

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

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 Trněra, DrSc.

Brno, 30.7. 2021

kontakt: mpospiech@vfu.cz

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

1. Cíl metodiky

V České republice není doposud sledována 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 jedinou 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.

ISBN: 978-80-7305-858-6

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

II. Vlastní popis metodiky.

II.a. Úvod

Pylová analýza medu (melissopalynologie) je jedním s používaných nástrojů pro určování kvality medu. Spolu s fyzikálními chemickými parametry a senzorními analýzami, 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 ovlivněna, 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; Faeste et al. 2006; Low et al. 1989; Pfister 1895; Todd a Vansell 1942; Jones a Bryant 2001; Lutier a Valsière 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 automatizovány za pomoci motorizovaného snímání náhodných zorných polí ve vzorku a vytvořením super ostrého obrazu. Automatizaci je zabezpečěn náhodný výběr pylových zrn z celé populace pylu ve vzorcích a zároveň ostroste ve všech optických úrovních.

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

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 ztekučení a následně med promíchat otáčením vzorkovnice minimálně deset krát. Zkrystalizované vzorky, které se neztekutí 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 rozpouštění vzorku.
- Pro úplné rozpouštění vzorky promícháme ve vortexu po dobu 30 vteřin při 2000 RPM.
- Poté vzorek zfiltrujeme přes filtrační aparaturu. Pro filtraci použijeme mikrofiltr s velikostí pórů 3µm, ϕ 25mm nebo 5µm, ϕ 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 vloženu čistým filtračním papírem, zakryjeme a necháme vyschnout na topné plotně (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 vychozího 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 materiály:

- destilovaná/demineralizovaná voda
- solakryl BMX
- běžný lak na nehty (s alkoholovým nebo xyleneovým základem)
- 50 ml centrifugační zkumavky
- skleněná tyčinka
- mikrofiltr s velikostí pórů 3 a 5 µm, ϕ 25 mm (Millipore)
- pinzeta
- petriho miska
- filtrační papír
- podložní a krycí mikroskopická skla

Přístroje:

- termostát, 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 plotněnka, 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 µm.

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

II.c. Snímaní vzorků

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

Nastavení kamery pro snímání

- nastavíme expozici 250 μs,
- 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 dílny kondenzoru a intenzity světla,
- zvolíme používaný objektiv 10x, 20x nebo 40x podle preferenci 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 zorném poli P_1, \dots, P_{10} ,
- spočítáme 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 ,

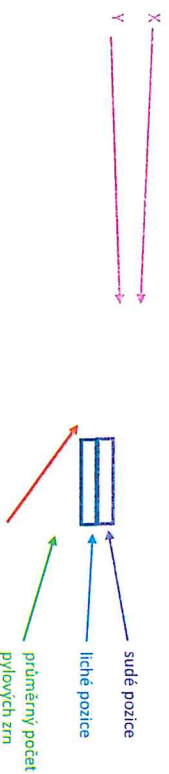
$$n = \frac{N}{\bar{P}}$$

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**“ (Koeficient vyplnění) estimate [%] upravíme parametr „**Fill coefficient**“ [%], číslo upravíme zaokrouhlením na celé číslo 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 vygenerujeme počet zorných polí pro duplikát.



Obrázek 1: Nastavení generování náhodných pozic

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

Snímaní mikroskopického preparátu.

- otevřeme si program pro snímání mikroskopických preparátů a nahrajeme souřadnice získané z programem „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 zrn) pro každý snímek (ostření je vhodné provádět v 10 krocích v rozsahu 100 μm na základě parametru pro světlo 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 stůlek, 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 daný vzorek medu,
- nastavíme velikost použitého filtru v milimetrech (např. ϕ 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 $N = \sum_{k=1}^k N_k^i + \sum_{l=1}^l N_l^p$, kde N_k^i jsou počty pylových zrn jednotlivých nektarodárných taxonů, N_l^p jsou počty pylových zrn pylodárných taxonů, k je počet taxonů nektarodárných a l je počet taxonů pylodárných. Pro procentuální zastoupení jednotlivých taxonů platí $\frac{N_k^i}{N} \cdot 100\%$, resp. $\frac{N_l^p}{N} \cdot 100\%$. Jestliže určíme celkový počet pylových zrn nektarodárných $N^i = \sum_{k=1}^k N_k^i$ a pylodárných taxonů $N^p = \sum_{l=1}^l N_l^p$, můžeme určit i jejich procentuální zastoupení $\frac{N^i}{N} \cdot 100\%$, resp. $\frac{N^p}{N} \cdot 100\%$,
- vystřídáme vzorky také pro duplikátní vzorek,
- po dokončení určení 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.*
	<i>Achillea</i> sp.
Asteraceae	<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.*
Pinaceae	<i>Picea</i> sp.*
	<i>Pinus</i> sp.*
Rhamnaceae	<i>Rhamnus</i> sp.
Rosaceae	<i>Pyrus/Prunus</i> sp.
	<i>Malus</i> sp.
	<i>Rubus</i> sp.
Salicaceae	<i>Salix</i> sp.
	<i>Robinia pseudoacacia</i>
Fabaceae	<i>Trifolium</i> sp.
	<i>Vicia</i> sp.*
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 předělsých měření. Přidáním nového botanického taxonu (ctrl-shift+klávese tlačítka myši) si laboratoř vytvoří vlastní databázi botanických taxonů obsahující následně zvoleného pylového zrna a jeho velikost.

Protokol melissopalynologické analýzy
Melissopalynologická analýza

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%
Dominantní pyl		0,00		0,00		0,00	
Celkem		0,00	0,00	0,00	0,00		

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%
Subdominantní pyl		Relativní zastoupení 16-35%					
1	<i>Tilia</i> sp.	119,00	39,27	39,27	± 5,41	± 7,23	
2	<i>Trifolium</i> sp.	92,00	30,36	30,36	± 5,18	± 6,80	
Celkem		211,00	69,64	69,64			

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%
Vzrostlé pyl		Relativní zastoupení 8-12%					
1	<i>Myosotis</i> sp.	34,00	34,00	11,22	± 3,55	± 4,67	
2	<i>Phacelia tanacetifolia</i>	13,00	4,29	4,29	± 2,28	± 3,00	
3	<i>Quercus</i> sp.	12,00	3,96	3,96	± 2,20	± 2,89	
Celkem		59,00	34,00	19,47	± 1,22		

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%
Mínorité pyl		Relativní zastoupení 1-3%					
1	<i>Aplicatae</i>	4,00	4,00	1,32	± 1,29	± 1,69	
2	NEZNAME2	4,00	1,32	1,32	± 1,29	± 1,69	
Celkem		8,00	4,80	2,94	± 1,32		

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

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

č.	Pylový taxon	Absolútni obsah		Relatívni obsah		Intervalový odhad	
		pylová zrna [n]	pylová zrna mikroskopických taxonů [n]	pylová zrna [%]	pylová zrna mikroskopických taxonů [%]	95%	99%
Prírodný pyl							
1	Achillea sp.	1,00		0,33		± 0,65	± 0,86
2	Bellis sp.	1,00		0,33		± 0,65	± 0,86
3	Betula sp.	1,00		0,33		± 0,65	± 0,86
4	Brassica sp.	1,00		0,33		± 0,65	± 0,86
5	Echium sp.	3,00		0,99		± 1,11	± 1,47
6	Lolus sp.	3,00		0,99		± 1,11	± 1,47
7	NEZNÁME	3,00		0,99		± 1,11	± 1,47
8	Echium sp.	3,00		0,99		± 1,11	± 1,47
9	Pollen?	3,00		0,99		± 1,11	± 1,47
10	Corylus sp.	1,00		0,33		± 0,65	± 0,86
11	Rubus sp.	2,00		0,66		± 0,91	± 1,20
12	Taraxacum sp.	1,00		0,33		± 0,65	± 0,86
13	Thymus sp.	1,00		0,33		± 0,65	± 0,86
14	Vicia sp.	1,00		0,33		± 0,65	± 0,86
Súčet		24,00	16,00	8,33			
prírodný pyl						5,28	

prírodnosť pylu táto skupina je považovaná za „nižšiu“ v populácii vzorku

Parametry melissopalynologické analýzy

	Počet vyšetrených zorných polí [n]	Průměrný počet pylu na zorné pole	Velikost použitého filtru [mm ²]	Pozitívna navážka [g]	Celkový obsah pylových zrn na vzorek (PSN)
Hodnota	49	6,18	430,87	6,00	11,1 · 10 ³

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

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

II.e. Hodnocení výsledku vyšetření

Výsledkem melissopalynologické analýzy je pylový profil medu. Tato informace vypovídá o botanickém původu nektaru, z kterého byl med včelami využit. Jednotlivé botanické druhy však mají rozdílnou pylodárnost a nektarodárnost. Obsah pylu v medu se proto liší dle zdroje snůžky (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 kakaos cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony (Ministerstvo Zemědělství 2003).

Pro splnění mikroskopické charakteristiky musí u jednodruhových medů vzorek splňovat minimální obsah pylových zrn podle tabulky č. 2. Pokud botanický druh v tabulce není uveden, posuzuje se podle nejnovějších vědeckých poznatků. 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.

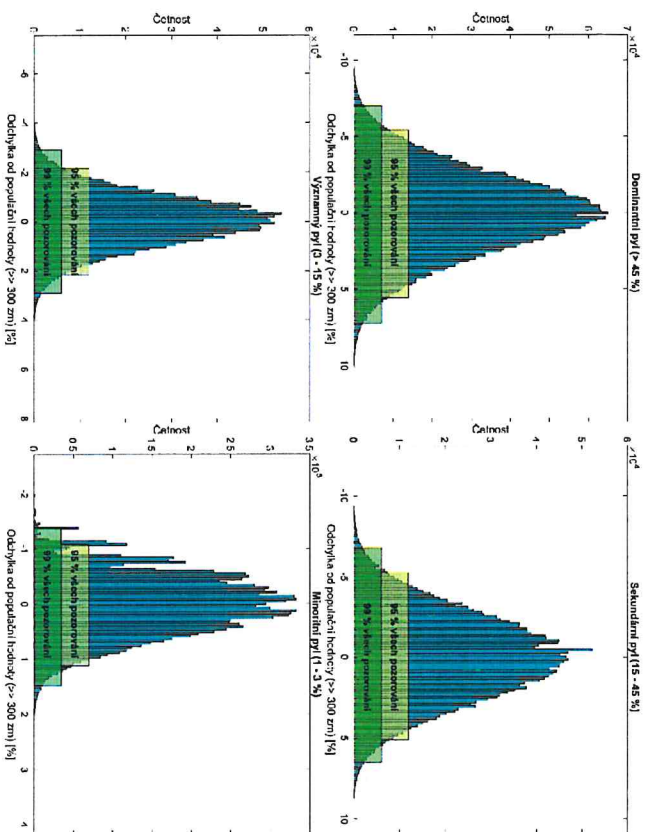
Tabulka č. 2: Pylové zastoupení specifického pylu u významných jednodruhových medů.

Označení pro jednodruhový med	Hlavní botanický taxon	Minimální rozmezí specifického pylu [%]
Řepkový	<i>Brassica napus</i>	60-80
Lipový	<i>Tilia</i> sp.	10-20
Akáčový	<i>Robinia pseudoacacia</i>	10-20
Slunečnicový	<i>Helianthus</i> sp.	30-50
Medovicový	-	
Jeteleový	<i>Trifolium</i> sp.	35-70
Svazenkový	<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; Našović 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 (nekončící) n. Černá přímka je hodnota, které musí být dosaženo ve vyšetřovaném souboru s reálným n, aby mohla být s příslušnou pravděpodobností vyvolána shoda s požadavkem pro příslušný druhový med.

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



Graf 2: Příjmutné odchylky od skupin pylových taxonů.

Z histogramů je zřejmé, 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).

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

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 superostřího 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 (Janůvková et al., 2021). Nastavení jednotlivých světelných podmínek také umožňuje využít barvu pylových zrn jako další znak pro klasifikaci pylových zrn.

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

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.

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

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

VI. Seznam použité související literatury.

- BECKH, G a G CAMPS, 2009. Neue Spezifikationen für Trachttonnage. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* [online]. 105(2), 105–110 [vid. 2021-04-30]. Dostupné z: http://www.teniamus.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. *Polynology* [online]. 25(1), 11–28 [vid. 2021-06-03]. ISSN 01916122. Dostupné z: doi: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.
- FÄSTE, C. K., L. HOLDEN, C. PLASSEN a B. ALMLI, 2006. Sensitive time-resolved fluorimmunoassay 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
- 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
- JAVŮRKOVÁ, Zdenka, Matej POSPIECH, Simona LASOVSKÁ, Pavel HRABEC a Bohuslava TREMLOVÁ, 2021. Numerical Methods And Image Processing Techniques For Melissopalynological Honey Analysis. *Potravinářstvo Slovač Journal of Food Sciences* [online]. 15, 58–65. ISSN 13370960. Dostupné z: doi: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 09331871069.
- 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
- LOW, Nicholas H, Charles SCHWEGER a Peter SPORNIS, 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
- 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
- NĚŠOVIČ, Milica, Uroš GAŠIĆ, Tomislav TOSTI, Nikola HORVACKI, Branko ŠIKOPARIJA, Nebojša NEDIĆ, Stevan BLAGOJEVIĆ, Ljubiša IGNIATOVIĆ 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
- PERSANO ODDO, Livia, Lucia PIANA, Stefan BOGDANOV, Antonio BENTABOL, Panagiota GOTSIOU, Jacob KERKVIET, Peter MARTIN, Monique MORLOT, Alberto ORTIZ VALBUENA, Kasper RUDOLF 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
- PERSANO ODDO, Livia a Roberto PIRLO, 2004. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie* [online]. 35(Suppl. 1), S38–S81. ISSN 0044-8435. Dostupné z: doi: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
- POSPIECH, Matej, Zdenka JAVŮRKOVÁ, Pavel HRABEC, Helena ČIŽKOVÁ, Dalibor TITĚRA, Pavel ŠTARHA, Simona LASOVSKÁ, Vojtěch KRUŽÍK, Tereza PODSKAĀSKÁ, Josef BEDNÁŘ, Pavla Kundrčková 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 LASOVSKÁ, Dalibor TITĚRA, Vojtěch KRUŽÍK, Zdenka JAVŮRKOVÁ a Bohuslava TREMLOVÁ, 2020. Pollen Diversity in Honey of the Czech Republic in the 2019 Season. *Potravinářstvo Slovač*

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:10.5219/15104
- STACHERZAK, Agnieszka, Ladislaw HÁLEK a Maria HELDAK, 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. VANSEL, 1942. Pollen Grains in Nectar and Honey. *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. *Cell's melissopalynological collection*. 3. edition. Celle: LAVES - Institut für 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.zakonyprolid.cz/cs/2003-76>

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

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

JAVŮRKOVÁ, Zdeňka, Matej POSPIECH, Simona LJASOVKÁ, Pavel HRABEC a Bohuslava TREMLLOVÁ, 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 Kundrliková BUREŠOVÁ a Bohuslava TREMLLOVÁ, 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 JAVŮRKOVÁ a Bohuslava TREMLLOVÁ, 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

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

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“