

**COMMISSION INTERNATIONALE DE BOTANIQUE APICOLE
DE L'U. I. S. B.
LES MÉTHODES DE LA MÉLISSO-PALYNOLOGIE**

J. LOUVEAUX, Anna MAURIZIO et G. VORWOHL

Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes sociaux, 91 - Bures-sur-Yvette (France)
Institut national de la Recherche agronomique
3097 Liebefeld, Rosenweg 9 (Schweiz)
Landesanstalt für Bienenkunde, 7 Stuttgart-Hohenheim (Bundesrepublik Deutschland)

INTRODUCTION

Depuis les travaux fondamentaux de ZANDER (1935, 1937, 1941, 1949, 1951), un grand nombre d'examen microscopiques de miels ont été faits dans beaucoup de pays, européens ou non. L'expérience ainsi acquise rend souhaitable de donner une nouvelle version des « Méthodes d'analyse pollinique des miels » publiées par la Commission internationale de botanique apicole de l'U.I.S.B. (1962-1963). L'origine du présent document se situe dans la discussion qui eut lieu à propos de l'interprétation des résultats et de la terminologie de l'examen microscopique des miels au cours d'une séance de travail consacrée à la détermination de l'origine des miels, à Stuttgart-Hohenheim (VORWOHL, 1968 b).

La forme adoptée pour la présentation des « Méthodes de la méliisso-palynologie » est celle préconisée dans le document « Standard layout for a standard method of food analysis » présenté par la Grande-Bretagne au « Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling » dans le cadre du Joint F.A.O./W.H.O. Food Standard Program. (Codex Analys. 68/8, June 1968).

1. — BUT DES EXAMENS MICROSCOPIQUES

L'examen microscopique du miel donne des informations ;

- 1.1. — sur son origine géographique et
- 1.2. — sur son origine botanique,

Il permet par ailleurs de faire des constatations :

1.3. — sur l'éventuelle souillure du miel par des fragments de couvain, des poussières, de la suie, etc.

1.4. — sur la quantité de levures présentes (fermentation) et

1.5. — sur la présence éventuelle de particules insolubles dans l'eau qui ne se trouvent normalement pas dans le miel.

2. — DOMAINE D'APPLICATION

2.1. — La détermination de l'origine *géographique* peut être tentée sur tous les miels à l'exception de ceux dont le pollen a été éliminé totalement par filtration, bien entendu.

2.2. — La détermination de l'origine *botanique* suppose que le miel a été extrait par centrifugation. Le spectre pollinique des miels de presse, des miels de Bruyère (*Calluna*) extraits avec l'aide d'un appareil à pointes et des miels filtrés sur kieselgur ou autres substances analogues, se trouve modifié par un enrichissement ou un appauvrissement secondaires. Dans ces différents cas les conditions indispensables pour une détermination correcte de l'origine botanique ne sont plus remplies.

Le cas échéant il conviendra d'examiner par une mesure de la teneur en sédiment et par une détermination de la teneur absolue en éléments végétaux (pollens, indicateurs de miellat) si l'on se trouve bien en présence d'un miel d'extracteur normal (voir 4).

3. — EXAMEN MICROSCOPIQUE QUALITATIF

3.1. — Principe

Enrichissement par centrifugation du miel en solution aqueuse en ses éléments microscopiques figurés.

Examen sous le microscope du sédiment monté entre lame et lamelle dans la glycérine-gélatine et exploitation des informations ainsi obtenues.

3.2. — Réactifs

Glycérine-gélatine selon KAISER.

3.3. — Appareillage

Centrifugeuse de laboratoire tournant à 2 500/3 000 tr/mn; accélération centrifuge relative : environ 1 350 g.

Tubes à centrifugation à fond conique, capacité environ 100, 50 et 10 ml.

Microscope. Grossissements 320-450 et 800-1 000 fois.

3.4. — Échantillons

3.41. — L'échantillon dit « de laboratoire » devrait être de 100 à 200 g de miel.

3.42. — L'échantillon test est obtenu à partir de l'échantillon de laboratoire par

un brassage convenable. Lorsque le miel est trop fermement cristallisé on le ramollit par un léger réchauffage.

Les miels fortement souillés sont liquéfiés à 40 °C et passés à travers une fine toile.

Les morceaux de rayons de miel sont désoperculés avec précaution. On les place ensuite devant une source lumineuse puissante pour détecter par transparence les cellules contenant des réserves de pollen. Au moyen d'une pipette reliée à une pompe aspirante on extrait le miel des cellules qui sont exemptes de réserves de pollen.

3.5. — *Mode opératoire*

3.51. — *Confection des préparations.*

10 g de miel (pesés exactement à 0,1 g près) sont dissous dans 20 ml d'eau chaude (ne pas dépasser 40 °C). La solution obtenue est centrifugée pendant cinq minutes et le liquide restant est séparé du sédiment; le liquide peut être versé ou aspiré. Pour une meilleure élimination des sucres du miel il est recommandé de reprendre le dépôt par 10 ml d'eau distillée, de le transvaser dans un tube à centrifugation plus petit et de centrifuger à nouveau pendant cinq minutes. On porte le dépôt (au moyen d'une anse de platine ou d'une fine baguette de verre), autant que possible de façon quantitative, sur une lame porte-objet et on le répartit sur une surface d'environ 20 × 20 mm. Après séchage (plus avantageusement à la chaleur mais sans excéder 40 °C) on l'inclut dans la glycérine-gélatine et on recouvre d'une lamelle. La glycérine-gélatine est préalablement liquéfiée au bain-marie à 40 °C.

Si on le désire, on peut utiliser de la glycérine-gélatine colorée (voir 5.2).

Pour le prélèvement du culot dans le tube à centrifugation on peut recommander également l'utilisation de pipettes Pasteur. L'extrémité capillaire de la pipette est fermée à la flamme et elle peut servir pour agiter le culot au fond du tube. Après avoir coupé l'extrémité de la pipette on aspire la suspension de sédiment et on la refoule sur la lame porte-objet. Il convient de manipuler la pipette avec précaution pour éviter la présence d'éclats de verre dans la préparation. La fraction du sédiment qui reste au fond du tube à centrifuger peut être reprise au moyen d'une goutte d'eau. On jette ensuite la pipette. Ce procédé garantit une récupération complète du sédiment. Du fait que la pipette ne sert qu'une seule fois on est certain de ne transporter sur la lame porte-objet aucune impureté et, en particulier, aucun pollen pouvant provenir d'un autre miel.

La quantité standard de miel utilisée est généralement de 10 g (voir également VERGERON, 1964). Pour les miels riches en sédiment on a intérêt à répartir le culot sous deux lamelles.

L'examen microscopique des miels riches en colloïdes se trouve facilité lorsqu'on utilise au lieu d'eau une solution étendue d'acide sulfurique pour dissoudre le miel (5 g H₂SO₄ concentré pour 1 litre d'eau). Dans ce milieu très acide les colloïdes sont en grande partie dissous et restent par conséquent à la centrifugation dans la fraction liquide. L'acide doit être soigneusement éliminé par un double lavage du sédiment. On opère ensuite comme décrit plus haut.

Une autre méthode pour l'élimination de la plus grande partie des colloïdes ainsi que des petites particules insolubles qui gênent l'observation des grains de

pollen est la filtration du sédiment mis en suspension dans l'eau sur un filtre Millipore de porosité 3 ou 5 μ . Le pollen reste sur le filtre. Pour monter le pollen on lave le filtre et on inclut le sédiment comme décrit plus haut. On trouvera les détails concernant la technique de filtration Millipore en 4.25.

3.52. — *Conduite de l'examen microscopique.*

La détermination de l'origine géographique et de l'origine botanique repose sur l'identification des pollens et des autres constituants du sédiment d'un miel ainsi que sur leur dénombrement. L'identification se fait avec l'aide des données tirées des publications spécialisées et au moyen de préparations de comparaison (voir 5).

3.521. — L'analyse peut être « sommaire » ou « complète ». Dans le premier cas on se contente de l'identification des éléments les plus fréquents du sédiment du miel et de la recherche de ceux qui sont caractéristiques et, de ce fait, susceptibles d'apporter une réponse à la question posée.

3.522. — L'analyse complète comprend la détermination de tous les pollens présents dans le sédiment ainsi que des autres constituants dans la mesure où l'état actuel des connaissances le permet. En ce qui concerne le dénombrement des constituants du sédiment on distingue :

3.523. — L'estimation qui peut être avantageusement entreprise en traitant 100 grains de pollen. D'autre part on compte les indicateurs de miellat qui correspondent à 100 grains de pollen.

3.524. — La détermination des classes de fréquence :

Elle repose sur le traitement de 200 à 300 grains de pollen et des indicateurs de miellat correspondants. Pour les spectres polliniques pauvres en espèces 200 grains de pollen suffisent ; pour ceux qui sont riches en espèces il est nécessaire de traiter 300 grains.

3.525. — Calcul des pourcentages : les indications de fréquence en pourcentages ne sont acceptables dans la formulation des résultats que lorsque les numérations ont été faites sur 1 200 grains de pollen au moins et, de préférence, sur deux préparations provenant de deux opérations distinctes.

3.526. — Pour les miels de miellat qui sont pauvres en pollen il suffit, selon le degré de précision de l'exploitation des numérations, d'utiliser 50, 100, 150 ou 600 grains de pollen.

3.527. — Les pollens de plantes anémophiles ou de plantes dépourvues de nectaires sont notés à part. Parmi les plantes anémophiles les plus importantes pour notre objet on notera :

Les Graminées (sauvages, céréales, maïs), les Cypéracées (*Carex*), *Rumex* spp. (oseille), *Cannabis* (chanvre) et les différents *Quercus* (chêne). Les pollens de Conifères (*Abies*, *Pinus*, *Picea*, *Taxus*, *Juniperus*, *Larix*, etc.), *Betula* (bouleau), *Fagus* (hêtre), *Carpinus* (charme), *Populus* (peuplier), *Alnus* (aune) et *Corylus* (noisetier) ne jouent pas un bien grand rôle dans les miels, pas plus que les pollens d'*Urtica* (ortie), *Typha* (massette) ou de Juncacées (joncs).

Les plantes suivantes sont connues comme étant sans nectaires mais plus ou moins entomophiles : *Papaver* spp. (pavot), *Plantago* spp. (plantain), *Thalictrum* spp. (pigamon), Chénopodiacées (chénopode), *Ambrosia* spp. (en anglais Ragweed),

Artemisia spp. (armoise). Plus douteuses sont les Cistacées et les *Filipendula* spp. qui ne fournissent certainement pas de grosses quantités de nectar.

3.528. — Les grains de pollen abortifs et malformés sont comptés, dans la mesure où il est possible de les identifier.

3.529. — On considère comme indicateurs de miellat : les hyphes et les spores de Champignons, et tout particulièrement de Fumagines, les Algues et les sécrétions cireuses provenant de certains producteurs de miellat. Les hyphes ainsi que les algues pluri-cellulaires et les complexes de spores sont comptés pour une unité. Il est recommandé de noter et de compter séparément les fragments de champignons, les algues et les sécrétions cireuses.

3.5291. — Les éléments provenant de champignons pathogènes, par exemple les spores de rouilles et de caries ainsi que celles d'oïdium (Urédinacées, Ustilaginacées, Péronosporacées, MAURIZIO, 1959) doivent, lorsqu'ils apparaissent en quantités importantes, être notés à part des indicateurs de miellat. En effet, ils peuvent être apportés par les abeilles directement avec le nectar. Occasionnellement les abeilles les récoltent et en font des pelotes. Enfin, il existe encore la possibilité qu'ils fassent partie des poussières atmosphériques qui tombent dans le miellat.

3.5292. — Ce qu'on désigne sous le nom, soit de masse finement granuleuse, soit de masse finement cristalline peut, dans de nombreux cas, être considéré comme le signe de la présence de miellat, mais existe également dans quelques miels de fleurs. C'est pourquoi il est préférable d'en faire mention sous la rubrique « autres constituants du sédiment ».

3.6. — Présentation des résultats

3.61. — L'identification des pollens ne peut souvent pas être poussée jusqu'au genre ou à l'espèce. L'emploi des noms scientifiques de genres ou d'espèces devrait donc être limité aux cas où une détermination sûre est possible. Lorsque cette condition n'est pas remplie il convient d'accompagner le nom scientifique d'une mention précisant clairement que celui-ci doit être pris dans un sens large : par exemple *Trifolium repens* s. l. (*sensu lato*) ou « Groupe *Trifolium repens* », (c'est-à-dire pollen qui d'après ses dimensions et sa structure est plus ou moins semblable à celui de *T. repens* mais qui peut également appartenir à une autre espèce, par exemple *T. resupinatum* ou *T. arvense*). Lorsque des connaissances détaillées font défaut ou lorsque pour des impératifs de temps on doit renoncer à une détermination plus fine, le pollen peut être rattaché à un groupement plus important (forme ou type). Par exemple « Forme *Teucrium* », c'est-à-dire pollen de Labiée tricolpé avec un opercule sur les sillons, ou bien « Type *Symphytum* », c'est-à-dire pollen de Borraginacée stéphanocolporé (MAURIZIO et LOUVEAUX, 1967; VORWOHL, 1968).

3.62. — Données concernant les fréquences.

3.621. — Dans l'estimation des fréquences des différents pollens on utilise les termes suivants :

☐ « Très fréquent », pour les formes qui représentent plus de 45 p. 100 sur 100 grains de pollen dénombrés.

« Fréquent », pour les grains de pollen qui ont une fréquence comprise entre 16 et 45 p. 100.

« Rare », pour les grains de pollen qui ont une fréquence comprise entre 3 et 15 p. 100.

« Isolé », pour les grains de pollen qui ont une fréquence inférieure à 3 p. 100.

3.622. — Lorsque les classes de fréquence sont déterminées avec précision, les termes suivants sont applicables :

« Pollen dominant » (plus de 45 p. 100 des pollens dénombrés).

« Pollen d'accompagnement » (16 à 45 p. 100).

« Pollen isolé important » (3 à 15 p. 100).

« Pollen isolé » (moins de 3 p. 100).

3.623. — Lorsqu'on a dénombré au moins 1 200 grains de pollen, on peut exprimer la fréquence en pourcentage. La marge d'erreur pour un dénombrement portant sur 1 200 grains de pollen est de l'ordre de ± 1 p. 100. L'utilisation de décimales n'est donc pas justifiée. Les formes dont la fréquence est égale ou inférieure à 1 p. 100 doivent seulement être signalées comme étant présentes.

3.624. — Dans l'indication de fréquence des indicateurs de miellat (I.M.) (voir 3.529 et 3.5210) il convient d'utiliser les termes suivants :

« Peu » lorsque I.M./P, c'est-à-dire le quotient du nombre des indicateurs de miellat par le nombre des grains de pollen de plantes nectarifères, se situe entre 0 et 1,5.

« Quantité moyenne » quand I.M./P est compris entre 1,5 et 3,0.

« Grande quantité » quand I.M./P est compris entre 3 et 4,5.

« Très grande quantité » quand I.M./P dépasse 4,5.

3.625. — Dans l'indication de fréquence des pollens de plantes anémophiles ou autres plantes dépourvues de nectaires, les termes suivants sont à utiliser :

« Rares » lorsque le nombre des grains de pollen de plantes dépourvues de nectaires (en tout, ou bien de chaque espèce végétale) représente moins de 3 p. 100 des grains de pollen dénombrés en tout.

« Peu fréquents », lorsque le nombre des pollens de plantes dépourvues de nectaires représente de 3 à 15 p. 100 des grains de pollen dénombrés en tout.

« Fréquents » lorsque le nombre des pollens de plantes dépourvues de nectaires représente plus de 45 p. 100 des grains de pollen dénombrés en tout.

« Très fréquents » lorsque le nombre des pollens de plantes dépourvues de nectaires représente plus de 45 p. 100 des grains de pollen dénombrés en tout.

Les pollens de plantes dépourvues de nectaires sont à retrancher du total des pollens dénombrés avant que ne soient calculées les fréquences des pollens de plantes nectarifères.

3.7. — *Interprétation*

3.71. — *Origine géographique.*

Les différentes origines géographiques peuvent, dans quelques cas relativement rares, être reconnues grâce à des formes caractéristiques n'existant que sur un territoire déterminé. Le plus souvent c'est l'apparition de combinaisons de

pollens bien déterminés (types de miel) qui permet la localisation de la région dans laquelle le miel a été produit.

Les détails sur les formes caractéristiques et les combinaisons typiques se trouvent dans la littérature spécialisée. Le spectre pollinique d'un miel est déterminé par les conditions phytogéographiques, agronomiques et forestières du territoire où le miel a été produit. Les frontières politiques et administratives n'exercent pas d'action déterminante sur ces facteurs. C'est pourquoi il n'est possible, dans certains cas, que de désigner la région géographique de production et non le pays (au sens politique du mot) sur la base de l'examen microscopique.

3.72. — *Origine botanique.*

La détermination de l'origine botanique repose sur l'identification des pollens et autres constituants du sédiment et sur la fixation de la fréquence des différents éléments. A partir de la fréquence des différents pollens et des indicateurs de miellat on peut tirer des conclusions concernant la proportion des sources de nectar correspondantes qui sont à l'origine du miel.

En général on peut admettre qu'un miel provient principalement d'une certaine source de nectar lorsque le pollen correspondant est au stade « dominant » dans le sédiment du miel (les pollens de plantes anémophiles et de plantes dépourvues de nectaires n'entrent pas dans le calcul des pourcentages). Cette règle n'est valable que si le miel ne contient qu'une faible proportion d'indicateurs de miellat (moins de un élément pour un pollen de plante nectarifère).

Les miels qui proviennent principalement d'une miellée de miellat contiennent de nombreux indicateurs de miellat. En règle générale on compte pour un grain de pollen, 3 ou plus de 3 indicateurs de miellat. Le pourcentage des pollens de plantes anémophiles est le plus souvent plus élevé que dans les miels de fleurs.

3.721. — *Cas particuliers.* Les pollens de quelques plantes sont sur-représentés dans le miel correspondant c'est-à-dire que le pourcentage des pollens trouvés est plus élevé que le pourcentage réel du nectar. Chez d'autres plantes il se produit un phénomène inverse : le pollen se trouve sous-représenté.

3.7211. — *Pollens sur-représentés.* Le cas extrême de sur-représentation est celui de *Myosotis*. Il est donc recommandé, lorsque le pollen de *Myosotis* est abondant dans le sédiment, de faire, à côté de la numération habituelle, une seconde numération ne faisant pas intervenir ce pollen. Ce procédé rend mieux compte de l'origine botanique réelle que l'estimation ordinaire.

Le pollen de châtaignier (*Castanea sativa*) appartient également à la catégorie des pollens sur-représentés. On peut admettre qu'un miel ne provient en majorité du châtaignier que lorsque le pollen de cette plante apparaît avec une fréquence de 90 p. 100. Pour les spectres polliniques comportant un fort pourcentage de pollen de *Castanea sativa* il est recommandé, comme pour les *Myosotis*, de procéder à une seconde numération en laissant de côté le pollen de châtaignier. En règle générale, les miels qui proviennent d'une plante dont le pollen est sur-représenté montrent une teneur absolue en pollen plus forte que les miels provenant de plantes dont le pollen est normalement représenté ou sous-représenté. Dans les cas douteux il conviendrait donc à côté de l'étude qualitative, de faire une détermination de la teneur absolue en pollen (voir 4).

Parmi les pollens sur-représentés il faut noter encore *Cynoglossum* et *Mimosa pudica*.

3.7212. — *Pollens sous-représentés*. La liste suivante est celle des pollens qui, parmi ceux que l'on considère comme sous-représentés, sont pratiquement les plus importants. Lorsque leur fréquence atteint au moins le pourcentage indiqué on peut considérer que le miel en question provient principalement de la source correspondante :

<i>Lavandula spica</i> × <i>Lavandula latifolia</i> (lavandin).....	10-20 %
<i>Salvia</i> (espèces d'Europe).....	20-30 %
<i>Robinia</i>	30 %
<i>Tilia</i>	20-30 %
<i>Medicago</i>	30 %

Appartiennent également au groupe des pollens sous-représentés *Chamaenerion* (Syn. *Epilobium*), Cucurbitacées et *Rosmarinus* (Romarin).

Les anthères des fleurs de quelques variétés de *Citrus* sont en général stériles. C'est pourquoi il existe des miels de *Citrus* dans lesquels le pollen de *Citrus* n'est représenté qu'avec une fréquence de 10 à 20 p. 100. En principe les miels provenant de plantes mellifères dont le pollen est sous-représenté ont une faible teneur absolue en éléments végétaux. Dans les cas douteux on entreprendra à côté de l'étude qualitative une étude quantitative (voir 4).

3.7213. — On peut encore compter sur des anomalies des coefficients de représentation chez les plantes qui, à côté des nectaires floraux possèdent des nectaires extra-floraux ainsi que chez les plantes dioïques dont le nectar des fleurs femelles est, évidemment, dépourvu de pollen et enfin chez les plantes dont le pollen n'est pas dispersé mais reste en paquets (pollinies) comme, par exemple, chez de nombreuses Orchidacées et Asclépiadacées.

3.7214. — Chez les miels dont le sédiment contient une forte proportion de pollens non identifiables, une détermination de l'origine botanique n'est possible qu'avec réserve étant donné qu'on ne sait rien sur le coefficient de représentation des pollens en question.

■ 3.7215. — Quelques miels monofloraux sont caractérisés par des propriétés chimiques ou physiques dont la prise en considération peut compléter et étayer l'examen microscopique.

Pour les miels de Bruyère (*Calluna*) il existe des procédés simples et faciles à utiliser pour la mise en évidence de la thixotropie et de la teneur relativement élevée en protéines. Les miels de miellat sont, entre autres, caractérisés par une conductibilité électrique relativement élevée.

Chez les miels de Robinier et de Tupelo la teneur élevée en fructose constitue une caractéristique complémentaire.

3.8. — *Reproductibilité*

VERGERON (1964) a entrepris une étude statistique sur la reproductibilité des résultats des numérations. Les conclusions de ce travail ont été prises en considération pour l'établissement des directives concernant le dénombrement des éléments microscopiques d'une préparation donnée (3.52 et 3.62). La reproducti-

bilité des résultats des opérations de dénombrement effectuées parallèlement sur les mêmes miels dans différents laboratoires a été jusqu'ici bonne. Une analyse tournante systématique n'a cependant pas encore été organisée. L'interprétation statistique d'une telle analyse reste d'ailleurs problématique dans la mesure où les résultats des identifications et des numérations sont sous la dépendance de l'expérience que possède l'examineur. Une analyse tournante donne dans ce cas plus de renseignements sur les connaissances de l'examineur que sur les possibilités de la méthode.

4. — EXAMEN MICROSCOPIQUE QUANTITATIF

4.1. — Détermination de la quantité de sédiment dans le miel

4.11. — But de l'examen.

La détermination de la quantité de sédiment n'est pas, à proprement parler, un procédé microscopique mais il convient cependant de l'étudier ici car les résultats de cet examen permettent de savoir si certains procédés d'interprétation microscopique sont utilisables ou non (voir 2.2).

La détermination du volume du sédiment donne :

4.111. — Des informations sur le mode de récolte du miel : pressage, centrifugation, filtration, etc., et

4.112. — Des indications sur d'éventuelles falsifications ou sur la présence en quantités importantes de particules étrangères (salissures, succédanés de pollen, levures, etc.).

4.12. — Domaine d'utilisation.

La détermination du volume du sédiment est applicable à tous les miels.

4.13. — Principe.

Séparation du sédiment du miel par centrifugation de sa solution dans l'eau. Mesure du sédiment dans des tubes à centrifugation calibrés.

4.14. — Appareillage.

Tubes à centrifugation d'environ 100 ml (voir 3.3).

Centrifugeuse (voir 3.3).

Trompe à vide ou autre installation convenable d'aspiration.

Petits tubes à centrifugation d'environ 10 ml de capacité terminés par un tube cylindrique gradué en μl et d'une capacité de 20 μl (tubes dits « de Trommsdorff »).

4.15. — Échantillons (voir 3.4).

4.16. — Mode opératoire.

10 g de miel exactement pesés à 0,01 g près sont dissous dans environ 20 ml d'eau chaude (pas plus de 40 °C). On centrifuge la solution pendant dix minutes, on aspire par le haut avec précaution le liquide superflu de telle sorte que le sédiment reste recouvert par une colonne de liquide de 1 à 2 cm. On agite le sédiment et on transvase de façon quantitative dans un tube à centrifugation gradué de la dimension la plus appropriée et on centrifuge à nouveau pendant dix minutes.

Si l'on constate que la quantité de sédiment est, soit très forte, soit très faible, on peut réduire de moitié ou au contraire doubler la prise d'essai. Il est recommandé d'enfoncer la partie calibrée des tubes à centrifugation dans un morceau de tube de caoutchouc ou dans une enveloppe métallique pour que pendant la centrifugation la charge de la partie supérieure du tube ne porte pas sur la pointe relativement fragile mais sur l'enveloppe.

4.17. — *Interprétation et conclusion.*

On lit sur la partie graduée du tube à centrifugation la quantité de sédiment. Les miels d'extracteur centrifuge contiennent peu de sédiment. Dans la plupart des cas 10 g de miel donnent 1,5 à 3,5 μ l. Un sédiment de plus de 10 μ l prouve qu'on est en présence d'un miel égoutté ou pressé à moins qu'il ne s'agisse d'un enrichissement du sédiment par des corps étrangers au miel (farine, succédanés de pollen, poussières, levures, etc.). Un sédiment très faible indique soit un miel naturellement pauvre en pollen (par exemple miel d'agrumes) soit un miel ayant subi un traitement (filtration sur des matériaux à pores très fins) ou une falsification (par exemple nourrissage au sucre).

4.2. — *Détermination du nombre absolu des constituants figurés végétaux du miel*

4.21. — *But de l'examen.*

Détermination du nombre absolu d'éléments figurés végétaux présents dans l'unité de poids.

4.22. — *Domaine d'utilisation.*

Possible chez tous les miels.

4.23. — *Détermination selon Maurizio.*

4.231. — *Principe de la méthode.* Extraction du sédiment d'une quantité déterminée de miel. Mise en suspension de ce sédiment dans une quantité d'eau mesurée. Étalement d'une quantité connue de la suspension sur une surface délimitée d'une lame porte-objet. Numération des éléments figurés et calcul de leur nombre dans l'unité de poids de miel.

4.232. — *Appareillage.*

Fioles d'Erlenmeyer jaugées de 100 ml.

Tubes à centrifugation de 10 ml de capacité, calibrés.

Tubes à centrifugation de 100 ml (voir 3.3).

Centrifugeuse (voir 3.3).

Pipettes de Breed de 0,01 ml, calibrées.

Lames porte-objet.

Microscope (grossissement \times 300 environ) avec platine à mouvements rectangulaires et avec oculaire à réseau.

4.233. — *Échantillons* (voir 3.4).

4.234. — *Mode opératoire.*

4.2341. — *Confection des préparations.* On pèse dans les fioles jaugées

de 100 ml deux prises d'essai de chacune 50 g de miel parfaitement homogénéisé. On complète à 100 ml avec de l'eau distillée et on laisse dissoudre au bain-marie. Si l'on dispose de peu de miel ou bien s'il s'agit de miels ayant un sédiment important on peut opérer avec deux prises d'essai parallèles de chacune 10 à 30 g. La solution de miel est centrifugée pendant cinq minutes dans des tubes ayant une capacité de 100 ml. Le liquide superflu est vidé avec précaution. Le sédiment est agité avec une anse de platine préalablement flambée et versé dans un tube à centrifugation de 10 ml calibré (on rince plusieurs fois à l'eau distillée pour récupérer la totalité du sédiment). On centrifuge à nouveau pendant cinq minutes; on verse ou on aspire le liquide superflu et on ajuste le volume du sédiment goutte à goutte jusqu'à la graduation choisie. La quantité de liquide est choisie en fonction de la quantité de sédiment de telle sorte qu'on obtienne une bonne séparation des éléments végétaux sur la lame (cf. MAURIZIO 1939, interprétation statistique). L'expérience montre qu'un miel d'extracteur récolté proprement donne une bonne concentration lorsque pour 50 g de miel on ajuste à 0,5 ml. Pour les miels plus riches on recommande une dilution de 1 ml ou plus.

Le sédiment est ensuite remué au moyen d'une anse de platine, repris au moyen d'une pipette de Breed de 0,01 ml et refoulé sur une lame porte-objet sur laquelle se trouve délimitée une surface de 1 cm². Sur chaque lame on dispose deux frottis parallèles provenant du même sédiment, soit 4 au total. On laisse sécher les frottis; il se forme une sorte de glaçage superficiel qui dispense de déposer une lamelle.

4.2342. — *Numération des éléments végétaux*. La numération des éléments végétaux se fait sous le microscope avec un grossissement de $\times 300$ et au moyen d'un oculaire à réseau. Dans chacun des 4 frottis on compte les éléments de 100 champs; on commence vers le milieu du frottis, au bord, et au moyen du charriot on explore la préparation en travers jusqu'à l'autre bord. De cette façon les parties centrales et périphériques du frottis sont également utilisées. Dans chaque champ on compte séparément les grains de pollen, les spores de champignons et les algues et on en dresse la liste.

4.235. — *Appréciation*. La teneur absolue en grains de pollen, spores de champignons et algues est calculée en faisant la moyenne des 400 champs et en rapportant à 1 g ou à 10 g de miel, compte tenu de la quantité de miel contenue dans la prise d'essai, du taux de dilution du sédiment et de la surface d'un champ microscopique.

D'après les expériences effectuées jusqu'ici la teneur absolue en éléments figurés végétaux des miels de fleurs monofloraux pauvres en pollen (par exemple miels de Robinier ou de *Citrus*), se situe en général au-dessous de 20 000 par 10 g, c'est-à-dire dans le groupe I. La plupart des miels de fleurs et des miels de fleurs mélangés de miel de miellat ont une teneur absolue en éléments figurés comprise entre 20 000 et 100 000 (groupe II). Dans le groupe III, avec une teneur comprise entre 100 000 et 500 000 se trouvent les miels de miellat purs et les miels de fleurs riches en pollen (*Myosotis*, *Castanea*). Le groupe IV avec 500 000 à 1 000 000 d'éléments figurés par 10 g de miel contient surtout des miels de fleurs riches en pollen et une partie des miels de presse. Au groupe V avec plus d'un million d'éléments figurés appartiennent seulement encore les miels de presse riches en pollen.

Les résultats des numérations peuvent être présentés, par exemple, sous la forme suivante : « 32/38/0,7-II », c'est-à-dire 32 000 grains de pollen, 38 000 spores de champignons et 700 algues dans 10 g de miel, avec classement dans le groupe II au sein des cinq groupes de teneur absolue en particules végétales. Cette formule montre qu'il s'agit dans le présent cas d'un miel mixte nectar-miellat. Un miel de fleurs pur aurait par exemple pour formule « 28/1/0-II ».

Les chiffres sont donnés pour 10 g de miel parce que cette quantité est la quantité standard pour un examen microscopique. On peut, bien entendu, rapporter aussi bien à 1 g de miel.

4.24. — *Détermination selon Demianowicz.*

4.241. — *Principe* (voir 4.231).

4.242. — *Appareillage* (voir 4.232).

4.243. — *Échantillons* (voir 3.4).

4.244. — *Mode opératoire.*

4.2441. — *Confection des préparations.*

4.24411. — *Miels unifloraux expérimentaux.*

Une goutte de miel non dilué est déposée sur une lamelle couvre-objet préalablement pesée; on effectue une seconde pesée miel compris. La lamelle est retournée et déposée sur une lame porte-objet. La quantité de miel doit être calculée avec suffisamment de précision pour ne pas déborder de la lamelle.

4.24412. — *Miels unifloraux.*

La préparation se fait, pour l'essentiel, comme selon MAURIZIO. DEMIANOWICZ recommande des carrés de 1 cm de côté dessinés à l'encre de Chine sur la lame porte-objet. Les bords dessinés à l'encre de Chine empêchent la solution de couler hors des limites.

4.2442. — *Numération.*

Au lieu d'une numération portant sur 100 champs par frottis on compte les particules sur des bandes parallèles allant d'un bout à l'autre des limites du frottis. Le nombre des bandes est fonction du nombre absolu de particules du miel. Lorsque celui-ci semble devoir être inférieur à 12 000, il convient de prospecter 8 bandes; pour 12 000 à 96 000 éléments on recommande 4 bandes et pour plus de 96 000, seulement 2 bandes. D'après les chiffres obtenus on calcule le nombre des éléments végétaux par centimètre carré et ensuite, compte tenu du poids de la prise d'essai et du facteur de dilution de la solution on obtient le nombre des éléments figurés par unité de poids.

4.245. — *Appréciation* (voir 4.235).

4.25. — *Détermination selon Louveaux.*

4.251. — *Principe de la méthode.* Séparation du sédiment d'une quantité de miel exactement pesée. Mise en suspension du sédiment dans l'eau et filtration sur un filtre de surface connue dont la porosité est assez faible pour que les éléments

à compter soient tous arrêtés. Traitement du filtre à l'huile pour immersion pour le rendre transparent. Numération sous le microscope des éléments restés sur le filtre. Calcul du nombre de particules dans l'unité de poids de miel à partir des dimensions du champ microscopique, du nombre de champs, du nombre d'éléments figurés, de la surface totale du filtre et de la quantité de miel examinée.

4.252. — *Réactifs*. Huile pour immersion Millipore, indice de réfraction 1,515.

4.253. — *Appareillage*.

Tubes à centrifugation de 100 ml (voir 3.3).

Centrifugeuse (voir 3.3).

Trompe à vide ou autre moyen d'aspiration.

Appareil de micro-filtration en pyrex de la Millipore Filter Corporation × 10 025 00, filtre 25 mm de diamètre, blanc, plat, porosité 1 μ environ.

Microscope (voir 3.3).

Lames porte-objet d'au moins 25 mm de large.

4.254. — *Échantillons* (voir 3.4).

4.255. — *Mode opératoire*.

4.2551. — *Confection des préparations*. Une quantité déterminée de miel est pesée exactement à 0,001 g près. On utilise habituellement 10 g. Pour les miels très pauvres en pollen on peut monter à 20 g. Pour les miels très riches on recommande une prise d'essai plus faible, autrement les grains de pollen sont trop nombreux dans chaque champ ce qui rend les numérations plus difficiles. La prise d'essai est dissoute dans environ 20 ml d'eau distillée (de préférence chaude mais pas plus de 40 °C) et centrifugée pendant dix minutes. Le liquide superflu est aspiré par le haut en utilisant le dispositif d'aspiration et on laisse au-dessus du sédiment une couche de liquide de 1 à 2 cm. Le tube à centrifugation est à nouveau rempli d'eau distillée et la suspension est centrifugée une seconde fois. Après avoir aspiré le liquide superflu (comme décrit plus haut) on verse sur le sédiment environ 10 ml d'eau distillée et on porte le tout dans la partie cylindrique du filtre. On établit le vide et le liquide passe au travers du filtre. L'addition d'un détergent accélère le passage. Le tube à centrifugation est rincé plusieurs fois avec de petites quantités d'eau distillée; les eaux de rinçage sont également filtrées. Les parois internes du filtre sont rincées à la pissette avant que le liquide soit entièrement aspiré. Au cours de toutes ces opérations de rinçage on évite de créer de forts remous dans le cylindre de façon à ce que le sédiment se dépose de façon aussi régulière que possible. Lorsque tout le liquide est passé, on retire le filtre de l'appareil et on le sèche. (Il convient de nettoyer très soigneusement le cylindre après usage au moyen d'un bon détergent et d'une brosse. Laisser sécher après rinçage à l'eau distillée, sans essuyer.) On dépose sur une lame porte-objet une goutte d'huile pour immersion; puis on approche le filtre parfaitement sec au contact de l'huile; on dépose par-dessus une nouvelle quantité d'huile et, finalement, une lamelle. L'huile rend le filtre transparent.

4.2552. — *Numération et exploitation des données*. Les constituants figurés végétaux sont dénombrés dans 100 champs sous un grossissement de × 800. Il convient de tenir compte autant que possible aussi

bien de la partie centrale que des bords de la surface circulaire du filtre. Le diamètre de la surface utile du filtre est en général facile à déterminer car les constituants du sédiment la colorent en brun ou en jaune. Le cas échéant on peut, pour déterminer avec précision la surface filtrante faire passer dans l'appareil une suspension d'encre de Chine. Le nombre des éléments figurés dans la quantité de miel examinée est donné par la formule :

$$N = \frac{F \cdot n}{f \cdot a}$$

N = nombre total des éléments figurés contenus dans le miel;
 F = surface utile du filtre en millimètre carré;
 f = surface d'un champ en millimètre carré;
 n = nombre des éléments dénombrés sur l'ensemble des champs examinés;
 a = nombre de champs examinés.

4.2553. — *Appréciation* (voir 4.235).

4.26. — *Reproductibilité.*

Une analyse tournante effectuée par différents laboratoires avec une ou plusieurs méthodes de détermination n'a, jusqu'ici, pas été entreprise, pas plus qu'une étude approfondie de la reproductibilité des résultats des numérations portant sur une même préparation selon la méthode de VERGERON. Cependant les examens portant sur la détermination du nombre absolu d'éléments effectuées dans différents laboratoires ont toujours donné, pour des miels comparables, des résultats suffisamment concordants pour être utilisables.

5. — CONFECTION DES PRÉPARATIONS DE RÉFÉRENCE

5.1. — *But du procédé*

Une collection de préparations de référence constitue un complément précieux et nécessaire de la littérature méliko-palynologique.

5.2. — *Réactifs*

Diéthyl-éther pour analyse.

Glycérine-gélatine de Kaiser.

Fuchsine basique (NB) Merck en solution alcoolique (0,1 %) pour coloration de la glycérine-gélatine.

5.3. — *Échantillons*

Fleurs de plantes dont le nom scientifique et le nom vulgaire sont connus. ZANDER recommande de laisser d'abord les fleurs s'ouvrir au laboratoire (à l'extérieur, les fleurs ouvertes sont souvent contaminées par le vent ou par les visites d'insectes par le pollen d'autres plantes).

5.4. — *Mode opératoire*

5.41. — *Préparations non colorées de pollen dégraissé.*

Les anthères, les fleurs entières ou les inflorescences sont lavées dans un verre de montre rempli d'éther. On jette l'éther, on le remplace, on agite et on le jette à nouveau. Après évaporation des restes d'éther on porte le pollen sur une lame porte-objet et on l'étale régulièrement. On recouvre avec la glycérine-gélatine

liquéfiée à 40 °C. Lorsque le pollen ne gonfle que lentement on conserve la préparation à la chaleur (platine chauffante ou étuve) pendant le temps voulu pour obtenir le gonflement désiré. Lorsque le pollen éclate facilement on recommande de procéder au dégraissage à l'éther directement sur la lame et de recouvrir rapidement avec la lamelle tout en limitant le chauffage au strict minimum nécessaire.

5.42. — *Préparations non dégraissées et non colorées.*

On fait tomber le pollen des anthères sur une lame porte-objet ou bien on y dilacère des anthères mûres. Les grains de pollen sont répartis avec une aiguille et après avoir éventuellement éliminé les restes d'anthères ou les autres impuretés présentes on inclut dans la glycérine-gélatine.

5.43. — *Préparations dégraissées et colorées.*

On opère comme 6.41 mais on utilise, au lieu de la glycérine-gélatine simple, de la glycérine-gélatine colorée. Pour colorer la glycérine-gélatine on lui ajoute goutte à goutte une solution alcoolique de fuchsine. L'affinité des pollens pour la fuchsine est variable. De nombreux pollens se colorent très facilement, d'autres se colorent mal. C'est pourquoi on conserve en réserve des glycérines-gélatines plus ou moins fortement colorées. On obtient une gamme de coloration en ajoutant de 0,2 à 1,5 ml de solution alcoolique de fuchsine à 10 ml de glycérine-gélatine liquéfiée.

5.5. — *Conservation des préparations*

Les préparations de référence se modifient avec le temps. Dans les préparations qui ne sont pas dégraissées, la couleur du liant pollinique s'affaiblit. Même la couleur naturelle de l'exine pâlit. Dans toutes les sortes de préparations on constate un gonflement et une augmentation des dimensions des grains de pollen. Malgré cela les vieilles préparations ne sont pas sans valeur car elles montrent parfois de façon très nette certains détails. Elles ne sont toutefois pas utilisables pour les comparaisons de dimensions. La collection doit donc, après quelques années, être complétée par des préparations nouvelles. Le lutage des préparations avec du Caedax, du baume du Canada ou du Krönings est recommandé pour améliorer la conservation.

Dans les pays de climat chaud et humide les préparations à la glycérine-gélatine risquent de fondre ou de moisir. Pour préserver les préparations il convient de les conserver dans un réfrigérateur (ou dans une chambre froide), ou de les sceller à la paraffine. Le lut à la paraffine est obtenu comme suit (ERDTMAN, 1966, 1969) : le pollen (ou le sédiment de miel) est étalé sur la lame porte-objet sur une surface limitée et inclus dans une quantité de glycérine-gélatine suffisamment faible pour que les bords de la lamelle ne soient pas atteints et qu'il reste tout autour un vide d'environ 5 mm. Dans une coupelle en porcelaine on liquéfie de la paraffine et on la porte au moyen d'une baguette de verre sur le bord de la lamelle. Si on a préalablement réchauffé la lame, la paraffine se répand rapidement dans l'espace libre sous la lamelle et constitue un lut hermétique. Ainsi, même si la glycérine-gélatine fond par suite d'une température trop élevée, elle ne peut pas s'écouler et elle est protégée des moisissures.

*Reçu pour publication en septembre 1969.
Eingegangen im September 1969.*

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARMBRUSTER L., OENIKE G., 1929. *Die Pollenformen als Mittel zur Honigherkunftsbestimmung*, Wachholtz, Neumünster.
- ARMBRUSTER L., JACOBS J., 1934-1935. Pollenformen und Honigherkunftsbestimmung. *Arch. Bienenkde*, **15**, (8), 277-308, **16** (1, 2/3) 17-106.
- BEUG H. J., 1961. *Leitfaden der Pollenbestimmung*. 1 Lfg., G. Fischer, Stuttgart.
- BROWN C. A., 1960. *Palynological techniques*. Baton Rouge.
- DEMIANOWICZ Z., 1961. Pollenkoeffizienten als Grundlage der quantitativen Pollenanalyse des Honigs. *Pszczeln. Zesz. Nauk.*, **5**, (2), 95-105.
- DEMIANOWICZ Z., 1964. Charakteristik der Einartenhonige. *Ann. Abeille*, **7**, (4), 273-288.
- ERDTMAN G., 1966. *Pollen morphology and plant taxonomy*. I. *Angiosperms*. Offset edition with addendum. Hafner, New-York.
- ERDTMAN G., 1969. *Handbook of Palynology*. Munksgaard, Copenhagen.
- EVENIUS J., FOCKE E., 1967. *Mikroskopische Untersuchung des Honigs*. *Handbuch der Lebensmittelchemie*. Bd. 5, Teil 1, 560-590, Springer, Berlin.
- FAECRI K., IVERSEN J., 1964. *Textbook of modern pollen analysis*. 2 nd. Ed., Munksgaard. Copenhagen.
- GENIER G., 1966. Le pollen des Ericacées dans les miels français. *Ann. Abeille*, **9**, (4), 271-321
- GONTARSKI H., 1951. Zur Analyse der Formbestandteile des Waldhonigs. *Z. Bienenforsch.*, **1**, (3) 33-37.
- GRIEBEL C., 1930-1931. Zur Pollenanalyse des Honigs. *Z. Unters. Lebensmittel*, **59**, (1), 63-79, (2/3) 197-211, (5) 441-471, 61, (3) 241-306.
- HYDE H. A., ADAMS K. F., 1958. *An atlas of airborne pollen grains*. Macmillan, London.
- INTERNATIONALE KOMMISSION FÜR BIENENBOTANIK DER I.U.B.S., 1962-1963. Methodik der Honig-Pollenanalyse. *Z. Bienenforsch.* **6** (4), 115-116. — *Bee World*, **43**, (4), 122-124. *Ann. Abeille*, **6** (1), 75-76.
- LOUVEAUX J., 1961. Techniques améliorées pour l'analyse pollinique des miels, *Z. Bienenforsch.*, **5**, (7), 199-204.
- LOUVEAUX J., 1966. Essai de caractérisation des miels de Callune (*Calluna vulgaris* Salisb.), *Ann. Abeille*, **9**, (4), 351-358.
- LOUVEAUX J., 1968. *L'analyse pollinique des miels*. In *Traité de biologie de l'abeille*, T. III, 325-362, Masson, Paris.
- LOUVEAUX J., VERGERON Ph., 1964. Étude du spectre pollinique de quelques miels espagnols. *Ann. Abeille*, **7**, (4), 329-347.
- MAURIZIO A., 1939. Untersuchungen zur quantitativen Pollenanalyse des Honigs. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, **30**, (1/2), 27-69.
- MAURIZIO A., 1949. Beiträge zur quantitativen Pollenanalyse des Honigs *Beih. Schweiz Bienenztg.*, **2** (18), 320-421.
- MAURIZIO A., 1955. Beiträge zur quantitativen Pollenanalyse des Honigs 2. *Z. Bienenforsch.*, **3**, (2), 32-39.
- MAURIZIO A., 1958. Beiträge zur quantitativen Pollenanalyse des Honigs. 3. *Ann. Abeille*, **1**, (2), 93-106.
- MAURIZIO A., 1959. Zur Frage der Mikroskopie von Honigtauhonig. *Ann. Abeille*, **2**, (2), 145-157.
- MAURIZIO A., 1966. Das Pollenbild europäischer Heidehonige. *Ann. Abeille*, **9**, (4), 375-387.
- MAURIZIO A., LOUVEAUX J., 1965. *Pollen de plantes mellifères d'Europe*. Union des groupements apicoles français, Paris.

- MAURIZIO A., LOUYEAUX J., 1967. Les méthodes et la terminologie en mélisso-palynologie. *Rev. Palaeobotan. Palynol.*, **3**, 291-295.
- VAN CAMPO M., 1954. Considérations générales sur les caractères des pollens et des spores et sur leur diagnose. *Bull. Soc. Bot. France*, **101**, (5/6), 250-281.
- VERGERON Ph., 1964. Interprétation statistique des résultats en matière d'analyse pollinique des miels. *Ann. Abeille*, **7**, (4), 349-364.
- VORWOHL G., 1964. Die Beziehungen zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachtmässigen Herkunft. *Ann. Abeille*, **7**, (4), 301-309.
- VORWOHL G., 1966. Das mikroskopische Bild der Pollenersatzmittel und des Sediments von Futterteigen. *Z. Bienenforsch.*, **8**, (5), 222-228.
- VORWHL G., 1968 a. Grundzüge einer modernen Pollenbeschreibung im Rahmen der Bienen- und Honigkunde. *Z. Bienenforsch.*, **9**, (5), 224-230.
- VORWOHL G., 1968 b. Bericht über die Diskussion der Auswertungsverfahren u. über die Terminologie der mikroskopischen Honiguntersuchung. *Z. Bienenforsch.* **9** (5) : 230-231.
- ZANDER E., 1935, 1937, 1941, 1949, 1951. *Beiträge zur Herkunftsbestimmung bei Honig*. I. Reichsfachgruppe Imker, Berlin, II, III, V, Liedloff Loth Michaelis, Leipzig, IV, Ehrenwirth, München
-