

Schválená metodika: Metodika semiautomatického stanovení pylového profilu – melissopalynologická analýza medu

Metodika byla vypracována jako výstup výzkumného projektu MZe NAZV QK1920344

„Ověření autenticity medu pomocí analýzy pylových zrn“

doc. MVDr. Matej Pospiech, Ph.D.

doc. Ing. Pavel Štarha, Ph.D.

doc. Ing. Josef Bednář, Ph.D.

doc. Helena Čížková, Ph.D.

Ing. Pavel Hrabec, Ph.D.

Ing. Vojtěch Kružík, Ph.D.

Mgr. Zdeňka Javůrková, Ph.D.

Ing. Dalibor Titěra, DrSc.

Brno, 30.7. 2021

kontakt: mpospiech@vfu.cz



I. Cíl metodiky

V České republice není doposud sjednocena melissopalynologická analýza medu. Přičemž různé způsoby zpracování vzorků a provedení analýzy mohou poskytovat odlišné výsledky. Pro popis a charakterizaci významných pylodárných taxonů se dá použít jakákoliv metodika. Pro celkovou charakterizaci českých medů je jednotná metodika klíčovou podmínkou.

Metoda je určena pro botanický popis medů z České republiky a pro dílčí průkaz při posuzování jednodruhových medů vedle organoleptické a fyzikálně-chemické charakteristiky.

Hlavním cílem metodiky je vypracování uceleného postupu semiautomatické melissopalynologické analýzy pro analýzu medu s určením pracovních charakteristik, které musí metoda splnit, aby byly dosaženy správné a robustní výsledky stanovení.

II. Vlastní popis metodiky.

II.a. Úvod

Pylová analýza medu (melissopalynologie) je jedním s používaných nástrojů pro určování kvality medu. Spolu s fyzikálně chemickými parametry a senzorickou analýzou, představuje klíčovou metodu pomocí, které lze usuzovat na botanický a geografický původ medu. Autentický med obsahuje vždy určité množství pylových zrn a/nebo medovicových elementů. Přítomnost těchto součástí souvisí s ekosystémem, ze kterého med pochází (von der Ohe et al. 2004). Získané poznatky pomáhají při posuzování geografického původu medu. Pro určení geografického původu medu je důležitým předpokladem znalost botanického taxonu v daném ekosystému, přičemž je nutno brát v úvahu i průběh roku. Využitelnost botanických taxonů pro produkci medu je silně ovlivněn, množstvím srážek, teplotou a zemědělskou činností. V těchto faktorech se lokality liší. Neopomenutelný vliv má také zemědělská činnost, která vychází z lokálních systémů hospodaření se zemědělskou půdou a je také nejvíce variabilním faktorem (Stacherzak et al. 2019).

Melissopalynologická analýza byla zavedena jako metoda určování pravosti medu před více než 100 lety. Od této doby prodělala řadu změn, které kopírují nové vědecko-technické poznatky. Na vývoji melissopalynologické metodě se podílelo několik autorů (von der Ohe et al. 2004; Bryant a Jones 2001; Louveaux et al. 1970; Fæste et al. 2006; Low et al. 1989; Pfister 1895; Todd a Vansell 1942; Jones a Bryant 2001; Lutier a Vaissière 1993). Melissopalynologická analýza se dodnes používá pro popis pylového spektra medu a jeho botanické a geografické určení (von der Ohe et al. 2004).

Ve světě se používá centrifugační nebo filtrační pylová analýza medu, přičemž pro kvantitativní stanovení se více hodí metoda filtrační, protože je méně ztrátová. Obě metody jsou uznávány jak evropskými, tak světovými společenstvími (von der Ohe et al. 2004).

Centrifugační metoda, používaná obvykle pro kvalitativní analýzy, je založena na naředění a opakovaném odstředění vzorku medu. Následně je sediment nanesen na podložní sklo a montován (uzavření vzorku mezi podložní a krycí sklo) do glycerin želatiny. Vyšetření probíhá pomocí světelného mikroskopu při zvětšení 400x – 1000x a počítá se 300-1000 pylových zrn. Výběr zorných polí pro analýzu je dán hodnotitelem a je proveden v 5-10 paralelních liniích. Výsledkem kvalitativní analýzy je relativní frekvence hlavních pylových taxonů ve vzorku.

Pro kvantitativní analýzy se využívá metoda založená na vakuové filtraci naředěného vzorku medu přes 3 μm membránový filtr. Membránový filtr je po vysušení nanesen na podložní sklo a montován imerzím olejem, který filtr zprůhlední. Vyšetření probíhá také pomocí světelného mikroskopu při zvětšení 400x – 1000x a počítá se nejméně 500 pylových zrn. Výběr zorných polí pro analýzu je dán hodnotitelem a je proveden v 10 paralelních liniích. Při této metodě se kromě relativní frekvence hlavních pylových taxonů ve vzorku počítá také absolutní počet pylových zrn a medovicových elementů. Absolutní počet pylových zrn je vhodným ukazatelem použité technologie zpracování medu, kdy dochází k částečnému snížení počtu pylových zrn při sedimentaci medu nebo k úplné ztrátě pylových zrn u medů filtrovaných.

Melissopalynologické metody jsou většinou založeny na manuálním určování jednotlivých pylových zrn v mikroskopickém preparátu. Přestože u tohoto způsobu byla prokázána reprezentativnost vyšetření (von der Ohe et al. 2004), je vědecký výzkum směřován na částečnou (semiautomatickou) nebo úplnou automatizaci melissopalynologické analýzy (Holt a Bennett 2014). Tyto metody automatizují některé kroky přípravy nebo vlastní mikroskopické vyšetření. Metody umožňují plně automatické (strojové) mikroskopické vyšetření s identifikací pylových taxonů. Výhodnou automatizovaných metod je zejména zjednodušení metody, omezení subjektivních chyb, zvýšení rychlosti vyšetření, s čímž je také spjato i snížení nákladů na vyšetření.

Naše metodika je založena na metodě filtrační s počítáním absolutního počtu pylových zrn ve vzorcích medu. Přičemž první kroky melissopalynologické analýzy jsou automatizován za pomoci motorizovaného snímání náhodných zorných polí ve vzorku a vytvořením super ostrého obrazu. Automatizací je zabezpečen náhodný výběr pylových zrn z celé populace pylu ve vzorcích a zároveň ostrosti ve všech optických úrovních.

II.b. Příprava a zpracování vzorků

Pro správnou přípravu vzorku je nutné provést jeho homogenizaci. Před homogenizací je nutno temperovat vzorek medu v termostatu při teplotě 40 °C do jeho úplného ztekucení a následně med promíchat otáčením vzorkovnice minimálně desetkrát. Zkrystalizované vzorky, které se neztekutíli v termostatu, vložíme do ultrazvukové lázně, kde je při teplotě max. 40 °C ztekutíme.

- Do 50 ml centrifugačních zkumavek navážíme 5,0 g ($\pm 0,1$ g) zhomogenizovaného vzorku.
- Každý vzorek připravujeme v duplikátu (značíme např. A a B).
- Následně přidáme 20 ml destilované vody (vytemperované na 40°C) a mícháme skleněnou tyčinkou do rozpuštění vzorku.
- Pro úplné rozpuštění vzorky promícháme ve vortexu po dobu 30 vteřin při 2000 RPM.
- Poté vzorek zfiltrujeme přes filtrační aparaturu. Pro filtraci použijeme mikrofiltr s velikostí pórů 3 μ m, \varnothing 25mm nebo 5 μ m, \varnothing 25mm¹. Celý obsah zkumavky pomalu naléváme na filtr, zkumavku důkladně vypláchneme trochou destilované vody, tak aby byla spláchnuta i pylová zrna ze stěn zkumavky. Pylová zrna zůstávají zachycena na použitém filtru.
- Filtr pomocí pinzety přemístíme na Petriho misku vyloženou čistým filtračním papírem, zakryjeme a necháme vyschnout na topné ploténce (cca 2 – 4 hodiny) při teplotě 30-40°C.
- Po uschnutí přemístíme filtr na podložní mikroskopické sklo (76 x 26 mm, se zábrusem) na kapku Solakrylu. Následně filtr zamontujeme opět pomocí Solakrylu a krycího skla o velikosti (50 x 24 mm). Pro omezení počtu vzduchových bublin přikládáme krycí sklo z jedné strany z výchozího úhlu 45°. Po zaschnutí skla očistíme od přebytku montovacího media a okraje krycího skla zalakujeme lakem na nehty, tak aby nedocházelo k vysychání preparátu.

Chemikálie a spotřební materiál:

- destilovaná/demineralizovaná voda
- solakryl BMX
- běžný lak na nehty (s alkoholovým nebo xylenovým základem)
- 50 ml centrifugační zkumavky
- skleněná tyčinka
- mikrofiltr filtr s velikostí pórů 3 a 5 μ m, \varnothing 25 mm (Millipore)
- pinzeta
- petriho miska
- filtrační papír
- podložní a krycí mikroskopické skla

Přístroje:

- termostat, rozmezí teplot termostatu 20 až 70 °C
- ultrazvuková lázeň, rozmezí teplot 20 až 80 °C
- váhy, přesnost vážení 0,01 g
- vortex, rozsah otáček 200 až 2500 RPM
- skleněná vakuová filtrační aparatura
- topná ploténka, rozmezí teplot 20 až 50 °C

¹Obsah pylových zrn může být u některých druhů medu vyšší, což zhoršuje filtraci. V případě pomalé filtrace nebo neúplného přefiltrování lze použít odlišnou navážku vzorku a objem vody, tak, aby zůstal zachován poměr 1:4 (med:destilovaná voda), např. 3,0 g vzorku medu a 12,0 ml destilované vody a pro filtraci použijeme filtr s velikostí pórů 5 μ m.

II.c. Snímání vzorků

Snímání vzorků medů je prováděno pomocí digitální kamery umístěné na mikroskopu. Pro správnou kvalitu získaných snímků je nutné správné nastavení kamery a mikroskopu:

Nastavení kamery pro snímání

- nastavíme expozici 250 μ s,
- upravíme barevné parametry obrazu pro jednotlivé barvy R – 1,70, G – 1,0, B – 1,38.

Nastavení mikroskopu pro snímání

- nastavíme světlo v rozmezí průměrné intenzity pixelů 150-160 pro všechny barevné kanály (RGB), pomocí clony kondenzoru a intenzity světla,
- zvolíme používaný objektiv 10x, 20x nebo 40x podle preferencí hodnotitele.

Nastavení počtu snímaných zorných polí (odhad velikosti populace)

- vybereme náhodně 10 zorných polí Z_1, \dots, Z_{10} ,
- určíme počet pylových zrn v každém zorné poli P_1, \dots, P_{10} ,
- spočteme střední hodnotu počtu pylových zrn na zorné pole $\bar{P} = \frac{1}{10} \sum_{i=1}^{10} P_i$,
- určíme počet zorných polí n dle požadovaného celkového počtu pylových zrn N ,

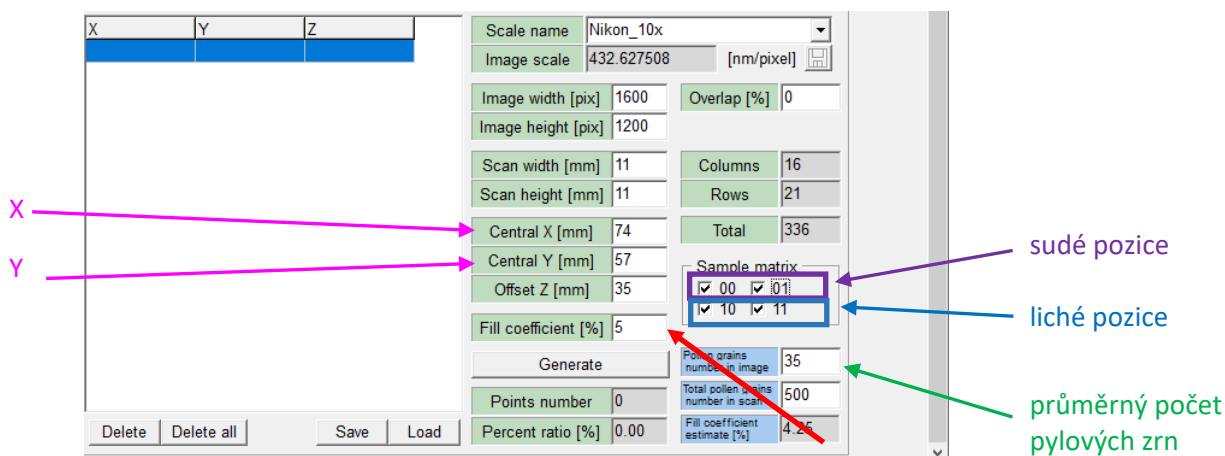
$$n = \frac{N}{\bar{P}}$$

kde n je počet zorných polí zaokrouhlený na celé číslo nahoru.

Generování souřadnic pro snímání mikroskopického preparátu.

Generování souřadnic zorných polí vychází z matice počítání pylových zrn podle harmonizované metody pro melissopalynologii (von der Ohe et al. 2004).

- spustíme program Scan Position Generator (k dispozici u autorů nebo [zde](#)),
- zadáme **průměrný počet pylů** \bar{P} na jedno zorné pole a souřadnice středu filtru (**X**, **Y**) umístěného na mikroskopickém preparátu (Obrázek 1),
- podle programem vypočítaného „**Fill coefficient** (Koefficient vyplnění)“ estimate [%] upravíme parametr „Fill coefficient“ [%], číslo upravíme zaokrouhlením na celá čísla nahoru (Obrázek 1),
- dle požadované správnosti zastoupení pylových zrn ve vzorku zvolíme „Total pollen grains number in scan“ předpokládaný počet pylových zrn pro melissopalynologickou analýzu (např. 150, 250, 500 pylů),
- vygenerujeme souřadnice pro **sudé** a následně pro **liché** pozice n pro zvolený celkový počet pylových zrn N (např. 300, 500, 1000 pylů) (Obrázek 1),
- vygenerované souřadnice uložíme s koncovkou – CSV File (*.csv),
- stejným způsobem generujeme počet zorných polí pro duplikát.



Obrázek 1: Nastavení generování náhodných pozic

Snímání mikroskopického preparátu.

- otevřeme si program pro snímání mikroskopických preparátů a nahrajeme souřadnice získané z programu "Scan Position Generator",
- nastavíme parametry pro snímání vzorku, tak aby byl preparát nasnímán vícenásobným snímáním v 5 rovinách ostrosti s posunem 8 μm , tudíž je vzorek snímán v rozsahu 32 μm v ose Z,
- snímání provádíme s využitím funkce autofokus (automatické ostření na pylové zrno) pro každý snímek (ostření je vhodné provádět v 10 krocích v rozsahu 100 μm na základě parametru pro světlé pole),
- po nasnímání sloučíme 5 rovin ostrosti do obrazu s rozšířenou hloubkou ostrosti "Extended depth of focus".

Přístroje:

- trinokulární mikroskop, objektivy 10x, 20x, 40x (např. Eclipse Ci-L, Nikon)
- motorizovaný stolek, uživatelsky nastavitelný pohyb v rovinách x, y, z (např. Proscan III, Prior)
- kamera, minimálně 1600x1200 pixelů, 8 bitů (např. DFK 23U274, Imaging Source)
- PC

Software:

- Scan Position Generator
- software pro snímání mikroskopických preparátů, snímání dle předdefinovaných pozic, skládání obrazu s rozšířenou hloubkou ostrosti (např. NIS Elements ver. 5.2).

II.d. Vyšetření vzorků

Klasifikace pylových zrn do botanických taxonů provádí hodnotitel v prostředí programu „Pollen Classification“. SW je dostupný u autorů nebo [zde](#). Klasifikace pylových taxonů je na základě jejich velikosti a dále na základě tvarových a barevných charakteristik pylových zrn. Pro určení taxonů se využívají znalosti hodnotitele a dostupné pylové atlasy (El-Labban 2020; von der Ohe a Von Der Ohe 2007).

- otevřeme sekvenci snímků pro dílčí vzorek medu,
- nastavíme velikost použitého filtru v milimetrech (např. Ø 25mm),
- nastavíme použitou navážku pro vzorek v gramech (např. 5 g, 3 g),
- na jednotlivých snímcích označujeme pylová zrna značkou přiřazenou danému botanickému taxonu²,
- pylová zrna všech botanických taxonů počítáme do požadovaného množství N . Pro celkový počet pylových zrn platí $N = \sum_{i=1}^k N_i^n + \sum_{i=1}^l N_i^p$, kde N_i^n jsou počty pylových zrn jednotlivých nektarodárných taxonů, N_i^p jsou počty pylových zrn pylodárných taxonů, k je počet taxonů nektarodárných a l je počet taxonů pylodárných. Pro procentuální zastoupení jednotlivých taxonů platí $\frac{N_i^n}{N} 100 \%$, resp. $\frac{N_i^p}{N} 100 \%$. Jestliže určíme celkový počet pylových zrn nektarodárných $N^n = \sum_{i=1}^k N_i^n$ a pylodárných taxonů $N^p = \sum_{i=1}^l N_i^p$, můžeme určit i jejich procentuální zastoupení $\frac{N^n}{N} 100 \%$, resp. $\frac{N^p}{N} 100 \%$,
- vystření opakujeme také pro duplikátní vzorek,
- po dokončení určování provedeme export výsledků do protokolu (Obrázek 2). Výsledkem měření je absolutní a relativní obsah pylu všech identifikovaných taxonů a také relativní obsah nektarodárných taxonů (Tabulka č. 1) ve vzorku.

Tabulka č. 1: Přehled významných nektarodárných botanických taxonů a zdrojů medovice ČR

Čeleď	Rod
Aceraceae	<i>Acer</i> sp.*
Asteraceae	<i>Achillea</i> sp.
	<i>Helianthus</i> sp.
	<i>Taraxacum</i> sp.
Boraginaceae	<i>Myosotis</i> sp.
Brassicaceae	<i>Brassica</i> sp.
Hydrophyllaceae	<i>Phacelia</i> sp.
Fagaceae	<i>Castanea</i> sp.
	<i>Abies</i> sp.*
	<i>Picea</i> sp.*
Pinaceae	<i>Pinus</i> sp.*
	<i>Rhamnus</i> sp.
	<i>Pyrus/Prunus</i> sp.
Rosaceae	<i>Malus</i> sp.
	<i>Rubus</i> sp.
	<i>Salix</i> sp.
Salicaceae	<i>Robinia pseudoacacia</i>
	<i>Trifolium</i> sp.
	<i>Vicia</i> sp.
Fabaceae	
Tiliaceae	<i>Tilia</i> sp.*

*botanický taxon je současně/také významným zdrojem medovice

Přístroje/Software:

- PC / Pollen Classification

² Značky pro identifikaci pylových zrn jsou volně nastavitelné a lze je využívat z předešlých měření. Přidáním nového botanického taxonu (ctr+shif+alt+levé tlačítko myši) si laboratoř vytvoří vlastní databázi botanických taxonů obsahující náhledy zvoleného pylového zrna a jeho velikost.

Protokol melissopalynologické analýzy
Melissopalynologická analýza

č.	Pylový taxon	Absolutní obsah		Relativní obsah		Intervalový odhad	
		Všechna pylová zrna [rz]	Pylová zrna nektarodárných taxonů [rz]	Všechna pylová zrna [%]	Pylová zrna nektarodárných taxonů [%]	95%	99%
Dominantní pyl		Relativní zastoupení >45%					
	Celkem	0.00	0.00	0.00	0.00		

č.	Pylový taxon	Absolutní obsah		Relativní obsah		Intervalový odhad	
		Všechna pylová zrna [rz]	Pylová zrna nektarodárných taxonů [rz]	Všechna pylová zrna [%]	Pylová zrna nektarodárných taxonů [%]	95%	99%
Sekundární pyl		Relativní zastoupení 15-45%					
1	Tilia sp.	119.00	119.00	39.27	39.27	± 5.41	± 7.23
2	Trifolium sp.	92.00	92.00	30.36	30.36	± 5.18	± 6.80
	Celkem	211.00	211.00	69.64	69.64		

č.	Pylový taxon	Absolutní obsah		Relativní obsah		Intervalový odhad	
		Všechna pylová zrna [rz]	Pylová zrna nektarodárných taxonů [rz]	Všechna pylová zrna [%]	Pylová zrna nektarodárných taxonů [%]	95%	99%
Významný pyl		Relativní zastoupení 3-15%					
1	Myosotis sp.	34.00	34.00	11.22	11.22	± 3.55	± 4.67
2	Phacelia tanacetifolia	13.00		4.29		± 2.28	± 3.00
3	Quercus sp.	12.00		3.96		± 2.20	± 2.89
	Celkem	59.00	34.00	19.47	11.22		

č.	Pylový taxon	Absolutní obsah		Relativní obsah		Intervalový odhad	
		Všechna pylová zrna [rz]	Pylová zrna nektarodárných taxonů [rz]	Všechna pylová zrna [%]	Pylová zrna nektarodárných taxonů [%]	95%	99%
Minoritní pyl		Relativní zastoupení 1-3%					
1	Apiaceae	4.00	4.00	1.32	1.32	± 1.29	± 1.69
2	NEZNAME2	4.00		1.32		± 1.29	± 1.69
	Celkem	8.00	4.00	2.64	1.32		

Obrázek 2. Vzor výsledků získaných z programu „Pollen Classification“ s pracovní charakteristikou metody

č.	Pylový taxon	Absolutní obsah		Relativní obsah		Intervalový odhad	
		Všechna pylová zrna [n]	Pylová zrna nektarodárných taxonů [n]	Všechna pylová zrna [%]	Pylová zrna nektarodárných taxonů [%]	95%	99%
	Přítomný pyl	Relativní zastoupení <1%*					
1	Achillea sp.	1.00		0.33		± 0.65	± 0.85
2	Bellis sp.	1.00	1.00	0.33	0.33	± 0.65	± 0.85
3	Betula sp.	1.00		0.33		± 0.65	± 0.85
4	Brassica sp.	1.00	1.00	0.33	0.33	± 0.65	± 0.85
5	Echium sp.	3.00	3.00	0.99	0.99	± 1.11	± 1.47
6	Lotus sp.	3.00	3.00	0.99	0.99	± 1.11	± 1.47
7	NEZNAME	3.00		0.99		± 1.11	± 1.47
8	Echium sp.	3.00	3.00	0.99	0.99	± 1.11	± 1.47
9	Pollen2	3.00		0.99		± 1.11	± 1.47
10	Corylus sp.	1.00		0.33		± 0.65	± 0.85
11	Rubus sp.	2.00	2.00	0.66	0.66	± 0.91	± 1.20
12	Taraxacum sp.	1.00	1.00	0.33	0.33	± 0.65	± 0.85
13	Thymus sp.	1.00	1.00	0.33	0.33	± 0.65	± 0.85
14	Vicia sp.	1.00	1.00	0.33	0.33	± 0.65	± 0.85
	Celkem	25.00	16.00	8.25	5.28		

* přítomnost pylu této skupiny lze považovat za „náhodnou“ i v populačním vzorku

Parametry melissopalynologické analýzy

	Počet vyšetřených zorných polí [n]	Průměrný počet pylu na zorné pole	Velikost použitého filtru [mm ²]	Použitá navážka [g]	Celkový obsah pylových zrn na vzorek (PGN)
Hodnota	49	6.18	490.87	6.00	14.1 · 10 ³

Obrázek 2 - pokračování. Vzor výsledků získaných z programu „Pollen Classification“ s pracovní charakteristikou metody

II.e. Hodnocení výsledku vyšetření

Výsledkem melissopalynologické analýzy je pylový profil medu. Tato informace vypovídá o botanickém původu nektaru, z kterého byl med včelami vytvořen. Jednotlivé botanické druhy však mají rozdílnou pylodárnost a nektarodárnost. Obsah pylu v medu se proto liší dle zdroje snůšky (Tabulka č. 2).

Hodnocení botanického původu medu

Aby med mohl být považován za jednodruhový, musí pocházet zcela nebo převážně z uvedeného druhu a musí mít odpovídající organoleptické, fyzikálně-chemické a mikroskopické charakteristiky § 9 odst. 2, písm. c) 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kaka a s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony) (Ministerstvo Zemědělství 2003).

Pro splnění mikroskopické charakteristiky musí u jednodruhových medů vzorek splňovat minimální obsah pylových taxonů podle tabulky č. 2. Pokud botanický druh v tabulce není uveden, posuzuje se podle nejnovějších vědeckých poznatků. I u jednodruhových medů jsou zastoupeny další pylové taxony, než je daný specifický taxon (Pospiech et al. 2021). Pokud se pyl dalších nektarodárných taxonů podílí ve významném množství (dominantní pyl případně sekundární pyl, tabulka č. 3), med nelze považovat za jednodruhový.

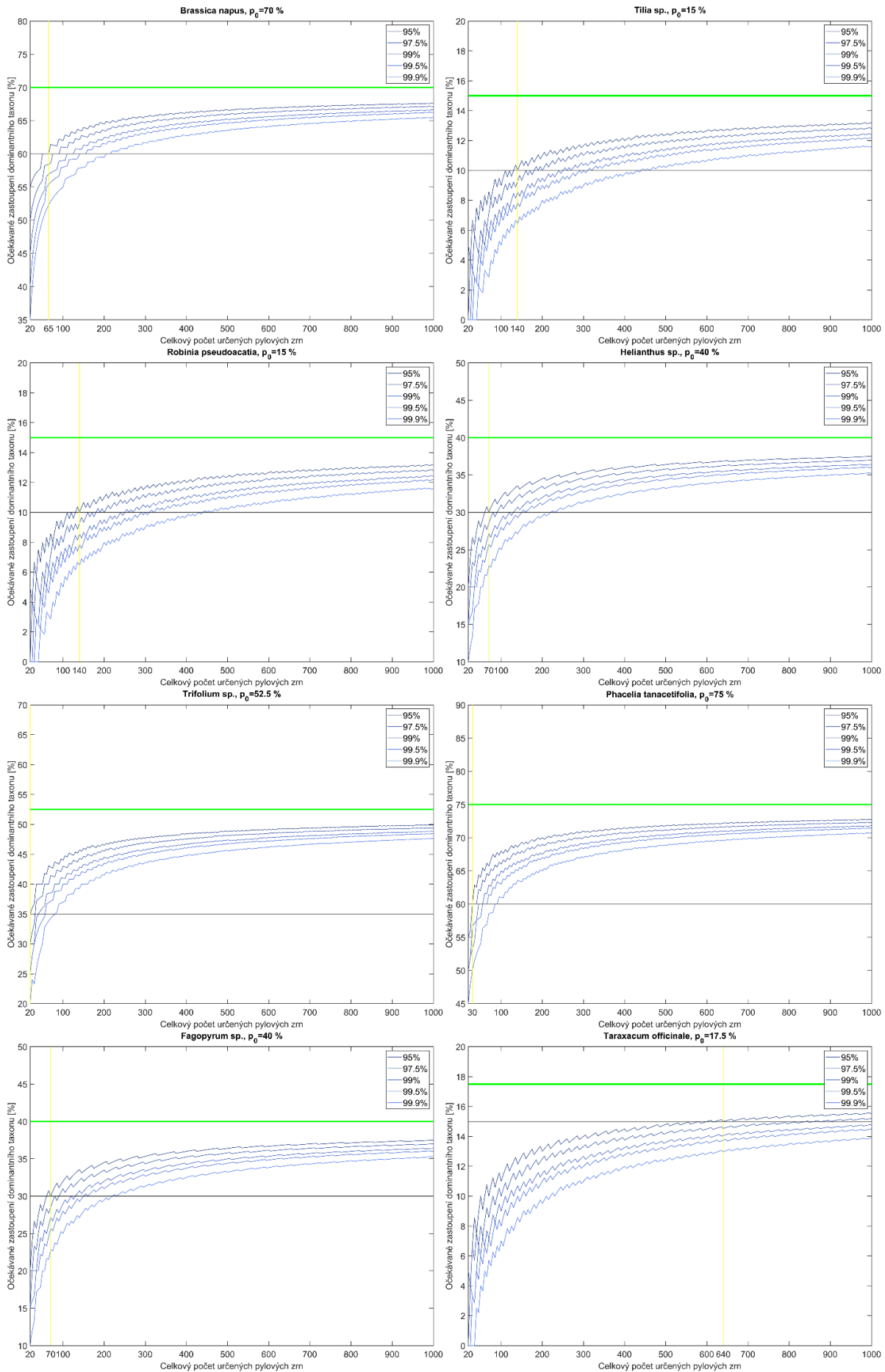
Tabulka č. 2: Pylové zastoupení specifického pylu u významných jednodruhových medů.

Označení pro jednodruhový med	Hlavní botanický taxon	Minimální rozmezí specifického pylu [%]
Řepkový	<i>Brassica napus</i>	60-80
Lípový	<i>Tilia</i> sp.	10-20
Akátový	<i>Robinia pseudoacacia</i>	10-20
Slunečnicový	<i>Helianthus</i> sp.	30-50
Medovicový	-	
Jetelový	<i>Trifolium</i> sp.	35-70
Svazekový	<i>Phacelia tanacetifolia</i>	60-90
Pohankový	<i>Fagopyrum</i> sp.	30-50
Pampeliškový	<i>Taraxacum officinale</i>	15-20

(El-Labban 2020; Persano Oddo et al. 2004; Beckh a Camps 2009; Persano Oddo a Piro 2004; Nešović et al. 2020)

Pro dodržení přesnosti metody je nutné vyšetřit určité množství pylových zrn specifických pylových taxonů. Potřebná minimální množství pylových zrn pro vyšetření, jsou znázorněny v grafu 1. pro různé hladiny významnosti ($p < 0,001$... $p < 0,05$, modré křivky). Minimální počet pylových zrn je definován pro jednotlivé botanické taxony podle jeho předpokládaného zastoupení v medu. Zelená přímka zobrazuje předpokládané zastoupení taxonu, a tedy asymptotickou hodnotu, které by bylo dosaženo se 100% spolehlivostí při maximálním (nekonečně velkém) n . Černá přímka je hodnota, které musí být dosaženo ve výběrovém souboru s reálným n , aby mohla být s příslušnou pravděpodobností vyslovena shoda s požadavkem pro příslušný druhový med.

Pospiech M. a kol. (2021): Metodika semiautomatického stanovení pylového profilu – melissopalynologická analýza medu



Graf 1: Očekávané zastoupení specifických taxonů v jednodruhových medech.

Modré krivky – hladina významnosti $p < 0,001$... $p < 0,05$; zelená přímka - předpokládané zastoupení taxonu; černá přímka - hodnota, které musí být dosaženo ve výběrovém souboru.

Hodnocení pylového profilu medu

Na pylovém profilu medu se podílí množství pylových taxonů, které jsou zastoupeny v různém poměru. Zastoupení jednotlivých pylových taxonů se liší podle geografického původu, konkrétní zemědělské výsadby a také klimatických podmínek a období snůšky (Pospiech et al. 2020). Pro popis pylového profilu medu se proto využívá relativní rozdělení obsahu pylu do pěti skupin tak, jak uvádí tabulka č. 3 (Louveaux et al. 1970). Zařazení taxonů do skupiny má vyšší vypovídající hodnotu než konkrétní zastoupení pro jednotlivé taxony. Hranice mezi významným a minoritním pylem je rozostřená při hodnocení 300 pylových zrn. Pro správné zařazení pylu mezi těmito skupinami je vhodné vyšetření více než 300 pylových zrn.

Pracovní charakteristika metody

Pro dodržení přesnosti melissopalynologické analýzy je nutné, aby vyšetření vzorku dosáhlo maximální chyby³ uvnitř zvoleného intervalu odchylek pro jednotlivé skupiny (Tabulka č. 3). Kromě interní charakteristiky metody je nutné ověřovat charakteristiku metody mezilaboratorními testy, tak aby dosažené výsledky byly srovnatelné v rámci Z – scóre srovnávaných laboratoří.

- vyšetříme vzorek medu,
- pro vzorek vypočteme z binomického rozdělení pravděpodobnosti intervalový odhad relativního zastoupení daného pylu s předem stanovenou spolehlivostí
- srovnáme vypočtený intervalový odhad vzorku medu s intervalem v tabulce č. 3.
- vypočtený intervalový odhad se musí nacházet v intervalu pro danou skupinu pylu, pokud je odchylka vyšší počítá se více pylových zrn až po dosažení rozmezí intervalu v tabulce č. 3.

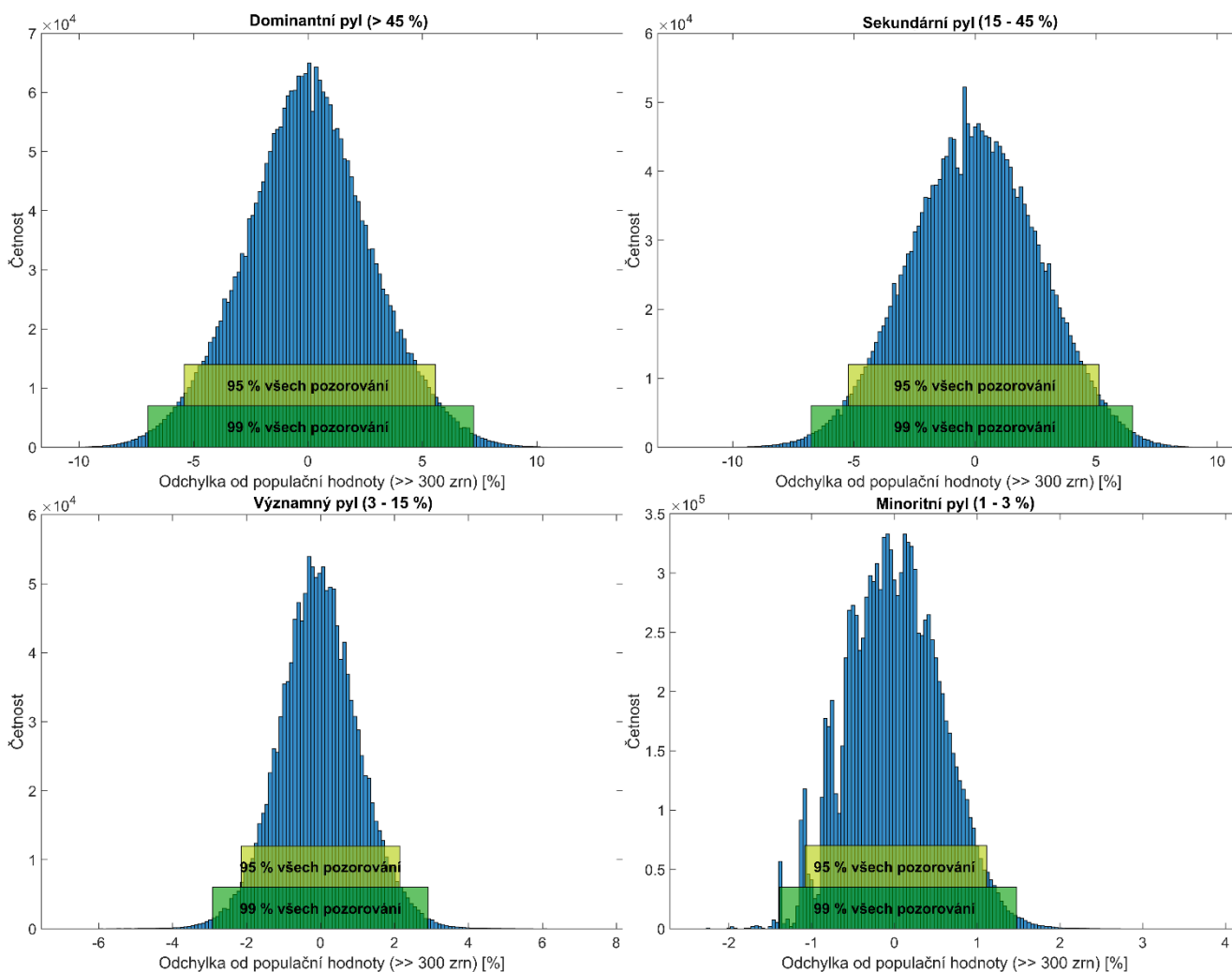
Tabulka č. 3: Relativní zastoupení pylových taxonů v medu a odhad přípustných chyb pro 300 pylových zrn⁴.

Název skupiny	Relativní zastoupení pylu	Směrodatná odchylka chyb	Maximální chyba	95 % odchylek v intervalu (%)		99 % odchylek v intervalu (%)	
Dominantní pyl	> 45 %	0,0275	0,1247	-5,41	5,56	-6,99	7,23
Sekundární pyl	15-45 %	0,0266	0,1199	-5,22	5,12	-6,76	6,52
Významný pyl	3-15 %	0,0108	0,0754	-2,14	2,14	-2,92	2,91
Minoritní pyl	1-3 %	0,0056	0,0358	-1,08	1,11	-1,39	1,48
Přítomný pyl	< 1 %*	-	-	-	-	-	-

* přítomnost pylu této skupiny lze považovat za „náhodnou“ i v populačním vzorku (cca 1000 určených zrn).

³ Odchylka od přesné hodnoty relativního zastoupení taxonu v dané kategorii.

⁴ Odhad chyby relativního složení pylových taxonů při použití podmnožiny počtu identifikovaných snímků (a tedy menšího množství pylových zrn). Vychází z takové kombinace snímků, aby počet použitých pylových zrn (je-li to možné) dosáhl 300. Relativní zastoupení taxonů určených pomocí všech nalezených pylových zrn je pak bráno jako populace.



Graf 2: Přípustné odchylky od skupin pylových taxonů.

Z histogramů je zjevné, že vyhodnocení 300 pylových zrn je dostačující pro stanovení relativního zastoupení daného taxonu, pokud je zastoupen ve vzorku alespoň 15 % (dominantní nebo sekundární pyl). Je-li ve vzorku 3-15 % daného taxonu lze stále považovat odhad pomocí 300 zrn za uspokojivý, ale hranice mezi minoritním a významným pylem se stává neostrou. Pro menší než 3 % zastoupení taxonu je již výsledek silně závislý na výběru použitých snímků (protože v absolutních číslech se již jedná pouze o desítky pylových zrn).

III. Srovnání novosti postupů

V současné době není v České republice k dispozici oficiální metoda melissopalynologické analýzy medu. Ve světě a v EU jsou k dispozici pouze metody „International Honey Commission“, pod záštitou, které byly popsány harmonizované melissopalynologické metody (von der Ohe et al. 2004).

Předkládaná metoda vychází z těchto harmonizovaných melissopalynologických metod. Metoda přebírá filtrační způsob zpracování vzorku, avšak dále je zvolen nový způsob snímání vzorku a melissopalynologické analýzy. Metodika automatizuje první fáze zpracování vzorků (výběr zorných polí, snímání, vytvoření superostrého obrazu). Přičemž ale metoda zůstává srovnatelná s harmonizovanými metodami IHC. Velkým přínosem pro přesnost a ověřování výsledků je náhodný výběr vyšetřovaných zorných polí v preparátu, což má za následek kratší vyšetřovací čas a možnost vyjádřit jak chybu metody, tak i chyby pro jednotlivá vyšetření.

Zpracování vzorků medu v rozšířené hloubce ostrosti umožňuje sledovat v jednom zorném poli více charakteristických znaků pylu co zpřesňuje identifikaci pylových taxonů. Rovněž umožňuje zachytit všechny pylová zrna, které se nachází na preparátu nezávisle na jejich optimální rovině ostrosti (Javůrková et al., 2021). Nastavení jednotných světlených podmínek také umožňuje využít barvu pylových zrn jako další znak pro klasifikaci pylových zrn.

IV. Popis uplatnění metodiky

Metodika semiautomatického stanovení pylového profilu – melissopalynologická analýza medu je určena pro výzkumná pracoviště a dozorové orgány České republiky (Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Státní veterinární správa).

Metodika představuje standardní operační postup pro melissopalynologické vyšetření medy pomocí SW „Pollen Classification“ vytvořeného v rámci projektu. V metodice jsou zahrnuty kroky přípravy vzorků medu, zpracování vzorků medu pro semiautomatické snímání a systém hodnocení pylových zrn. Výstupem analýzy je pylový profil analyzovaného medu v absolutních hodnotách a procentech všech detekovaných taxonů a procentech pylodárných taxonů. Součástí analýzy je také absolutní počet pylových zrn ve vzorku medu.

V. Ekonomické aspekty

Ekonomický odhad nákladů na laboratorní analýzu

Náklady na zařízení melissopalynologické laboratoře jsou 800 000 Kč. Pro potřeby analýzy je nutné disponovat nebo zakoupit vědecký mikroskop s motorizovaným pohybem v x, y, z osách. Dalším nezbytným zařízením je SW disponujícím ovládním motorizovaného stolku a snímáním preparátů. Cena za tento SW je cca 100 000 Kč. Dalším nutným zařízením je SW pro náhodný výběr pozic pro snímání a SW pro hodnocení pylových zrn na snímcích. Tyto dva SW jsou výstupem z projektu a jsou k dispozici na stránkách autorů. Jako ekonomicky nejvhodnější je analýza vzorků ve specializovaných laboratořích, které budou disponovat zkušenými hodnotiteli schopnými klasifikovat pylová zrna jednotlivých taxonů.

Předpokládaná jednotková cena za jednu analýzu medu je 850 Kč.

Ekonomický dopad na prodejce medu

Prodej druhového nebo regionálního medu může mít také výrazný ekonomický efekt pro včelaře. Druhové medy v ČR se prodávají za cenu vyšší, a to v rozmezí od 4–12 %. To má za následek zlepšení ekonomické situace chovu včel. Při průměrné produkci medu za posledních 10 let (8482 tun), přidaná hodnota představuje při průměrné ceně medu 192 Kč/kg teoretické navýšení příjmů včelařů až o 65-195 milionu Kč. S ohledem na charakter krajiny lze očekávat menší počet druhových nebo regionálních medů, než je celková produkce. Při odhadované produkci 10 % regionálních nebo druhových medů může mít prodej vyšetřeného medu ekonomický přínos pro včelaře 780 tisíc až 2,34 milionu korun při cca 12% navýšení ceny těchto medů.

VI. Seznam použité související literatury.

BECKH, G a G CAMPS, 2009. Neue Spezifikationen für Trachthonige. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* [online]. **105**(2), 105–110 [vid. 2021-04-30]. Dostupné z: http://www.tentamus.com/qsi-de/wp-content/uploads/sites/11/2018/01/30_DLR-2009-105-2-Sortenspezifikationen.pdf

BRYANT, Vaughn M. a Gretchen D. JONES, 2001. The r-values of honey: Pollen coefficients. *Palynology* [online]. **25**(1), 11–28 [vid. 2021-06-03]. ISSN 01916122. Dostupné z: [doi:10.1080/01916122.2001.9989554](https://doi.org/10.1080/01916122.2001.9989554)

EL-LABBAN, Mohammad, 2020. *Beekeepers' Guide For Pollen Identification Of Honey*. Lebanon: Mohammad El-Labban. ISBN 978-9953-0-5184-0.

FÆSTE, C. K., L. HOLDEN, C. PLASSEN a B. ALMLI, 2006. Sensitive time-resolved fluoroimmunoassay for the detection of hazelnut (*Corylus avellana*) protein traces in food matrices. *Journal of Immunological Methods* [online]. **314**(1–2), 114–122. ISSN 00221759. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jim.2006.06.006](https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.06.006)

HOLT, K. A. a K. D. BENNETT, 2014. Principles and methods for automated palynology. *New Phytologist* [online]. **203**(3), 735–742. ISSN 0028646X. Dostupné z: [doi:10.1111/nph.12848](https://doi.org/10.1111/nph.12848)

JAVŮRKOVÁ, Zdeňka, Matej POSPIECH, Simona LJASOVKÁ, Pavel HRABEC a Bohuslava TREMLOVÁ, 2021. Numerical Methods And Image Processing Techniques for Melissopalynological Honey Analysis. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences* [online]. **15**, 58–65. ISSN 13370960. Dostupné z: [doi:10.5219/1517](https://doi.org/10.5219/1517)

JONES, Gretchen D a Vaughn M BRYANT, 2001. Jones & Bryant (2001) Is one drop enough for honey analyses IS ONE DROP ENOUGH?!. In: *PROCEEDINGS OF THE IX INTERNATIONAL PALYNOLOGICAL CONGRESS, HOUSTON, TEXAS, U.S.A., 1996*. s. 483–487. ISBN 0931871069.

LOUVEAUX, J, Anna MAURIZIO a G VORWOHL, 1970. Methods of Melissopalynology. *Bee World* [online]. **51**(3), 125–138. ISSN 0005-772X. Dostupné z: [doi:10.1080/0005772x.1970.11097312](https://doi.org/10.1080/0005772x.1970.11097312)

LOW, Nicholas H, Charles SCHWEGER a Peter SPORNS, 1989. Precautions in the use of melissopalynology. *Journal of Apicultural Research* [online]. **28**(1), 50–54 [vid. 2021-06-11]. ISSN 20786913. Dostupné z: [doi:10.1080/00218839.1989.11100820](https://doi.org/10.1080/00218839.1989.11100820)

LUTIER, Pascale M. a Bernard E VAISSIÈRE, 1993. An improved method for pollen analysis of honey. *Review of Palaeobotany and Palynology* [online]. **78**(1–2), 129–144 [vid. 2021-06-11]. ISSN 00346667. Dostupné z: [doi:10.1016/0034-6667\(93\)90019-Q](https://doi.org/10.1016/0034-6667(93)90019-Q)

NEŠOVIĆ, Milica, Uroš GAŠIĆ, Tomislav TOSTI, Nikola HORVACKI, Branko ŠIKOPARIJA, Nebojša NEDIĆ, Stevan BLAGOJEVIĆ, Ljubiša IGNJATOVIĆ a Živoslav TEŠIĆ, 2020. Polyphenol profile of buckwheat honey, nectar and pollen. *Royal Society Open Science* [online]. **7**(12), 201576 [vid. 2021-06-03]. Dostupné z: [doi:10.1098/rsos.201576](https://doi.org/10.1098/rsos.201576)

PERSANO ODDO, Livia, Lucia PIANA, Stefan BOGDANOV, Antonio BENTABOL, Panagiota GOTSIOU, Jacob KERKVLIT, Peter MARTIN, Monique MORLOT, Alberto ORTIZ VALBUENA, Kaspar RUOFF a Katharine VON DER OHE, 2004. Botanical species giving unifloral honey in Europe. *Apidologie* [online]. **35**(Suppl. 1), S82–S93. ISSN 0044-8435. Dostupné z: [doi:10.1051/apido:2004045](https://doi.org/10.1051/apido:2004045)

PERSANO ODDO, Livia a Roberto PIRO, 2004. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie* [online]. **35**(Suppl. 1), S38–S81. ISSN 0044-8435. Dostupné z: [doi:10.1051/apido:2004049](https://doi.org/10.1051/apido:2004049)

PFISTER, Rudolf, 1895. Den Versuch einer Mikroskopie des Honigs. *Zeitschrift für Analytische Chemie* [online]. **34**(1), 479. ISSN 16182642. Dostupné z: [doi:10.1007/BF01595875](https://doi.org/10.1007/BF01595875)

POSPIECH, Matej, Zdeňka JAVŮRKOVÁ, Pavel HRABEC, Helena ČÍŽKOVÁ, Dalibor TITĚRA, Pavel ŠTARHA, Simona LJASOVSKÁ, Vojtěch KRUŽÍK, Tereza PODSKALSKÁ, Josef BEDNÁŘ, Pavla Kundriková BUREŠOVÁ a Bohuslava TREMLOVÁ, 2021. Physico-Chemical and Melissopalynological Characterization of Czech Honey. *Applied Sciences* [online]. **11**(11), 4989 [vid. 2021-06-11]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: [doi:10.3390/app11114989](https://doi.org/10.3390/app11114989)

POSPIECH, Matej, Simona LJASOVSKÁ, Dalibor TITĚRA, Vojtěch KRUŽÍK, Zdeňka JAVURKOVÁ a Bohuslava TREMLOVÁ, 2020. Pollen Diversity in Honey of the Czech Republic in the 2019 Season. *Potravinarstvo Slovak*

Pospiech M. a kol. (2021): Metodika semiautomatického stanovení pylového profilu – melissopalynologická analýza medu

Journal of Food Sciences [online]. **14**, 1115–1123. ISSN 13370960. Dostupné z: doi:10.5219/1504

STACHERZAK, Agnieszka, Ladislav HÁJEK a Maria HEŁDAK, 2019. Changes in the use of agricultural land in Poland and Czech Republic. *Journal of Ecological Engineering* [online]. **20**(7), 211–221 [vid. 2021-04-13]. ISSN 22998993. Dostupné z: doi:10.12911/22998993/109869

TODD, Frank E. a Geo. H. VANSELL, 1942. Pollen Grains in Nectar and Honey¹. *Journal of Economic Entomology* [online]. **35**(5), 728–731 [vid. 2021-06-11]. ISSN 0022-0493. Dostupné z: doi:10.1093/jee/35.5.728

VON DER OHE, Katharine a Werner VON DER OHE, 2007. *Celle's melissopalynological collection*. 3. edition. Celle: LAVES - institut fur Bienenkunde Celle.

VON DER OHE, Werner, Livia PERSANO ODDO, Maria Lucia PIANA, Monique MORLOT a Peter MARTIN, 2004. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie* [online]. **35**(Suppl. 1), S18–S25. ISSN 0044-8435. Dostupné z: doi:10.1051/apido:2004050

ZEMĚDĚLSTVÍ, Ministerstvo, 2003. 76/2003 Sb. Vyhláška, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi... *Vyhláška* [online] [vid. 2021-05-30]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-76>

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

JAVŮRKOVÁ, Zdeňka, Matej POSPIECH, Simona LJASOVKÁ, Pavel HRABEC a Bohuslava TREMLOVÁ, 2021. Numerical Methods And Image Processing Techniques for Melissopalynological Honey Analysis. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences* [online]. **15**, 58–65. ISSN 13370960. Dostupné z: doi:10.5219/1517

POSPIECH, Matej, Zdeňka JAVŮRKOVÁ, Pavel HRABEC, Helena ČÍŽKOVÁ, Dalibor TITĚRA, Pavel ŠTARHA, Simona LJASOVSKÁ, Vojtěch KRUŽÍK, Tereza PODSKALSKÁ, Josef BEDNÁŘ, Pavla Kundříková BUREŠOVÁ a Bohuslava TREMLOVÁ, 2021. Physico-Chemical and Melissopalynological Characterization of Czech Honey. *Applied Sciences* [online]. **11**(11), 4989 [vid. 2021-06-11]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app11114989

POSPIECH, Matej, Simona LJASOVSKÁ, Dalibor TITĚRA, Vojtěch KRUŽÍK, Zdeňka JAVURKOVÁ a Bohuslava TREMLOVÁ, 2020. Pollen Diversity in Honey of the Czech Republic in the 2019 Season. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences* [online]. **14**, 1115–1123. ISSN 13370960. Dostupné z: doi:10.5219/1504

VIII. Jména oponentů

Oponenti metodiky byli:

Ing. Helena Čurdová

oddělení chemie, Státní veterinární ústav Jihlava, Rantířovská 93/20, Horní Kosov, 58601 Jihlava

Ing. Martin Kubík

vedoucí odboru zkušební laboratoře, Inspektorát SZPI v Praze, Za Opravnou 300/6, 150 00 Praha 5

IX. Dedikace:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu MZe NAZV QK1920344 s názvem: „Ověření autenticity medu pomocí analýzy pylových zrn“