) | gospodinjski odpadki (GO) | pivske tropine (PT) |
|------------------|----------------------|---------------------------|---------------------|
| vlaga            | 58,60                | 71,40                     | 82,00               |
| SB               | 18,43                | 29,21                     | 31,02               |
| SM               | 2,25                 | 21,12                     | 5,89                |
| SV               | 16,01                | 10,73                     | 9,40                |
| pepel            | 7,54                 | 6,98                      | 4,88                |
| B:OH             | 1:3                  | 1:1                       | 1:1,5               |
| Na               | 0,01                 | 0,91                      | 0,02                |
| Mg               | 0,66                 | 0,13                      | 0,21                |
| P                | 1,53                 | 0,36                      | 0,70                |
| K                | 1,60                 | 0,92                      | 0,14                |
| Ca               | 0,14                 | 0,93                      | 0,27                |
| Mn               | 146,83               | 9,92                      | 31,65               |
| Fe               | 171,24               | 170,03                    | 119,53              |
| Co               | 0,03                 | 0,06                      | 0,03                |
| Cu               | 17,63                | 8,78                      | 23,98               |
| Zn               | 94,15                | 22,34                     | 60,58               |
| Cd               | 0,12                 | 0,06                      | 0,01                |
| Pb               | 0,22                 | 0,44                      | 0,52                |
| As               | 0,03                 | 0,10                      | 0,02                |
| Se               | 0,18                 | 0,27                      | 0,16                |

Legenda: SB - surove beljakovine, SM – surove maščobe, SV – surove vlaknine, B:OH – razmerje beljakovine:ogljikovi hidrati

### 4.3.2 Vsebnost vlage v ličinkah in substratih

Vsebnost vlage v substratih in ličinkah ČBM prikazuje Slika 21.

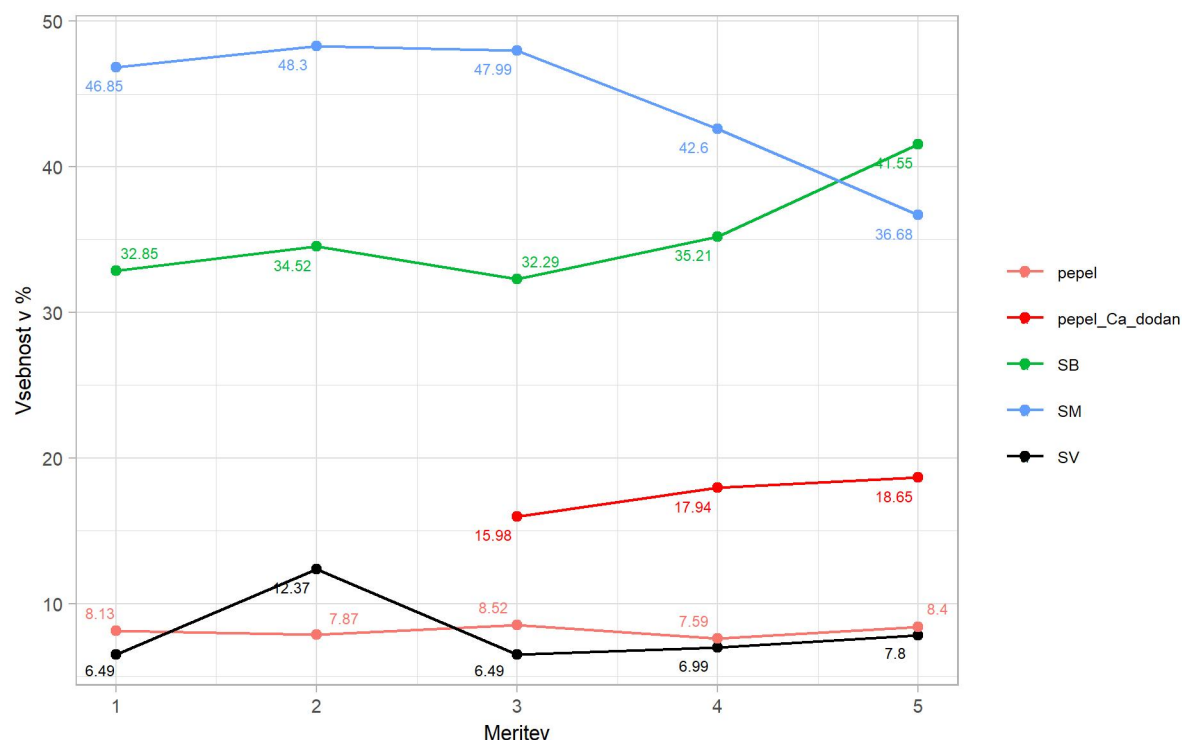


Slika 21: Vsebnost vlage v substratih in ličinkah *H. illucens* (PO – pšenični otrobi, GO – gospodinjski odpadki, PT – pivske tropine)

Statistično značilna razlika (Tabela 4) v vsebnosti vlage v ličinkah je bila pri 3. odvzemu ( $p = 0,0183$ ) med ličinkami, gojenimi na GO ( $60,25 \pm 1,06$  %) in PO ( $73,00 \pm 1,83$  %).

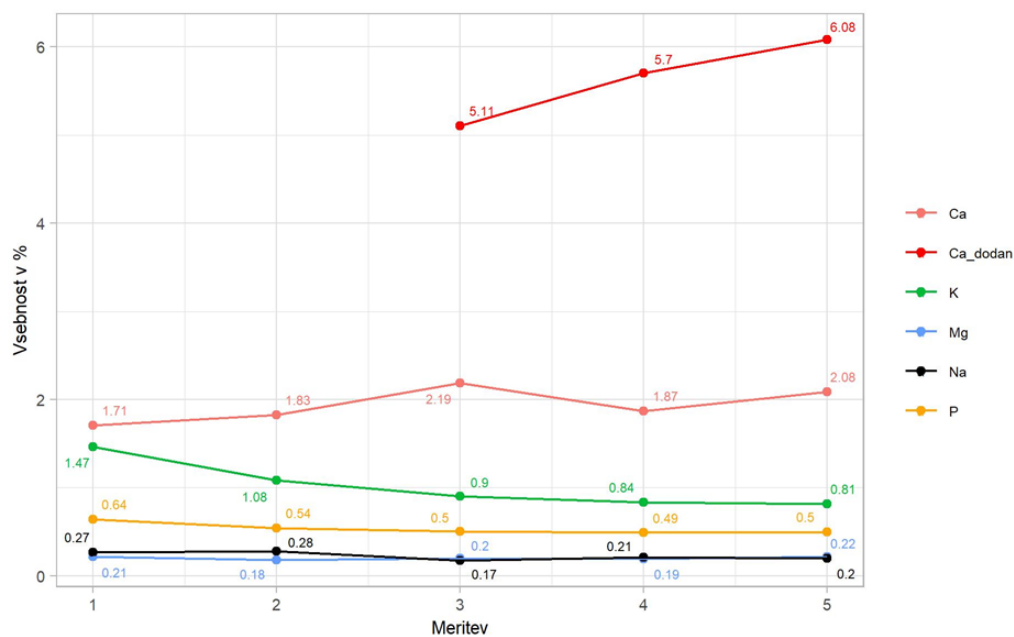
### 4.3.3 Vsebnosti hranilnih snovi v ličinkah, gojenih na gospodinjskih odpadkih

Vsebnost SB in SM (% na SS) je bila pri 3. odvzemu  $32,29 \pm 1,07$  % in  $47,99 \pm 1,46$  %, pri 5. pa  $41,55 \pm 0,07$  % in  $36,68 \pm 1,15$  %. Največ SM so ličinke torej vsebovale pri 3. odvzemu in najmanj pri 5., pri vsebnosti SB pa je bilo obratno – pri 3. odvzemu so ličinke vsebovale najmanj SB in pri 5. odvzemu največ. Delež pepela je bil pri ličinkah, ki smo jim v substrat dodali Ca, še enkrat večji (Slika 22).



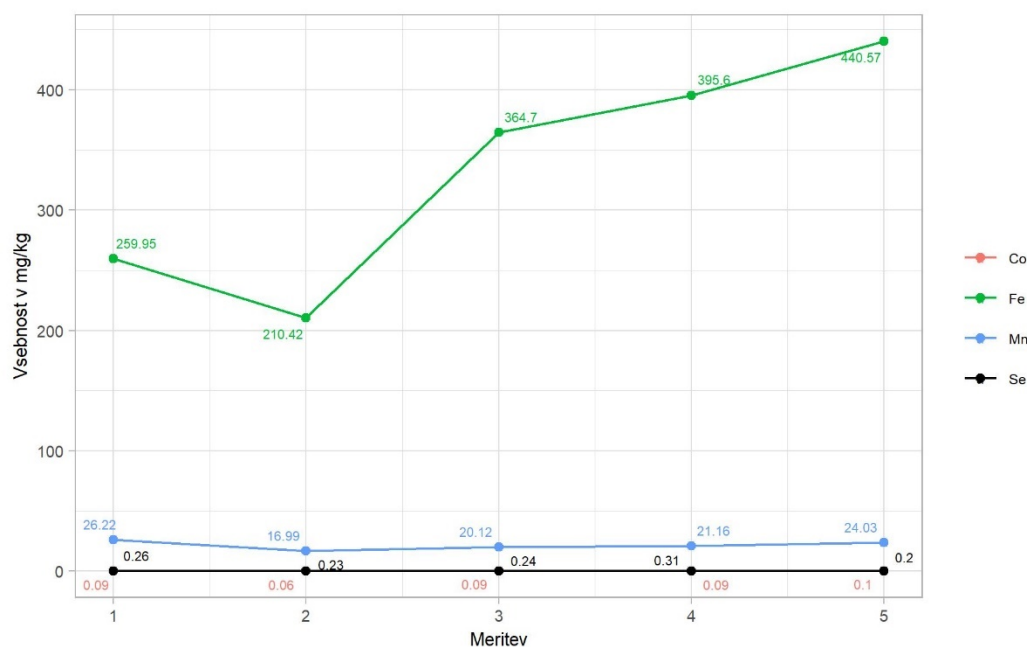
Slika 22: Vsebnost surovih beljakovin (SB), surovih maščob (SM), surovih vlaknin (SV) in pepela v ličinkah *H. illucens*, gojenih na gospodinjskih odpadkih, (% na SS). Dodatna rdeča črta prikazuje delež pepela po dodatku Ca.

Vsebnosti P, Na in Mg se med poskusom niso bistveno spreminjale. Vsebnost Ca se je močno povečala po dodatku. Na koncu poskusa je bila vsebnost Ca v ličinkah brez dodatka Ca  $2,08 \pm 0,09$  %, z dodatkom Ca pa  $6,08 \pm 0,27$  %. Vsebnost K se je zmanjševala od  $1,47 \pm 1,08$  % do  $0,81 \pm 0,01$  % (Slika 23).



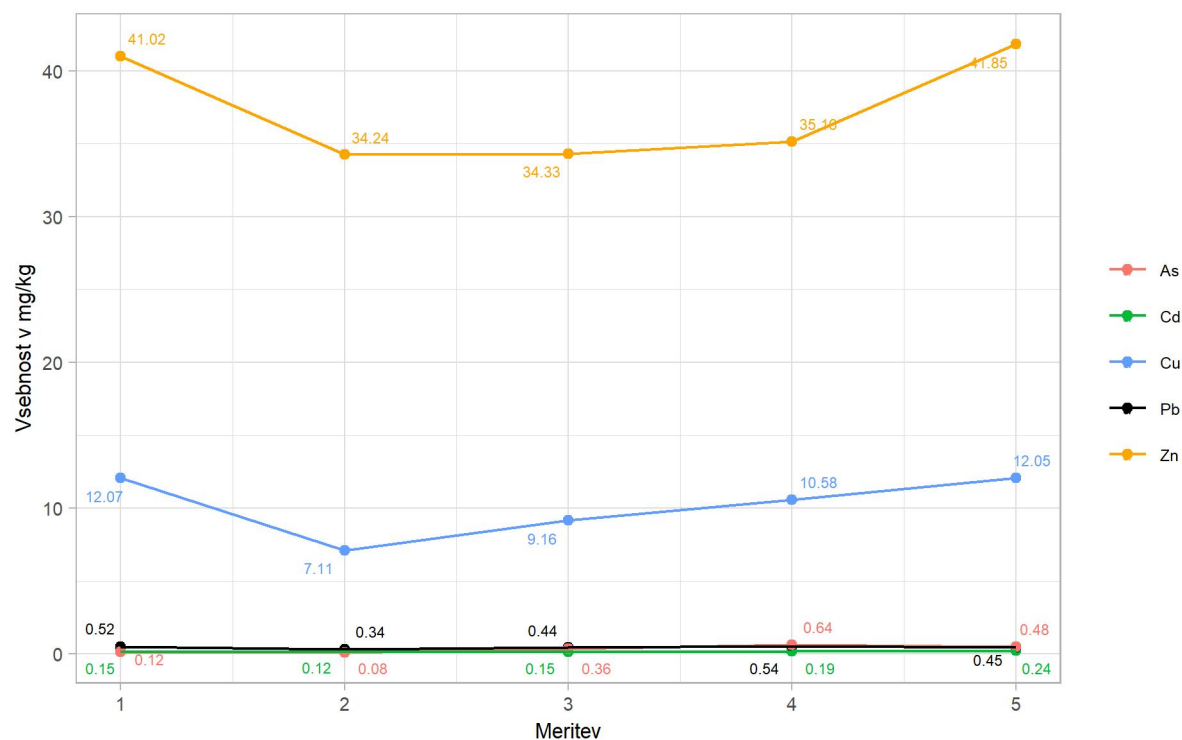
Slika 23: Vsebnost makroelementov (Ca, P, Na, K in Mg) v ličinkah *H. illucens*, gojenih na gospodinjskih odpadkih, (% na SS). Zgornja rdeča črta prikazuje vrednosti po dodajanju Ca v substrat.

V vzorcih ličink se je povečeval delež Fe (Slika 24).



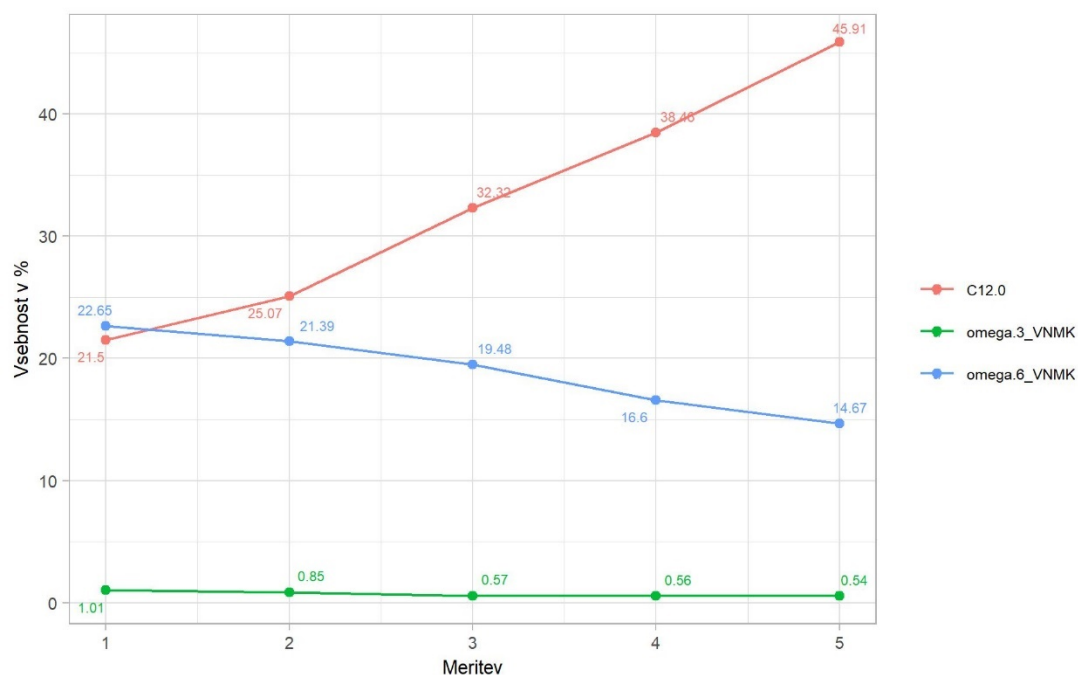
Slika 24: Vsebnost Co, Fe, Mn in Se v ličinkah, gojenih na gospodinjskih odpadkih, (% na SS)

Vsebnost Cu in Zn se je najprej zmanjšala, nato pa ponovno povečala na začetno vrednost (Slika 25).



Slika 25: Vsebnost As, Cd, Cu, Pb in Zn v ličinkah *H. illucens*, gojenih na gospodinskih odpadkih, (% na SS)

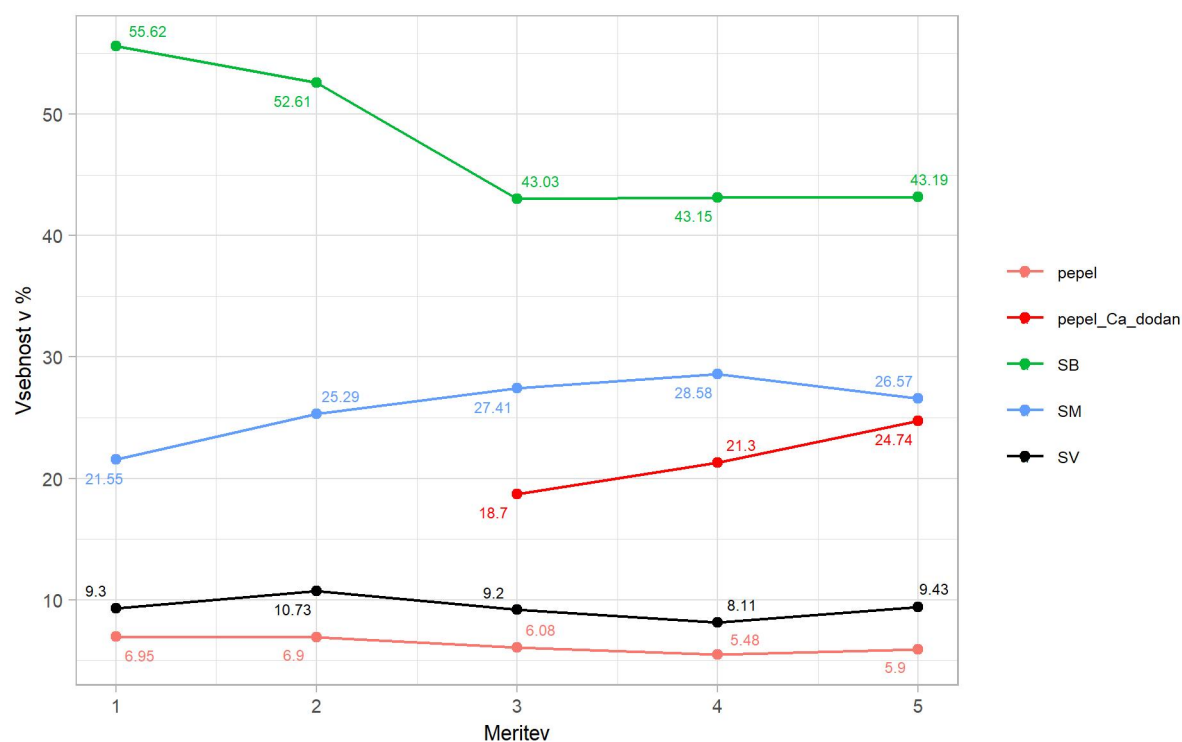
Delež omega 3 večkrat nenasičenih maščobnih kislin (VNMK) se med poskusom ni bistveno spreminjal, zmanjševal pa se je delež omega 6 VNMK. Vsebnost srednjeveržne maščobne kisline C12:0 (lavrinska kislina) se je ves čas povečevala. Na koncu poskusa je bil njen delež v SM  $45,91 \pm 0,55$  % (Slika 26).



Slika 26: Vsebnost omega 3 in omega 6 maščobnih kislin ter lavrinske kisline v ličinkah *H. illucens*, gojenih na gospodinjskih odpadkih, (% v SM)

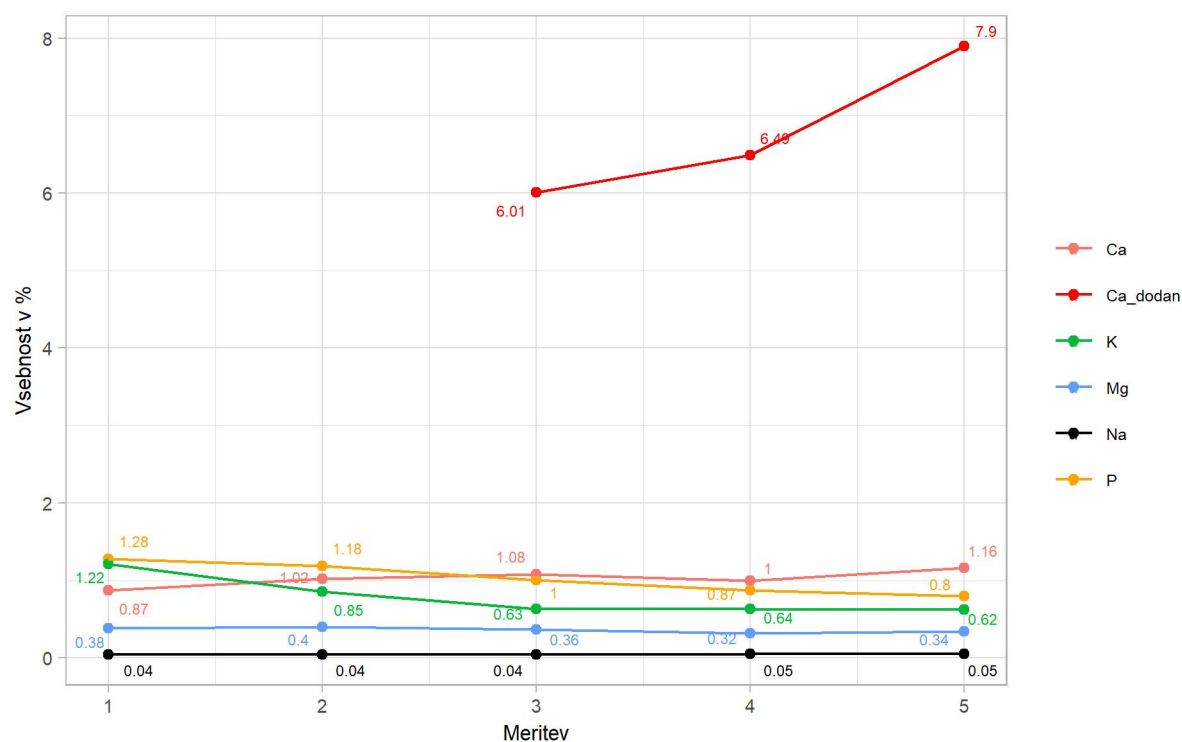
#### 4.3.4 Vsebnosti hranilnih snovi v ličinkah, gojenih na pivskih tropinah

Ličinke, gojene na PT, so največ SB vsebovale na začetku poskusa ( $55,62 \pm 1,45$  %), na koncu poskusa pa  $43,19 \pm 0,51$  % (Slika 27). Od 3. odvzema je bila vsebnost SB približno enaka. Vsebnost SM se med poskusom ni bistveno spreminjala. Po dodatku Ca se je na koncu poskusa delež pepela povečal za štirikrat ( $24,04 \pm 3,12$  %).



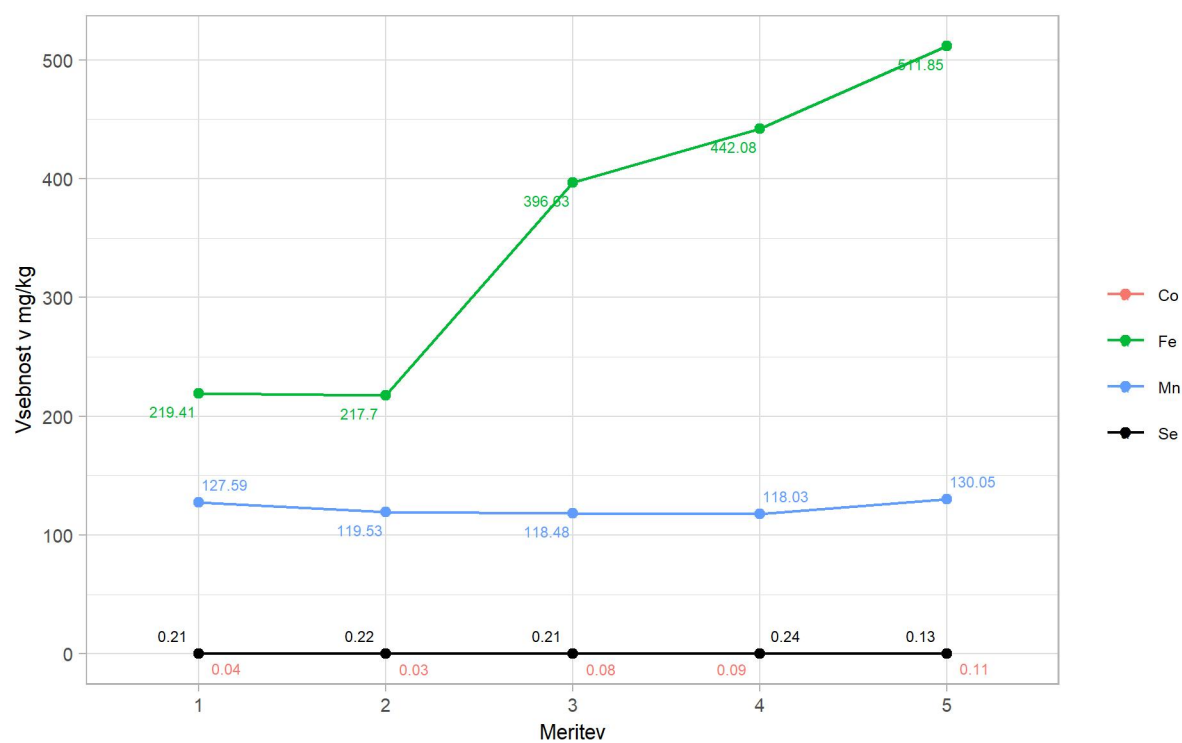
Slika 27: Vsebnost surovih beljakovin (SB), surovih maščob (SM), surovih vlaknin (SV) in pepela v ličinkah *H. illucens*, gojenih na pivskih tropinah, (% na SS). Dodatna rdeča črta prikazuje delež pepela po dodatku Ca.

Vsebnosti P, Na, Mg in K se med poskusom niso bistveno spreminjale. Vsebnost Ca se je močno povečala po dodatku. Na koncu poskusa je bila vsebnost Ca v ličinkah brez dodatka Ca  $1,16 \pm 0,02$  %, z dodatkom Ca pa  $7,89 \pm 0,65$  % (Slika 28).



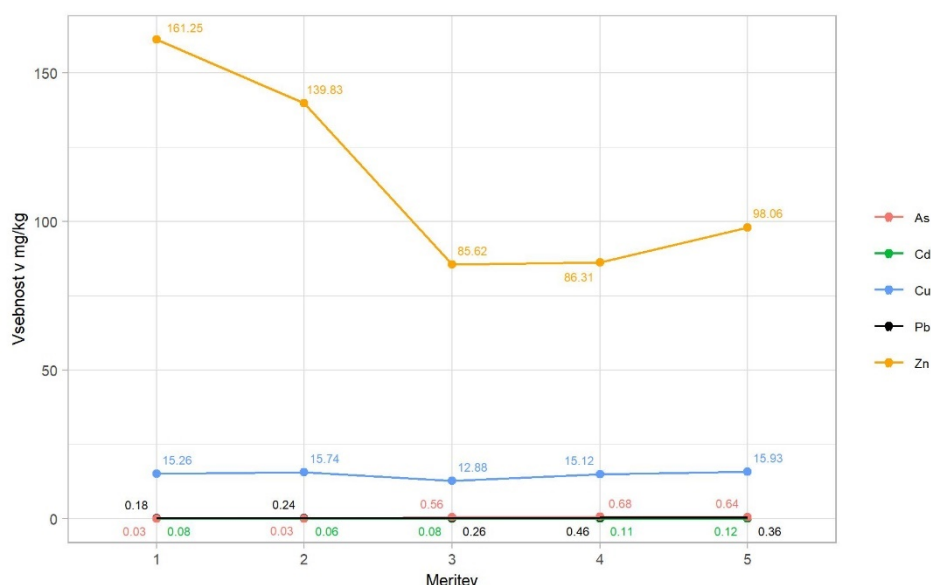
Slika 28: Vsebnost makroelementov (Ca, P, Na, K in Mg) v ličinkah *H. illucens*, gojenih na pivskih tropinah, (% na SS). Zgornja rdeča črta prikazuje vrednosti pri dodajanju Ca v substrat.

V vzorcih ličink se je povečeval delež Fe (Slika 29).



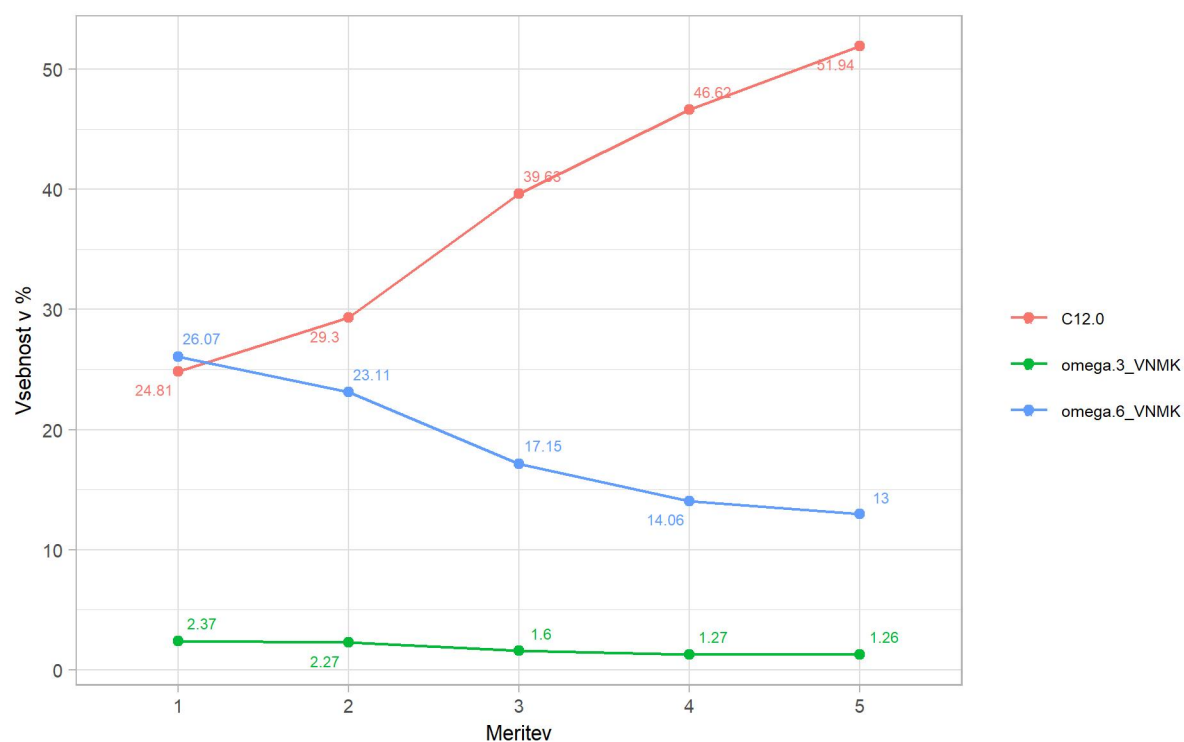
Slika 29: Vsebnost Co, Fe, Mn in Se v ličinkah *H. illucens*, gojenih na pivskih tropinah, (% na SS)

Vsebnost As, Cd, Cu in Pb se med poskusom ni bistveno spreminjala. Vsebnost Zn je bila največja na začetku poskusa, nato se je začela zmanjševati. Po 3. odvzemu je vsebnost začela rahlo naraščati do  $98,06 \pm 6,41$  % (Slika 30).



Slika 30: Vsebnost As, Cd, Cu, Pb in Zn v ličinkah *H. illucens*, gojenih na pivskih tropinah, (% na SS).

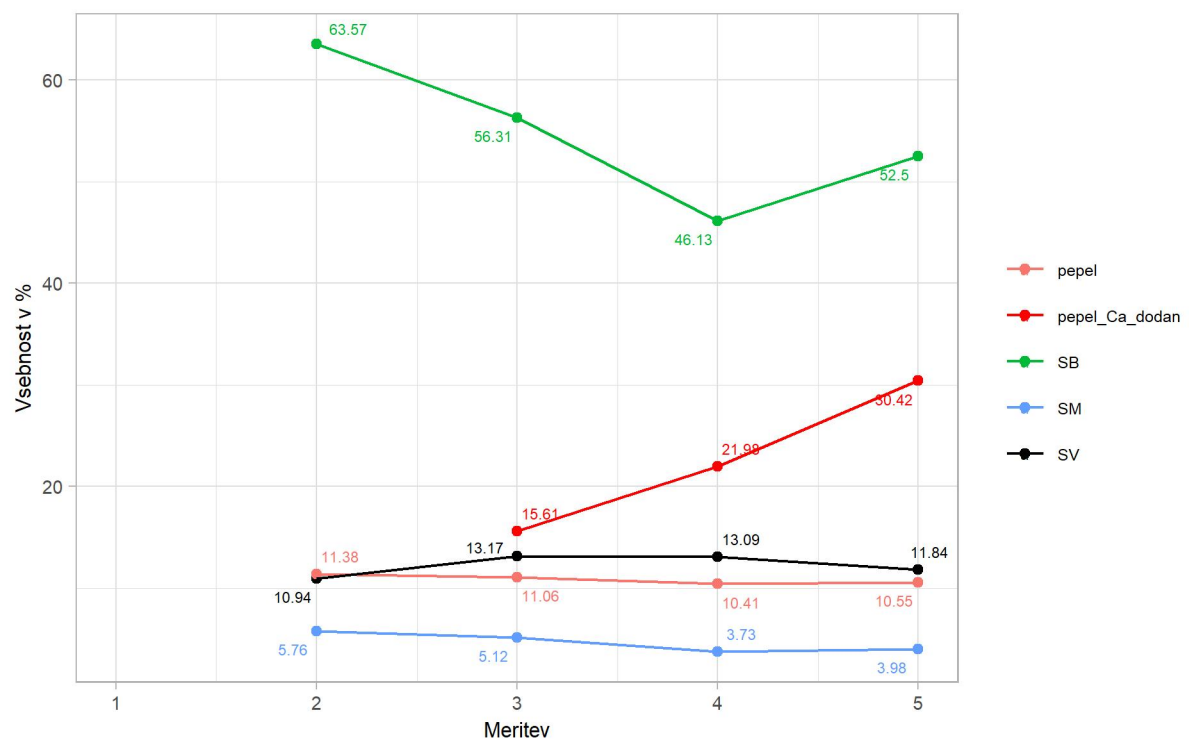
Delež omega 3 večkrat VNМК se je med poskusom počasi zmanjševal. Delež omega 6 VNМК se je od začetka do konca poskusa prepolovil. Vsebnost C12:0 (lavrinska kislina) se je ves čas povečevala. Na koncu poskusa je bil njen delež v SM  $51,94 \pm 1,40$  % (Slika 31).



Slika 31: Vsebnost omega 3 in omega 6 maščobnih kislin ter lavrinske kisline v ličinkah *H. illucens*, gojenih na pivskih tropinah, (% v SM)

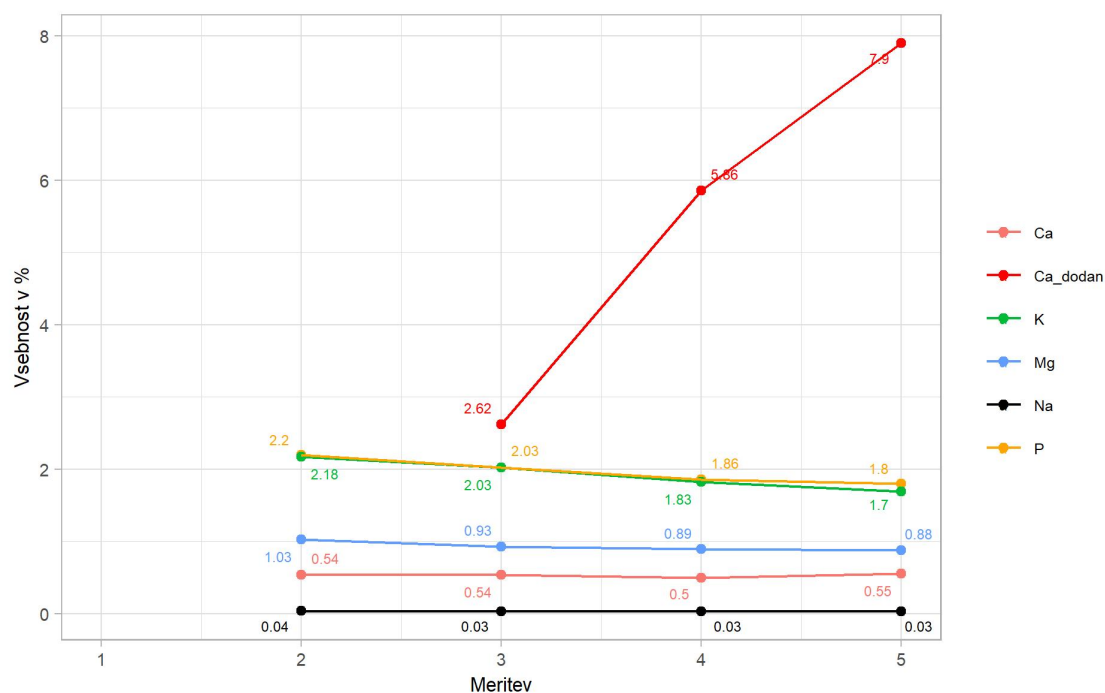
#### 4.3.5 Vsebnosti hranilnih snovi v ličinkah, gojenih na pšeničnih otrobih

Ličinke so največ SB vsebovale pri 2. odvzemu, in sicer  $63,57 \pm 2,67$  %, na koncu poskusa pa  $52,5 \pm 1,80$  %. Vsebnost SM je bila zelo nizka, to je med  $5,76 \pm 0,55$  % in  $3,98 \pm 0,43$  %. Po dodatku Ca se je vsebnost pepela povečala za trikrat (Slika 32).



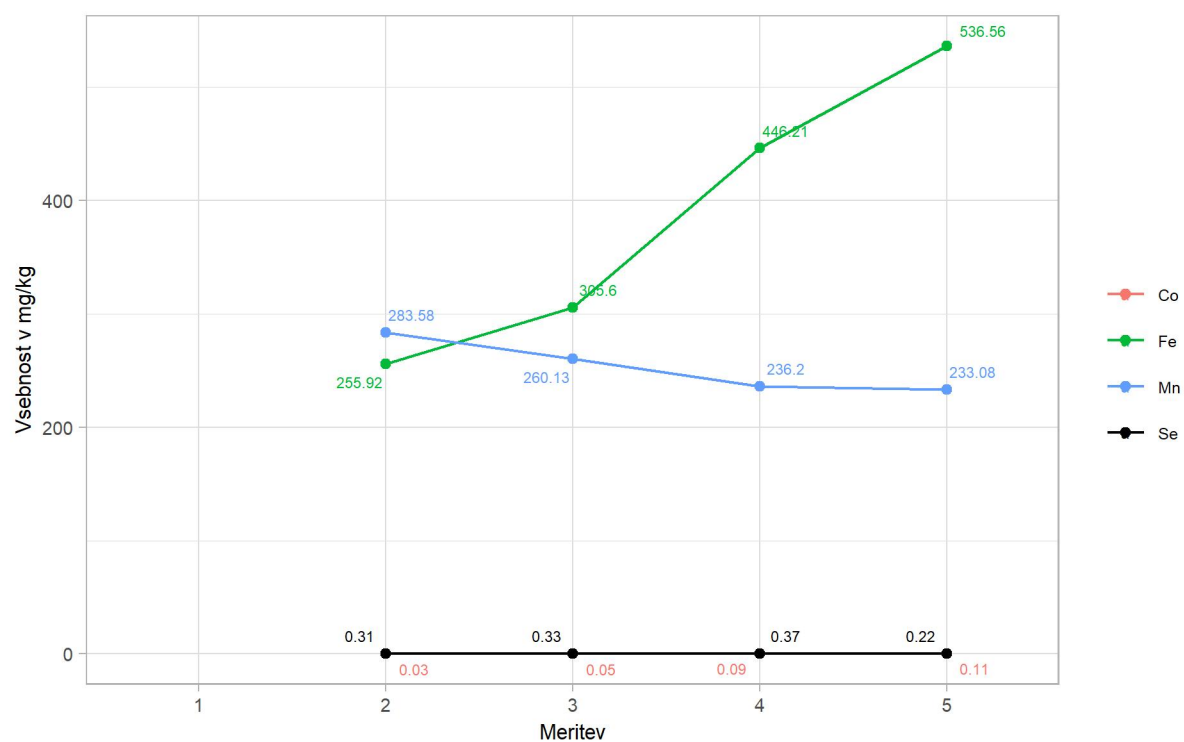
Slika 32: Vsebnost surovih beljakovin (SB), surovih maščob (SM), surovih vlaknin (SV) in pepela v ličinkah *H. illucens*, gojenih na pšeničnih otrobih, (% na SS). Dodatna rdeča črta prikazuje vsebnost pepela po dodatku Ca.

Vsebnosti P in Na se med poskusom nista bistveno spreminjale. Vsebnost Ca se je močno povečala po dodatku. Na koncu poskusa je bila vsebnost Ca v ličinkah brez dodatka Ca  $0,55 \pm 0,20$  %, z dodatkom Ca pa  $7,89 \pm 0,65$  %. Vsebnosti K in P sta se od začetka do konca poskusa rahlo zmanjševali (Slika 33).



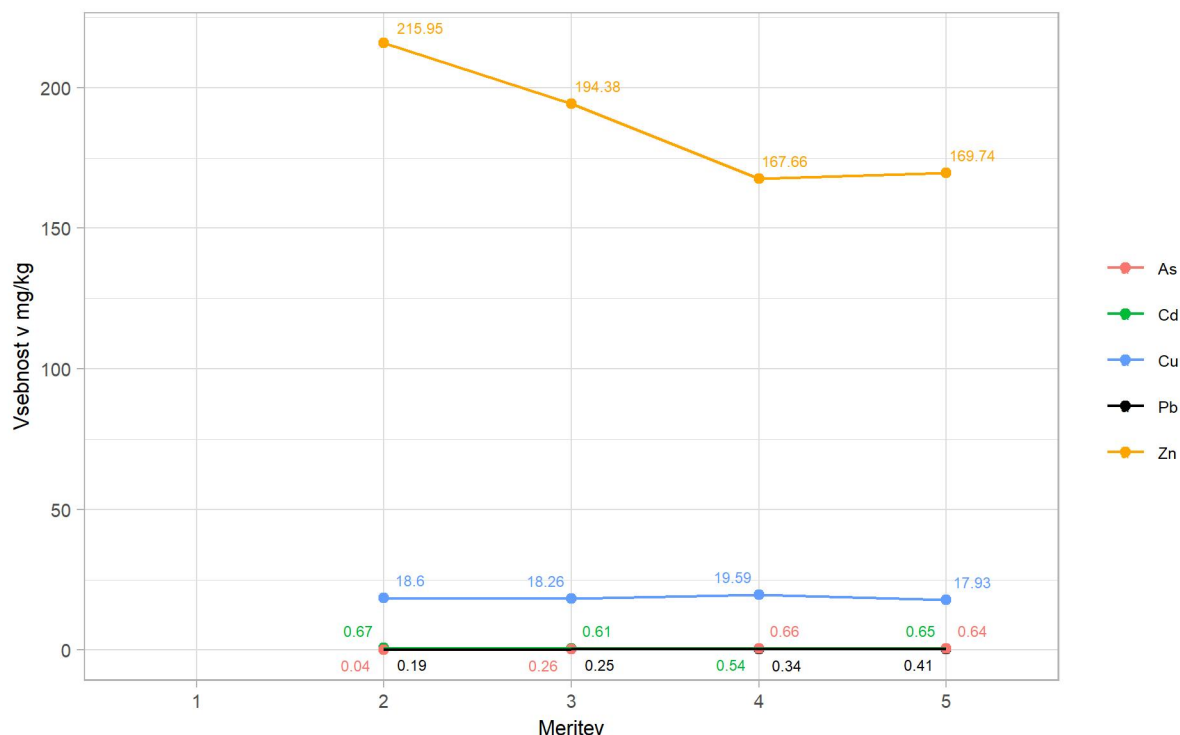
Slika 33: Vsebnost makroelementov (Ca, P, Na, K in Mg) v ličinkah *H. illucens*, gojenih na pšeničnih otrobih, (% na SS). Zgornja rdeča črta prikazuje vrednosti po dodajanju Ca v substrat.

V vzorcih ličink se je povečeval delež Fe (Slika 34).



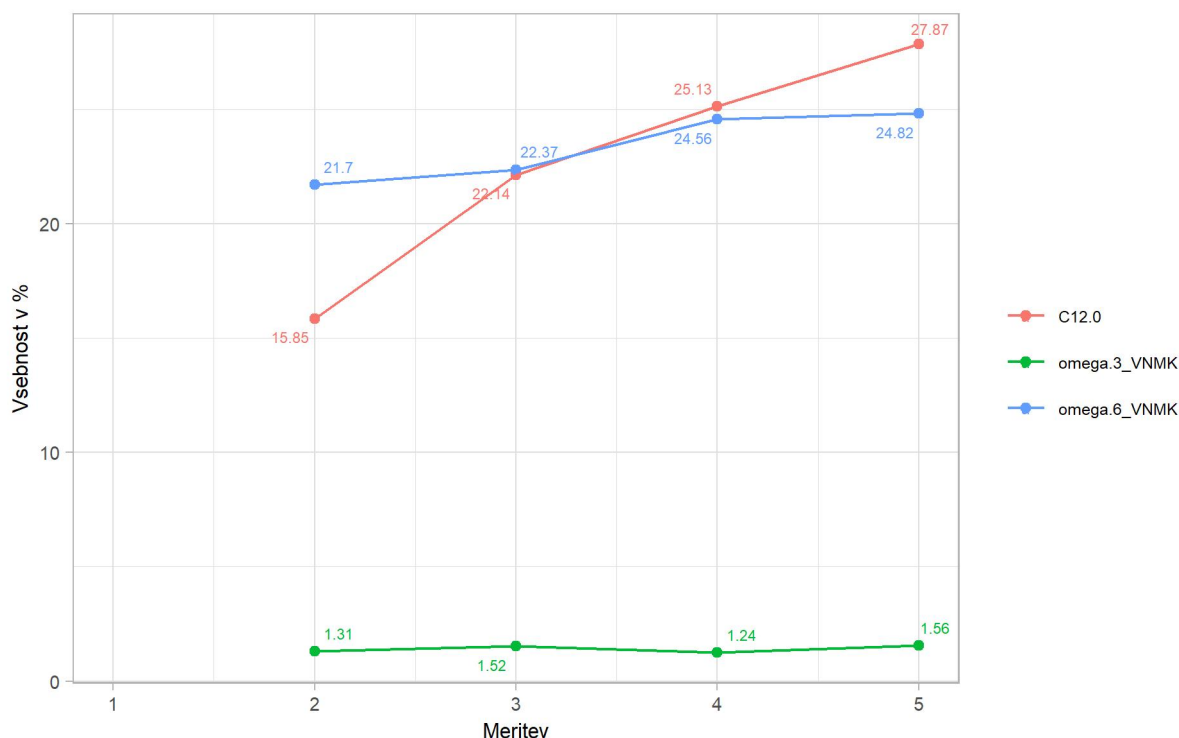
Slika 34: Vsebnost Co, Fe, Mn in Se v ličinkah *H. illucens*, gojenih na pšeničnih otrobih, (% na SS).

Vsebnost Cu se ni spreminjala, vsebnost Zn pa je bila največja pri 2. odvzemu, do konca poskusa pa se je zmanjšala za približno 20 % (Slika 35).



Slika 35: Vsebnost As, Cd, Cu, Pb in Zn v ličinkah *H. illucens*, gojenih na pšeničnih otrobih, (% na SS)

Delež omega 3 VNMK se med poskusom ni bistveno spreminjal. Delež omega 6 VNMK se je rahlo povečeval. Vsebnost C12:0 (lavrinska kislina) se je ves čas povečevala. Na koncu poskusa je bil njen delež v SM  $27,87 \pm 2,57$  % (Slika 36).



Slika 36: Vsebnost omega 3 in omega 6 maščobnih kislin ter lavrinske kisline v ličinkah *H. illucens*, gojenih na pšeničnih otrobih, (% v SM).

#### 4.4 RAZLIKE MED PREISKOVANIMI PARAMETRI

V Tabeli 4 so prikazane statistično značilne razlike med posameznimi odvzemi ličink. Te so se začele pojavljati pri 3. odvzemu (24. dan poskusa). Največ razlik v fizikalnih in kemijskih parametrih je bilo med ličinkami, gojenimi na GO in PO; med PT in PO pa samo v vsebnosti K, Cd, Se ter v vsebnosti maščobnih kislin (C10:0, C12:0, neznana C14:0, C16:0, C18:2n6c, neznane C22:0, NMK, VNMK in omega 3 VNMK).

Ličinke ČBM, gojene na GO in PO, so se začele pri 3. odvzemu razlikovati v vsebnosti vlage, SB, SM in SV. Na koncu poskusa je razlika ostala pri vseh naštetih parametrih, razen pri vsebnosti vlage. V ličinkah so se razlikovale tudi ugotovljene vsebnosti Na, Mg, P, Mn, Cu in Zn.

V vsebnostih maščobnih kislin je bilo največ razlik pri 3. odvzemu, na koncu poskusa pa se vsebnosti maščobnih kislin med posameznimi skupinami niso razlikovale.

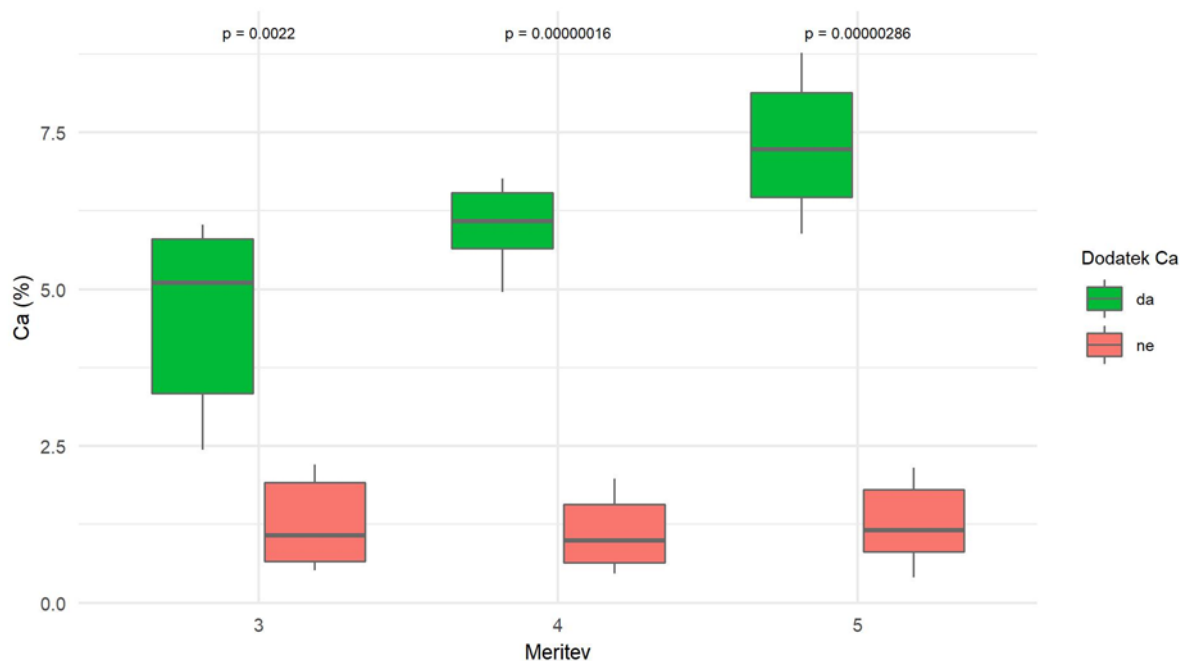
Tabela 4: Prikaz statistično značilnih razlik v fizikalnih lastnostih in kemijskih analizah ličink *H. illucens*, gojenih na treh različnih substratih

| čas            | 1 |             | 2 |             | 3      |             | 4      |             | 5      |             |
|----------------|---|-------------|---|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|
|                | p | razlika med | p | razlika med | p      | razlika med | p      | razlika med | p      | razlika med |
| vлага          |   |             |   |             | 0,0183 | GO-PO       |        |             |        |             |
| SB             |   |             |   |             | 0,0097 | GO-PO       |        |             | 0,0308 | GO-PO       |
| SM             |   |             |   |             | 0,0073 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       | 0,0097 | GO-PO       |
| SV             |   |             |   |             | 0,0073 | GO-PO       | 0,0154 | GO-PO       | 0,0308 | GO-PO       |
| pepel          |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| Na             |   |             |   |             | 0,0097 | GO-PO       | 0,0097 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       |
| Mg             |   |             |   |             | 0,0073 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       |
| P              |   |             |   |             | 0,0073 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       |
| K              |   |             |   |             | 0,0073 | PO-PT       | 0,0073 | PO-PT       | 0,0073 | PO-PT       |
| Ca             |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| Mn             |   |             |   |             | 0,0073 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       |
| Fe             |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| Co             |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| Cu             |   |             |   |             | 0,0097 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       | 0,0183 | GO-PO       |
| Zn             |   |             |   |             | 0,0073 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       |
| Cd             |   |             |   |             | 0,0073 | PO-PT       | 0,0073 | PO-PT       | 0,0073 | PO-PT       |
| Pb             |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| As             |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| Se             |   |             |   |             | 0,0154 | PO-PT       | 0,0488 | PO-PT       | 0,0210 | PO-PT       |
| dolzina        |   |             |   |             | 0,0073 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       |
| sirina         |   |             |   |             | 0,0073 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       |
| masa           |   |             |   |             | 0,0072 | GO-PO       | 0,0073 | GO-PO       | 0,0072 | GO-PO       |
| C10.0          |   |             |   |             | 0,0116 | PO-PT       | 0,0439 | PO-PT       |        |             |
| unC10.12       |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| C12.0          |   |             |   |             | 0,0116 | PO-PT       | 0,0439 | PO-PT       |        |             |
| C14.0          |   |             |   |             | 0,0116 | GO-PT       |        |             |        |             |
| unC14          |   |             |   |             | 0,0107 | PO-PT       |        |             |        |             |
| C14.1          |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| C15.0          |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| C16.0          |   |             |   |             | 0,0164 | PO-PT       | 0,0439 | PO-PT       |        |             |
| sumC16.1       |   |             |   |             | 0,0198 | GO-PO       |        |             |        |             |
| C17.0          |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| C17.1          |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| C18.0          |   |             |   |             | 0,0156 | GO-PO       |        |             |        |             |
| sumC18.1       |   |             |   |             | 0,0116 | GO-PT       |        |             |        |             |
| C18.2n6c       |   |             |   |             | 0,0116 | PO-PT       | 0,0439 | PO-PT       |        |             |
| C20.0          |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| C18.3n6        |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| C18.3n3        |   |             |   |             | 0,0238 | GO-PT       |        |             |        |             |
| sumC20.1n11_n9 |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| C21.0          |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| C20.2          |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| C22.0          |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| C20.4n6        |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| C23.0          |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| C22.5          |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| C22.6n3        |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| unknown        |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| sum unknown    |   |             |   |             | 0,0107 | PO-PT       |        |             |        |             |
| NMK            |   |             |   |             | 0,0164 | PO-PT       | 0,0439 | PO-PT       |        |             |
| ENMK           |   |             |   |             |        |             |        |             |        |             |
| VNMK           |   |             |   |             | 0,0156 | PO-PT       |        |             |        |             |
| omega.3 VNMK   |   |             |   |             | 0,0238 | GO-PT       |        |             |        |             |
| omega.6 VNMK   |   |             |   |             | 0,0116 | PO-PT       | 0,0439 | PO-PT       |        |             |

Legenda: p – statistična značilnost; GO - gospodinjjski odpadki, PT - pivske tropine, PO - pšenični otrobi, NMK – nasičene maščobne kisline, ENMK – enkrat nenasičene maščobne kisline, VNMK – večkrat nenasičene maščobne kisline

Ko smo v substrat zamešali Ca, je bila razlika med vsebnostjo Ca v ličinkah brez dodatka in v ličinkah z dodatkom Ca statistično značilna od 3. ( $p = 0,0022$ ) do 5. odvzema ( $p < 0,0001$ ) (Slika 37).

Največja vsebnost Ca je bila v ličinkah ČBM, gojenih na PT in PO, skoraj 8 % v SS (Sliki 28 in 33).



Slika 37: Razlika v vsebnosti Ca v ličinkah *H.illucens* po dodatku Ca (zeleno).

#### 4.5 KORELACIJE MED PARAMETRI V SUBSTRATU IN LIČINKAH *H. ILLUCENS*

Izračuni korelacij so v Prilogi 2.

Visoko korelacijo, ki je močno statistično značilna, smo ugotovili med vsebnostjo pepela v substratu in ličinkah ( $r = 0,7432$ ,  $p = 0,0006$ ) ter vsebnostjo SM ( $r = 0,6652$ ,  $p = 0,0086$ ).

Pri elementih smo ugotovili zelo močno korelacijo med vsebnostjo As v substratu in ličinkah ( $r = 0,8300$ ,  $p < 0,001$ ), Mg ( $r = 0,8820$ ,  $p < 0,001$ ), Mn ( $r = 0,8666$ ,  $p < 0,001$ ), Zn ( $r = 0,8499$ ,  $p < 0,001$ ), Ca ( $r = 0,8779$ ,  $p < 0,001$ ) in Cd ( $r = 0,8793$ ,  $p < 0,001$ ). Močno korelacijo smo

ugotovili za Fe ( $r = 0,7308$ ,  $p = 0,0033$ ), K ( $r = 0,7548$ ,  $p = 0,0013$ ), P ( $r = 0,7014$ ;  $p = 0,0094$ ) in Co ( $r = 0,7016$ ,  $p = 0,0196$ ).

Zelo močna korelacija je bila ugotovljena še med vsebnostjo As in Ca v ličinkah ( $r = 0,8933$ ,  $p < 0,001$ ), As in Co ( $r = 0,9171$ ,  $p < 0,001$ ), As in Fe ( $r = 0,8981$ ,  $p < 0,001$ ), Ca in Co ( $r = 0,8600$ ,  $p < 0,001$ ), Co in Fe ( $r = 0,8808$ ,  $p < 0,001$ ), Cu in Mg ( $r = 0,8188$ ,  $p = 0,0001$ ), Cu in Mn ( $r = 0,8626$ ,  $p < 0,001$ ) ter Cu in Zn ( $r = 0,8619$ ,  $p < 0,001$ ).

Močno korelacijo smo ugotovili še med vsebnostjo C 18:0 v substratu in ličinkah, ki je bila tudi statistično značilna ( $r = 0,800$ ;  $p = 0,0281$ ).

#### 4.6 REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH PREISKAV

Podrobni rezultati mikrobioloških preiskav so v Prilogi 3.

##### 4.6.1 Preiskava na *Salmonella* spp.

Na prisotnost *Salmonella* spp. smo preiskovali ličinke in vzorce vseh treh substratov, na katerih smo vzrejali ličinke. Bakterij nismo našli v nobenem vzorcu.

##### 4.6.2 Ugotavljanje števila enterobakterij

Preiskavo na ugotavljanje števila enterobakterij smo izvajali na ličinkah in na vzorcih posameznih substratov. Izjemoma preiskave nismo opravili na substratih pri zadnjem vzorčenju, saj nas je takrat bolj zanimalo število bakterij *E. coli*.

V PO smo enterobakterije odkrili že v izvorni embalaži, iz katere smo hranili ličinke med rejo. Tudi pri naslednjih vzorčenjih smo vedno ugotovili enterobakterije. Z MALDI-TOF detekcijo smo odkrili sledeče vrste bakterij: *Acinetobacter baumannii*, *Cronobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae* in *Klebsiella variicola*.

Pri ličinkah, gojenih na PO, smo pri vsakem vzorčenju ugotovili enterobakterije. Z MALDI-TOF detekcijo smo odkrili naslednje vrste bakterij: *Enetrobacter xiangfangensis*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumniae*, *Klebsiella variicola* in *Serratia marcescens*. Ko smo delili ličinke in eni polovici dodajali Ca, te niso dovolj hitro rastle, zato nismo imeli dovolj velikega vzorca za nadaljnjo preiskavo na enterobakterije.

V GO smo odkrili enterobakterije že v začetnem substratu, s katerim smo hranili ličinke med poskusom. Tudi pri naslednjih vzorčenjih smo vedno našli enterobakterije. Z MALDI-TOF detekcijo smo odkrili v substratu naslednji vrsti bakterij: *Citrobacter amalonaticus* in *Proteus mirabilis*.

Pri ličinkah, gojenih na GO, smo pri vsakem vzorčenju našli enterobakterije (*Proteus mirabilis* in *Providencia rettgeri*).

Tudi v PT smo našli enterobakterije že v začetnem substratu in tudi pri vseh naslednjih vzorčenjih. Z MALDI-TOF detekcijo smo odkrili te vrste bakterij: *Cronobacter sp.*, *Enetrobacter cloacae*, *Enetrobacter bugandensis*, *Enetrobacter asburiae*, *Klebsiella pneumoniae* in *Klebsiella variicola*.

Pri ličinkah, gojenih na PT, smo našli z MALDI-TOF determinirane vrste bakterij: *Alcaligenes faecalis*, *Citobacter amalonaticus*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri* in *Providencia stuartii*.

#### **4.6.3 Preiskava na število bakterij *E. coli***

Število bakterij *E. coli* smo ugotavljali samo pri zadnjem vzorčenju v vseh treh substratih (PO, GO, PT), to je v posodah z dodanim Ca in v posodah brez dodatka. *E. coli* smo ugotovili v vseh vzorcih.

V substratih PO in PT smo v primerjavi z GO ugotovili precej višje vrednosti *E. coli*. V PO smo našli najnižjo vsebnost, to je 770.000 cfu/g, in najvišjo, to je 1.100.000 cfu/g. V PT je bila najnižja vsebnost 190.000 cfu/g, najvišja pa je presegala mejo detekcije in je bila > 1.500.000 cfu/g. V GO je bilo število bakterij pod mejo detekcije (< 100 cfu/g).



## 5 RAZPRAVA

V naši raziskavi smo ličinke ČBM gojili v naravnih klimatskih razmerah v poletnem času na treh različnih substratih: GO, PT in PO. Rezultati raziskave, trajajoče 34 dni, so pokazali, da je takšna reja mogoča v poletnem času tudi v Sloveniji. Ličinke ČBM, gojene na GO in PT, so dosegle povprečno maso 0,078–0,220 g, objavljeno v drugih raziskavah (Nyakeri in sod., 2017; Shumo in sod., 2019). Ličinke ČBM, gojene na PO, pa kljub dobri vsebnosti SB in mineralov niso dovolj priraščale in niso dosegle povprečne mase ( $0,036 \pm 0,010$  g). Med poskusom so bila zabeležena temperaturna nihanja do 10 °C, vlažnost pa se je spreminjala za 30 %. V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno dodati skupino, ki bi jo imeli v kontroliranih pogojih, in sicer za primerjavo rezultatov. Po podatkih iz literature ličinke ČBM v okolju, kjer ostaja podnebje skozi vse leto približno podobno, rastejo hitro, njihova reja pa zahteva le malo časa in dela (Wang in Shelomi, 2017). Poletne klimatske razmere v Sloveniji bi lahko bile primerne za rejo ličink ČBM. Takšne razmere sicer niso optimalne za rejo, vendar pa je ta bolj trajnostna. Ker za rejo ličink ČBM ne potrebujemo veliko prostora, bi bilo v nadaljevanju smiselno proučiti dodatne ukrepe, s katerimi bi tudi pozimi ohranjali ustrezne klimatske razmere (zapiranje stranic ipd.). Povprečna zunanja dnevna temperatura med poskusom in v omari, v kateri smo gojili ličinke ČBM, je bila 23,4 °C, vlaga pa 82,9 %. Ličinke se najboljše razvijajo pri temperaturi 30 °C (Wang in Shelomi, 2017) in optimalni vlagi v substratu med 60 % in 70 % (Nyakeri in sod., 2017, Sprangers in sod., 2017, Wang in Shelomi, 2017). Vsebnost vlage v substratu je bila na začetku poskusa 58,6 % v PO, 71,4 % v GO in 82 % v PT. V bodoče bi morali substrate dodatno navlažiti ali osušiti, da bi dosegali vrednosti med 60 % in 70 %. Najnižja vsebnost vlage je bila na koncu poskusa v PO (manj kot 10 %), kjer smo hkrati opazili tudi najslabšo rast ličink ČBM. Zagotavljanje temperature v razponu med 27 °C in 32 °C pa je pomembna tudi z mikrobiološkega vidika, saj antimikrobni peptidi v črevesju ličink takrat najbolj učinkovito inaktivirajo bakterije *E. coli* O157:H7 in *Salmonella* enteritidis (Erickson in sod., 2004). V našem podnebnem pasu je največja težava padec temperature ponoči, ki je v tem času lahko tudi okoli 15 °C. Vseeno pa bi bilo v prihodnje smiselno poskus ponoviti in se usmeriti v raziskovanje različnih temperaturnih režimov in njihov vpliv na rast ličink kot tudi inaktivacijo patogenih mikroorganizmov.

Nekateri avtorji zagovarjajo (Wang in Shelomi, 2017), da je za uspešno rejo ličink potreben dobro optimiziran sistem. Poleg optimalne temperature je potrebno poznati tudi razmerje med

količino dnevno dodanega substrata in najbolj uspešno rastjo ličink. Dodajanje substrata v prevelikih količinah lahko upočasni razvoj ličink ČBM (Wang in Shelomi, 2017). Te bodo sicer na videz težje, saj bodo za rast porabile več časa, vendar pa bodo predelale manjšo količino dodanega substrata. V našem poskusu smo količino substrata dodajali glede na njegovo porabljenost in na rast ličink. Na GO so ličinke najboljše priraščale in tako tudi najbolj uspešno pretvarjale substrat. Največjo maso so dosegle že pri 4. vzorčenju (0,271 g), ki pa se je do 5. vzorčenja zmanjšala na 0,24 g. Podobno se je zgodilo z ličinkami, gojenimi na PO, ki so največjo maso prav tako dosegle že pri 4. vzorčenju (0,036 g). Ličinke ČBM, gojene na PT, pa so največjo maso dosegle šele pri 5. odvzemu (0,137 g). Ugotovljeno je bilo (Liu in sod., 2017), da ličinke ČBM hitro kopičijo biomaso od 4. do 6. dne, poleg tega se njihova masa od 14. do 16. dne razvoja poveča za približno 4000 krat. Vsem tem podatkom v našem poskusu nismo mogli slediti, ker smo pričeli z vzorčenjem 16. dan starosti ličink. Vsekakor pa bi z rejo ličink, gojenih na GO, lahko zaključili prej.

Ličinke ČBM, gojene na PO, so na splošno priraščale preslabo. Verjetni razlogi so prevelika količina substrata in hkrati premajhna vsebnost vlage ter prevelika vsebnost surovih vlaknin. Gold in sod. (2018) so ugotovili, da bo krajši čas razvoja ličink tudi pri prehrani, ki ima razmerje B : OH 1:1-4:1, vendar bo masa ličink večja (in večji delež maščob) pri razmerju 1:2-1:4. Beljakovine predstavljajo najpomembnejše hranilo pri rasti ličink ČBM (Gold in sod., 2018). Pri visoki vsebnosti beljakovin sprosti telo ličink hormone, inzulinu podobne, ki spodbujajo rast in razvoj. Če ličinke gojimo na substratu z majhno vsebnostjo beljakovin, pretvarjajo črevesni mikrobi metabolite ogljikovih hidratov v nove aminokisline (Gold in sod., 2018). V GO je bilo ugotovljeno razmerje B : OH 1:1, vsebnost SM pa je bila največja (21,12 % na SS). Ličinke so na GO najhitreje dosegle največjo maso in hkrati najvišjo vsebnost SM (48 %) pri 3. odvzemu. Količina SM se je nato začela zmanjševati. Ogljikovi hidrati so tudi v tesni povezavi z deležem maščob v ličinkah. V primeru, da ličinke gojimo na substratu z nizko vsebnostjo beljakovin in velikim deležem ogljikovih hidratov, bodo te ogljikove hidrate pretvorile in naložile v maščobni del telesa (Gold in sod., 2018). Maščobe ne vplivajo na razvoj ličink, kadar niso v presežku prisotne v substratu. Na splošno lahko rečemo, da beljakovine in ogljikovi hidrati vplivajo na razvoj ličink, vsebnost maščob v substratu vpliva na njihovo maščobno sestavo (Gold in sod., 2018).

Podaljšan čas rasti ličink (podaljšana faza ličinke pred fazo prepupe), gojenih na GO, je verjetno posledica večje vsebnosti SM v substratu, ki je zaradi tega slabše in težje razgradljiv. Ličinke, gojene na energijsko bogatem obroku, se preobrazijo v prepupe z visoko koncentracijo maščob (Sprangers in sod., 2017).

Razmerje med B : OH v PT je bilo 1:1,5. Vrednost SB v substratu je bila v primerjavi z GO nekoliko večja (31 %), vsebnost SM pa precej manjša (5,89 %). Substrat PT in GO imata po ugotovitvah Gold in sod. (2018) podobno aminokislinsko sestavo kot ličinke ČBM. Gojenje teh na substratih, kjer je aminokislinska sestava komplementarna sestavi v ličinkah, izboljša njihovo rast in razvoj (Gold in sod., 2018).

Razmerje med B : OH v PO pa je bilo 1 : 3. PO so med uporabljenimi substrati vsebovali najmanjši delež SB (18,43 %) in SM (2,25 % v SS). Tudi v ličinkah ČBM na koncu meritev je ostala vrednost SM nizka (3,98 % v SS). Kljub najvišji vsebnosti ogljikovih hidratov so ličinke slabo priraščale in so imele nizko vrednost SM, kar nakazuje, da moramo rejo ličink in hranilne vrednosti substratov gledati celovito. PO so se od drugih dveh substratov razlikovali v tem, da so vsebovali največ SV (50 % več kot GO in PT). Vsebnost SB v ličinkah, gojenih na PO, je bila na koncu poskusa najvišja, in sicer 52,5 % na SS, čeprav so ličinke priraščale slabo in niso dosegle povprečne mase. Kot smo že omenili, je eden od razlogov visoka vsebnost SV v substratu. Ker so vlaknine težko razgradljive in je njihova razgradljivost v veliki meri odvisna od pomoči črevesne mikrobiote, pripisujemo visoko vsebnost SB pri ličinkah PO pretvorbi ogljikovih hidratov v SB, namesto v SM, ki jih tudi v substratu ni bilo veliko.

Glede vsebnosti SB je bilo ugotovljeno (Nyakeri in sod., 2017), da se vsebnost beljakovin v ličinkah zmanjšuje s starostjo ne glede na uporabljen substrat. Vendar v našem poskusu tega nismo potrdili. V ličinkah, gojenih na GO, je vrednost SB naraščala, v ličinkah PT je po 3. odvzemu ostajala enaka, pri ličinkah PO pa se je po začetnem zmanjšanju ponovno povečala. Po podatkih iz literature (Nyakeri in sod., 2017) sovпада zmanjšanje vsebnosti SB s procesom sklerotizacije, ki povzroči encimsko razgradnjo beljakovin za izgradnjo hitina v eksoskeletu. Zato je najbolj idealen čas pobiranja ličink, preden razvijejo trd zunanji eksoskelet. V našem poskusu smo opazili, da so ličinke, gojene na GO, ostajale v fazi ličink in samo pridobivale na vsebnosti maščobe; ličinke, gojene na PT, pa so se vedno bolj pretvarjale v fazo prepupe že pri

predzadnjem vzorčenju. To pojasnuje, zakaj se je pri ličinkah, gojenih na PT, vrednost SB najprej zmanjšala, nato pa ostala enaka. Metabolizem beljakovin in maščob je med rastjo ličink preusmerjen v sintezo maščobe, da se zagotovi in shrani dovolj energije za kasnejše preoblikovanje v pupe ter nato tudi za razmnoževanje odraslih muh, saj se takrat ne prehranjujejo več (Luis in sod., 2017).

Razvoj tehnologije, ki bi predelala organske odpadke pred uporabo za rejo ličink, bi lahko bistveno spremenila način reje in izkoriščenost substrata za ličinke ČBM v namene kompostiranja (Gold in sod., 2018). Podobno so ugotovili tudi Sprangers in sod. (2017). Ličinke so gojili na zelenjavnih in GO ter PO. Sveži zelenjavni odpadki, v katerih je že potekal proces razgradnje, so bili za ličinke lažje razgradljiva hrana. Za rejo so uporabili najmanj substrata na SS (533,8 g, medtem ko so za rast na GO porabili 1259 g, na PO pa 930 g), ličinke pa so največ hranil pretvorile v lastno biomaso.

Ličinke ČBM sodijo po veljavni zakonodaji med rejne živali, GO pa med odpadke, ki niso dovoljeni v prehranski verigi. Čeprav smo v poskusu uporabili substrat, ki nima statusa posamičnega krmila, smo ugotovili, da ličinke ČBM na GO hitro in dobro rastejo ter uspešno pridobivajo na masi. Kot smo že večkrat omenili, je smisel gojenja ličink krožno gospodarstvo in trajnostni razvoj, zato se veliko pozornosti namenja iskanju pravega substrata, ki bi poleg zagotavljanja hranilnih snovi izboljšal tudi ekonomičnost reje žuželk.

Ličinke ČBM, gojene na GO in PO, so se začele pri 3. odvzemu (24. dan poskusa) razlikovati v vsebnosti vlage, SB, SM in SV. Na koncu poskusa je ostala razlika statistično značilna pri vseh naštetih parametrih, razen pri vsebnosti vlage. Visoko korelacijo, ki je močno statistično značilna, smo ugotovili med vsebnostjo pepela v substratu in v ličinkah ( $r = 0,7432$ ,  $p = 0,0006$ ) ter vsebnostjo SM ( $r = 0,6652$ ,  $p = 0,0086$ ).

Po podatkih iz literature vsebujejo ličinke ČBM veliko VNMK (Wang in Shelomi, 2017; Sprangers in sod., 2017; Lui in sod., 2017). V vseh fazah življenjskega cikla vsebujejo visoko raven esencialnih maščobnih kislin, vključno z linolno (18:2,  $\omega$ -6) in  $\alpha$ -linolensko kislino (18:3,  $\omega$ -3). Omenjeni maščobni kislini delujeta kot osnova za sintezo dolgoverižnih prekursorskih maščobnih kislin, kot so: arahidonska kislina, eikozapentaenojska in dokozaheksaenojska

kislina (Lui in sod., 2017). Obe esencialni maščobni kislini sta potrebni za vzdrževanje celične membrane, delovanje možganov in prenose živčnih impulzov. Sodelujeta tudi pri procesih prenosa kisika, sintezi hemoglobina in delitvi celic (Lui in sod., 2017). V naši raziskavi so bile povprečne vsebnosti linolne in linolenske kisline v ličinkah od  $13,00 \pm 0,22$  % (PT) do  $24,81 \pm 4,85$  % (GO) in od  $0,543 \pm 0,001$  (GO) do  $1,31 \pm 0,46$  % v SM. Vrednosti so primerljive s podatki drugih raziskovalcev (Lui in sod., 2017), kjer so ugotovili najvišjo vsebnost linolne kisline, to je 31,4 %, in linolenske kisline 1,6 % v SM, in sicer šesti dan razvoja ličink. Vrednosti so se med njihovim razvojem zmanjševale.

Pri ličinkah, gojenih na GO in PO, smo ugotovili, da se vrednosti omega 3 VNMK niso bistveno spreminjale, medtem ko so se pri ličinkah, gojenih na PT, počasi zmanjševale (iz začetne vrednosti 2,37 % na 1,26 % v SM). Pri ličinkah, gojenih na GO in PT, se je vrednost omega 6 VNMK zmanjševala (pri PT celo prepolovila), medtem ko se je pri ličinkah, gojenih na PO, rahlo povečala (iz začetne vrednosti 21,7 % na 24,8 % v SM).

Med pomembnejšimi maščobnimi kislinami je tudi lavrinska kislina (C12:0), ki lahko deluje probiotično na črevesno mikrofloro, opisujejo pa tudi antibiotični učinek na patogene črevesne bakterije. V našem poskusu smo ugotovili povečevanje vsebnosti lavrinske kisline v ličinkah ČBM ne glede na substrat. Na koncu poskusa je bil njen delež v ličinkah, gojenih na GO, 45,91 %, v ličinkah, gojenih na PT, je znašal 51,94 % in na ličinkah, gojenih na PO, je bil 27,87 % v SM. Raziskovalci menijo, da bi probiotično delovanje lavrinske kisline v ličinkah ČBM lahko v prihodnosti bolj raziskali ter jih uporabili kot naravni dodatek krmi za rejne živali. Vendar bi hkrati to pomenilo tudi večjo vsebnost nekaterih nezaželenih maščob, zato so potrebne nadaljnje raziskave (Wang in Shelomi, 2017). Lavrinska kislina prevladuje v prepupah tudi, če je v substratu nizka vsebnost SM. Sintetizira se namreč lahko iz drugih hranil, predvsem škroba ali sladkorjev (Spranghers in sod., 2017).

NMK so v prehrani ljudi nezaželeni, vendar pa so v naravi zelo pogosti in se v večjem deležu nahajajo v rastlinah in v živalskih tkivih. Ugotovljena višja vsebnost NMK v ličinkah ČBM ni presenetljiva (od  $54,15 \pm 3,45$  % (PO) do  $75,17 \pm 1,17$  % (PT) v SM). Poznano je, da sprememba substrata ne vpliva na vrednosti NMK v ličinkah ČBM, vendar pa njegova sestava in masa ličink lahko do nekatere mere vplivata na sestavo maščobnih kislin. V našem poskusu

smo ugotovili močno korelacijo le med vsebnostjo C 18 : 0 (stearinska kislina) v substratu in ličinkah, ki je bila tudi statistično značilna ( $r = 0,800$ ;  $p = 0,0281$ ). Na splošno bodo težje ličinke imele večjo vsebnost NMK od nenasičenih. NMK se namreč slabše oksidirajo kot nenasičene, ugotovljena pa je bila tudi bolj učinkovita absorpcija in razgradnja srednjeveržnih maščobnih kislin v primerjavi z dolgoverižnimi maščobnimi kislinami (Sprangers in sod., 2017), zaradi česar ima ličinka ČBM boljšo zalogo energije v obliki maščob za obdobje odrasle muhe (Lui in sod., 2017).

V vsebnostih maščobnih kislin je bilo največ statistično značilnih razlik pri 3. odvzemu, na koncu poskusa pa se vsebnosti maščobnih kislin niso razlikovale med posameznimi skupinami.

Tudi vsebnost mineralov v ličinkah ČBM je odvisna od substrata. Ličinke, gojene na GO in PO, so se statistično značilno razlikovale v ugotovljenih vsebnostih: Na, Mg, P, Mn, Cu in Zn. Med ličinkami, gojenimi na PT in PO, pa je bila statistično značilna razlika v vsebnosti: K, Cd in Se.

Ličinke ČBM naj bi akumulirale Ca in Mg, ne pa Na ali S (Wang in Shelomi, 2017). V našem poskusu se je povečevala le vrednost Fe, koncentracija drugih elementov pa se je med odvzemi povečevala in zmanjševala ali pa je ostajala na približno enaki ravni. Na splošno se je vsebnost K zmanjševala, vsebnosti: Mg, P, Na, Mn, Se, Co, Cd in As pa so ostajale približno enake. Pri ličinkah, gojenih na GO, se je vsebnost Cu in Zn najprej zmanjšala, nato pa ponovno povečala na približno začetno vrednost (Zn 4,185 % in Cu 1,205 % v SS). V substratu GO je bilo ugotovljeno 8,78 % Cu in 22,24 % Zn v SS.

Podobno je bila pri ličinkah, gojenih na PT, vsebnost Zn največja na začetku poskusa (16,25 %), nato se je začela zmanjševati. Po 3. odvzemu je vsebnost začela rahlo naraščati, to je do  $9,06 \pm 0,641$  %. Delež Cu v substratu PT je bil 23,98 % SS, v ličinkah pri zadnjem odvzemu pa 1,593 %.

Vrednost Zn se je zmanjševala tudi pri ličinkah, gojenih na PO.

Ugotovljene vsebnosti elementov v naši raziskavi so primerljive z drugimi avtorji (Tschirner in Simon, 2015), ki so sicer ugotovili nekoliko višje vrednost Na, Mn, Fe, Zn in Cu ter manjšo vrednost K.

Ličinke ČBM naj bi vsebovale še enkrat toliko Ca kot druge vrste insektov (6,6-9,3% v SS, v primerjavi z drugimi, ki imajo vrednosti pod 1%) (Wang in Shelomi, 2017). Začetne vrednosti Ca v substratih GO, PO in PT so bile sledeče: 0,93 %, 0,14 % in 0,27 % v SS. V ličinkah, gojenih na GO, smo na začetku poskusa določili vrednosti okoli 2 %, ki pa se je po dodatku Ca povečala na 6 %. Vrednosti Ca po dodatku so narasle tudi pri ličinkah, gojenih na PO (iz 0,55 % na 7,89 %) in PT (iz 1,16 % na 7,89 %). Končne vrednosti Ca po dodatku so bile tako primerljive med substrati in niso imele pomembne vloge pri rasti ličink. V raziskavi smo pokazali, da se z dodatkom Ca v substrat lahko značilno poveča njegova koncentracija v ličinkah. Vendar ne smemo pozabiti na podatek, da niso zaželeno previsoke koncentracije pepela v ličinkah. Previsoke vrednosti Ca namreč povišajo pH želodca, kar vodi v večjo nevarnost bakterijskih infekcij (ki bi jih nizek pH sicer zaviral). Z ekstrakcijo maščobe bi se vrednost mineralov relativno še povišala, zato je potrebno to idejo v prihodnosti še proučiti. Ličinke, gojene na substratu z več SM, manj pepela ter SV, kot so npr. GO, vsebujejo manj pepela in bi bile zato primernejše za krmo rejnih živali (Sprangers in sod., 2017).

Lui in sod. (2017) so ugotovili, da je količina elementov, kot so: Ca, P, Na, Fe in Zn, najvišja predvsem pri zreli ličinki in pri prepupi, ki predstavljata ekonomsko najbolj učinkoviti fazi razvoja. Ocenili so celo višjo vsebnost mineralov (Ca, P) v prepupi kot v ličinki, ker se minerali začnejo kopičiti v eksoskeletu, ki nastaja pri prepupi. Koncentracije Na, Fe in Zn pa so ostajale višje v ličinkah pred fazo prepupe. Ker smo v našem poskusu ličinke pobrali pred nastopom faze prepupe, so vrednosti Fe še vedno naraščale. Enako smo zaznali za Zn, z izjemo ličink, gojenih na PO. Po ugotovitvah Wang in Shelomi (2017) se vrednosti akumuliranega Zn manjšajo z njegovim naraščanjem v substratu. V PO smo res ugotovili največjo koncentracijo Zn (94,15 % na SS) v primerjavi z GO (22,34 % na SS) in PT (60,58 % na SS). Visoka raven mineralov v ČBM podpira trditev, da bi užitne žuželke lahko predstavljale trajnosten vir hranil predvsem v državah, kjer primanjkuje hrane (Lui in sod., 2017).

Nevarnost akumuliranja težkih kovin je bila do danes že delno raziskana (Wang in Shelomi, 2017). Ličinke ČBM naj bi akumulirale Cd, medtem ko te bojazni za Cr, As, Ni in Hg ni. V našem poskusu smo merili vrednosti As, Cd in Pb. Pri vseh treh substratih so te ostale zanemarljivo nizke, pod 1 % v SS. Biancarosa in sod. (2018) so ocenjevali vpliv koncentracije težkih kovin v krmi na koncentracijo v ličinkah ČBM. V substrat, na katerem so gojili ličinke, so postopoma dodajali onesnažene morske alge. Zamenjava osnovnega substrata iz žit z več kot 50 % onesnaženih morskih alg je imela negativne učinke na rast ličink in na njihovo preživetje. Koncentracija Pb, Hg in As v ličinkah je linearno naraščala s koncentracijo omenjenih elementov v substratu. Večina celotnega As, najdenega v morskih algah, je v obliki organskega As, ki za zdravje ni škodljiv tako kot so anorganske oblike. Ker so v ličinkah ugotovili < 1 % celotnega As v anorganski obliki, so domnevali, da ličinke organskih oblik arzena ne morejo pretvoriti v anorganske. Tako bi zamenjava ribje moke, ki pogosto vsebuje toksične elemente, z moko ličink ČBM, ki so se hranile na substratu s 60 % vsebnostjo morskih alg, lahko v prihodnost predstavljala obetajoče posamično krmilo.

Pri uporabi ličink ČBM kot predelovalca kompostov se srečamo z ugotovitvijo, da jih v tem primeru ne moremo uporabljati za prehrano (npr. akumuliranje Cd). Dobimo sicer neoporečen kompost, vendar pa ličinke vsebujejo večji delež težkih kovin (Wang in Shelomi, 2017).

Spreminjanje koncentracije posameznih elementov med poskusom je včasih težko pojasniti, vsekakor pa vpliva tudi medsebojno delovanje elementov in njihova koncentracija v substratu. Elementi, pri katerih smo ugotovili zelo močno korelacijo med vsebnostjo v ličinkah in v substratu, so: As, Ca, Cd, Mg, Mn in Zn. Poleg tega smo zelo močno korelacijo ugotovili še med vsebnostjo As in Ca v ličinkah, As in Co, As in Fe, Ca in Co, Co in Fe, Cu in Mg, Cu in Mn ter Cu in Zn.

Substrati, ki smo jih uporabili za rejo ličink ČBM, so se med seboj precej razlikovali. GO so bili sestavljeni iz odpadnega sadja, zelenjave, ki so predstavljali za ličinke vir ogljikovih hidratov, vlaknin, vitaminov in mineralov ter iz mlečnih proizvodov in koščkov mesa, vira beljakovin in maščob. Učinkovit metabolizem in absorpcija vseh hranil je pozitivno vplivala na antimikrobni mehanizem v črevesju ličink. V substratu GO ličinke ČBM niso samo najhitreje rastle, ampak smo v njem na koncu poskusa ugotovili tudi najmanjše število bakterij *E. coli*.

Našteli smo manj kot 100 cfu/g bakterij, tako v posodah z dodanim Ca kot v posodah brez njega. V preostalih dveh substratih (PO in PT) pa smo ugotovili višje vrednosti *E. coli* (nad 190.000 cfu/g). Ugotovili smo tudi, da so bile vrednosti med posodami s Ca ali brez njega zanemarljivo podobne, vendar bi za natančne zaključke morali preiskavo ponoviti in jo usmeriti v vpliv Ca na mikrobiološko sestavo.

PO in PT sta posamični krmili, zaradi česar niso imele ličinke pestrosti surovin med razvojem. Njihova črevesna mikrobiota izkorišča del hranil za svojo rast in razvoj, zato se pestrost substrata odraža tudi na njeni učinkovitosti in raznolikosti. V črevesju najdemo mikrobiološke združbe, ki jih sestavljajo družine bakterij, protozojev, gliv in virusov. Sodelujejo pri prebavi in fermentaciji rastlinskih polimerov, sintezi vitaminov, biometabolizmu toksičnih produktov, ohranjanju mukozne integritete in zaščiti pred kolonizacijo patogenov (Bogataj, 2018).

Različna hranilna sestava substratov je po našem mnenju vzrok, zakaj smo determinirali različne vrste bakterij družine *Enterobacteriaceae* spp. Po ugotovitvah Klammersteiner in sod. (2020) so enterobakterije ene izmed glavnih črevesnih bakterij, ki z izločanjem antimikrobnih snovi sodelujejo pri metabolizmu hranilnih snovi in tako omogočijo, da postanejo za ličinko hranila izkoristljiva. V PT in PO smo ugotovili podobne rodove enterobakterij, ki smo jih dokazali tudi v ličinkah, gojenih na obeh substratih: *Klebsiella* spp. in *Cronobacter* spp. V ličinkah, gojenih na GO, je prevladoval rod *Proteus* spp. Ne smemo pozabiti, da smo na začetku poskusa jajčeca izlegali na PO. Ker smo ugotovili prisotnost enterobakterij že pri prvem vzorčenju čistega substrata PO, je to zagotovo vplivalo na kasnejše rezultate. Vendar pa ugotovljena različnost v bakterijskih rodovih kasneje med poskusom potrjuje, da ima raznovrstnost substrata vpliv na črevesno mikrofloro, ta pa na ličinkino rast in obrambo pred nezaželenimi mikoroorganizmi. V substratu PT smo determinirali še rodova *Enterobacter* spp. in *Citobacter* spp., v PO pa *Acinetobacter* spp. in *Serratia* spp.. Primerljive vrste enterobakterij so zasledili tudi drugi raziskovalci (Gold in sod., 2018; Wang, 2017; Smet in sod., 2018; Erickson in sod., 2004; Klammersteiner in sod., 2020). Nekateri avtorji so proučevali ličinke divjih ČBM (Smet in sod., 2018) in ugotovili, da ravno zato, ker imajo ličinke v naravi dostop do bolj raznovrstne prehrane, tudi boljše rastejo kot na enoličnih substratih, ki jih uporabljamo v reji. V naravi se ličinka enostavno prestavi, ko ji substrat več ne ustreza, v reji pa se ji enak substrat samo nalaga.

Klammsteiner in sod. (2020) so ličinke ČBM gojili na treh različnih substratih. Substrat z najvišjo vsebnostjo beljakovin je predstavljala krma za piščance, ki je bila v osnovi iz pšeničnih otrobov. Uporabili so še mešanico zelenjave in sadja, vendar je zelo visoka vsebnost celuloze zaviralno delovala na ličinkin metabolizem, saj so te najpočasneje rastle. Poleg tega so uporabili še svežo pokošeno travo, na kateri ličinke niso najboljše priraščale, so pa imele zelo raznovrstno črevesno floro. Ugotovili so, da bolj kot je substrat raznovrsten in večja kot je vsebnost beljakovin, bolj učinkovito oziroma zaviralno deluje črevesna mikrobiota na patogeno *E. coli*. Tudi Smet in sod. (2018) so ugotovili, da prehrana, bogata z beljakovinami, sproži najmočnejši odziv ličink proti patogenim mikroorganizmom. Isti avtorji (Smet in sod. (2021) so ugotovili tudi, zakaj ličinke, rejene na substratu, ki je zelo raznovrsten in sestavljen iz zelenjave, sadja in mlečnih proizvodov, manj uspešno inaktivirajo bakterije v primerjavi z ličinkami, gojenimi na gnoju (Lalander in sod., 2013; Liu in sod., 2008). *E. coli* in *Salmonella* spp. sta v gnoju verjetno izpostavljeni bolj neugodnim pogojem in neuspešno tekmujeta z ličinkami ČBM za hranilne snovi. Posledica je, da so bolj občutljive na antimikrobne peptide v črevesju ličink.

V našem poskusu smo ličinke vzrejali na mešanici bioloških odpadkov ter na posamičnih krmilih, v nobenem vzorcu nismo dokazali *Salmonella* spp. Še vedno ni znano, kako hitro *Salmonella* spp. lahko zraste na substratu ali v ličinki in kaj vse vpliva na njeno inaktivacijo (Smet in sod., 2021). Po podatkih iz literature substrati na osnovi odpadne zelenjave, sadja in mlečnih proizvodov lahko vsebujejo *Salmonella* spp. (Jongen, 2005; Lee et al., 2016) že v času skladiščenja substrata (Smet in sod., 2021). Erickson in sod. (2004) so inhibicijo *Salmonella enteritidis* pripisovali vsebnosti amonijaka v substratu, odvisnem od vsebnosti beljakovin v substratu.

V evropskem projektu PROteINSECT so med leti 2013 in 2015 izvedli ankete, v katerih so pokazali splošno soglasje ljudi o uporabi insektov v prehrani rejnih živali. 64 % udeležencev je zdravstveno tveganje uživanja živalskih proizvodov, če bi bile živali krmljene z ličinkami, ocenilo kot "ni tveganja" ali je "nizko tveganje", 88% udeležencev pa je opozorilo na pomanjkanje znanja in raziskav (Sogari in sod., 2019). Dejavnike, ki vplivajo na potrošnikovo odločitev, so raziskovali Ankamah-Yeaboah in sod. (2018). Analizirali so podatke, zbrane iz spletnega vprašalnika v Nemčiji. Večina anketiranih potrošnikov ni imela pomislekov glede

uporabe žuželk v prehrani živali. Bazoche in sod. (2016) menijo, da bi odnos do uporabe žuželk v prehrani lahko izboljšali z informativnimi kampanjami o negativnem vplivu tradicionalnih praks krmljenja na naše okolje. Analize so tudi pokazale, da ni večjih vplivov na aromo, okus in teksturo živalskega mesa, če so te hranjene z moko ličink ČBM (Sogari in sod., 2019).

S tržnega vidika je zanimivo opazovati, kako nekatera podjetja promovirajo za proizvodnjo žuželk ličinke žuželk kot krmo, ki predstavlja naravno prehrano piščancev, zato je dobra za njihovo naravno vedenje. V prihodnosti bo zanimivo opazovati, kako bo zasebni sektor razvijal svoje oglaševalske kampanje za rejce živali in kako bodo potrošniki sprejeli tovrstne informacije (Sogari in sod., 2019).

Z našo raziskavo smo zagotovo pokazali potencial v reji ličink ČBM, trajnostno rejo, učinkovito predelavo substrata in dobro hranilno vrednost ličink. Potrebne so še nadaljnje raziskave, da ugotovimo optimalne pogoje, substrat in morebitna tveganja, predvsem v akumulaciji težkih kovin in potencialni alergenosti.

## 6 SKLEPI

1. S poskusom smo dokazali, da je v poletnih mesecih mogoče gojiti ličinke ČBM v naravnih klimatskih razmerah, čeprav se je temperatura v enem dnevu lahko spremenila za  $\pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vlažnost pa za  $\pm 30\text{ }\%$ .
2. Substrat GO ni vseboval največ SB in SM, ampak samo največ SM. Največ SB so vsebovale PT. Kljub temu so ličinke, gojene na GO, dosegle največjo maso ( $0,271 \pm 0,031\text{ g}$ ), vsebovale pa so največ SM ( $36,68\text{ }\%$ ).
3. Ličinke, ki smo jih gojili na PO, so rastle zelo slabo, zato pri zadnjem vzorčenju ni bilo dovolj vzorca za vse analize ( $0,036 \pm 0,010\text{ g}$ ). Kljub temu pa so vsebovale primerljivo vsebnost SB, SM pa izredno malo ( $3,98 \pm 0,43\text{ }\%$ ). PO so vsebovali največ SV ( $16,01\text{ }\%$ ).
4. Vsebnost SB in SM v ličinkah se je zelo različno spreminjala med odvzemi in skupinami. Pri ličinkah, gojenih na GO, so se s starostjo ličink povečevale SM in manjšale SB. Pri ličinkah, gojenih na PT, se od 3. odvzema naprej vsebnost SB ni več spreminjala, SM pa so se povečevale do 4. odvzema. V ličinkah, gojenih na PO, se je vsebnost SB manjšala do 4. odvzema, potem je narasla. Vsebnost SM se je ves čas zmanjševala.
5. Po dodatku Ca v koncentraciji  $5\text{ }\%$  v substratih se je vsebnost Ca v ličinkah statistično značilno povečala.
6. Mikrobiološka slika GO ni bila slabša od preostalih dveh substratov. Vsi vzorci so bili negativni na *Salmonella* spp., vsebovali pa so enterobakterije. *E. coli* smo ugotavljali samo pri zadnjem vzorčenju in jo potrdili v vseh vzorcih, vendar jo je bilo številčno več v PT in PO kot v GO.

## 7 POVZETEK

Na svetu trenutno živi 7,2 milijard prebivalcev, po napovedih strokovnjakov pa je 80 % možnost, da bo število do leta 2100 naraslo na med 9,6 in 12,3 milijard (Gerland in sod., 2014). S povečevanjem svetovnega prebivalstva se povečuje tudi potreba po hrani, zato v prihodnosti potrebujemo nove vire in nove načine pridelave hrane. To zelo obremenjuje okolje, zato moramo iskati tudi okolju bolj prijazne načine, ki bodo hkrati omogočali dovolj veliko proizvodnjo. V ta namen že preizkušajo nove ali izboljšane sorte rastlin, še neuporabljene stranske proizvode živil ter alternativne vire beljakovin, kot so: žuželke in alge (EFSA, 2015). Glede na primerljivo hranilno sestavo bi žuželke lahko uporabljali namesto trenutno poznanih živalskih in rastlinskih beljakovin. Največja prednost pri reji žuželk je, da jih lahko vzrejamo na substratu, slabše kakovosti (npr. organski ostanki), in pri tem pridobivamo kakovostne beljakovine (van Huis, 2013).

V zadnjih letih je v EU precej zanimanja za uporabo žuželk v prehrani ljudi in živali. Vendar je predhodno potrebno preučiti vsa znana tveganja za zdravje ljudi in živali. Poleg tega bi za rejo žuželk morala veljati enaka pravila glede zdravja in dobrobiti, kot veljajo za druge rejne živali (EFSA, 2015).

V prehrani ljudi se v nekaterih delih sveta uporabljajo žuželke v vsakodnevni prehrani že generacije, v drugih delih sveta pa je to še vedno tabu. Ker žuželke ne potrebujejo za rast veliko prostora, ker hitro priraščajo in porabljajo malo virov, v pogledu trajnostne prihodnosti vsekakor pridobivajo na pomenu (van Huis in sod., 2013). Črna bojovniška muha (*H. illucens*) je vrsta žuželke, ki bi lahko v prihodnosti pomenila nov pomemben vir beljakovin v prehrani ljudi in živali. Uspešno izkorišča hranilne snovi različnih organskih substratov in jih pretvarja v sebi lastne hranilne snovi, odvisne od sestave substrata (Bogataj, 2018). Življenjski cikel *H. illucens* traja približno 40-45 dni in je sestavljen iz štirih faz: odrasle muhe, ki se ne prehranjuje (nima ustnega aparata), jajčeca, ličinke in prepupe/pupe (Bogataj, 2018). Za prehrano ljudi in živali so najbolj zanimive ličinke. Uspešno rastejo pri temperaturi okoli 30 °C in relativni vlagi med 60 % in 70 % (Wang in Shelomi, 2017).

V naši raziskavi smo ličinke *H. illucens* gojili 34 dni (od 21. 7. do 24. 8. 2020) v naravnih klimatskih razmerah (povprečna temperatura zraka 23,4 °C ± 3,8 °C in povprečna relativna

vlažnost  $82,9 \% \pm 11,4$ ) na treh različnih substratih: gospodinjskih odpadkih (GO), pivskih tropinah (PT) in pšeničnih otrobih (PT). Na podlagi zakonodaje so ličinke uvrščene med rejne živali (Uredba 1069/2009/ES), zato lahko uporabljamo za krmljenje samo proizvode, dovoljene za krmljenje rejnih neprežvekovalcev (Uredba 767/2009/ES). GO so za krmljenje rejnih živali prepovedani, vendar smo v raziskavi želeli preučiti tudi vidik kompostiranja odpadkov oziroma pomen *H. illucens* v krožnem gospodarstvu. Ličinke smo med poskusom vzorčili petkrat (16., 20., 24., 28 in 34. dan), substrat pa štirikrat (pred začetkom poskusa, nato pa še 20., 24. in 34. dan). Vzorce ličink in substrata smo analizirali na osnovne skupine hranilnih snovi (surove beljakovine - SB, surove maščobe - SM, vlago, pepel in surova vlaknina - SV), vsebnost 14 elementov (As, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Na, Mg, Mn, P, Pb, Se in Zn) in različnih maščobnih kislin. 20. dan poskusa smo v substrat pričeli dajati Ca.

S poskusom smo dokazali, da bi v poletnem času ličinke *H. illucens* lahko gojili pri zunanji temperaturi in vlagi. Ličinke na PO so rastle izredno slabo in dosegle maso  $0,036 \pm 0,010$  g, v primerjavi z ličinkami na GO ( $0,271 \pm 0,031$  g) in na PT ( $0,147 \pm 0,041$  g). Ličinke, gojene na GO, so dosegle največjo maso že pri 4. vzorčenju, zato bi bil zanje primeren krajši čas gojenja. Razlog za slabo priraščanje ličink, gojenih na PO, je verjetno prenizka vsebnost vlage (ki je bila na koncu poskusa manj kot 10 %) in prevelika vsebnost vlaknin v substratu (16 % na SS). Posode, v katerih smo gojili ličinke, so bile odprte in izpostavljene vplivu okoliškega zraka. Ker smo poskus delali poleti, ko je prevladovalo sonce, je bilo pričakovano, da bo substrat bolj suh. Prav tako smo vzorčili v popoldanskem času, ko ni bilo več vpliva jutranje rose oziroma vlage. Pri ponovitvi poskusa bi vsekakor bolj natančno spremljali vsebnost vlage v substratu. Na krajši čas oziroma na daljši čas rasti ličink vpliva tudi razmerje hranilnih snovi, še posebej razmerje med beljakovinami in ogljikovimi hidrati (Gold in sod., 2018), ki je bilo pri PO največje, in sicer 1 : 3.

Vsebnost SB je bila v vseh ličinkah od 41 (GO) do 52,5 (PO) % na SS, vsebnost SM pa je bila največja v ličinkah, gojenih na GO (36,68 %), in najmanjša v ličinkah, gojenih na PO (3,6 %). Maščobe po podatkih iz literature ne vplivajo na razvoj ličink, kadar niso v presežku prisotne v substratu (Gold in sod., 2018). Podaljšana faza ličinke pred fazo prepupe, ki smo jo opazili pri ličinkah, gojenih na GO, je najverjetno posledica večje vsebnosti maščobe v substratu, zaradi česar je ta na splošno slabše in težje prebavljiv. Visoko korelacijo, ki je bila močno

statistično značilna, smo ugotovili med vsebnostjo SM v substratu in v ličinkah ( $r = 0,6652$ ,  $p = 0,0086$ ) ter vsebnostjo pepela ( $r = 0,7432$ ,  $p = 0,0006$ ).

Ličinke *H. illucens* vsebujejo v vseh fazah življenjskega cikla visoko raven esencialnih maščobnih kislin, vključno z linolno (18: 2,  $\omega$ -6) in  $\alpha$ -linolensko kislino (18: 3,  $\omega$ -3) (Lui in sod., 2017), kar smo potrdili tudi v naši raziskavi. Ličinke, gojene na PT, so vsebovale največji delež nasičenih maščobnih kislin (NMK, 75,  $17 \pm 1,17$  % v SM), ličinke, gojene na GO in PO, pa  $67,72 \pm 0,59$  % in  $54,15 \pm 3,45$  %. Delež NMK v substratih je bil, v primerjavi z vrednostmi v ličinkah, manjši, delež VNMK pa večji. Največ VNMK so vsebovale ličinke, gojene na PO ( $26,37 \pm 4,93$  % v SM). Podobno vsebnost VNMK so vsebovale ličinke, gojene na PT in GO ( $14,26 \pm 0,93$  % in  $15,21 \pm 0,18$  %). V ličinkah pa se je med poskusom povečeval predvsem delež lavrinske kisline (največ v ličinkah PT 51,94 % v SM).

Vsebnost Ca je bila največja v ličinkah, gojenih na GO (2,08 %), po dodatku Ca pa je vsebnost Ca dosegla največjo vrednost v ličinkah, gojenih na PO in PT (skoraj 8 %). Ličinke *H. illucens* naj bi vsebovale še enkrat toliko Ca kot druge vrste insektov (6,6-9,3 % v SS, v primerjavi z drugimi, ki imajo vrednosti pod 1%) (Wang in Shelomi, 2017), česar v naši raziskavi nismo potrdili. Vrednosti blizu 8 % Ca na SS smo v ličinkah dosegli šele po dodajanju Ca.

Med poskusom se je še zviševala vrednost Fe, česar ne znamo pojasniti. Verjetna razlaga je v razmerju Fe do vseh drugih elementov, kajti zelo močno korelacijo smo ugotovili med vsebnostjo As in Ca v ličinkah, As in Co, As in Fe, Ca in Co, Co in Fe, Cu in Mg, Cu in Mn ter Cu in Zn.

Vrednost Zn se je za približno 20 % začetne vrednosti zmanjšala le pri ličinkah, gojenih na PO. Vrednosti težkih kovin (As, Cd in Pb) so ostajale zanemarljivo nizke.

Elementi, pri katerih smo ugotovil zelo močno korelacijo med vsebnostjo v ličinkah in v substratu so As, Ca, Cd, Mg, Mn in Zn.

Pri začetnem vzorčenju substratov smo ugotovili, da GO, PT in PO ne vsebujejo salmonel, enterobakterije pa smo potrdili v vseh treh substratih in kasneje pri vseh njihovih vzorčenjih. V

PO in PT smo ugotovili *Cronobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* in *Klebsiella variicola*; posebej v PO pa še *Acinetobacter baumannii*, v PT pa *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter bugandensis*, *Enterobacter asburiae* in *Klebsiella variicola*. V GO smo potrdili druge vrste enterobakterij, in sicer *Citrobacter amalonaticus* ter *Proteus mirabilis*.

Vsi vzorci ličink so bili negativni na *Salmonella* spp., vsebovali pa so enterobakterije. Z metodo MALDI-TOF smo v ličinkah, ki so rastle na PO, našli bakterije *Enterobacter xiangfangensis*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola* in *Serratia marcescens*; v ličinkah, ki so rastle na GO *Proteus mirabilis* in *Providencia rettgeri* ter v ličinkah, raslih na PT bakterije *Alcaligenes faecalis*, *Citrobacter amalonaticus*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri* in *Providencia stuartii*. Raznolikost in hranilna sestava substrata sta po našem mnenju vzrok, zakaj smo determinirali različne vrste enterobakterij. PO in PT sta namreč posamični krmili, zaradi česar ličinke niso imele med razvojem takšne pestrosti surovin. Posledično tudi črevesna mikrobiota ni bila zelo raznolika, kajti poznano je, da črevesna mikrobiota izkorišča del hranil tudi za svojo rast in razvoj (Bogataj, 2018).

Bakterijo *E. coli* smo ugotavljali samo pri zadnjem vzorčenju in jo potrdili v vseh vzorcih, vendar jo je bilo številčno več v PT in PO kot GO. Našteli smo manj kot 100 cfu/g bakterij, v PO in PT pa več kot 190.000 cfu/g.

Vse navedeno nakazuje, da so bile v našem poskusu najbolj primeren substrat za gojenje ličinke *H. illucens* PT. Uporabili smo tudi GO in potrdili, da ličinke *H. illucens* hitro in dobro rastejo ter predelujejo substrat. V prihodnosti je potrebno nadaljevati raziskave o najbolj primerem substratu za gojenje *H. illucens*, s katerim bi po eni strani pripomogli k razbremenjevanju okolja in trajnostnemu gospodarstvu, po drugi strani pa živalim (in ljudem) zagotovili kakovosten in varen alternativen vir beljakovin.



## 8 SUMMARY

There are currently around 7.2 billion people living on this planet and scientist predict that the probability of population increasing to 9.6 or 12.3 billion by the year 2100 is around 80% (Gerland et al., 2014). As the world population is growing, the need to find new resources and new ways to grow food is increasing. However, current agriculture methods are earth destructive, and there is a need for more sustainable solutions and regenerative agricultural approaches which will produce enough food and feed. Consequently, new practices have tested the viability and applicability of various plants and by-products to reach these goals. Insects and algae represent an alternative source of protein, which triggered current research (EFSA, 2015). Due to their comparable nutritional value, insects could replace currently known plant and animal proteins. The most significant advantage in rearing insects is that they could grow on lower quality substrates (such as organic waste), but in the end larvae would still be rich in protein (van Huis et al., 2013).

In the past few years, the EU has shown a growing interest in insects in food and feed. However, before they can safely enter our food chain, we need to consider critical risks and threats to human and animal health and conduct thorough research. Moreover, the regulations for insect rearing should impose the health and welfare of insects in the same way as it is considered for other farm animals (EFSA, 2015).

In certain places around the world, insects have been consumed for generations, however, it is still predominantly considered a taboo. However, due to fast growth and the scarcity of resources and space, insects represent a valuable solution for a more sustainable future (van Huis et al., 2013). Black Soldier Fly (*H. illucens*) is one of the prospective insect species that could be a potential new protein source in food and feed. It successfully grows on different organic substrates, converting them into a nutritionally valuable source (Bogataj, 2018). The life cycle of *H. illucens* lasts for approximately 45–50 days and is divided into four stages: an adult fly, that no longer eats (as it has no mouth), eggs, larvae and pupal stage (Bogataj, 2018). For the use in food, the larvae phase is most useful. They can grow successfully at temperatures around 30 °C and relative humidity between 60 and 70 % (Wang and Shelomi, 2017).

In our study, we reared *H. illucens* for 34 days (between 21st of July until 24th of August 2020) in a natural environment. The average air temperature was  $23.4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3.8\text{ }^{\circ}\text{C}$  and relative humidity  $82.9\text{ \%} \pm 11.4\text{ \%}$ . We reared Black Soldier Fly larvae on three different substrates: Kitchen waste (KW), brewers' grains (SG) and wheat bran (WB). Based on Regulation (EC) No 1069/2009 insect larvae are considered livestock, which means that the substrates on which they are reared fall into the same category as a non-ruminant feed (Regulation (EC) No 767/2009).

KW is banned as feed for livestock. Nevertheless, we wanted to explore the aspect of waste composting by Black Soldier Fly larvae and furthermore understand its role in the circular economy. We collected five samples of larvae during the experiment (on day 16, 20, 24 and 34 of the experiment) and four samples of the substrates (before the experiment and then on day 20, 24 and 34). We analysed them for analytical constituents (crude protein-CP, crude fat-EE, moisture, crude ash and crude fibre-CF), the concentration of 14 different elements (As, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Na, Mg, Mn, P, Pb, Se and Zn) as well as for the content of different fatty acids. On day 20 of the experiment, we started adding Ca to the substrates.

We proved that in summertime, *H. illucens* can grow at natural temperatures and humidity. Larvae reared on WB grew poorly and gained only  $0.036\text{ g} \pm 0.010\text{ g}$ , while larvae grown on KW and SG gained  $0.271\text{ g} \pm 0.031\text{ g}$  and  $0.147\text{ g} \pm 0.041\text{ g}$ , respectively. As larvae reared on KW gained the highest mass by the 4th sampling already, we believe that their rearing could be shortened. On the contrary, we believe the reason for the poor growth of larvae reared on WB is attributed to the low moisture content of the substrate (which dropped to less than 10 % by the end of the experiment) and the high crude fibre content (16 % DM). Furthermore, by rearing larvae in open boxes exposed to uncontrolled air, we expected higher dryness by conducting our experiment in the summer months due to prolonged exposure to the sun. Moreover, we took the samples in the afternoon when the dryness was higher, which affected our results. If we were to repeat the experiment, we would monitor the moisture content in the substrate more closely. Nutrient balance also had a great influence on the growth rate, particularly the ratio between protein and carbohydrates (Gold et al., 2018), which was highest in WB (1:3).

Crude protein content was comparable among all larvae (ranging from 41 % to 43 % DM), whereas crude fat was highest in larvae reared on KW (36,7 %), and lowest on larvae reared on WB (3,6 %). Based on the literature review (Gold et al., 2018), crude fat does not affect the development of larvae when they are not present in excess in the substrate. The larval stage reared on KW was prolonged due to the high fat content in the substrate, making the digestion more difficult. The highest correlation, which was statistically very typical, was found between crude fat content in the substrate and the larvae ( $r = 0,6652$ ,  $p = 0,0086$ ) as well as the ash content in the substrate and the larvae ( $r = 0,7432$ ,  $p = 0,0006$ ).

*H. illucens* larvae contain high level of essential fatty acids throughout their lifespan, including linoleic acid (18: 2,  $\omega$ -6) and alpha-linolenic acid (18: 3,  $\omega$ -3) (Lui et al., 2017), which we also confirmed. Larvae reared on SG contained the highest concentration of saturated fatty acids ( $75.17 \% \pm 1.17 \%$  in DM), whereas larvae reared on KW and WB contained  $67.72 \% \pm 0.59 \%$  and  $54.15 \% \pm 3.45 \%$ , respectively. The fraction of saturated fatty acids in the substrate was lower than in larvae, while the polyunsaturated fatty acids were higher. The highest content of polyunsaturated fatty acids was found in larvae reared on WB ( $26.37 \pm 4.93 \%$  DM). Similar content was found in SG and KW ( $14.26 \% \pm 0.93 \%$  and  $15.21 \% \pm 0.18 \%$ , respectively). Lauric acid had the highest rise during larval growth (with the highest content in SG of  $51.94 \%$  DM).

Ca content was highest in larvae reared on KW (2.08 %), but after addition, it was highest in larvae reared on WB and SG (almost 8 %). *H. illucens* are known to contain at least twice as much Ca as other insects (6.6–9.3 % DM, compared to some other species that contain even less than 1%) (Wang and Shelomi, 2017), but which we did not confirm in our research. Concentrations close to 8% were only found after adding Ca to the substrates.

During rearing, the Fe content also increased, which remained unexplained. The probability is in Fe ratio to other elements, as we noticed a high correlation between As in Ca in larvae, As and Co, As and Fe, Ca in Co, Co and Fe, Cu and Mg, Cu and Mn, and Cu and Zn. Zn content decreased by about 20 % only in larvae reared on WB. Heavy metal content (As, Cd and Pb) remained negligibly low. Elements for which we noticed a high correlation between the larvae and the substrate were As, Ca, Cd, Mg, Mn and Zn.

After the first sampling, we found that neither KW, SG nor WB contained traces of *Salmonella* spp., whereas *Enterobacteriaceae* were detected in all three substrates even in the later sampling. In WB and SG we found *Cronobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae* in *Klebsiella variicola*; in WB specifically *Acinetobacter baumannii* and in SG *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter bugandensis*, *Enterobacter asburiae* and *Klebsiella variicola*. We found different species in KW, namely *Citrobacter amalonaticus* and *Proteus mirabilis*.

All samples of larvae were also negative for *Salmonella* spp., but contained *Enterobacteriaceae*. In larvae reared on WB, we determined *Enterobacter xiangfangensis*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola* and *Serratia marcescens* by MALDI-TOF; in larvae reared on KW *Proteus mirabilis* and *Providencia rettgeri*; and in larvae reared on SG *Alcaligenes faecalis*, *Citrobacter amalonaticus*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri* and *Providencia stuartii*.

We believe that the different nutritional values of the substrates influenced why we identified different species of *Enterobacteriaceae*. SG and WB are feed materials, so the larvae did not have as much nutrient diversity during growth. Consequently, the gut microbiota might not have been very diverse, since it is known that the gut microbiota uses the same nutrients for its own growth (Bogataj, 2018).

We searched for *E. coli* in the last sampling and finally confirmed it in every sample, but the numbers were much higher in SG and WB than in KW. It was less than 100 cfu/g, whereas in SG and WB, we found more than 190000 cfu/g.

In conclusion, our results show that the most suitable substrate for rearing Black Soldier Fly larvae is SG. We used KW and proved that *H. illucens* could grow efficiently and quickly while composting the substrate properly. In the future, we would continue to research the most suitable substrate for rearing *H. illucens*, contributing to a more sustainable economy and providing animals (and humans) with a safe and high-quality alternative protein source.

## 9 ZAHVALE

Srčna hvala mentorici, izr. prof. dr. Bredi Jakovac Strajn, za vse spodbude med pisanjem tega dela, izkazano zaupanje, prijaznost in predvsem potrpežljivost, ki mi jo je namenila. Zahvaljujem se ji za čas, toplino in odprtost za vsa moja vprašanja. Zahvala velja tudi somentorici, doc. dr. Urški Jamnikar Ciglencečki, za znanstvene in akademske nasvete, vodenje v pravo smer in neverjetno hitro odzivnost ne glede na čas. Z njuno pomočjo je raziskovalna naloga v takšni obliki.

Velika zahvala gre podjetju Larvero d.o.o., kjer so mi Edo Duvelek, Aleš Kokol in Matic Markovič predstavili črno bojovniško muho kot nepogrešljivo prihodnost ter mi pomagali pri zbiranju vzorcev. Hvala za zanimivo raziskavo.

Zahvaljujem se doc.dr. Stanki Vadnjal, dr. vet. med., za pomoč pri interpretaciji rezultatov mikrobioloških analiz in prijaznost. Hvala tudi vsem drugim na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje, ki so sodelovali pri izvedbi mikrobioloških analiz.

Zahvaljujem se asist. dr. Katarini Pavšič Vrtač za analizo elementov, Poloni Koren in Ireni Indihar za izvajanje Weendske analize. Zahvaljujem se doc. dr. Zlatki Bajc za določanje maščobnih kislin. Brez njih Prešernove naloge ne bi uspeli dokončati.

Zahvaljujem se mag. Brigiti Grecc Smole za pregled literature ter slovenistki Ireni Šinkovec za lektoriranje Prešernove naloge.

Zahvaljujem se tudi svoji psički Eho, ki me je potrpežljivo čakala in ljubeznivo spodbujala, ter vsem bližnjim, ki so mi nesebično stali ob strani.

## 10 LITERATURA

1. Alexander P, Brown C, Arneth A, Finnigan J, Moran D, Rounsevell MDA. Losses, inefficiencies and waste in the global food system. *Agric Syst* 2017; 153: 190–200.
2. Ankamah-Yeboah I, Jacobsen JB, Olsen SB. Innovating out of the fishmeal trap: the role of insect-based fish feed in consumers' preferences for fish attributes. *Br Food J* 2018; 120: 2395–410.
3. Biancarosa I, Liland NS, Biemans D, et al. Uptake of heavy metals and arsenic in black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae grown on seaweed-enriched media. *J Sci Food Agric* 2018; 98: 2176–83.
4. Boccazzi IV, Ottoboni M, Martin E, et al. A survey of the mycobiota associated with larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) reared for feed production. *Plos One* 2017; 12(8): e0182533. doi:10.1371/journal.pone.0182533
5. Bogataj T. Use of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) for protein production from organic wastes and its microbiome. Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2018. Magistrsko delo
6. Braeckman B, Smagghe G, Brutsaert N, Cornelis R, Raes H. Cadmium uptake and defense mechanism in insect cells. *Environ Res* 1999; 80(3): 231–43.
7. Diener S, Zurbrugg C, Tockner K. Bioaccumulation of heavy metals in the black soldier fly, *Hermetia illucens* and effects on its life cycle. *J Insects Food Feed* 2015; 1(4): 261–70.
8. European Food Safety Authority. Appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. *EFSA J* 2016; 14: e04425. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4425
9. European Food Safety Authority. Risk profile related to the production and consumption of insects as food and feed. *EFSA J* 2015; 13(10): e4257. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4257
10. Erickson MC, Islam M, Sheppard C, Liao J, Doyle MP. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* in chicken manure by larvae of the black soldier fly. *J Food Prot* 2004; 67(4): 685–90.
11. Gerland P, Raftery AE, Ševčíková H, et al. World population stabilization unlikely this century. *Science* 2014; 346: 234–37.
12. Gintenreiter S, Ortel J, Nopp HJ. Bioaccumulation of cadmium, lead, copper, and zinc in successive developmental stages of *Lymantria dispar* L. (Lymantriidae, Lepid): a life cycle study. *Arch Environ Contam Toxicol* 1993; 25: 55–61.

13. Gold M, Tombberlin JK, Diener S, Zurbrugg C, Mathys A. Decomposition of biowaste macronutrients, micorbes and chemicals in black soldier fly larvae: a review. *Waste Manag* 2018; 82: 302–18.
14. ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: detection of *Salmonella* spp. France : Association française de normalisation, 2017: 50 str.
15. ISO 16649-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. France : Association française de normalisation, 2001: 8 str.
16. ISO 21528-2: Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2: colony-count technique. France : Association française de normalisation, 2017: 15 str.
17. Jeon H, Park S, Choi J, et al. The intestinal bacterial community in the food waste-reducing larvae of *Hermetia illucens*. *Curr Microbiol* 2011; 62: 1390–9.
18. Jongen W. Measuring microbiological contamination in fruit and vegetables. In: Pla M, Rodriguez-Lazaro D, Badosa E, Montesinos E, eds. Improving the safety of fresh fruit and vegetables. Cambridge : Woodhead Publishing, 2005: 89–134.
19. Khan S.H. Recent advances in role of insects as alternative protein source in poultry nutrition. *J Appl Anim Res* 2018; 46: 1144–57.
20. Klammersteiner T, Walter A, Bogataj T, et al. The core gut microbiome of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae raised on low-bioburden diets. *Front Microbiol* 2020; 11: e993. doi:10.3389/fmicb.2020.00993
21. Lalander C, Senecal J, Gros Calvo M, et al. Fate of pharmaceuticals and pesticides in fly larvae composting. *Sci Total Environ* 2016; 565: 279–86.
22. Lee KM, Herrman TJ, Post L. Evaluation of selected nutrients and contaminants in distillers grains from ethanol production in Texas. *Food Prot* 2016; 79(9): 1562–71.
23. Lindqvist L, Block M. Losses of Cd, Hg, and Zn during metamorphosis in the beetle *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Bull Environ Contam Toxicol* 1997; 58: 67–70.

24. Liu X, Chen X, Wang H, et al. Dynamic changes of nutrient composition throughout the entire life cycle of black soldier fly. *Plos One* 2017; 12(8): e0182601. doi: 10.1371/journal.pone.0182601
25. Mancuso T, Baldi L, Gasco L. An empirical study on consumer acceptance of farmed fish fed on insect meals: the Italian case. *Aquacult Int* 2016; 24: 1489–507.
26. Maryanski M, Kramarz P, Laskowski R, Niklinska M. Decreased energetic reserves, morphological changes and accumulation of metals in carabid beetles (*Poecilus cupreus* L.) exposed to zinc- or cadmium-contaminated food. *Comp Ecotoxicol* 2002; 11: 127–39.
27. Newton L, Sheppard C, Watson D, Burtle G, Dove R. Using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a value-added tool for the management of swine manure. Report of project for Animal and Poultry Waste Management Center. Raleigh: North Carolina State University, 2005: 17 str.
28. Nyakeri EM, Ogola HJO, Ayieko MA, Amimo FA. Valorisation of organic waste material: growth performance of wild black soldier fly (*Hermetia illucens*) reared on different organic wastes. *J Insects Food Feed* 2017; 3(3): 193–202.
29. Poret S, Bazoche P. What do trout eat: acceptance of insects in animal feed. In: 11èmes Journées de Recherche en Sciences Sociales. Lyon, 2017: 14 str.
30. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna : R Foundation for Statistical Computing, 2019. <https://www.R-project.org/> (15. 4. 2021)
31. Schrögel P, Wätjen W. Insects for food and feed-safety aspects related to mycotoxins and metals. *Foods* 2019; 8(8): e288. doi:10.3390/foods8080288
32. Shumo M, Osuga IM, Khamis FM, et al. The nutritive value of black soldier fly larvae reared on common organic waste streams in Kenya. *Sci Rep* 2019; 9: e10110. doi: 10.1038/s41598-019-46603-z
33. Skřivanová E, Marounek M, Benda V, Brezina P. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Vet Med Czech* 2006; 51: 81–8.
34. Smet JD, Vandeweyer D, Van Moll L, Lachi D, Van Campenhout L. Dynamics of *Salmonella* spp. inoculated during rearing of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) on chicken feed. *bioRxiv* 2021; e439665. doi:10.1101/2021.04.13.439665

35. Smet JD, Wynants E, Cos P, Van Campenhout L. Microbial community dynamics during rearing of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) and impact on exploitation potential. *Appl Environ Microbiol* 2018; 84(9): e02722–17. doi:10.1128/AEM.02722-17
36. Sogari G, Amato M, Biasato I, Chiesa S, Gasco L. The potential role of insects as feed: a multi-perspective review. *Animals* 2019; 9(4): e119. doi:10.3390/ani9040119
37. Sprangers T, Ottoboni M, Klootwijk C, et al. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *J Sci Food Agric* 2017; 97(8): 2594–600.
38. Tretola M, Ottoboni M, Luciano A, Rossi L, Baldi A, Pinotti L. Former food products have no detrimental effects on diet digestibility, growth performance and selected plasma variables in post-weaning piglets. *Int J Anim Sci* 2019; 18(1): e987–996. doi: 10.1080/1828051X.2019.1607784
39. Tschirner M, Simon A. Influence of different growing substrates and processing on the nutrient composition of black soldier fly larvae destined for animal feed. *J Insect Food Feed* 2015; 1(4): 249–59.
40. Uredba (ES) št. 1069/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 21. oktobra 2009 o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode in pridobljene proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi, ter razveljavitvi Uredbe (ES) št. 1774/2002 (Uredba o živalskih stranskih proizvodih). *Off J Eur Union* 2009; L300: e1–33. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1069&from=EN>
41. Uredba (ES) št. 178/2002 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane. *Off J Eur Union* 2002; L31: e1–24. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20060428:SL:PDF>
42. Uredba (ES) št. 767/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 13. julija 2009 o dajanju krme v promet in njeni uporabi, spremembi Uredbe (ES) št. 1831/2003 Evropskega parlamenta in Sveta in razveljavitvi Direktive Sveta 79/373/EGS, Direktive Komisije 80/511/EGS, direktiv Sveta 82/471/EGS, 83/228/EGS, 93/74/EGS, 93/113/ES in 96/25/ES ter Odločbe Komisije 2004/217/ES (Besedilo velja za EGP). *Off J Eur Union* 2009; L229:

- 1–28. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:02009R0767-20100901&from=EN>
43. Uredba (EU) 2015/2283 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 25. novembra 2015 o novih živilih, spremembi Uredbe (EU) št. 1169/2011 Evropskega parlamenta in Sveta in razveljavitvi Uredbe (ES) št. 258/97 Evropskega parlamenta in Sveta ter Uredbe Komisije (ES) št. 1852/2001 (Besedilo velja za EGP). Off J Eur Union 2015; L327: 1–22. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R2283&from=DE>
44. Uredba Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 999/2001 z dne 22. maja 2001 o določitvi predpisov za preprečevanje, nadzor in izkoreninjenje nekaterih transmisivnih spongiformnih encefalopatij. Off J Eur Union 2001; L147: 1–40. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2001/999/oj>
45. Uredba Komisije (ES) št. 152/2009, z dne 27. januarja 2009, o določitvi metod vzročenja in analitskih metod za uradni nadzor krme. Off J Eur Union 2009; L54: 1–130. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/sl/TXT/?uri=CELEX%3A32009R0152>
46. Uredba Komisije (EU) št. 142/2011 z dne 25. februarja 2011 o izvajanju Uredbe (ES) št. 1069/2009 Evropskega parlamenta in Sveta o določitvi zdravstvenih pravil za živalske stranske proizvode in pridobljene proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi, ter o izvajanju Direktive Sveta 97/78/ES glede nekaterih vzorcev in predmetov, ki so izvzeti iz veterinarskih pregledov na meji v skladu z navedeno direktivo. Off J Eur Union 2011; L54: 1–254. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0142&from=en>
47. Uredba Komisije (EU) št. 68/2013 z dne 16. januarja 2013 o katalogu posamičnih krmil (Besedilo velja za EGP). Off J Eur Union 2013; L29: 1–64. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/sl/TXT/?uri=CELEX:32013R0068>
48. van Huis A, van Itterbeeck J, Klunder H, et al. Edible insects: future prospects for food and feed security. Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013: 201 str. (FAO forestry paper, No. 171) <http://www.fao.org/docrep/018/i3253e/i3253e.pdf>
49. Verbeke W, Sprangers T, De Clercq P, De Smet S, Sas B, Eeckhout M. Insects in animal feed: acceptance and its determinants among farmers, agriculture sector stakeholders and citizens. Anim Feed Sci Technol 2015; 204: 72–87.
50. Volk N. Barvni vid bojvniške muhe (*Hermetia illucens*). Ljubljana : Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2018. Magistrsko delo

51. Wang YS, Shelomi M. Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. *Foods* 2017; 6(19): e91. doi:10.3390/foods6100091
52. Zheng L, Crippen TL, Singh B, et al. A survey of bacterial diversity from successive life stages of black soldier fly (Diptera: *Stratomyidae*) by using 16S rDNA pyrosequencing. *J Med Entomol* 2013; 50(3): 647–58.

## 11 PRILOGE

### PRILOGA 1

#### 1.1 Podatki hranilna vrednost ličinke in substrat (% na SS)

| datum      | time | posoda | st | st_vzorec     | ca_dodan | vzorec_vrsta         | vлага | SB        | SM        | SV       | pepel     |
|------------|------|--------|----|---------------|----------|----------------------|-------|-----------|-----------|----------|-----------|
| 28.07.2020 |      | 1      | 0  | 1 PN 2020/1   | ne       | pšenični otrobi (PO) | 58,6  | 18,429952 | 2,2537198 | 16,00773 | 7,5404831 |
| 28.07.2020 |      | 1      | 0  | 2 PN 2020/2   | ne       | gosp. odpadki (GO)   | 71,4  | 29,211189 | 21,124476 | 10,72727 | 6,980979  |
| 28.07.2020 |      | 1      | 0  | 3 PN 2020/3   | ne       | pivske tropine (PT)  | 82    | 31,02     | 5,8906667 | 9,4      | 4,8775556 |
| 6.08.2020  |      | 1      | 11 | 4 PN 2020/4   | ne       | ličinke PO           |       |           |           |          |           |
| 6.08.2020  |      | 1      | 17 | 5 PN 2020/5   | ne       | ličinke PO           |       |           |           |          |           |
| 6.08.2020  |      | 1      | 6  | 6 PN 2020/6   | ne       | ličinke GO           | 63,9  | 33,387258 | 48,432133 | 5,873684 | 7,934626  |
| 6.08.2020  |      | 1      | 10 | 7 PN 2020/7   | ne       | ličinke GO           | 65,5  | 32,310145 | 45,275362 | 7,1      | 8,3244928 |
| 6.08.2020  |      | 1      | 9  | 8 PN 2020/8   | ne       | ličinke PT           | 76,3  | 56,64557  | 23,734177 | 9,377637 | 7,0675105 |
| 6.08.2020  |      | 1      | 13 | 9 PN 2020/9   | ne       | ličinke PT           | 74,9  | 54,589641 | 19,370518 | 9,219124 | 6,8262948 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 11 | 10 PN 2020/10 | ne       | substrat PO          | 29,7  | 21,924324 | 0,8116216 | 22,24054 | 9,5918919 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 17 | 11 PN 2020/11 | ne       | substrat PO          | 23,6  | 21,600131 | 0,8218586 | 18,8606  | 9,7674738 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 6  | 12 PN 2020/12 | ne       | substrat GO          | 43,5  | 20,189735 | 7,4166372 | 21,32283 | 17,305487 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 10 | 13 PN 2020/13 | ne       | substrat GO          | 42,8  | 18,98514  | 6,9372727 | 21,96119 | 18,266783 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 9  | 14 PN 2020/14 | ne       | substrat PT          | 55,1  | 16,05167  | 1,2090869 | 31,89488 | 5,7640089 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 13 | 15 PN 2020/15 | ne       | substrat PT          | 49,4  | 16,831818 | 1,0245455 | 29,79545 | 5,9590909 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 11 | 16 PN 2020/16 | ne       | ličinke PO           | 74,2  | 63,729845 | 5,8355039 | 11,07868 | 11,188372 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 17 | 17 PN 2020/17 | ne       | ličinke PO           | 74,8  | 63,402778 | 5,6746032 | 10,80357 | 11,56746  |
| 10.08.2020 |      | 2      | 6  | 18 PN 2020/18 | ne       | ličinke GO           | 60,3  | 34,512594 | 48,21461  | 16,17456 | 7,8194207 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 10 | 19 PN 2020/19 | ne       | ličinke GO           | 61,7  | 34,533681 | 48,388512 | 8,571384 | 7,92      |
| 10.08.2020 |      | 2      | 9  | 20 PN 2020/20 | ne       | ličinke PT           | 69,4  | 50,717647 | 24,035294 | 11,11765 | 6,8823529 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 13 | 21 PN 2020/21 | ne       | ličinke PT           | 71,4  | 54,494755 | 26,554196 | 10,34441 | 6,9211538 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 11 | 22 PN 2020/22 | ne       | ličinke PO           | 71,7  | 60,185159 | 4,0644523 | 13,73428 | 11,277739 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 17 | 23 PN 2020/23 | ne       | ličinke PO           | 74,3  | 64,369261 | 4,8536965 | 12,24981 | 10,851479 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 6  | 24 PN 2020/24 | ne       | ličinke GO           | 59,5  | 34,955062 | 49,556543 | 6,172444 | 8,3958519 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 10 | 25 PN 2020/25 | ne       | ličinke GO           | 61    | 33,435385 | 50,207179 | 7,347128 | 8,6455897 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 9  | 26 PN 2020/26 | ne       | ličinke PT           | 68,4  | 50,371519 | 31,824684 | 7,998323 | 6,3227848 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 13 | 27 PN 2020/27 | ne       | ličinke PT           | 67,9  | 41,004984 | 28,894704 | 11,4729  | 5,8320561 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 11 | 28 PN 2020/28 | da       | ličinke PO+Ca        | 72,1  | 55,61147  | 4,3039427 | 12,34552 | 16,196416 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 17 | 29 PN 2020/29 | da       | ličinke PO+Ca        | 63,8  | 45,073757 | 7,2381215 | 14,36657 | 15,024586 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 6  | 30 PN 2020/30 | da       | ličinke GO+Ca        | 59,7  | 30,052357 | 45,452854 | 5,967692 | 15,72134  |
| 14.08.2020 |      | 3      | 10 | 31 PN 2020/31 | da       | ličinke GO+Ca        | 58,3  | 30,702638 | 46,730456 | 6,452758 | 16,235971 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 9  | 32 PN 2020/32 | da       | ličinke PT+Ca        | 67,8  | 40,757764 | 25,024845 | 8,552795 | 19,639752 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 13 | 33 PN 2020/33 | da       | ličinke PT+Ca        | 68,8  | 39,980769 | 23,903846 | 8,768269 | 17,769231 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 11 | 34 PN 2020/34 | ne       | substrat PO          | 30,4  | 21,889655 | 0,7613793 | 18,82299 | 12,583908 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 10 | 35 PN 2020/35 | ne       | substrat GO          | 12,3  | 21,877081 | 9,0020525 | 17,5854  | 17,48073  |
| 14.08.2020 |      | 3      | 10 | 36 PN 2020/36 | ne       | substrat GO          | 43,9  | 18,624955 | 7,3662745 | 10,56809 | 35,052585 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 9  | 37 PN 2020/37 | ne       | substrat PT          | 49,7  | 16,818489 | 0,8254473 | 31,77972 | 5,9535388 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 9  | 38 PN 2020/38 | ne       | substrat PT          | 50,5  | 14,349293 | 1,1355556 | 29,00828 | 19,201212 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 11 | 39 PN 2020/39 | ne       | ličinke PO           | 67,7  | 51,986068 | 4,6600619 | 14,28793 | 10,111455 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 17 | 40 PN 2020/40 | ne       | ličinke PO           | 68,8  | 54,542308 | 4,7292308 | 12,71538 | 10,707692 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 6  | 41 PN 2020/41 | ne       | ličinke GO           | 59,3  | 38,072727 | 45,381818 | 6,861818 | 7,8436364 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 10 | 42 PN 2020/42 | ne       | ličinke GO           | 58,9  | 38,381022 | 47,399513 | 7,22528  | 7,3406326 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 9  | 43 PN 2020/43 | ne       | ličinke PT           | 66,1  | 43,046018 | 30,410619 | 9,840619 | 5,7715929 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 13 | 44 PN 2020/44 | ne       | ličinke PT           | 64,7  | 46,760907 | 34,422663 | 7,143739 | 5,184136  |
| 18.08.2020 |      | 4      | 11 | 45 PN 2020/45 | da       | ličinke PO+Ca        | 63,1  | 39,655285 | 3,2682927 | 12,41951 | 24,403252 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 17 | 46 PN 2020/46 | da       | ličinke PO+Ca        | 57,2  | 38,351636 | 2,2598131 | 12,92874 | 19,556075 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 6  | 47 PN 2020/47 | da       | ličinke GO+Ca        | 59,2  | 32,911029 | 37,011765 | 6,308824 | 17,664706 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 10 | 48 PN 2020/48 | da       | ličinke GO+Ca        | 56,8  | 31,490278 | 40,619167 | 7,570833 | 18,213889 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 9  | 49 PN 2020/49 | da       | ličinke PT+Ca        | 66,1  | 40,910914 | 24,639528 | 7,426726 | 21,850147 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 13 | 50 PN 2020/50 | da       | ličinke PT+Ca        | 67,5  | 41,864923 | 2,839077  | 8,046462 | 20,757538 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 11 | 51 PN 2020/51 | ne       | ličinke PO           | 55,6  | 52,96036  | 3,645045  |          | 10,077477 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 17 | 52 PN 2020/52 | ne       | ličinke PO           | 63,2  | 56,958696 | 4,4967391 | 13,27609 | 11,027717 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 6  | 53 PN 2020/53 | ne       | ličinke GO           | 59,7  | 45,559801 | 39,851613 | 8,985112 | 8,3508685 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 10 | 54 PN 2020/54 | ne       | ličinke GO           | 57    | 45,456744 | 41,49     | 7,826279 | 8,458814  |
| 24.08.2020 |      | 5      | 9  | 55 PN 2020/56 | ne       | ličinke PT           | 64,5  | 47,530141 | 30,741972 | 9,037268 | 5,8867606 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 13 | 56 PN 2020/57 | ne       | ličinke PT           | 62,2  | 48,253968 | 29,404762 | 11,30952 | 5,9060847 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 11 | 57 PN 2020/59 | da       | ličinke PO+Ca        | 67,1  | 47,795745 | 3,5846809 | 10,45532 | 30,085714 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 17 | 58 PN 2020/60 | da       | ličinke PO+Ca        | 56,4  | 52,288073 | 4,200367  | 11,8     | 30,744954 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 6  | 59 PN 2020/61 | da       | ličinke GO+Ca        | 55,9  | 38,247619 | 30,620862 | 8,195918 | 19,237642 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 10 | 60 PN 2020/62 | da       | ličinke GO+Ca        | 54,8  | 36,929204 | 34,743363 | 6,212389 | 18,061947 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 9  | 61 PN 2020/64 | da       | ličinke PT+Ca        | 61,9  | 37,59685  | 21,188976 | 8,475591 | 26,948031 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 13 | 62 PN 2020/65 | da       | ličinke PT+Ca        | 60,2  | 39,394975 | 24,936181 | 8,884824 | 22,526382 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 11 | 63 PN 2020/67 | ne       | substrat PO          | 13,8  | 21,785383 | 0,7227378 | 17,86195 | 9,0548724 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 17 | 64 PN 2020/68 | ne       | substrat PO          | 11,5  | 21,839096 | 0,6831186 | 19,35503 | 8,8701921 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 11 | 65 PN 2020/69 | da       | substrat PO+Ca       | 17    | 20,288193 | 0,5019759 | 17,88289 | 16,418795 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 17 | 66 PN 2020/70 | da       | substrat PO+Ca       | 12,2  | 19,796128 | 0,8291572 | 16,89408 | 15,028474 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 6  | 67 PN 2020/71 | ne       | substrat GO          | 26,6  | 24,64891  | 12,994823 | 15,16063 | 15,470027 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 10 | 68 PN 2020/72 | ne       | substrat GO          | 24    | 32,432895 | 15,596711 | 13,63421 | 15,596711 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 6  | 69 PN 2020/73 | da       | substrat GO+Ca       | 21,6  | 20,025    | 17,675128 | 7,866964 | 39,232653 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 10 | 70 PN 2020/74 | da       | substrat GO+Ca       | 24,5  | 19,603974 | 15,064106 | 8,254305 | 36,834834 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 9  | 71 PN 2020/75 | ne       | substrat PT          | 57,6  | 19,120047 | 0,5015094 | 32,18019 | 6,7599292 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 13 | 72 PN 2020/76 | ne       | substrat PT          | 67,8  | 18,264596 | 0,3149068 | 28,97143 | 6,9279503 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 9  | 73 PN 2020/77 | da       | substrat PT+Ca       | 39,6  | 12,810596 | 0,4545695 | 22,9351  | 34,815894 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 13 | 74 PN 2020/78 | da       | substrat PT+Ca       | 54,1  | 12,678431 | 0,2909804 | 26,5     | 27,954902 |

## 1.2 Podatki vsebnost makroelementi (% na SS)

| datum      | time | posoda | st | st_vzorec | ca_dodan   | vzorec_vrsta | Na       | Mg        | P        | K        | Ca        |
|------------|------|--------|----|-----------|------------|--------------|----------|-----------|----------|----------|-----------|
| 28.07.2020 |      | 1      | 0  | 1         | PN 2020/1  | ne           | 0,010851 | 0,663333  | 1,528449 | 1,601499 | 0,1380588 |
| 28.07.2020 |      | 1      | 0  | 2         | PN 2020/2  | ne           | 0,913595 | 0,125532  | 0,362559 | 0,915638 | 0,9306782 |
| 28.07.2020 |      | 1      | 0  | 3         | PN 2020/3  | ne           | 0,016936 | 0,2072    | 0,697502 | 0,142487 | 0,2685246 |
| 6.08.2020  |      | 1      | 11 | 4         | PN 2020/4  | ne           |          |           |          |          |           |
| 6.08.2020  |      | 1      | 17 | 5         | PN 2020/5  | ne           |          |           |          |          |           |
| 6.08.2020  |      | 1      | 6  | 6         | PN 2020/6  | ne           | 0,188785 | 0,213547  | 0,624479 | 1,332659 | 1,791484  |
| 6.08.2020  |      | 1      | 10 | 7         | PN 2020/7  | ne           | 0,346076 | 0,21619   | 0,660968 | 1,599426 | 1,6194812 |
| 6.08.2020  |      | 1      | 9  | 8         | PN 2020/8  | ne           | 0,04231  | 0,369344  | 1,232333 | 1,136026 | 0,8518673 |
| 6.08.2020  |      | 1      | 13 | 9         | PN 2020/9  | ne           | 0,043214 | 0,391952  | 1,323111 | 1,295096 | 0,8886205 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 11 | 10        | PN 2020/10 | ne           | 0,015433 | 0,905213  | 2,083245 | 2,31473  | 0,1609911 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 17 | 11        | PN 2020/11 | ne           | 0,015067 | 0,878258  | 2,069048 | 2,342027 | 0,1601111 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 6  | 12        | PN 2020/12 | ne           | 3,965942 | 0,14968   | 0,749832 | 1,888509 | 0,7746975 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 10 | 13        | PN 2020/13 | ne           | 4,002456 | 0,186785  | 0,794961 | 2,011455 | 0,695415  |
| 10.08.2020 |      | 2      | 9  | 14        | PN 2020/14 | ne           | 0,013142 | 0,310458  | 0,859678 | 0,038625 | 0,108416  |
| 10.08.2020 |      | 2      | 13 | 15        | PN 2020/15 | ne           | 0,01301  | 0,391518  | 1,013115 | 0,053048 | 0,1258657 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 11 | 16        | PN 2020/16 | ne           | 0,043157 | 0,1015957 | 2,211676 | 2,199756 | 0,5334199 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 17 | 17        | PN 2020/17 | ne           | 0,032599 | 1,046853  | 2,187746 | 2,151298 | 0,5377486 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 6  | 18        | PN 2020/18 | ne           | 0,285058 | 0,17901   | 0,543422 | 1,089245 | 1,8476693 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 10 | 19        | PN 2020/19 | ne           | 0,274079 | 0,178146  | 0,539681 | 1,072125 | 1,8054684 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 9  | 20        | PN 2020/20 | ne           | 0,041135 | 0,417288  | 1,218938 | 0,780352 | 1,0237128 |
| 10.08.2020 |      | 2      | 13 | 21        | PN 2020/21 | ne           | 0,041748 | 0,380614  | 1,150333 | 0,927908 | 1,0214413 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 11 | 22        | PN 2020/22 | ne           | 0,026695 | 0,976547  | 2,086868 | 2,175757 | 0,5225054 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 17 | 23        | PN 2020/23 | ne           | 0,035082 | 1,037302  | 2,152706 | 2,142619 | 0,5523752 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 6  | 24        | PN 2020/24 | ne           | 0,142627 | 0,190646  | 0,511565 | 0,961975 | 2,2064243 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 10 | 25        | PN 2020/25 | ne           | 0,238673 | 0,189508  | 0,511474 | 1,001727 | 2,1661595 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 9  | 26        | PN 2020/26 | ne           | 0,040135 | 0,317183  | 0,931835 | 0,678737 | 1,1567946 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 13 | 27        | PN 2020/27 | ne           | 0,035204 | 0,31789   | 0,910278 | 0,616024 | 0,995096  |
| 14.08.2020 |      | 3      | 11 | 28        | PN 2020/28 | da           | 0,027559 | 0,963215  | 2,159776 | 2,086713 | 2,8032779 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 17 | 29        | PN 2020/29 | da           | 0,036098 | 0,737089  | 1,710538 | 1,703234 | 2,4348602 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 6  | 30        | PN 2020/30 | da           | 0,1425   | 0,200507  | 0,469171 | 0,810357 | 4,9627115 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 10 | 31        | PN 2020/31 | da           | 0,163093 | 0,209448  | 0,513687 | 0,841104 | 5,2486857 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 9  | 32        | PN 2020/32 | da           | 0,051597 | 0,387338  | 1,009742 | 0,59391  | 6,0235741 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 13 | 33        | PN 2020/33 | da           | 0,042383 | 0,430523  | 1,166569 | 0,631416 | 5,9901822 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 11 | 34        | PN 2020/34 | ne           | 0,013567 | 0,856521  | 1,977434 | 2,117801 | 1,4645374 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 10 | 35        | PN 2020/35 | ne           | 3,484272 | 0,14272   | 0,946931 | 1,856042 | 1,2046337 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 10 | 36        | PN 2020/36 | ne           | 2,223346 | 0,18776   | 0,659044 | 1,297771 | 9,4862538 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 9  | 37        | PN 2020/37 | ne           | 0,012315 | 0,312143  | 0,845106 | 0,040754 | 0,1713336 |
| 14.08.2020 |      | 3      | 9  | 38        | PN 2020/38 | ne           | 0,094581 | 0,287308  | 0,692749 | 0,100528 | 4,8759434 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 11 | 39        | PN 2020/39 | ne           | 0,03003  | 0,935022  | 1,936878 | 1,98033  | 0,4660925 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 17 | 40        | PN 2020/40 | ne           | 0,04001  | 1,054902  | 2,073859 | 2,010777 | 0,5295701 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 6  | 41        | PN 2020/41 | ne           | 0,156749 | 0,185794  | 0,507858 | 0,833498 | 1,9756145 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 10 | 42        | PN 2020/42 | ne           | 0,170335 | 0,171105  | 0,47606  | 0,852815 | 1,7560419 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 9  | 43        | PN 2020/43 | ne           | 0,042219 | 0,285891  | 0,831311 | 0,60966  | 1,0154115 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 13 | 44        | PN 2020/44 | ne           | 0,044884 | 0,236894  | 0,723214 | 0,698742 | 0,9811422 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 11 | 45        | PN 2020/45 | da           | 0,024864 | 0,796713  | 1,719183 | 1,678004 | 6,7614025 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 17 | 46        | PN 2020/46 | da           | 0,027587 | 0,779902  | 1,714814 | 1,634806 | 4,9588925 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 6  | 47        | PN 2020/47 | da           | 0,187923 | 0,207322  | 0,46672  | 0,799697 | 5,8024174 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 10 | 48        | PN 2020/48 | da           | 0,316688 | 0,205462  | 0,507975 | 0,860908 | 5,6028578 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 9  | 49        | PN 2020/49 | da           | 0,073177 | 0,373385  | 0,91397  | 0,640302 | 6,5877021 |
| 18.08.2020 |      | 4      | 13 | 50        | PN 2020/50 | da           | 0,039054 | 0,386022  | 1,018524 | 0,593399 | 6,3842387 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 11 | 51        | PN 2020/51 | ne           | 0,024291 | 0,812814  | 1,734412 | 1,764343 | 0,4083124 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 17 | 52        | PN 2020/52 | ne           | 0,045744 | 1,172316  | 2,274212 | 2,111452 | 0,6971833 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 6  | 53        | PN 2020/53 | ne           | 0,160454 | 0,205196  | 0,505566 | 0,815942 | 2,1513201 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 10 | 54        | PN 2020/54 | ne           | 0,185467 | 0,195639  | 0,498147 | 0,800334 | 2,0166134 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 9  | 55        | PN 2020/56 | ne           | 0,046803 | 0,314447  | 0,782924 | 0,651905 | 1,1443808 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 13 | 56        | PN 2020/57 | ne           | 0,050056 | 0,294372  | 0,748942 | 0,637675 | 1,1730075 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 11 | 57        | PN 2020/59 | da           | 0,030182 | 0,771681  | 1,590222 | 1,448301 | 8,7727894 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 17 | 58        | PN 2020/60 | da           | 0,037437 | 0,769856  | 1,592659 | 1,458823 | 7,0260058 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 6  | 59        | PN 2020/61 | da           | 0,252779 | 0,232575  | 0,505536 | 0,849265 | 5,8901481 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 10 | 60        | PN 2020/62 | da           | 0,203142 | 0,236017  | 0,487311 | 0,787191 | 6,2776471 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 9  | 61        | PN 2020/64 | da           | 0,064415 | 0,389662  | 0,841869 | 0,589836 | 8,3604964 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 13 | 62        | PN 2020/65 | da           | 0,045841 | 0,370045  | 0,807444 | 0,598828 | 7,4387656 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 11 | 63        | PN 2020/67 | ne           | 0,011912 | 0,785934  | 1,864601 | 2,083495 | 0,16682   |
| 24.08.2020 |      | 5      | 17 | 64        | PN 2020/68 | ne           | 0,013877 | 0,776436  | 1,840205 | 2,077689 | 0,1719881 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 11 | 65        | PN 2020/69 | da           | 0,012124 | 0,807163  | 1,863881 | 1,961984 | 3,6330893 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 17 | 66        | PN 2020/70 | da           | 0,013045 | 0,738299  | 1,733651 | 1,795874 | 2,8887152 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 6  | 67        | PN 2020/71 | ne           | 3,282543 | 0,103844  | 0,745905 | 1,82405  | 0,7839028 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 10 | 68        | PN 2020/72 | ne           | 3,254876 | 0,110889  | 0,751761 | 1,875853 | 0,6832738 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 6  | 69        | PN 2020/73 | da           | 1,938929 | 0,195967  | 0,660121 | 1,225797 | 11,450009 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 10 | 70        | PN 2020/74 | da           | 2,171471 | 0,165756  | 0,598239 | 1,248481 | 10,083456 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 9  | 71        | PN 2020/75 | ne           | 0,01349  | 0,306665  | 0,963135 | 0,086515 | 0,1644401 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 13 | 72        | PN 2020/76 | ne           | 0,012053 | 0,369567  | 1,122091 | 0,111167 | 0,1693028 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 9  | 73        | PN 2020/77 | da           | 0,018193 | 0,299657  | 0,718002 | 0,080251 | 7,4966224 |
| 24.08.2020 |      | 5      | 13 | 74        | PN 2020/78 | da           | 0,011938 | 0,463032  | 0,962121 | 0,085959 | 12,816647 |

### 1.3 Podatki mikroelementi in toksični elementi (% na SS)

| datum      | time | posoda | st | st_vzorec  | ca_dodan | vzorec_vrsta         | Mn        | Fe          | Co        | Cu         | Zn         | Cd       | Pb        | As         | Se        |
|------------|------|--------|----|------------|----------|----------------------|-----------|-------------|-----------|------------|------------|----------|-----------|------------|-----------|
| 28.07.2020 | 1    | 0      | 1  | PN 2020/1  | ne       | pšenični otrobi (PO) | 146,82563 | 171,2436338 | 0,0324553 | 17,6276169 | 94,1537156 | 0,117833 | 0,2194816 | 0,0264988  | 0,1822069 |
| 28.07.2020 | 1    | 0      | 2  | PN 2020/2  | ne       | gosp. odpadki (GO)   | 9,922219  | 170,0325538 | 0,0607025 | 8,78233401 | 22,3353536 | 0,06341  | 0,4409231 | 0,1040357  | 0,2658855 |
| 28.07.2020 | 1    | 0      | 3  | PN 2020/3  | ne       | pivske tropine (PT)  | 31,647137 | 119,5328022 | 0,0346911 | 23,9774678 | 60,5768482 | 0,0094   | 0,5236725 | 0,0197757  | 0,1552138 |
| 6.08.2020  | 1    | 11     | 4  | PN 2020/4  | ne       | ličinke PO           |           |             |           |            |            |          |           |            |           |
| 6.08.2020  | 1    | 17     | 5  | PN 2020/5  | ne       | ličinke PO           |           |             |           |            |            |          |           |            |           |
| 6.08.2020  | 1    | 6      | 6  | PN 2020/6  | ne       | ličinke GO           | 26,211349 | 251,0206537 | 0,082594  | 12,2715793 | 42,6678951 | 0,152723 | 0,4577403 | 0,1054527  | 0,2485361 |
| 6.08.2020  | 1    | 10     | 7  | PN 2020/7  | ne       | ličinke GO           | 26,226176 | 268,8817333 | 0,09581   | 11,8745442 | 39,3668555 | 0,147828 | 0,5723346 | 0,1356667  | 0,2657688 |
| 6.08.2020  | 1    | 9      | 8  | PN 2020/8  | ne       | ličinke PT           | 123,35601 | 205,8955696 | 0,0403297 | 13,9020148 | 153,679747 | 0,072324 | 0,1696407 | 0,0326741  | 0,2064259 |
| 6.08.2020  | 1    | 13     | 9  | PN 2020/9  | ne       | ličinke PT           | 131,8229  | 232,9178406 | 0,0400065 | 16,60851   | 168,820693 | 0,080169 | 0,1870791 | 0,0351445  | 0,2123659 |
| 10.08.2020 | 2    | 11     | 10 | PN 2020/10 | ne       | substrat PO          | 190,02297 | 228,1431486 | 0,0626022 | 26,8304295 | 118,068705 | 0,134588 | 0,3669102 | 0,0170757  | 0,1804829 |
| 10.08.2020 | 2    | 17     | 11 | PN 2020/11 | ne       | substrat PO          | 188,17223 | 228,0635308 | 0,0639286 | 25,7404967 | 119,549876 | 0,129943 | 0,3384666 | 0,0288178  | 0,2042485 |
| 10.08.2020 | 2    | 6      | 12 | PN 2020/12 | ne       | substrat GO          | 6,5046586 | 278,3835791 | 0,1919228 | 14,3524702 | 15,6802131 | 0,029596 | 0,6594632 | 0,1813013  | 0,4443171 |
| 10.08.2020 | 2    | 10     | 13 | PN 2020/13 | ne       | substrat GO          | 7,1630635 | 325,2916942 | 0,1935511 | 13,1583028 | 13,7411877 | 0,024089 | 0,5937043 | 0,1990247  | 0,5238905 |
| 10.08.2020 | 2    | 9      | 14 | PN 2020/14 | ne       | substrat PT          | 25,900548 | 167,2932187 | 0,0515532 | 18,9239292 | 81,8898478 | 0,017504 | 0,3228228 | 0,0251113  | 0,1747507 |
| 10.08.2020 | 2    | 13     | 15 | PN 2020/15 | ne       | substrat PT          | 26,552078 | 174,7500273 | 0,0447771 | 19,1162409 | 81,9922923 | 0,017148 | 0,3139648 | 0,0121095  | 0,1217611 |
| 10.08.2020 | 2    | 11     | 16 | PN 2020/16 | ne       | ličinke PO           | 278,47419 | 250,3741585 | 0,0337957 | 19,404586  | 212,956184 | 0,670797 | 0,1885708 | 0,0380285  | 0,3278365 |
| 10.08.2020 | 2    | 17     | 17 | PN 2020/17 | ne       | ličinke PO           | 288,6806  | 261,47      | 0,0303711 | 17,8000079 | 218,943433 | 0,672042 | 0,1839922 | 0,0354419  | 0,2975039 |
| 10.08.2020 | 2    | 6      | 18 | PN 2020/18 | ne       | ličinke GO           | 17,223824 | 211,9863484 | 0,0647135 | 7,1526806  | 34,8970236 | 0,124107 | 0,0747217 | 0,2409201  |           |
| 10.08.2020 | 2    | 10     | 19 | PN 2020/19 | ne       | ličinke GO           | 16,748856 | 208,8546392 | 0,0604986 | 7,06626949 | 33,5919666 | 0,118072 | 0,337451  | 0,0951189  | 0,222535  |
| 10.08.2020 | 2    | 9      | 20 | PN 2020/20 | ne       | ličinke PT           | 112,98081 | 110,5219647 | 0,029542  | 15,5869835 | 132,282529 | 0,059149 | 0,2951809 | 0,0276794  | 0,1978292 |
| 10.08.2020 | 2    | 13     | 21 | PN 2020/21 | ne       | ličinke PT           | 126,08337 | 224,8817255 | 0,0304617 | 15,9003858 | 147,381972 | 0,065571 | 0,1944151 | 0,0396277  | 0,2396204 |
| 14.08.2020 | 3    | 11     | 22 | PN 2020/22 | ne       | ličinke PO           | 262,35738 | 217,0495689 | 0,0310239 | 18,2113592 | 204,578735 | 0,634809 | 0,161993  | 0,0428074  | 0,308843  |
| 14.08.2020 | 3    | 17     | 23 | PN 2020/23 | ne       | ličinke PO           | 277,97155 | 221,9946724 | 0,0218181 | 17,9548634 | 212,865909 | 0,717227 | 0,1797217 | 0,0357964  | 0,3295177 |
| 14.08.2020 | 3    | 6      | 24 | PN 2020/24 | ne       | ličinke GO           | 17,804903 | 223,4252326 | 0,0528408 | 7,7066387  | 39,0963184 | 0,138831 | 0,3449393 | 0,0909011  | 0,2485495 |
| 14.08.2020 | 3    | 10     | 25 | PN 2020/25 | ne       | ličinke GO           | 17,99329  | 219,6344446 | 0,0550976 | 7,26996496 | 35,5690383 | 0,147807 | 0,3692482 | 0,0856209  | 0,218355  |
| 14.08.2020 | 3    | 9      | 26 | PN 2020/26 | ne       | ličinke PT           | 121,97084 | 162,4464627 | 0,0151128 | 10,8272842 | 91,2340754 | 0,060259 | 0,1897151 | 0,0372703  | 0,2232697 |
| 14.08.2020 | 3    | 13     | 27 | PN 2020/27 | ne       | ličinke PT           | 113,85512 | 163,7813439 | 0,0205417 | 12,0060682 | 88,3125624 | 0,056728 | 0,1889134 | 0,034262   | 0,1293182 |
| 14.08.2020 | 3    | 11     | 28 | PN 2020/28 | da       | ličinke PO+Ca        | 285,85235 | 413,2646867 | 0,0809721 | 16,5960142 | 203,291861 | 0,698735 | 0,2871767 | 0,5358884  | 0,3402404 |
| 14.08.2020 | 3    | 17     | 29 | PN 2020/29 | da       | ličinke PO+Ca        | 214,34162 | 370,0780262 | 0,0663135 | 20,2955502 | 156,788131 | 0,382893 | 0,367625  | 0,4073625  | 0,3421781 |
| 14.08.2020 | 3    | 6      | 30 | PN 2020/30 | da       | ličinke GO+Ca        | 22,710812 | 486,1651124 | 0,1171402 | 10,4057678 | 30,7730364 | 0,173825 | 0,4901507 | 0,5467187  | 0,2572913 |
| 14.08.2020 | 3    | 10     | 31 | PN 2020/31 | da       | ličinke GO+Ca        | 21,964157 | 529,5829319 | 0,1352142 | 11,260999  | 31,8700563 | 0,153301 | 0,5577807 | 0,7058653  | 0,244665  |
| 14.08.2020 | 3    | 9      | 32 | PN 2020/32 | da       | ličinke PT+Ca        | 119,20791 | 632,5867888 | 0,1451836 | 13,6922435 | 76,7995168 | 0,108222 | 0,3200521 | 1,0931929  | 0,1921348 |
| 14.08.2020 | 3    | 13     | 33 | PN 2020/33 | da       | ličinke PT+Ca        | 118,86769 | 627,6915192 | 0,1401638 | 15,013551  | 86,1334058 | 0,103561 | 0,3322117 | 1,0809573  | 0,2473521 |
| 14.08.2020 | 3    | 11     | 34 | PN 2020/34 | ne       | substrat PO          | 189,64446 | 358,1122207 | 0,0949121 | 33,7228009 | 113,462966 | 0,150394 | 0,5340755 | 0,3329359  | 0,1911389 |
| 14.08.2020 | 3    | 10     | 35 | PN 2020/35 | ne       | substrat GO          | 4,580528  | 331,2377425 | 0,2271393 | 20,152518  | 24,4862212 | 0,020332 | 0,7252345 | 0,1974012  | 0,4141212 |
| 14.08.2020 | 3    | 10     | 36 | PN 2020/36 | ne       | substrat GO          | 13,053645 | 1095,204929 | 0,3775554 | 9,06160585 | 19,9647803 | 0,123961 | 0,6702955 | 0,2386155  | 0,2526542 |
| 14.08.2020 | 3    | 9      | 37 | PN 2020/37 | ne       | substrat PT          | 26,747176 | 168,011134  | 0,0440837 | 16,8848034 | 88,3064467 | 0,020795 | 0,2484792 | 0,0370043  | 0,120786  |
| 14.08.2020 | 3    | 17     | 38 | PN 2020/38 | ne       | substrat PT          | 27,672353 | 617,2148083 | 0,1838576 | 24,291949  | 71,6632181 | 0,079505 | 0,5489418 | 1,1082723  | 0,0981111 |
| 18.08.2020 | 4    | 11     | 39 | PN 2020/39 | ne       | ličinke PO           | 249,70293 | 204,8086223 | 0,0144049 | 20,9837203 | 188,826259 | 0,578079 | 0,3081113 | 0,0647408  | 0,4241189 |
| 18.08.2020 | 4    | 17     | 40 | PN 2020/40 | ne       | ličinke PO           | 267,94952 | 212,1268577 | 0,0147278 | 20,2116281 | 202,417212 | 0,614646 | 0,2816879 | 0,0578287  | 0,4304141 |
| 18.08.2020 | 4    | 6      | 41 | PN 2020/41 | ne       | ličinke GO           | 20,399073 | 216,9990545 | 0,0324694 | 10,3796967 | 38,2735964 | 0,173444 | 0,4553731 | 0,2429843  | 0,3497008 |
| 18.08.2020 | 4    | 10     | 42 | PN 2020/42 | ne       | ličinke GO           | 20,498559 | 212,9619238 | 0,0359926 | 10,3434914 | 39,6055443 | 0,180797 | 0,7256888 | 0,2039451  | 0,3246333 |
| 18.08.2020 | 4    | 9      | 43 | PN 2020/43 | ne       | ličinke PT           | 127,38345 | 194,6201478 | 0,0140236 | 17,3291274 | 100,250267 | 0,066579 | 0,6395727 | 0,0614498  | 0,290951  |
| 18.08.2020 | 4    | 13     | 44 | PN 2020/44 | ne       | ličinke PT           | 131,3686  | 166,1686657 | 0,0144262 | 12,6307948 | 81,5480038 | 0,069172 | 0,2294212 | 0,0417426  | 0,2456378 |
| 18.08.2020 | 4    | 11     | 45 | PN 2020/45 | da       | ličinke PO+Ca        | 224,67965 | 760,6396699 | 0,1862322 | 18,5532151 | 141,188065 | 0,502566 | 0,3910777 | 1,04019897 | 0,3252813 |
| 18.08.2020 | 4    | 17     | 46 | PN 2020/46 | da       | ličinke PO+Ca        | 202,47741 | 607,2813084 | 0,1329829 | 18,5921341 | 138,221141 | 0,448128 | 0,3974539 | 1,110835   | 0,2812739 |
| 18.08.2020 | 4    | 6      | 47 | PN 2020/47 | da       | ličinke GO+Ca        | 22,915508 | 576,2766463 | 0,1452759 | 11,5150645 | 30,3520549 | 0,212662 | 0,4587508 | 0,8767437  | 0,2696504 |
| 18.08.2020 | 4    | 10     | 48 | PN 2020/48 | da       | ličinke GO+Ca        | 20,831631 | 576,1739917 | 0,1505025 | 10,0987587 | 32,4240358 | 0,212581 | 0,5317747 | 1,2381187  | 0,2793737 |
| 18.08.2020 | 4    | 9      | 49 | PN 2020/49 | da       | ličinke PT+Ca        | 107,87531 | 712,5642254 | 0,1643185 | 14,742434  | 79,3459166 | 0,156345 | 0,4301884 | 1,278315   | 0,2008407 |
| 18.08.2020 | 4    | 13     | 50 | PN 2020/50 | da       | ličinke PT+Ca        | 105,50658 | 694,9514258 | 0,1586396 | 15,7713328 | 84,109196  | 0,138324 | 0,5230748 | 1,3430174  | 0,2371169 |
| 24.08.2020 | 5    | 11     | 51 | PN 2020/51 | ne       | ličinke PO           | 209,63512 | 191,1343694 | 0,004     | 21,5065269 | 162,413023 | 0,485296 | 0,4360149 | 0,0194018  | 0,2358939 |
| 24.08.2020 | 5    | 17     | 52 | PN 2020/52 | ne       | ličinke PO           | 264,39863 | 249,828762  | 0,0204288 | 19,8911328 | 209,740547 | 0,700833 | 0,4033092 | 0,0410932  | 0,2304833 |
| 24.08.2020 | 5    | 6      | 53 | PN 2020/53 | ne       | ličinke GO           | 24,416756 | 255,0806605 | 0,0404979 | 11,6371572 | 48,6217267 | 0,223146 | 0,4374231 | 0,1843228  | 0,2244138 |
| 24.08.2020 | 5    | 10     | 54 | PN 2020/54 | ne       | ličinke GO           | 25,085454 | 246,5229663 | 0,0369084 | 11,9688251 | 46,3468709 | 0,232508 | 0,4504512 | 0,178644   | 0,2090969 |
| 24.08.2020 | 5    | 9      | 55 | PN 2020/55 | ne       | ličinke PT           | 156,33939 | 198,8819163 | 0,01356   | 17,3985716 | 118,523492 | 0,083252 | 0,3171252 | 0,0290035  | 0,1464318 |
| 24.08.2020 | 5    | 13     | 56 | PN 2020/56 | ne       | ličinke PT           | 145,7065  | 176,0366336 | 0,004     | 17,3206991 | 108,457868 | 0,067516 | 0,3951801 | 0,0228919  | 0,1343867 |
| 24.08.2020 | 5    | 11     | 57 | PN 2020/57 | da       | ličinke PO+Ca        | 246,96061 | 967,1061392 | 0,2332088 | 15,5680129 | 155,288801 | 0,716955 | 0,5203579 | 1,3226053  | 0,1826773 |
| 24.08.2020 | 5    | 17     | 58 | PN 2020/58 | da       | ličinke PO+Ca        | 211,32707 | 738,1840752 | 0,1696411 | 14,7712941 | 151,504206 | 0,677739 | 0,2982767 | 1,1618583  | 0,2117845 |
| 24.08.2020 | 5    | 6      | 59 | PN 2020/59 | da       | ličinke GO+Ca        | 23,090213 | 615,2663397 | 0,1468084 | 10,707915  | 36,2391296 | 0,260629 | 0,3647759 | 0,8479065  | 0,2247242 |
| 24.08.2020 | 5    | 10     | 60 | PN 2020/60 | da       | ličinke GO+Ca        | 23,544415 | 645,4075487 | 0,1569796 | 13,8996    | 36,1950717 | 0,254864 | 0,5653312 | 0,7273754  | 0,1613794 |
| 24.08.2020 | 5    | 9      | 61 | PN 2020/61 | da       | ličinke PT+Ca        | 102,03611 | 892,1986686 | 0,2240441 | 14,4608135 | 78,1009587 | 0,17434  | 0,349451  | 1,349879   | 0,1181467 |
| 24.08.2020 | 5    | 13     | 62 | PN 2020/62 | da       | ličinke PT+Ca        | 116,12339 | 780,2693405 | 0,1921226 | 14,5514979 | 87,1680141 | 0,1586   | 0,3615706 | 1,0848506  | 0,1014471 |
| 24.08.2020 | 5    | 11     | 63 | PN 2020/63 | ne       | substrat PO          | 174,64495 | 211,3286415 | 0,0549538 | 21,5575862 | 109,956816 | 0,132794 | 0,        |            |           |

#### 1.4 Podatki fizikalnih lastnosti (mm)

| datum      | time | posoda | st | st_vzorec  | ca_dodan | vzorec_vrsta         | dolzina | sirina | masa |
|------------|------|--------|----|------------|----------|----------------------|---------|--------|------|
| 28.07.2020 | 1    | 0      | 1  | PN 2020/1  | ne       | pšenični otrobi (PO) |         |        |      |
| 28.07.2020 | 1    | 0      | 2  | PN 2020/2  | ne       | gosp. odpadki (GO)   |         |        |      |
| 28.07.2020 | 1    | 0      | 3  | PN 2020/3  | ne       | pivske tropine (PT)  |         |        |      |
| 6.08.2020  | 1    | 11     | 4  | PN 2020/4  | ne       | ličinke PO           | 8,9     | 2,6    | 0,0  |
| 6.08.2020  | 1    | 17     | 5  | PN 2020/5  | ne       | ličinke PO           | 7,4     | 2,2    | 0,0  |
| 6.08.2020  | 1    | 6      | 6  | PN 2020/6  | ne       | ličinke GO           | 14,4    | 3,7    | 0,1  |
| 6.08.2020  | 1    | 10     | 7  | PN 2020/7  | ne       | ličinke GO           | 11,6    | 3,0    | 0,0  |
| 6.08.2020  | 1    | 9      | 8  | PN 2020/8  | ne       | ličinke PT           | 8,3     | 2,8    | 0,1  |
| 6.08.2020  | 1    | 13     | 9  | PN 2020/9  | ne       | ličinke PT           | 10,8    | 3,0    | 0,0  |
| 10.08.2020 | 2    | 11     | 10 | PN 2020/10 | ne       | substrat PO          |         |        |      |
| 10.08.2020 | 2    | 17     | 11 | PN 2020/11 | ne       | substrat PO          |         |        |      |
| 10.08.2020 | 2    | 6      | 12 | PN 2020/12 | ne       | substrat GO          |         |        |      |
| 10.08.2020 | 2    | 10     | 13 | PN 2020/13 | ne       | substrat GO          |         |        |      |
| 10.08.2020 | 2    | 9      | 14 | PN 2020/14 | ne       | substrat PT          |         |        |      |
| 10.08.2020 | 2    | 13     | 15 | PN 2020/15 | ne       | substrat PT          |         |        |      |
| 10.08.2020 | 2    | 11     | 16 | PN 2020/16 | ne       | ličinke PO           | 9,3     | 3,1    | 0,0  |
| 10.08.2020 | 2    | 17     | 17 | PN 2020/17 | ne       | ličinke PO           | 8,6     | 3,0    | 0,0  |
| 10.08.2020 | 2    | 6      | 18 | PN 2020/18 | ne       | ličinke GO           | 18,6    | 4,9    | 0,2  |
| 10.08.2020 | 2    | 10     | 19 | PN 2020/19 | ne       | ličinke GO           | 18,9    | 5,4    | 0,2  |
| 10.08.2020 | 2    | 9      | 20 | PN 2020/20 | ne       | ličinke PT           | 12,1    | 3,6    | 0,1  |
| 10.08.2020 | 2    | 13     | 21 | PN 2020/21 | ne       | ličinke PT           | 12,1    | 3,5    | 0,1  |
| 14.08.2020 | 3    | 11     | 22 | PN 2020/22 | ne       | ličinke PO           | 10,7    | 3,3    | 0,0  |
| 14.08.2020 | 3    | 17     | 23 | PN 2020/23 | ne       | ličinke PO           | 9,2     | 2,9    | 0,0  |
| 14.08.2020 | 3    | 6      | 24 | PN 2020/24 | ne       | ličinke GO           | 21,0    | 5,2    | 0,2  |
| 14.08.2020 | 3    | 10     | 25 | PN 2020/25 | ne       | ličinke GO           | 21,3    | 5,4    | 0,2  |
| 14.08.2020 | 3    | 9      | 26 | PN 2020/26 | ne       | ličinke PT           | 12,8    | 3,5    | 0,1  |
| 14.08.2020 | 3    | 13     | 27 | PN 2020/27 | ne       | ličinke PT           | 15,6    | 4,3    | 0,1  |
| 14.08.2020 | 3    | 11     | 28 | PN 2020/28 | da       | ličinke PO+Ca        | 9,3     | 3,1    | 0,0  |
| 14.08.2020 | 3    | 17     | 29 | PN 2020/29 | da       | ličinke PO+Ca        | 10,1    | 2,8    | 0,0  |
| 14.08.2020 | 3    | 6      | 30 | PN 2020/30 | da       | ličinke GO+Ca        | 19,5    | 4,9    | 0,2  |
| 14.08.2020 | 3    | 10     | 31 | PN 2020/31 | da       | ličinke GO+Ca        | 20,1    | 5,3    | 0,2  |
| 14.08.2020 | 3    | 9      | 32 | PN 2020/32 | da       | ličinke PT+Ca        | 12,1    | 4,3    | 0,1  |
| 14.08.2020 | 3    | 13     | 33 | PN 2020/33 | da       | ličinke PT+Ca        | 15,6    | 4,0    | 0,1  |
| 14.08.2020 | 3    | 11     | 34 | PN 2020/34 | ne       | substrat PO          |         |        |      |
| 14.08.2020 | 3    | 10     | 35 | PN 2020/35 | ne       | substrat GO          |         |        |      |
| 14.08.2020 | 3    | 10     | 36 | PN 2020/36 | ne       | substrat GO          |         |        |      |
| 14.08.2020 | 3    | 9      | 37 | PN 2020/37 | ne       | substrat PT          |         |        |      |
| 14.08.2020 | 3    | 9      | 38 | PN 2020/38 | ne       | substrat PT          |         |        |      |
| 18.08.2020 | 4    | 11     | 39 | PN 2020/39 | ne       | ličinke PO           | 10,5    | 3,4    | 0,0  |
| 18.08.2020 | 4    | 17     | 40 | PN 2020/40 | ne       | ličinke PO           | 8,8     | 3,1    | 0,0  |
| 18.08.2020 | 4    | 6      | 41 | PN 2020/41 | ne       | ličinke GO           | 22,1    | 5,4    | 0,2  |
| 18.08.2020 | 4    | 10     | 42 | PN 2020/42 | ne       | ličinke GO           | 22,0    | 5,7    | 0,3  |
| 18.08.2020 | 4    | 9      | 43 | PN 2020/43 | ne       | ličinke PT           | 16,0    | 4,3    | 0,1  |
| 18.08.2020 | 4    | 13     | 44 | PN 2020/44 | ne       | ličinke PT           | 17,5    | 4,3    | 0,2  |
| 18.08.2020 | 4    | 11     | 45 | PN 2020/45 | da       | ličinke PO+Ca        | 10,3    | 3,4    | 0,1  |
| 18.08.2020 | 4    | 17     | 46 | PN 2020/46 | da       | ličinke PO+Ca        | 8,9     | 2,9    | 0,0  |
| 18.08.2020 | 4    | 6      | 47 | PN 2020/47 | da       | ličinke GO+Ca        | 21,6    | 5,5    | 0,3  |
| 18.08.2020 | 4    | 10     | 48 | PN 2020/48 | da       | ličinke GO+Ca        | 21,6    | 5,7    | 0,3  |
| 18.08.2020 | 4    | 9      | 49 | PN 2020/49 | da       | ličinke PT+Ca        | 15,6    | 4,3    | 0,1  |
| 18.08.2020 | 4    | 13     | 50 | PN 2020/50 | da       | ličinke PT+Ca        | 14,5    | 3,8    | 0,1  |
| 24.08.2020 | 5    | 11     | 51 | PN 2020/51 | ne       | ličinke PO           | 8,9     | 3,0    | 0,0  |
| 24.08.2020 | 5    | 17     | 52 | PN 2020/52 | ne       | ličinke PO           | 9,0     | 3,1    | 0,0  |
| 24.08.2020 | 5    | 6      | 53 | PN 2020/53 | ne       | ličinke GO           | 19,2    | 5,5    | 0,2  |
| 24.08.2020 | 5    | 10     | 54 | PN 2020/54 | ne       | ličinke GO           | 20,6    | 5,7    | 0,2  |
| 24.08.2020 | 5    | 9      | 55 | PN 2020/56 | ne       | ličinke PT           | 16,0    | 4,2    | 0,1  |
| 24.08.2020 | 5    | 13     | 56 | PN 2020/57 | ne       | ličinke PT           | 18,2    | 4,7    | 0,2  |
| 24.08.2020 | 5    | 11     | 57 | PN 2020/59 | da       | ličinke PO+Ca        | 9,2     | 3,0    | 0,0  |
| 24.08.2020 | 5    | 17     | 58 | PN 2020/60 | da       | ličinke PO+Ca        | 8,7     | 3,1    | 0,0  |
| 24.08.2020 | 5    | 6      | 59 | PN 2020/61 | da       | ličinke GO+Ca        | 20,4    | 5,8    | 0,3  |
| 24.08.2020 | 5    | 10     | 60 | PN 2020/62 | da       | ličinke GO+Ca        | 19,7    | 5,5    | 0,2  |
| 24.08.2020 | 5    | 9      | 61 | PN 2020/64 | da       | ličinke PT+Ca        | 16,1    | 3,7    | 0,1  |
| 24.08.2020 | 5    | 13     | 62 | PN 2020/65 | da       | ličinke PT+Ca        | 16,2    | 4,2    | 0,1  |
| 24.08.2020 | 5    | 11     | 63 | PN 2020/67 | ne       | substrat PO          |         |        |      |
| 24.08.2020 | 5    | 17     | 64 | PN 2020/68 | ne       | substrat PO          |         |        |      |
| 24.08.2020 | 5    | 11     | 65 | PN 2020/69 | da       | substrat PO+Ca       |         |        |      |
| 24.08.2020 | 5    | 17     | 66 | PN 2020/70 | da       | substrat PO+Ca       |         |        |      |
| 24.08.2020 | 5    | 6      | 67 | PN 2020/71 | ne       | substrat GO          |         |        |      |
| 24.08.2020 | 5    | 10     | 68 | PN 2020/72 | ne       | substrat GO          |         |        |      |
| 24.08.2020 | 5    | 6      | 69 | PN 2020/73 | da       | substrat GO+Ca       |         |        |      |
| 24.08.2020 | 5    | 10     | 70 | PN 2020/74 | da       | substrat GO+Ca       |         |        |      |
| 24.08.2020 | 5    | 9      | 71 | PN 2020/75 | ne       | substrat PT          |         |        |      |
| 24.08.2020 | 5    | 13     | 72 | PN 2020/76 | ne       | substrat PT          |         |        |      |
| 24.08.2020 | 5    | 9      | 73 | PN 2020/77 | da       | substrat PT+Ca       |         |        |      |
| 24.08.2020 | 5    | 13     | 74 | PN 2020/78 | da       | substrat PT+Ca       |         |        |      |

## 1.5 Vsebnost MK C:10 do C:20

| time | posoda | st_vzorec  | ca_dodan | vzorec_vrsta         | C10.0    | unC10.12 | C12.0     | C14.0    | unC14    | C14.1    | C15.0    | C16.0     | sumC16.1 | C17.0    | C17.1    | C18.0    | sumC18.1  | C18.2n6c  | C20.0    |
|------|--------|------------|----------|----------------------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|
| 1    | 0      | PN 2020/1  | ne       | pšenični otrobi (PO) |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 1    | 0      | PN 2020/2  | ne       | gosp. odpadki (GO)   |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 1    | 0      | PN 2020/3  | ne       | pivske tropine (PT)  |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 1    | 11     | PN 2020/4  | ne       | ličinke PO           |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 1    | 17     | PN 2020/5  | ne       | ličinke PO           |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 1    | 6      | PN 2020/6  | ne       | ličinke GO           | 0,546261 | 0        | 21,302841 | 5,201196 | 0        | 0,125385 | 0,128032 | 15,408613 | 2,357775 | 0,122745 | 0,256837 | 3,084274 | 26,501754 | 22,673607 | 0,199404 |
| 1    | 10     | PN 2020/7  | ne       | ličinke GO           | 0,557863 | 0        | 21,69956  | 5,232717 | 0        | 0,124092 | 0,122339 | 15,206155 | 2,287273 | 0,125896 | 0,251098 | 3,345049 | 26,209639 | 22,377156 | 0,220356 |
| 1    | 9      | PN 2020/8  | ne       | ličinke PT           | 0,592912 | 0        | 25,193726 | 6,07478  | 0        | 0,086925 | 0,241628 | 17,613777 | 2,310042 | 0,235419 | 0,199057 | 3,20116  | 12,94621  | 25,919317 | 0        |
| 1    | 13     | PN 2020/9  | ne       | ličinke PT           | 0,586776 | 0        | 24,433588 | 5,970149 | 0        | 0,08635  | 0,234911 | 17,817639 | 2,441271 | 0,245885 | 0,211185 | 3,323947 | 13,034132 | 25,67743  | 0        |
| 2    | 11     | PN 2020/10 | ne       | substrat PO          | 0        | 0        | 0,3531996 | 0,298047 | 0        | 0        | 0        | 13,89545  | 0        | 0        | 0        | 1,376267 | 19,585975 | 58,366935 | 0        |
| 2    | 17     | PN 2020/11 | ne       | substrat PO          | 0        | 0        | 0         | 0        | 0        | 0        | 0        | 14,056412 | 0        | 0        | 0        | 1,383729 | 19,919046 | 58,536571 | 0        |
| 2    | 6      | PN 2020/12 | ne       | substrat GO          | 0        | 0        | 1,5434898 | 1,11265  | 0        | 0        | 0        | 12,872539 | 1,117926 | 0        | 0        | 5,103139 | 34,781498 | 37,213952 | 0        |
| 2    | 10     | PN 2020/13 | ne       | substrat GO          | 0        | 0        | 0,4811837 | 0,911425 | 0        | 0        | 0        | 11,92497  | 1,117042 | 0        | 0        | 4,889191 | 34,117032 | 38,936392 | 0,533515 |
| 2    | 9      | PN 2020/14 | ne       | substrat PT          | 0        | 0        | 1,281718  | 0,921957 | 0        | 0        | 0        | 18,421584 | 0        | 0        | 0        | 2,14882  | 16,68653  | 52,351847 | 0        |
| 2    | 13     | PN 2020/15 | ne       | substrat PT          | 0        | 0        | 3,1707602 | 1,47134  | 0        | 0        | 0        | 19,445634 | 1,079372 | 0        | 0        | 2,422726 | 15,542339 | 49,771767 | 0        |
| 2    | 11     | PN 2020/16 | ne       | ličinke PO           | 0,436818 | 1,056039 | 15,502831 | 5,208084 | 0,815512 | 0,862998 | 0,38504  | 19,970528 | 6,974467 | 0,202871 | 0,900542 | 6,009532 | 18,680746 | 20,743556 | 0,191374 |
| 2    | 17     | PN 2020/17 | ne       | ličinke PO           | 0,408738 | 0,921966 | 16,198416 | 5,3      | 1,2      | 0,591106 | 0,305329 | 20,471204 | 5,130016 | 0,14356  | 0,667872 | 6,063194 | 17,780708 | 22,662602 | 0,216525 |
| 2    | 6      | PN 2020/18 | ne       | ličinke GO           | 0,584024 | 0        | 25,265263 | 5,383234 | 0,301117 | 0,126286 | 0,122829 | 15,629128 | 2,58127  | 0,114876 | 0,36037  | 2,793431 | 23,906667 | 21,152764 | 0,145101 |
| 2    | 10     | PN 2020/19 | ne       | ličinke GO           | 0,625376 | 0        | 24,882929 | 5,360509 | 0,281801 | 0,127354 | 0,124059 | 15,491156 | 2,586689 | 0,11656  | 0,313459 | 2,795063 | 24,292169 | 21,391379 | 0        |
| 2    | 9      | PN 2020/20 | ne       | ličinke PT           | 0,777521 | 0        | 29,472495 | 6,423955 | 0        | 0,109014 | 0,240065 | 17,003622 | 2,806542 | 0,210151 | 0,198678 | 2,688212 | 10,409811 | 22,75255  | 0        |
| 2    | 13     | PN 2020/21 | ne       | ličinke PT           | 0,755166 | 0        | 29,137409 | 6,419751 | 0        | 0,114035 | 0        | 17,192231 | 2,942301 | 0,192626 | 0,185118 | 2,839354 | 10,07579  | 22,601934 | 0        |
| 3    | 11     | PN 2020/22 | ne       | ličinke PO           | 0,493685 | 1,19583  | 19,454322 | 5,681109 | 1,238879 | 0,754414 | 0,325268 | 18,654245 | 5,414974 | 0,330076 | 0,936168 | 4,601266 | 17,452592 | 21,140757 | 0        |
| 3    | 17     | PN 2020/23 | ne       | ličinke PO           | 0,577053 | 0,96874  | 22,677001 | 6,413091 | 0,905951 | 0,538336 | 0,262316 | 18,723308 | 4,633931 | 0,334178 | 0,740998 | 4,828876 | 15,874646 | 20,390977 | 0        |
| 3    | 6      | PN 2020/24 | ne       | ličinke GO           | 0,654837 | 0        | 32,918373 | 5,322365 | 0,428512 | 0,087458 | 0,087014 | 14,995948 | 2,64297  | 0        | 0,331501 | 1,905155 | 20,188429 | 19,741479 | 0        |
| 3    | 10     | PN 2020/25 | ne       | ličinke GO           | 0,658592 | 0        | 32,322614 | 5,241119 | 0,411052 | 0,089284 | 0,097032 | 14,984662 | 2,506707 | 0        | 0,32395  | 1,884965 | 20,633463 | 20,070238 | 0        |
| 3    | 9      | PN 2020/26 | ne       | ličinke PT           |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 3    | 13     | PN 2020/27 | ne       | ličinke PT           | 0,749881 | 0        | 39,490466 | 8,313984 | 0        | 0,139641 | 0,192951 | 14,453626 | 2,804693 | 0,15294  | 0,146335 | 2,035638 | 8,2550985 | 17,272882 | 0,053704 |
| 3    | 11     | PN 2020/28 | da       | ličinke PO+Ca        | 0,471367 | 1,003752 | 21,451234 | 5,790227 | 1,159334 | 0,67695  | 0,287649 | 17,480252 | 5,032886 | 0,306646 | 0,684764 | 4,255277 | 17,812792 | 21,196009 | 0        |
| 3    | 17     | PN 2020/29 | da       | ličinke PO+Ca        | 0,460867 | 0        | 24,984772 | 6,101907 | 0,678189 | 0,398921 | 0        | 15,554552 | 2,845376 | 0        | 0        | 2,739077 | 16,091041 | 26,753705 | 0        |
| 3    | 6      | PN 2020/30 | da       | ličinke GO+Ca        | 0,662128 | 0        | 33,466189 | 5,375081 | 0,420738 | 0        | 0        | 15,195724 | 2,685776 | 0        | 0        | 1,867003 | 20,217524 | 18,80636  | 0        |
| 3    | 10     | PN 2020/31 | da       | ličinke GO+Ca        | 0,61387  | 0        | 30,561038 | 5,24364  | 0,421124 | 0        | 0        | 15,802834 | 2,679791 | 0        | 0        | 2,080053 | 21,555631 | 19,317055 | 0        |
| 3    | 9      | PN 2020/32 | da       | ličinke PT+Ca        | 0,806495 | 0        | 39,446377 | 8,339921 | 0        | 0        | 0,193659 | 14,931876 | 2,895437 | 0,140127 | 0        | 2,171196 | 8,7152528 | 16,766918 | 0        |
| 3    | 13     | PN 2020/33 | da       | ličinke PT+Ca        | 0,846884 | 0        | 39,959999 | 8,303468 | 0        | 0        | 0        | 14,665764 | 2,880459 | 0        | 0        | 2,201965 | 8,2007619 | 16,965751 | 0        |
| 3    | 11     | PN 2020/34 | ne       | substrat PO          | 0        | 0        | 0         | 0        | 0        | 0        | 0        | 15,245116 | 0        | 0        | 0        | 0        | 21,369226 | 60,354045 | 0        |
| 3    | 10     | PN 2020/35 | ne       | substrat GO          | 0        | 0        | 1,277814  | 1,141362 | 0        | 0        | 0        | 15,311319 | 1,491602 | 0        | 0        | 5,577989 | 35,145314 | 34,285474 | 0,414597 |
| 3    | 10     | PN 2020/36 | ne       | substrat GO          | 0        | 0        | 2,0418613 | 1,767375 | 0        | 0        | 0        | 16,183064 | 1,11003  | 0        | 0        | 6,612086 | 34,47063  | 33,323369 | 0,822296 |
| 3    | 9      | PN 2020/37 | ne       | substrat PT          | 0        | 0        | 1,6457923 | 0,74272  | 0        | 0        | 0        | 22,297719 | 0        | 0        | 0        | 1,944702 | 14,299432 | 54,279925 | 0        |
| 3    | 9      | PN 2020/38 | ne       | substrat PT          | 0        | 0        | 9,1307515 | 2,432675 | 0        | 0        | 0        | 22,88601  | 0,785787 | 0        | 0        | 2,476453 | 17,003755 | 41,681187 | 0        |
| 4    | 11     | PN 2020/39 | ne       | ličinke PO           | 0,627433 | 0        | 31,489206 | 5,395907 | 0,400225 | 0,101473 | 0,096175 | 16,009295 | 2,76108  | 0        | 0        | 2,003144 | 21,250542 | 18,313362 | 0        |
| 4    | 17     | PN 2020/40 | ne       | ličinke PO           | 0,654725 | 0,762359 | 23,577073 | 6,343214 | 0        | 0,452297 | 0        | 17,611539 | 4,060413 | 0,316434 | 0,832782 | 4,717579 | 15,314609 | 23,559894 | 0        |
| 4    | 6      | PN 2020/41 | ne       | ličinke GO           | 0,680613 | 0        | 37,717684 | 5,612218 | 0,479719 | 0        | 0        | 14,923972 | 2,66219  | 0        | 0        | 1,575021 | 18,470946 | 17,213693 | 0        |
| 4    | 10     | PN 2020/42 | ne       | ličinke GO           | 0,696593 | 0        | 37,813269 | 5,643777 | 0,470154 | 0        | 0        | 15,126256 | 2,579672 | 0        | 0        | 1,595291 | 18,561312 | 16,926604 | 0        |
| 4    | 13     | PN 2020/44 | ne       | ličinke PT           | 0,724426 | 0        | 45,312456 | 9,003098 | 0        | 0        | 0        | 13,412817 | 2,805477 | 0        | 0        | 1,540156 | 7,7096344 | 15,084883 | 0        |
| 4    | 11     | PN 2020/45 | da       | ličinke PO+Ca        | 0,448015 | 0,690261 | 20,308939 | 5,14031  | 0        | 0        | 0        | 16,208569 | 2,700035 | 0        | 0        | 3,146879 | 17,202634 | 31,820548 | 0        |
| 4    | 17     | PN 2020/46 | da       | ličinke PO+Ca        |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 4    | 6      | PN 2020/47 | da       | ličinke GO+Ca        | 0,701886 | 0        | 39,856875 | 5,840011 | 0,459222 | 0        | 0        | 15,073141 | 2,602596 | 0        | 0        | 1,396542 | 17,029901 | 15,646113 | 0        |
| 4    | 10     | PN 2020/48 | da       | ličinke GO+Ca        |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 4    | 9      | PN 2020/49 | da       | ličinke PT+Ca        | 0,768973 | 0        | 47,926567 | 9,462714 | 0        | 0        | 0        | 13,878852 | 2,682174 | 0        | 0        | 1,488151 | 6,6491092 | 13,040618 | 0        |
| 4    | 13     | PN 2020/50 | da       | ličinke PT+Ca        |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 5    | 11     | PN 2020/51 | ne       | ličinke PO           | 0,651309 | 0        | 26,045612 | 5,845781 | 0        | 0        | 0        | 15,433262 | 2,7159   | 0        | 0        | 3,55651  | 15,293187 | 28,251479 | 0        |
| 5    | 17     | PN 2020/52 | ne       | ličinke PO           | 0,705618 | 1,589939 | 29,684792 | 6,894899 | 0        | 0        | 0        | 15,323266 | 3,013464 | 0        | 0        | 3,704858 | 15,496725 | 21,381546 | 0        |
| 5    | 6      | PN 2020/53 | ne       | ličinke GO           | 0,790764 | 0        | 46,297283 | 6,193399 | 0,372785 | 0        | 0        | 13,643699 | 2,01104  | 0        | 0        | 1,217877 | 14,247478 | 14,400521 | 0        |
| 5    | 10     | PN 2020/54 | ne       | ličinke GO           | 0,828382 | 0        | 45,516217 | 6,059919 | 0,338884 | 0        | 0        | 13,680009 | 2,069609 | 0        | 0        | 1,21395  | 14,695351 | 14,670225 | 0        |
| 5    | 9      | PN 2020/56 | ne       | ličinke PT           | 0,988548 | 0        | 50,950284 | 9,206607 | 0        | 0        | 0        | 11,961429 | 2,540813 | 0        | 0        | 1,234113 | 6,1501818 | 13,160011 | 0        |
| 5    | 13     | PN 2020/57 | ne       | ličinke PT           | 0,765454 | 0        | 52,930815 | 10,66705 | 0        | 0        | 0        | 10,498375 | 2,272724 | 0        | 0        | 1,147911 | 6,063739  | 12,842006 | 0        |
| 5    | 11     | PN 2020/59 | da       | ličinke PO+Ca        |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 5    | 17     | PN 2020/60 | da       | ličinke PO+Ca        |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 5    | 6      | PN 2020/61 | da       | ličinke GO+Ca        |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 5    | 10     | PN 2020/62 | da       | ličinke GO+Ca        |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 5    | 9      | PN 2020/64 | da       | ličinke PT+Ca        |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 5    | 13     | PN 2020/65 | da       | ličinke PT+Ca        |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 5    | 11     | PN 2020/67 | ne       | substrat PO          | 0        | 0        | 1,3801634 | 0,542368 | 0        | 0        | 0        | 14,508674 | 0,799595 | 0        | 0        | 1,629965 | 20,729259 | 56,884514 | 0        |
| 5    | 17     | PN 2020/68 | ne       | substrat PO          | 0        | 0        | 0         | 0        | 0        | 0        | 0        | 14,986029 | 0        | 0        | 0        | 1,197737 | 20,896747 | 59,403824 | 0        |
| 5    | 11     | PN 2020/69 | da       | substrat PO+Ca       |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 5    | 17     | PN 2020/70 | da       | substrat PO+Ca       |          |          |           |          |          |          |          |           |          |          |          |          |           |           |          |
| 5    | 6      | PN 2020/71 | ne       | substrat GO          | 0        | 0        | 0,7279535 | 2,051077 | 0        | 0        | 0        | 17,070301 | 0        | 0        | 0        | 5,646991 | 36,198174 | 31,490666 | 0        |
| 5    | 10     | PN 2020/72 | ne       | substrat GO          | 0,277516 | 0        | 0,7306529 | 1,767891 | 0        | 0        | 0        | 17,136693 | 0,94536  | 0        |          |          |           |           |          |

## 1.6 Vsebnost MK C:20 do C:22

[illegible]



|        |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Co_L   | 0.9171  | 0.7789  | 0.8600  | 0.8893  | 0.3471  | 0.4799  | 1.0000  | 0.7016  | -0.4568 | -0.2966 | 0.8808  | 0.6769  | -0.1269 | -0.0151 | -0.1583 | -0.2175 | -0.3430 | -0.0534 |
| 0.3088 | 0.3027  | -0.2705 | -0.3992 | 0.3293  | 0.2302  | -0.2137 | 0.0520  | -0.4014 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Co_S   | 0.7726  | 0.8604  | 0.7452  | 0.7920  | 0.4627  | 0.5635  | 0.7016  | 1.0000  | -0.4648 | -0.2467 | 0.6905  | 0.8987  | -0.2329 | 0.2385  | -0.2945 | -0.2371 | -0.5021 | -0.2138 |
| 0.4774 | 0.4560  | -0.4627 | -0.2118 | 0.4819  | 0.4588  | -0.1806 | 0.3575  | -0.5523 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Cu_L   | -0.4332 | -0.5236 | -0.5118 | -0.5325 | 0.2513  | 0.2076  | -0.4568 | -0.4648 | 1.0000  | 0.6310  | -0.1296 | -0.2008 | 0.3518  | 0.1789  | 0.8188  | 0.7582  | 0.8626  | 0.7432  |
| 0.6834 | -0.6802 | 0.7641  | 0.6850  | -0.3258 | -0.4306 | 0.0557  | -0.4142 | 0.8619  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Cu_S   | -0.2096 | -0.3534 | -0.2842 | -0.3206 | 0.2179  | 0.1139  | -0.2966 | -0.2467 | 0.6310  | 1.0000  | -0.0811 | -0.0387 | 0.2302  | 0.2713  | 0.6686  | 0.6086  | 0.6881  | 0.6681  |
| 0.5561 | -0.3363 | 0.6898  | 0.6326  | -0.4791 | 0.1461  | 0.0171  | -0.4184 | 0.7254  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Fe_L   | 0.8981  | 0.7110  | 0.7422  | 0.7589  | 0.5870  | 0.6994  | 0.8808  | 0.6905  | -0.1296 | -0.0811 | 1.0000  | 0.7308  | -0.0031 | 0.1262  | 0.1562  | 0.0427  | -0.0448 | 0.1932  |
| 0.1077 | 0.1399  | -0.0414 | -0.1624 | 0.3094  | 0.1358  | -0.0906 | -0.0072 | -0.1221 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Fe_S   | 0.7473  | 0.8207  | 0.7220  | 0.7516  | 0.5489  | 0.7181  | 0.6769  | 0.8987  | -0.2008 | -0.0387 | 0.7308  | 1.0000  | -0.1645 | 0.2562  | -0.0099 | 0.1153  | -0.1867 | 0.1256  |
| 0.1860 | 0.1481  | -0.1994 | 0.0346  | 0.3143  | 0.2302  | -0.1826 | 0.1132  | -0.2979 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| K_L    | -0.1795 | -0.3882 | -0.4475 | -0.2630 | 0.5590  | 0.3417  | -0.1269 | -0.2329 | 0.3518  | 0.2302  | -0.0031 | -0.1645 | 1.0000  | 0.7548  | 0.4338  | 0.3670  | 0.4769  | 0.4162  |
| 0.3238 | -0.0373 | 0.5610  | 0.4142  | -0.1036 | -0.1426 | 0.7504  | 0.3334  | 0.5091  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| K_S    | 0.0489  | 0.0181  | -0.1501 | -0.0051 | 0.7753  | 0.5286  | -0.0151 | 0.2385  | 0.1789  | 0.2713  | 0.1262  | 0.2562  | 0.7548  | 1.0000  | 0.2028  | 0.2261  | 0.2558  | 0.2439  |
| 0.1074 | 0.2248  | 0.2500  | 0.4376  | 0.1529  | 0.1810  | 0.5308  | 0.5929  | 0.2452  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Mg_L   | -0.1214 | -0.3314 | -0.3019 | -0.3054 | 0.4051  | 0.4169  | -0.1583 | -0.2945 | 0.8188  | 0.6686  | 0.1562  | -0.0099 | 0.4338  | 0.2028  | 1.0000  | 0.8820  | 0.8810  | 0.9395  |
| 0.8126 | -0.6645 | 0.9303  | 0.6652  | -0.4612 | -0.4299 | 0.1501  | -0.5168 | 0.9009  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Mg_S   | -0.1618 | -0.2720 | -0.2514 | -0.3219 | 0.3574  | 0.4615  | -0.2175 | -0.2371 | 0.7582  | 0.6086  | 0.0427  | 0.1153  | 0.3670  | 0.2261  | 0.8820  | 1.0000  | 0.8687  | 0.9206  |
| 0.8269 | -0.7852 | 0.8567  | 0.8495  | -0.4750 | -0.5258 | 0.1224  | -0.4991 | 0.8205  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Mn_L   | -0.2786 | -0.4631 | -0.4038 | -0.4542 | 0.3436  | 0.3146  | -0.3430 | -0.5021 | 0.8626  | 0.6881  | -0.0448 | -0.1867 | 0.4769  | 0.2558  | 0.8810  | 0.8687  | 1.0000  | 0.8666  |
| 0.8291 | -0.7264 | 0.8920  | 0.7681  | -0.4728 | -0.5014 | 0.1795  | -0.4706 | 0.9460  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Mn_S   | -0.0455 | -0.2138 | -0.2069 | -0.1659 | 0.4374  | 0.4971  | -0.0534 | -0.2138 | 0.7432  | 0.6681  | 0.1932  | 0.1256  | 0.4162  | 0.2439  | 0.9395  | 0.9206  | 0.8666  | 1.0000  |
| 0.8071 | -0.6873 | 0.8998  | 0.6811  | -0.4867 | -0.4170 | 0.1279  | -0.5566 | 0.8560  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Na_L   | 0.2745  | 0.3782  | 0.3128  | 0.4268  | -0.1932 | -0.1949 | 0.3088  | 0.4774  | -0.6834 | -0.5561 | 0.1077  | 0.1860  | -0.3238 | -0.1074 | -0.8126 | -0.8269 | -0.8291 | -0.8071 |
| 1.0000 | 0.7873  | -0.8291 | -0.7264 | 0.5296  | 0.5759  | -0.1036 | 0.4829  | -0.8523 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Na_S   | 0.2856  | 0.2795  | 0.2110  | 0.3404  | 0.0010  | -0.2042 | 0.3027  | 0.4560  | -0.6802 | -0.3363 | 0.1399  | 0.1481  | -0.0373 | 0.2248  | -0.6645 | -0.7852 | -0.7264 | -0.6873 |
| 0.7873 | 1.0000  | -0.6358 | -0.6168 | 0.3027  | 0.7393  | 0.1683  | 0.6463  | -0.6638 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| P_L    | -0.2643 | -0.5161 | -0.4509 | -0.4402 | 0.2841  | 0.2698  | -0.2705 | -0.4627 | 0.7641  | 0.6898  | -0.0414 | -0.1994 | 0.5610  | 0.2500  | 0.9303  | 0.8567  | 0.8920  | 0.8998  |
| 0.8291 | -0.6358 | 1.0000  | 0.7014  | -0.5644 | -0.3875 | 0.2711  | -0.4997 | 0.9214  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| P_S    | -0.2794 | -0.3541 | -0.3184 | -0.4738 | 0.3895  | 0.3479  | -0.3992 | -0.2118 | 0.6850  | 0.6326  | -0.1624 | 0.0346  | 0.4142  | 0.4376  | 0.6652  | 0.8495  | 0.7681  | 0.6811  |
| 0.7264 | -0.6168 | 0.7014  | 1.0000  | -0.3882 | -0.3760 | 0.1402  | -0.1810 | 0.7432  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Pb_L   | 0.3819  | 0.5256  | 0.4270  | 0.4785  | 0.2807  | 0.3143  | 0.3293  | 0.4819  | -0.3258 | -0.4791 | 0.3094  | 0.3143  | -0.1036 | 0.1529  | -0.4612 | -0.4750 | -0.4728 | -0.4867 |
| 0.5296 | 0.3027  | -0.5644 | -0.3882 | 1.0000  | 0.2179  | -0.0790 | 0.4935  | -0.5843 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Pb_S   | 0.2739  | 0.2727  | 0.2445  | 0.3726  | 0.0092  | -0.1112 | 0.2302  | 0.4588  | -0.4306 | 0.1461  | 0.1358  | 0.2302  | -0.1426 | 0.1810  | -0.4299 | -0.5258 | -0.5014 | -0.4170 |
| 0.5759 | 0.7393  | -0.3875 | -0.3760 | 0.2179  | 1.0000  | 0.0089  | 0.3021  | -0.4367 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Se_L   | -0.1747 | -0.3112 | -0.4544 | -0.2606 | 0.2827  | 0.1402  | -0.2137 | -0.1806 | 0.0557  | 0.0171  | -0.0906 | -0.1826 | 0.7504  | 0.5308  | 0.1501  | 0.1224  | 0.1795  | 0.1279  |
| 0.1036 | 0.1683  | 0.2711  | 0.1402  | -0.0790 | 0.0089  | 1.0000  | 0.3796  | 0.1979  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Se_S   | 0.0598  | 0.2152  | 0.0386  | 0.1146  | 0.3246  | 0.1030  | 0.0520  | 0.3575  | -0.4142 | -0.4184 | -0.0072 | 0.1132  | 0.3334  | 0.5929  | -0.5168 | -0.4991 | -0.4706 | -0.5566 |
| 0.4829 | 0.6463  | -0.4997 | -0.1810 | 0.4935  | 0.3021  | 0.3796  | 1.0000  | -0.4538 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Zn_L   | -0.3750 | -0.5845 | -0.5241 | -0.5448 | 0.2848  | 0.1843  | -0.4014 | -0.5523 | 0.8619  | 0.7254  | -0.1221 | -0.2979 | 0.5091  | 0.2452  | 0.9009  | 0.8205  | 0.9460  | 0.8560  |
| 0.8523 | -0.6638 | 0.9214  | 0.7432  | -0.5843 | -0.4367 | 0.1979  | -0.4538 | 1.0000  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Zn_S   | -0.2767 | -0.3411 | -0.3143 | -0.4211 | 0.3191  | 0.3561  | -0.3807 | -0.3322 | 0.8232  | 0.7119  | -0.0769 | -0.0058 | 0.2842  | 0.2125  | 0.8376  | 0.9220  | 0.9152  | 0.8385  |
| 0.7975 | -0.7722 | 0.7869  | 0.8666  | -0.4456 | -0.4930 | 0.0239  | -0.4656 | 0.8499  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Zn_S   |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| As_L   | -0.2767 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| As_S   | -0.3411 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Ca_L   | -0.3143 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Ca_S   | -0.4211 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Cd_L   | 0.3191  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Cd_S   | 0.3561  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Co_L   | -0.3807 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Co_S   | -0.3322 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Cu_L   | 0.8232  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Cu_S   | 0.7119  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Fe_L   | -0.0769 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Fe_S   | -0.0058 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| K_L    | 0.2842  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| K_S    | 0.2125  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Mg_L   | 0.8376  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Mg_S   | 0.9220  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Mn_L   | 0.9152  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Mn_S   | 0.8385  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Na_L   | -0.7975 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Na_S   | -0.7722 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| P_L    | 0.7869  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| P_S    | 0.8666  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Pb_L   | -0.4456 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Pb_S   | -0.4930 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Se_L   | 0.0239  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Se_S   | -0.4656 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Zn_L   | 0.8499  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
| Zn_S   | 1.0000  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |

Adjusted p-values (Holm's method)

| P_S    | As_L   | As_S   | Ca_L   | Ca_S   | Cd_L   | Cd_S   | Co_L   | Co_S   | Cu_L   | Cu_S   | Fe_L   | Fe_S   | K_L    | K_S    | Mg_L   | Mg_S   | Mn_L   | Mn_S   | Na_L   | Na_S   | P_L    |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| As_L   |        | Pb_S   | Pb_S   | Se_L   | Se_S   | Zn_L   | Zn_S   |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| As_L   |        | <.0001 | <.0001 | <.0001 | 1.0000 | 0.4774 | <.0001 | 0.0012 | 1.0000 | 1.0000 | <.0001 | 0.0036 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| As_S   | <.0001 |        | <.0001 | <.0001 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0009 | <.0001 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0141 | <.0001 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.4735 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Ca_L   | <.0001 | <.0001 |        | <.0001 | 1.0000 | 1.0000 | <.0001 | 0.0039 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0044 | 0.0096 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Ca_S   | <.0001 | <.0001 | <.0001 |        | 1.0000 | 1.0000 | <.0001 | 0.0005 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0022 | 0.0030 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Cd_L   | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        | <.0001 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.4485 | 0.9766 | 0.8052 | 0.0011 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Cd_S   | 0.4774 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | <.0001 |        | 1.0000 | 0.7379 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0210 | 0.0110 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Co_L   | <.0001 | <.0001 | <.0001 | <.0001 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Co_S   | 0.0012 | <.0001 | 0.0039 | 0.0005 | 1.0000 | 0.7379 | 0.0196 |        | 1.0000 | 1.0000 | 0.0282 | <.0001 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.9141 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Cu_L   | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Cu_S   | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.1540 |        | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0545 | 0.2705 | 0.0303 | 0.0551 | 0.8489 | 1.0000 |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.1540 |        | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0545 | 0.2705 | 0.0303 | 0.0551 | 0.8489 | 1.0000 |
| Fe_L   | <.0001 | 0.0141 | 0.0044 | 0.0022 | 0.4485 | 0.0210 | <.0001 | 0.0282 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Fe_S   | 0.0036 | <.0001 | 0.0096 | 0.0030 | 0.9766 | 0.0110 | 0.0424 | <.0001 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0069 |        | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| K_L    | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.8052 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0032 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| K_S    | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0011 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0027 |        | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.3929 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Mg_L   | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0001 | 0.0545 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 |        |        |        |        |        |        |
| Mg_S   | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0023 | 0.2705 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | <.0001 |        |        |        |        |        |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | <.0001 |        |        |        |        |        |
| Mn_L   | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | <.0001 | 0.0303 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | <.0001 | <.0001 |        |        |        |        |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |        |        |        |
| Mn_S   | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0043 | 0.0551 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |        |        |        |
| 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |        |        |        |
| P_L    | 0.0373 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.8427 | <.0001 | <.0001 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |

Na\_L 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.0348 0.8489 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.0002 <.0001 <.0001 0.0002 0.0006 <.0001  
0.0082 1.0000 0.5673 1.0000 1.0000 <.0001 0.0004  
Na\_S 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.0383 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.0611 0.0007 0.0082 0.0309 0.0006 0.1364  
0.2212 1.0000 0.0050 1.0000 0.1027 0.0621 0.0012  
P\_L 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.0018 0.0287 1.0000 1.0000 0.7741 1.0000 <.0001 <.0001 <.0001 <.0001 <.0001 0.1364  
0.0196 0.7252 1.0000 1.0000 1.0000 <.0001 0.0006  
P\_S 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.0332 0.1481 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.0600 <.0001 0.0015 0.0373 0.0082 0.2212 0.0196  
1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.0043 <.0001  
Pb\_L 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.7252  
1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.4739 1.0000  
Pb\_S 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.5673 0.0050 1.0000  
1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000  
Se\_L 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000  
1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000  
Se\_S 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.3929 1.0000 1.0000 1.0000 0.8427 1.0000 0.1027 1.0000  
1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000  
Zn\_L 1.0000 0.4735 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 0.9141 <.0001 0.0084 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 <.0001 <.0001 <.0001 <.0001 <.0001 0.0621 <.0001  
0.0043 0.4739 1.0000 1.0000 1.0000 <.0001  
Zn\_S 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000  
<.0001 1.0000 1.0000 1.0000 1.0000 <.0001

### 2.3 Maščobne kisline

#### Spearman correlations:

|                | ENMK_L  | ENMK_S  | NMK_L   | NMK_S   | omega.3_VNMK_L | omega.3_VNMK_S | omega.6_VNMK_L | omega.6_VNMK_S |
|----------------|---------|---------|---------|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ENMK_L         | 1.0000  | 0.2964  | -0.8929 | -0.6429 | -0.2179        | -0.2036        | 0.3429         | 0.2107         |
| ENMK_S         | 0.2964  | 1.0000  | -0.1214 | -0.0321 | -0.7857        | -0.4143        | -0.2179        | -0.5964        |
| NMK_L          | -0.8929 | -0.1214 | 1.0000  | 0.7464  | -0.0321        | 0.0643         | -0.5357        | -0.3929        |
| NMK_S          | -0.6429 | -0.0321 | 0.7464  | 1.0000  | -0.1536        | 0.0250         | -0.5857        | -0.7107        |
| omega.3_VNMK_L | -0.2179 | -0.7857 | -0.0321 | -0.1536 | 1.0000         | 0.1357         | 0.6571         | 0.6857         |
| omega.3_VNMK_S | -0.2036 | -0.4143 | 0.0643  | 0.0250  | 0.1357         | 1.0000         | 0.0821         | -0.0143        |
| omega.6_VNMK_L | 0.3429  | -0.2179 | -0.5357 | -0.5857 | 0.6571         | 0.0821         | 1.0000         | 0.5536         |
| omega.6_VNMK_S | 0.2107  | -0.5964 | -0.3929 | -0.7107 | 0.6857         | -0.0143        | 0.5536         | 1.0000         |
| VNMK_L         | 0.3036  | -0.2536 | -0.4964 | -0.6321 | 0.6929         | 0.0179         | 0.9821         | 0.6500         |
| VNMK_S         | 0.2214  | -0.6286 | -0.4607 | -0.7179 | 0.6643         | 0.1714         | 0.5500         | 0.9679         |

Number of observations: 15

#### Adjusted p-values (Holm's method)

|                | ENMK_L | ENMK_S | NMK_L  | NMK_S  | omega.3_VNMK_L | omega.3_VNMK_S | omega.6_VNMK_L | omega.6_VNMK_S |
|----------------|--------|--------|--------|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ENMK_L         | 1.0000 | 0.0003 | 0.3214 | 1.0000 | 1.0000         | 1.0000         | 1.0000         | 1.0000         |
| ENMK_S         | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.0217         | 1.0000         | 1.0000         | 0.5490         |
| NMK_L          | 0.0003 | 1.0000 | 0.0570 | 1.0000 | 1.0000         | 0.9892         | 1.0000         | 1.0000         |
| NMK_S          | 0.3214 | 1.0000 | 0.0570 | 1.0000 | 1.0000         | 0.6097         | 0.1162         | 0.3666         |
| omega.3_VNMK_L | 1.0000 | 0.0217 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000         | 0.2720         | 0.1766         | 0.1592         |
| omega.3_VNMK_S | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000         | 1.0000         | 1.0000         | 1.0000         |
| omega.6_VNMK_L | 1.0000 | 1.0000 | 0.9892 | 0.6097 | 0.2720         | 1.0000         | 1.0000         | 0.8718         |
| omega.6_VNMK_S | 1.0000 | 0.5490 | 1.0000 | 0.1162 | 0.1766         | 1.0000         | 0.8718         | 0.2962         |
| VNMK_L         | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 0.3666 | 0.1592         | 1.0000         | <.0001         | 0.2962         |
| VNMK_S         | 1.0000 | 0.3745 | 1.0000 | 0.1032 | 0.2488         | 1.0000         | 0.8750         | <.0001         |

Spearman correlations:

|            | C12.0_L | C12.0_S | C14.0_L | C14.0_S | C16.0_L | C16.0_S | C18.0_L | C18.0_S | C18.2n6c_L | C18.2n6c_S |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------------|------------|
| C12.0_L    | 1.0000  | 0.5233  | 0.5714  | 0.8315  | -0.8821 | 0.7429  | -0.8893 | 0.5464  | -0.6929    | -0.62      |
| C12.0_S    | -0.2536 | -0.0036 | -0.5337 | 0.0852  |         |         |         |         |            |            |
| C14.0_L    | 0.5233  | 1.0000  | 0.3943  | 0.7770  | -0.3871 | 0.6057  | -0.5305 | 0.4373  | -0.2903    | -0.43      |
| C14.0_S    | 0.2975  | 0.1254  | -0.6572 | 0.1380  |         |         |         |         |            |            |
| C16.0_L    | 0.5714  | 0.3943  | 1.0000  | 0.4086  | -0.5179 | 0.6857  | -0.2964 | -0.1393 | -0.1429    | 0.07       |
| C16.0_S    | 0.4179  | 0.3929  | -0.1084 | 0.0949  |         |         |         |         |            |            |
| C18.0_L    | 0.8315  | 0.7770  | 0.4086  | 1.0000  | -0.7025 | 0.7169  | -0.8746 | 0.6953  | -0.7276    | -0.75      |
| C18.0_S    | -0.1649 | 0.1362  | -0.8173 | 0.2274  |         |         |         |         |            |            |
| C18.2n6c_L | -0.8821 | -0.3871 | -0.5179 | -0.7025 | 1.0000  | -0.4464 | 0.8000  | -0.4500 | 0.6536     | 0.58       |
| C18.2n6c_S | 0.3214  | 0.0214  | 0.4019  | -0.0349 |         |         |         |         |            |            |
| C23.0_L    | 0.7429  | 0.6057  | 0.6857  | 0.7169  | -0.4464 | 1.0000  | -0.5750 | 0.2250  | -0.4214    | -0.24      |
| C23.0_S    | 0.2607  | 0.2000  | -0.4401 | 0.0910  |         |         |         |         |            |            |
| C23.0_L    | -0.8893 | -0.5305 | -0.2964 | -0.8746 | 0.8000  | -0.5750 | 1.0000  | -0.8000 | 0.7107     | 0.86       |
| C23.0_S    | 0.4571  | 0.0393  | 0.7718  | -0.3157 |         |         |         |         |            |            |
| C23.0_L    | 0.5464  | 0.4373  | -0.1393 | 0.6953  | -0.4500 | 0.2250  | -0.8000 | 1.0000  | -0.4786    | -0.97      |
| C23.0_S    | -0.5857 | -0.1393 | -0.8186 | 0.4474  |         |         |         |         |            |            |
| C23.0_L    | -0.6929 | -0.2903 | -0.1429 | -0.7276 | 0.6536  | -0.4214 | 0.7107  | -0.4786 | 1.0000     | 0.60       |
| C23.0_S    | 0.5679  | 0.2286  | 0.4550  | 0.1666  |         |         |         |         |            |            |
| C23.0_L    | -0.6214 | -0.4337 | 0.0786  | -0.7599 | 0.5821  | -0.2429 | 0.8679  | -0.9750 | 0.6036     | 1.00       |
| C23.0_S    | 0.6250  | 0.1071  | 0.8228  | -0.4203 |         |         |         |         |            |            |
| C23.0_L    | -0.2536 | 0.2975  | 0.4179  | -0.1649 | 0.3214  | 0.2607  | 0.4571  | -0.5857 | 0.5679     | 0.62       |
| C23.0_S    | 1.0000  | 0.5107  | 0.2020  | -0.0368 |         |         |         |         |            |            |
| C23.0_L    | -0.0036 | 0.1254  | 0.3929  | 0.1362  | 0.0214  | 0.2000  | 0.0393  | -0.1393 | 0.2286     | 0.10       |
| C23.0_S    | 0.5107  | 1.0000  | -0.2551 | 0.5307  |         |         |         |         |            |            |
| C23.0_L    | -0.5337 | -0.6572 | -0.1084 | -0.8173 | 0.4019  | -0.4401 | 0.7718  | -0.8186 | 0.4550     | 0.82       |
| C23.0_S    | 0.2020  | -0.2551 | 1.0000  | -0.6054 |         |         |         |         |            |            |
| C23.0_L    | 0.0852  | 0.1380  | 0.0949  | 0.2274  | -0.0349 | 0.0910  | -0.3157 | 0.4474  | 0.1666     | -0.42      |
| C23.0_S    | -0.0368 | 0.5307  | -0.6054 | 1.0000  |         |         |         |         |            |            |

Number of observations: 15

Adjusted p-values (Holm's method)

|            | C12.0_L | C12.0_S | C14.0_L | C14.0_S | C16.0_L | C16.0_S | C18.0_L | C18.0_S | C18.2n6c_L | C18.2n6c_S |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------------|------------|
| C12.0_L    | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 0.0105  | 0.0012  | 0.1162  | 0.0008  | 1.0000  | 0.2975     | 0.8845     |
| C12.0_S    | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 0.0524  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000     | 1.0000     |
| C14.0_L    | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 0.3341  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000     | 1.0000     |
| C14.0_S    | 0.0105  | 0.0524  | 1.0000  | 1.0000  | 0.2551  | 0.1976  | 0.0018  | 0.2881  | 0.1602     | 0.0789     |
| C16.0_L    | 0.0012  | 1.0000  | 1.0000  | 0.2551  | 1.0000  | 1.0000  | 0.0281  | 1.0000  | 0.5597     | 1.0000     |
| C16.0_S    | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000     | 1.0000     |
| C18.0_L    | 0.0008  | 1.0000  | 1.0000  | 0.0018  | 0.0281  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 0.2204     | 0.0024     |
| C18.0_S    | 1.0000  | 1.0000  | 0.0592  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 0.0281  | 1.0000  | 1.0000     | <.0001     |
| C18.2n6c_L | 0.2975  | 1.0000  | 1.0000  | 0.1602  | 0.5597  | 1.0000  | 0.2204  | 1.0000  | 1.0000     | 1.0000     |
| C18.2n6c_S | 0.8845  | 1.0000  | 1.0000  | 0.0789  | 1.0000  | 1.0000  | 0.0024  | <.0001  | 1.0000     | 1.0000     |
| C18.3n3_L  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000     | 0.8527     |
| C18.3n3_S  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000     | 1.0000     |
| C23.0_L    | 1.0000  | 0.5354  | 1.0000  | 0.0165  | 1.0000  | 1.0000  | 0.0592  | 0.0160  | 1.0000     | 0.0140     |
| C23.0_S    | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000  | 1.0000     | 1.0000     |

>

### PRILOGA 3: MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE

#### 11.1 Rezultati mikrobioloških preiskav substrata: pšenični otrobi

| ŠT. VZORCA | IZVOR VZORCA | DATUM ODVZEMA | ENTEROBAKTERIJE (v 1 g)         | SALMONELE (v 25g) | E. COLI (cfu/g) |
|------------|--------------|---------------|---------------------------------|-------------------|-----------------|
| 08/03/4008 | ORIG. EMB.   | 26/ 7/ 20     | najdeno                         | ni najdeno        | /               |
| PN 10      | POSODA 11    | 9/ 8/ 20      | najdeno                         | ni najdeno        | /               |
|            |              |               | <i>*Klebsiella pneumoniae</i>   |                   |                 |
|            |              |               | <i>*Cronobacter sp.</i>         |                   |                 |
|            |              |               | <i>*Acinetobacter baumannii</i> |                   |                 |
| PN 11      | POSODA 17    | 9/ 8/ 20      | najdeno                         |                   | /               |
|            |              |               | <i>*Klebsiella pneumoniae</i>   |                   |                 |
|            |              |               | <i>*Cronobacter sp.</i>         |                   |                 |
|            |              |               | <i>*Klebsiella variicola</i>    |                   |                 |
| PN 67      | POSODA 11 A  | 23/ 8/ 20     | /                               | ni najdeno        | 1100000         |
| PN 69      | POSODA 11 B  | 23/ 8/ 20     | /                               | ni najdeno        | 790000          |
| PN 68      | POSODA 17 A  | 23/ 8/ 20     | /                               | ni najdeno        | 860000          |
| PN 70      | POSODA 17 B  | 23/ 8/ 20     | /                               | ni najdeno        | 770000          |

Legenda: ORIG. EMB. = originalna embalaža; / = analize nismo izvajali; \* = determinirano z MALDI-TOF; A = brez dodanega Ca; B = dodan Ca.

#### 11.2 Rezultati mikrobioloških preiskav ličink, gojenih na pšeničnih otrobih

| ŠT. VZORCA | IZVOR VZORCA | DATUM ODVZEMA | ENTEROBAKTERIJE (v 1g)              | SALMONELE (v 25g) | E. COLI (cfu/g) |
|------------|--------------|---------------|-------------------------------------|-------------------|-----------------|
| PN 4       | POSODA 11    | 5/ 8/ 20      | najdeno                             | ni najdeno        | /               |
| PN 5       | POSODA 17    | 5/ 8/ 20      | najdeno                             | ni najdeno        | /               |
| PN 16      | POSODA 11    | 9/ 8/ 20      | najdeno                             | ni najdeno        | /               |
|            |              |               | <i>*Serratia marcescens</i>         |                   |                 |
|            |              |               | <i>*Enetrobacter xiangfangensis</i> |                   |                 |
|            |              |               | <i>*Klebsiella aerogenes</i>        |                   |                 |
|            |              |               | <i>*Klebsiella pneumoniae</i>       |                   |                 |
|            |              |               | <i>*Klebsiella variicola</i>        |                   |                 |
| PN 17      | POSODA 17    | 9/ 8/ 20      | najdeno                             | ni najdeno        | /               |
|            |              |               | <i>*Klebsiella pneumoniae</i>       |                   |                 |
|            |              |               | <i>*Klebsiella pneumoniae</i>       |                   |                 |
|            |              |               | <i>*Klebsiella pneumoniae</i>       |                   |                 |
|            |              |               | <i>*Klebsiella variicola</i>        |                   |                 |
|            |              |               | <i>*Klebsiella pneumoniae</i>       |                   |                 |
| PN 22      | POSODA 11 A  | 13/ 8/ 20     | -                                   | -                 | /               |
| PN 28      | POSODA 11 B  | 13/ 8/ 20     | -                                   | -                 | /               |
| PN 23      | POSODA 17 A  | 13/ 8/ 20     | -                                   | -                 | /               |
| PN 29      | POSODA 17 B  | 13/ 8/ 20     | -                                   | -                 | /               |
| PN 39      | POSODA 11 A  | 17/ 8/ 20     | -                                   | -                 | /               |
| PN 45      | POSODA 11 B  | 17/ 8/ 20     | -                                   | -                 | /               |

|       |             |           |   |   |   |
|-------|-------------|-----------|---|---|---|
| PN 40 | POSODA 17 A | 17/ 8/ 20 | - | - | / |
| PN 46 | POSODA 17 B | 17/ 8/ 20 | - | - | / |
| PN 51 | POSODA 11 A | 23/ 8/ 20 | - | - | / |
| PN 59 | POSODA 11 B | 23/ 8/ 20 | - | - | / |
| PN 52 | POSODA 17 A | 23/ 8/ 20 | - | - | / |
| PN 60 | POSODA 17 B | 23/ 8/ 20 | - | - | / |

Legenda: / = analize nismo izvajali; - = ni bilo dovolj vzorca za analizo; \* = determinirano z MALDI-TOF; A = brez dodanega Ca; B = dodan Ca.

### 11.3 Rezultati mikrobioloških preiskav substrata: gospodinjski odpadki

| ŠT. VZORCA | IZVOR VZORCA | DATUM ODVZEMA | ENTEROBAKTERIJE (v 10g)           | SALMONELE (v 25g) | E. COLI (cfu/g) |
|------------|--------------|---------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------|
| PN 2       | ORIG. EMB.   | 26/ 7/ 20     | najdeno                           | ni najdeno        | /               |
| PN 12      | POSODA 6     | 9/ 8/ 20      | najdeno                           |                   | /               |
|            |              |               | * <i>Proteus mirabilis</i>        |                   |                 |
| PN 13      | POSODA 10    | 9/ 8/ 20      | najdeno                           | ni najdeno        | /               |
|            |              |               | * <i>Proteus mirabilis</i>        |                   |                 |
|            |              |               | * <i>Proteus mirabilis</i>        |                   |                 |
|            |              |               | * <i>Citrobacter amalonaticus</i> |                   |                 |
|            |              |               | * <i>Proteus mirabilis</i>        |                   |                 |
|            |              |               | * <i>Proteus mirabilis</i>        |                   |                 |
| PN 71      | POSODA 6 A   | 23/ 8/ 20     | /                                 | ni najdeno        | < 100           |
| PN 73      | POSODA 6 B   | 23/ 8/ 20     | /                                 | ni najdeno        | < 100           |
| PN 72      | POSODA 10 A  | 23/ 8/ 20     | /                                 | ni najdeno        | < 100           |
| PN 74      | POSODA 10 B  | 23/ 8/ 20     | /                                 | ni najdeno        | < 100           |

Legenda: ORIG. EMB. = originalna embalaža; / = analize nismo izvajali; \* = determinirano z MALDI-TOF; A = brez dodanega Ca; B = dodan Ca.

### 11.4 Rezultati mikrobioloških preiskav ličink, gojenih na gospodinjskih odpadkih

| ŠT. VZORCA | IZVOR VZORCA | DATUM ODVZEMA | ENTEROBAKTERIJE (v 10g)       | SALMONELE (v 25g) | E. COLI (cfu/g) |
|------------|--------------|---------------|-------------------------------|-------------------|-----------------|
| PN 6       | POSODA 6     | 5/ 8/ 20      | najdeno                       | ni najdeno        | /               |
| PN 7       | POSODA 10    | 5/ 8/ 20      | * <i>Providencia rettgeri</i> | ni najdeno        | /               |
|            |              |               | * <i>Proteus mirabilis</i>    |                   |                 |
|            |              |               | * <i>Providencia rettgeri</i> |                   |                 |
|            |              |               | * <i>Providencia rettgeri</i> |                   |                 |
| PN 18      | POSODA 6     | 9/ 8/ 20      | najdeno                       | ni najdeno        | /               |
|            |              |               | * <i>Proteus mirabilis</i>    |                   |                 |
| PN 19      | POSODA 10    | 9/ 8/ 20      | najdeno                       | ni najdeno        | /               |
|            |              |               | * <i>Proteus mirabilis</i>    |                   |                 |
| PN 24      | POSODA 6 A   | 13/ 8/ 20     | najdeno                       | ni najdeno        | /               |
| PN 30      | POSODA 6 B   | 13/ 8/ 20     | najdeno                       | ni najdeno        | /               |

|       |             |           |         |            |   |
|-------|-------------|-----------|---------|------------|---|
| PN 25 | POSODA 10 A | 13/ 8/ 20 | najdeno | ni najdeno | / |
| PN 31 | POSODA 10 B | 13/ 8/ 20 | najdeno | ni najdeno | / |
| PN 41 | POSODA 6 A  | 17/ 8/ 20 | najdeno | ni najdeno | / |
| PN 47 | POSODA 6 B  | 17/ 8/ 20 | najdeno | ni najdeno | / |
| PN 42 | POSODA 10 A | 17/ 8/ 20 | najdeno | ni najdeno | / |
| PN 48 | POSODA 10 B | 17/ 8/ 20 | najdeno | ni najdeno | / |
| PN 53 | POSODA 6 A  | 23/ 8/ 20 | najdeno | ni najdeno | / |
| PN 61 | POSODA 6 B  | 23/ 8/ 20 | najdeno | ni najdeno | / |
| PN 54 | POSODA 10 A | 23/ 8/ 20 | najdeno | ni najdeno | / |
| PN 62 | POSODA 10 B | 23/ 8/ 20 | najdeno | ni najdeno | / |

Legenda: / = analize nismo izvajali; \* = determinirano z MALDI-TOF; A = brez dodanega Ca; B = dodan Ca.

### 11.5 Rezultati mikrobioloških preiskav substrata: pivske tropine

| ŠT:<br>VZORCA | IZVOR<br>VZORCA | DATUM<br>ODVZEMA | ENTEROBAKTERIJE<br>(v 10g)        | SALMONELE<br>(v 25g) | E. COLI<br>(cfu/g) |
|---------------|-----------------|------------------|-----------------------------------|----------------------|--------------------|
| PN 3          | ORIG. EMB.      | 26/ 7/ 20        | najdeno                           | ni najdeno           | /                  |
| PN 14         | POSODA 9        | 9/ 8/ 20         | najdeno                           | ni najdeno           | /                  |
|               |                 |                  | * <i>Klebsiella pneumoniae</i>    |                      |                    |
|               |                 |                  | * <i>Enterobacter cloacae</i>     |                      |                    |
|               |                 |                  | * <i>Klebsiella pneumoniae</i>    |                      |                    |
|               |                 |                  | * <i>Cronobacter sp.</i>          |                      |                    |
|               |                 |                  | * <i>Klebsiella variicola</i>     |                      |                    |
| PN 15         | POSODA 13       | 9/ 8/ 20         | najdeno                           | ni najdeno           | /                  |
|               |                 |                  | * <i>Enterobacter bugandensis</i> |                      |                    |
|               |                 |                  | * <i>Enterobacter asburiae</i>    |                      |                    |
|               |                 |                  | * <i>Enterobacter asburiae</i>    |                      |                    |
|               |                 |                  | * <i>Enterobacter asburiae</i>    |                      |                    |
|               |                 |                  | * <i>Enterobacter asburiae</i>    |                      |                    |
| PN 75         | POSODA 9 A      | 23/ 8/ 20        | /                                 | ni najdeno           | > 1500000          |
| PN 77         | POSODA 9 B      | 23/ 8/ 20        | /                                 | ni najdeno           | 800000             |
| PN 76         | POSODA 13 A     | 23/ 8/ 20        | /                                 | ni najdeno           | 770000             |
| PN 78         | POSODA 13 B     | 23/ 8/ 20        | /                                 | ni najdeno           | 190000             |

Legenda: ORIG. EMB. = originalna embalaža; / = analize nismo izvajali; \* = determinirano z MALDI-TOF; A = brez dodanega Ca; B = dodan Ca.

### 11.6 Rezultati mikrobioloških preiskav ličink, gojenih na pivskih tropinah

| ŠT:<br>VZORCA | IZVOR<br>VZORCA | DATUM<br>ODVZEMA | ENTEROBAKTERIJE<br>(v 10g)        | SALMONELE<br>(v 25g) | E. COLI<br>(cfu/g) |
|---------------|-----------------|------------------|-----------------------------------|----------------------|--------------------|
| PN 8          | POSODA 9        | 5/ 8/ 20         | najdeno                           | ni najdeno           | /                  |
|               |                 |                  | * <i>Citrobacter amalonaticus</i> |                      |                    |
|               |                 |                  | * <i>Klebsiella pneumoniae</i>    |                      |                    |
|               |                 |                  | * <i>Citrobacter amalonaticus</i> |                      |                    |

|       |             |           |                                  |            |   |
|-------|-------------|-----------|----------------------------------|------------|---|
|       |             |           | <i>*Citrobacter amalonaticus</i> |            |   |
| PN 9  | POSODA 13   | 5/ 8/ 20  | najdeno                          | ni najdeno | / |
|       |             |           | <i>*Klebsiella pneumoniae</i>    |            |   |
|       |             |           | <i>*Klebsiella pneumoniae</i>    |            |   |
|       |             |           | <i>*Klebsiella pneumoniae</i>    |            |   |
|       |             |           | <i>*Klebsiella pneumoniae</i>    |            |   |
| PN 20 | POSODA 9    | 9/ 8/ 20  | najdeno                          | ni najdeno | / |
|       |             |           | <i>*Klebsiella pneumoniae</i>    |            |   |
|       |             |           | <i>*Klebsiella oxytoca</i>       |            |   |
|       |             |           | <i>*Morganella morganii</i>      |            |   |
|       |             |           | <i>*Providencia stuartii</i>     |            |   |
|       |             |           | <i>*Morganella morganii</i>      |            |   |
| PN 21 | POSODA 13   | 9/ 8/ 20  | najdeno                          | ni najdeno | / |
|       |             |           | <i>*Citobacter amalonaticus</i>  |            |   |
|       |             |           | <i>*Alcaligenes faecalis</i>     |            |   |
|       |             |           | <i>*Morganella morganii</i>      |            |   |
|       |             |           | <i>*Providencia rettgeri</i>     |            |   |
|       |             |           | <i>*Morganella morganii</i>      |            |   |
| PN 26 | POSODA 9 A  | 13/ 8/ 20 | najdeno                          | ni najdeno | / |
| PN 32 | POSODA 9 B  | 13/ 8/ 20 | najdeno                          | ni najdeno | / |
| PN 27 | POSODA 13 A | 13/ 8/ 20 | najdeno                          | ni najdeno | / |
| PN 33 | POSODA 13 B | 13/ 8/ 20 | najdeno                          | ni najdeno | / |
| PN 43 | POSODA 9 A  | 17/ 8/ 20 | najdeno                          | ni najdeno | / |
| PN 49 | POSODA 9 B  | 17/ 8/ 20 | najdeno                          | ni najdeno | / |
| PN 44 | POSODA 13 A | 17/ 8/ 20 | najdeno                          | ni najdeno | / |
| PN 50 | POSODA 13 B | 17/ 8/ 20 | najdeno                          | ni najdeno | / |
| PN 56 | POSODA 9 A  | 23/ 8/ 20 | najdeno                          | ni najdeno | / |
| PN 64 | POSODA 9 B  | 23/ 8/ 20 | najdeno                          | ni najdeno | / |
| PN 57 | POSODA 13 A | 23/ 8/ 20 | najdeno                          | ni najdeno | / |
| PN 65 | POSODA 13 B | 23/ 8/ 20 | najdeno                          | ni najdeno | / |

Legenda: / = analize nismo izvajali; \* = determinirano z MALDI-TOF; A = brez dodanega Ca; B = dodan Ca.